

中國醫藥大學中醫學系碩士論文

指 導 教 授：賴東淵 副教授

共同指導教授：鍾景光 教授

：陳榮洲 教授

論文題目

大黃素體外抑制小鼠血癌細胞(WEHI-3)之機轉

及體內促進巨噬細胞吞噬作用的探討

Emodin inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vitro and
enhances macrophage phagocytosis in vivo

研究生：張原彰

中華民國九十九年一月

中國醫藥大學中醫學系碩士論文

指導教授：賴東淵 副教授

共同指導教授：鍾景光 教授

：陳榮洲 教授

論文題目

大黃素體外抑制小鼠血癌細胞(WEHI-3)之機轉

及體內促進巨噬細胞吞噬作用的探討

Emodin inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vitro

and enhances macrophage phagocytosis in vivo

研究生：張原彰

中華民國九十九年一月

總目錄

第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	4
第一節 實驗藥物：大黃素.....	4
一、大黃素之簡介.....	4
二、大黃素目前運用及研究結果.....	5
第二節 癌症之探討.....	6
一、症之成因.....	6
二、血癌.....	7
第三節 天然草藥及植物治療癌症相關研究之探討.....	10
第四節 實驗目的與流程設計.....	11
第三章 實驗材料及方法.....	14
第一節 實驗材料.....	14
一、細胞株及實驗動物.....	14
二、實驗藥物.....	14
三、藥品試劑.....	14
四、儀器設備.....	18
第二節 實驗方法.....	19
一、實驗藥品配置.....	19
二、細胞培養.....	20
(一)配置細胞培養基.....	20
(二)細胞株培養條件.....	20
(三)活化冷凍細胞.....	20
(四)冷凍細胞.....	21
(五)細胞計數.....	22
三、流式細胞儀的應用.....	23
(一)細胞存活率(Viability)之分析.....	23
(二)細胞內粒線體膜電位($\Delta\psi_m$)的分析.....	25
(三)細胞內活性氧化物質(Reactive oxygen species ; ROS) 的檢測.....	26
(四)細胞內鈣離子濃度(Intracellular calcium concentration) 之分析.....	27
(五)細胞內 Caspase-3 , -8 , -9 活性分析.....	27

四、DNA 裂解與電泳分析.....	29
五、西方墨點法.....	30
(一)細胞總蛋白的抽取	30
(二)蛋白質濃度的測定	30
六、細胞內分子螢光染色.....	35
(一)DAPI (4-6-diamidine-2-phenyl indole) 染色.....	35
(二)彗星試驗(Comet assay)	36
七、體內巨噬細胞吞噬作用及免疫機轉.....	38
第三節 統計分析方法(statistics analysis).....	39
第四章 結果.....	40
第一節、大黃素(Emodin)對小鼠血癌細胞株(WEHI-3)	40
一、大黃素對小鼠血癌細胞株(WEHI-3)存活率之探討.....	40
二、大黃素導致小鼠血癌細胞株(WEHI-3)DNA 受損 之探討	41
(一)DNA Fragmentation.....	41
(二)彗星試驗(Comet assay).....	42
(三)利用 DAPI 染色法檢測.....	43
三、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)產生自由基 之探討.....	44
四、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)粒線體膜電位 ($\Delta\psi_m$)改變之探討.....	47
五、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)鈣離子釋放 之探討.....	49
六、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3) Caspase-3、-8 、-9 活性之探討.....	51
七、利用西方墨點法探討大黃素影響小鼠血癌細胞株 (WEHI-3)各種相關蛋白表現之影響.....	54
(一) 探討與細胞凋亡粒線體路徑(Mitochondria-dependent apoptosis pathway)相關之蛋白表現.....	54
(二) 內質網壓力(ER stress)調控細胞凋亡路徑相關蛋白 之表現.....	59
第二節、大黃素影響體內免疫機轉及細胞吞噬之抗癌作用 探討.....	61
(一)大黃素(Emodin) 對於血癌模式小鼠(WEHI-3/BALB/c)	

治療體重、脾臟及肝臟重量變化.....	61
(二)利用流式細胞儀測得大黃素(Emodin) 對於血癌 模式小鼠 (WEHI-3/BALB/c)週邊白血球細胞族群 之分佈百分比.....	63
第五章 討論.....	66
第六章 結論.....	73
參考文獻.....	75
英文摘要.....	83



圖目錄

圖 2-1 (A)(B)大黃(<i>Rheum palmatum</i> L.)藥材及原生植物 外觀形態.....	5
圖 2-2 癌症形成之三個階段.....	7
圖 2-3 具有抗癌功效之天然植物.....	10
圖 2-4 天然食物中可能抗癌的分子標的.....	11
圖 2-5 大黃素對小鼠血癌細胞株的實驗流程圖(A)in vitro (B)in vivo.....	12
圖 3-1 細胞計數示意圖.....	22
圖 4-1 不同濃度之大黃素(Emodin)分別作用於小鼠血癌 細胞株 24 小時、48 小時細胞存活相對統計量化圖.....	41
圖 4-2 大黃素(Emodin)以不同濃度作用於小鼠血癌細胞株 (WEHI-3)共同培養 24 小時之後，觀察 DNA Fragmentation 的情形.....	42
圖 4-3 不同濃度大黃素(Emodin)作用小鼠血癌細胞株 (WEHI-3)培養 24 小時後，利用彗星試驗分析觀察 DNA 受損的情形.....	43
圖 4-4 不同濃度大黃素(Emodin)作用小鼠血癌細胞株 (WEHI-3)培養 24 小時後，利用 DAPI 染色法檢測 分析觀察細胞凋亡的情形.....	44
圖 4-5 大黃素(100 μ M)作用於小鼠血癌細胞株(WEHI-3) 0、1、3、6、12 小時 (A)流式細胞儀分析細胞內 ROS 表現量分析圖.....	46
(B)細胞內 ROS 表現量之相對統計圖.....	46
圖 4-6 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)培養 0、1、3、6、12 小時 (A)流式細胞儀分析細胞內粒線體膜電位變化分析圖.....	48
(B)細胞內粒線體膜電位變化之相對統計圖.....	49
圖 4-7 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)培養 0、1、3、6、12、24 小時 (A)流式細胞儀分析細胞鈣離子濃度變化分析圖.....	40
(B)細胞鈣離子濃度變化之相對統計圖.....	51

圖 4-8 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3) Caspase-3、-8、-9 活性分析	
(A)大黃素作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3) Caspase-3 、-8、-9 活性分析圖.....	53
(B)大黃素和 N-acetylcysteine (NAC)及 Pan-caspase inhibitor 作用老鼠血癌細胞株(WEHI-3)細胞 存活率分析圖.....	54
圖 4-9 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)以 不同時間點培養，細胞凋亡機制相關 Bcl-2 family 蛋白表現情形.....	57
圖 4-10 (A)(B)大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3) 以不同時間點培養，細胞凋亡粒線體路徑之相關蛋白 表現情形.....	58
圖 4-11 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)以 不同時間點培養，細胞凋亡機制內質網路徑之相關 蛋白表現情形.....	60
圖 4-12 大黃素(Emodin) 對於血癌模式小鼠(WEHI-3/BALB/c) 治療(A)體重(B)脾臟及(C)肝臟重量變化.....	62
圖 4-13 大黃素(Emodin)對於血癌模式小鼠(WEHI-3/BALB/c) 週邊白血球細胞族群之分佈百分	
(A)CD3.....	63
(B)CD19.....	64
(C)CD11b.....	64
(D)MAC-3.....	64
圖 4-14 大黃素影響了巨噬細胞吞噬作用	
(A)周邊.....	65
(B)腹膜.....	65
圖 6-1 大黃素誘導細胞凋亡.....	74

表目錄

表 3-1 10 倍濃度磷酸鹽緩衝液(10x phosphate buffer saline , PBS)成分.....	24
表 3-2 蛋白質標準品之製備.....	31
表 3-3 SDS-PAGE 下層膠(separation gel)之製備與組成.....	32
表 3-4 SDS-PAGE 上層膠(stackion gel)之製備與組成.....	32
表 3-5 電泳緩衝液(running buffer; 1.5M Tris-HCl, pH8.8) 之組成.....	32
表 3-6 stacking buffer (0.5M Tris-HCl, pH6.8)之組成.....	32
表 3-7 轉染緩衝液(transfer buffer)之組成.....	34
表 3-8 PBS-Tween 20 之組成.....	34
表 3-9 comet assay 之 lysis buffer 的製備.....	37
表 3-10 alkaline buffer 之製備.....	37
表 3-11 Tris buffer 之製備.....	37
表 4-1 Bcl-2 family 家族蛋白分類.....	55

大黃素體外抑制小鼠血癌細胞(WEHI-3)之機轉

及體內促進巨噬細胞吞噬作用的探討

指 導 教 授：賴東淵 副教授

共 同 指 導 教 授：鍾景光 教授

：陳榮洲 教授

研究生：張原彰

大黃素(Emodin)是中藥大黃(*Rheum palmatum* L.)萃取物主要活性成份並被廣泛應用在中醫學研究，大黃素已證實能夠導致多種人類癌細胞株產生凋亡，如：肺癌、子宮頸癌、黑色素細胞癌、食道癌以及肝癌等，但目前沒有相關研究證明大黃素能使小鼠血癌細胞株(WEHI-3)產生凋亡。本實驗探討大黃素是否對小鼠血癌細胞株(WEHI-3)誘發抗癌活性機轉及促進細胞吞噬之免疫調節。藉由流式細胞儀分析結果發現大黃素能夠讓細胞週期停滯於 G0/G1 期，最後走向細胞凋亡，結果可經由 DAPI stain 及 DNA 電泳觀察到 DNA 斷裂情形證實。藉由流式細胞儀分析測得大黃素作用後的小鼠血癌細胞(WEHI-3)裡的活性氧化物(ROS)濃度上升、鈣離子釋放及粒線體膜電位(MMP)下降等細胞凋亡重要指標，結果經西方墨點法證實大黃素能使癌細胞中的 Bcl-2 表現量下降，Bax 表現量上升。實驗結果可證實：大黃素能引起細胞中粒線體膜電位(MMP)改變導致凋亡蛋白 Cytochrome c 從粒線體釋放出而活化了 Caspase-3，進而誘發小鼠血癌細胞

株(WEHI-3)走向凋亡路徑。免疫作用上，大黃素能增加巨噬細胞 (macrophage)吞噬作用，研究發現實驗組動物肝臟及脾臟重量較對照組減輕，且讓注射 WEHI-3 老鼠體中 CD11b 及 CD19 免疫細胞數量增加而有關巨噬細胞分化之 Mac-3 則是下降。大黃素血癌小鼠周邊及腹膜之巨噬細胞有促進吞噬能力作用。結論，大黃素具有抑制 WEHI-3 細胞及促細凋亡作用並能促進巨噬細胞吞噬能力。

關鍵字：大黃素，中藥大黃，小鼠血癌細胞株，細胞凋亡，吞噬作用



第一章 前言

癌症一直是國人十大死因之首，根據 2008 年行政院衛生署統計約有三萬八千多人死於癌症【1】，且有逐年增加的趨勢，而每年新增加的癌症病例數也將近六萬人。癌症的發生目前還無法完全證實，可能是環境因素、遺傳因子、飲食習慣等有關，儘管醫療技術日新月異，但癌症仍是一個難以對抗的疾病，因此全球許多研究人員都致力於癌症方面的研究，以期能找到最佳治療癌症的方法。

血癌又稱白血病(Leukemia)，也就是白血球異常所產生的癌症，在台灣血癌為癌症死因的第十三位，目前雖然已從台灣十大癌症死因中除名，但仍是女性癌症死因的第十位，小兒癌病的首位。血癌在近幾年的發生率有逐漸上升的趨勢，且發病的人數更有逐年增加之勢。白血病的成因式多重的，包括：基因突變(如唐氏症)、暴露於有放射線污染的環境(如車諾比爾核爆意外)、病毒感染、(如 HTLV-I 病毒)、化學物品的刺激、以及體質的因素(癌基因的表現型)等，都是目前醫學上認為可能導致白血病的成因。白血病的發生是血液或骨髓內白血球不正常的過度增生，而其成因及臨床表現皆不相同，一般分成急性與慢性兩型，兒童的白血病多屬急性淋巴性白血病；而成人則大都是急性骨髓性或慢性淋巴性白血病，尤其是慢性淋巴性白血病多為 60~70 歲以上的老人。由於血球新陳代謝極快，故

白血病患者可以在數日內突然發病，尤其是急性白血病，倘若是未給予及時治療，因癌細胞會迅速侵潤及破壞骨髓，造成正常的造血功能受到抑制而形成貧血、出血或是內臟出血等情況，又血液中的癌細胞過多時也容易導致血栓等等，這些症狀嚴重的話都足以致命，若是延誤了治療，病人之存活期很少超過三至六個月，因此找出正確、適當治療血癌的方法絕對是重要的事，而對於癌症的預防及抗癌藥物的研究篩選及開發，更是在癌症醫學中值得去重視及探討的。

近年來許多研究顯示，將天然中草藥的有效活性成分給予癌症治療，能夠得到良好的治療效果，由於目前臨床上用於抗癌的化學療法、放射線療法所產生的副作用讓患者在接受治療相當辛苦，且病人在治療過程免疫功能下降容易產生感染、生理機能失調等情況，因此若能研發出副作用低且能使癌症的治療效果與化療藥物有相同作用的天然中草藥將是癌症醫學治療的一大進步。

研究用大黃素 (Emodin; 6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone)，它是由中草藥大黃(Rhubarb)萃取出來主要成分【2】。大黃為中醫臨床常用中藥，具有瀉下攻積、涼血解毒、清熱利濕等作用，現代藥理研究及臨床應用表明，大黃具有良好的抗病毒、止血、健胃、利膽、瀉下、解熱、鎮痛、抗炎、利尿、降脂、降壓、抗腫瘤及改善肝腎功能等多種作用【2,3】。大黃素則具有多種藥理學作用，如抑制胰酶活性、抗炎、抑菌、抗氧化、利

尿、免疫調節、保護肝腎、鬆弛血管、促進胃腸蠕動及抑制血小板聚集、改善微循環等【4】，近年來，國內外關於大黃素抗腫瘤的研究取得了一定進展，相關研究報導也日益增加，如抗肺癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌等【5,6】。本研究擬對大黃素體外抑制老鼠血癌細胞(WEHI-3)之機轉及體內促進巨噬細胞吞噬作用進行探討研究。



第二章 文獻探討

第一節 實驗藥物：大黃素

一、大黃素之簡介

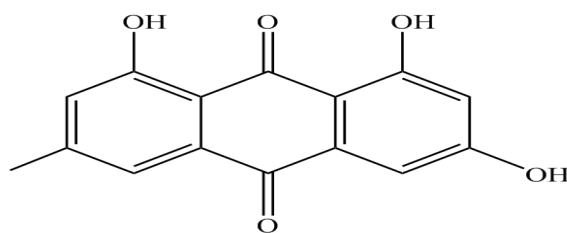
1、藥物名稱：大黃素 (Emodin; 6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone)

2、藥物性狀：淡黃色粉末

3、分子式： $C_{15}H_{10}O_5$

4、分子量：270.24 g/mol

5、分子結構式：



6、植物來源：

大黃素(Emodin)主要是中藥大黃(*Rheum palmatum* L.)萃取而來。大黃原產於甘肅、青海、西藏、四川等地，是多年生的落葉草本植物，圓錐花序，屬於蓼科植物(圖 2-1)。大黃外表黃棕色錦紋及星點明顯，體重質堅硬，有油性氣清香，味苦而不澀。掌葉大黃 *R.palmatum*、唐古特大黃 *R.tanguticum*、藥用大黃 *R.officinale* 三種是臨床常用品種【2】。

(A)



(B)



圖 2-1 (A)(B)大黃(*Rheum palmatum* L.)藥材及原生植物外觀形態

二、大黃素目前運用及研究結果

1、中醫藥觀點及臨床運用：

大黃最早記載於《神農本草經》，列為下品，性味苦寒，歸胃、大腸、肝、脾，其性走而不守、因個大色黃而得名，故陶弘景曰：「大黃，其色也。將軍之號，但取其駿快也」。大黃是中醫臨床最常用得藥物之一，其一般的功效為瀉熱通便、涼血解毒、逐瘀通經、實熱便秘、積滯腹痛、瀉痢不爽、濕熱黃疸、目赤咽腫、腸痛腹痛、痛腫療瘡、瘀血經閉、跌打損傷、外治水火燙傷等【2】。

2、抗腫瘤藥理作用機轉：

大黃素抗腫瘤機制目前尚未完全被了解，但國內外關於大黃素抗腫瘤的研究取得了一定進展，報導也日益增多。以下擬對大黃素抗腫瘤分子機制方面的研究進展進行綜述：

(1) 大黃素能抑制多種人肝癌細胞系的生長並啟動 P53 和 P21 蛋白表

達，從而阻斷 HepG2/C3A 細胞週期停滯於 G2/M 期；並且，大黃素可通過啟動 P53、P21、Fas/APO-1、Caspase-3 等誘導 HepG2/C3A 細胞的凋亡【7】。

(2) 大黃素能濃度和時間依賴性抑制人肝癌細胞生長，導致這些腫瘤細胞產生 ROS，引起細胞內線粒體膜電位降低，啟動 Caspase-9、Caspase-3，從而導致 DNA 片段化和細胞凋亡【8】。

(3) 大黃素通過對 FAK、ERK1/2、Akt 和 AP-1、NFκB 轉錄活性的抑制作用，能夠有效抑制透明質酸誘導的 MMP-9 分泌及神經膠質瘤的侵襲與轉移【9】。

(4) 大黃素能濃度依賴性抑制 VEGF-A、bFGF 誘導的人臍靜脈內皮細胞(HUVECs)增殖、遷移及管樣形成【10】。

第二節 癌症之探討

一、癌症之成因

以台灣地區而言，癌症，自民國七十一年來已連續二十幾年高居國人死因之首位，且癌症的發生率及死亡率皆有逐年升高的趨勢，癌症的形成可能藉由各種環境因素、遺傳因子所衍生而產生，例如(1)化學物質：亞硝酸胺、油煙、某些染料等等。(2)輻射線：X 光射線、核爆炸等。(3)其他：日光中的紫外線可能和皮膚癌的形成有關。以上種種都可能讓附近的細胞產生變化，而造成癌症。癌症又名惡性腫瘤(malignant tumor)，是指生物體

內不正常細胞不受控制的生長、不斷分裂，且具有自我更新的能力，甚至能夠侵略鄰近的組織或器官導致週邊的器官也產生新的腫瘤，如圖 2-2【11】。癌症的成因至今尚未明確，因此關於癌症這方面的研究，是值得重視繼續發展的。

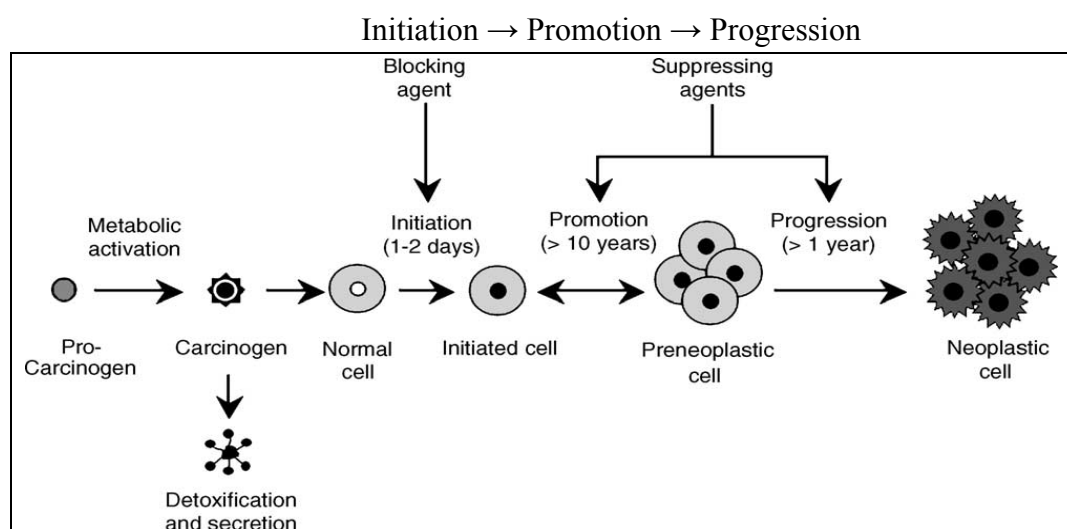


圖 2-2 癌症形成之三個階段【11】

二、血癌

(一)血癌之成因

血癌在近幾年的發生率有逐漸上升的趨勢，而除了遺傳之外，病毒和輻射污染等，都可能是導致血癌發生的原因。俗稱『血癌』的白血病是血液或骨髓內白血球不正常的過度增生，而其成因及臨床表現皆不相同，一般分成急性與慢性兩型，兒童的白血病多屬急性淋巴性白血病；而成人則大都是急性骨髓性或慢性淋巴性白血病。白血病的成因是多重的，包括：基因突變、放射線污染的環境、病毒感染、化學物品的刺激、以及體質的

因素(癌基因的表現型)等，都是目前醫學上認為可能導致白血病的成因【12】。

(二)臨床症狀【12,13】

(1)急性白血病：

急性白血病症狀常以貧血、高燒不退(三天以上)及出血不止等傾向來表現，約有四成的病人會出現身體多處皮膚的紫斑、點狀出血或牙齦出血不止；尤其是經血不止或拔牙後流血不止，經送醫後發現是白血病患者亦不在少數，但最早的症狀可能是全身倦怠。

(2)慢性白血病：

慢性白血病較不會有明顯的症狀，但會感到倦怠、精神不振、皮膚常出現紫斑淤血，也比較容易感冒或發燒；而慢性淋巴性白血病則常出現頸部淋巴腺腫大或脾臟腫大；須注意的是，因症狀不明顯，往往必須是透過常規的血液檢查後，才發現有不正常、不成熟的白血球，才被診斷出白血病。在老年人一般來說與年輕者並無不同，但少數病例會出現泛血球貧血症，也就是紅血球、白血球及血小板都顯著地減少，此時很容易病發敗血症(細菌感染)以及嚴重出血。兒童則會產生骨痛，腿骨或胸骨等部位的疼痛。

(三)目前治療方式

白血病的治療，依急性或慢性以及淋巴球或骨髓性(非淋巴球性)白血

病，而有不同的治療方式。急性白血病的治療越來越進步，病人在藥物的控制下，多有不錯的治療成果，相較之下，慢性白血病則較以控制病情為主。但大致來說，均是以化學治療為主。一般來說，白血病化學治療的第一階段為「誘導性化學治療」，目的在殺死不正常的血癌細胞，已達成完全緩解，故又稱【緩解性治療】。待病患達成初步的完全緩解後(一般需時30天)，接著進行第二階段的加強性治療，或稱「實質性強化治療」，其目的在清除殘餘的癌細胞；而做完第一階段與第二階段的治療之後，有些病人可能還需做為期二年的「維持性治療」。然而須注意的是在治療的過程中，病人常會有些副作用，如掉髮、噁心等，甚至有出血或細菌感染等情形出現，此時醫師多用抗生素或輸入血小板來控制治療。

(四)血癌的高危險群

- (1)家族中有罹患白血病或者是症候群者
- (2)家族中有罹患神經纖維瘤者
- (3)過去曾接受過甲基類化學藥物治療癌症
- (4)生活環境中受輻射線污染而受害者
- (5)曾被證實有不正常的染色體或抑癌基因缺損者
- (6)曾受 HTLV-I (人類嗜 T 淋巴球)病毒感染者

第三節 天然草藥及植物治療癌症相關研究之探討

有報導指出自然界中含有多種天然抗癌物質，它們被廣泛地存在於新鮮水果和蔬菜中，同時也有大量科學證據顯示蔬菜與水果對於預防上皮組織癌如肺癌、子宮癌、食道癌、胃癌、大腸癌與胰腺癌等最為有效，已有許多文獻證實預防癌症及抗癌藥物大多是由水果或蔬菜植物當中所萃取而來的，從當中所提煉衍生而來的植物化學物質，通常統稱為化學保護劑 (chemopreventive agents)，像是 curcumin、emodin、resveratrol、barberin 等等，圖 2-3【14】。然而這些 Dietary agents 會因所含主要成份差異而有不同的抗癌分子機制，圖 2-4【14】。

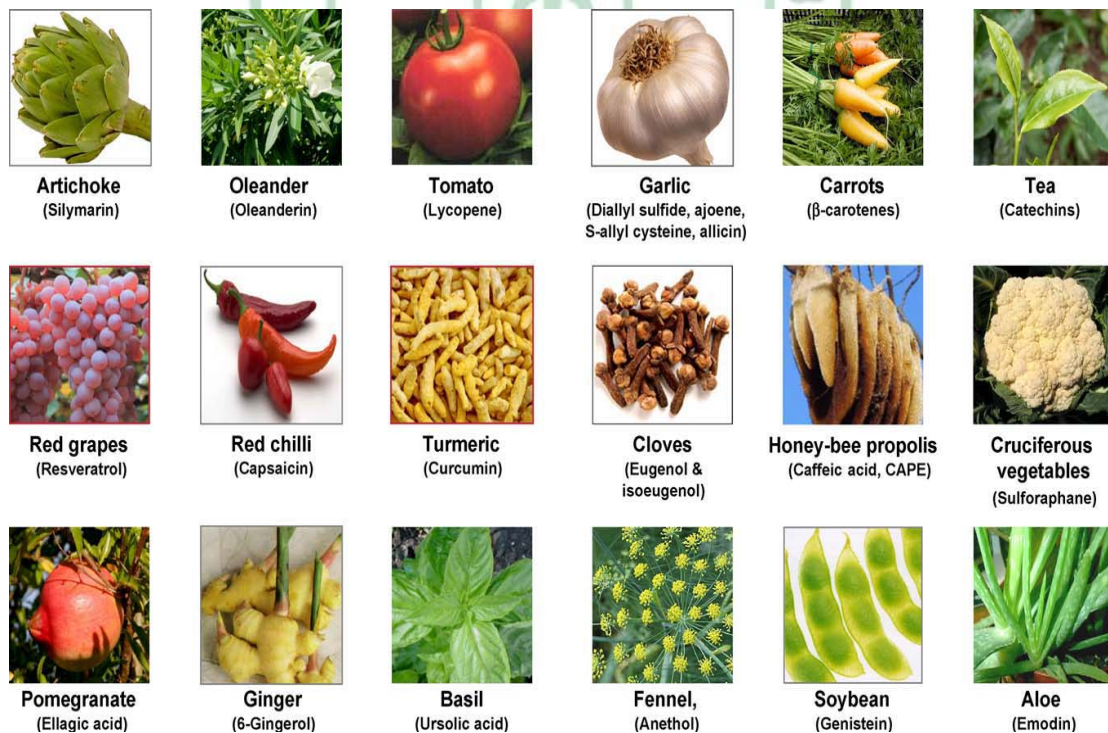


圖 2-3 具有抗癌功效之天然植物

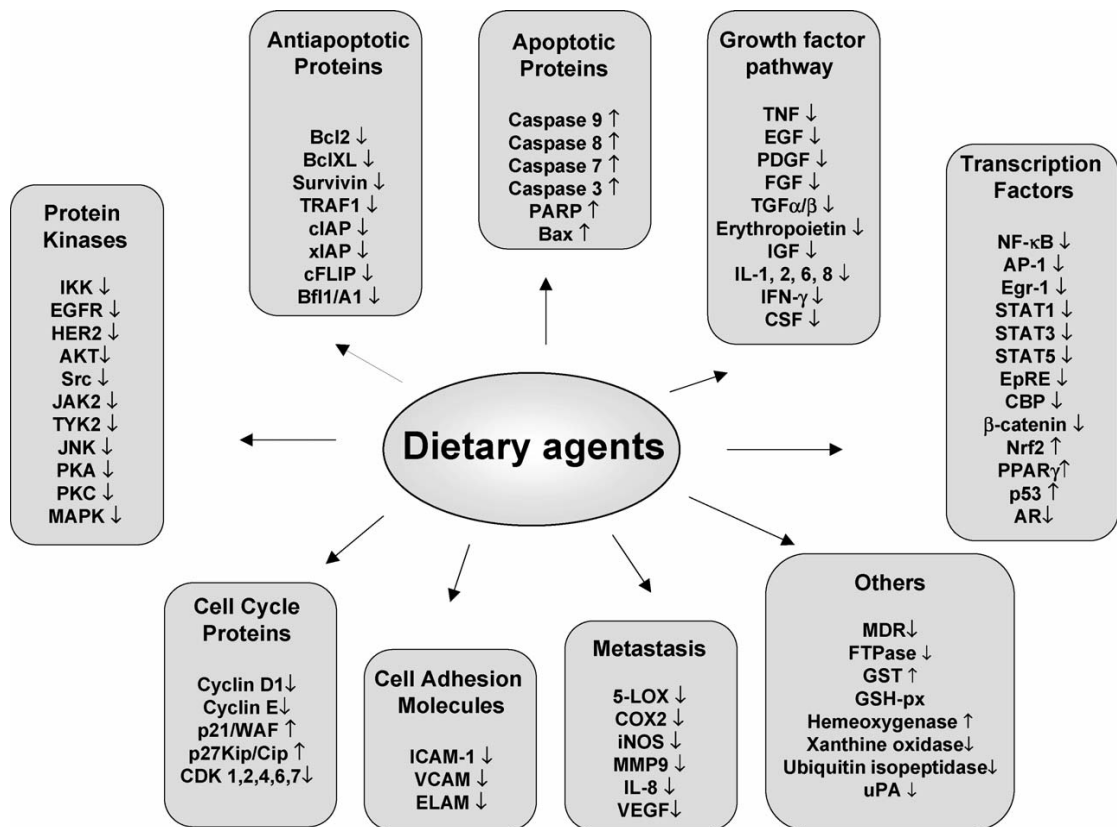


圖 2-4 天然食物中可能抗癌的分子標的

第四節 實驗目的與流程設計

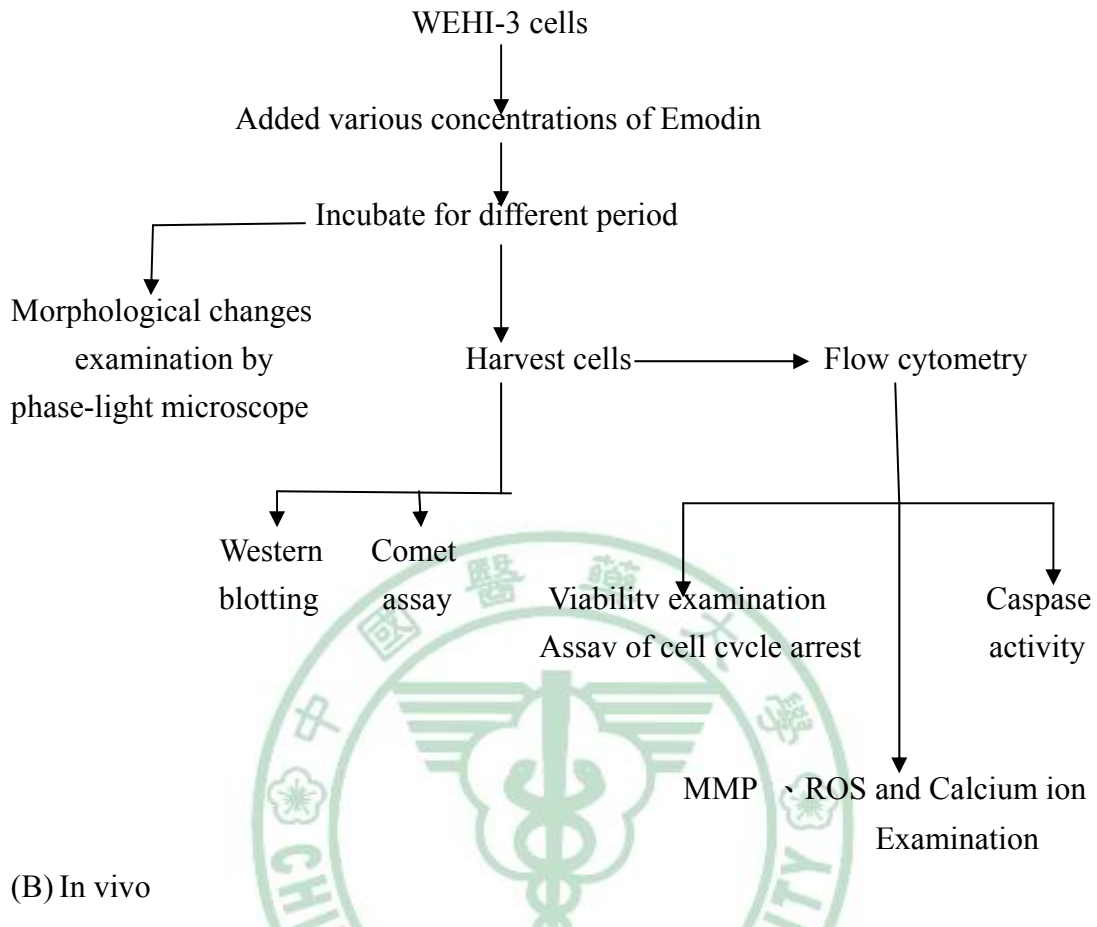
一、實驗目的：

本實驗目的的主要為探討大黃素(emodin)誘導小鼠血癌細胞株(WEHI-3)產生細胞凋亡之路徑以及分子機轉及促進巨噬細胞吞噬作用之免疫機轉。

二、實驗流程設計：

實驗流程如圖 2-5

(A) In vitro



(B) In vivo

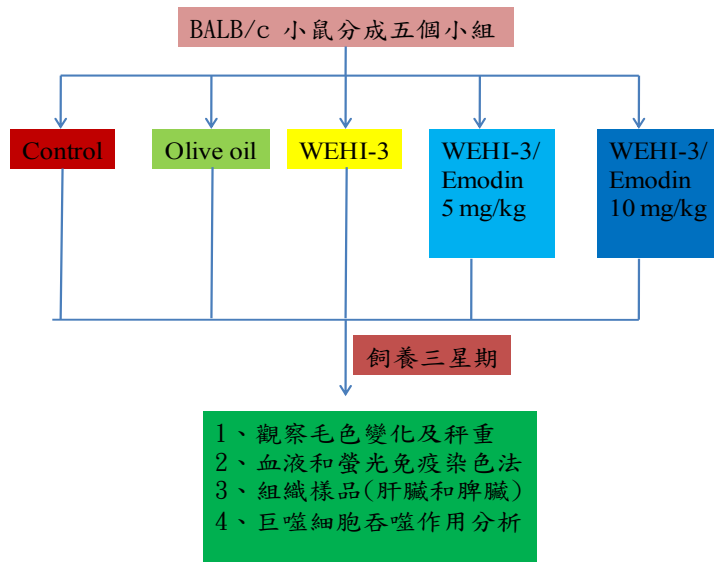


圖 2-5 大黃素對小鼠血癌細胞株的實驗流程圖(A)in vitro (B)in vivo

實驗說明如下：

將大黃素(Emodin)作用於小鼠血癌細胞株(WEHI-3)

(1)利用流式細胞儀偵測經 Emodin 處理過後之細胞株的存活率，並取得

$IC_{50}=40\ \mu\text{M}$ 作為日後實驗所需的濃度。

(2)利用流式細胞儀偵測經 Emodin 處理過後之細胞株的 DNA 狀態，以

及進行其細胞週期的分析。

(3)藉著 DAPI 染色、彗星試驗(Comet assay) DNA 斷裂分析(DNA

fragmentation assay)等實驗，觀察其細胞內 DNA 損傷的情形。

(4)利用流式細胞儀分析經 Emodin 處理過後之細胞株的粒線體膜電位

變化、活性氧化物釋放量以及細胞內鈣離子的濃度。

(5)利用西方墨點法(Western blot)觀察其蛋白表現量變化，進而推論大黃

素(Emodin)誘導小鼠血癌細胞株(WEHI-3)產生細胞凋亡作用之相關

路徑。

(6)動物實驗觀察實驗動物體重及脾臟肝臟重量改變、血中免疫

球蛋白變化情況及巨噬細胞吞噬能力變化情況。

第三章 實驗材料及方法

第一節 實驗材料

一、細胞株及實驗動物

本研究之實驗細胞株為小鼠血癌細胞株(Mouse BALB/c myelomonocytic leukemia cells:WEHI-3)購自新竹食品發展工業研究所 (Food Industry Research and Development Institute)，實驗動物來自台灣大學動物實驗中心，體重介於 22-28 g 八週之 Male BALB/c mice。

二、實驗藥物

大黃素(Emodin)購自於 Sigma (St. Louis, MO, USA).

三、藥品試劑

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO): 購於 Sigma Chemical Co.
2. Trypsin-EDTA: 購於 Amersco
3. Fetal bovine serum (胎牛血清; FBS): 購於 Gibco
4. Ethanol: 購於 TEDIA
5. Penicillum Streptomycin (PS): 購於 Gibco
6. Trypan blue: 購於 Sigma Chemical Co
7. RPMI medium: 購於 Gibco
8. L-Glutamine (麩胺酸; LG): 購於 Gibco
9. Methanol: 購於 TEDIA

10. Formaldehyde: 購於 Merck
11. Agarose I : 購於 Amresco
12. Acrylamide / Bis 40% solution (ACRYL/BIS™ 29:1): 購於 Amresco
13. Ammonium persulfate (APS): 購於 Amersco
14. ATP Determination Kit: 購於 Blossom Biotechnologies, Inc.
15. BioMax Flim: 購於 Kodak
16. Bovine serum albumin (BSA): 購於 Merck
17. 10X SDS buffer (Sodium dodecyl sulfate): 購於 Amresco
18. Trypsin-EDTA: 購於 Amersco
19. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine): 購於 Amresco
20. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane): 購於 Amresco
21. Tween 20: 購於 Amresco
22. Protein marker: 購於 Femantas
23. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit): 購於 Amersham
24. Glycine: 購於 Amresco
25. RNaseA (Ribonuclease A) : 購於 Amresco
26. Disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄): 購於 Merck
27. PhiPhiLux[®]-G₁D₁kit: 購於 Oncolmmunin (Gaithersburg; MD; USA)
28. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄): 購於 Merck

29. Potassium chloride (KCl): 購於 Merck
30. Protein assay-Dye reagent concentrate: 購於 Bio-Rad
31. Sodium chloride (NaCl): 購於 Merck
32. Propidium iodide (PI): 購於 Sigma Chemical Co.
33. Triton X-100: 購於 Sigma chemical Co.
33. 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6): 購於 Calbiochem
34. 顯影劑：購於 Kodak
35. 定影劑：購於 Kodak
36. 核酸純化試劑組(DNA purification kit)：購於 Gene Mark
37. 蛋白質萃取試劑(protein extraction solution) (PRO-PREP)：購於 iNtRON Biotechnology, INC.
38. 5X TBE buffer: 購於 Amresco
39. Fluo-3 (calcium)：購於 Calbiochem
40. H₂DCFDA (ROS 試劑)：購於 Calbiochem
41. Primary antibody (1⁰ 抗體)：
 - A. anti-β-actin: 購於 Oncogen
 - B. anti-cytochrome c: 購於 Oncogen
 - C. anti-Bcl-2: 購於 Oncogen
 - D. anti-Bcl-xl/xs: 購於 Oncogen
 - E. anti-Bax: 購於 Sigma Chemical Co.

- F. anti-Bid: 購於 Sigma Chemical Co
- G. anti-caspase 3: 購於 Upstate
- H. anti-caspase 8: 購於 Upstate
- I. anti-caspase 9: 購於 Upstate
- J. anti-ATF-6 α : 購於 Upstate
- K. anti-CDK2: 購於 Upstate
- L. anti-CDK6: 購於 Upstate
- M. anti-Cyclin D: 購於 Upstate
- N. anti-Cyclin E: 購於 Upstate
- O. anti-PARP: 購於 Upstate
- P. anti-PERK: 購於 Upstate
- Q. anti-p27: 購於 Sam cruz Biotechnology
- R. anti-p53: 購於 Sata cruz Biotechnology
- S. anti-pl6: 購於 Sam cruz Biotechnology
- T. anti-p21: 購於 Sata cruz Biotechnology
- U. anti-Endo-G: 購於 Oncongen
- V. anti-MKK7: 購於 Oncongen
- W. anti-GRB2: 購於 Oncongen
- X. anti-XIAP: 購於 Sigma Chemical Co.

42. Secondary antibody (2⁰ 抗體) :

A. anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody :

購於 Chemicon

B. anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody : 購

於 Chemicon

C. anti-goat IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody : 購

於 Chemicon

D. anti-sheep IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody :

購於 Chemicon

四、儀器設備

1. 細胞培養皿：購自 FALCON

2. 細胞培養盤：購自 FALCON

3. 細胞培養箱：購自 Nuaire

4. 細胞計數器(haemocytometer)：購自 Boeco

5. 倒立式位像差顯微鏡(phase-contrast microscope)：Olympus

6. 微量天平(TE-200; MILLTER)

7. 去離子水製造機：購自 Minipore

8. 電源供應器：購自 Amershan

9. 酸鹼值測定計(C831)：購自 Consort

10. DNA 電泳槽: 購於 Mupid-2
11. Mini-3D Shaker: 購於 Boeco
12. PVDF membrane: 購於 Minipore
13. SDS-PAGE 電泳槽套組: 購於 Bio-Rad
14. Transfer Cell Blot 套組: 購於 Bio-Rad
15. 加熱板: 購自 Lab-Line
16. 流式細胞計數儀(flow cytometry): 購自 Becton Dickinson
17. 高速離心機:購自 HERMLE
18. 分光光度計: 購自 Beckman
19. 光學顯微鏡(Nikon LABOPHOT-2): 購自 Nikon
20. 酵素免疫分析儀(Anthos 2020): 購自 Anthos Labtec, Australia
21. 冷凍管: 購自 TPP
22. 溫控離心機:購自 Beckman
23. 乾浴槽(Model II 0001):購自 Beckman
24. 無菌操作臺: 購自 Lian Shen
25. 微量離心管:購自 Orange
26. 雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡:購自縉階生物科技股份有限公司

第二節 實驗方法

一、實驗藥品配置

大黃素(Emodin; 6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone)分子量 270.24 g/mol。以 DMSO 為溶劑，將大黃素配置成 25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 等濃度作為實驗用的加藥濃度，配置好的藥物放置於-20 $^{\circ}$ C 作為保存。

二、細胞培養

(一)配置細胞培養基(RPMI-1640 medium)【15】

培養小鼠血癌細胞株(WEHI-3)所使用的培養基均為 RPMI-1640 medium，並且其培養基內還添加胎牛血清(fetal bovine serum;FBS)、抗生素(PS)，麩胺酸(LG)，此培養基最終含有 10% FBS，100 units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycin 以及 2 mM L-Glutamine。

(二)細胞株培養條件

首先將新鮮的培養基回溫至 37 $^{\circ}$ C，使用 70%的酒精擦拭檯面。所有放入無菌操作檯的物品都要以 70%的酒精擦拭，並帶無菌手套進行以下的實驗。老鼠血癌細胞株(WEHI-3)培養在已配置好的 RPMI-1640 medium 培養基中，置於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱中培養，定期更換新鮮的培養液，當其細胞長到八分滿時即繼代下來做實驗。

(三)活化冷凍細胞【15,16】

細胞解凍的過程必須以快速的原則，否則形成冰晶將會對細胞造成傷害，為了避免在凍細胞的過程中，因水分形成的冰晶傷害細胞，往往將

DMSO 的濃度調高到 7%以作為抗凍的保護措施，所以當快速解凍後也必須快速的加入培養基以稀釋 DMSO 到 1%以下，因為 DMSO 具有介面活性劑的性質，對於細胞膜具有傷害性，DMSO 濃度小於 1%的情況下則是安全的。首先將新鮮的細胞培養基放入 37°C 水浴鍋中，等待培養基回溫至 37°C 時，接著取已回溫好的培養基 10 ml 至滅菌的 15 ml 離心管中，再從液態氮中取出冷凍管，迅速的將冷凍管移至 37°C 水浴鍋中，使冷凍管裡的細胞液快速解凍，盡量能在 1~2 分鐘內融化，融化之後將冷凍管裡的細胞液取至含有回溫好的新鮮培養基中。使其混和均勻後，以 1500 rpm 的速度離心 5 分鐘後，去除上清液，再加入新鮮的培養基 10 ml，接著移入 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養，隔日更換新鮮的培養基。

(四)冷凍細胞【15,16】

將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)大量培養後可用液態氮冷凍保存細胞，欲保存冷凍的細胞盡量是採用細胞處於生長旺盛且存活率高的細胞情況來進行冷凍。首先需配製冷凍保存液，將 DMSO 加入新鮮培養基中，最後濃度為 7%混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞液來計數細胞。之後細胞離心後去上清液，加入事前配製好的保存液，使細胞數保持在 1~5x10⁶ cells/ml，混合均勻後分裝至冷凍保存管中(1 ml/vial)，在管外標示細胞名稱、數目以及日期。冷凍過程為冷凍管置於 4°C：10 分鐘→ -20°C：30 分鐘→ -80°C：16~18 小時→最後置入液態氮桶中(-196°C)長期儲存，並取少

量細胞懸浮液作污染檢測。

(五)細胞計數【16】

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 上方蓋上蓋破片後，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 之細胞數目(圖 3-1)。

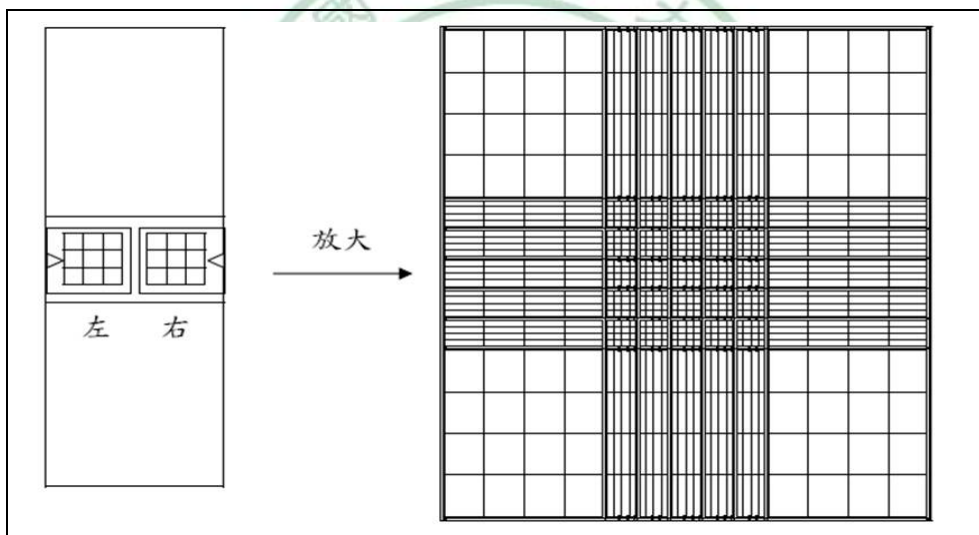


圖 3-1 細胞計數示意圖

(細胞計數盤)存活細胞測試的原理為 dye exclusion，因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 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% 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 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，死細胞為藍色。計數四個大方格之細胞總數後除 4 平均，再乘以稀釋倍數 2，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 100 個細胞)，需再加入更多的培養液稀釋。

三、流式細胞儀的應用

(一)細胞存活率(Viability)之分析【17】

原理：流式細胞儀分析原理是藉由接收不同波長的螢光來區分及定量。當細胞死亡的時候，其細胞膜會呈現不完整狀態，因此利用 Propidium Iodine (PI) 染劑，可以染細胞核內的核酸，而細胞膜完整的細胞則會被 PI 染上，因為細胞是處在正常健康狀態下，其細胞膜是完整且具良好通透性，但細胞若是發生凋亡、壞死等作用時，細胞膜則呈現不完整、破裂等狀態，當細胞膜破損便會使細胞核的 DNA 被 PI 染劑染上，被染上 PI 的細胞再利用流式細胞儀分析，可以在 488 nm 的位置激發出螢光，死亡的細胞會呈現出較高的紅色螢光，存活的細胞則有較弱的紅色螢光，再以 Cell Quest 軟體分析。

步驟：將小鼠血癌細胞(WEHI-3)，加入 12 well 的培養盤以 1×10^5 cells/ml 的密度培養實驗需要的時間，以 DMSO (dimethylsulfoxide) 為溶劑，最後加入不同濃度的大黃素(Emodin) ($25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 為最終

濃度)，1% DMSO 為 control 組。等待培養時間(分別培養 6、12、24、48 小時)到之後，收取細胞以 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 2ml PBS 清洗後再離心去上清液，於避光加入 500 μ l (400 μ g/ml PBS) PI (propidium iodide) solution，接著以固定計數秒數(20 秒)及流速(35 μ l/min)的速度進行流式細胞計數儀檢測。每個實驗組皆三重複取平均值增加實驗的準確度。

- PBS (Phosphate Buffer Saline)的配製製備 10 倍的 PBS，秤取 NaCl 160 g；KCl 4 g；Na₂HPO₄ 23 g；KH₂PO₄ 4 g，加 D.D.Water (double deionized water)至 2 公升，利用攪拌子攪拌使完全溶解，以 0.22 μ m 的濾膜過濾，使用時在加以稀釋成 1 倍的濃度。

表 3-1 10 倍濃度磷酸鹽緩衝液(10x phosphate buffer saline, PBS)成分

組成	重量(g)
NaCl	160.0
KCl	4.0
Na ₂ HPO ₄	28.8
KH ₂ PO ₄	4.8
Add D.D.Water 2000 ml	

- PI (propidium iodide)染劑配置

先配置出濃度為 2 mg PI/100 ml PBS 作為 PI stock，於要進行實驗時再利用 PBS 將 PI stock 稀釋五倍，最後足以 0.4 mg PI/100 ml PBS 作為實驗所使用濃度。

(二)細胞內粒線體膜電位($\Delta\psi_m$)的分析

原理：細胞膜電位探針，DiOC6 (3, 3'-dihexyloxacarbocyanine)為對粒線體具專一性之親脂性陽離子螢光染劑，容易跟帶有負電性之粒線體內膜結合，當粒線體受刺激去極化而失去內膜之負電荷時，內膜被標定的 DiOC6 會減少，因此螢光強度也降低，可作為偵測粒線體膜電位(MMP)之指標

【18】。在流式細胞儀中可由 488 nm 雷射激發出 525 nm 的螢光，以 FL1 之濾鏡偵測所放出的螢光強度，藉以分析 MMP。而粒線體的去極化 (mitochondria membranes depolarization)伴隨早期的細胞凋亡發生，因此亦可當做細胞早期凋亡偵測上的指標。

試劑：DiOC6 (3, 3'-dihexyloxacarbocyanine)10 μ l DiOC6/500 μ l PBS

步驟：培養細胞之細胞數約 2×10^5 cells/well，要有 1~2 個 well 做空白對照 (blank)。將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)分別種於 12well 培養盤中，均給予大黃素(Emodin) 100 μ M(最終濃度)，分別培養 1 小時、3 小時、6 小時、12 小時後收集細胞，離心到第二次時，準備 MMP 試劑(每支離心管所需的量是 10 μ l MMP 試劑加 500 μ l 之 1 倍的 PBS)，離心後，去上清液，避光加入配製好的 MMP 染劑，於 37°C 中避光 30 分鐘，之後上流式細胞儀分析。將 blank (紅色的 peak)調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control (藍色的 peak)調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1 及 M2 其 gate 約等於 50%，樣品上機後，分析 MMP (peak 往右代表樣品的膜電位上升，往左代表膜電位下降)。

(三)細胞內活性氧化物質(Reactive oxygenspecies; ROS)的檢測

原理：進行細胞染色，可藉由 2', 7'-Dichloro-2,7-dihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)，為一種具有螢光性質可通過細胞膜並特異性追蹤評估細胞內產生 ROS 的多寡。當 H₂DCF-DA 在細胞內的乙醯脂(esterase)去乙醯化 (deacetylate)後會形成非螢光性的 DCFH，DCFH 會被細胞內的 H₂O 氧化成具螢光性質的 DCF，並聚集在粒線體中，在流式細胞儀中可由 488 nm 雷射激發出 525 nm 的螢光，藉以分析細胞內的 ROS 含量 【19】。

試劑：2', 7'-Dichloro-2,7-dihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)

1 μl H₂DCF-DA/500 μl PBS; H₂DCF-DA stock sol'n: 20 Mm; Working sol'n: 200 μM。

步驟：培養細胞之細胞數約 2x10⁵ cells/Well，要有 1~2 個 Well 做 blank。將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)分別種於 12 well 培養盤中，均給予大黃素 (Emodin) 100 μM (最終濃度)，分別培養 1 小時、3 小時、6 小時、12 小時後收集細胞，離心到第二次時，準備 ROS 試劑(每支離心管所需的量足 1 μl ROS 試劑加 500 μl 之 1 倍的 PBS)，離心後去除上清液，避光加入配製好的 ROS 染劑，於 37°C 中避光 30 分鐘後上流式細胞儀分析，將 blank (紅色的 peak)調在 10⁰~10¹ 之間，control (藍色的 peak)調在 10¹~10² 之間，M1 及 M2 其 gate 約等於 50%，樣品上機後，分析細胞內活性氧化物質的變化情形(peak 往右代表樣品的活性氧化物質 ROS 增加，往左代表 ROS 被清除)。

(四)細胞內鈣離子濃度(Intracellular calcium concentration)之分析

原理： Fluo-3/AM 為螢光染劑，當通過乙醯甲酯(AE)導入細胞後，與鈣離子特異性結合，可螯合鈣離子，螯合鈣離子之螢光染劑會有光學特性上的改變，並且會隨著細胞內鈣離子的濃度的改變，而發散出不同強度的螢光，來偵測細胞內鈣離子的濃度變化【20】。

試劑：Fluo-3/AM

步驟：培養細胞之細胞數約 2×10^5 cells/well，要有 1~2 個 well 做 blank。將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)分別種於 12 well 培養盤中，均給予大黃素 (Emodin) 100 μ M (最終濃度)，分別培養 3 小時、6 小時、12 小時、24 小時後收集細胞，離心到第二次時，去上清液，避光加入配製好的 Fluo-3/AM 染劑，每管加入 1 ml (3 μ g/1 ml)於 37°C 中避光 40 分鐘，每 10 分鐘拿出來上下搖動試管，反應時間結束後，將樣品取出離心 1500 rpm、5 分鐘，PBS 洗兩次，最後加 500 μ l PBS 進行流式細胞儀分析。將 blank (紅色的 peak)及 control (藍色的 peak)調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，樣品上機後，分析鈣離子釋放的情形(peak 往右代表樣品中的鈣離子濃度增加)。

(五)細胞內 Caspase-3，-8，-9 活性分析

原理:PhiPhiLux 主要為一個 loop 的形狀且兩端皆標有螢光的 peptid，它會被 Caspase-3 及 Caspase-3-like 蛋白所辨識，並且可以被細胞主動吞入。當細胞因受刺激而產生凋亡作用時，此時若是加入 PhiPhiLux 則會大量被凋

亡細胞吞入，而同時在細胞內部所誘發生成的 Caspase-3 也會與 PhiPhiLux 上的特定位置結合，造成 PhiPhiLux 結構斷裂，使得 loop 結構兩端上的螢光物質結合，因而產生螢光，而 PhiPhiLux 也具有放大細胞內 Caspase-3 及 Caspase-3-like 訊號的功能，因此利用流式細胞儀偵測樣品中的螢光強度，便可推得知其 Caspase-3 的活性【21-23】。另外偵測 Caspase-8 之活性也是相同原理，但用 CaspaLux 染劑來偵測，之後利用流式細胞儀以 488 nm 激發螢光，分析定量與定性，偵測到更早期、更完整、更準確的活細胞凋亡狀態。

試劑：Caspase-3: PhiPhiLux; Caspase-8: CaspaLux LID2.

步驟：培養細胞之細胞數約 2×10^5 cells/well，要有 1~2 個 well 做 blank。

將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)分別種於 12 well 培養盤中，均給予大黃素 (Emodin) 100 μ M (最終濃度)，分別培養 24 小時、48 小時後收集細胞，離心到第二次時，去上清液，避光加入染劑，每管加 25 μ l (10 μ M substrate PhiPhiLux for Caspase-3, CaspaLux LID2 forCaspase-8)，於 37°C 中避光 60 分鐘，之後利用流式細胞儀進行分析。Control (藍色的 peak)調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，樣品上機後，分析 Caspase-3，-8 之活性(peak 往右則代表樣品的 Caspase-3，-8 活性增加)。

四、DNA 裂解與電泳分析

原理：當細胞產生凋亡作用時，會有 DNA 斷裂現象的發生，細胞核內的 DNA 會裂解成 180~200 bp，藉由將細胞中的 DNA 抽出，利用電泳跑膠來觀察是否有 DNA 裂解的現象產生，當跑膠後用 UV 燈照相觀察時，有階梯形的現象產生時，即表示 DNA 有裂解片段產生【24】。

步驟：培養細胞之細胞數約 1×10^6 cells/well，將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)分別種於 10 cm² dish 培養盤中，均給予大黃素(Emodin) 100 μ M (最終濃度)，分別培養 3 小時、6 小時、12 小時、24 小時後收集細胞，收取細胞離心後，加入 200 μ l PBS，並將細胞液移至 eppendorf，離心 13000 rpm、10 秒，移去上清液，加入 200 μ l PBS 混和均勻，再加入 20 μ l RNase (100 mg/ml in H₂O)，靜置室溫 5 分鐘。加入 20 μ l proteinase K 及 200 μ l Binding buffer，混和均勻，並加熱 70°C、10 分鐘，之後再加入 200 μ l ethanol，混合均勻後移至 spin column，離心 13000 rpm、1 分鐘，丟棄下面的液體，加入 300 μ l Binding solution，離心 13000 rpm、1 分鐘，丟棄下面液體，加入 700 μ l washing solution (此動作重複兩次)，最後離到乾為止。丟棄下面的液體，在 55°C 烘箱 3~5 分鐘，丟棄下面的收集管，換上新的 eppendorf，加入 Elution solution (先預熱至 70°C)每個樣品約加 50~60 μ l，放置室溫 1~2 分鐘，離心 1 分鐘，收集下面液體(內含 DNA)，之後電泳跑膠。將處理好的 DNA 加入 6X DNA loading dye 混合，loading 進含有 0.5X 的 TBE

buffer、2%的 agarose gel 中，以 50 V 的電壓跑膠並以 Eithitium Bromide 染色，最後在 UV light 下照相。

五、西方墨點法【25,26】

(一)細胞總蛋白的抽取

步驟：培養細胞之細胞數約 1×10^6 cells/well，將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)分別種於 10 cm^2 dish 培養盤中，均加入大黃素 (Emodin) $100 \mu\text{M}$ (最終濃度)，分別培養 6 小時、12 小時、24 小時後收集細胞，收細胞離心兩次後，將細胞收取下移至 1.5 ml 的 eppendorf tube，加入 lysis buffer(依細胞量來增添 lysis buffer 的量)，震盪 2 分鐘，置於 -20°C 隔夜後，離心 1500 rpm、25 分鐘，取上清液此為總蛋白質，即可置於 -20°C 冰箱保存備用。

(二)蛋白質濃度的測定

(1)標準品檢量線之製作

原理：以 bradford 定量法，使用胎牛血清白蛋白(bovine serum albumin BSA)為蛋白質標準品配置不同濃度的蛋白質標準品(表 3-2)，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader)在 O.D. 595 nm 的條件下測量蛋白質標準品吸光值做檢量線(standard curve)分析，求出趨勢線方程式及 R^2 value 。

步驟：先取 bradford 染劑 2 ml 加 8 ml 二次水 5 倍稀釋，混合均勻後備用，取 $15 \mu\text{l}$ 配製好蛋白質標準品(BSA)加 $735 \mu\text{l}$ 的 bradford 染劑共 $750 \mu\text{l}$ 混合均勻，以每 well 加入 $200 \mu\text{l}$ 的量，加入 96 well plate 中，靜置 5 min 後測

量吸光值，測得標準品之吸光平均值，以 O.D. value (Y)對蛋白濃度 $\mu\text{g/ml}$ (X)，求出趨勢線方程式： $Y=aX+b$ ， R^2 value 要趨近於 0.99。

表 3-2 蛋白質標準品之製備

蛋白質濃度 $\mu\text{g/ml}$	100 mg/ml BSA(ml)	D.D.Water (ml)
100	500	0
80	400	100
60	300	200
40	200	300
20	100	400
0	0	500

(2)樣品蛋白質定量

取 15 μl 樣品蛋白質與 5 倍稀釋的 Bradford 染劑 735 μl 混合，反應 5 分鐘後，連同蛋白質標準品一起測定吸光值。所得之吸光值平均，帶入 Y 值 ($Y=aX+b$)，求出該 sample 的蛋白質濃度($\mu\text{g/ml}$)

(3)SDS—PAGE 電泳分析

A.試劑材料(表 3-3 至表 3-6)

表 3-3 SDS-PAGE 下層膠(separation gel)之製備與組成

組成	10% separation gel (四片量)	12% separation gel (四片量)
40% acrylamide/Bis (29:1)	5.0 ml	6.0 ml
Running buffer	5.0 ml	5.0 ml
10% SDS	0.2 ml	0.2 ml
10% APS	0.2 ml	0.2 ml
TEMED	20 μ l	12 μ l

表 3-4 SDS-PAGE 上層膠(stackion gel)之製備與組成

組成	Stacking buffer
40% acrylamide/Bis (29:1)	1.02 ml
stacking buffer	1.66 ml
10% SDS	66.0 μ l
10% APS	33.4 μ l
TEMED	12.0 μ l
D.D.water	4.06 ml

表 3-5 電泳緩衝液(running buffer ; 1.5M Tris-HCl , pH8.8)之組成

組成	重量
Tris	36.3 g
D.D.water	150 ml
HCl	調整至 pH 值為 8.8
加 D.D.water 到種體積為 200 ml	

表 3-6 stacking buffer(0.5M Tris-HCl, pH6.8)之組成

組成	重量
Tris	3 g
D.D.water	40 ml
HCl	調整至 pH 值為 6.8
加 D.D.water 到種體積為 50 ml	

B. 電泳膠片製作

將配製好的下膠注入製膠台，再以 isopropanol 去除氣泡並壓平下膠，靜置一段時間，可觀察管子當中的剩餘下膠是否凝固，約需 30~40 分鐘

使下膠凝固後，將 isopropanol 倒掉，注入上膠並插上 comb，並避免 comb 的下緣有氣泡產生，待上膠凝固約需 15~20 分鐘。

C. 電泳

將製好的膠體放置於電泳槽中，加入電泳緩衝液(running buffer)，預先將萃取出蛋白質與 5X protein loading dye 混合並以 95°C 加熱 10 分鐘後，在冰上冷卻後低速離心，依序將標示標準分子量的 multimer 5 μ l 及各 sample 15 μ l 注入膠體的孔槽中，通以電壓 90 volts，待樣品通過 stacking gel 後，電壓調高為 110 volts，繼續進行電泳，當 SDS-PAGE 染劑跑到 SDS-PAGE 膠片底部後，即可停止電泳。

D. 轉染步驟

先將 PVDF membrane 事先裁剪好，以 methanol 濕潤 10 秒後，再浸入轉染緩衝液中(transfer buffer；表 3-7)，接著將事先裁好的 3M 濾紙先浸泡在 transfer buffer 中備用，將轉染夾打開後，黑色面為底部並朝上，將預先以 transfer buffer 潤濕的海綿墊片鋪在黑夾上，再將 3M 濾紙鋪上接下來裁剪下膠中所要轉染的區域後，將 SDS-PAGE gel 小心的鋪於 3M 濾紙上，可在濾紙上加入多量的 transfer buffer，鋪上 SDS-PAGE gel 時勿產生任何氣泡，依序放上 PVDF membrane (同樣避免氣泡產生)，及 3M 濾紙，最後放上一片海綿墊片，再把整個轉染夾裝好，形成三明治夾層狀之構造。置入已裝有 transfer buffer 的電泳槽中將黑夾朝負極，紅夾朝正極，電泳槽外

圍放置足夠冰塊，使整各系統維持低溫狀態，以免在轉染的過程中，因溫度過高而使 SDS-PAGE gel 溶化，以 400 mA、90 分鐘的條件下進行蛋白質轉染。轉染完成後取出轉染膜裁去多餘部分，轉染膜以 0.1% 的 tween 20/1X PBS (表 3-8) 清洗 3 次，每次至少 10 分鐘。緊接將轉染膜以 2% 的 FBS (溶於 0.1% tween 20/1X PBS 中) 進行 blocking 的步驟，以室溫 1 小時為條件進行。blocking 之後以 0.1% 的 tween20/1X PBS 清洗轉染膜 3 次，每次至少 10 分鐘。倒掉清洗液，加入 8 ml 的一級抗體(溶於新鮮配製的 blocking solution 中，稀釋倍數 2000:1)，在 4°C 下進行搖盪。隔天一級抗體回收，再以 0.1% 的 tween 20/1X PBS 清洗轉染膜 3 次，每次至少 10 分鐘。加入 8 ml 稀釋 10000 倍的 goat anti-IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody 二級抗體(溶於含 2%FBS 的 0.1% tween 20/1X PBS 中)，於室溫下搖盪 1 小時，最後取出轉染膜，以 0.1% 的 tween 20/1X PBS 清洗 3 次，每次至少 10 分鐘。

表 3-7 轉染緩衝液(transfer buffer)之組成

組成	重量
Tris	4.5 g
glycin	21.6 ml
methanol	300 ml
加 D.D.water 到種體積為 1500 ml	

表 3-8 PBS-Tween 20 之組成

組成	重量
Tween 20	1 ml
PBS	1000 ml

E. 暗房壓片步驟

將轉染膜浸泡於 ECL 混合液中(每瓶各取 2 ml 等比例混合) 1 分鐘反應，轉染膜正面朝上放置於壓片卡匣(cassette)內的兩張透明投影片中間，於暗房中以 hyperfilm 軟片置於上層投影片上，對齊轉染膜進行壓片，感光時間依轉染膜上螢光亮度決定時間長短，約 15 秒至 20 分鐘不等。感光後放入顯影劑進行顯影步驟，再以清水沖洗後浸泡在定影劑中，再浸泡清水沖洗。

六、細胞內分子螢光染色

(一) DAPI (4-6-diamidino-2-phenyl indole) 染色

原理：DAPI (4-6-diamidino-2-phenyl indole) 是一種核酸螢光染劑，會專一性的結合在 DNA 雙股螺旋小溝(minor groove)上，當細胞產生凋亡時會有染色質凝結、DNA 斷裂(DNA fragmentation)情形發生，因此當細胞凋亡的現象越嚴重，DNA 斷裂的也就越多，則 DAPI 染劑染上結合也會更多，當在顯微鏡下觀察時，即可觀察到凋亡細胞所產生的螢光強度比正常細胞強【27】。

步驟：培養細胞之細胞數約 2×10^5 cells/well。將小鼠血癌細胞株(WEHL-3)分別種於 6 well 培養盤中，均給予大黃素(Emodin) (25 μ M、50 μ M、100 μ M) 培養 48 小時，將細胞收取下來，取適量細胞利用 3% Formaldehyde/PBS 固定於玻片上，使之完全自然晾乾為止，用 PBS 洗三次，加入 0.1% Triton

X-100/PBS (1 ml)反應 15~20 分鐘，再用 PBS 洗三次，加入 DAPI 染劑約 300 μ l，在 37°C incubater 避光 30 分鐘，吸掉染劑，用 PBS 洗三次，於螢光顯微鏡 F=200X 照相。

(二)彗星試驗(Comet assay)

原理：利用 Comet assay 觀察細胞拖尾的情況，彗星試驗又稱為單細胞電泳分析(single cell gel electrophoresis assay)，可用來分析及定量 DNA 損傷 (DNA damage)程度。利用 DNA damage 後發生斷裂，藉由電泳將斷裂的 DNA 拖出膜外，形成彗星狀而命名之，藉由拖尾長短得知 DNA 損傷程度【28,29】。

步驟：培養細胞之細胞數約 2×10^5 cells/well。將小鼠血癌細胞株(WEHL-3)種於 6 well 培養盤中，給予大黃素(Emodin) (25 μ M、50 μ M、100 μ M)培養 24 小時之後收取細胞，將細胞液移至 1.5 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，加入 200 μ l PBS 混合均勻。將上下膠分別以微波溶解後放於 55°C 水浴鍋中備用，在磨砂載玻片上以鉛筆標上號碼，滴加 0.5% normal-melting-point argarose (NMA) + 0.5% low-melting-point argarose (LMA)的混合液 70 μ l 於載玻片上，將蓋玻片蓋上並防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，取 10 μ l 細胞液合併 0.5%的 LMA 約 60 μ l 加在第一層膠上，將蓋玻片蓋上並防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，配置 lysis buffer (表 3-9)。將做好的膠置於 lysis buffer 中 1 小時，目的在使細胞膜上的雙層磷脂(diphospholipids)結構破壞，以利於斷裂的 DNA 被電泳拖出，再將膠

移至 alkaline buffer (表 3-10)中浸泡 20 分鐘，其目的是使 DNA 雙股螺旋解開，將電泳槽置於冰上，以 alkaline buffer 為電泳液跑 30 分鐘(25 V;300 mA)。將膠移至 0.4 M 的 Tris buffer (表 3-11)使 pH 值回到中性，再將膠置於 methanol 中脫水，加入 PI 染劑(2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)進行染色，以螢光顯微鏡觀察並照相，進而評估其 DNA damage 的情形。

表 3-9 comet assay 之 lysis buffer 的製備

lysis buffer	pH=8~10
5 M NaCl	100 ml
1 M Tris-HC	2 ml
0.5 M EDTA	40 ml
Triton	2 ml
D. D. Water	56 ml
Total	200 ml

表 3-10 alkaline buffer 之製備

alkaline buffer (pH= 13)	
NaOH	12.0 g
NaOH	0.3724 g
D. D. Water	1000 ml

表 3-11 Tris buffer 之製備

0.4 M Tris buffer (以 HCl 調整 pH= 7.5)	
Tris	48.45g
D. D. Water	1000 ml

七、體內巨噬細胞吞噬作用及免疫機轉

五十隻(N=50) BALB/c 小鼠分成五個小組。第一組組控制組(10 隻動物)。第二組給與橄欖油(olive oil, n=10)。第三組注射 WEHI-3 細胞 (10 隻動物)。第四、五組注射 WEHI-3 細胞然後給予大黃素(5 和 10 mg/kg, 各 10 隻動物)在橄欖油中。飼養及管餵所有動物上述藥量 3 個星期。

(1) 血液和螢光免疫染色法

每組在實驗後從每個動物收集血液(1 ml)，收集的血液立刻以 ammonium chloride 溶解紅血球，4 °C 離心 15 分鐘 1500 rpm。將分離出白血球加入 anti-CD3、CD19、CD11b 和 Mac3 抗體以 flow cytometry 檢測細胞標誌，如 CD3、Mac3、CD19、CD11b。

(2) 組織樣品(肝臟和脾臟)

每個動物在抽血前先稱重。之後取出肝臟和脾臟並稱重。

(3) 巨噬細胞吞噬作用分析

以 PHAGOTEST kit 分析吞噬細胞的吞噬作用。在測量之前，細胞加 opsonised fluorescein isothiocyanatelabelled *E. coli* (20 µl)，以 37°C incubated 1 小時。之後加入 ice-cold quenching solution (100 µl)。固定單核細胞/巨噬細胞細胞，然後以 flow cytometry 分析。

第三節 統計分析方法(statistics analysis)

實驗數據結果以平均值標準差(mean±SD)表示，實驗組數據與對照組數據以 student-*t* test 進行統計比較。當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有顯著差異，以(*)代表。



第四章 結果

第一節、大黃素(Emodin)對小鼠血癌細胞株(WEHI-3)

一、大黃素對小鼠血癌細胞株(WEHI-3)存活率之探討

小鼠血癌細胞株(WEHI-3)經培養、加入實驗的藥物大黃素(Emodin)後，依觀察的時間點及濃度利用流式細胞儀偵測其存活率並以顯微鏡觀察細胞型態。以 PI (propidium iodide) 核酸染劑作為染劑，當細胞凋亡時，細胞膜通透性改變，PI 會進入細胞內與 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，經雷射光激發後，會產生 488 nm 波長的螢光，由流式細胞儀的偵測器接收，藉此細胞特性及染色原理，我們可以區別 PI 染色後的細胞螢光強度較高者為死細胞，螢光強度較弱者為活細胞，最後再以統計分析出 WEHI-3 經 Emodin 作用後之生存率(viability)。

我們探討大黃素(Emodin)對小鼠血癌細胞株(WEHI-3)是否具有毒殺效果，由型態上的變化以及統計量圖得知。在 24 小時、48 小時偵測其生存率時發現細胞的確有毒殺作用且具有劑量上之效應(Dose-dependent)。利用生存率之試驗，找出 $IC_{50}=40 \mu M$ 此濃度作為以後實驗的濃度依據，因為以 $40 \mu M$ 作用經 24 小時後，便可發現細胞的存活率有明顯改變，且到 48 小時時可達一半致死率。

結論：大黃素(Emodin)對於小鼠血癌細胞株(WEHI-3)是具有毒殺作用，且有劑量上(Dose-dependent)以及時間效應(Time-dependent) (圖 4-1)。

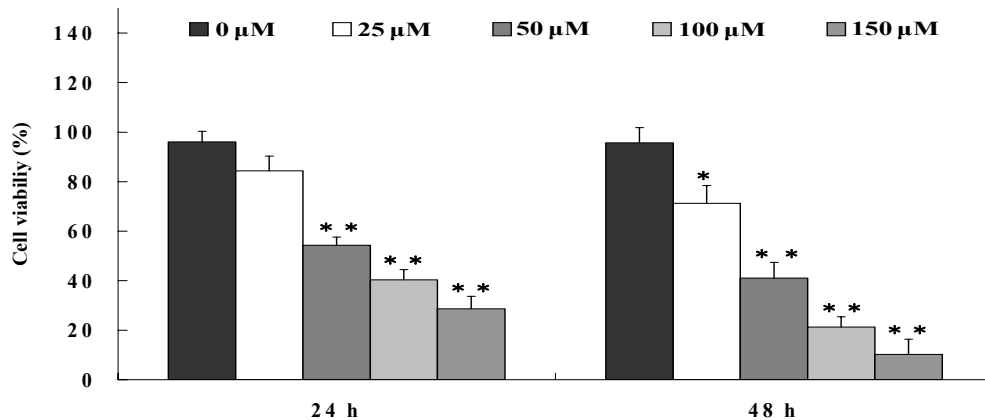


圖 4-1 不同濃度之大黃素(Emodin)分別作用於小鼠血癌細胞株 24 小時、48 小時細胞存活相對統計量化圖。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$

二、大黃素導致小鼠血癌細胞株(WEHI-3)DNA 受損之探討

(一)DNA Fragmentation

當細胞產生凋亡作用(Apoptosis)時，會有 DNA 斷裂現象產生，細胞內的 DNase 會在核小體(nucleosome)兩側進行分解，可分解成 180~200 bp 的 DNA 片段，經電泳跑膠會出現階梯狀現象(DNA ladder)，由圖 4-2 可知實驗結果為：將小鼠血癌細胞株(WEHI-3)經與大黃素(Emodin) (50 μM 、100 μM 、150 μM)共同培養 24 小時之後即有明顯的 DNA ladder 現象產生，則表示大黃素會造成小鼠血癌細胞株(WEHI-3)的 DNA 斷裂。

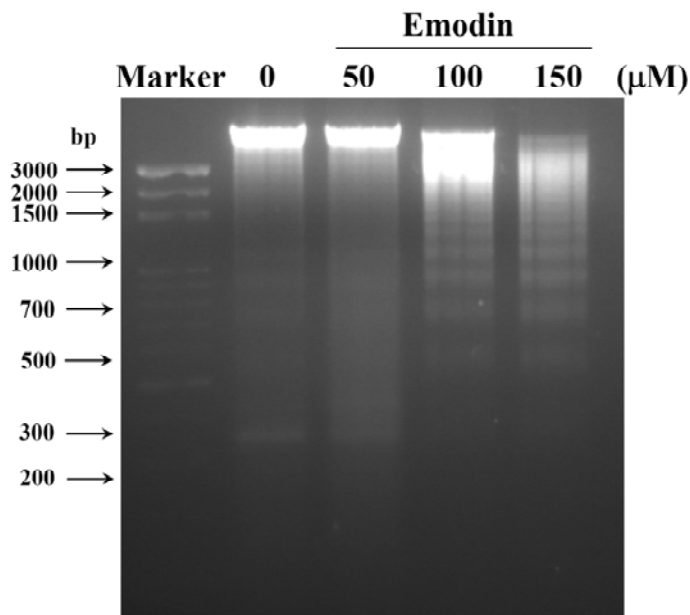


圖 4-2 大黃素(Emodin)以不同濃度作用於小鼠血癌細胞株(WEHI-3)共同培養 24 小時之後，觀察 DNA Fragmentation 的情形。

(二)彗星試驗(Comet assay)

彗星試驗(Comet assay)即為單細胞電泳分析法(single cell gel electrophoresis assay)，是一個簡單、快速以及敏感度高的技術，可用來分析及定量 DNA 損傷(DNA damage)的程度。當細胞受到刺激而 DNA 破壞時會形成不同片段的斷裂，可藉由電泳將斷裂的 DNA 片段拖出膜外，之後利用 PI 染劑將其染色，便可觀察出拖尾的現象，由此可藉由拖尾的長短，判斷 DNA 損傷的情形，拖尾愈長則表示 DNA 斷裂情形愈嚴重。

由圖 4-3 可得知：小鼠血癌細胞株(WEHI-3)與不同濃度大黃素(Emodin)共同培養 24 小時之後，可發現隨著藥物濃度的增加，小鼠血癌細胞株

(WEHI-3)拖尾的現象越顯著，則表示 DNA 受損的情形越嚴重。

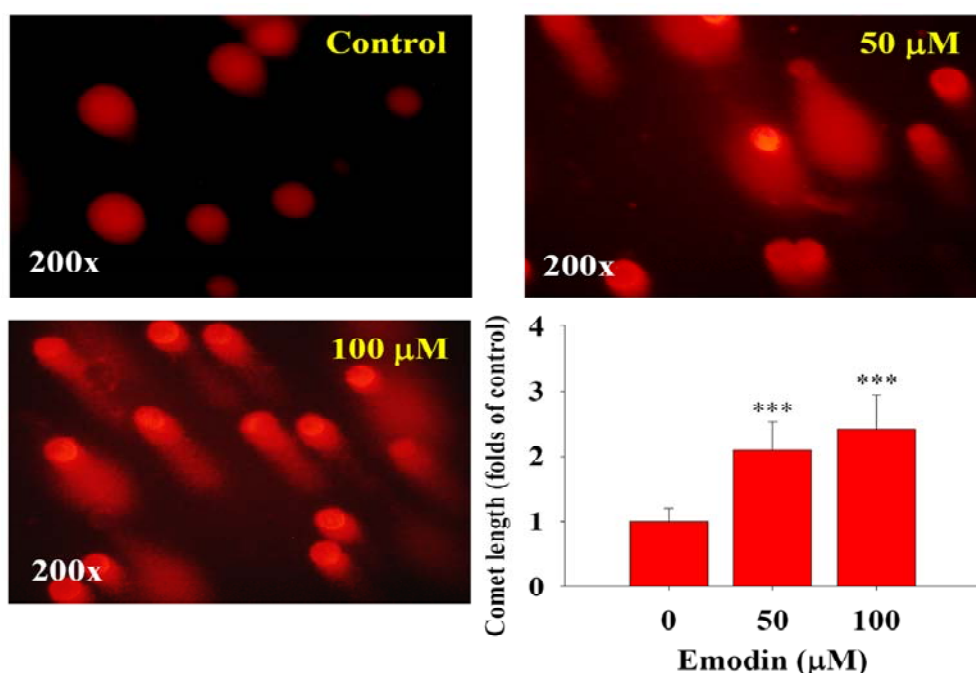


圖 4-3 不同濃度大黃素(Emodin)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)培養 24 小時之後，利用彗星試驗分析觀察 DNA 受損的情形。*** $p < 0.01$

(三)利用 DAPI 染色法檢測

DAPI (4-6-diamidine-2-phenyl indole)是一種核酸螢光染劑，會專一性的結合在 DNA 雙股螺旋小溝(minor groove)上，當細胞產生凋亡時會有染色質凝結、DNA 斷裂(DNA fragmentation)情形發生，因此當細胞凋亡的現象越嚴重，DNA 斷裂的也就越多，則 DAPI 染劑染上結合也會更多，當在顯微鏡下觀察時，即可觀察到凋亡細胞所產生的螢光強度比正常細胞強。

由圖 4-4 可得知：小鼠血癌細胞株(WEHI-3)與不同濃度大黃素(Emodin)共同培養 24 小時之後，可發現隨著藥物濃度的增加，小鼠血癌細胞株

(WEHI-3) 螢光強度越顯著，則表示細胞凋亡的情形越嚴重。

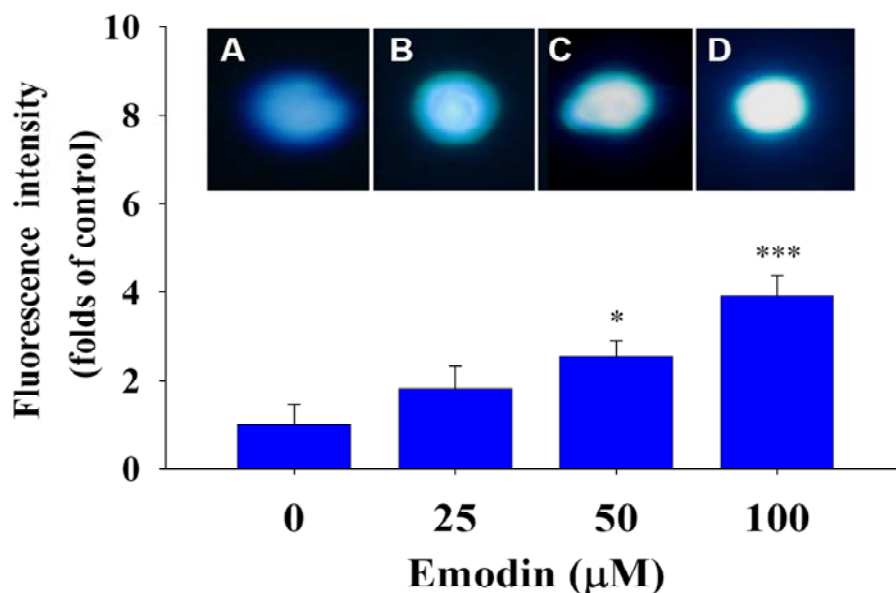


圖 4-4 不同濃度大黃素(Emodin)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)培養 24 小時之後，利用 DAPI 染色法檢測分析觀察細胞凋亡的情形 * $p < 0.05$ ，*** $p < 0.01$

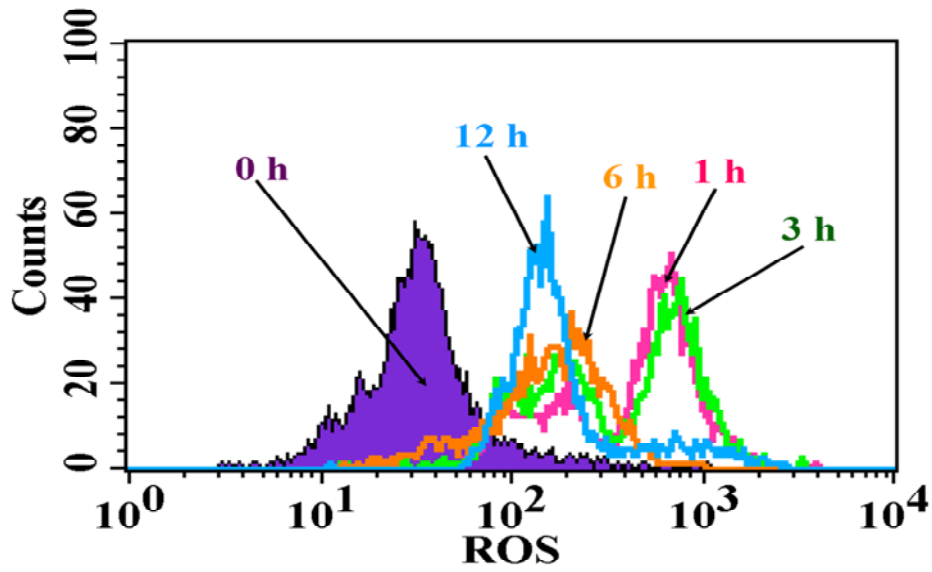
三、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)產生自由基之探討

當細胞內產生過多的活性氧化物質時，自由基(ROS)會破壞細胞內大部分的成份，包括細胞蛋白、細胞脂質及 DNA 等，而使細胞核內的 DNA 損傷(DNA damage)、造成細胞週期停滯(cell cycle arrest)，除此之外，ROS 之存在也會造成氧化壓力(oxidative stress)產生，氧化壓力能使粒線體膜通透性改變而導致粒線體膜電位下降，由此可知自由基(ROS)的生成與粒線體凋亡機制有密不可分的關係【30】。有文獻指出，ROS 能夠誘導細胞凋亡

的機制【31】，例：Death receptor apoptosis pathway、Mitochondria apoptosis pathway 等，故此實驗是藉由偵測細胞中活性氧化物質(ROS)的表現情形來了解 ROS 與 Apoptosis 之間的關係。利用流式細胞儀及 H₂DCF-DA 染劑去偵測並觀察大黃素(Emodin)引發小鼠血癌細胞株(WEHI-3)內部自由基的變化，H₂DCF-DA 為本實驗中所利用的 ROS 染劑，主要是與 H₂O₂ 結合產生螢光，結果圖 4-5 得知，當小鼠血癌細胞株(WEHI-3)與大黃素(100 μM)共同培養 0、1、3、6、12 小時之後，在短時間內即有大量的自由基(ROS)生成。



(A)



(B)

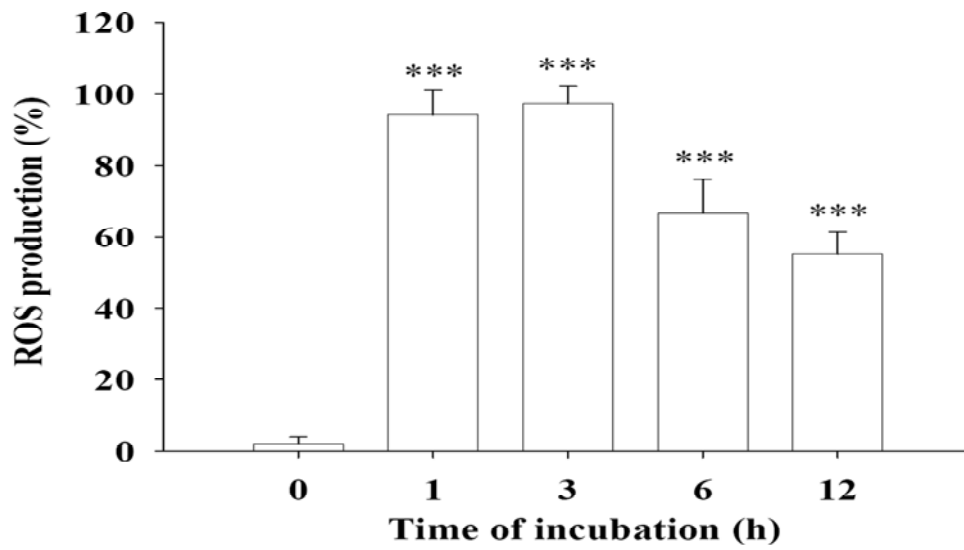


圖 4-5 大黃素(100 μ M)作用於小鼠血癌細胞株(WEHI-3) 0、1、3、6、12 小時

(A) 流式細胞儀分析細胞內 ROS 表現量分析圖

(B) 細胞內 ROS 表現量之相對統計圖；***p<0.05

四、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)粒線體膜電位($\Delta\psi_m$)改變之探討

粒線體能將產生的能量以電化學位能儲存於粒線體內膜，稱之為 mitochondrion membrane potential ($\Delta\psi_m$)，而最終產生 ATP 以供細胞代謝所使用，故粒線體在細胞有能量工廠之稱。近年來在粒線體的研究越來越多，已有文獻證實粒線體除了提供能量之外，也能調控細胞凋亡機制【32】。

粒線體上有一種由多種蛋白質所組成的特殊通透管道稱為粒線體過度性通透孔(mitochondria permeability transition pore) (MPTP)，它能誘發數種凋亡蛋白從粒線體內釋出，同時也與細胞凋亡作用的產生有關。當粒線體遭受過多鈣離子累積、氧化壓力增加、或粒線體膜電位改變時，都會導致 MPT 膜孔打開，進而促使多種凋亡蛋白的釋放，如：Cytochrome c (細胞色素)，AIF (apoptosis inducing factor)，和 endonuclease G 等蛋白，並活化下游 caspases 等一連串反應，誘導細胞走向細胞凋亡(apoptosis)。文獻指出粒線體膜功能不良(mitochondrial dysfunction)通常伴隨著早期細胞凋亡的發生【33,34】，因此粒線體異常通常在細胞凋亡過程中扮演著重要的角色，而細胞經呼吸所產生的能量會累積儲存在粒線體膜間，稱之為粒線體膜電位，此電位會受到細胞凋亡的擾動，利用一些陽離子染劑偵測出其螢光強度的改變可觀察得知粒線體膜電位變化。本實驗為利用流式細胞儀及 DiOC6 染劑去偵測粒線體膜電位的改變，由實驗結果圖 4-6 可得知，當小鼠血癌細胞株(WEHI-3)與大黃素(100 μ M)共同培養 0、1、3、6、12 小時之

後，在短時間作用下粒線體膜電位便有明顯的下降趨勢。

(A)

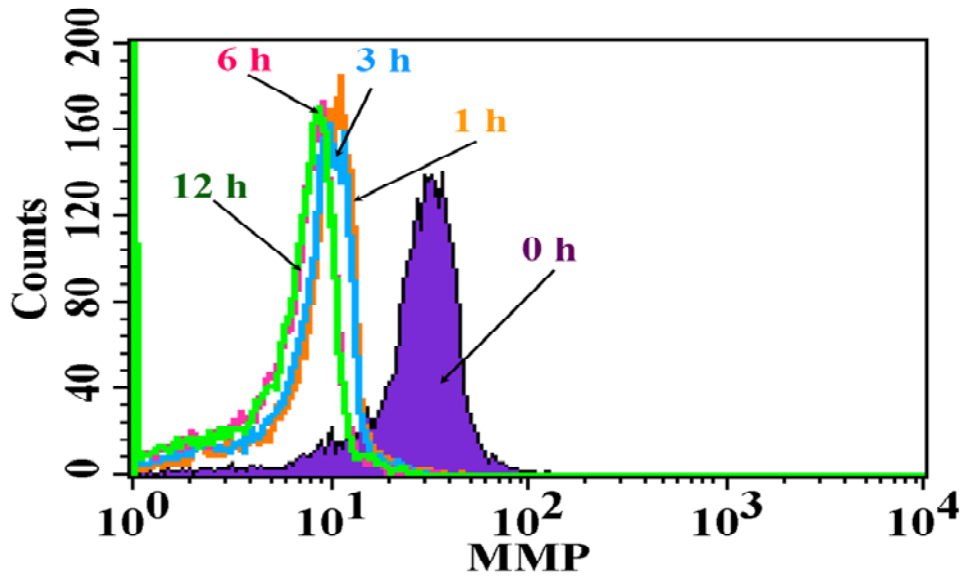


圖 4-6 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)培養 0、1、3、6、12 小時

(A) 流式細胞儀分析細胞內粒線體膜電位變化分析圖

(B) 細胞內粒線體膜電位變化之相對統計圖；*** $p < 0.05$

(B)

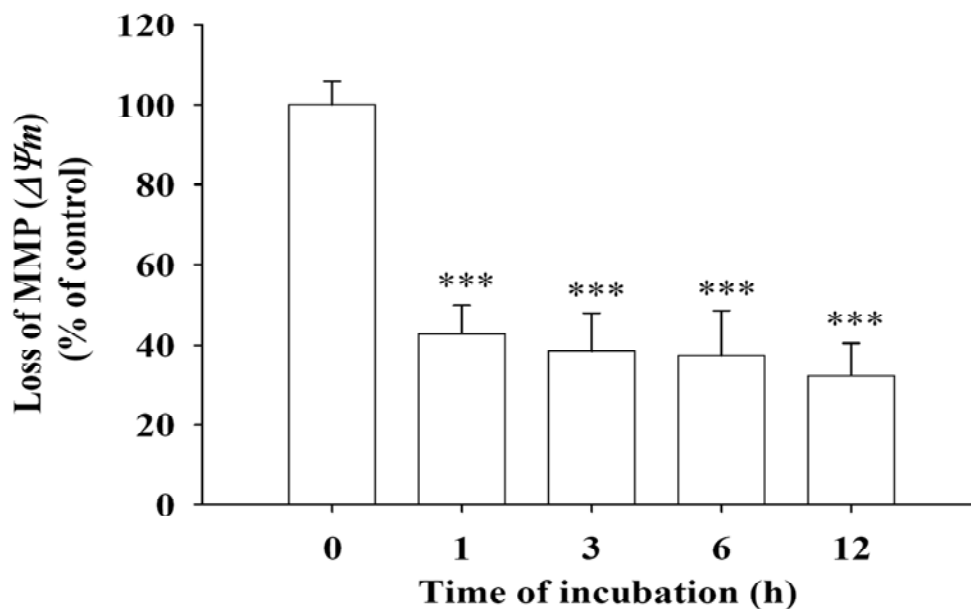


圖 4-6 續

五、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)鈣離子釋放之探討

當細胞中鈣離子濃度平衡時，細胞的生理活性是正常的，而細胞內鈣離子濃度改變時則會影響許多生理功能，如：肌肉收縮、細胞分化、細胞凋亡(apoptosis)與基因調控等等，在一般正常情況之下，鈣離子是儲存在細胞的內質網中，倘若細胞受到外在刺激導致內質網受到壓力(ER stress)時，此時鈣離子便會從內質網釋出進入粒線體內，造成粒線體膜電位異常而促使細胞走向凋亡路徑，因此鈣離子(Ca^{2+})在細胞凋亡過程中扮演著重要的調節角色【35】。本實驗則是探討小鼠血癌細胞株(WEHI-3)經大黃素處理過後，

細胞內鈣離子濃度的變化，而利用流式細胞儀及鈣離子螢光染劑

(Fluo-3/AM)去偵測細胞內鈣離子濃度的改變，其結果可由圖 4-7 得知，小鼠血癌細胞株(WEHI-3)在加入大黃素(100 μ M)共同培養 0、1、3、6、12、24 小時之後，短時間內便有大量鈣離子釋出的現象產生。

(A)

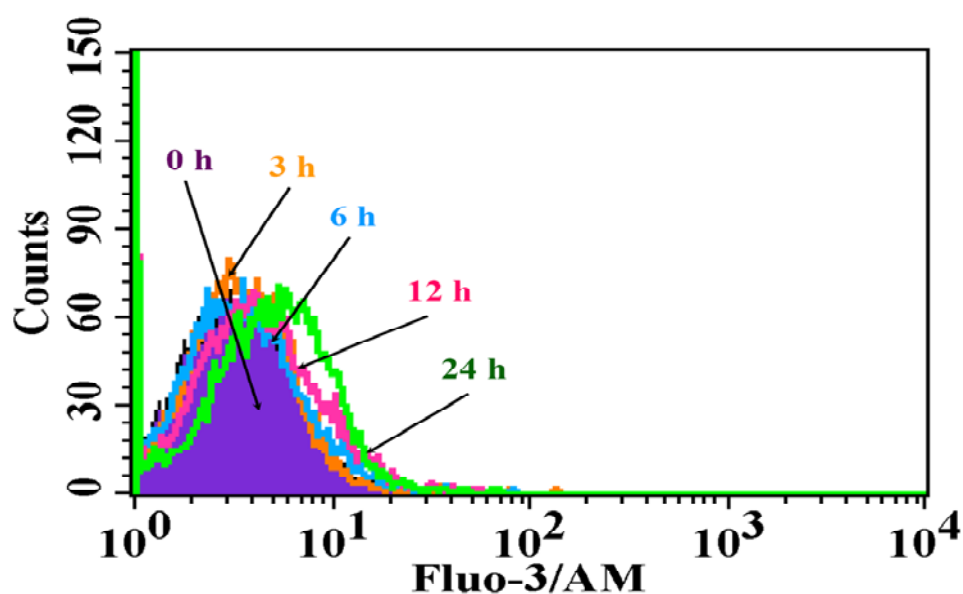


圖 4-7 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)培養 0、1、3、6、12、24 小時

(A) 流式細胞儀分析細胞鈣離子濃度變化分析圖

(B) 細胞鈣離子濃度變化之相對統計圖；* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.01$

(B)

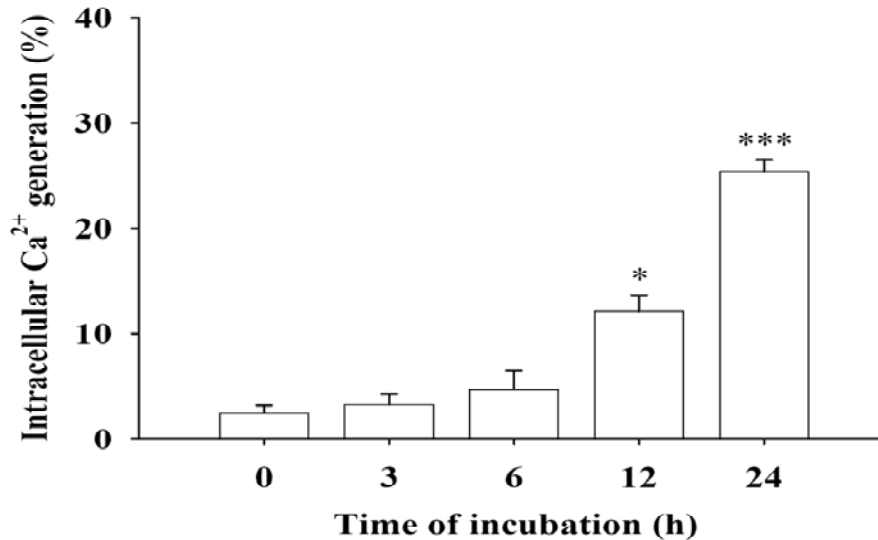


圖 4-7 續

六、大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)Caspase-3、-8、-9 活性之探討

實驗結果可知粒線體膜電位改變促使細胞早期凋亡(apoptosis)，當粒線體上的過渡性通透孔-mitochondria permeability transition pore(MPTP)通透性改變時，一些粒線體膜上的致死蛋白會釋放至細胞質中，如：cytochrome c，進而活化 caspase family 蛋白，經由 caspases 對自己的水解而活化更多的 Caspases 蛋白，並且誘發下游 caspases 等一連串反應，此 caspase cascade 一旦開始便啟動了自殺機制，促使細胞走向細胞凋亡(apoptosis)【36】。caspase-3 會活化細胞核內和 DNA repair 相關的 PARP (poly-ADP ribose polymerase)，使之產生裂解失去修復 DNA 的功能，當 DNA 無法修補時細

胞終究走向死亡，而 Caspase-8 則是在 death receptor-dependent apoptosis pathway 扮演著重要的角色【37】，Caspase-9 是細胞凋亡信號轉導過程中比較上游的一個 caspase。線粒體釋放細胞色素 C 以後，caspase-9 可以和細胞色素 C 以及 Apaf1 形成複合物，同時被啟動。啟動的 caspase-9 可以啟動細胞凋亡的最關鍵酶 caspase-3，從而促進後續的細胞凋亡信號。本實驗主要是利用吸光值偵測細胞內 caspase-3、-8、-9 活性的變化，吸光強度愈強則表示 caspase-3、-8、-9 活性愈高，結果顯示，大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)，在 24 小時便可發現 caspase-3 及 caspase-9 活性皆有明顯上升的現象而 caspase-8 則無明顯差異，推測大黃素可能主要透過激活 caspase-3、-9 路徑促使細胞凋亡。Pan-caspase inhibitor 可以穿透細胞膜的 caspase 抑制劑，可以抑制由 caspase 啟動導致的細胞凋亡，實驗結果發現，在有抑制劑存在下，caspase 活性下降且細胞存活率明顯增加。

N-乙醯基半胱氨酸(N-acetylcysteine; NAC)為包含 thiol 的複合物且具有膜通透性，可以透過增加細胞內 glutathione 的濃度或直接作用在活性氧化物上清除細胞內過多的自由基(free radical)，使細胞免於 ROS 所造成的傷害而達到抗氧化的能力【38】，因此把 N-acetylcysteine (NAC)作為 ROS 的抑制劑。利用 N-乙醯基半胱氨酸(N-acetylcysteine; NAC)作用於細胞後，再加入實驗藥物並觀察其細胞內活性氧化物(Reactive oxygen species; ROS)的生成量是否有減少的情形。

實驗發現，加入 N-acetylcysteine (NAC) 2 小時之後，再加入實驗藥物大黃素(100 μ M)共同作用 12 小時，由結果可發現到：加入 N-acetylcysteine (20 mM)的細胞組別與只有加入實驗藥物大黃素(100 μ M)兩組相比較，得知其細胞內活性氧化物(Reactive oxygen Species; ROS)生成量有明顯下降。

(A)

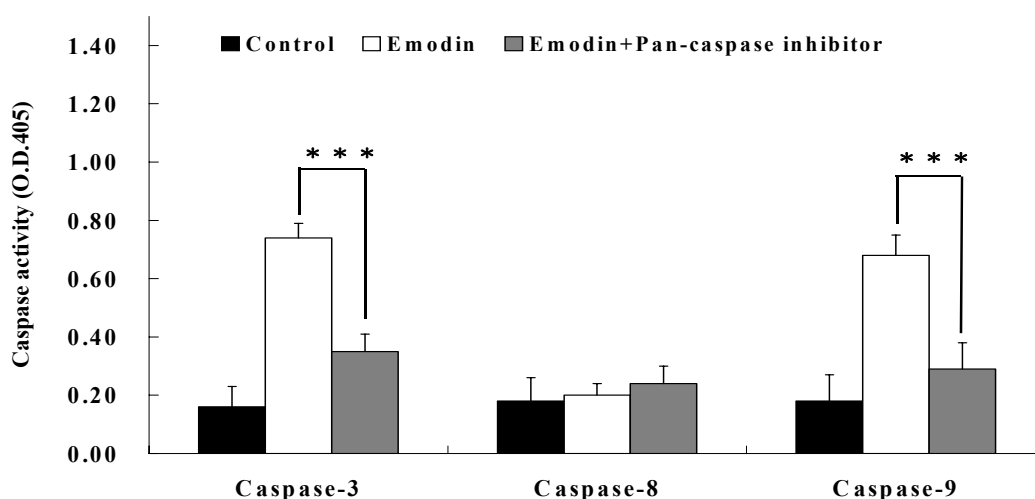


圖 4-8 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3) Caspase-3、-8、-9 活性分析

(A) 大黃素作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3) Caspase-3、-8、-9 活性分析

圖，***P<0.05

(B) 大黃素和 N-acetylcysteine (NAC)及 Pan-caspase inhibitor作用小鼠血

癌細胞株(WEHI-3)細胞存活率分析圖，***p<0.05

(B)

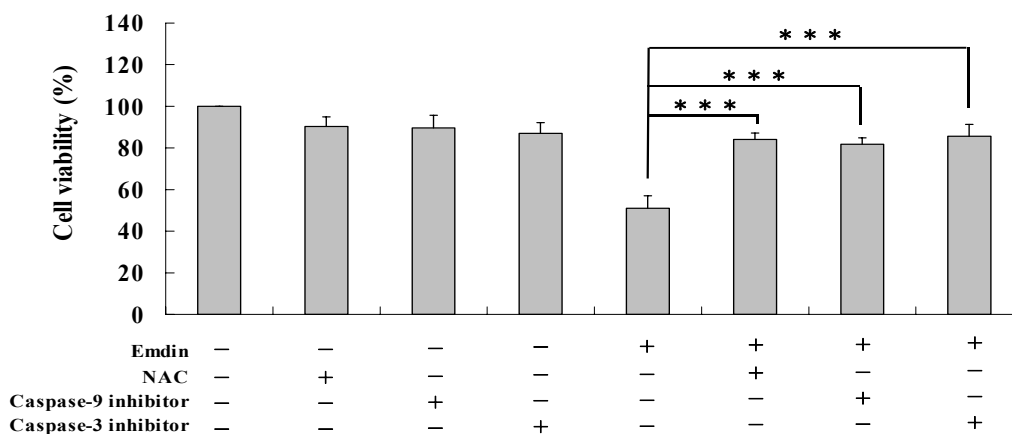


圖 4-8 續

七、利用西方墨點法探討大黃素影響小鼠血癌細胞株(WEHI-3)各種相關蛋白表現之影響

(一) 探討與細胞凋亡粒線體路徑(Mitochondria-dependent apoptosis pathway)相關之蛋白表現

粒線體路徑在誘發細胞凋亡機制中是最具意義的，而 Bcl-2 蛋白位於粒線體膜的外層，調控細胞的存活。像是細胞受到細胞外或細胞內的壓力及傷害時，如：放射性輻射、氧氣不足、藥物、DNA damage 等，會使細胞質的粒線體膜電位下降，促使 Cytochrome c 從粒線體的 intermembrane space 釋放到細胞質中，與 Apaf-1 與 Caspase-9 結合形成

apoptosome，之後 ATP 進而活化 Caspase-9 的複合物，Caspase-9 也促使下游的 caspase-3 活化，最後誘導走向細胞凋亡。

(1) Bcl-2 family 家族蛋白【39-41】

Bcl-2 family 在細胞凋亡中扮演著細胞存活調控的重要角色，可分為促使凋亡蛋白分子(pro-apoptotic protein)及抑制凋亡蛋白分子(anti-apoptotic protein)這兩類蛋白(表 4-1)。

表 4-1 Bcl-2 family 家族蛋白分類

功能	種類
pro-apoptosis	Bax、Bak、Bok/Mtd、Bcl-xs、Bcl-GL、Bad、Bid、Bik/Nbk、Blk、Hrk/DP5、Bim/Bod、Bmf、Nip3/BNIP3、Nix/BNip3L、Noxa/APR、PUMA、MAP-1, Bcl-Gs
anti-apoptosis	Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1/Bfl-1、Boo/Diva、Bcl-B/Bcl-2L-10/Nrh

(2) 細胞凋亡誘導因子(Apoptosis inducing factor; AIF)

細胞凋亡之產生與細胞凋亡誘導因子(Apoptosis inducing factor; AIF)釋放相關，為 caspase-independent cell death factor，其分子量 67 kDa，存在粒線體內膜中，具有抑制 Bcl-2 的能力。當粒線體的通道發生改變時，會從粒線體膜間腔釋出，經細胞質最後到細胞核，之後誘導染色質濃縮，最後造成 DNA fragmentation 而產生 DNA 裂解小片段。【42】

(3) 內核酸酶(Endonuclease G; Endo G)

Endonuclease G 是一種非專一性、非經 Caspase 活化、分子量為

35 kDa 的蛋白質，也是一種在真核細胞中含量最多的核酸水解 (nuclease)，在 DNA 單股及雙股皆具有活性，能夠裂解雙股 DNA、單股 DNA、單股 RNA，同時也具有多種生理活性包括：DNA 修補、粒線體 DNA 複製、參與細胞凋亡等等，當細胞凋亡機制被啟動時 Bcl-2 家族被活化的 pro-apoptosis 蛋白，例如：Bax、Bid 等，會增加粒線體膜通透性導致 Endo G 蛋白由粒線體膜間腔釋放出來進入細胞核並且執行 nuclease 的功能將 DNA 分解，而形成 DNA fragmentation【43】。

(4) 凋亡蛋白酶(Caspase)

在細胞凋亡過程當中必需要仰賴一群酵素—凋亡蛋白酶 Caspase (cysteine aspartyl-specific protease)，此種蛋白為一群具有專一性的 cysteine protease，能夠進行一連串的蛋白質酶解作用 (proteolysis cascade)，而這些水解蛋白酶是以未活化的形式 (pro-caspase) 存在細胞質裡，主要可分為兩大類 (a) 啟動者 initiator caspase：包含了 caspase-2、8、9、10 等蛋白，(b) 作用者 effector caspase：包括 caspase-3、6、7 等蛋白。當粒線體凋亡機制被啟動時，此時存在粒線體中的 Cytochrome c 會被釋放出來和細胞質中的 Apaf-1 (Apoptosis activating factor-1) 蛋白結合，形成一個複合物進而活化 caspase-9、caspase-3 等蛋白，而活化態的 caspase-3 又會去活化裂解具 DNA 修復功能的 PARP (Poly ADP-ribose polymerase) 蛋白，使得 DNA 損傷無法修補，造成 DNA

fragmentation、細胞走向凋亡路徑。而其中的 caspase-3 又被認為是 The point-of-no-return，意思是指當細胞中的 caspase-3 蛋白一旦被啟動活化時，細胞便注定走向凋亡作用，因此 caspase-3 又可當作走細胞凋亡作用的重要指標【44】。

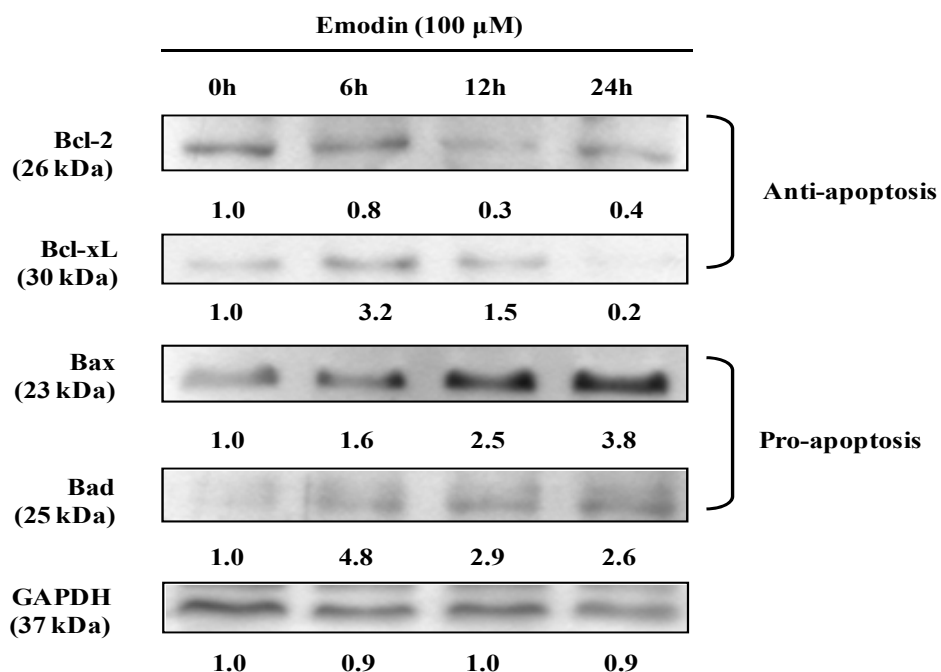
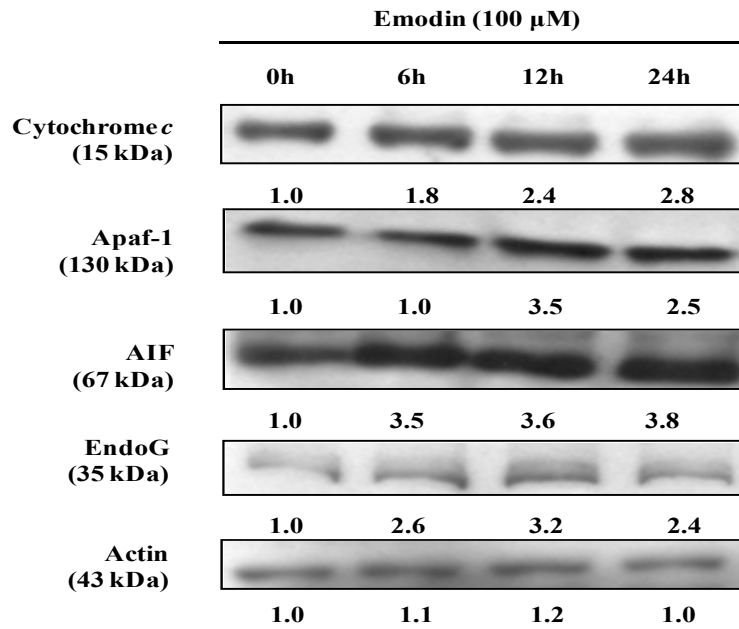


圖 4-9 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)以不同時間點培養，細胞凋亡機制相關 Bcl-2 family 蛋白表現情形

(A)



(B)

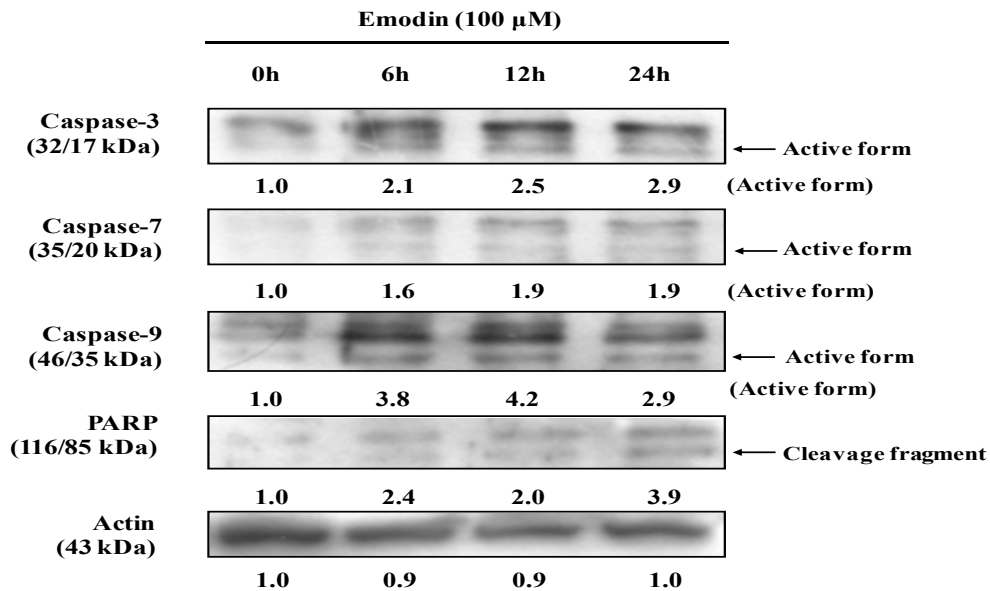


圖 4-10 (A)(B)大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)以不同時間點

培養，細胞凋亡粒線體路徑之相關蛋白表現情形

藉由以上結果(圖 4-9、4-10)可推測：當細胞的粒線體通透性改變時，會使得粒線體膜電位($\Delta\psi_m$)下降，此時粒線體內的一些凋亡因子例如: AIF、Endo-G、Cytochrome C 等蛋白會被釋出，最後導致細胞走向凋亡。

(二) 內質網壓力(ER stress)調控細胞凋亡路徑相關蛋白之表現

由實驗得知，大黃素可誘導老鼠血癌細胞株(WEHI-3)細胞中釋放鈣離子。本研究探討 ER (Endoplasmic Reticulum) stress 中調控細胞凋亡路徑相關蛋白質表現，證明鈣離子釋放是否從 ER stress 路徑來調控細胞凋亡。細胞中鈣離子(Ca^{2+})濃度最高的地方即為內質網，近年已有多篇文獻探討內質網和細胞凋亡作用兩者之間的關係【45】，當內質網受到外來環境的刺激，如：藥物或是鈣離子濃度不平衡等等，皆會造成 ER stress(內質網壓力)，又內質網(Endoplasmic Reticulum)也是蛋白質合成與修飾的地方，因此，當內質網受到傷害時會使得蛋白質無法順利摺疊，形成 Unfolded Protein Response (UPR)、ER-associated degradation (ERAD)等反應【46】，這時內質網上的功能蛋白 GRP78 便會被活化而與 Unfolded Protein 結合幫助蛋白質摺疊，另一方面 ER stress 時，也會啟動內質網上的三個感應器蛋白：IRE1、PERK、ATF-6，促使這些蛋白被激發活化進而產生大量的 GRP78 等蛋白【45,47】，同時存在內質網中的鈣離子也會在 ER stress 發生時，大量地被釋放出至細胞質，進而影響粒線體膜通透性導致膜電位改變，最後誘發細胞產生凋亡，除此之外和 apoptosis 相關的 caspase-12 蛋白也會被

IRE1 活化，進而活化下游的 caspase 蛋白導致細胞 apoptosis。因此，大量的內質網壓力產生時，是會誘導細胞走向凋亡路徑的【48】。

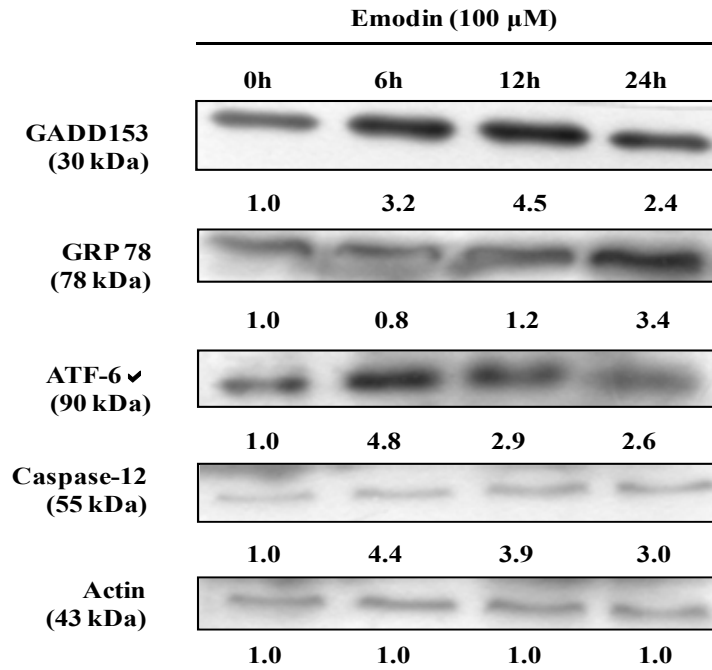


圖 4-11 大黃素(100 μ M)作用小鼠血癌細胞株(WEHI-3)以不同時間點培養，細胞凋亡機制內質網路徑之相關蛋白表現情形。

藉由圖 4-11 得知：大黃素(100 μ M)可誘導小鼠血癌細胞株(WEHI-3)生成內質網壓力(ER stress)，進而造成 apoptosis 相關蛋白顯著增加。

第二節、大黃素影響體內免疫機轉及細胞吞噬之抗癌作用探討

本實驗中，我們以 MHC 同源的小鼠血癌細胞株(WEHI-3； 10^5 cells/mice)利用腹腔注射方式注入 BALB/c 小鼠體內，將 BALB/c Mice 誘導成血癌動物模型，飼養三星期之後以大黃素(Emodin)作為治療藥物，實驗動物連續以管餵方式給予藥物三星期，可藉由下列幾種實驗評估大黃素(Emodin)對於血癌模式小鼠 (WEHI-3/BALB/c)的治療功效。

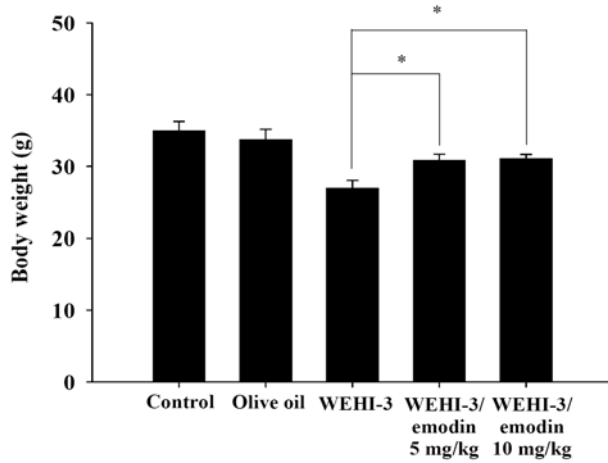
- (1) 觀察動物的活動力、毛色光澤度是否改變。
- (2) 測得體重、脾臟及肝臟重量的變化。
- (3) 藉由流式細胞儀分析週邊血液中白血球細胞族群(CD3、CD19、CD11b、Mac-3)分佈情形，以得知免疫功能的程度。

(一)大黃素(Emodin) 對於血癌模式小鼠(WEHI-3/BALB/c)治療體

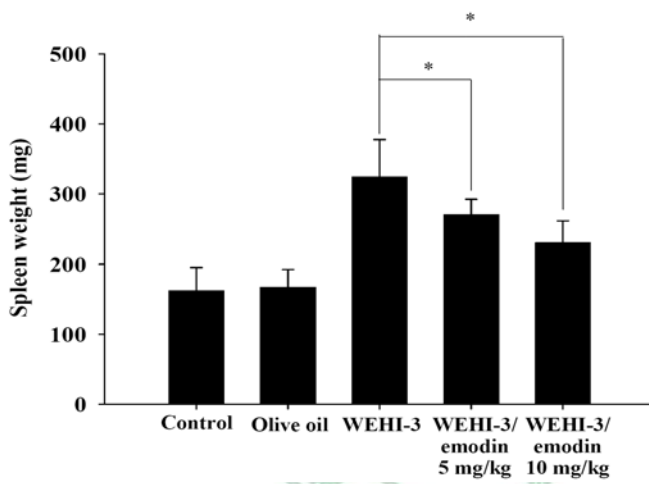
重、脾臟及肝臟重量變化。

動物犧牲前先測得各隻小鼠的體重以和實驗前時的體重作為比較，在小鼠犧牲後則摘除脾臟及肝臟並且測得重量，實驗結果如圖 4-12。

(A)



(B)



(C)

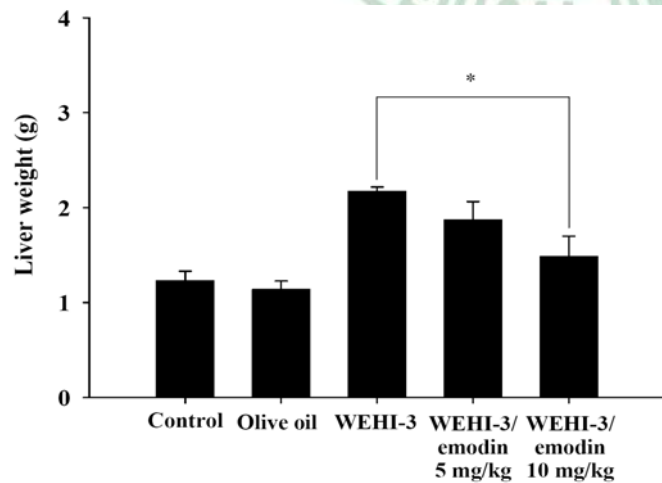


圖 4-12 大黃素(Emodin) 對於血癌模式小鼠(WEHI-3/BALB/c)治療(A)

體重(B)脾臟及(C)肝臟重量變化。 * $p < 0.05$

實驗結果：未給予藥物餵食的 WEHI-3/BALB/c 體重減輕且有脾臟、肝臟腫大情形，免疫組的老鼠體重則是明顯增加，而經大黃素(Emodin)治療過後的小鼠脾臟及肝臟腫大現象則是有明顯的改善效果。

(二) 利用流式細胞儀測得大黃素(Emodin) 對於血癌模式小鼠 (WEHI-3/BALB/c) 週邊白血球細胞族群之分佈百分比。

在動物犧牲前先抽取老鼠週邊血液，血液經處理過後，包括：溶解紅血球以及加入所需的螢光染劑之後則是藉由流式細胞儀針對 (WEHI-3/BALB/c) 小鼠週邊白血球細胞群以進行分析。CD3 為 T 細胞的細胞表面標記 (cell surface marker)，一般被當作是 T 細胞免疫功能評估指標。CD19 為 B 細胞的細胞表面標記 (cell surface marker)，一般被當作是 B 細胞免疫功能評估的指標【49】。結果如下：

(A)

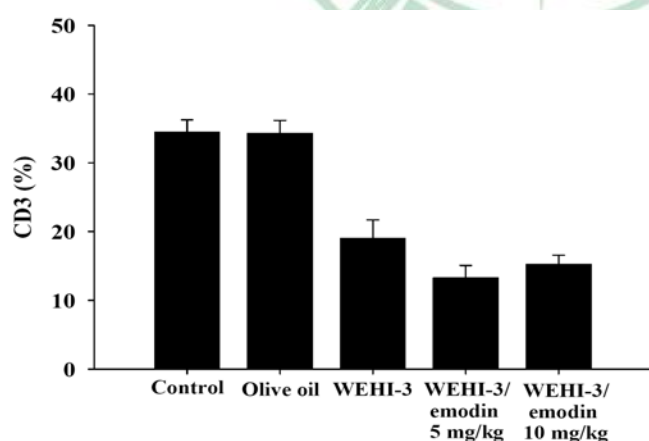


圖 4-13 (A)(B)(C)(D)大黃素(Emodin)對於血癌模式小鼠

(WEHI-3/BALB/c)週邊白血球細胞族群之分佈百分比。* $p < 0.05$

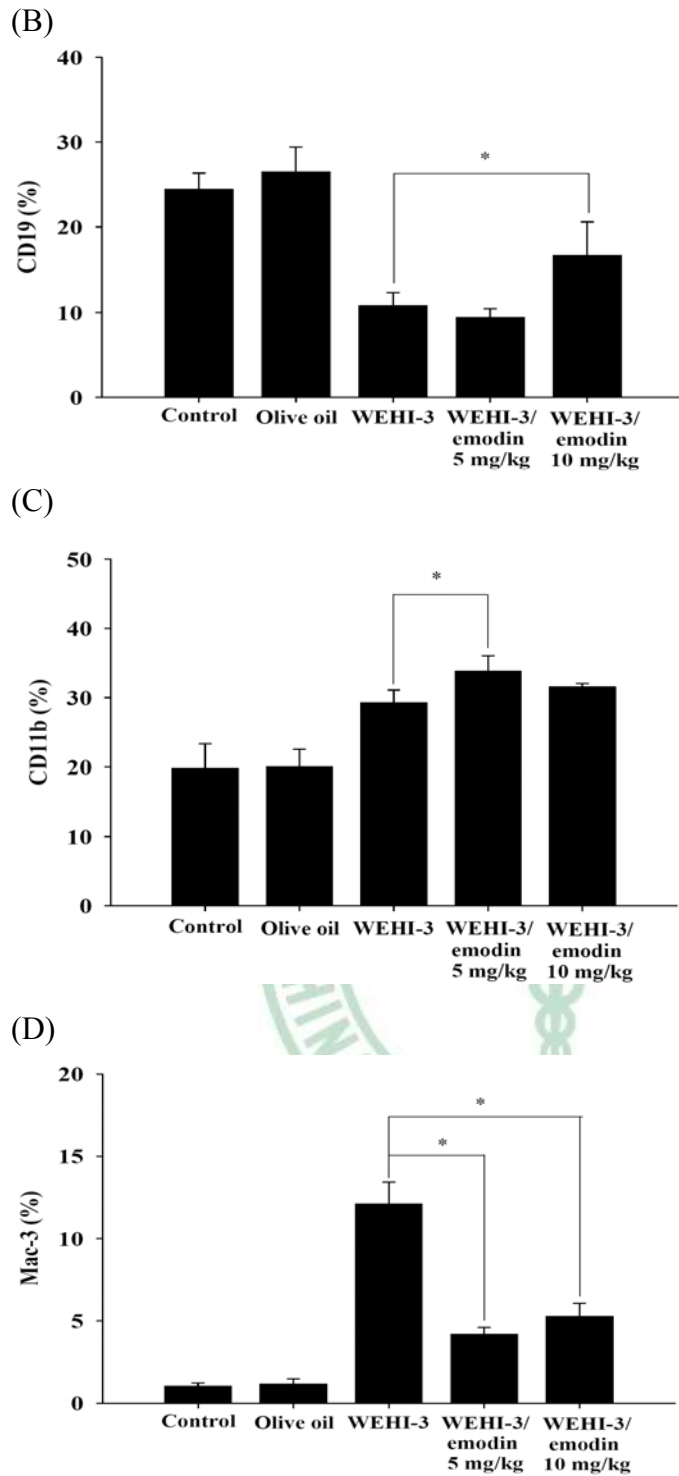
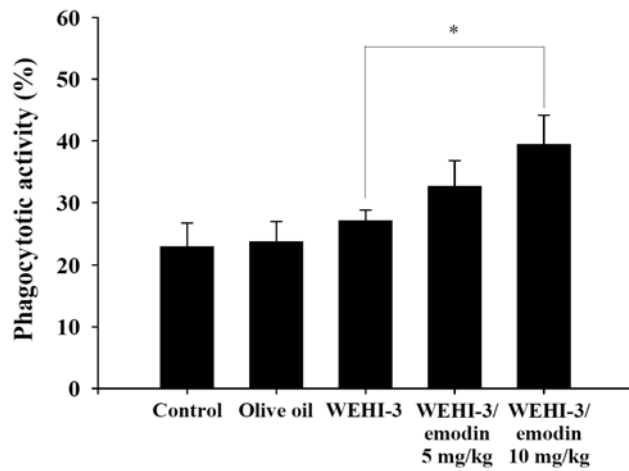


圖 4-13 續

由圖 4-13 結果可知：給予大黃素(Emodin) 治療血癌模式小鼠 (WEHI-3/BALB/c)，治療後的小鼠其 CD19、CD11b 的細胞族群比未給藥的致癌小鼠顯著增加而 Mac-3 則有減少的情況，因此可推測大黃

素(Emodin)可能會提升、修復致癌小鼠的免疫功能。

(A) PBMC



(B) Peritoneum

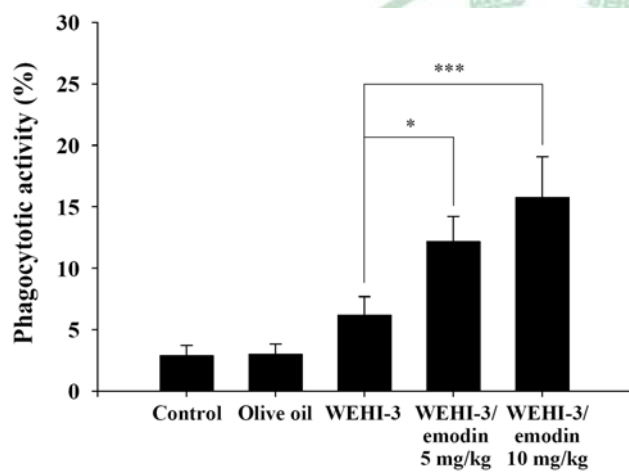


圖 4-14 大黃素影響了巨噬細胞吞噬作用(A)周邊及(B)腹膜之血液

* $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

由結果圖 4-14 可知，從流程 cytometric 分析顯示在 BALB/c 小鼠中 PBMC (A)和腹膜(B)巨噬細胞吞噬作用增加，因此大黃素促進巨噬細胞之吞噬作用。

第五章 討論

細胞凋亡(Apoptosis)與細胞壞死兩者(Necrosis)廣義上來說皆為細胞死亡，兩者最大的不同在於細胞凋亡(Apoptosis)為細胞產生計畫性死亡機制(programmed cell death; PCD)，而細胞壞死(Necrosis)則是惡性死亡。因此 Apoptosis 在生物體內扮演相當重要的角色，當正常細胞受到外在環境刺激時，便會受基因調控而啟動細胞凋亡的機制，在整個細胞凋亡過程中，是不會產生發炎反應的，其特徵為細胞皺縮、細胞膜保持完整性、染色質濃縮、DNA 斷裂以及形成凋亡小體(apoptotic bodies)，是一種對周圍細胞及組織傷害最小的細胞自殺性死亡【50】。而細胞壞死(Necrosis)則是會有發炎反應的產生，其特徵為細胞型態腫脹、細胞膜喪失完整性造成細胞破裂、發炎因子釋出，導致周圍鄰近的組織或細胞受到傷害，出現壞死現象【51】。故細胞凋亡機制可被應用在治療癌症藥物方面的研究，以減少藥物對體內細胞所引發的併發症及副作用。

大黃素(Emodin)是一種由大黃植物中所萃取出來的黃色粉末藥物，許多研究報告指出，Emodin 在抗細胞增生、抗癌或是輔助癌症治療過程中扮演著重要的角色，由細胞培養實驗模式當中得知大黃素對於子宮頸癌、肝癌、黑色素瘤等癌細胞都可抑制腫瘤發生及生長而達到治療改善的功效【4-6】，除此之外，大黃素也具有抗發炎、抗潰

瘍、抗病毒、止血、健胃、利膽、瀉下、解熱、鎮痛、利尿、降脂、降壓等功能【2、3】。而細胞凋亡的主要機制分為兩大類，一是死亡接受器路徑，另一則是粒線體活化路徑，過去的文獻證實 Emodin 誘導人類大腸癌細胞株(colon 205)產生細胞凋亡、是藉由粒線體凋亡路徑(Mitochondria-dependent apoptosis pathway)【52】，因此本研究則是探討大黃素誘導小鼠血癌細胞株(WEHI-3)產生凋亡之相關機制及細胞吞噬免疫機轉。

首先就細胞存活率而言，藉由流式細胞儀分析實驗結果可得知，Emodin 對小鼠血癌細胞株(WEHI-3)在藥物濃度差上有 Dose-dependent、藥物作用時間上有 Time-dependent，同時 IC₅₀ 濃度在 48 小時約為 40 μ M。而在過去的文獻中指出 Emodin 對於人類骨髓性白血病細胞株(HL-60)所選用的藥物濃度為 60 μ M【53】，由此可知，Emodin 對於不同細胞株所造成的藥物毒性強度是不相同的。

在先前有提到 Death receptor pathway 和 Mitochondria-dependent pathway 為細胞產生凋亡的兩大機制，過去也有研究證實 Emodin 誘導人類肝癌細胞株(Hep3B)、人類大腸癌細胞株(colon 205)產生細胞凋亡，皆和粒線體凋亡分子機制有關。以下是對於 Mitochondria 與 Apoptosis 兩者之間的探討：粒線體除了可提供 ATP 供給細胞生長、代謝、活動所需的能量之外，在細胞凋亡作用當中也扮演著重要的角

色【54】，粒線體上的 mitochondria permeability transition pore (MPT pore)粒線體過度性通透孔，它控制了粒線體的膜通透性能夠誘導存在粒線體內的凋亡蛋白釋出，MPT pore 含有兩大部分，一是在粒線體外膜的蛋白質(porin、voltage-dependent anion channel; VDAC)，另一個則是與 adenine nucleotide translocator (ANT)相關位於粒線體內膜的蛋白質，當此通道打開會使得粒線體膜電位($\Delta\psi_m$)下降、內膜兩側的 H^+ gradient 消失、基質滲透壓增高，而造成粒線體漲大、外膜破裂，導致凋亡蛋白 AIF、Endo-G (caspase-independent factor)釋放至細胞核，造成 DNA damage，而 Cytochrome c (caspase-inducing factor)則是釋放到細胞質中，活化下游的 caspase protein 誘導細胞產生凋亡。因此粒線體膜電位的改變被當作是偵測早期細胞凋亡的重要指標。和粒線體凋亡機制相關的重要蛋白還有 Bcl-2 family protein，此家族蛋白結合在粒線體膜上主要功能為調控粒線體膜電位以及膜通透性的表現，當 Bcl-2 family 的 anti-apoptosis 蛋白 Bcl-2 表現量下降時，會導致粒線體膜電位下降，而 pro-apoptosis 的蛋白 Bax 則是表現量增加，Bax 與 Bcl-2 結合亦會讓粒線體的膜通透性增加、膜電位下降時，這時 AIF、Endo-G 等蛋白會釋放至細胞核內造成 DNA 斷裂進而走向細胞凋亡【55,56】。由實驗結果顯示 Emodin 的添加，可使 Bax 蛋白表現增加、抑制 Bcl-2 蛋白表現、釋出 Cytochrome c、AIF、Endo-G 使

其蛋白表現量增加，並使粒線體相關凋亡蛋白因子 Caspase-9，-3 被裂解活化，其活化態蛋白表現量增加。另外作為 DNA 修復蛋白的 PARP 也被裂解活化，使 PARP 失去修復功能而造成 DNA 斷裂損傷。因此可推論：老鼠血癌細胞株(WEHI-3)經大黃素處理後會產生凋亡作用，可能和粒線體活化路徑有關。

接下來則是探討細胞內活性氧化物(Reactive oxygen species; ROS)的生成，從實驗中可發現，利用流式細胞儀偵測經 Emodin 作用過之血癌細胞株在短時間時即有大量自由基釋出，這表示 Emodin 能夠促使血癌細胞株產生 ROS，在過去也有文獻指出 ROS 的表現是會影響細胞凋亡的作用【30,31】。為了證實 Emodin 所誘發出的 ROS 是造成細胞凋亡因素之一，因此我們以 N-acetylcysteine (NAC)此胺基酸作為 ROS 的抑制劑【57,58】，進而偵測分析活性氧化物的改變情形，由實驗數據得知，當細胞同時以 Emodin 以 N-acetylcysteine (NAC)共同作用過後，活性氧化物的增加量有明顯的減少，這表示 ROS 的生成走受到了 N-acetylcysteine (NAC)的影響而被抑制住，進一步則是偵測 N-acetylcysteine (NAC)對於細胞存活率的影響，從結果發現當 ROS 被 N-acetylcysteine (NAC)抑制住的同時，細胞存活率則是明顯上升，由此可證明，經 Emodin 所誘發出的活性氧化物質的確是造成血癌細胞株凋亡的因素之一。而細胞經 Emodin 刺激後之所以會釋放出大量

的 ROS，可能走因為 Emodin 在穿透細胞膜進入細胞內時，會破壞細胞膜的組成份 - 磷脂質 (Phospholipid) 使得膜上脂質過氧化 (Peroxidation) 因而產生大量的自由基，造成細胞 DNA damage【59】。而另一個和細胞凋亡相關路徑-ER stress pathway 的研究方面，過去有文獻指出內質網壓力(ER stress)產生的機制和蛋白質的摺疊(fold)是有相關性的【60】，當內質網發生 ER stress 時，此時蛋白質摺疊訊息會發生錯誤，而具有修復蛋白質摺疊功能的蛋白—GRP78 便會大量活化表現量增加，因此 GRP78 (glucose-regulated protein) 亦可當作走內質網壓力的指標之一【61】。此外，內質網上的三個感應器蛋白 PERK、IRE1 和 ATF6 在 ER stress 無法排除或累積過多時也會被啟動活化進行一連串和凋亡作用相關的反應【62】，包括：(a) PERK 和 ATF6 會藉由不同路徑促使下游的 GADD153 (modulators) 大量表現，而 GADD153 (growth arrest and DNA damage inducible gene 153) 是一種轉錄因子，能夠抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表現及促進促凋亡蛋白 Bax 的表現，以調控細胞凋亡作用，另外當細胞生長抑制及 DNA 受損時 GADD153 亦會增加。(b) IRE1 會啟動 TRAF2-ASK-JNK pathway 誘導細胞走向凋亡路徑等反應。由西方墨點法的實驗結果得知 GADD153、GRP78 蛋白表現皆增加，而在粒線體中 Bcl-2 蛋白表現下降、Bax 上升，皆符合上述之理論，另外鈣離子濃度的偵測在短時間

也有大量的釋放，因此可推論：經 Emodin 作用過的小鼠血癌細胞株 (WEHI-3) 可能是受到外來藥物的刺激後，而使得內質網受到嚴重壓力導致細胞中鈣離子濃度不平衡，進而活化 ER stress pathwa) 造成細胞凋亡。

從細胞株各項實驗結果可證實 Emodin 能夠誘導小鼠血癌細胞株 (WEHI-3) 產生凋亡作用，我們便以此藥物應用在動物試驗且探討其作用，實驗以 WEHI-3/BALB/c 小鼠作為 Emodin 的抗癌評估。

實驗結果顯示：

- (一) 從觀察小鼠活動力、毛色、型態外觀的改變以及測得體重、脾臟重量，可發現大黃素確實能夠減緩 WEHI-3/BALB/c 小鼠病變的程度。
- (二) 利用流式細胞儀分析 WEHI-3/BALB/c 小鼠週邊白血球細胞族群的分佈，可得知給予 Emodin 治療後的 WEHL-3/BALB/c 小鼠，其免疫系統中 B 細胞-CD19 及調控細胞吞噬作用-CD11b 族群比起未給予藥物治療的致癌小鼠有顯著性的增加。
- (三) 經 Emodin 治療後的 WEHI-3/BALB/c 小鼠，其脾臟組織裡癌細胞浸潤的區域比起未給予藥物治療的致癌小鼠有明顯減少的現象，由此推測 Emodin 可能可以殺死 WEHI-3/BALB/c 小鼠體內的癌細胞。

根據上述實驗結果，我們可初步推論 Emodin 在 WEHL-3/BALB/c 小鼠體內可能具有毒殺癌細胞(WEHI-3 cells) 的能力，而使得小鼠週邊血液裡的未成熟血球細胞數目減少，進而提升修復免疫功能讓 B 細胞(CD19)族群表現大量增加並增加巨噬細胞吞噬能力(CD11b)，甚至是直接增強小鼠體內的免疫力等等。因此 Emodin 具有抗癌功效但是否真的可被應用在臨床治療血癌的病人，這都值得再做進一步研究探討，而 Emodin 確實是一個極具有開發潛力的抗癌藥物。



第六章 結論

本實驗目的為探討大黃素誘導小鼠血癌細胞株(WEHL-3)產生細胞凋亡的機制，由上述種種實驗結果可得到以下幾個結論：

(一)、大黃素能夠抑制血癌細胞株的存活率，這表示大黃素對於癌細胞具有毒殺作用。

(二)、利用 DNA Fragmentation、Comet assay 和 DAPI staining 可觀察到 DNA 斷裂形發生，而得知 DNA 損傷的程度。

(三)、利用流式細胞儀偵測分析，血癌細胞株經 Emodin 作用之後，皆會釋放出大量的鈣離子以及活性氧化物質(ROS)，而導致粒線體膜通透性改變、膜電位下降。

(四)、利用流式細胞儀也可測得 Caspase-3、-8、-9 活性皆有上升的表現。

(五)、藉由西方墨點法探討了當粒線體膜電位改變時，一些與細胞凋亡有關的蛋白表現量以及觀察和內質網壓力產生有關的蛋白變化情形，此外，免疫螢光染色的實驗利用共軛焦顯微鏡觀察細胞凋亡的情形。由種種實驗結果可推論 Emodin 誘導老鼠血癌細胞株(WEHI-3)產生細胞凋亡可能和 Mitochondria-dependent apoptosis pathway、ER stress pathway 兩者路徑皆有關。

(六) 大黃素影響體內免疫機轉及細胞吞噬之抗癌作用探討，藉由 *in vivo* 動物實驗，發現 Emodin 在 WEHL-3/BALB/c 小鼠體內可能具有毒殺癌細胞(WEHI-3 cells)的能力，而使得小鼠週邊血液裡的未成熟血球細胞數目減少，進而提升修復免疫功能讓 B 細胞(CD19)族群及(CD11b)表現大量增加並增加 PBMC 和腹膜巨噬細胞吞噬能力，甚至是直接增強小鼠體內的免疫力等等。

綜合上述結果，Emodin 可能透過破壞粒線體功能、產生自由基並誘導細胞計劃性凋亡之機制執行其抗血癌能力(圖 6-1)，同時配合動物模式實驗也得知 Emodin 可能藉由毒殺癌細胞因而提升了免疫功能，故 Emodin 在未來應用在臨床治療癌症病患以及抗癌研究方面是具有無限潛力及發展性的。

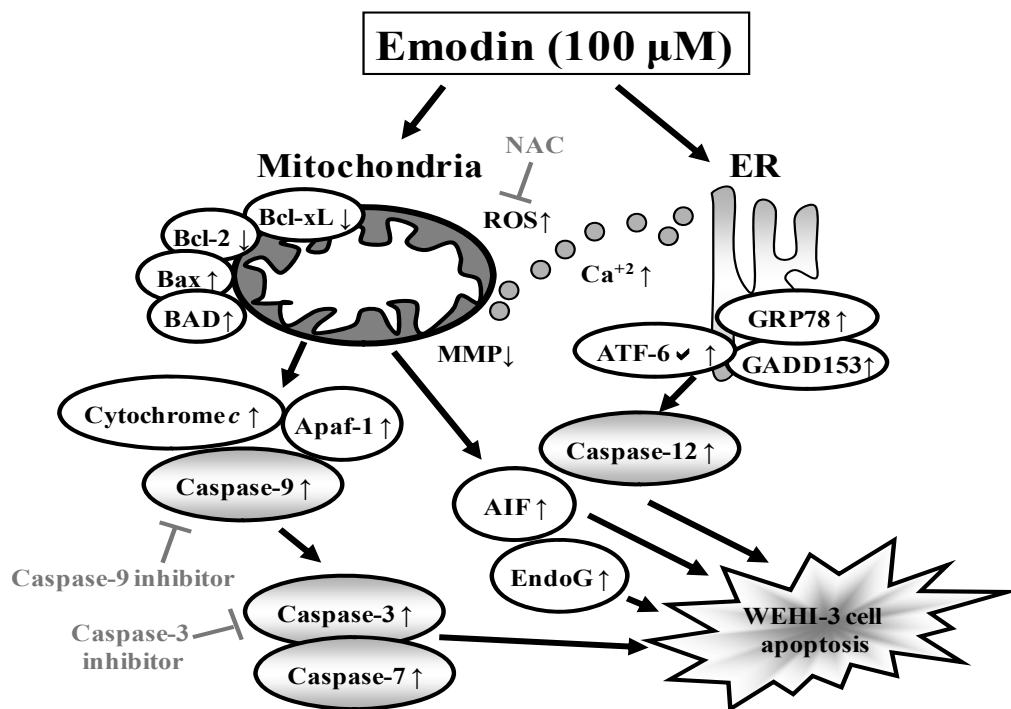


圖 6-1 大黃素誘導細胞(WEHI-3)凋亡之機制

參考文獻

- 1、行政院衛生署 97 年十大死因排行榜
<http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>. 2008
- 2、邱頌平. 中華名藥研究系列叢書-大黃的藥學與臨床研究.北京.中國中醫藥出版社. 2007
- 3、李秀才.大黃的研究進展[J].中國藥學雜誌. 1998; 33(10): 581.
- 4、Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP. Molecular mechanism of emodin action. Transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev.* 2007; 27 (5): 591-608
- 5、Kuo TC, Yang JS, Lin MW, Hsu SC, Lin JJ, Lin HJ, Chung JG. Emodin has cytotoxic and protective effects in rat C6 glioma cells: roles of Mdr1a and nuclear factor kappa B in cell survival. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 330(3): 736-744
- 6、Lin SY, Lai WW, Ho CC, Chen GW, Yang JS, Chung JG. Emodin Induces Apoptosis of Human Tongue Squamous Cancer SCC-4 Cells through Reactive Oxygen Species and Mitochondria-dependent Pathways. *Anticancer research.* 2009; 29: 327-336
- 7、Shieh DE, Chen YY, Yen MH. Emodin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. *Life Sci.* 2004; 74 (18): 2279-2290
- 8、Jing X, Ueki N, Cheng J. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. *Jpn J Cancer Res.*2002; 93(8):

874-8821

- 9、Kmi MS, Park M J, Kmi SJ. Emodin suppresses hyaluronic acid-induced MMP-9 secretion and invasion of glioma cells. *Int J Oncol.* 2005;27(3): 839-846
- 10、Kwak HJ, Park M J, Park CM. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR /Flk21) phosphorylation. *Int J Cancer.* 2006; 118 (11): 2711-2720
- 11、Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.
- 12、Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss P, Malden MA. *Essential Haematology.* Blackwell Science. 2000; 4th ed.
- 13、何敏夫.血液學.合計出版社.2003; 3rded.
- 14、Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006; (71): 1397-1421.
- 15、財團法人食品工業發展研究所著.細胞株目錄.食品工業發展研究所.2002; 2nd ed.
- 16、R. Ian Freshney. *Culture of Animals Cells A Manual of Basic Technique.* WILEY. 5th ed.
- 17、Teresa S. Hawley, Robert G. *Flow Cytometry Protocols.* 2nd ed.
- 18、Petit PX, O'Connor JE, Grunwald D and Brown SC, Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow

- cytometry and possible applications. *Eur. J. Biochem.* 1990; (194): 389-397.
- 19、Royall JA, Schiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993 ; (302): 348-355.
- 20、Kruman II, Mattson MP. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* 1999; (72) : 529-540.
- 21、Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del-Bino C4 Gorczyca W, Hotz MA., Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1992; (13): 795-808.
- 22、Givan AL. *Flow Cytometry: First Principles.* Wiley-Liss. 2001;2nd ed.
- 23、Fox R, Aubert M. Flow cytometric detection of activated caspase-3. *Methods Mol Biol.* 2008; (414): 47-56.
- 24、Lombardi L, Ceccarelli N, Picciarelli P, Lorenzi R. DNA degradation during programmed cell death in *Phaseolus coccineus* suspensor. *Plant Physical Biochem.* 2007; 45: 221-227.
- 25、*Molecular Cloning-Table of Contents.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000.
- 26、Smith P, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Garmer FH, Prorenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BT and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchomic acid. *Anal. Biochem.*

- 1985; 15 : 76-85.
- 27、Shono M, Shimizu I, Omoya T, Hiasa A, Honda H, Tomita Y, Ito S.
Differences in ethidium bromide and 4'-6-diamidino-2-phenylindole staining profiles with regard to DNA fragmentation during apoptosis. *Biochem Mol Biol Int.* 1998; 46 : 1055-61.
- 28、Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, G'aivgo I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 2008; 23 : 143-51.
- 29、Jha AN. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 2008 ; 23 : 207-21.
- 30、Kannan K and Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 2000; 7 : 153-163.
- 31、Engel RH, Evens AM. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci.* 2006; 11: 300-12
- 32、Kroemer G and Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000; 6 : 513-519.
- 33、Parone PA, James D, Kroemer G. Mitochondria-regulating the inevitable. *Biochimie.* 1994; 76 : 665-676.
- 34、Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407 : 770-776.
- 35、Karine F., Ferri, Guido Kroemer. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology.* 2001 ; 3 : E255-E263

- 36、Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002; 9: 459-70.
- 37、Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25: 259-64.
- 38、Vanderbist F, Maes P, Nbye J In vitro comparative assessment of the antioxidant activity of n-acetylcysteine against three reactive oxygen species. *Arzneimittelforschung*. 1996; 46: 783-8.
- 39、Packham G and Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2005; 114: 441-449.
- 40、Smith P, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Garmer FH, Proenzano MD, Droga Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V, Turk B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of Bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem*. 2008; 283(27): 19140-50
- 41、Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: The sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life*. 2008; 60: 390-397.
- 42、Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001 ; 412: 95-99.
- 43、Hong S J, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends*

- Pharmacol Sci. 2004; 25: 259-64.
- 44 、 Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2003; 27: 199-214.
- 45 、 Dale E, Bredesen, Rammohan VR, Patrick M. Cell death in the nervous system. Nature. 2006; 443: 796-802.
- 46 、 Romisch K. Endoplasmic reticulum-associated degradation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2005; 21: 435-456.
- 47 、 Egger L, Madden DT, Rh6me C, Rao RV, Bredesen DE. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death mediated by the proteasome. Cell Death Differ. 2007 ; 14: 1172-80
- 48 、 Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. J Cell Sci. 2006; 119 : 3958-66.
- 49 、 Su CC, Yang JS, Lin SY, Lu HF, Lin SS, Chang YH, Huang WW, Li YC, Chang S J, Chung JG. Curcumin inhibits WEHI-3 leukemia cells in BALB/c mice in vivo. In Vivo. 2008; 22: 63-68.
- 50 、 Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today. 1993; 14: 126-30.
- 51 、 Nicotera P, Leist M, Ferrando ME. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. Biochem. Soc. Symp. 1999; 66: 69-73.
- 52 、 Chen JC, Lu KW, Lee IH, Yeh CC, Chung JG. Gypenosides induced apoptosis in human colon cancer cells through the

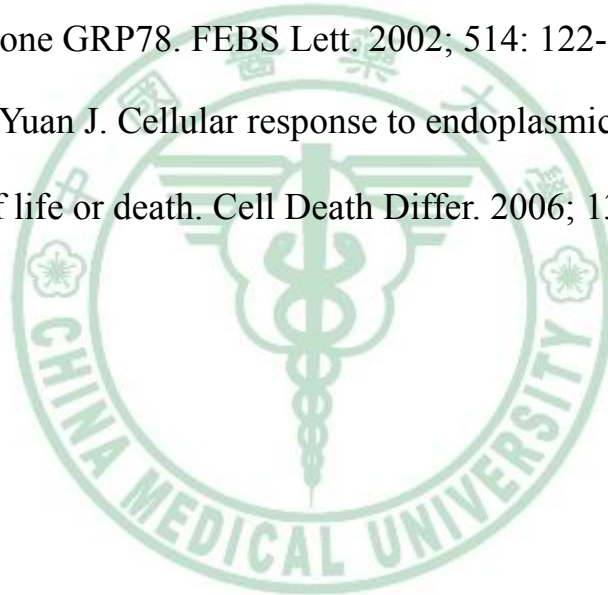
- mitochondria-dependent pathways and activation of caspase-3.
Anticancer Res. 2006; 26: 4313-4326.
- 53 、Chen YC, Shen SC, LeeWR. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64: 1713-1724.
- 54 、Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1644: 133-147.
- 55 、Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999; 399: 483-487.
- 56 、Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Bezmkov SM. Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem*. 2004; 279: 13575-13583.
- 57 、Cai T, Fassina G, Morini M, Aluigi MG, Masiello L, Fontanini G, D'Agostini F, DeFlora S, Noonan DM, Albini A. N-acetylcysteine inhibits endothelial cell invasion and angiogenesis. *Lab Invest*. 1999; 79: 1151-9.
- 58 、Ates B, Abraham L, Ercal N. Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radic Res*. 2008; 42: 372-7.
- 59 、Jiang J, Serinkan BF, Tyurina YY, Borisenko GG, Mi Z, Robbins PD,

Schroit AJ, Kagan VE. Peroxidation and externalization of phosphatidylserine associated with release of cytochrome c from mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35: 814-25.

60 、 Bemales, S. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2006; 22: 487-508.

61 、 Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* 2002; 514: 122-8.

62 、 Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 363-373



Emodin inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vitro and enhances macrophage phagocytosis in vivo

Yuan-Chang Chang

Major professor: Tung-Yuan Lai

Graduate institute of Chinese Medical science, China Medical University

Abstract

Emodin is extracted from *Rheum palmatum* L. that had been used as folk medicine in Chinese population. Emodin have been shown to induce cell death and apoptosis in many human cancer cell lines, such as lung, cervical, melanoma, esophagus and liver cancers. However, there is no available information to address Emodin induced apoptosis in WEHI-3 cells. We examined the effects of Emodin on murine leukemia WEHI-3 cells and enhance macrophage phagocytosis in vivo. Therefore, the results from flow cytometric analysis indicated that Emodin arrest cell cycle in G0/G1 and induced apoptosis in examined cell line.

We also used DAPI stain and DNA gel electrophoresis to confirm Emodin induced apoptosis in WEHI-3 cell line. Flow cytometric also used for analysis the levels of reactive oxygen species, Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential (MMP) in WEHI-3 cell lines. The results showed Emodin promoted ROS and Ca^{2+} production and decreased the MMP level. Western blotting show that Emodin treatment gradually decreased the levels of anti-apoptotic protein (Bcl-2), but increased the levels of the pro-apoptotic protein (Bax). Emodin promoted the release of cytochrome c from mitochondria based on the changes of MMP and the activation of caspase-3 before leading to apoptosis.

In this study, we examined the *in vivo* effects of Emodin on leukemia WEHI-3 cells and on macrophage phagocytosis. The weights of the livers and spleens were decreased in the Emodin-treated groups compared to the control groups. The Emodin treatment increased the percentage of CD11b and CD19 marker cells in WEHI-3-injected mice and decreased the percentage of Mac-3 indicating that the differentiation of the precursor of macrophage and B cells was inhibited. The Emodin treatment promoted the activity of macrophage phagocytosis in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and peritoneal cells. In conclusion, Emodin can inhibit WEHI-3 cells *in vitro* and promote macrophage phagocytosis *in vivo*.

keywords : Emodin, *Rheum palmatum*, WEHI-3, apoptosis, phagocytosis

