

中國醫藥大學  
生物科技學系碩士班  
碩士學位論文

鞣花酸對於引起人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 的  
細胞凋亡與抑制生長的影響

The Effect of Ellagic Acid Induced Growth Inhibition and Apoptosis  
on Human Bladder Carcinoma TSGH-8301 cells.

指導教授：鍾景光 教授

共同指導教授：陳柏源 助理教授

研究生：何郡誌

中華民國九十九年五月

中國醫藥大學 生物科技系碩士班

碩士候選人學位考試

論文題目

中文：鞣花酸對於引起人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 的  
細胞凋亡與抑制生長的影響

英文：The Effect of Ellagic Acid Induced Growth Inhibition and  
Apoptosis on Human Bladder Carcinoma TSGH-8301 cells.

本論文係何郡誌於中國醫藥大學生物科技系碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

考試委員

鍾景光

楊永欣

陳柏源

林仁三

王朝輝

系主任：

鍾景光

中華民國 九十九年五月二十五日

## 中文摘要

Ellagic acid (EA)是存在莓類、水果和堅果中的一種多酚類化合物。在過去的研究中顯示可以抑制癌症的生長與促使癌症細胞的凋亡。雖然 EA 已經被研究指出具有抗癌的活性，卻沒有明確的證據指出可以誘發人類膀胱癌細胞 TSHG-8301 的細胞凋亡。因此在本論文中探討 EA 是否可以誘發膀胱癌細胞 TSHG-8301 的細胞凋亡。首先我們利用 MTT assay 測試處理完不同濃度的 EA 並培養不同時間後的細胞存活率。我們也利用的流式細胞儀去偵測細胞中的細胞週期、粒線體膜電位變化、活性氧基群的表現、以及細胞質中鈣離子濃度的變化，最後再利用流式細胞儀去偵測 caspase-3 的活性與 Annexin V 親和力分析，藉此進一步的確認細胞凋亡的現象。實驗結果顯示 EA 可以抑制細胞的生長。EA 也會使細胞中的粒線體膜電位下降，並且造成 DNA 的與染色體凝集。由西方墨點法分析發現 Bid 與 Bax 表現明顯的增加，同時也發現 cytochrome *c*、AIF 與 Endo G 由粒線體中釋放出來並造成下游路徑的活化並造成細胞凋亡。總觀以上結果我們認為 EA 可以引起粒線體功能的缺失並導致細胞毒性，且使粒線體膜電位下降與引起 DNA 的損傷最後導致細胞死亡。

關鍵字: Ellagic Acid、粒線體、TSGH-8301 細胞、細胞凋亡

## 英文摘要

Ellagic acid (EA), a polyphenolic compound which was found in berries, fruits and nuts, has been shown to possess growth inhibition and apoptosis promoting activities in cancer cell lines. Although EA has been reported with anticancer activity, there are no direct evidences for EA induces apoptosis in human bladder carcinoma TSGH-8301 cells. In this study, we investigated EA whether or not can induce apoptosis in TSGH-8301 cells. We use MTT assay to determine cell viability from TSGH-8301 cells after treated with different doses of EA and for various time periods. We also used the flow cytometry to examine the levels of mitochondrial membrane potential, the production of reactive oxygen species and the levels of calcium ion after TSGH-8301 cells treated with various doses of EA. Finally, we used the flow cytometry to examine caspase-3 activity and Annexin V affinity assay for apoptosis. Our results indicated that the proliferation of TSGH-8301 cells was inhibited after treated with EA (50 $\mu$ M) for 48 hours. EA also caused decreased the levels of MMP in TSGH-8301 cells. In nuclear, we seen the chromatins began to condense in TSGH-8301 cells after EA (50 $\mu$ M) treated for 24 hours. Then, DNA was damaged after EA treated for 48 hours. In Western blotting assay, we found Bid and Bax were expressed and cytochrome c, AIF and Endo G were released from mitochondria and activated downstream pathway to cause cell apoptosis. In conclusion, we suggest that EA caused the dysfunction of mitochondria followed by causing cytotoxicity, DNA damaged and MMP decreased, then led to cell death.

Keywords: Ellagic Acid, Mitochondria, TSGH-8301 cells, Apoptosis

## 誌謝

兩年的碩士班研究生生涯不算長也不算短，但在這兩年內我學到了許多新的事物。從一個完全部會做實驗的大學生，慢慢地學著一個接著一個的新實驗，直到現在成為學了許多實驗的研究生。不僅僅學到了實驗上的技巧，在研究生活的經驗中學到了待人處事的道理。

而碩士班兩年內最重要的是遇到能夠讓我獲益匪淺的良師益友們。首先感謝鍾景光老師為我提供如此優質的實驗環境與指導，有老師對我們的支持，我們才能夠順利的進行實驗。鍾景光老師雖然身上的事務十分繁重，但仍不時無刻的關心我們的實驗。三不五時的也會提醒我們的實驗進度。同時我也很感謝楊家欣老師與黃雯雯老師在實驗上適時的提供幫助。

感謝實驗室中的學長姐:啟程、若華與鈞隆，他們不厭其煩地替我解決實驗上的問題。也感謝實驗室的同伴們。因為有老師們與實驗室的同伴們我才能夠完成我的論文。感謝林仁混老師、王朝鐘老師、鍾景光老師、陳柏源老師與楊家欣老師在百忙之中抽空來為我口試。

最重要的就是要感謝我的父母親，他們無怨無尤地為我的付出更是讓我永遠銘記在心。最後，謹以此文獻給我摯愛的雙親。

## 總目錄

總目錄	I
表目錄	V
圖目錄	VI
縮寫表	IX
<b>第一章 前言</b>	<b>1</b>
<b>第一節 研究背景</b>	<b>1</b>
一、 惡性腫瘤之介紹	1
二、 膀胱癌(Bladder cancer)之介紹	4
三、 鞣花酸 (Ellagic acid)之介紹	6
四、 細胞凋亡之介紹	8
五、 內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress)之介紹	12
六、 細胞週期 (cell cycle)之介紹	15
<b>第二節 研究目的</b>	<b>17</b>
<b>第二章 材料與方法</b>	<b>18</b>
<b>第一節 實驗材料</b>	<b>18</b>
一、 細胞來源	18
二、 藥品試劑	18
三、 儀器設備	21

第二節 實驗方法	23
一、 藥物 Ellagic acid 的配製	23
二、 人類膀胱癌細胞 TSGH-8301 細胞培養	23
三、 細胞的冷凍保存	25
四、 冷凍細胞的活化	25
五、 細胞存活率分析	26
六、 細胞週期 (Cell cycle)	27
七、 彗星試驗 (Comet assay)	29
八、 細胞核質濃縮現象	31
九、 DNA 膠體電泳(DNA gel electrophoresis)	32
十、 活性氧物質	34
十一、粒線體膜電位(Mitochondrial membrane potential, MMP)變化	35
十二、鈣離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ )釋出之檢測	37
十三、西方點墨法 (Western blotting)	38
十四、免疫螢光染色	43
十五、Annexin V affinity assay	44
十六、Caspase-3 活性分析	45
十七、Quantitative PCR Analysis	46
十八、統計分析	48

第三章 研究結果	49
第一節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞生長影響	49
第二節 Ellagic acid 對老鼠正常細胞株 A10 毒性的影響	52
第三節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞週期的影響	54
第四節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞 DNA 損傷的影響	57
一、 DAPI 染色法	57
二、 彗星試驗 (Comet assay)	60
三、 DNA 膠體電泳 (DNA gel electrophoresis)	62
第五節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞產生活性氧物質能力的影響	64
第六節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞內鈣離子 (Ca <sup>2+</sup> ) 釋出的影響	66
第七節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞粒線體電位 (Mitochondrial membrane potential, MMP) 的影響	68
第八節 Ellagic acid 誘導 TSGH-8401 細胞產生細胞凋亡的影響	70
一、 Annexin V affinity assay	70
二、 Caspase activity assay	72
第九節 以西方墨點法探討 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞產生細胞凋亡之相關蛋白表現	75

第十節	以西方墨點法探討 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞的 細胞週期之相關蛋白表現 -----	81
第十一節	利用免疫螢光染色探討 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細 胞中凋亡相關蛋白之表現與轉移之影響 -----	83
第十二節	以 Quantitative PCR Analysis 探討 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞產生凋亡相關蛋白之 mRNA 表現 ---	87
第四章	<u>討論</u> -----	89
第五章	<u>結論</u> -----	98
第六章	<u>參考文獻</u> -----	99



## 表目錄

表 2-2-1 Cell cycle 之 PI 染劑 -----	28
表 2-2-2 SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel)之配置與組成 -----	41
表 2-2-3 SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel)之配置與組成 -----	41
表 2-2-4 電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer) -----	41
表 2-2-5 轉漬緩衝液 (Transfer buffer) -----	42
表 2-2-6 Quantitative PCR 所使用之 primer -----	47
表 3-12-1 mRNA 定量分析表 -----	87



## 圖目錄

圖 1-1-1 鞣花酸 (Ellagic acid)化學結構式 -----	7
圖 1-1-2 細胞死亡的三種方式 -----	10
圖 1-1-3 經由外在、內在與其它相關的凋亡路徑 -----	11
圖 1-1-4 內質網壓力反應誘使細胞走向存活之路徑-----	14
圖 1-1-5 內質網壓力誘導細胞走向凋亡之路徑-----	14
圖 2-2-1 細胞培養之簡易示意圖 -----	24
圖 2-2-2 蛋白質轉漬順序 -----	42
圖 3-1-1 TSHG-8301 細胞經不同濃度 Ellagic acid 處理 24 小時後 細胞型態之變化 -----	49
圖 3-1-2 TSHG-8301 細胞經不同濃度 Ellagic acid 處理 48 小時後 細胞型態之變化 -----	50
圖 3-1-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞之細胞存活率的影響 -----	51
圖 3-2-1 EA 對正常細胞 A10 與 TSGH-8301 存活率的影響 -----	53
圖 3-3-1 不同濃度 EA 處理 TSGH-8301 細胞 48 小時後，細胞周期 之變化 -----	55
圖 3-3-2 TSGH-8301 細胞以 25 $\mu$ M 的 EA 處理後，細胞週期之變 化 -----	56
圖 3-4-1 EA 對於 TSGH-8301 細胞之染色體凝集的影響-----	58

圖 3-4-2 DAPI 螢光量之量化圖 -----	59
圖 3-4-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞之 DNA 產生受損的影響 -----	61
圖 3-4-4 EA 對於 TSGH-8301 細胞之 DNA 產生斷裂的影響 -----	63
圖 3-5-1 EA 對於 TSGH-8301 細胞活性氧化物質(ROS)產生的影響 -----	65
圖 3-6-1 EA 對 TSGH-8401 細胞內鈣離子( $Ca^{2+}$ )釋出的影響 -----	67
圖 3-7-1 EA 對 TSGH-8401 細胞粒線體電位的影響 -----	69
圖 3-8-1 EA 誘導 TSGH-8401 細胞產生細胞凋亡的影響 -----	71
圖 3-8-2 EA 對於 TSGH-8301 細胞 caspase-9 活性的影響 -----	73
圖 3-8-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞 caspase-3 活性的影響 -----	74
圖 3-9-1 粒線體路徑之凋亡相關蛋白表現變化 -----	76
圖 3-9-2 存於粒線體內之凋亡相關蛋白變化 -----	77
圖 3-9-3 與粒線體相關內在路徑之凋亡相關蛋白表現變化 -----	78
圖 3-9-4 外在路徑之凋亡相關蛋白表現變化 -----	79
圖 3-9-5 抗凋亡相關蛋白表現變化 -----	80
圖 3-10-1 細胞週期相關蛋白表現變化 -----	82
圖 3-11-1 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 cytochrome <i>c</i> 的表現與轉移 的影響 -----	83
圖 3-11-2 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 Smac/DIABLO 的表現與轉	

移的影響	84
圖 3-11-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 Endo G 的表現與轉移的影響	85
圖 3-11-4 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 AIF 的表現與轉移的影響	86
圖 3-12-1 EA 對於 TSGH-8401 細胞 caspase-9 mRNA 表現的影響	88
圖 3-12-2 EA 對於 TSGH-8401 細胞 caspase-3 mRNA 表現的影響	88
圖 5-1 Ellagic acid 誘導人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 細胞凋亡之路徑模式圖	98



## 縮寫表

**AIF : Apoptosis-inducing factor**

**Apaf-1 : apoptosis-protease activating factor 1**

**APS : Ammonium persulfate**

**CDK : cyclin-dependent kinase**

**DMSO : Dimethylsulfoxide**

**EA : Ellagic acid**

**Endo G : Endonuclease G**

**FasL : Fas Ligand**

**FBS : Fetal bovine serum**

**MMP : mitochondrial membrane potential**

**IAPs : inhibitor of apoptosis proteins**

**PBS : Phosphate buffer Saline**

**ROS : Reactive oxygen species**



## 第一章 前言

### 第一節 研究背景

#### 一、惡性腫瘤之介紹

隨著科技的日新月異，國人的生活品質也大幅的被改善。因此人們的平均壽命也隨之增加。然而在平均壽命增加的背後，人們的文明病也與日俱增。最眾所皆知的疾病就是惡性腫瘤了。根據行政院衛生署從 75 年至 97 年統計中，惡性腫瘤一直是導致國人的十大死因中排名第一<sup>1</sup>。根據世界衛生組織公布在 2004 年全球就有 740 萬人口死於癌症，占全球死亡人數的 13%。世界衛生組織預估未來因癌症死亡的人會越來越多，在 2030 年就有 1200 萬人口可能因癌症而死亡<sup>2</sup>。惡性腫瘤，也就是癌症，是一群生長不受控制的細胞所形成的腫塊。腫塊會不斷的生長並且影響到周邊器官的正常功能，進而使得人體的機能喪失而死亡。而且腫瘤細胞會經由浸潤 (invasion) 或經由淋巴管轉移 (metastasis) 到別的器官或組織<sup>3</sup>。由於轉移的現象無法去正確地被偵測，因此對於根治癌症上更是難上加難。

癌症都有可能發生在任何的年齡層，但是隨著年齡得增加罹患癌症的風險也就越大。除了年齡的增長所造成的風險外，長期具有不良的生活習慣，或是處在危險的工作環境中都是發生癌症的高危險群。最常見的不良生活習慣，如暴飲暴食、作息不正常、抽菸酗酒等這些

習慣都有可能造成癌症的形成，而長時間處於危險的工作環境，如揮發性有機顏料、染髮劑、輻射線等也是造能癌症發生的原因之一。以上所指出的原因常常使細胞的遺傳物質損傷或是突變，而使得原致癌基因 (proto-oncogene)轉變成致癌基因 (oncogene)，而使得細胞的生長不被控制進而形成腫瘤<sup>4</sup>。

現今醫學上治療癌症的方法有手術、放射線治療、免疫療法、標定藥物治療、化學療法、荷爾蒙療法、抗血管新生等等。雖然有許多治療癌症的方法，但是都具有相當大的風險與後遺症。例如利用手術雖然可以切除腫瘤，但是常常會因為癌細胞清除不完全而復發癌症、放射線治療最常見的副作用就是毛髮脫落、產生疲倦感與傷害表皮細胞等，因此越來越多的科學家開始尋求天然且對人體副作用較小的天然化合物或成分。例如從大蒜中萃取的 diallyl trisulfide 可經由 Bak 與 Bax 的活化路徑引起肺癌細胞株 H358 的細胞凋亡<sup>5</sup>。由植物中黃酮類 (flavonoid)所衍生出來的 Quercetin 被發現會誘發乳癌細胞株 MCF-7 活性氧化物質的產生並使 AMPK 與 Apoptosis signal-regulating kinase (ASK)-1 的活化，而引起其細胞凋亡<sup>6</sup>。由末食子中發現的 gallic acid 也有研究指出可對抗多種癌症，如：可誘使異種移植至實驗動物上的肺癌細胞株 LL-2 的生長<sup>7</sup>；也可以抑制子宮頸癌細胞株 HeLa 的生長並使之細胞凋亡<sup>8</sup>。

在天然藥物慢慢的被重視的同時，鞣花酸 (Ellagic acid) 也被認為是具有抑制癌症增生的活性<sup>9</sup>。但其抑制之機制仍不甚明瞭，因此本研究以 Ellagic acid 做為研究對象，探討其對癌細胞所造成的影響與其機制。



## 二、膀胱癌 (Bladder cancer)之介紹

膀胱癌顧名思義是發生在膀胱組織的癌症，依組織可分為移行上皮細胞癌 (transitional cell carcinoma, or TCC)、鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinomas)、腺性上皮癌 (adenocarcinomas)。移行上皮細胞癌為佔所有膀胱癌最多的一種；佔約 90%，鱗狀上皮細胞癌與腺性上皮癌分別佔約 8%與 2%<sup>10</sup>。膀胱癌真正發生的原因仍不清楚，但是仍有幾種可能是會導致膀胱癌的原因，包括抽煙、工作環境暴露在致癌物質下如橡膠、化學製劑、皮革製造業、染髮劑等、喜食肉類與高脂肪食物、遭到感染等。膀胱癌的最主要的症狀是血尿，尤其是不具有疼痛感的血尿、頻尿、解尿時感到疼痛。膀胱癌的治療因疾病進展程度的不同而有很大差異，一般癌細胞侵犯程度的不同而區分為以下各期，而有不同的治療的方式：

零 期：癌細胞只限於黏膜。此時經尿道切除或電燒膀胱腫瘤；術後再加上膀胱內灌藥治療即可。八成患者可行這種簡單手術達到良好療效。

第一期： 侵犯到黏膜下層，但未達到肌肉層，治療與零期同。

第二期： 腫瘤已侵犯肌肉層，但未達到軟部組織。此時可施行經尿道切除術、膀胱部份切除或全切除，視侵犯大小不同而定。

第三期： 腫瘤已超過肌肉層，而擴及漿膜層和周圍脂肪，但未達周

圍其他器官，無淋巴腺轉移。此時必須將膀胱根除性切除，加上尿路改道手術或放射線治療或全身性化學治療。

第四期：腫瘤已侵犯其他器官，或有淋巴腺及器官轉移。此時只能靠放射線治療或化學療法。膀胱全切除後，目前可用迴腸來替代，甚至改作一個新膀胱<sup>11</sup>。

預防重於治療，因此預防膀胱癌的發生是相當重要的。以下是關於預防膀胱癌所要注意的事項。不吃含有防腐劑和化學物質的食物，可能附有農藥的食物務必要洗淨。每天應多喝水，尿量維持二千西西以上可減低致癌物質在膀胱的濃度。不要養成憋尿習慣，最好每小時排尿一次，排尿愈頻繁，致癌可能性愈小。每天服用維生素 A、C 和 B6。不吸菸、少染髮、少接觸染料及有機溶劑<sup>11</sup>。

### 三、鞣花酸 (Ellagic acid)之介紹

鞣花酸是屬於一種多酚類的抗氧化劑，它在許多水果跟蔬菜中被發現，例如石榴、胡桃、蔓越莓、草莓跟覆盆子等。在植物中，植物會產生鞣花酸並且會將它轉換成單寧酸 (tannin)。而當植物被食用時，單寧酸上的糖配體 (glucosides) 會被迅速的水解並產生鞣花酸。鞣花酸(圖 1-1-1)是屬於單寧酸的主要結構成分，而那些單寧酸同時也會產生另一種單寧酸如沒食子單寧 (gallotannins)。因此這些單寧被水所水解的時候就會產生鞣花酸跟沒食子酸 (Gallic acid)<sup>12</sup>。鞣花酸在動物實驗中被證明具有抗氧化 (antioxidant) 與抗增生 (antiproliferative) 的能力<sup>13</sup>。在之前的研究報告指出鞣花酸可避免一些致癌物質如亞硝酸 (nitrosamines)<sup>14</sup>、多環類芳香族碳氫化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons)<sup>15</sup> 等去結合到 DNA 上面，而導致 DNA 的傷害。就如同其他多酚類的化合物，鞣花酸在細胞中可以藉由減少氧化壓力而達到化學保護的效果<sup>16</sup>。

近年來鞣花酸在抗癌上的研究陸續的被發表。鞣花酸可抑制神經膠瘤 (glioma) 的生長<sup>10</sup>。誘發人類黑色素瘤 (human melanoma cell) 的細胞凋亡<sup>17</sup>。藉由與槲黃素 (quercetin) 共同的作用而誘使人類血癌 (human leukemia cells) 的細胞週期停滯與細胞凋亡<sup>18</sup>。鞣花酸也會影響人類神經母細胞瘤 (human neuroblastoma cells) 的細胞貼附與生長

<sup>19</sup>。鞣花酸會抑制胰腺癌 (pancreatic cancer cell) 中 NF- $\kappa$ B 進而誘導細胞凋亡<sup>20</sup>。鞣花酸藉由使人類膀胱癌細胞株 T24 的 p21 與 p53 的蛋白表現並使其細胞週期停滯在 G1 期與細胞凋亡<sup>21</sup>。鞣花酸也可以在人類結腸癌細胞株 Caco-2 中調控 MAPK 的訊號傳遞與細胞週期的停滯<sup>22</sup>。另外鞣花酸也會抑制 PDGF 和 VEGF receptors 的表現<sup>23</sup>。根據以上的研究報告顯示，鞣花酸對於抗癌的功效上是非常有潛力的，因此本論文探討鞣花酸對於人類膀胱癌細胞株 TSGH-8401 是否有抗癌效果與其相關機制。

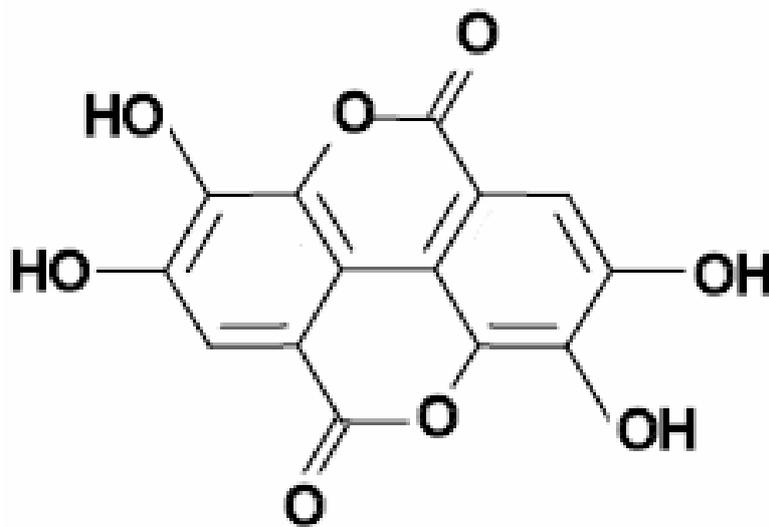


圖 1-1-1 鞣花酸 (Ellagic acid) 化學結構式

#### 四、細胞凋亡之介紹

當細胞受到外在的影響，如藥物、胞器傷害、生長環境的改變等時而使得細胞的 DNA 受到傷害，當傷害無法被修復時，細胞會漸漸的走向死亡。細胞的死亡有分三種，分別是細胞凋亡 (apoptosis)、細胞自噬 (autophagy)<sup>24</sup> 與細胞壞死 (necrosis)。(圖 1-1-2)細胞凋亡又稱為程序性細胞死亡，顧名思義細胞死亡的過程是被調控的而且是有順序性的。細胞凋亡常常牽扯著很多的訊息途徑(圖 1-1-3)，訊息傳遞途徑又粗分為外在路徑 (extrinsic cell death signaling) 與內在路徑 (intrinsic cell death signaling)。內在路徑是藉由粒線體或內質網所引起的一連串反應<sup>25-26</sup>。其中最重要調節者的為 Bcl-2 蛋白家族<sup>27</sup>，Bcl-2 蛋白家族根據功能又分為抑制凋亡蛋白 (anti-apoptosis) 與促進凋亡蛋白 (pro-apoptosis)。抑制凋亡蛋白有 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>、Mcl-1 等，而促進凋亡蛋白有 Bax、Bad、Bid、Bak、Bcl-X<sub>s</sub>、Bim 等。以粒線體路徑為例，當細胞受到刺激時 Bax 會轉移至粒線體膜上引起膜電位下降，Cytochrome *c* 會釋放到細胞質中。Cytochrome *c* 會引起 Caspase-9 的活性進而去活化下游的 Caspase-3 活性並引起細胞凋亡<sup>28</sup>。除此之外粒線體也會釋放出 Apoptosis-inducing factor (AIF) 與 Endonuclease G (Endo G) 這兩種蛋白會直接進入細胞核中對 DNA 進行裂解，而引起細胞凋亡<sup>28</sup>。

除了內在路徑外，另一條路徑便是外在路徑。外在路徑又稱為死亡受器路徑。此條路徑主要是由死亡接受體 (death receptors, DRs) 所調控。舉例來說 Fas (CD95) 是腫瘤壞死因子接受器的一員，當 Fas 與其對應的配體 (ligand) Fas Ligand (FasL) 結合後會啟動下游蛋白的一連串反應，最後將 Caspase-8 裂解使之活化。活化的 Caspase-8 再使 Caspase-3 活化而導致細胞凋亡<sup>29</sup>。另外活化的 Caspase-8 也會活化 Bid，Bid 會活化 Bax 使之在粒線體上形成孔洞而使得粒線體膜電位下降，同樣的會使得細胞死亡<sup>30</sup>。

不論是外在路徑或內在路徑都會引起 caspase 蛋白家族的活性，因此 caspase 蛋白家族在細胞凋亡的過程中扮演著相當重要的角色。caspase 又稱為 cysteine-aspartic proteases (Cysteine dependent aspartate specific protease, 蛋白水解酵素)。一般情況下，caspase 是不具有活性的存在細胞中 (又稱為 pro-caspase)，當細胞因為開始進行細胞凋亡而使得這一系列的蛋白被活化時，會先被裂解並變成活化態。被裂解的 Caspase 又會去活化下游的 caspase 並使之裂解成活化態。被裂解的 Caspase 又再進一步的分解其它的 pro-caspase 形成一連串的訊息傳遞 (caspase cascade)，最後形成死亡受質 (death substrate) 導致 DNA 產生斷裂並使細胞的死亡<sup>31</sup>。

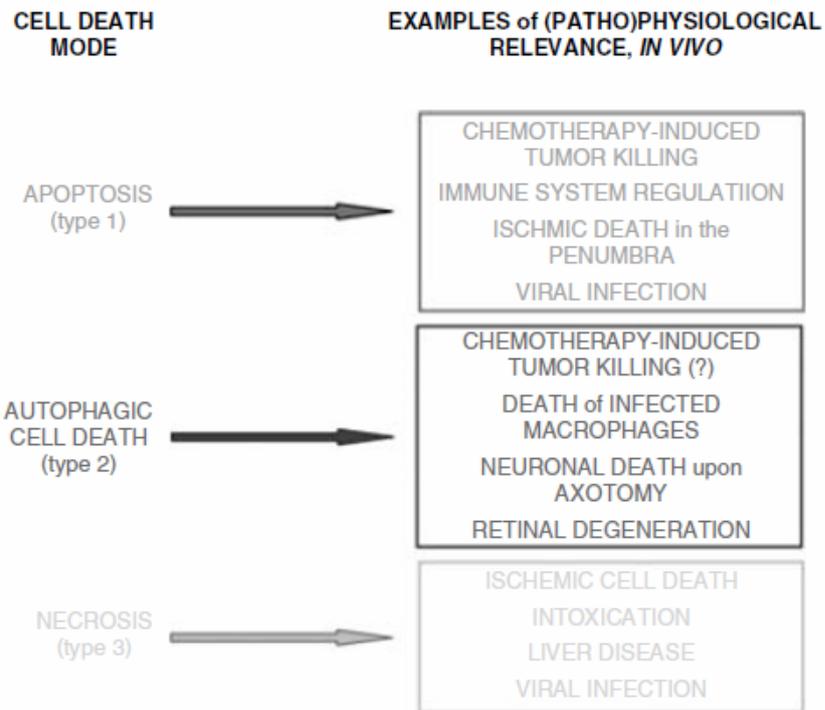


圖 1-1-2 細胞死亡的三種方式<sup>32</sup>



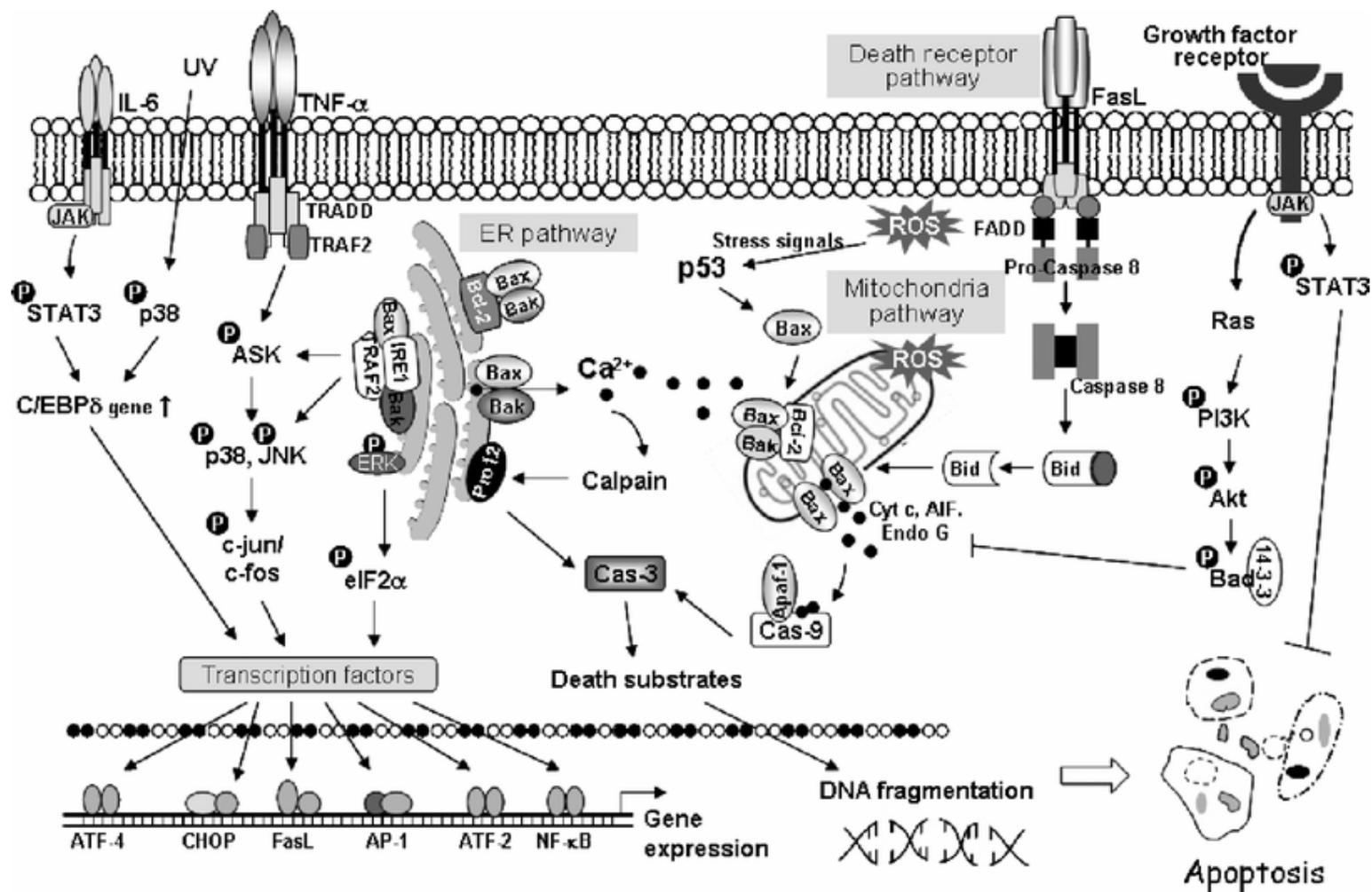


圖 1-1-3 經由外在、內在與其它相關的凋亡路徑<sup>33</sup>

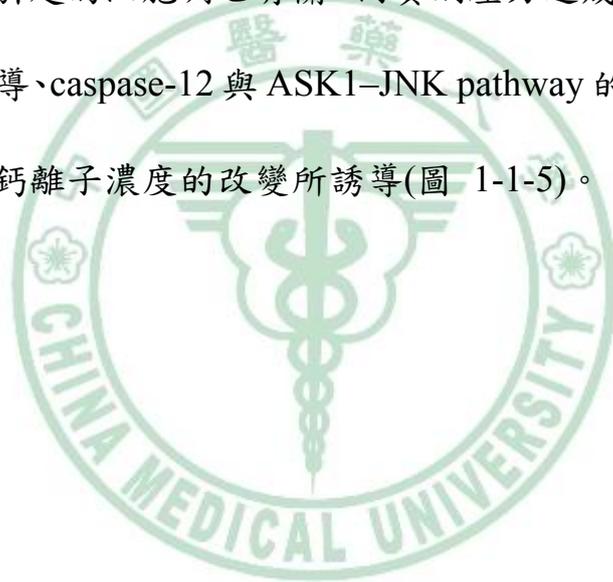
## 五、內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress)之介紹

細胞內有三分之一得蛋白會轉移至內質網內<sup>34</sup>。內質網對於轉譯出來的蛋白摺疊至合適的第三級結構是相當重要的。當內質網的功能受到內在或外在的刺激時稱之為內質網壓力。這些刺激包含做醣蛋白的醣類修飾 (glycosylation)被抑制、雙硫鍵被還原、鈣離子由內質網內部被釋放出、將蛋白轉移至高基氏體 (Golgi)的傳輸蛋白受到損害與突變後的蛋白於內質網中表現。細胞處於內質網壓力下，未折疊的蛋白會累積在內質網中，而這會引起兩種相對的情形產生；細胞凋亡或存活。

當未摺疊的蛋白累積在內質網中時，內質網會啟動自我防衛機制稱為內質網壓力反應 (ER stress responses)，此反應使細胞可在內質網壓力下存活。在真核細胞中，內質網的自我防衛機制包含：(1) 降低轉譯速度已減少未折疊蛋白繼續累積於內質網中<sup>35</sup>。(2) 促使 chaperone (如：BiP/GRP78 與 GRP94)的基因進行轉錄<sup>36</sup>。(3) 內質網所誘導的降解 (ER-associated degradation；ERAD)，將未摺疊蛋白移至細胞質中並利用 26S proteasome 將之降解。以便回復內質網摺疊蛋白的能力<sup>37</sup>。而這些反應主要由內質網膜上之接受器：ATF6、IRE1 和 PERK 所誘導。當不良摺疊蛋白累積於內質網中時，內質網中的感測器如：ATF6、IRE1 和 PERK 便會被活化並誘使內質網壓力反應。

IRE1、ATF4 與 ATF6 會使內質網目標基因的轉錄活化。PERK-eIF2 pathway 則會調控轉譯並降低轉譯速度。IRE1-XBP1 pathway 則會去調控 ERAD pathway 使內質網摺疊蛋白的能力回復(圖 1-1-4)。

當自我防衛機制無法有效降低內質網壓力時，細胞便會走向細胞凋亡使受內質網壓力而受損的細胞遭到摧毀。有研究報告指出 CHOP<sup>38</sup>、caspase-12<sup>39</sup>、Bax/Bak<sup>40</sup>、IRE1<sup>41</sup> 和 MAP kinase cascade<sup>42</sup> 與內質網壓力所引起的細胞凋亡有關。內質網壓力造成的細胞凋亡主要由 CHOP 的誘導、caspase-12 與 ASK1-JNK pathway 的活化與 Bax/Bak 引起內質網內鈣離子濃度的改變所誘導(圖 1-1-5)。



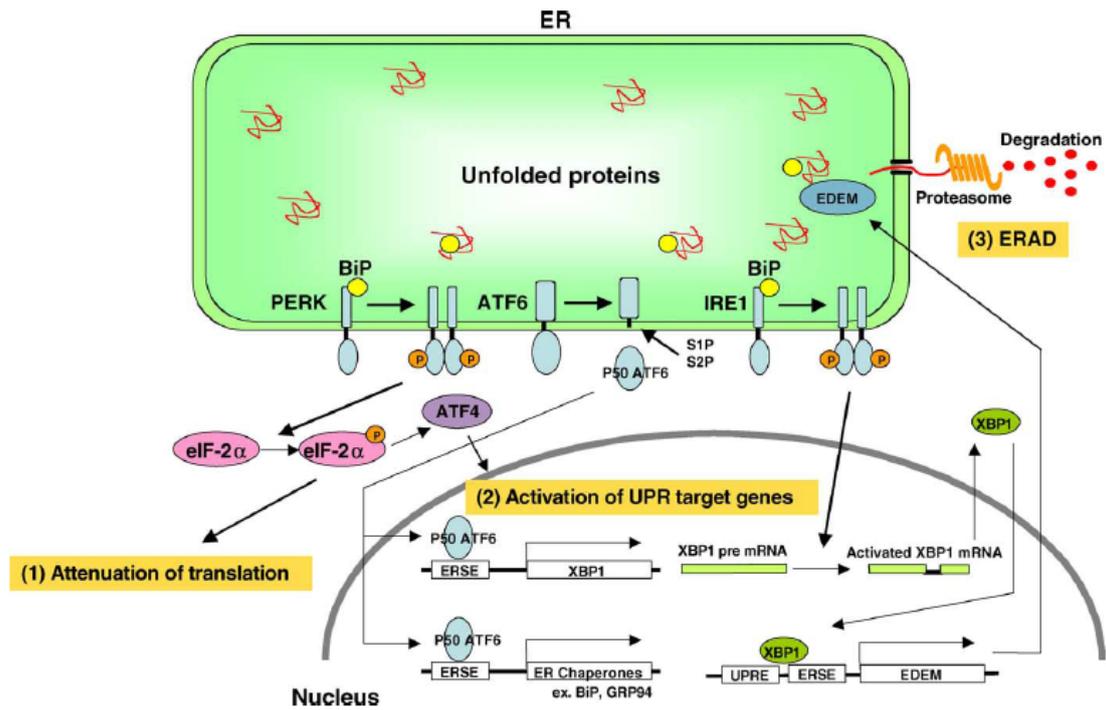


圖 1-1-4 內質網壓力反應誘使細胞走向存活之路徑<sup>43</sup>

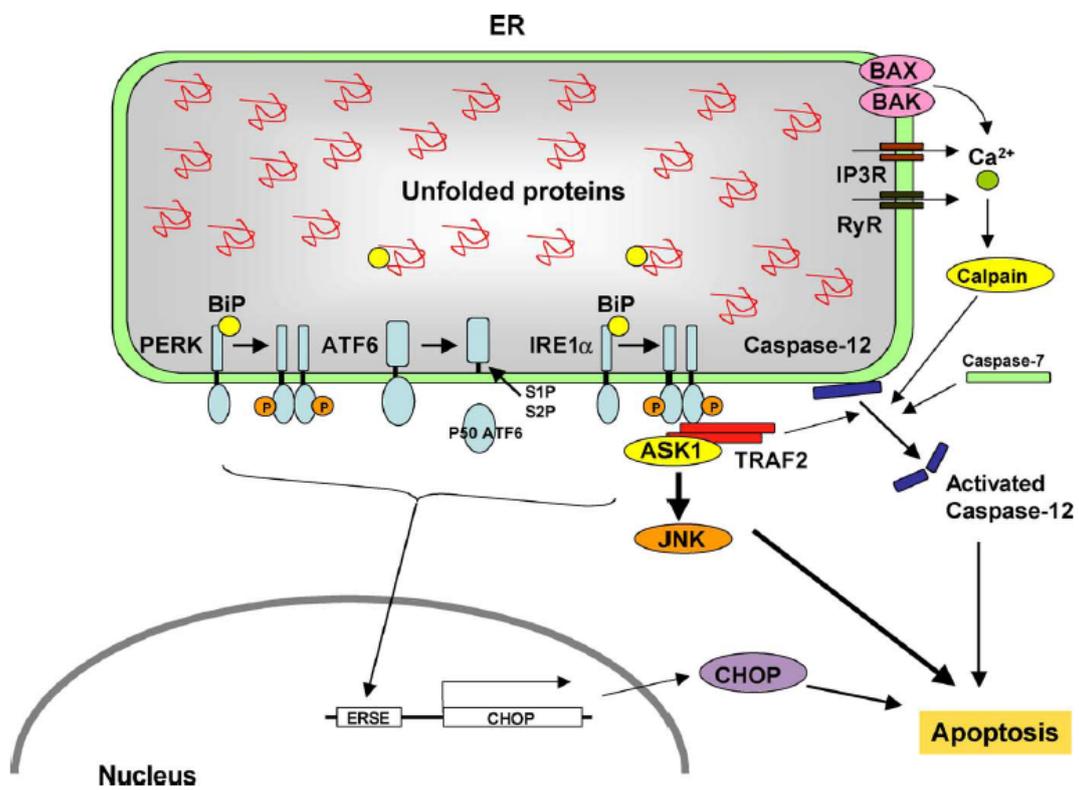


圖 1-1-5 內質網壓力誘導細胞走向凋亡之路徑<sup>43</sup>

## 六、細胞週期 (cell cycle)之介紹

細胞週期可分為四個階段，分別為 G1 (G 代表 gap)、S、G2、M phase (M 代表 Mitosis)，而細胞在進入 G1 phase 前會有一段維持不分裂的狀態稱為 G0 phase。在 G1 phase，細胞會開始合成酵素以提供下一階段 S phase 所使用。細胞週期進入 S phase 後 DNA 開始複製，也就是染色體複製<sup>44</sup>。DNA 合成完便進入 G2 phase。在 G2 phase 中，細胞繼續合成分裂所需物質，例如：有絲分裂時所需的 microtubules。接下來進入 M phase，M phase 又可分為五個期，分別為 prophase (前期)、metaphase (中期)、anaphase (後期)、cytokinesis (細胞質分裂期)、telophase (末期)。細胞分裂完後會離開細胞週期並停止分裂以等待下次分裂的開始，此時稱為 G0 phase。

細胞週期主要受到 CDK (cyclin-dependent kinase)與 cyclins 所調控，它們會形成複合物使得 G1 phase 進入 S phase 或 G2 phase 進入 M phase。cyclin D 與 CDK4 及 CDK6 的結合主要於 G1 phase 的中期至晚期作用，在 G1 phase 晚期則由 cyclin E 與 CDK2 所調控。S phase 至 G2 phase 由 cyclin A 與 CDK2 所調控，cyclin A 及 cyclin B 與 CDK1 會作用在 G2 至 M 期。

當細胞 DNA 複製出現異常或受損時，細胞會藉由啟動 checkpoint 的機制中斷細胞週期。Checkpoint 可分為(1) Intra-S phase checkpoint：

進入 M phase 之前確認所有的 DNA 都已複製；(2) Spindle-assembly checkpoint: 確認紡錘絲的微管蛋白是否結合至 Kinetochore (著絲點)；(3) Spindle-position checkpoint: 確認所有的染色體是否都已準備好分裂；(4) DNA-damage checkpoint: 偵測細胞週期中 DNA 的受損，並誘使細胞週期停滯並修復。



## 第二節 研究目的

關於 Ellagic acid 在抗癌的應用上已經出現初步的結果，其中的機制已經慢慢的被發現。但未有研究指出 Ellagic acid 對於人類膀胱癌細胞株 TSGH-8401 的抗癌效果與機制。因此本研究利用 Ellagic acid 在體外測試與探討人類人類膀胱癌細胞株 TSGH-8401 經由 Ellagic acid 處理後，Ellagic acid 所引起的細胞凋亡與生長抑制的反應及相關的機制。



## 第二章 材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 一、細胞來源.

本論文實驗所使用的細胞為人類膀胱癌 (Human bladder cancer) 細胞株 TSGH-8401，購自新竹食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute)

#### 二、藥品試劑

1. 10X TG-SDS buffer：購自 Amresco
2. 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodine (DiOC<sub>6</sub>)：購自 calbiochem
3. 40% Acrylamide/Bis (29:1)：購自 Amresco
4. Agarose：購自 MD 生化有限公司
5. Ammonium persulfate (APS)：購自 Amresco
6. Annexin V-FITC apoptosis detection kit：購自 BD
7. Benzyl isothiocyanate：購自 Sigma Chemical Co.
8. BioMax Flim：購自 Kodak
9. Bovine serum albumin (BSA)：購自 Merck
10. Dimethyl sulfoxide (DMSO)：購自 Sigma Chemical Co.
11. Disodium hydrogen phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)：購自 Merck

12. Ellagic acid : 購自 Fluka
13. ELC kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amresco
14. Ethanol : 購自 TEDIA
15. Fetal bovine serum (FBS) : 購自 Invitrogen
16. Formaldehyde : 購自 Sigma Chemical Co.
17. Glycine : 購自 Amresco
18. L-Glutamine : 購自 Invitrogen
19. Low melting agarose (LMA) : 購自 USB
20. Methanol : 購自 TEDIA
21. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) : 購自 Amresco
22. N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) : 購自 Amresco
23. Normal melting agarose (NMA) : 購自 USB
24. Penicillin-Streptomycin (PS) : 購自 Invitrogen
25. Phenethyl isothiocyanate : 購自 Sigma Chemical Co.
26. PhiPhiLux<sup>®</sup> kit : 購自 OncoImmulin (Gaithersburg, MD, USA)
27. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
28. Potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) : 購自 Merck
29. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.

30. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
31. Protein extraction solution (PRO-PREP) : 購自 iNtRON  
Biotechnology, Inc.
32. Protein marker : 購自 Fermentas
33. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amresco
34. RPMI-1640 medium : 購自 Invitrogen
35. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck
36. Sodium dodecyl sulfate (SDS) : 購自 Amresco
37. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) : 購自 Amresco
38. Triton X-100 : 購自 Sigma Chemical Co.
39. Trypan Blue : 購自 Sigma Chemical Co.
40. Trypsin-EDTA : 購自 Sigma Chemical Co.
41. Tween-20 : 購自 Amresco
42. 顯影劑 : 購自 Kodak
43. 定影劑 : 購自 Kodak
44. Primary antibody (1° antibody)
  - (1) Anti-β actin : 購自 Sigma Chemical Co.
  - (2) Anti-AIF : 購自 BD
  - (3) Anti-Apaf-1 : 購自 Calbiochem

- (4) Anti-Bak：購自 Cell Signaling Technology
- (5) Anti-Bax：購自 upstate
- (6) Anti-Bcl-2：購自 biovision
- (7) Anti-Bcl-X<sub>L</sub>：購自 Santa cruz
- (8) Anti-Bid：購自 Chemicon
- (9) Anti-Caspase-3：購自 Sigma Chemical Co.
- (10) Anti-Caspase-9：購自 biovision
- (11) Anti-Cytochrome *c*：購自 biovision
- (12) Anti-Endo G：購自 Santa cruz
- (13) Anti-Smac/Diablo：購自 Cell Signaling Technology
- (14) Anti-XIAP：購自 Santa cruz

45. Secondary antibody (2° antibody)

- (1) Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon
- (2) Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon
- (3) Goat anti-sheep IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon

### 三、儀器設備

1. 無菌操作台、細胞培養皿、細胞培養箱、冷凍管、恆溫離心機、

血球計數版、倒立式顯微鏡、Dispenser、1.5/ 15/ 50 mL 離心機、  
Pipetmen。

2. 去離子水製造機、電源供應器、酸鹼值測定器 (pH meter)、PVDF  
membrane、震盪器、SDS-PAGE 電泳槽套組、Transfer Cell Bolt Kit、  
加熱板。

3. 流式細胞儀、高速離心機、酵素免疫分析儀、單細胞電泳槽。



## 第二節 實驗方法

### 一、藥物 Ellagic acid 的配製

Ellagic acid 為固體藥物。Ellagic acid 的分子量為 338.23，純度為 98% 以上。利用 DMSO 為溶劑配置成 7.5 mM 的庫存液 (stock solution)，並分裝於 1.5 mL 微量離心管。庫存液儲存於 -20 °C 冰箱中備用，於每次實驗前利用 DMSO 稀釋成所需之濃度。

### 二、人類膀胱癌細胞 TSGH-8301 細胞培養

TSGH-8301 所使用之培養基為 RPMI-1640 medium，額外添加胎牛血清 (FBS)、抗生素 (PS) 與 L-Glutamine，使細胞培養基最終含有 10% FBS、1% PS 與 2 mM L-Glutamine。培養箱環境具有 5% CO<sub>2</sub> 與 37 °C 的溫度。每隔 2 天換一次培養基，等細胞八分滿時進行繼代或分盤做實驗。

由於 TSGH-8401 為貼附型細胞，因此每次繼代或分盤時需要利用 Trypsin-EDTA 將細胞懸浮。首先要利用磷酸緩衝液 (Phosphate buffer saline, PBS) 清洗細胞，再加入 2~3 mL 的 0.5 mg/mL Trypsin-EDTA。等待 3~5 分鐘，當細胞完全懸浮時，加入培養基以終止 Trypsin-EDTA 的反應。接著取出細胞至離心管中，並離心 1500 rpm，5 分鐘。離心完後去除上清液，加入培養基稀釋細胞。取出稀釋後的細胞種至新的

培養瓶中進行繼代。剩餘的細胞則是利用血球計數盤與 Trypan blue 來計算細胞數。Trypan blue 可以染死細胞而活細胞不會被染色，藉此來分辨出活細胞與死細胞，再配合血球計數盤便可以計算出活細胞數。計算完細胞數後，再依實驗所需之細胞數種至培養皿或培養盤中並進行實驗。

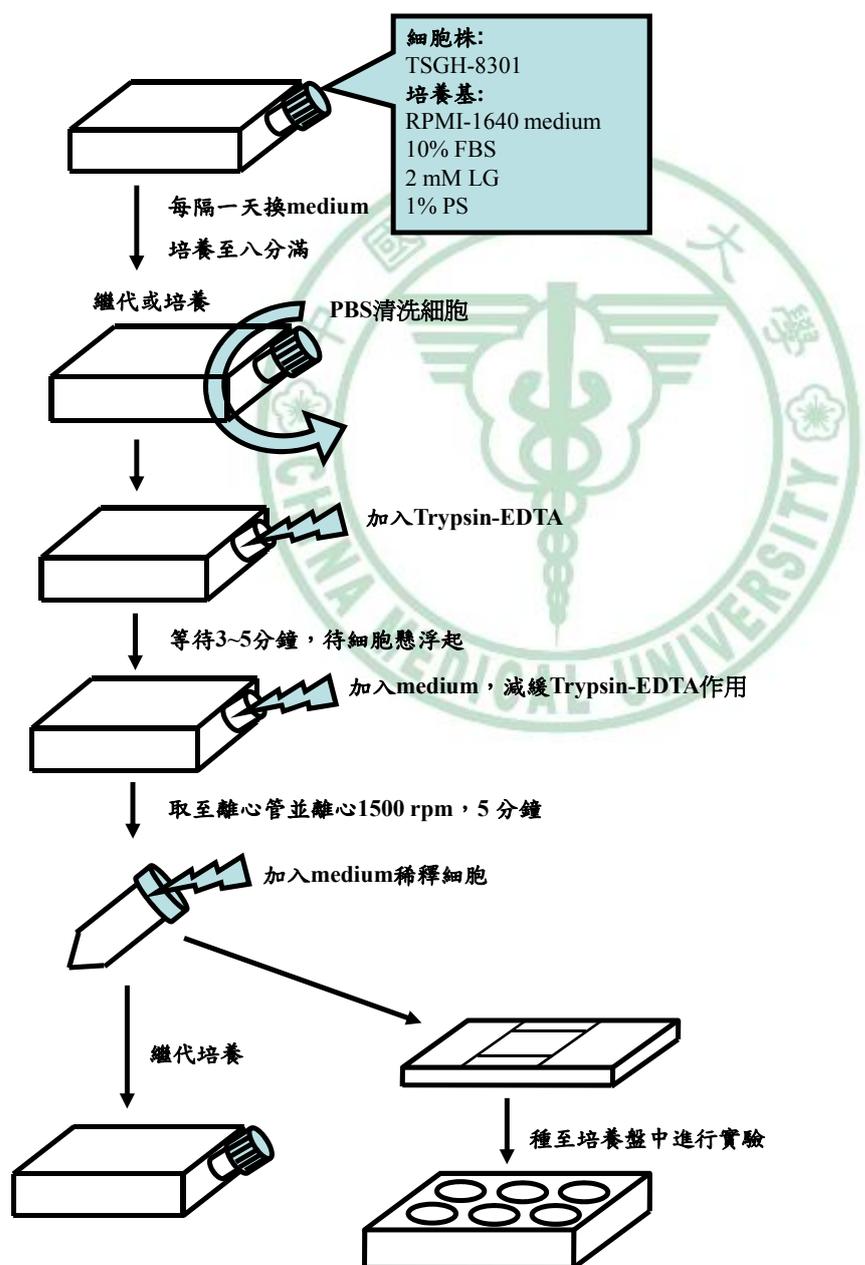


圖 2-2-1 細胞培養之簡易示意圖

### 三、細胞的冷凍保存

將 TSGH-8301 細胞大量培養後，在細胞處於生長旺盛與存活率高的情況下進行冷凍細胞。首先要配置抗凍劑。使用 DMSO 與 FBS 混和配置成含有 7% DMSO 的 FBS。將細胞用 Trypsin 收集後，將抗凍液加入細胞中並分裝於冷凍小管中。分別依序按照以下步驟進行降溫，4 °C 存放 30 分鐘，-20 °C 存放 60 分鐘，最後於-80 °C 存放至隔夜後在移至液態氮桶中保存。

### 四、冷凍細胞的活化

解凍細胞的過程需要以快速為原則，以避免冰晶的產生與濃度過高的 DMSO 對細胞產生傷害。因此將細胞從液態氮桶中取出後，馬上以 37 °C 水浴槽快速回溫。等待溶解後加入培養基並均勻混和以便稀釋 DMSO 濃度，並使用離心機轉速 1500 rpm，5 分鐘，將抗凍劑去除。移去上清液後加入新鮮培養基。種細胞於培養瓶中並於隔日更換新的培養基。

## 五、細胞存活率分析<sup>45</sup>

### 實驗原理

MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) 是一種黃色水溶性固體，它會與粒線體中的去氫酵素 (dehydrogenase) 作用並代謝之。去氫酵素會將 tetrazolium ring 切斷並還原成紫色沉澱物 formazan 累積在細胞中，之後再利用 DMSO 溶解並利用 Elisa reader 以 570 nm 測吸光值 (O.D.)。因活細胞才具有去氫酵素活性，所以測得的吸光值大小會與活細胞數成正比，藉此測量細胞存活率。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $1 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 24 孔盤培養盤中，待貼附後加入不同濃度的 Ellagic acid (5, 10, 15, 25, 50, 60, 75  $\mu$ M)，分別等待 24 與 48 小時後去除上清液，並且加入 500  $\mu$ L 的 MTT (0.5 mg/mL)，待反應 3.5 小時後，去除上清液並加入 500  $\mu$ L 的 DMSO 使 formazan 溶解出後利用 Elisa reader 以 570 nm 測吸光值以得知存活率。

## 六、細胞週期 (Cell cycle) 分析<sup>46</sup>

### 實驗原理

Propidium iodide (PI) 是一種螢光染劑，可專一的與核酸鍵結。實驗利用酒精固定細胞，酒精除了固定細胞外另一個功能為增加細胞膜的通透性，使 PI 可以進入細胞及核膜中，形成 DNA 特異性染色。且酒精固定後的細胞相當穩定，樣品可保存於低溫中而不影響染色結果及實驗數據。由於 PI 可以與核酸產生鍵結，因此可以利用流式細胞儀 (Flow cytometry ; FACS) 偵測 PI 之螢光，就可以知道細胞內 DNA 的狀態而進行細胞週期分析。

### 實驗方法

將細胞依照  $2 \times 10^5$  接種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附後加入不同濃度的 Ellagic acid。分別在培養 48 小時之後，將上清液收至離心管中，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 1500 rpm，5 分鐘，去除上清液後加入 PBS 清洗，離心 1500 rpm，5 分鐘，去除上清液再一邊震盪一邊緩慢的滴入 3 mL 的 70% 酒精。酒精固定完後置於  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  至少 1 個小時。接著離心去除上清液，加入 PBS 清洗細胞，再離心並去除上清液。將細胞打散後加入 PI 染劑(配

方如)。避光反應 30 分鐘後，以流式細胞儀進行分析，再利用 Modfit  
LT 分析結果。

表 2-2-1 Cell cycle 之 PI 染劑

組成	體積
<b>0.2 mg/mL CAT PI stock</b>	<b>1 mL</b>
<b>5% Triton X-100</b>	<b>10 mL</b>
<b>RNase (10 mg/mL)</b>	<b>2 mL</b>
<b>1X PBS</b>	<b>37 mL</b>



## 七、彗星試驗 (Comet assay)<sup>47</sup>

### 實驗原理

彗星試驗又稱單細胞電泳分析 (Single cell gel electrophoresis assay)主要是用來分析 DNA 損傷 (DNA damage)的程度。是一個簡單、快速、準確性高的分析 DNA 損傷之技術。當 DNA 受傷而產生斷裂時，利用電泳的方式將斷裂成片段的 DNA 拖出膜外，再利用與 DNA 具有專一性結合的螢光染劑染色，接著在螢光顯微鏡下觀察便可看到斷裂的 DNA 形成如彗星狀的拖尾。藉由拖尾的長短來判斷 DNA 的損害程度。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後加入不同濃度的 Ellagic acid (25, 50, 75, 100  $\mu$ M)。等待 48 小時後，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 5 分鐘，去除上清液後加入 PBS。在磨砂載玻片上以鉛筆標上號碼，置 70  $\mu$ L 的下層膠於載玻片上，將蓋玻片蓋上並防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片。取 10  $\mu$ L 細胞液混合 60  $\mu$ L 上層膠加在下層膠上，將蓋玻片以 45° 角蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片。將做好的載玻

片置於 Lysis buffer 中。反應後，將玻片移至 alkaline buffer 中。接著移至以 alkaline buffer 作為電泳液的電泳槽中進行電泳；以 25 V、300 mA 的條件電泳。電泳完後將膠移至 0.4 M Tris buffer。接著將膠置於 methanol 中脫水。最後於膠上滴 100  $\mu$ L 的 DAPI 染色，再利用螢光顯微鏡觀察拍照。



## 八、細胞核質濃縮現象<sup>48</sup>

### 實驗原理

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)是一種核酸螢光染劑可以與雙股 DNA 上的小溝 (minor groove)結合，當細胞凋亡時會出現染色質凝集 (chromosomes condensation)與 DNA 斷裂 (DNA fragmentation)的現象。當凋亡越嚴重時，DNA 的損害也就越嚴重因此 DAPI 染上就會變多，在螢光顯微鏡下觀察就會發現螢光量變多。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $5 \times 10^4$  cell/mL 的濃度接種於 6 孔盤培養盤中，待貼附後加入不同濃度的 Ellagic acid (25, 50, 75, 100  $\mu$ M)，分別等待 24 與 36 小時後以 PBS 清洗。利用 4% Formaldehyde 在 4 °C 下固定。再以 PBS 清洗並加入 Triton X-100 1 mL 反應。以 PBS 清洗後，加入 DAPI 染劑室溫避光反應後，利用 PBS 洗去多餘的 DAPI。再利用螢光顯微鏡以 UV 光激發 DAPI 螢光並觀察照相之。

## 九、DNA 膠體電泳(DNA gel electrophoresis) <sup>49</sup>

### 實驗原理

當細胞凋亡的時候會有 DNA 斷裂現象發生，其細胞核內 DNA 會裂解成 180~200 bp，可藉由提取 DNA 後。再經由電泳跑膠，看出是否有 DNA 斷裂現象，要是有斷裂則跑膠照相後會出現階梯狀 (ladder)，可藉由 DNA marker 來得知其斷裂鹼基對 (base pair)。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後利用不同濃度的 Ellagic acid (0, 25, 50, 75  $\mu$ M ) 處理細胞。經過 48 小時之後以 Tissue and Cell Genomic DNA Purification Kit (Gene Mark) 抽取 DNA。

首先將上清液收至離心管中，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 1500 rpm，5 分鐘，去除上清液後加入 PBS 清洗，離心 1500 rpm，5 分鐘，到掉上清液，加入 200  $\mu$ M PBS 混合細胞後移至 eppendorf，以 13000 rpm 離心 10 秒，小心移去上清液加入 200  $\mu$ L PBS, 混和均勻。加入 48  $\mu$ L RNase A (10 mg/ mL)，靜置室溫 5 分鐘。加入 20  $\mu$ L Proteinase K 和 200  $\mu$ L Binding buffer，混

和均勻後放入 70°C 乾浴鍋，等待 10 分鐘加入 200  $\mu$ L Ethanol 混和均勻，移到 spin column，高速離心 13000 rpm，1 分鐘。丟棄下面液體，加入 300  $\mu$ L Binding buffer，以最高速離心 1 分鐘。丟棄下面液體，加入 600  $\mu$ L Washing solution，再以最高速離心 1 分鐘。丟棄下面液體，加入 600  $\mu$ L Washing solution，再以最高速離心 1 分鐘。最高速離心到乾，3 到 5 分鐘並更換新已去上蓋的 ependorf。丟棄下面液體。使用新 ependorf 並放入 55°C 烘箱 3 到 5 分鐘，以揮發殘留 Ethanol。丟棄下面收集管，換上新的 ependorf，將 Elution Solution 取到 ependorf 預熱 70°C，並以每個 sample 約 50  $\mu$ L 到 60  $\mu$ L 的量加入。放置室溫 1 到 2 分鐘，離心 1 分鐘，收集下面液體其內含 DNA。儲存於 -20°C，待 DNA 跑膠。

將 DNA 與 6X DNA loading dye 以 5:1 比例混勻，loading 至 2% agarose (1 g agarose、50 mL 0.5X TBE buffer、10  $\mu$ L Ethidium bromide) 中，以 100 V 進行電泳約 40 分鐘。將膠拿至 UV 下照射，拍照。

## 十、活性氧物質<sup>50</sup>

### 實驗原理

利用 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) 在細胞內一連串的反應並形成螢光來測量 ROS 的產生。H<sub>2</sub>DCF-DA 可滲透至細胞內，在細胞內被乙醯酯酶 (esterases) 去乙醯化 (deacetylated) 而形成 DCFH，DCFH 無法通過細胞膜因而被留在細胞中。DCFH 接著會被 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化而形成具有螢光特性的 DCF，並聚集在粒線體中，利用流式細胞儀分析螢光量便可測得細胞內 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的濃度。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後分別以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理 12、24、36、48 小時後。加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 1500 rpm，5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心 1500 rpm，5 分鐘。去除上清液後加入 H<sub>2</sub>DCF-DA，混合均勻後於 37 °C 水浴槽中反應半小時。最後再以流式細胞儀分析，收集至少 10000 顆細胞並以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析。

## 十一、粒線體膜電位 (Mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$ ) 變化<sup>51</sup>

### 實驗原理

細胞膜電位探針。DiOC<sub>6</sub> (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodine) 是一種可穿透細胞膜，專一性結合並累積在細胞粒線體內，DiOC<sub>6</sub> 在細胞膜內外的分布可以反應出細胞膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可以顯示細胞膜電位改變的情形。可發出綠色螢光 (green-fluorescent) 之陽離子 (cationic dye) 親脂性染劑；不需要固定細胞會其他處理的情況下可以即時、快速的偵測活細胞內粒線體膜電位。粒線體膜功能不良 (mitochondrial dysfunction) 的時候通常伴隨著細胞凋亡的發生，因此細胞粒線體膜電位的改變也就當作早期凋亡偵測上的指標。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後分別以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理 12、24、36、48 小時後。加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 1500 rpm，5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心 1500 rpm，5 分鐘。去除上清液後加入 DiOC<sub>6</sub>，混合均勻後於 37 °C 水浴槽中反應

半小時。最後再以流式細胞儀分析，收集至少 10000 顆細胞並以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析。



## 十二、鈣離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 釋出之檢測<sup>52</sup>

### 實驗原理

胞內鈣離子作為細胞信號傳導的郵差，是細胞激活過程中重要的功能。利用螢光染劑 Fluo-3/AM 通過細胞膜後，在細胞內被內生性的 (endogenous esterases) 水解 (hydrolyze) 成 Fluo-3。Fluo-3 才能滯留在細胞內並跟鈣離子具有專一性的結合力。利用流式細胞儀分析螢光量便可測得細胞內鈣離子的濃度。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後分別以 50  $\mu\text{M}$  的 Ellagic acid 處理 12、24、36、48 小時後。加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 1500 rpm，5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心 1500 rpm，5 分鐘。去除上清液後加入 Fluo-3/AM，混合均勻後於 37 °C 水浴槽中反應半小時。上機前離心 1500 rpm，5 分鐘，去掉上清液以便去掉多餘的染劑。接著加入 500  $\mu\text{L}$  的 PBS 再用流式細胞儀分析。收集至少 10000 顆細胞並以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析。

### 十三、西方點墨法 (Western blotting)<sup>53</sup>

#### 實驗原理

藉由抗體抗原反應來觀察蛋白質的變化。藉由特定抗體對特定胺基酸序列具有專一性特性，當抗體與蛋白質抗原結合後，再以帶有 Horseradish peroxidase (HRP) 的二級抗體與一級抗體做結合。再利用 Enhanced chemiluminescent (ECL) 呈色後，藉由感光底片吸收冷光而產生曝光。經過顯影與定影步驟後，根據曝光程度區域大小就可以知道蛋白質表現量的變化。

#### 實驗方法

##### (1) 蛋白質萃取 (protein extraction)

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^6$  cell/mL 的濃度接種於  $10 \text{ cm}^2$  培養盤中，待貼附後分別以  $50 \text{ }\mu\text{M}$  的 Ellagic acid 處理 12、24、36、48 小時後。加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 3000 rpm，5 分鐘。離心完後去除上清液，加入 1 mL 的 PBS 將細胞移至 1.5 mL 微量離心管中。接著離心 13000 rpm，1 分鐘。離心完後去除上清液，加入 400  $\mu\text{L}$  的 Lysis buffer (PRO-PREP for Cell/Tissue)。依照細胞量的多寡決定其加入的量，一般每  $2.5 \times 10^6$  cell/mL 的細胞數

增加 200  $\mu\text{L}$  的 Lysis buffer。將細胞混合後置於 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中 24 小時後離心 13000 rpm，10 分鐘。取其上清液至另一微量離心管後進行蛋白質定量。

## (2) 蛋白質的定量分析

以 Bradford 定量法定量，使用胎牛血清白蛋白(Bovine serum albumun ; BSA)做為標準品。配置不同濃度的標準品後，利用 Bio-rad 與標準品混和且以相同的混合方式與樣品混合。混合均勻後，取至 96 孔盤培養盤利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader)在吸光值 O.D.595 nm 下測量其吸光值並以標準品吸光值做出標準曲線 (standard curve)。求出標準曲線的線性回歸方程式與  $R^2$  值。將樣品吸光值帶回線性曲線方程式並求出蛋白質濃度。

## (3) SDS-PAGE 分析

首先配置 SDS gel，其組成如表 2-2-2 與表 2-2-3，將蛋白質利用 1%SDS 稀釋置所需濃度並取出 20  $\mu\text{L}$  與 5  $\mu\text{L}$  的 protein loading dye 混合均勻，以  $90^{\circ}\text{C}$  加熱 10 分鐘。於電泳槽中加入 electrophoresis running buffer (配方如表 2-2-4)後，於樣品槽中加入須分析之蛋白質與分子量指示劑 (marker)用以對照蛋白質分子量。以電壓 80 volt 電泳，待樣品通過 stacking gel 之後，電壓調至 110 volt 繼續電泳直到染劑到達底端並停止電泳。

#### (4)轉漬步驟

先將蛋白質轉印膜 (PVDF membrane)與濾紙浸泡於 transfer buffer (配方如)中，取轉漬夾，依照海綿、濾紙、SDS 膠片、蛋白質轉印膜、濾紙、海綿依序疊於轉漬夾中。膠片與蛋白質轉印膜中不可以有氣泡。將轉漬夾移至有 transfer buffer 的轉漬槽中，蛋白質轉印膜面向正極，SDS 膠片面向負極 (圖 2-2-2)。以 80 volt 進行轉漬 2 小時。

#### (5)影像呈現

轉印完後以麗春紅 (Poncean S)染劑染色，可以看出蛋白質轉漬至膜上的情形。用 PBST (0.1% Tween 20 in PBS)洗蛋白質轉印膜至紅色褪去。加入 blocking buffer (5% Fat free milk in PBST)搖晃 2 小時，可使膜上面未轉漬上蛋白的部分填滿酪蛋白以免抗體非專一性結合。接著利用 PBST 清洗轉印膜 5 分鐘 3 次後加入 1 級抗體，4°C 搖晃至隔天。回收一級抗體並以 PBST 清洗轉印膜 5 分鐘 3 次後加入 2 級抗體，於室溫下搖晃 1 小時，取出轉印膜。以 PBST 清洗轉印膜 5 分鐘 3 次。最後將轉印膜與 ECL kit 的試劑混合液反應，並將轉印膜夾於透明投影片中以感光底片顯影之。

表 2-2-2 SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel)之配置與組成

組成	10% separating gel	12% separating gel
ddH <sub>2</sub> O	9.6 mL	8.6 mL
40% Acrylamide/Bis (29:1)	5 mL	6 mL
0.5 M Tris (pH=8.8)	5 mL	5 mL
10% SDS	0.2 mL	0.2 mL
10% APS	0.2 mL	0.2 mL
TEMED	30 $\mu$ L	12 $\mu$ L

表 2-2-3 SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel)之配置與組成

組成	5% stacking gel
ddH <sub>2</sub> O	4.06 mL
40% Acrylamide/Bis (29:1)	1.02 mL
0.5 M Tris (pH=6.8)	1.66 mL
10% SDS	66 mL
10% APS	33.4 mL
TEMED	30 $\mu$ L

表 2-2-4 電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer)

組成	體積
10X TG-SDS buffer (25 mM Tris, 192mM glycine,0.1% SDS)	200 mL
ddH <sub>2</sub> O	1800 mL

表 2-2-5 轉漬緩衝液 (Transfer buffer)

組成	體積
Tris	4.5 g
Glycine	21.6 g
Methanol	300 mL
ddH <sub>2</sub> O	1200 mL

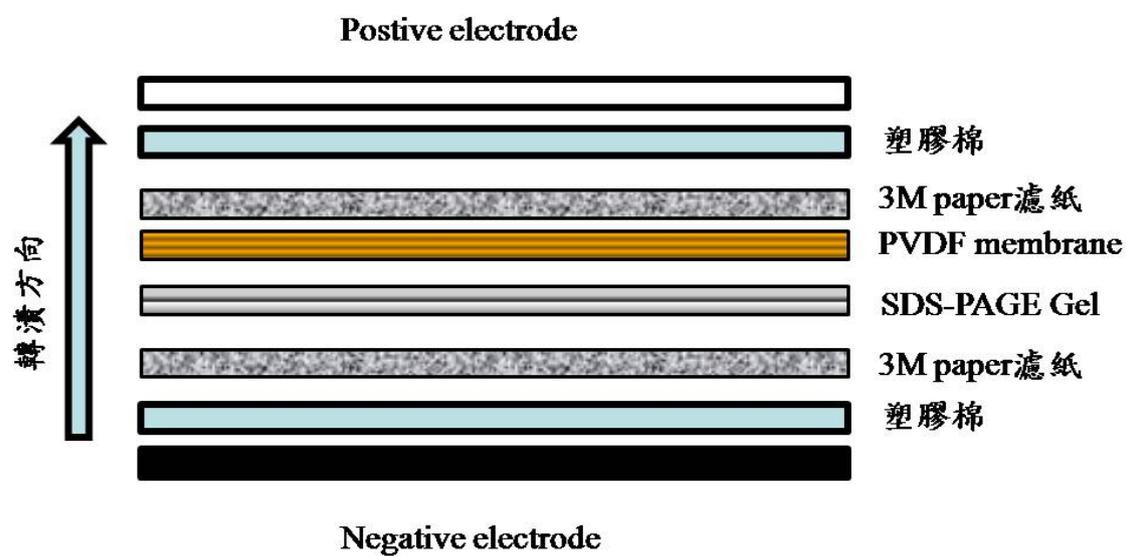


圖 2-2-2 蛋白質轉漬順序

#### 十四、免疫螢光染色<sup>54</sup>

##### 實驗原理

利用抗體與抗原反應，將一級抗體直接送入細胞內與需要偵測之蛋白質結合，再藉由二級抗體連接 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光的方式，且使用不同的螢光染劑標記細胞內胞器，如粒線體、細胞核等。最後利用共軛焦顯微鏡 (Confocal microscope) 觀察螢光呈現的情形得知蛋白質的表現量或轉移等現象。

##### 實驗方法

將載玻片固定於 10 cm<sup>2</sup> 培養盤中接著將 TSGH-8401 細胞以 2×10<sup>6</sup> cell/mL 的濃度接種於 10 cm<sup>2</sup> 培養盤中，待貼附後分別以 50 μM 的 Ellagic acid 處理 48 小時。取出載玻片並以 PBS 洗過，利用甲醇 (Methanol) 將細胞固定，作用 20 分鐘。以 PBS 清洗 3 次再利用 0.1% 的 Triton-X 100 作用 30 分鐘。以 PBS 清洗 3 次加入一級抗體染劑 (50~60 μl) 放至隔天。PBS 清洗 3 次五分鐘，再染二級抗體 PBS。清洗 3 次五分鐘，再依其需要染細胞核、粒線體等。最後 PBS 清洗 3 次五分鐘，再以封片膠將其封片並進行共軛焦顯微鏡的觀察。

## 十五、Annexin V affinity assay<sup>55</sup>

### 實驗原理

細胞在程序性死亡 (apoptosis) 時，phospholipid phosphatidylserine (PS) 會從細胞膜內層向外轉移至外層。此時利用 Annexin V 可與之結合。Annexin V 為一種具有鈣離子依存性的磷脂質，它會與 PS 具有高度的專一性。因此使 Annexin V 帶有螢光物質，便可偵測 PS 外翻的情形。再利用 Propidium Iodide (PI) 去區別細胞凋亡的時期。

### 實驗方法

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後分別以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理 12、24、36、48 小時後。加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心 5 分鐘。去除上清液後加入 5  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 與 5  $\mu$ L 的 PI，均勻混合後置於室溫 (25°C) 避光反應，再加入 400  $\mu$ L 的 1X binding buffer 終止反應。再用流式細胞儀分析。收集至少 10000 顆細胞並以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析。

## 十六、Caspase-3 活性分析<sup>55</sup>

### 實驗原理

利用 Caspase-3 substrate (PhiPhiLux-G<sub>1</sub>D<sub>2</sub>)來偵測 Caspase-3 的活性。PhiPhiLux-G<sub>1</sub>D<sub>2</sub> 具有螢光物質，當 Caspase-3 具有活性的時候會將 Caspase-3 substrate 特定的序列裂解，使得含有螢光物質的部分產生。再經由流式細胞儀偵測，根據螢光的產量就可知道 Caspase-3 的活性。

### 實驗步驟

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後分別以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理 12、24 小時後，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 1500 rpm，5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心 1500 rpm，5 分鐘。去除上清液後加入 Caspase-3 substrate (PhiPhiLux-G<sub>1</sub>D<sub>2</sub>)，混合均勻後於 37 °C 水浴槽中反應。反應後，加入 1 mL 的 PBS 再以 1500 rpm，5 分鐘離心，並去除上清液後，接著加入的 Flow Cytometer Buffer 再用流式細胞儀分析。收集至少 10000 顆細胞並以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析。

## 十七、Quantitative PCR Analysis<sup>56</sup>

### 實驗原理

其原理是操作 PCR 的同時，再加入一段可與 DNA 樣品互補的探針，而這段探針具有螢光標記。當探針與 DNA 樣品互補時，才會發散出螢光。因此 PCR 的循環次數愈多，DNA 濃度愈高，偵測到的螢光強度就愈高。此時儀器內部會設定預期達到的螢光強度，達到該螢光強度所需要的複製次數，又稱為 threshold cycle。也就是說 DNA 樣品濃度愈多，可以較少的 threshold cycle 達到預測的螢光強度；DNA 樣品濃度愈少，就需較多的 threshold cycle 才達到預測的螢光強度。因此便能畫出各已知核酸濃度與 threshold cycle 間反比的檢量線。未知樣品便能從檢量線中求得。

### 實驗步驟

將 TSGH-8401 細胞以  $2 \times 10^5$  cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後分別以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理 24 與 48 小時後，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。離心並利用 PBS 清洗過一次後，萃取 total RNA。接著將 RNA 反轉錄成 cDNA。接著利用有螢光標記的探針進行 PCR。根據螢光量的產生取得數據。

Primer Name	Primer sequence
homo caspase-3-F	CAGTGGAGGCCGACTTCTTG
homo caspase-3-R	TGGCACAAAGCGACTGGAT
homo caspase-9-F	TGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTT
homo caspase-9-R	GTGAGCCCACTGCTCAAAGAT

表 2-2-6 Quantitative PCR 所使用之 primer



## 十八、統計分析

實驗結果以平均值標準差 (mean±SD)表示，使用 Student's *t*-test 來決定實驗組與對照組之差異。當 *p* 值小於 0.05 時則認為具有統計上的意義，以\*表示之。



### 第三章 研究結果

#### 第一節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞生長影響

人類膀胱癌細胞 TSGH-8301 細胞經過不同濃度(5、10、25、50、75  $\mu\text{M}$ )的 Ellagic acid 處理後，細胞的數量減少與細胞產生皺縮的現象(圖 3-1-1 與圖 3-1-2)。再由 MTT assay 測試存活率，在量化表發現 Ellagic acid 在 24、48 小時對於 TSGH-8301 細胞的毒殺效果隨著劑量的上升而增加並隨著時間的增加存活率也隨之下降(圖 3-1-3)，結果顯示 Ellagic acid 對於 TSGH-8301 細胞的毒殺效果具有計量依賴性 (Dose dependent)與時間依賴性 (Time dependent)的現象。

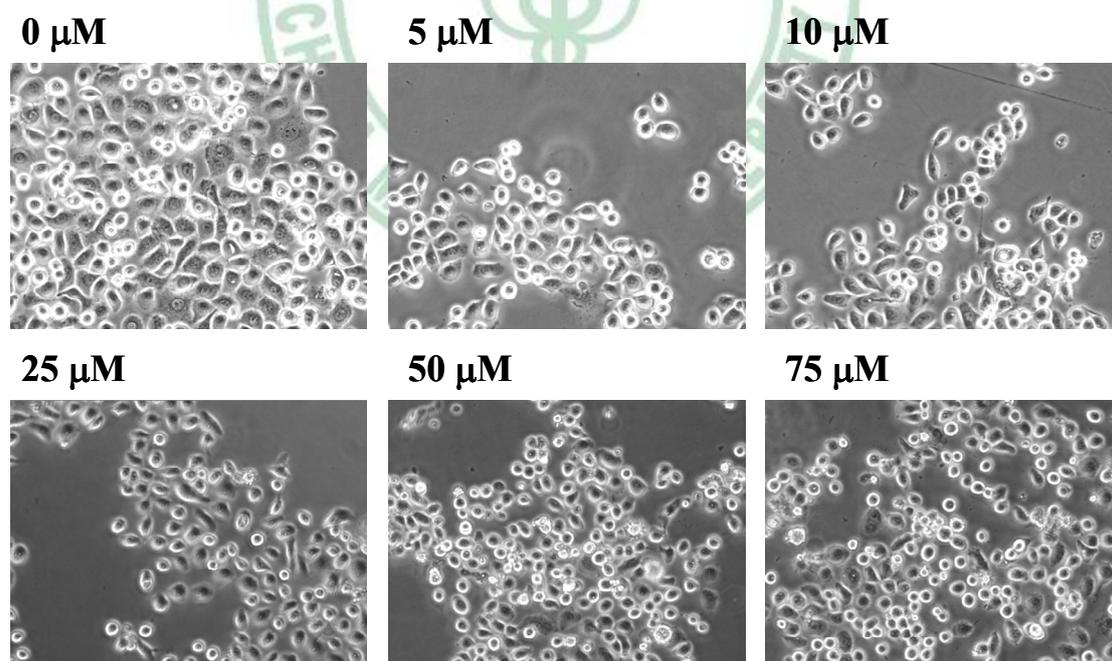


圖 3-1-1 TSHG-8301 細胞經不同濃度 Ellagic acid 處理 24 小時後細胞型態之變化。

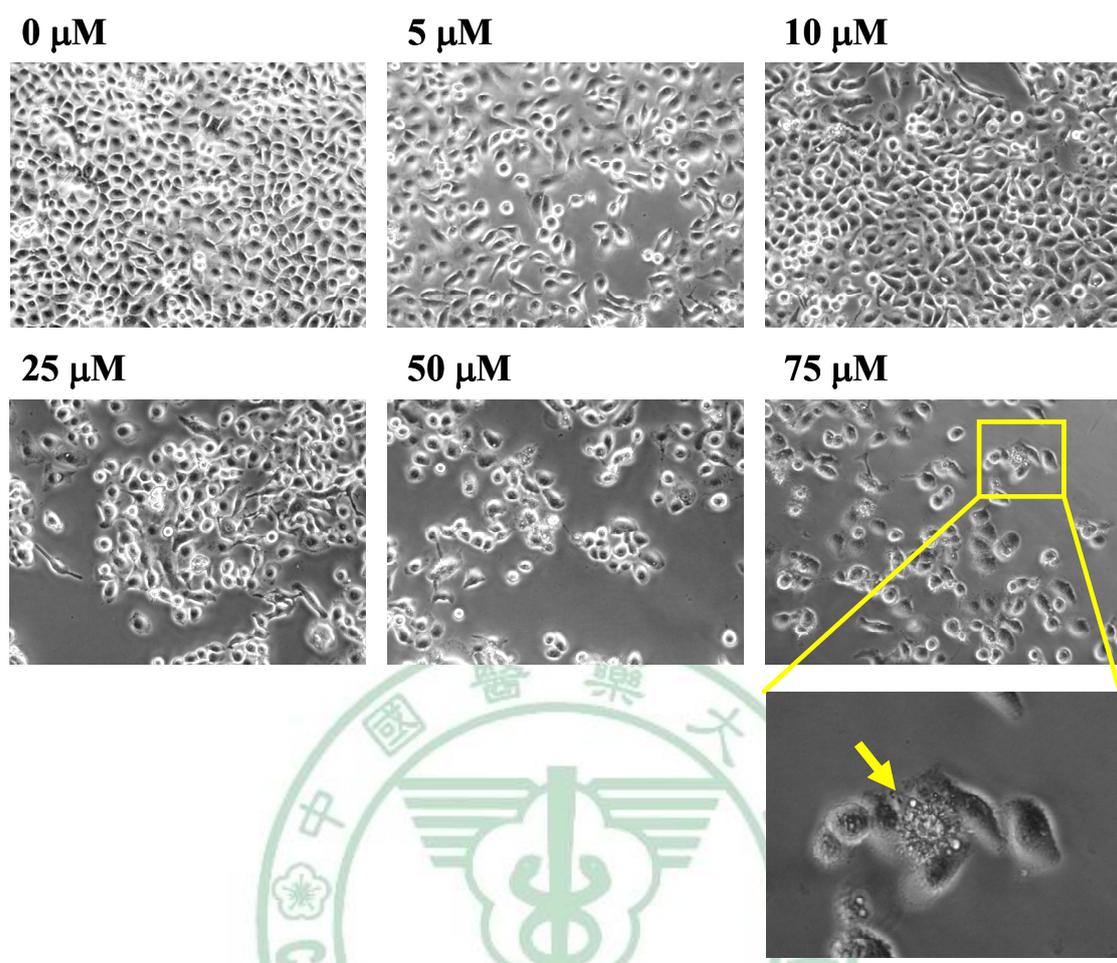


圖 3-1-2 TSHG-8301 細胞經不同濃度 Ellagic acid 處理 48 小時後細胞型態之變化。

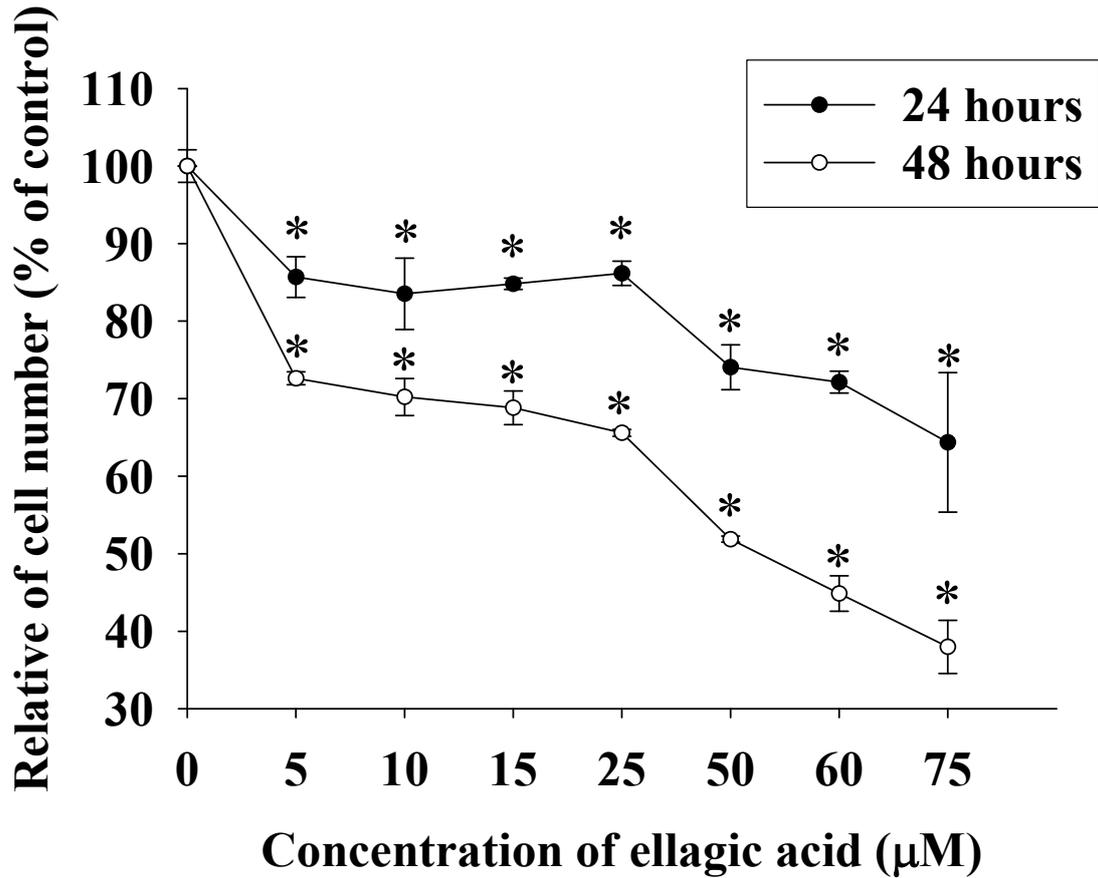


圖 3-1-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞之細胞存活率的影響。TSGH-8301 細胞以 5、10、15、25、50、60、75 μM 之 EA 處理 24、48 小時後，以 MTT assay 方法檢測細胞存活率。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

## 第二節 Ellagic acid 對老鼠正常細胞株 A10 毒性的影響

為了更進一步確認 Ellagic acid 對正常細胞是否有毒性，因此利用老鼠正常動脈平滑肌細胞株 A10 以 MTT 的方式測試處理藥物後的存活率。實驗結果顯示 A10 細胞株在處理不同濃度藥物並培養 48 小時後，A10 之存活率呈現非計量依賴性下降，且相較於 TSGH-8301 的存活率還要來的高。結果顯示 Ellagic acid 對於正常細胞所造成毒性相較於 TSGH-8301 還要來的低。



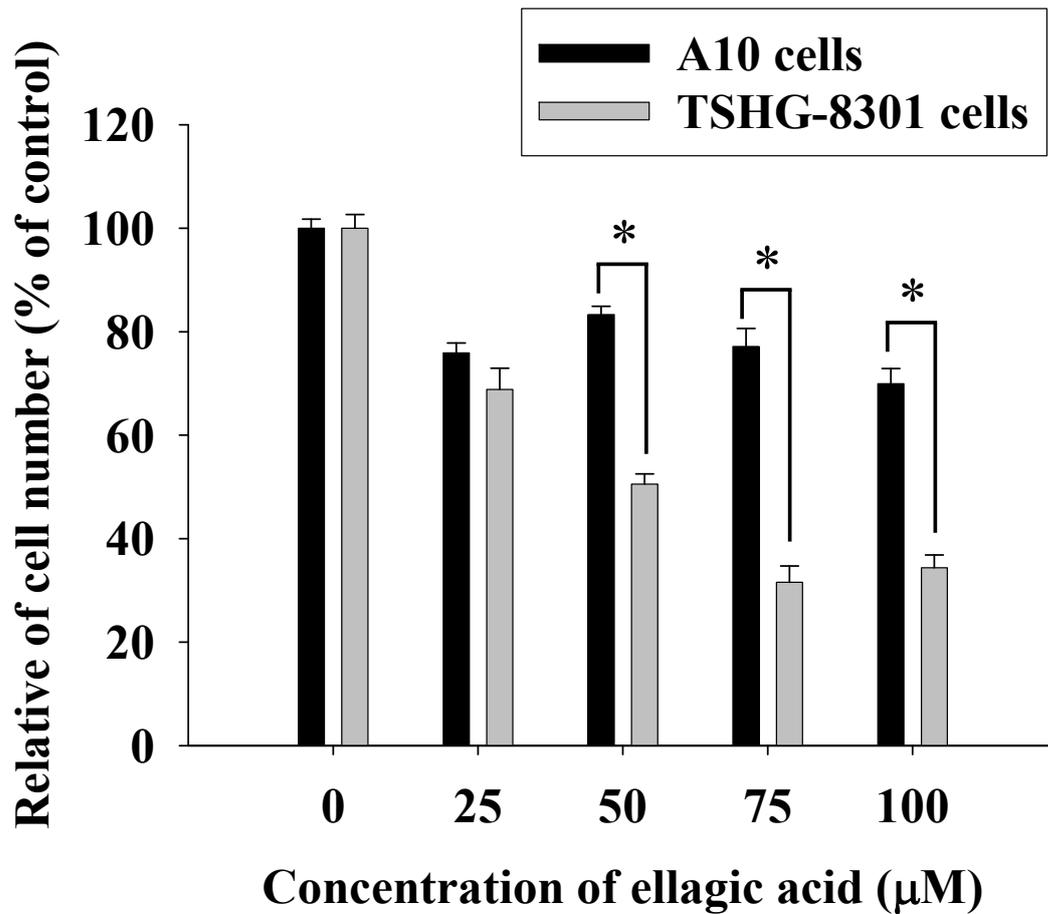
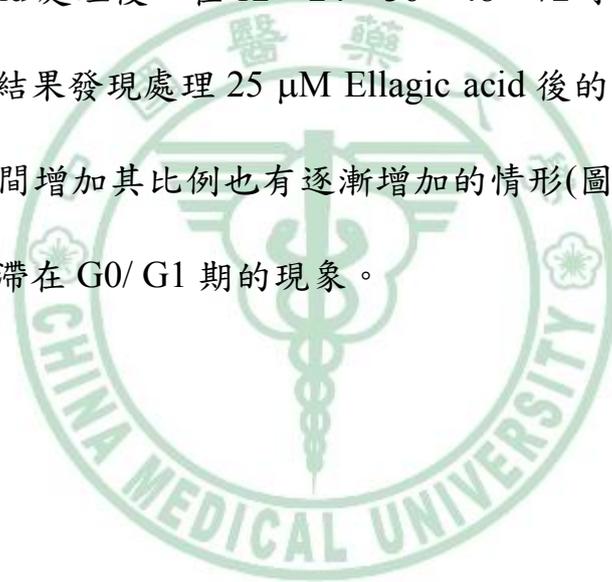


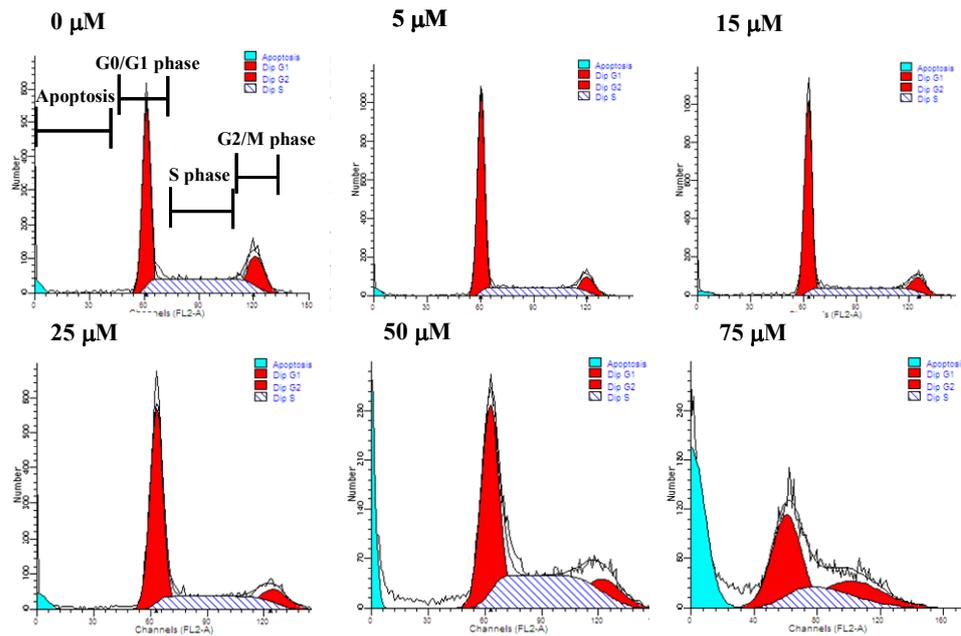
圖 3-2-1 EA 對正常細胞 A10 與 TSGH-8301 存活率的影響。正常細胞 A10 與 TSGH-8301 細胞以 25、50、75、100 μM 之 EA 處理 48 小時後，以 MTT assay 方法檢測細胞存活率。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

### 第三節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞週期的影響

利用流式細胞儀檢測細胞內 DNA 的含量用以判別細胞週期的分布，當 TSGH-8301 細胞與不同濃度之 Ellagic acid 共同培養 48 小時後，由分析圖可發現 G0/G1 的比例隨著濃度的上升而增加(圖 3-3-1)，由圖 3-3-2 可發現 G0/G1 的比例從不處理藥物組別 (49.5%) 至處理 25  $\mu$ M Ellagic acid (62.2%)增加了 12.7%。TSGH-8301 細胞 25  $\mu$ M Ellagic acid 處理後，在 12、24、36、48、72 小時後觀察其細胞週期的變化，結果發現處理 25  $\mu$ M Ellagic acid 後的細胞之 G0/G1 期隨著處理的時間增加其比例也有逐漸增加的情形(圖 3-3-2)，結果顯示細胞出現停滯在 G0/ G1 期的現象。



(A)



(B)

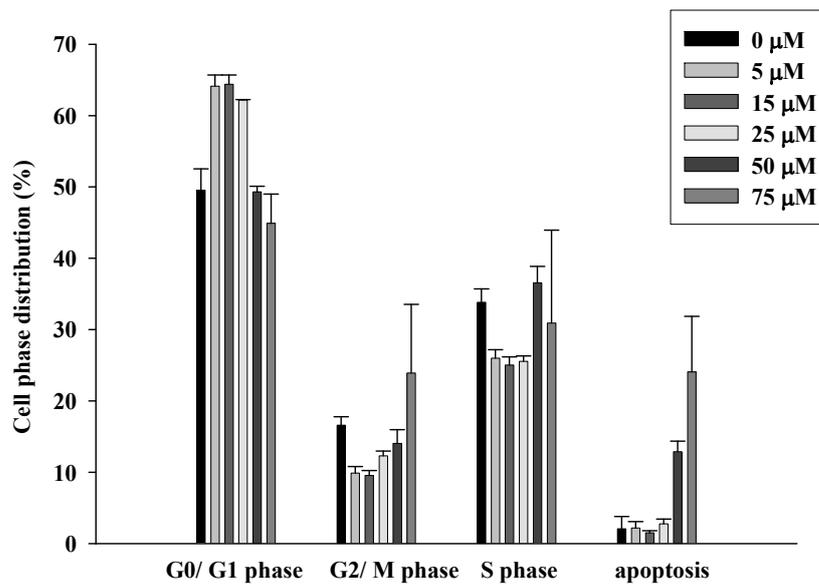
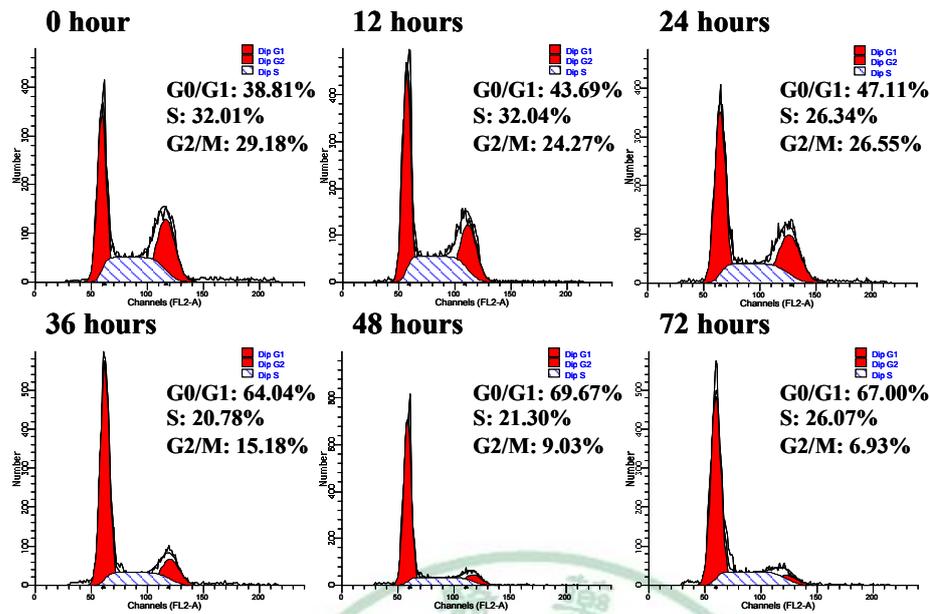


圖 3-3-1 不同濃度 EA 處理 TSGH-8301 細胞 48 小時後，細胞周期之變化。TSGH-8301 細胞以 5、15、25、50、75  $\mu\text{M}$  之 EA 處理 48 小時後，以流式細胞儀檢測細胞周期並利用 Modfit LT 軟體分析結果。

(A) 細胞周期分析圖。(B) Modfit LT 軟體分析後得到之量化圖。

(A)



(B)

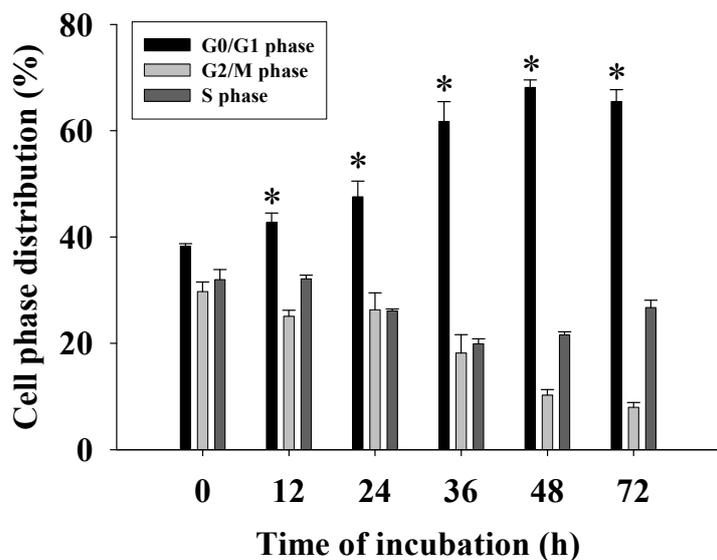


圖 3-3-2 TSGH-8301 細胞以 25  $\mu$ M 的 EA 處理後，細胞週期之變化。

細胞以 25  $\mu$ M 的 EA 處理後，經過 12、24、36、48、72 小時後，利用流式細胞儀觀察細胞週期變化。(A) 細胞週期分析圖。(B) Modfit LT 軟體分析後得到之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

#### 第四節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞 DNA 損傷的影響

##### (一) DAPI 染色法

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)會與 DNA 雙股螺旋小溝的 AT 區結合。當結合時在螢光顯微鏡下觀察到的螢光強度也越強，表示 DNA 斷裂的情形越嚴重。由圖 3-4-1 與圖 3-4-2 顯示 TSGH-8301 細胞經過 50、75、100  $\mu\text{M}$  的 Ellagic acid 處理 24、36 小時後，可發現隨著濃度增加其螢光強度明顯增強，表示 DNA 斷裂與核質濃縮的現象越明顯。



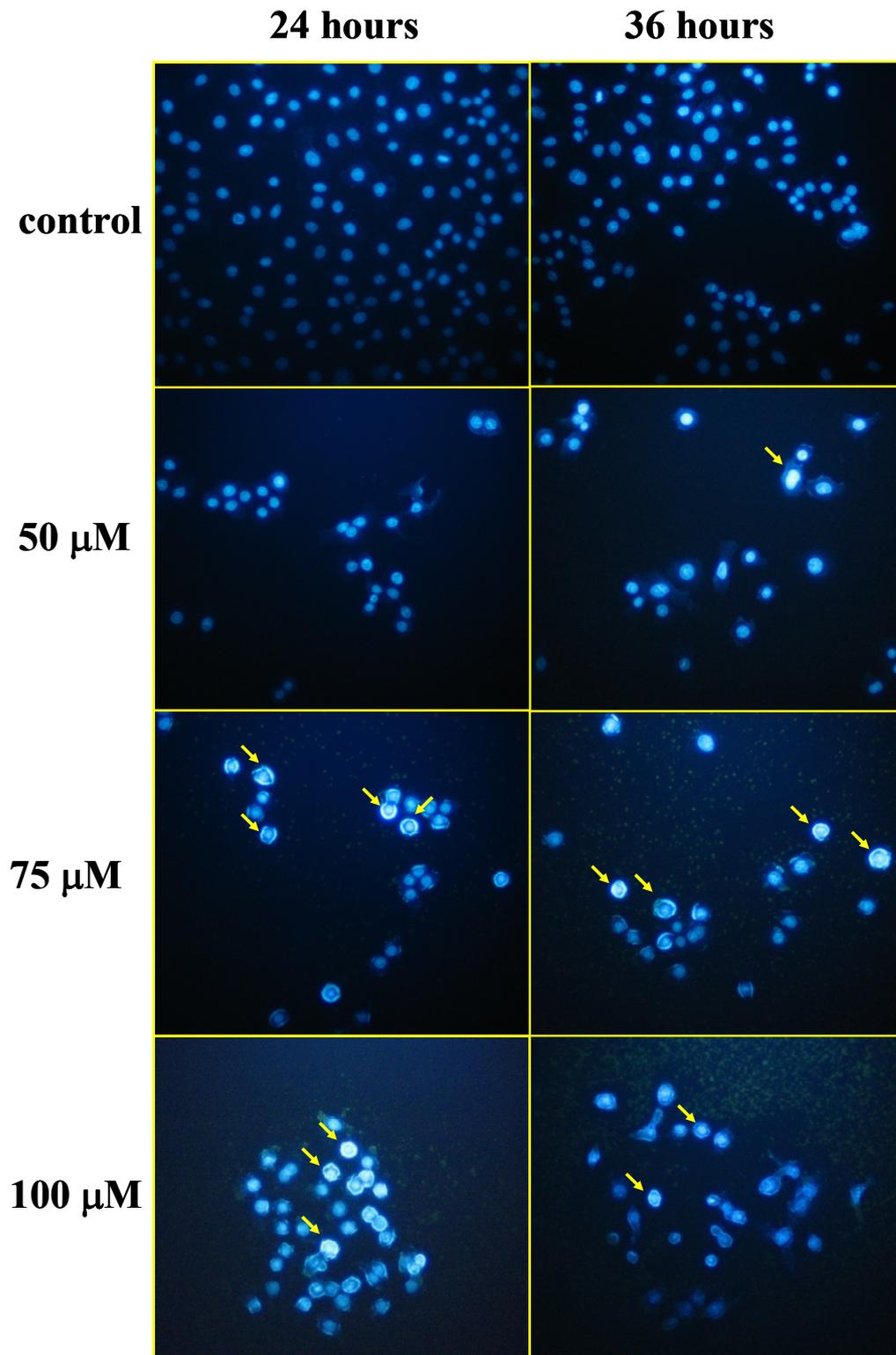


圖 3-4-1 EA 對於 TSGH-8301 細胞之染色體凝集的影響。TSGH-8301 細胞以 50、75、100  $\mu\text{M}$  之 EA 處理 24 與 36 小時後。利用倒立式螢光顯微鏡所觀察其染色質凝集之現象與拍攝。

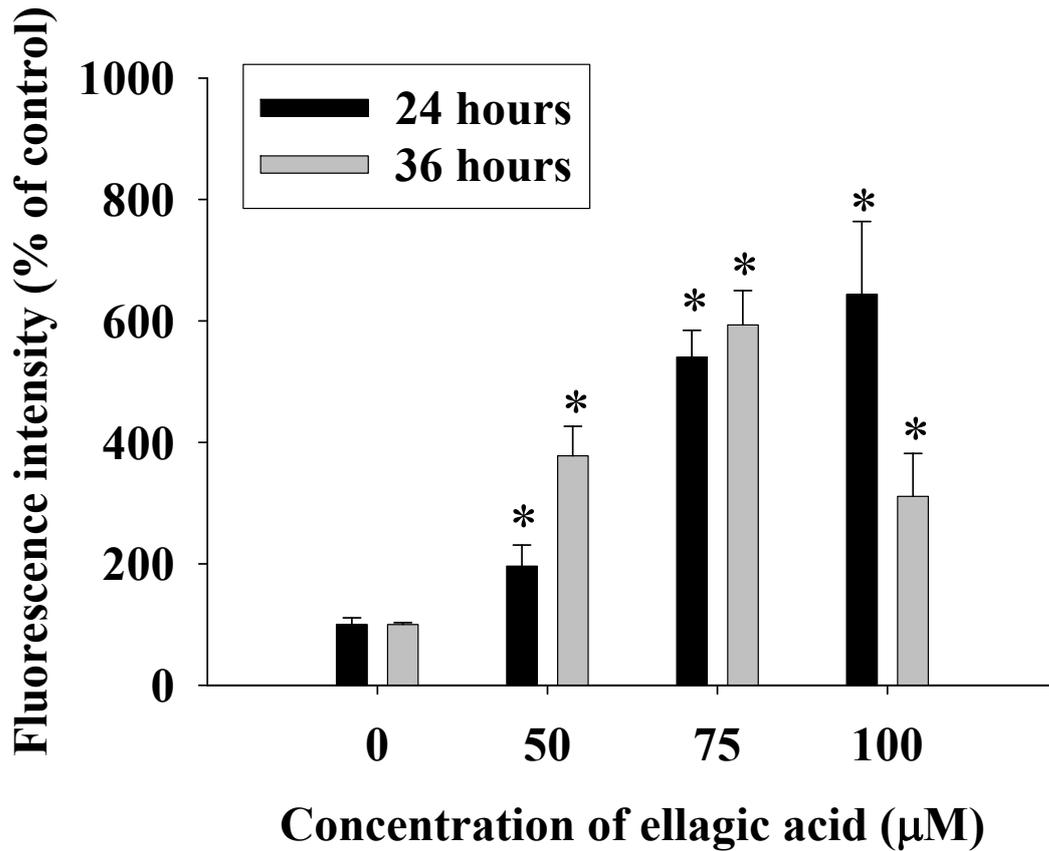


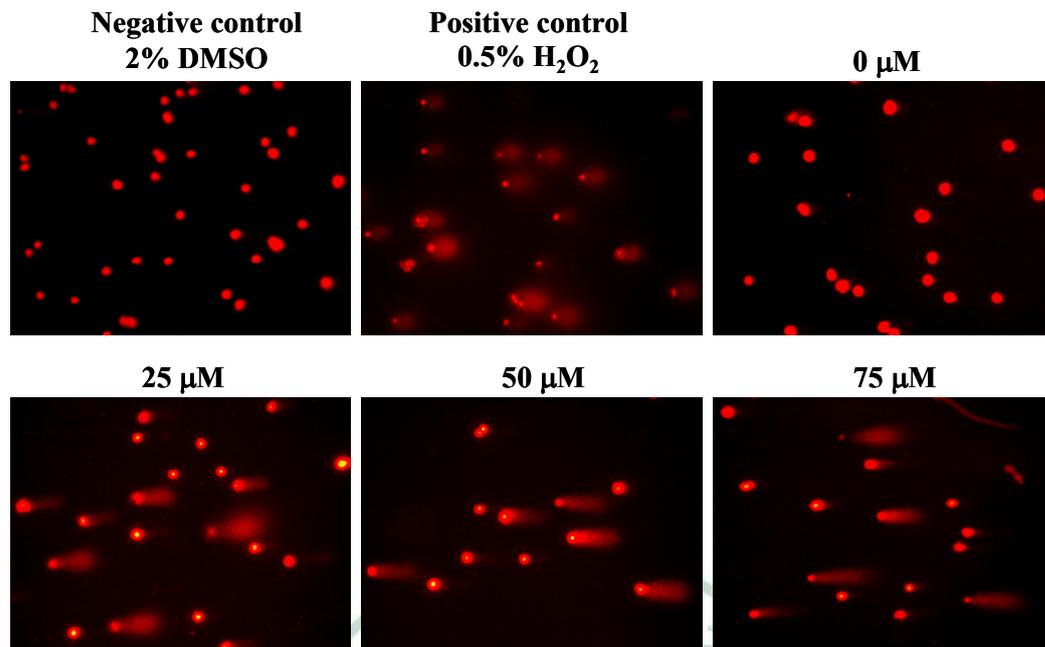
圖 3-4-2 DAPI 螢光量之量化圖。TSGH-8301 細胞以 50、75、100 μM 之 EA 處理 24 與 36 小時後，觀察染色質凝集之現象。利用倒立式螢光顯微鏡所觀察與拍攝後，並將 DAPI 之螢光量量化。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

## (二) 彗星試驗 (Comet assay)

由圖 3-4-3 可得知隨著 Ellagic acid 濃度的增加其細胞拖尾的現象越明顯，代表細胞受到 Ellagic acid 的處理會使之 DNA 產生斷裂與受損的情形，且濃度越高其受損越嚴重。



(A)



(B)

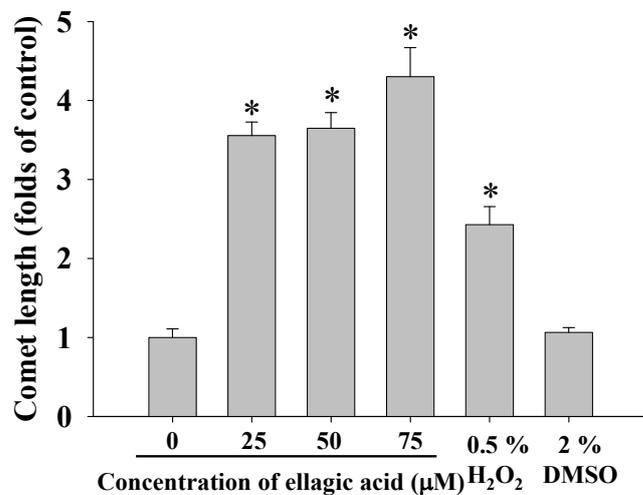


圖 3-4-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞之 DNA 產生受損的影響。

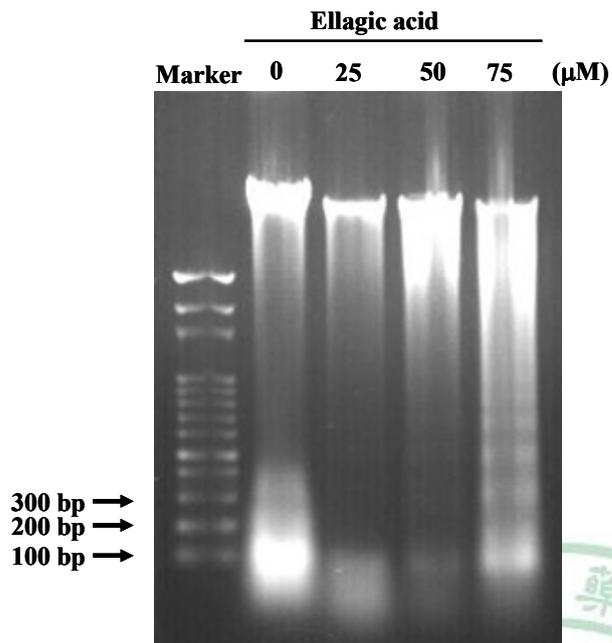
TSGH-8301 細胞以 25、50、75 μM 之 EA 處理 48 小時後，利用彗星試驗觀察細胞核拖尾之現象。(A) 利用倒立式螢光顯微鏡所觀察並拍攝圖。(B) 細胞核拖尾之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

### (三) DNA 膠體電泳 (DNA gel electrophoresis)

當細胞 DNA 受損的時候，利用 DNA 膠體電泳可看出其成階梯狀分布，約在 180~200 bp 間的位置有所謂的 DNA ladder 的表現。實驗結果顯示隨著處理藥物的濃度增加，DNA 斷裂的情況有明顯的表現(圖 3-4-4)。結果表示 Ellagic acid 會誘使 TSGH-8301 細胞的 DNA 產生受損的現象。



(A)



(B)

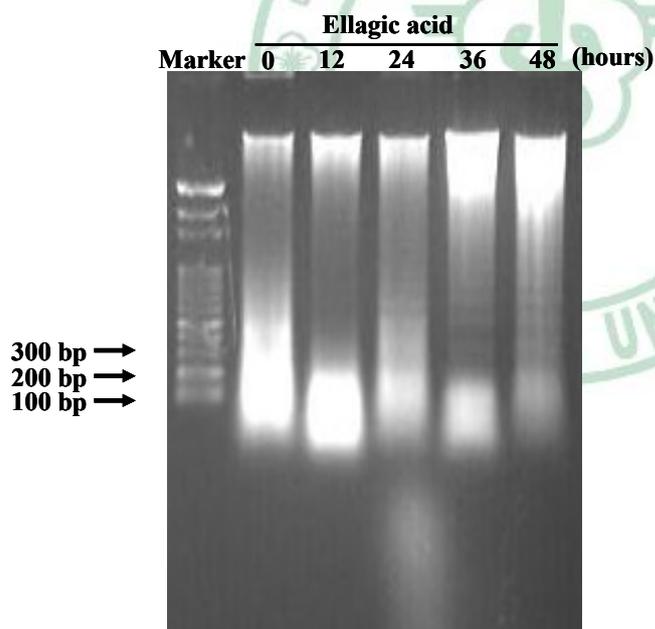


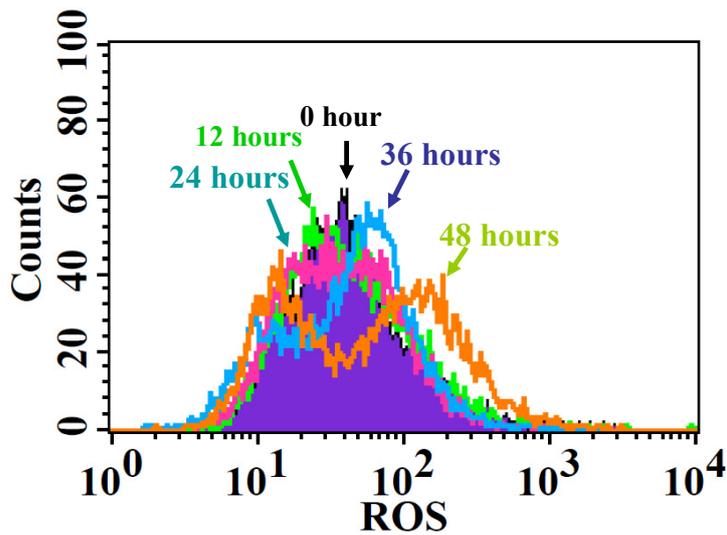
圖 3-4-4 EA 對於 TSGH-8301 細胞之 DNA 產生斷裂的影響。(A) 不同濃度的 EA 處理細胞 48 小時後，利用 DNA 膠體電泳偵測 DNA 斷裂之現象。(B) 以 50 μM 的 EA 處理細胞不同時間點，利用 DNA 膠體電泳偵測 DNA 斷裂之現象。

## 第五節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞產生活性氧物質能力的影響

TSGH-8301 細胞以 50  $\mu\text{M}$  的 Ellagic acid 處理後，經過 12、24、36、48 小時利用流式細胞儀偵測  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  螢光量，觀察 ROS 在細胞內的表現情形。由圖可以觀察到  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  螢光量當細胞處理藥物 12 小時開始下降，而在 36 小時後開始上升。



(A)



(B)

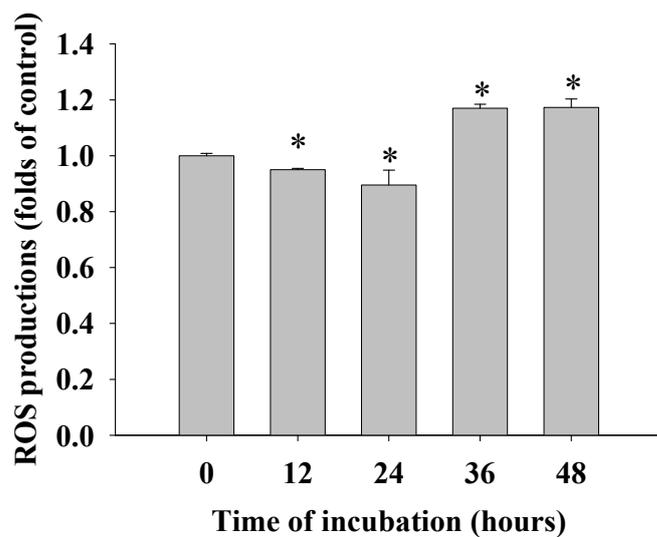


圖 3-5-1 EA 對於 TSGH-8301 細胞活性氧化物質(ROS)產生的影響。

TSGH-8301 細胞以  $50 \mu\text{M}$  的 EA 處理後，經過 12、24、36、48 小時

後，利用流式細胞儀觀察 ROS 在細胞內的表現。(A) 流式細胞儀觀

察 ROS 在細胞內表現分析圖。(B) ROS 在細胞內表現量化圖，實驗

數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's  $t$ -test 統計分析，\*

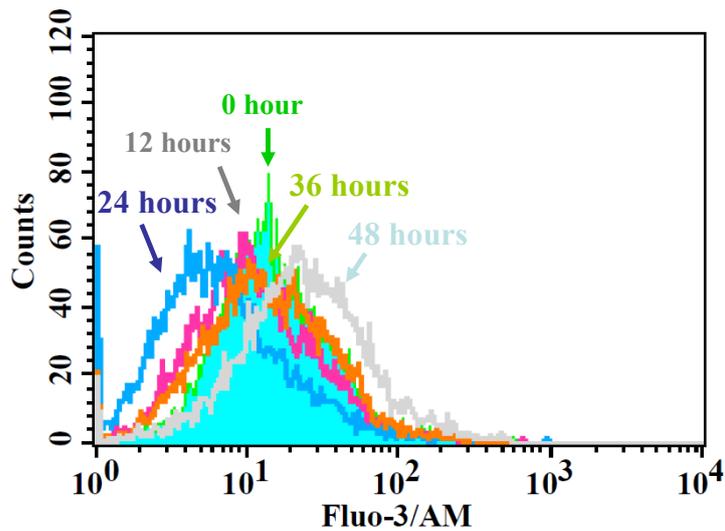
表示  $p < 0.05$ 。

## 第六節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞內鈣離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 釋出的影響

以 50  $\mu\text{M}$  的 Ellagic acid 處理 TSGH-8301 細胞後，經過 12、24、36、48 小時利用流式細胞儀偵測 Fluo-3 螢光量，觀察  $\text{Ca}^{2+}$  在細胞內的表現情形。由圖可以觀察到 Fluo-3 螢光量當細胞處理藥物 12 小時候開始下降，而在 36 小時後開始上升。



(A)



(B)

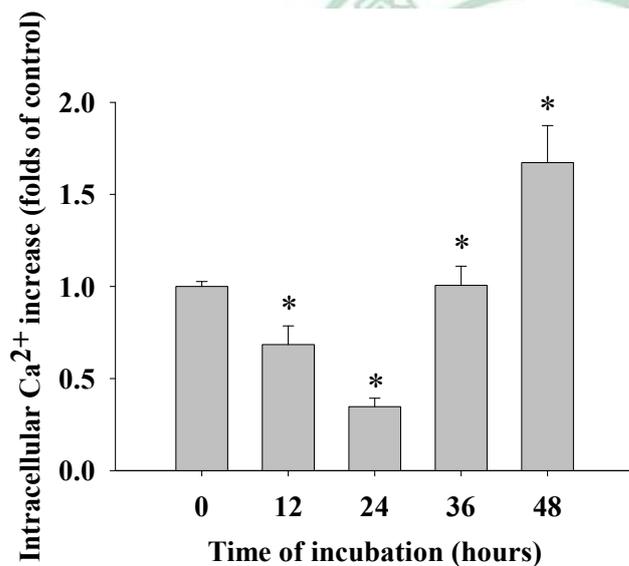


圖 3-6-1 EA 對 TSGH-8401 細胞內鈣離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 釋出的影響。

TSGH-8301 細胞以  $50 \mu\text{M}$  的 EA 處理後，經過 12、24、36、48 小時

後，利用流式細胞儀觀察鈣離子在細胞內的表現情形。(A) 流式細胞

儀觀察鈣離子在細胞質內釋出之分析圖。(B) 鈣離子在細胞質內釋出

之量化圖，實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's

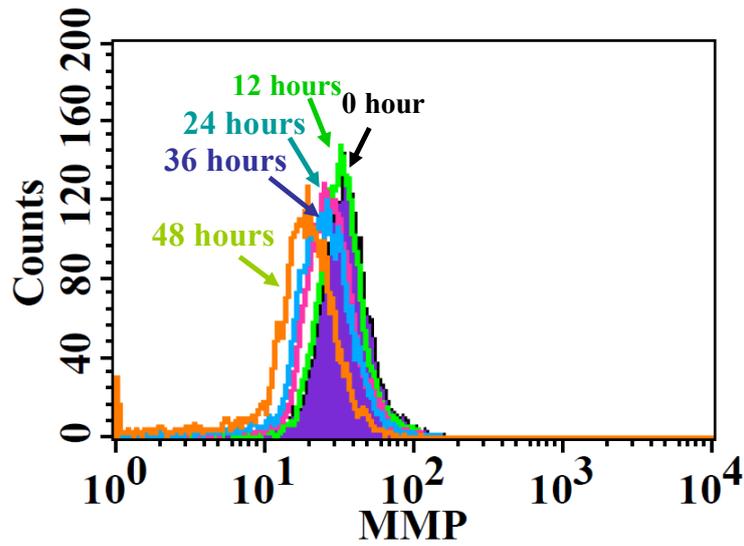
*t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

## 第七節 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞粒線體電位(Mitochondrial membrane potential, MMP, $\Delta\psi_m$ )的影響

以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理 TSGH-8301 細胞後，經過 12、24、36、48 小時利用流式細胞儀偵測 DiOC<sub>6</sub> 螢光量來觀察粒線體電位 (Mitochondrial membrane potential, MMP, $\Delta\psi_m$ ) 的變化。隨著處理藥物的時間越長 DiOC<sub>6</sub> 螢光量顯著的下降，結果顯示 Ellagic acid 會去影響粒線體膜電位並使之下降。



(A)



(B)

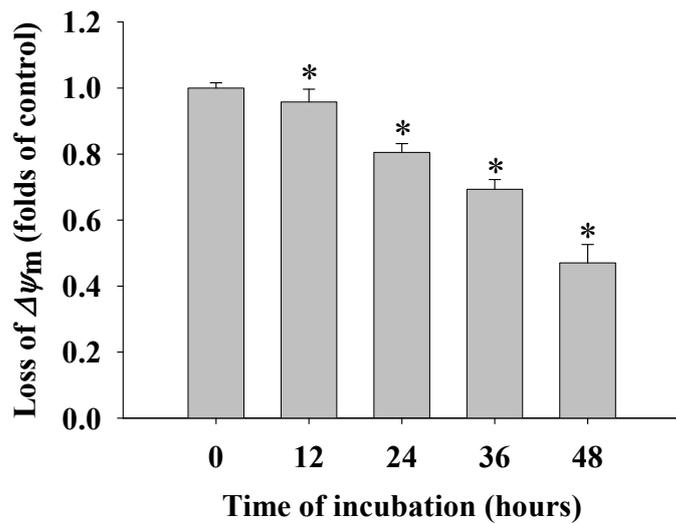


圖 3-7-1 EA 對 TSGH-8401 細胞粒線體電位的影響。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu\text{M}$  的 EA 處理後，經過 12、24、36、48 小時利用流式細胞儀觀察粒線體膜電位的變化。(A) 粒線體膜電位的變化之分析圖。(B) 粒線體膜電位的變化之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

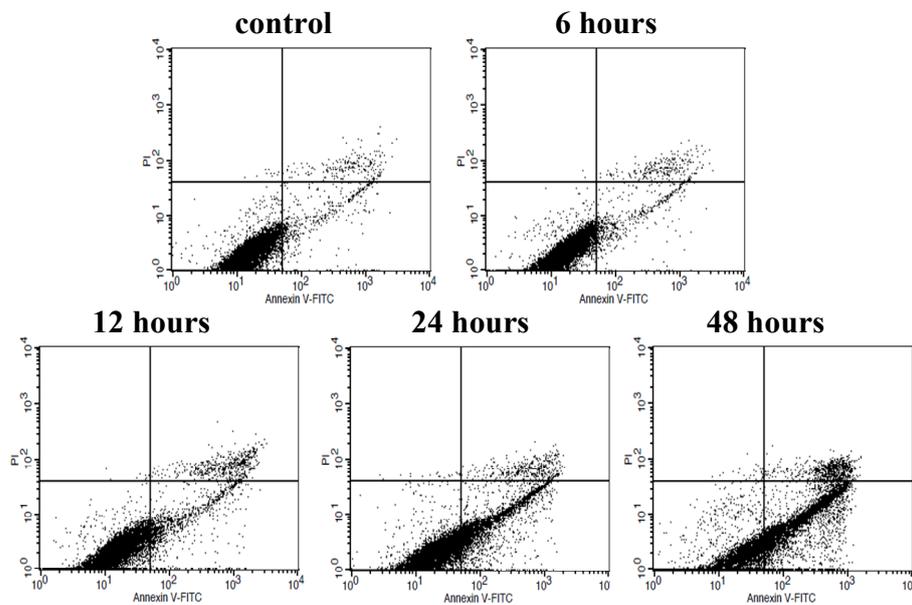
## 第八節 Ellagic acid 誘導 TSGH-8401 細胞產生細胞凋亡的影響

### (1) Annexin V affinity assay

藉由當細胞產生凋亡時，磷脂質絲胺酸 (phospholipid phosphatidylserine ; PS) 會從細胞膜內層外轉移至外層。並利用 Annexin V 與之的專一性來偵測細胞凋亡的現象。圖 3-8-1 中顯示隨著 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理的時間越長，TSGH-8301 細胞的細胞凋亡現象越來越多。證實 Ellagic acid 會誘導 SGH-8301 細胞的凋亡。



(A)



(B)

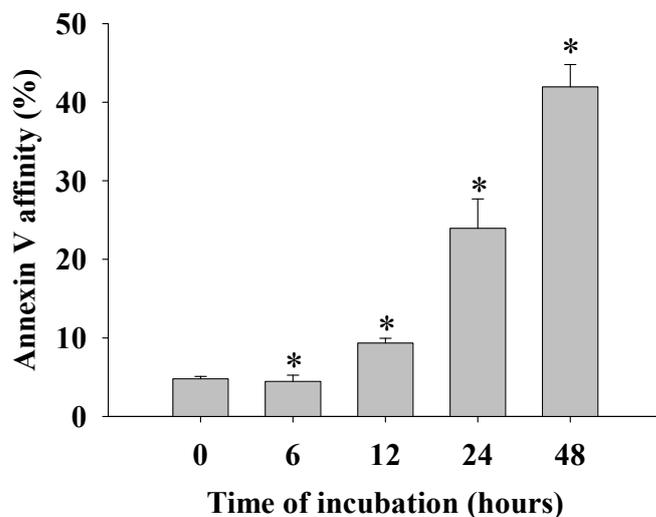


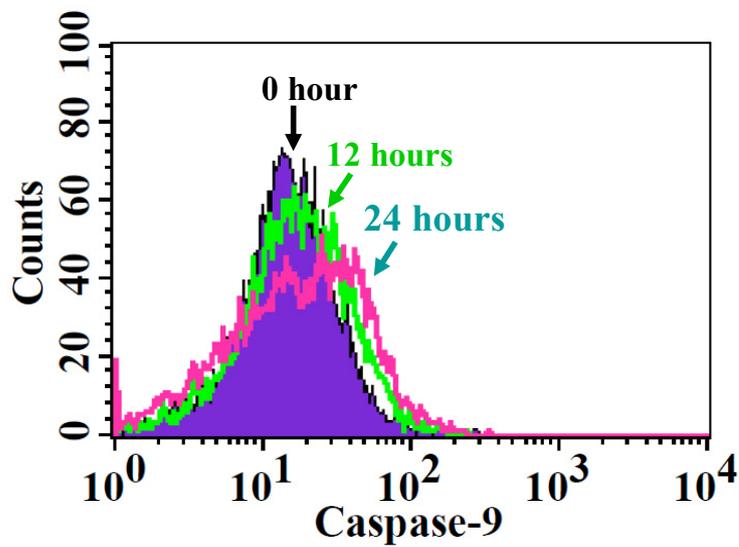
圖 3-8-1 EA 誘導 TSGH-8401 細胞產生細胞凋亡的影響。TSGH-8301 細胞以  $50 \mu\text{M}$  的 EA 處理，經過 6、12、24、48 小時後，利用流式細胞儀觀察磷脂質絲胺酸外翻的變化。(A) Annexin V affinity assay 之分析圖。(B) Annexin V affinity assay 之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

## (2) Caspase activity assay

過去研究指出 Caspase-3 的活性常做為細胞凋亡的指標之一，利用流式細胞儀配合 PhiPhiLux kit 來偵測 Caspase-3 的活性，螢光的強度越強表示 Caspase-3 的活性越高。由圖可以看出隨著處理 Ellagic acid 時間的增加，Caspase-3 的活性也就越高。實驗結果顯示 Ellagic acid 可以誘發 Caspase-3 的活性也進一步的確認 Ellagic acid 可以引起細胞的凋亡。此外同時也測試了 Caspase-3 上游蛋白 Caspase-9 的活性，也發現 caspase-9 的活性在 12 小時便有顯著上升的情形。



(A)



(B)

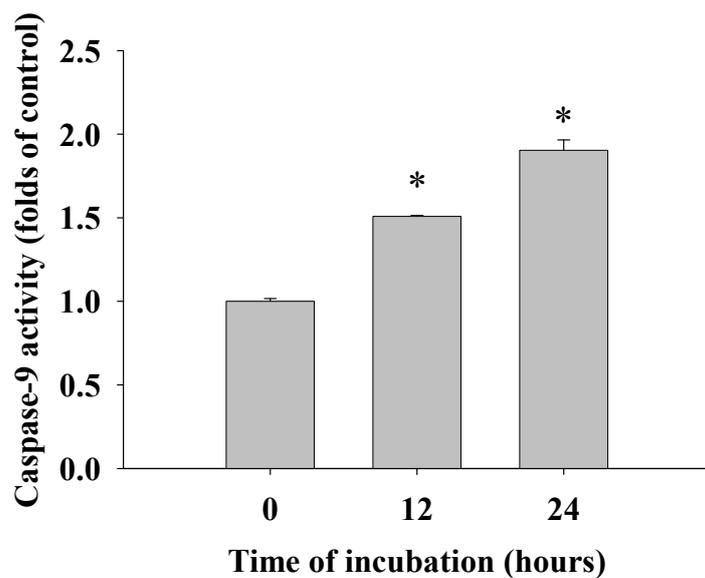
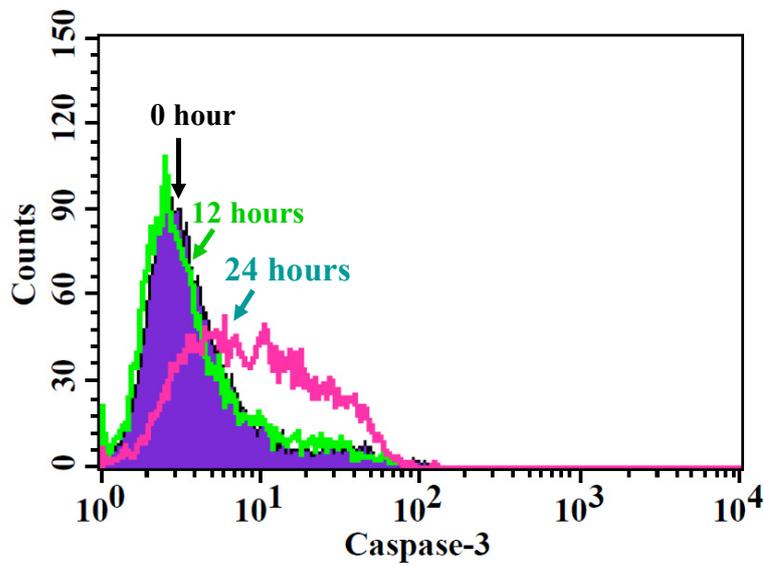


圖 3-8-2 EA 對於 TSGH-8301 細胞 caspase-9 活性的影響。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理後，經過 12、24 小時利用流式細胞儀觀察 caspase-9 活性的變化。(A) caspase-9 活性之分析圖。(B) caspase-9 活性之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

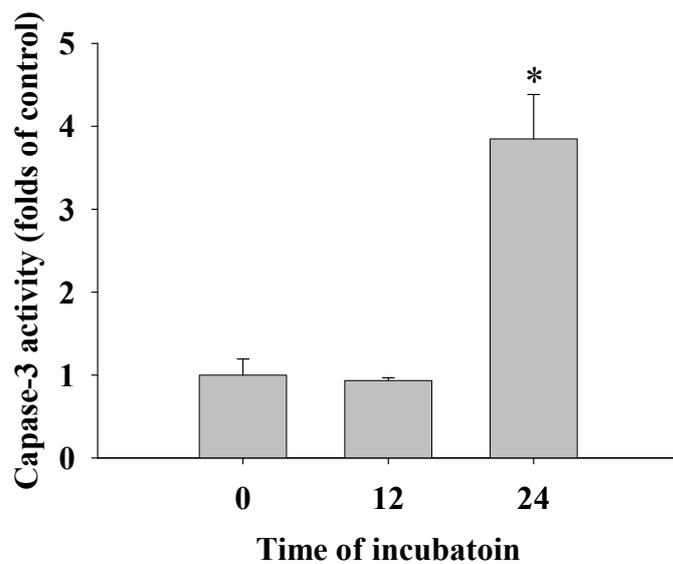


圖 3-8-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞 caspase-3 活性的影響。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理後，經過 12、24 小時利用流式細胞儀觀察 caspase-3 活性的變化。(A) caspase-3 活性之分析圖。(B) caspase-3 活性之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，\*表示  $p < 0.05$ 。

## 第九節 以西方墨點法探討 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞產生細胞

### 凋亡之相關蛋白表現

將細胞以 50  $\mu$ M Ellagic acid 處理並利用西方墨點法分析處理藥物後之 0、12、24、36、48 小時的蛋白表現

實驗結果顯示 pro-apoptosis 中的 Bax、Bak 表現有上升的情形且 t-Bid 也有表現的情形(圖 3-9-1)。在由粒線體中釋放出的與凋亡相關蛋白中 AIF、Endo G、Cytochrome *c* 表現量也有明顯的上升(圖 3-9-2)。Cytochrome *c* 會引起下游的 Apaf-1 的活化而引起一系列的 Caspase 活化，實驗結果顯示 Apaf-1 有表現上升的情形且下游的 caspase-9 與 caspase-3 有被裂解的情形(圖 3-9-3)。而外在路徑中的 Fas、FasL、caspase-8、t-Bid 的表現量上升。此外 anti-apoptosis 蛋白 Bcl-X<sub>L</sub>、Bcl-2 與 XIAP 表現量有隨著處理藥物的時間增加而表現量下降。

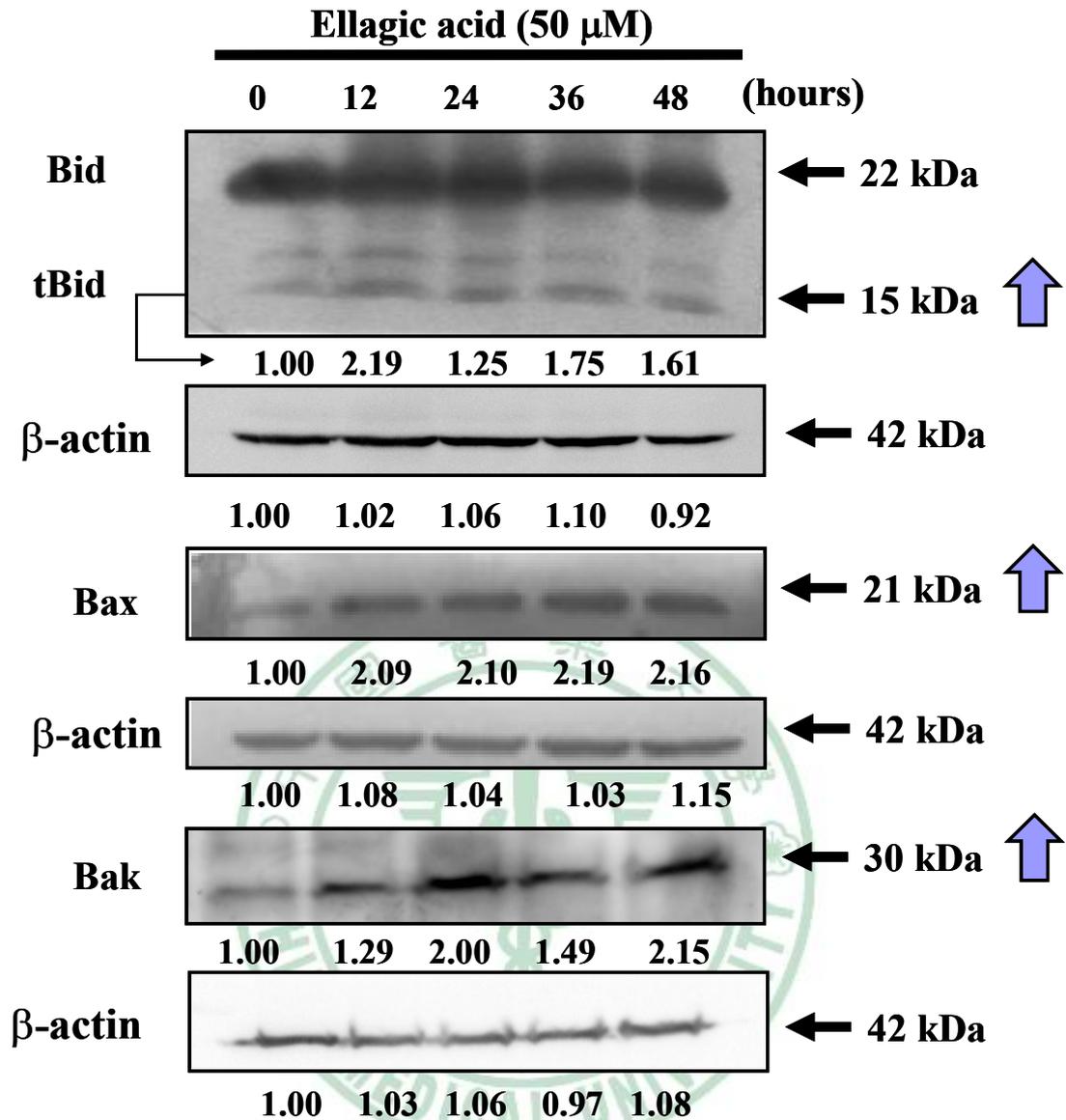


圖 3-9-1 粒線體路徑之凋亡相關蛋白表現變化。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 EA 處理後，經過 12、24、36、48 小時後，利用西方墨點法檢測與粒線體路徑之凋亡相關蛋白 t-Bid、Bax、Bak 的表現變化。

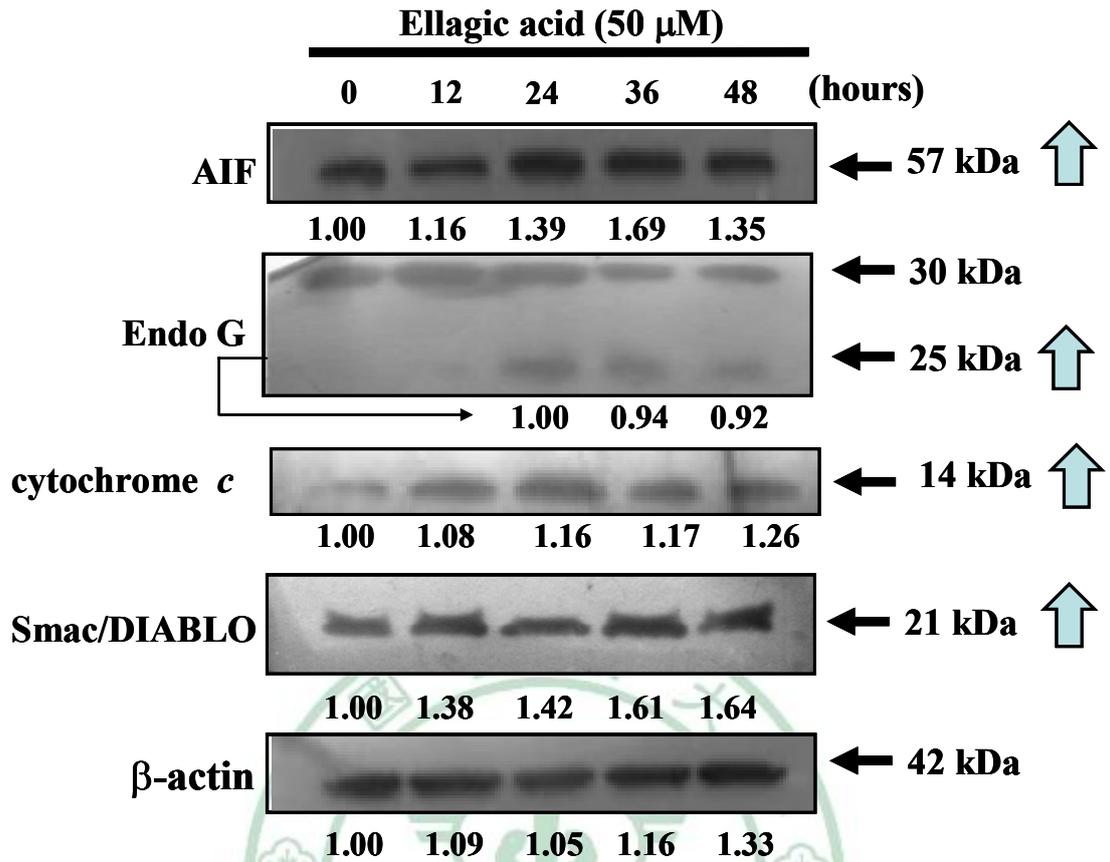


圖 3-9-2 存於粒線體內之凋亡相關蛋白變化。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 EA 處理後，經過 12、24、36、48 小時後，利用西方墨點法檢測有關存於粒線體內之凋亡相關蛋白 AIF、Endo G、Cytochrome *c*、Smac/DIABLO 的表現變化。

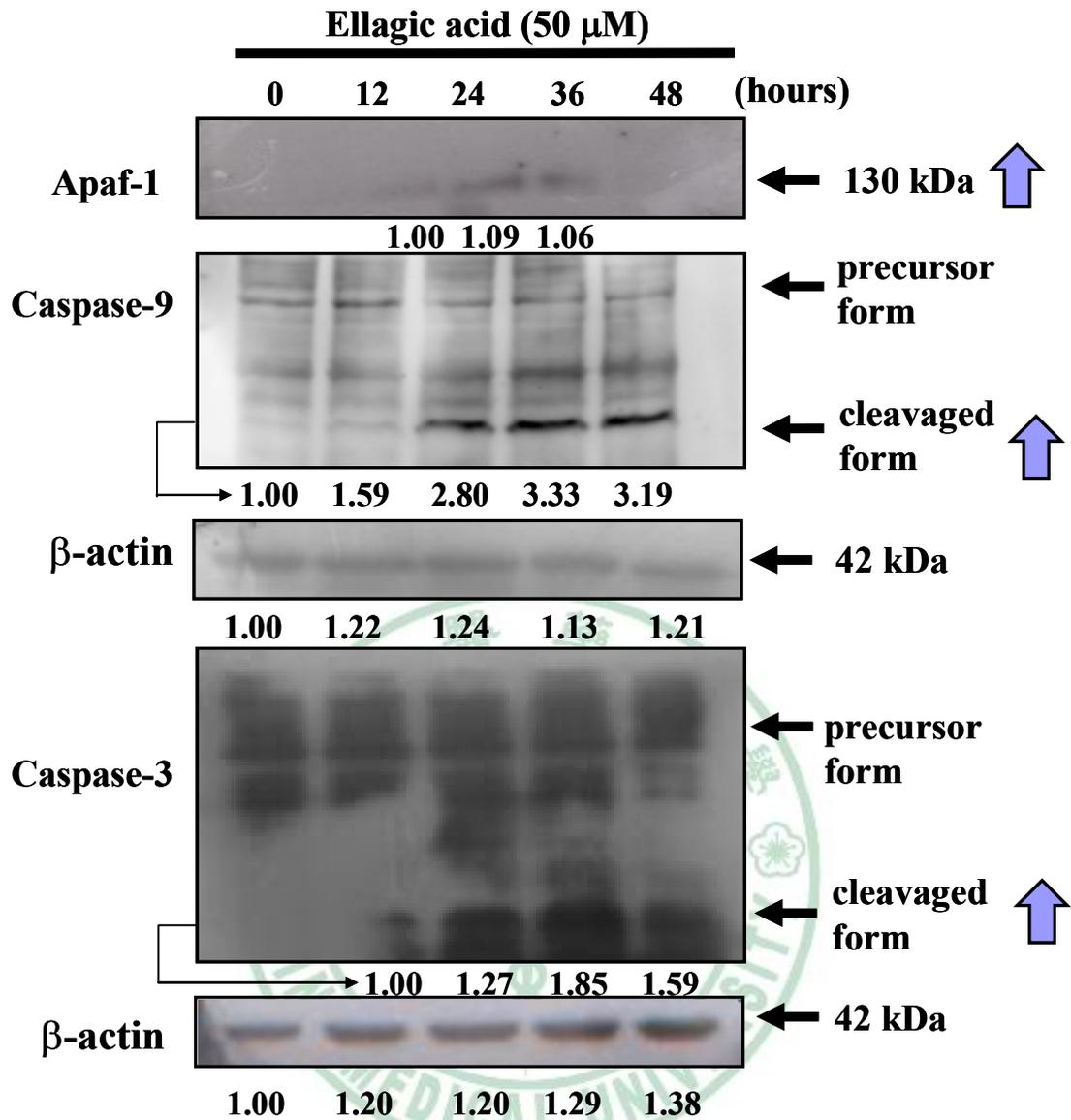


圖 3-9-3 與粒線體相關內在路徑之凋亡相關蛋白表現變化。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 EA 處理後，經過 12、24、36、48 小時後，利用西方墨點法檢測有關於粒線體內在路徑之凋亡相關蛋白 Apaf-1、caspase-9、caspase-3 之表現變化。

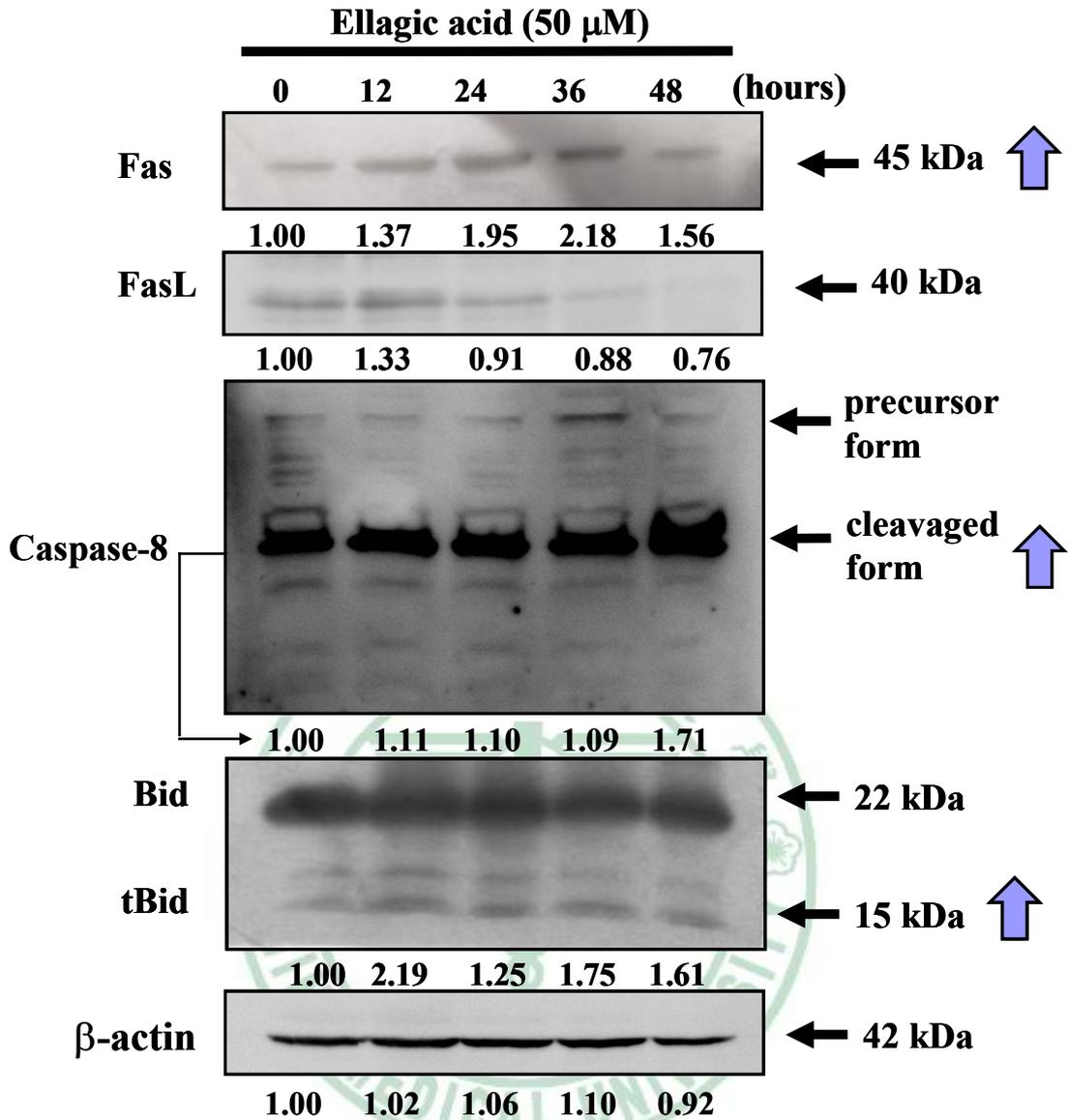


圖 3-9-4 外在路徑之凋亡相關蛋白表現變化。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理後，經過 12、24、36、48 小時後，利用西方墨點法檢測有關於外在路徑之凋亡相關蛋白 Fas、FasL、t-Bid、caspase-8 之表現變化。

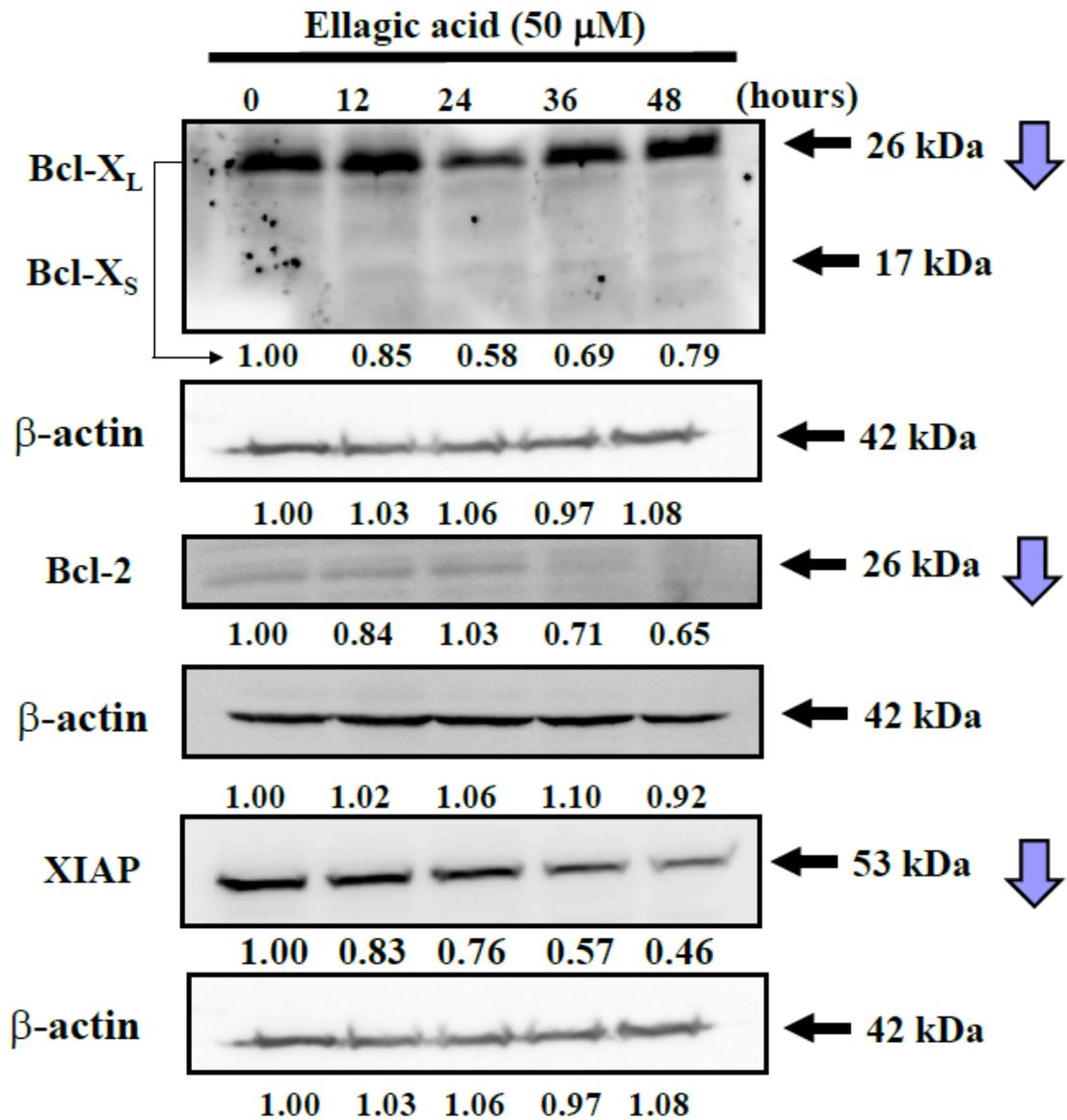


圖 3-9-5 抗凋亡相關蛋白表現變化。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理後，經過 12、24、36、48 小時後，利用西方墨點法檢測有關於抗凋亡相關蛋白 Bcl-X<sub>L</sub>、Bcl-2、XIAP 之表現變化。

## 第十節 以西方墨點法探討 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞的細胞週

### 期之相關蛋白表現

實驗結果顯示隨著時間的增加，p53 與 p21 的表現量也隨之增加，而下游的 cycline E 與 cdk2 表現量有減少的情形(圖 3-10-1)。因此可證明 Ellagic acid 可誘使 TSGH-8401 細胞的細胞週期停滯在 G0/G1。



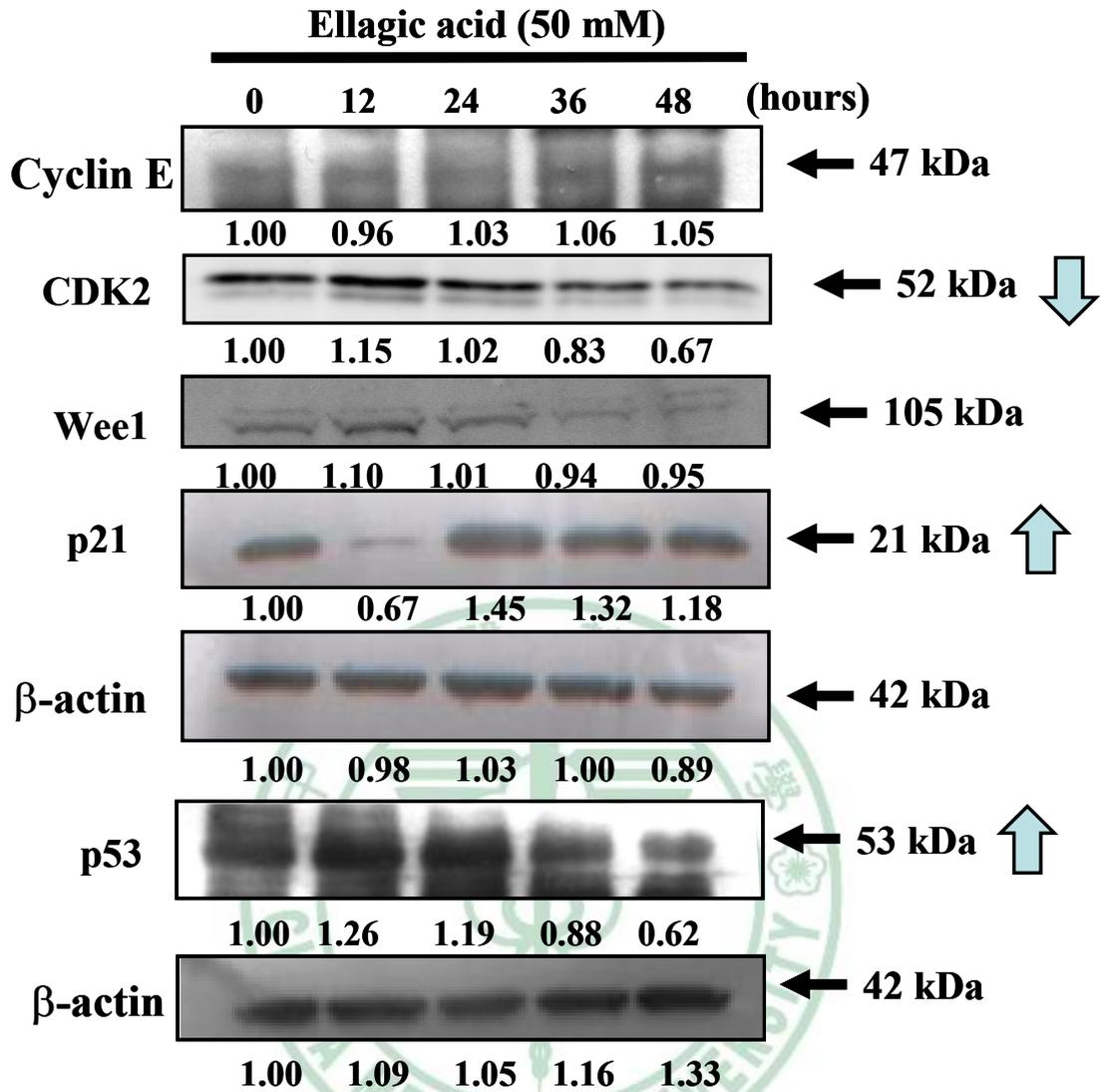


圖 3-10-1 TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 Ellagic acid 處理後，經過 12、24、36、48 小時後，利用西方墨點法檢測有關於細胞週期相關蛋白 cyclin E、CDK2、wee1、p21、p53 之表現變化。

## 第十一節 利用免疫螢光染色探討 Ellagic acid 對 TSGH-8401 細胞中

### 凋亡相關蛋白之表現與轉移之影響

以 50  $\mu\text{M}$  的 Ellagic acid 處理 TSGH-8301 細胞 48 小時後，利用免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡觀察之。實驗結果顯示，當細胞以藥物處理 48 小時之後 cytochrome *c* 與 Smac/DIABLO 大量的表現與釋放之細胞質中。Endo G 與 AIF 也大量表現並移動至細胞核中。

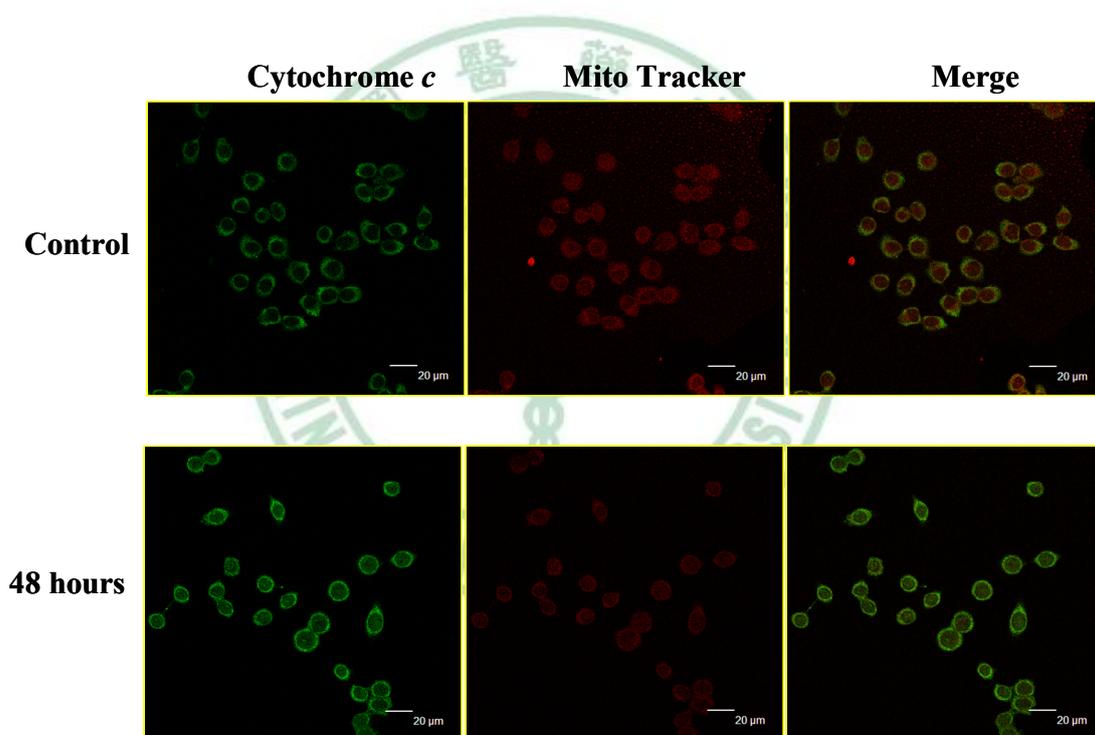


圖 3-11-1 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 cytochrome *c* 的表現與轉移的影響。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu\text{M}$  的 EA 處理，並經過 48 小時後，免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡觀察 cytochrome *c* 的表現與轉移。

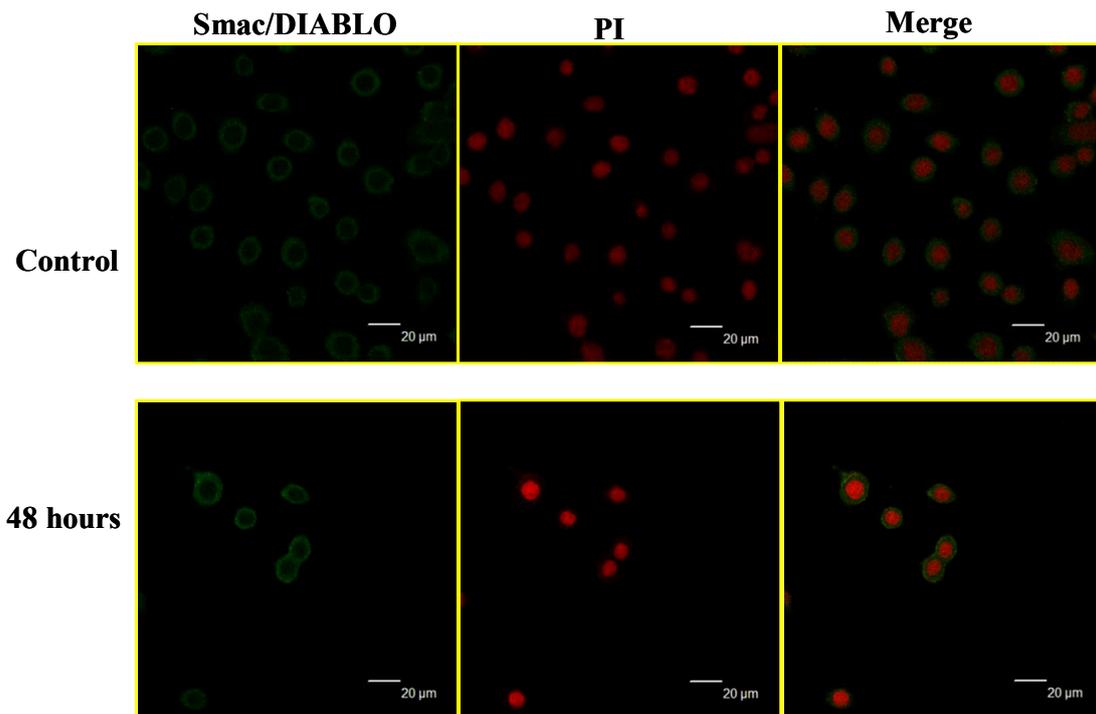


圖 3-11-2 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 Smac/DIABLO 的表現與轉移的影響。TSGH-8301 細胞以 50  $\mu\text{M}$  的 EA 處理，並經過 48 小時後，免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡觀察 Smac/DIABLO 的表現與轉移。

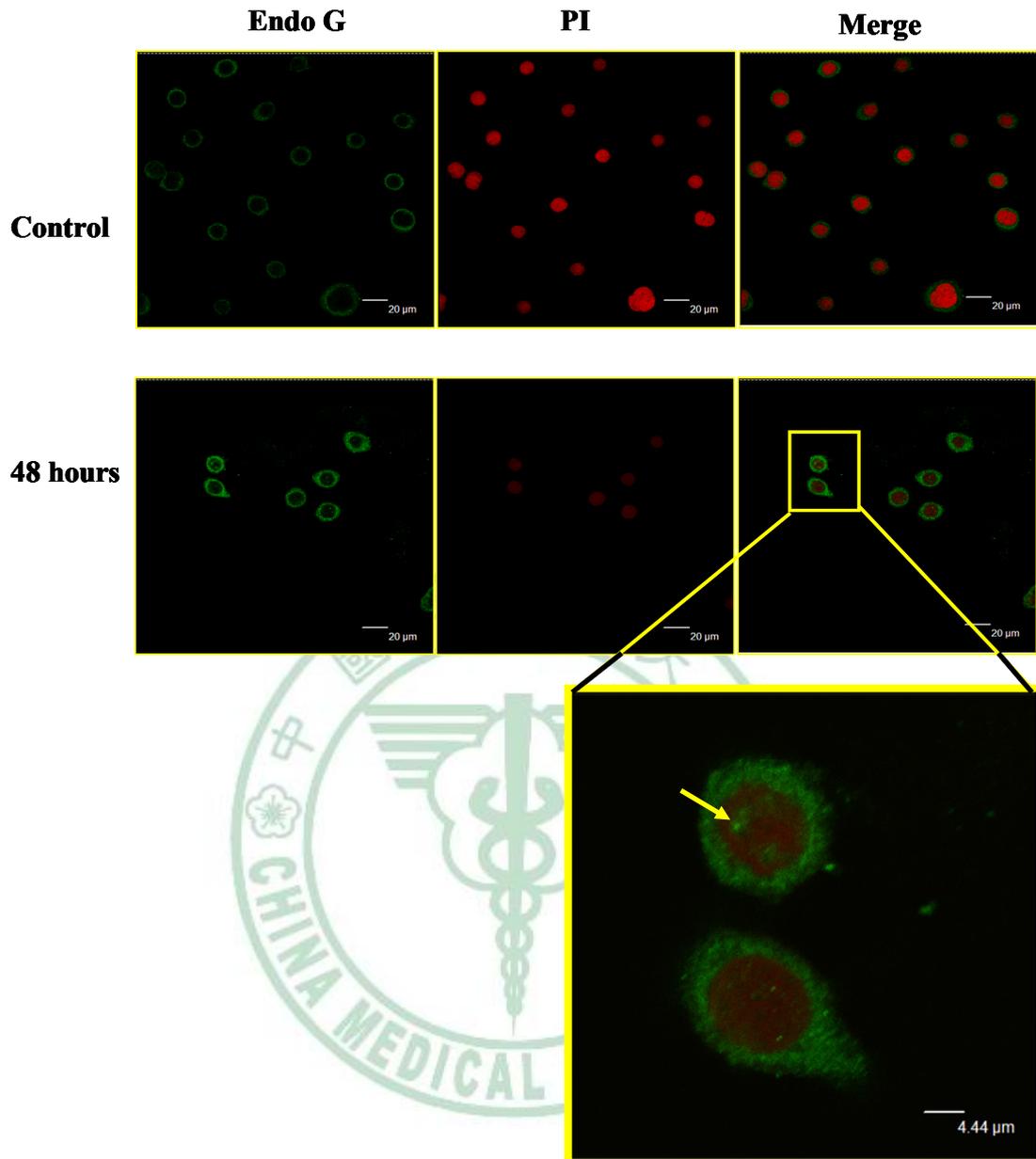


圖 3-11-3 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 Endo G 的表現與轉移的影響。  
TSGH-8301 細胞以 50  $\mu\text{M}$  的 EA 處理，並經過 48 小時後，免疫螢光  
染色與共軛焦顯微鏡觀察 Endo G 的表現與轉移。

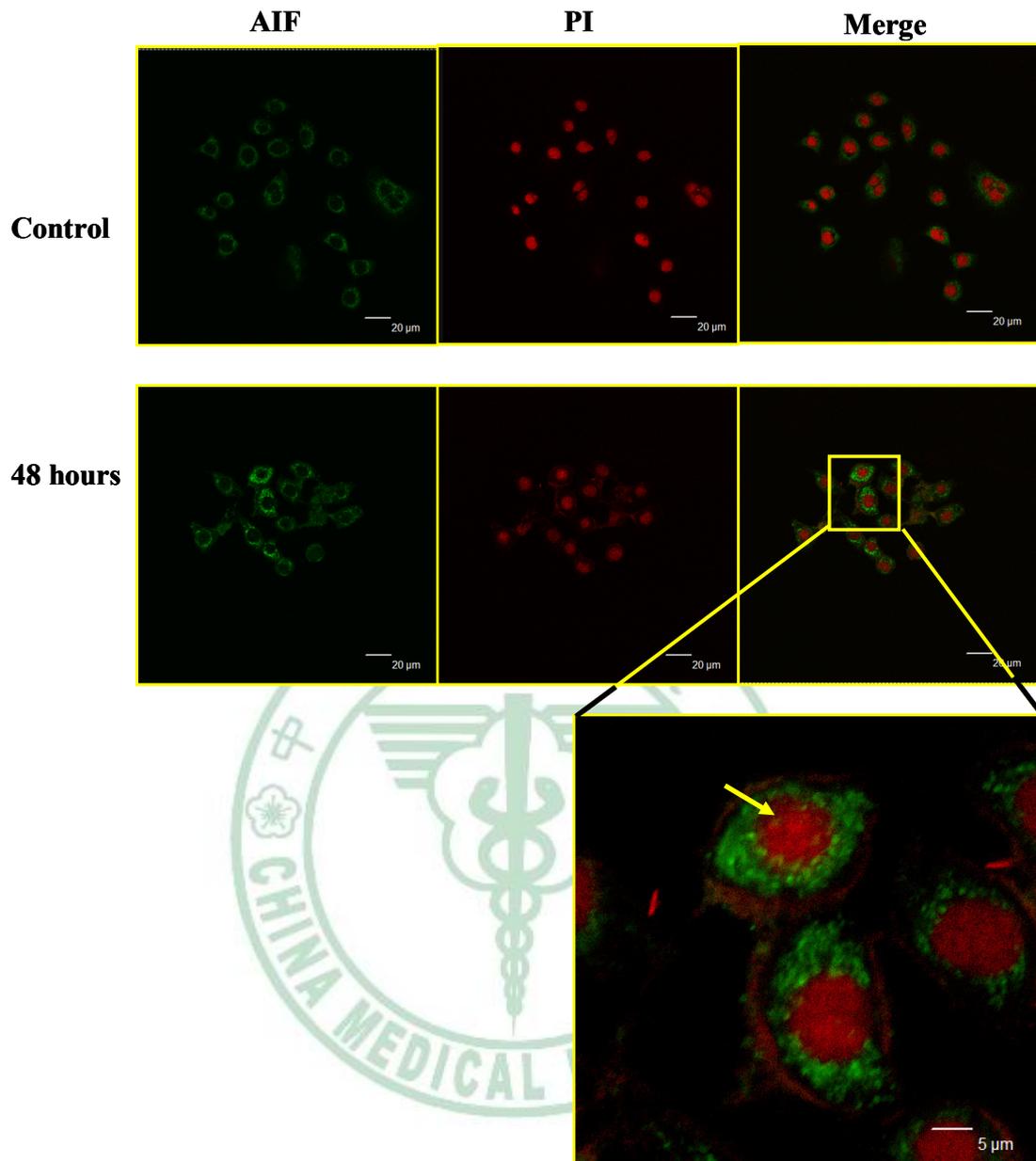


圖 3-11-4 EA 對於 TSGH-8301 細胞內 AIF 的表現與轉移的影響。  
TSGH-8301 細胞以 50  $\mu$ M 的 EA 處理，並經過 48 小時後，免疫螢光  
染色與共軛焦顯微鏡觀察 AIF 的表現與轉移。

## 第十二節 以 Quantitative PCR Analysis 探討 Ellagic acid 對

### TSGH-8401 細胞產生凋亡相關蛋白之 mRNA 表現

實驗結果顯示當 TSGH-8401 細胞處理 50  $\mu$ M Ellagic acid 之後，caspase-9 mRNA 表現在 24 小時有上升的情形 (圖 3-12-1)。而 caspase-9 下游之 caspase-3 在細胞處理藥物後的 24 小時 mRNA 表現開始上升，而隨著處理時間的增加而增加(圖 3-12-2)。

	Target Average Cr	GAPDH Average Cr	$\Delta$ Cr Target- GAPDH	$\Delta$ $\Delta$ Cr $\Delta$ Cr- $\Delta$ Cr <sub>cont</sub>	RQ to cont	RQ Min	RQ. Max
<b>Caspase-3</b>							
0 hour	21.21 $\pm$ 0.01	16.38 $\pm$ 0.04	4.83 $\pm$ 0.05	0	1	0.87	1.15
24 hours	20.78 $\pm$ 0.07	16.42 $\pm$ 0.05	4.36 $\pm$ 0.09	-0.47	1.39	1.13	1.7
48 hours	21.54 $\pm$ 0.01	17.39 $\pm$ 0.12	4.15 $\pm$ 0.13	-0.68	1.6	1.1	2.32
<b>Caspase-9</b>							
0 hour	25.08 $\pm$ 0.02	16.38 $\pm$ 0.04	8.70 $\pm$ 0.05	0	1	0.87	1.15
24 hours	24.91 $\pm$ 0.05	16.42 $\pm$ 0.05	8.49 $\pm$ 0.08	-0.21	1.15	0.97	1.38
48 hours	26.06 $\pm$ 0.02	17.39 $\pm$ 0.12	8.67 $\pm$ 0.13	-0.03	1.02	0.77	1.35

表 3-12-1 mRNA 定量分析表

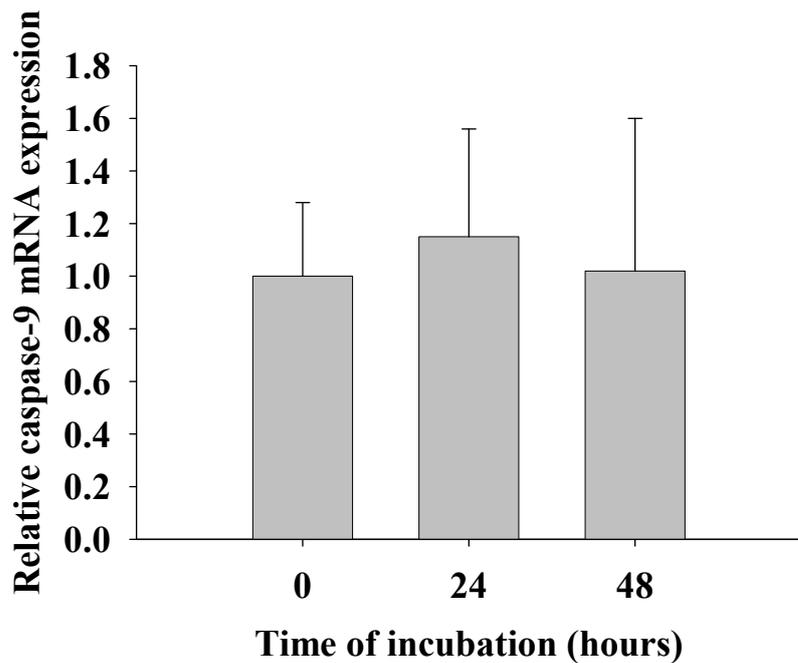


圖 3-12-1 EA 對於 TSGH-8401 細胞 caspase-9 mRNA 表現的影響。

TSGH-8401 細胞處理 50  $\mu$ M EA 之後，caspase-9 mRNA 表現。

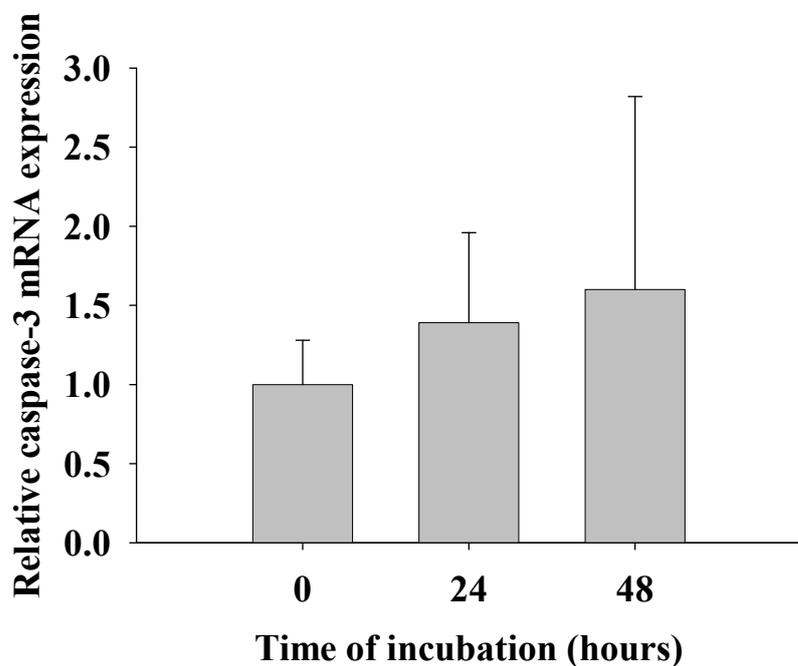


圖 3-12-2 EA 對於 TSGH-8401 細胞 caspase-3 mRNA 表現的影響。

TSGH-8401 細胞處理 50  $\mu$ M EA 之後，caspase-3 mRNA 表現。

#### 第四章 討論

許多研究指出 Ellagic acid 誘發癌細胞的凋亡如：神經母細胞瘤 (Neuroblastoma) 細胞株 SH-SY5Y<sup>19</sup>、人類膀胱癌細胞株 T24、胰臟癌 (pancreatic cancer cell)<sup>20</sup> 細胞與結腸癌細胞株 Caco-2<sup>22</sup>。且與其他藥物共同作用時可更有效使細胞凋亡，如：甲殼素 (Chitosan) 與 Ellagic acid 的共同處理可使神經膠質瘤 (glioma)<sup>10</sup> 與黑色素細胞癌 (melanoma)<sup>17</sup> 產生細胞凋亡。槲皮素(querctetin) 與 Ellagic acid 的共同處理可以使人類血癌細胞的細胞週期停滯與細胞凋亡<sup>18</sup>。而在本研究中由細胞存活率分析得知 Ellagic acid 可抑制 TSGH-8301 細胞的生長 (圖 3-1-3)，因此進一步去觀察 Ellagic acid 對於 TSGH-8301 細胞是否使之產生細胞凋亡。在實驗中利用了 Annexin V affinity assay 來評估磷脂質絲胺酸(phospholipid phosphatidylserine)的外翻情形。結果顯示 TSGH-8301 細胞株在處理 Ellagic acid 後磷脂質絲胺酸外翻的情形有隨著時間的增加而越嚴重。因此證明了 Ellagic acid 也會誘使 TSGH-8301 細胞株的凋亡。

細胞凋亡的特徵也可以由細胞外表與細胞核的變化觀察出來<sup>57</sup>。當細胞進行凋亡時，細胞膜會往內皺縮進而形成凋亡小體，而細胞核內則是 DNA 會凝集 (DNA condensation) 與斷裂 (DNA fragmentation)。由型態照片可以發現處理藥物之後的 TSGH-8301 細

胞其隨著濃度與時間的增加，細胞數目逐漸的減少與細胞開始產生皺縮的現象(圖 3-1-1 與圖 3-1-2)。當細胞凋亡時，DNA 會產生受損的現象，DNA 受損會出現染色質凝集現象與 DNA 會被活化的 AIF、Endo G 和 Caspase 下游的死亡受質切成較小的片段(約 180~200 bp)<sup>58</sup>。首先由 DAPI 染色實驗中可以發現經過藥物處理過的 TSGH-8301 細胞的細胞核有隨著濃度的增加與時間的增長，而其 DAPI 所發出的螢光訊號也越來越強(圖 3-4-1 與圖 3-4-2)，也就是說 TSGH-8301 細胞經過藥物處理後其，DNA 出現凝集的現象。利用 DNA 膠體電泳可以觀察到 DNA 斷裂的現象，實驗結果顯示當隨著處理藥物的時間與濃度的增加，DNA 所形成的斷裂也越來越嚴重(圖 3-4-4)。另外，彗星試驗(comet assay)是一種有效且快速觀察 DNA 受損的情形，當 DNA 受損的越嚴重則彗星拖尾的現象就會越長。<sup>47</sup> 由實驗結果可以發現隨著濃度的增加彗星拖尾的現象也越來越長(圖 3-4-3)。由 DAPI 染色、DNA 膠體電泳和彗星試驗的結果顯示，當 TSGH-8301 細胞被 Ellagic acid 處理過後 DNA 會出現受損的情形，而且是隨著處理藥物的時間與濃度的增加，DNA 受損的現象就越來越嚴重。

當 DNA 受損時，細胞週期會停滯並先進行修復的動作。細胞週期受到許多相關分子的調控，在 G0/ G1 期的部分就受到如:Cyclin D-CDK4/6 complex、Cyclin E-CDK2 complex、chk2、p21 與 p53 等蛋

白所調控。其中 cyclin 與 cdk 必須要結合並形成 complex 才具有活化下游基因的能力。當 DNA 受損時 p53 會受到刺激而增加表現。p53 是一種腫瘤抑制蛋白及轉錄因子。它可以調節細胞內的一些功能，如：細胞週期的調控、DNA 的合成和修復、調控基因的轉錄、誘使細胞死亡等<sup>59</sup> 當 p53 受到 DNA 受損的影響時，會被活化並誘使 p21 基因被轉錄並轉譯出 p21 蛋白。被活化的 p21 蛋白會去抑制 Cyclin D-CDK4/6 complex 與 Cyclin E-CDK2 complex 的形成，而造成細胞週期的停滯<sup>60</sup>。有研究指出 Ellagic acid 可使人類膀胱癌細胞株 T24<sup>21</sup> 與子宮頸癌細胞株 CaSki<sup>61</sup> 的 p21 與 p53 活化且使細胞週期停滯在 G1 期。也有研究指出 Ellagic acid 可以誘使大鼠神經膠質瘤 C6 細胞株 p53 的活化<sup>10</sup>。在本研究中利用流式細胞儀分析細胞週期，結果顯示當隨著處理藥物的濃度增加細胞週期族逐漸停滯在 G0/G1 期(圖 3-3-1)。並且由西方墨點法的蛋白質分析(圖 3-10-1)可以明顯的看出 p53 與 p21 蛋白表現有明顯的增加，且 CDK2 表現有被抑制的情形。因此總歸以上實驗顯示 Ellagic acid 可以造成 TSGH-8301 細胞的細胞周期停滯在 G0/ G1 的現象。

由細胞型態的變化與 DNA 受損的實驗可以初步的觀察到 Ellagic acid 對 TSGH-8301 細胞所引起的凋亡現象。研究細胞凋亡非常有用的工具之一就是流式細胞儀，我們可以藉由不同螢光染劑將細胞染

色，並觀察其細胞內各種物理或化學上的變化，如：鈣離子的濃度的變化、粒線體膜電位的變化、活性氧化物質的增減、caspase 活性的增加與磷脂質絲胺酸(phospholipid phosphatidylserine)的外翻等。而以上所述現象有可能與細胞凋亡的過程有關<sup>55</sup>。有回顧性文章指出，細胞質內鈣離子的增加、活性氧化物質的增加與粒線體膜電位的下降都可能引起細胞凋亡<sup>33</sup>。而實驗結果顯示，當利用 Ellagic acid 去處理 TSGH-8301 細胞後，用流式細胞儀去檢測上述三種現象可以發現細胞質內鈣離子與活性氧化物質的螢光量在 36 小時之前會先下降，36 小時會開始上升(圖 3-5-1 與圖 3-6-1)。而粒線體膜電位則是從 12 小時就開始下降(圖 3-7-1)。此外我們也發現了隨著處理藥物時間的增加，磷脂質絲胺酸的外翻也越來越明顯(圖 3-8-1)，最後測試了與粒線體相關凋亡路徑中的 caspase-9 與 caspase-3 的活性顯示在處理藥物之後 caspase-9(圖 3-8-2)與 caspase-3(圖 3-8-3)的活性有上升的情形。由流式細胞儀的實驗結果推論，Ellagic acid 引起 TSGH-8301 細胞凋亡的路徑是經由粒線體相關路徑同時會引起 caspase-9 與 caspase-3 的活性的增加。此外利用 Quantitative PCR Analysis 分析 caspase-9 與 caspase-3 的 mRNA 表現也可以發現 Ellagic acid 會誘使 TSGH-8301 細胞的 caspase-9 與 caspase-3 之基因進行轉錄(圖 3-12-1 與圖 3-12-2)。

在細胞凋亡的過程中，粒線體是非常重要的關鍵點，因為它能釋放許多與 caspase 作用的蛋白<sup>62</sup>。而細胞凋亡的內在路徑就是經由粒線體釋放出存在於粒線體內的蛋白進入細胞質中。在粒線體內啟動細胞凋亡活化的主要蛋白無疑地便是 cytochrome *c*。雖然有部分的 cytochrome *c* 會離開內膜上並移動，但在正常狀況下，多虧 cytochrome *c* 上的酸性磷酸根使得 cytochrome *c* 緊密的結合在粒線體的內膜上。cytochrome *c* 在粒線體電子傳遞鏈中是不可或缺的要素，它將電子傳遞於複合物 III (complexes III)至 IV(complexes IV)，因此它在生命中也是不可或缺的蛋白，所以當製造此蛋白的唯一基因產生缺陷時，會導致胚胎的死亡<sup>63</sup>。當它被釋放至細胞質中時，它驅動著 Apaf-1 (apoptosis-protease activating factor 1)與 caspase-9 集成 caspase 活化複合物又稱為 'apoptosome'。cytochrome *c* 在細胞質中可使 Apaf-1 重新排列與結合，每一個 Apaf-1 可在集成複合物並導致它們的蛋白分解程序並活化<sup>64</sup>。

粒線體包含了許多其它促凋亡蛋白，如位於內外膜之間膜間隙 (intermembrane space) 的 Smac/DIABLO、HtraA2/Omi、AIF 和 Endo G。DIABLO 和 HtraA2 在 N 端的區域都具有與抑制凋亡蛋白 IAPs (inhibitor of apoptosis proteins)作用與抑制之。IAPs 蛋白中有 XIAP、cIAP-1 和 cIAP-2，它們是可溶性胜肽 (peptide)且存在於細胞質。它

們的功能主要是與 procaspase 連結並使 procaspase 處於穩定的狀態中進而避免被活化。另一方面，當細胞受到凋亡訊息的刺激時，促凋亡因子 (apoptosis-inducing factor) 與 Endo G (endonuclease G) 會從粒線體膜間隙轉移至細胞核中並造成染色質的凝集 (chromatin condensation) 與 DNA 斷裂 (DNA fragmentation)<sup>65</sup>。

內在路徑的調控是由 Bcl-2 家族蛋白所調控。proapoptosis 蛋白 Bax 與 Bak 在非活化態時是以單體 (monomer) 的形式存在。Bax 位在細胞質中對結合到粒線體膜上的能力較為弱，而 Bak 則與粒線體的功能有關。當細胞凋亡被引發時，Bax 會轉移到粒線體外膜上並形成寡聚體 (homooligomerizes)，同時 Bak 在構形上也出現改變，致使在粒線體外膜上形成寡聚體。以上這些事件觸發了粒線體外膜的通透性產生改變，這段過程調控著存在膜間隙中的 caspase cofactor 從膜間隙中被釋放到細胞質中<sup>66</sup>。

在本研究實驗結果顯示，當細胞處理藥物之後，以流式細胞儀偵測其細胞內粒線體膜電位之變化，其膜電位隨著加藥的時間增加而減少(圖 3-7-1)。意味著 Ellagic acid 直接或間接的造成粒線體功能上的改變。而膜電位的改變代表著粒線體膜的滲透性產生了改變，而這些改變有可能是因為 Bax 與 Bak 結合至膜上形成孔洞而導致的滲透壓改變。由西方墨點法觀察到 Bax 與 Bak 的蛋白表現有明顯的增加(圖

3-9-1), Bax 與 Bak 共同作用而使得膜電位產生改變同時滲透壓產生了改變。Bax 與 Bak 所造成的孔洞就會使膜間隙內的促凋亡因子(如: AIF、Endo G 與 cytochrome *c*)釋放到細胞質之中。因此由西方墨點法去觀察這些蛋白的表現, 可以 AIF、Endo G、Smac/DIABLO 與 cytochrome *c* 發現都有明顯增加的情形(圖 3-9-2), 此外利用免疫螢光染色再用共軛焦顯微鏡去觀察這些蛋白的轉位 (translocation) 可以發現 cytochrome *c* 與 Smac/DIABLO 在細胞處理藥物之後在細胞質中有大量表現(圖 3-11-1 與圖 3-11-2), 而 AIF(圖 3-11-4)與 Endo G(圖 3-11-3)則是有大量表現並有進入細胞核中的情形。實驗證明粒線體在細胞受到藥物處理後有出現功能上的變化, 其膜電位的改變與通透性的改變, 且誘發促凋亡因子釋放到細胞質中。同時利用西方墨點法發現 cytochrome *c* 的下游蛋白 Apaf-1 的表現有增加且 caspase-9 的活化態蛋白也有明顯表現。接著我們也發現了 caspase-3 的活化態的蛋白表現也上升了(圖 3-9-3)。當 caspase-3 被裂解活化後會引起下游路徑, 最後造成 DNA 的斷裂並引起細胞凋亡。此外我們也發現了在調控粒線體凋亡路徑 Bcl-2 家族蛋白中, Bcl-2 與 Bcl-X<sub>L</sub> 的蛋白表現隨著藥物處理的時間增加有下降的情形。而於細胞質中會抑制 caspase 活性的 IAPs 蛋白中 XIAP 表現也有隨著處理藥物時間的增加而下降(圖 3-9-5)。實驗結果顯示 Ellagic acid 可以經由粒線體相關路徑造成

TSGH-8301 細胞的凋亡且會誘使抑制凋亡的蛋白 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 與 XIAP 的表現而更進一步的造成細胞凋亡。除了內在路徑所引起的凋亡外，相對另一條路徑稱做外在路徑，其又稱為死亡受器路徑。其中一條路徑是由 Fas 接上 FasL 後引起下游的 caspase-8 裂解。活化 caspase-8 會使 caspase-3 活化並使細胞凋亡，另一方面它也會使 Bid 裂解成 t-Bid，裂解的 t-Bid 則會去影響粒線體膜電位的變化並造成死亡<sup>67</sup>。由西方墨點法實驗中發現，Fas 與 FasL 的蛋白表現有上升的情形，且其下游的 caspase-8 與 Bid 的活化態表現也有增加情形(圖 3-9-6)。雖然其蛋白增加變化量並不明顯，但由此可推斷 Ellagic acid 有可能經由此路徑造成 TSGH-8301 細胞的凋亡。

在先前的研究指出 Ellagic acid 對人類正常纖維母細胞株 HEL 299 在低於 100  $\mu$ M Ellagic acid 的處理下並不會造成毒性，而且對於結腸癌細胞株 Caco-2、人類攝護腺癌細胞株 DU 145、乳癌細胞株 MCF-7 和 Hs 578T 隨著藥物濃度的增加而越有更嚴重的毒殺效果與抗增生的作用<sup>9</sup>。我們的結果顯示利用 Ellagic acid 處理老鼠正常平滑肌細胞 A10 後，相較於膀胱癌細胞株 TSGH-8301，Ellagic acid 所造成的抑制生長效果來的較低，而且不具有劑量依賴性(圖 3-2-1)。相對的 Ellagic acid 較能有效的抑制 TSGH-8301 細胞的生長(圖 3-1-3)。此外在 2005 年時，有研究指出 Ellagic Acid 可以降低前列腺癌病人因

化學治療所引起的毒性<sup>68</sup>。因此在未來 Ellagic acid 不管是降低化學治療所引起的毒性或是抑制癌症的生長上，都是具有相當潛力的抗癌藥物。而綜合以上實驗結果我們可以得知：

1. Ellagic acid 可以引起 TSGH-8301 細胞的死亡，且會隨著濃度與時間的增加而越嚴重。
2. Ellagic acid 會導致 TSGH-8301 細胞 DNA 受損並使之細胞週期停滯於 G0/G1。
3. Ellagic acid 會影響 TSGH-8301 細胞中的粒線體並使其膜電位下降。
4. Ellagic acid 會誘使 TSGH-8301 細胞 Bax 與 Bak 表現增加而導致粒線體膜通透改變，導致粒線體中的 cytochrome *c* 釋放至細胞質中並引起下游 caspase-dependent apoptosis pathway 的活化。
5. Ellagic acid 也會誘使 TSGH-8301 細胞粒線體中的 AIF 與 Endo G 釋放至細胞質中並進入細胞核內直接對 DNA 進行裂解而導致 DNA 受損並使細胞走向凋亡。
6. Ellagic acid 會誘使粒線體中的 Smac/DIABLO 釋放至細胞質中抑制 XIAP，而導致 XIAP 無法去抑制 caspase-9 與 caspase-3 的活性。
7. Ellagic acid 導致 TSGH-8301 細胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 與 XIAP 的表現量下降而無法抑制細胞的凋亡。

## 第五章 結論

我們認為 Ellagic acid 可以抑制 TSGH-8301 細胞的生長與造成細胞週期停滯，並經由粒線體相關路徑來引起細胞凋亡。但是否其它路徑所引起的凋亡仍需待日後更進一步研究。

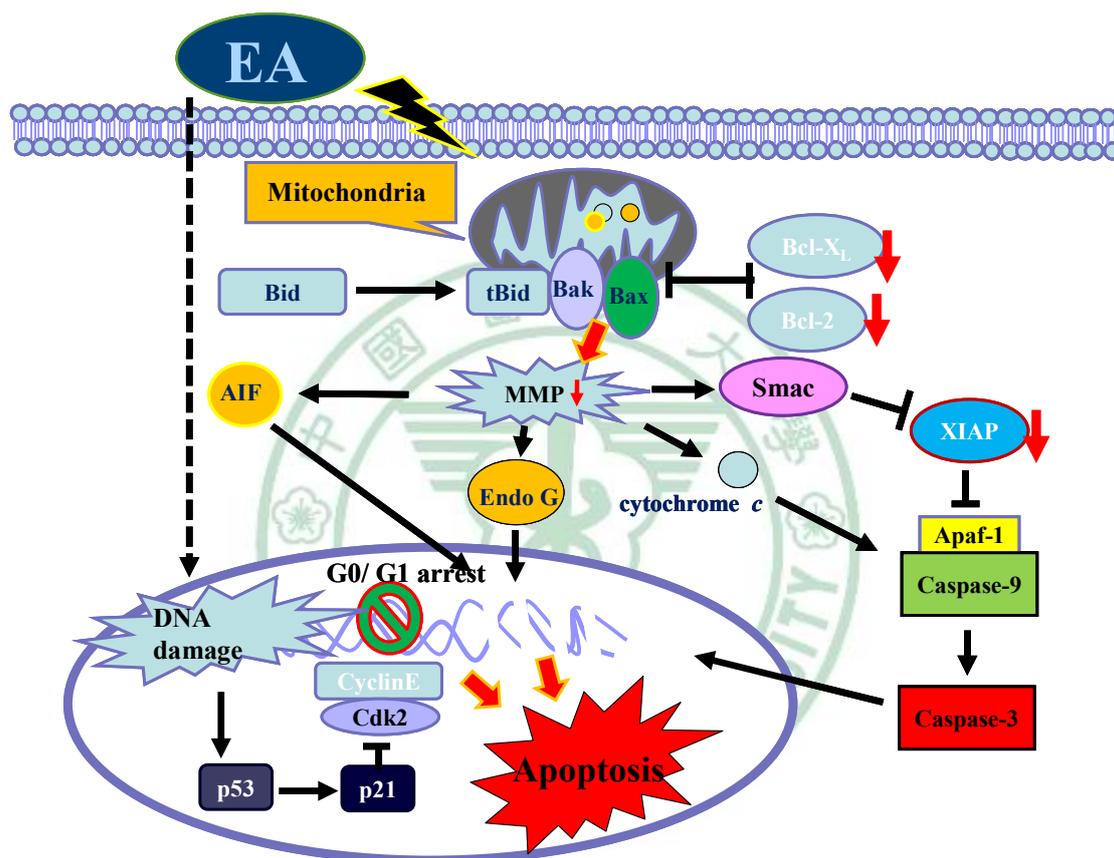


圖 5-1 Ellagic acid 誘導人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 細胞凋亡之路徑模式圖。

## 第六章 參考文獻

1. 行政院衛生署. [cite; Available from <http://www.doh.gov.tw/>. (2007).]
2. 世界衛生組織. [cite; Available from <http://www.who.int/en/>. (2007).]
3. B., A. Molecular biology of the cell. (2002).
4. Todd, R. & Wong, D.T. Oncogenes. *Anticancer Res* **19**, 4729-4746 (1999).
5. Xiao, D., *et al.* Diallyl trisulfide selectively causes Bax- and Bak-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Environ Mol Mutagen* **50**, 201-212 (2009).
6. Lee, Y.K., Hwang, J.T., Kwon, D.Y., Surh, Y.J. & Park, O.J. Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK $\alpha$ 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett* **292**, 228-236 (2010).
7. Kawada, M., *et al.* Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* **12**, 847-852 (2001).
8. You, B.R., Moon, H.J., Han, Y.H. & Park, W.H. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food Chem Toxicol* **48**, 1334-1340 (2010).
9. Losso, J.N., Bansode, R.R., Trappey, A., 2nd, Bawadi, H.A. & Truax, R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J Nutr Biochem* **15**, 672-678 (2004).
10. Kim, S., *et al.* The inhibition of glioma growth in vitro and in vivo by a chitosan/ellagic acid composite biomaterial. *Biomaterials* **30**, 4743-4751 (2009).
11. 陶聲洋防癌基金會. [cite; Available from [http://www.sydao.org.tw/cure/cancer\\_19.html](http://www.sydao.org.tw/cure/cancer_19.html). (2009).]
12. Vattem, D.A. & Shetty, K. Biological Function of Ellagic Acid: A Review. *Journal of Food Biochemistry* **29**, 266 (2005).
13. Seeram, N.P., *et al.* In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other

- polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* **16**, 360-367 (2005).
14. Mandal, S., Shivapurkar, N.M., Galati, A.J. & Stoner, G.D. Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine metabolism and DNA binding in cultured rat esophagus by ellagic acid. *Carcinogenesis* **9**, 1313-1316 (1988).
  15. Teel, R.W., Babcock, M.S., Dixit, R. & Stoner, G.D. Ellagic acid toxicity and interaction with benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol in human bronchial epithelial cells. *Cell Biol Toxicol* **2**, 53-62 (1986).
  16. Yu, Y.M., Chang, W.C., Wu, C.H. & Chiang, S.Y. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *J Nutr Biochem* **16**, 675-681 (2005).
  17. Kim, S., *et al.* Development of chitosan-ellagic acid films as a local drug delivery system to induce apoptotic death of human melanoma cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **90**, 145-155 (2009).
  18. Mertens-Talcott, S.U. & Percival, S.S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* **218**, 141-151 (2005).
  19. Fjaeraa, C. & Nanberg, E. Effect of ellagic acid on proliferation, cell adhesion and apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomed Pharmacother* **63**, 254-261 (2009).
  20. Edderkaoui, M., *et al.* Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* **14**, 3672-3680 (2008).
  21. 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).
  22. Gonzalez-Sarrias, A., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. & Garcia-Conesa, M.T. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol Nutr Food Res* **53**, 686-698 (2009).
  23. Labrecque, L., *et al.* Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcinogenesis* **26**, 821-826 (2005).
  24. Levine, B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* **446**,

- 745-747 (2007).
25. Bratton, S.B. & Cohen, G.M. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* **22**, 306-315 (2001).
  26. Ferri, K.F. & Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**, E255-263 (2001).
  27. Jacobson, M.D., *et al.* Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* **361**, 365-369 (1993).
  28. Susin, S.A., *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446 (1999).
  29. LA, O.R., *et al.* Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* **461**, 659-663 (2009).
  30. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
  31. Kumar, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**, 32-43 (2007).
  32. Galluzzi, L., *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* **14**, 1237-1243 (2007).
  33. Pan, M.H. & Ho, C.T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem Soc Rev* **37**, 2558-2574 (2008).
  34. Kakizuka, A. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends Genet* **14**, 396-402 (1998).
  35. Harding, H.P., Zhang, Y. & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274 (1999).
  36. Gething, M.J. & Sambrook, J. Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45 (1992).
  37. Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**, 451-454 (2000).
  38. Oyadomari, S., *et al.* Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* **109**, 525-532 (2002).
  39. Nakagawa, T., *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103 (2000).
  40. Scorrano, L., *et al.* BAX and BAK regulation of endoplasmic

- reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135-139 (2003).
41. Iwawaki, T., *et al.* Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol* **3**, 158-164 (2001).
  42. Nishitoh, H., *et al.* ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**, 1345-1355 (2002).
  43. Kadowaki, H., Nishitoh, H. & Ichijo, H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *J Chem Neuroanat* **28**, 93-100 (2004).
  44. Wu, R.S. & Bonner, W.M. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* **27**, 321-330 (1981).
  45. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63 (1983).
  46. Lin, S.Y., *et al.* Sodium ascorbate inhibits growth via the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human malignant melanoma A375.S2 cells. *Melanoma Res* **16**, 509-519 (2006).
  47. Liao, W., McNutt, M.A. & Zhu, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* **48**, 46-53 (2009).
  48. Ji, B.C., *et al.* Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *J Agric Food Chem* **57**, 7596-7604 (2009).
  49. Olson, M.V. Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology. *J Chromatogr* **470**, 377-383 (1989).
  50. Cardoni, R.L., Rottenberg, M.E. & Segura, E.L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Immunol* **128**, 11-21 (1990).
  51. Tan, T.W., *et al.* Curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells via MMP changes and caspase-3 activation. *Anticancer Res* **26**, 4361-4371 (2006).
  52. Lu, H.F., *et al.* The role of Ca<sup>2+</sup> in (-)-menthol-induced human

- promyelocytic leukemia HL-60 cell death. *In Vivo* **20**, 69-75 (2006).
53. Wada, A., *et al.* Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **44**, 142-150 (2006).
  54. Hsia, T.C., *et al.* The roles of endoplasmic reticulum stress and Ca<sup>2+</sup> on rhein-induced apoptosis in A-549 human lung cancer cells. *Anticancer Res* **29**, 309-318 (2009).
  55. Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**, 167-190 (2000).
  56. Wingo, S.T., *et al.* Quantitative reverse transcription-PCR measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of healthy subjects. *Clin Chem* **45**, 785-789 (1999).
  57. Collins, J.A., Schandi, C.A., Young, K.K., Vesely, J. & Willingham, M.C. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* **45**, 923-934 (1997).
  58. Robertson, J.D., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* **129**, 346-358 (2000).
  59. Cui, Q., *et al.* P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3- independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* **28**, 1057-1066 (2007).
  60. Hill, R., Bodzak, E., Blough, M.D. & Lee, P.W. p53 Binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle* **7**, 2535-2543 (2008).
  61. Narayanan, B.A., Geoffroy, O., Willingham, M.C., Re, G.G. & Nixon, D.W. p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Lett* **136**, 215-221 (1999).
  62. Armstrong, J.S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* **28**, 253-260 (2006).
  63. Odinkova, I.V., *et al.* Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria. *Gut* **58**, 431-442 (2009).
  64. Hill, M.M., Adrain, C. & Martin, S.J. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* **3**, 19-26 (2003).
  65. Ravagnan, L., Roumier, T. & Kroemer, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* **192**, 131-137 (2002).

66. Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219 (2004).
67. Wilson, N.S., Dixit, V. & Ashkenazi, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* **10**, 348-355 (2009).
68. Falsaperla, M., Morgia, G., Tartarone, A., Ardito, R. & Romano, G. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. *Eur Urol* **47**, 449-454; discussion 454-445 (2005).

