

中國醫藥大學  
生物科技學系碩士班  
碩士學位論文

白英粗抽物誘發人類骨肉瘤細胞 U-2 OS  
細胞生長抑制及細胞凋亡之機制

The Mechanism of *Solanum Lyratum*  
Extracts-Induced Growth Inhibition and  
Apoptotic Cell Death in Human  
Osteosarcoma U-2 OS Cells

指導教授：鍾景光 教授

共同指導教授：黃雯雯 助理教授

研究生：林怡廷

中華民國九十九年六月

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：白英粗抽物誘發人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞生長抑制及細胞凋亡之機制

英文：*The Mechanism of Solanum Lyratum Extracts-Induced Growth Inhibition and Apoptotic Cell Death in Human Osteosarcoma U-2 OS Cells*

本論文係林怡廷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

鍾學光

林仁斌

王朝精

黃雯雯

楊永欣

系主任：

鍾學光

中華民國 九十九年五月二十五日

## 誌謝

首先特別感謝我的口試委員：台灣大學醫學院 林仁混教授、中山醫學大學生化暨生物科技研究所 王朝鐘教授、中國醫藥大學生物科技學系 鍾景光教授、黃雯雯助理教授、醫學系藥理學科 楊家欣助理教授，因為老師們的指導與建議，讓怡廷的論文內容更加的完整與豐富。

時間過得非常的快，一下子又到了說再見的時候。而今不僅僅是要說聲再見，更要說出我對老師們的感謝。謝謝我的指導教授鍾景光老師，一開始願意接受我這個完全沒碰過分生實驗的學生，在我生平第一次要上台全英文口頭報告時老師耐心的指導我鼓勵我，讓我非常感激。我也從老師身上學習到一位真正的學者，對學生教學的態度與熱誠，並不會因學生資質優劣而改變；也要感謝黃雯雯老師以及楊家欣老師提供許多儀器讓我們使用，使我們在實驗上順利許多，並且也給我很多實驗上的建議與方向；另外還有實驗室博士班鈞隆學長、啟誠學長、若華學姊，謝謝你們有無比的耐心與無私，把實驗上的經驗傳授給我們，並且在我遇到難題時，總是肯花時間和我一起討論，提供我很多想法；碩士班同學郡誌、詩慧、學弟妹節文、于絜，我們的關係就好比戰友，無論實驗或生活上互相幫忙扶持，開心難過都可以一起分享，能遇見你們讓我覺得自己很幸運！

大學部學弟妹：烏龜、小豬、小瑜、詠庭、183、小瑛、白雲、

小蛋、芳于等，實驗室有你們熱鬧了許多，上天不會虧待認真的小孩，所以希望你們未來也要好好加油，都能實踐自己的理想與方向！

在這短短的兩年，我學會了如何去當一個研究生，也對人生有了新的體悟。兩年下來，有努力，有收穫；有淚水，有歡笑。而淚水會乾，挫折也會過去。重要的是我們在其中得到寶貴的經驗。這所有一切最要感謝我親愛的家人對我念研究所全力的支持，以及男友對我的體諒與陪伴，還有好友們在我心情不好時願意聽我吐苦水。因為有你們，我更加有勇氣與毅力認真的完成學業！願把這份喜悅分享給大家~

祝

健康、平安

林怡廷 謹致於

中國醫藥大學生命科學院 生物科技學系碩士班

*June, 2010*

# 總目錄

總目錄	I
表目錄	VI
圖目錄	VII
縮寫表	X
中文摘要	XI
英文摘要	XII
第一章 前言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 白英之文獻回顧	3
第二節 細胞凋亡 ( Apoptosis )	5
一、 內在路徑 (Intrinsic pathway)	6
二、 外在路徑 (Extrinsic pathway)	9
三、 內質網壓力 (ER stress)	10
第三節 細胞週期 (Cell cycle)	12
一、 Cyclins 與細胞週期相關調控因子	13
二、 p53	13
第四節 癌細胞轉移 (Metastasis)	15
第三章 研究目的與實驗設計	17
第一節 實驗目的	17
第二節 實驗設計	17
第四章 材料與方法	18
第一節 實驗材料	18

一、 藥物來源與製備 -----	18
二、 細胞株來源 -----	18
三、 藥品試劑 -----	18
四、 儀器設備、器材 -----	21
第二節 實驗方法 -----	22
一、 配置藥物 -----	22
二、 人類骨肉瘤細胞株 U-2 OS 培養 -----	22
1. 細胞株培養條件 -----	22
2. 細胞繼代與分盤 -----	22
3. 細胞冷凍保存 -----	23
4. 冷凍細胞活化 -----	23
三、 細胞存活率 ( Viability) 分析 -----	25
四、 細胞週期 ( Cell cycle) 分析 -----	27
五、 細胞核質濃縮現象觀察 -----	29
1. DAPI ( 4-6-diamidine-2-phenylindole ) 螢光染色 -----	29
2. DNA 彗星拖尾試驗 ( Comet assay) -----	30
六、 早期細胞凋亡測定 -----	33
七、 粒線體膜電位 ( Mitochondria membrane potential; $\Delta\Psi_m$ ) 之檢測-----	34
八、 細胞內活性氧化物質 ( Reactive oxygen species, ROS ) 之檢測 -----	35
九、 細胞內一氧化氮 ( Nitric oxide, NO ) 含量之檢測 -----	36
十、 細胞內鈣離子 ( $Ca^{2+}$ ) 釋出的變化 -----	37
十一、 粒線體膜氧化程度測定 -----	39

十二、Caspase-8, -9 活性分析 -----	40
十三、西方墨點法 ( Western Blotting ) -----	41
十四、基質金屬蛋白酶 ( Matrix metalloproteinases, MMPs )	
活性測定 -----	48
十五、細胞傷口癒合試驗 ( Wound Healing assay) -----	49
十六、免疫螢光染色 (Immunofluorescence Staining) -----	50
十七、統計分析 (Statistics analysis) -----	50
第五章 研究結果 -----	51
第一節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞	
(U-2 OS cells) 形態之影響 -----	51
第二節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞	
U-2 OS 存活率之影響 -----	54
第三節 探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞	
U-2 OS 細胞週期之影響 -----	56
第四節 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞	
U-2 OS 細胞週期 (Cell cycle) 相關蛋白之影響 -----	58
第五節 觀察白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞	
U-2 OS DNA 傷害之情形 -----	59
1. 以彗星試驗 (Comet assay) 觀察 DNA 拖尾程度 -----	59
2. 利用 DAPI 染色法觀察細胞染色質濃縮情形	
(chromatin condensation) -----	61
第六節 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS	
誘導凋亡之影響 -----	63
第七節 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS	

鈣離子釋放之影響 -----	65
第八節 探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 的細胞凋亡內質網壓力路徑 (Endoplasmic reticulum stress dependent apoptotic pathway) 相關蛋白之表現 -----	67
第九節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 產生活性氧物質 (ROS) 能力之影響 -----	69
第十節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞抗氧化相關蛋白之影響 -----	71
第十一節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 產生一氧化氮(Nitric oxide, NO) 能力 之影響 -----	72
第十二節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 粒線體之影響 -----	74
第十三節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 粒線體膜氧化之影響 -----	76
第十四節 探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞凋亡粒線體路徑 (Mitochondria- dependent apoptotic pathway) 相關蛋白之影響 -----	78
第十五節 利用流式細胞儀探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對 人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 之 Caspase-8. -9 活性 之影響 -----	80
第十六節 利用免疫螢光染色法探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞蛋白轉位	



(translocation)表現 -----	83
第十七節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞轉移(Migration)的影響 -----	86
第十八節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS MMP-2 及 MMP-9 之影響 -----	88
第六章 結果討論 -----	89
第七章 實驗結論 -----	95
第八章 參考文獻 -----	98



## 表目錄

表 2-2-1	細胞凋亡 (Apoptosis) 與細胞壞死 (Necrosis) -----	5
表 2-2-2	Bcl-2 家族 -----	7
表 4-3-1	1 X Phosphate Buffer Saline (PBS) 之配製 -----	26
表 4-4-1	Cell cycle PI 染劑配製 -----	28
表 4-5-1	Lysis buffer 配製 -----	31
表 4-5-2	Alkaline buffer 配製 -----	31
表 4-5-3	Tris buffer 配製 -----	32
表 4-13-1	BSA 標準曲線之配製 -----	42
表 4-13-2	SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel)之配製及組成 -----	45
表 4-13-3	SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel)之配製及組成 -----	45
表 4-13-4	1.5 M Tris-HCl 配製 -----	46
表 4-13-5	0.5 M Tris-HCl 配製 -----	46
表 4-13-6	電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer) 之組成 -----	46
表 4-13-7	轉印緩衝液 (Transfer buffer) 之組成 -----	47
表 4-13-8	PBS-tween 20 (PBST) 之組成 -----	47

## 圖目錄

圖 2-1 白英果實、花、葉之型態 -----	3
圖 2-2 白英與細胞凋亡相關之功能 -----	4
圖 2-3 經由粒線體所造成的細胞死亡途徑-----	8
圖 2-4 細胞凋亡外在與內在路徑 -----	9
圖 2-5 鈣離子與 cytochrome <i>c</i> 在細胞凋亡中，扮演了胞器內訊息 傳遞者的角色-----	11
圖 2-6 細胞週期路徑和相關蛋白調控圖 -----	14
圖 2-7 MMPs 在腫瘤環境的多種功能 -----	16
圖 3-1 本研究實驗流程圖 -----	17
圖 5-1 不同濃度之 SLE 處理 U-2 OS 細胞 24、48 小時之型態變化 -----	53
圖 5-2 不同濃度之 SLE 處理 U-2 OS 細胞 12、24 小時之存活率 -----	55
圖 5-3 不同濃度之 SLE 處理 U-2 OS 細胞 0、12、24、48 小時細胞 週期停滯之情形 -----	57
圖 5-4 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U2 OS 細胞，檢測 G0/G1 期之細胞週期停滯相關蛋白之表現變化 -----	58
圖 5-5 不同濃度之 SLE 處理 U-2 OS 細胞 24 小時，以單細胞凝膠 電泳觀察 DNA 受損情形 -----	60
圖 5-6 不同濃度之 SLE 處理 U-2 OS 細胞 24 小時，以 DAPI 染色 法觀察 DNA 受損與染色質濃縮的現象 -----	62
圖 5-7 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，早期細胞 凋亡之情形 -----	64

圖 5-8 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測細胞 內鈣離子濃度變化 -----	66
圖 5-9 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測 ER stress 相關蛋白之表現量變化 -----	68
圖 5-10 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測細胞 內 ROS 產生之影響 -----	70
圖 5-11 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測抗氧 化相關蛋白之表現量變化 -----	71
圖 5-12 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測細胞內 NO 產生之影響 -----	73
圖 5-13 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測細胞 內粒線體膜電位之變化-----	75
圖 5-14 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測粒線 體膜氧化程度 -----	77
圖 5-15 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測粒線 體路徑相關蛋白之表現量變化 -----	79
圖 5-16 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測細胞 內 caspase-8 活性的變化 -----	81
圖 5-17 以 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，檢測細胞 內 caspase-9 活性的變化 -----	82
圖 5-18 利用共軛焦顯微鏡觀察 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞，AIF 螢光強度變化及進入細胞核之表現 -----	83

圖 5-19	利用共軛焦顯微鏡觀察 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞, Endo G 螢光強度變化及進入細胞核之表現	----- 84
圖 5-20	利用共軛焦顯微鏡觀察 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 處理不同時間點之 U-2 OS 細胞, GADD153 螢光強度變化及進入細胞核之表現	- 85
圖 5-21	U-2 OS 細胞經 12.5 及 25 $\mu\text{g/ml}$ SLE 誘導後, 以 Wound Healing assay 觀察細胞移動之能力	-----87
圖 5-22	U-2 OS 細胞經 25 及 50 $\mu\text{g/ml}$ SLE 誘導後, 以 gelatin zymography 檢測 MMP-9 與 MMP-2 的活性	----- 88
圖 5-23	白英乙醇粗抽物 (SLE) 誘導人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞凋亡之路徑圖	----- 97



## 縮寫表

AIF	Apoptosis-inducing factor
APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
Caspase	Cysteine dependent aspartate cleaving protease
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
Endo G	Endonuclease G
FBS	Fetal bovine serum
LG	L-Glutamine
LMA	Low melting agarose
MMP	Mitochondria membrane potential
MMPs	Matrix metalloproteinases
NMA	Normal melting agarose
NO	Nitric oxide
PBS	Phosphate buffer saline
PI	Propidium iodide
ROS	Reactive oxygen species
SLE	<i>Solanum lyratum</i> ethanol extraction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superoxide dismutase
TBE	Tris-borate-EDTA

## 中文摘要

*Solanum Lyratum* Thunb (白英)，為中國傳統中藥之一，在臨床治療上曾用於治療黃疸、腹瀉、水腫，也被當作治療肝癌、肺炎、食道癌的抗癌藥物。雖然白英具有抗腫瘤之效果，但尚未有研究指出白英對於人類骨癌的抗癌相關機轉。因此，本研究主要為探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 針對人類惡性骨肉瘤 U-2 OS 細胞，誘導細胞走向凋亡之分子機制。

本實驗中，U-2 OS 細胞處理不同濃度之白英乙醇粗抽物 (SLE)，並培養不同時間，以流式細胞儀來檢測細胞的存活率；另觀察細胞週期之分佈，以及細胞凋亡相關的分子層面之檢測，包含利用 Annexin V 偵測初期的細胞凋亡、活性氧族群 (ROS)、一氧化氮 (NO)、粒線體膜電位變化 (MMP,  $\Delta\Psi_m$ )、鈣離子釋放及等。並以 DAPI 染色法及 Comet assay 來觀察 DNA 受損情形，另利用 Western Blot 觀察蛋白質表現。

實驗結果顯示，當人類惡性骨肉瘤 U-2 OS 細胞經由白英乙醇粗抽物 (SLE) 處理後，細胞存活率會隨著藥物濃度增加而下降，細胞週期停滯於 G0/G1 期，型態上可觀察到細胞皺縮，由 Comet assay 和 DAPI staining 也可發現有 DNA 受損之情形，鈣離子及一氧化氮 (NO) 在短時間內釋放，粒線體膜電位下降，Annexin V 凋亡細胞增加，caspase-8, -9 被活化；而凋亡相關蛋白 Bax 及 caspase-3 的活化也證明 SLE 確實可誘導 U-2 OS 細胞凋亡。根據實驗結果得知，白英乙醇粗抽物 (SLE) 是經由多重路徑，使 U-2 OS 細胞生長抑制及誘導細胞凋亡。

## 英文摘要

*Solanum Lyratum* Thunb, which is one kind of Chinese herb medicine, not only used in clinical therapy including jaundice, diarrhea, edema, but also used as an anticancer drug to treat liver cancers, lung cancers, esophagus cancers and so on. Yet, there has been no report as to whether *Solanum lyratum* Thumb could induce the apoptosis of bone cancer. In this study, we investigated to examine whether or not *Solanum Lyratum* ethanol extraction (SLE) induced apoptosis in human osteosarcoma U-2 OS cells.

In this study, we investigated the SLE from ethanol extraction whether or not cause human osteosarcoma cells U-2 OS growth inhibition and induce apoptosis. After treated with SLE in various dosages and time interval, we observed the cell morphology and use flow cytometry to examine cell proliferation. Then also use flow cytometry to detect cell cycle distribution, Annexin V and intracellular change of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ), calcium ion release, free radical generation including reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) as well as caspase-8, -9 activity. DNA damage was determined by DAPI staining and Comet assay, the protein expression measured by Western Blot. Our results indicated that SLE induce cell death, DNA damage in dose-dependent manner, and cell cycle arrest in G0/G1 phase. Calcium ion release and NO generation, MMP decrease, apoptotic cells increase by Annexin V and caspase-8, -9 activate, and apoptosis associate protein expression including Bcl-2-associated X protein (Bax) and caspase-3 activations to confirm the SLE cause U-2 OS cells apoptosis. Overall, we suggest the SLE through multiple mechanisms to inhibit the growth and induce apoptosis of the U-2 OS cells.



## 第一章 前言

根據行政院衛生署公布之 97 年全國十大死因，統計資料顯示，惡性腫瘤迄今已蟬聯 27 年十大死因之首<sup>1</sup>。世界衛生組織 ( World health organization, WHO ) 的統計也顯示，惡性腫瘤可能發生在各個年齡層，並占全球死亡率 13%，因此抗癌藥物的篩選及癌症的預防，成為相當重要的課題。

其中「骨癌」為一種由骨骼系統長出的惡性腫瘤，分為原發性及轉移性骨癌兩大類。原發性骨癌，包括惡性骨肉瘤 ( Osteosarcoma )、依汶氏肉瘤 ( Ewing's sarcoma )、軟骨肉瘤 ( Chondrosarcoma )、纖維肉瘤 ( Fibrosarcoma )、巨大細胞瘤 ( Giant cell tumor ) 等等。通常都是出現在未成年的年輕人或小孩身上，好發年齡約 10~19 歲左右，因骨骼在發育當中，骨細胞在不斷分化、成長的過程中，若遇到致癌因子，就可能產生出癌細胞。轉移性及多發性骨癌則常見於 45 歲以上，各種癌症都有可能轉移到骨頭，比較常見的有肺癌、攝護腺癌、肝癌、乳癌<sup>2-3</sup>。

骨癌的原因目前仍不清楚，但是由它的原發部位和多發生於青春期的年紀，則顯示跟成骨細胞的活性增加可能有關。遺傳因素在骨癌似乎也扮演重要的角色，患有視網膜母細胞瘤的患者，得到骨癌的機會是正常人的五百倍。經常在癌症初期，病患本身並不易察覺，直到癌細胞轉移到骨頭，出現明顯的症狀後，檢查之下才知癌細胞已經擴散<sup>4</sup>。

目前對於骨癌的治療方法，主要是以外科切除，依據腫瘤部位開刀截除患肢，以免癌細胞侵犯鄰近組織而復發。或是以新式輔助化學治療，方

法為在手術前先使用約 2 個月的化學治療，之後進行原發性腫瘤部位廣泛切除，並以人造義肢取代。由於醫學的進步，骨癌經治療後的五年存活率已由過去的 15~20% 提高到 60~70%<sup>5-6</sup>。

中草藥在中國已有幾千年歷史，這些先人們常用來治療疾病的天然植物，其療效經科學證實後，由於成分天然、安全性佳，已開發出許多受矚目的藥物及保健品，例如紫杉醇、銀杏等。在臨床治療上也有許多癌症病人除了化學療法外，另以傳統中草藥作為輔助療法，以期降低化療之副作用。許多研究指出中草藥材將是未來藥物的重要來源，若經實驗證實能達到有效的抗癌作用，則是研究癌症治療藥物的重要發展之一。

應用抗癌藥物干擾癌細胞生長、代謝、增殖等過程，最後引發癌細胞自殺，誘導細胞凋亡，此方法已成為治療癌症的新途徑之一<sup>7</sup>。因此，本研究利用中草藥白英之乙醇粗抽物作為主要的研究材料，初步檢測其對於人類骨癌細胞生長的抑制情形，以及誘導細胞凋亡的機轉，作為未來白英治療癌症之參考。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 白英之文獻回顧

「白英」為一種常見的茄科植物，學名為 *Solanum lyratum* Thunb. 別名有：白毛藤、毛葫蘆藤、排風子、蜀羊泉、鬼目草、望冬紅、柳仔癩、和尚頭草等<sup>8</sup>。白英之名最早出現於《神農本草經》<sup>9</sup>。李時珍形容其外型為：「此俗名排風子是也。正月生苗，白色，可食。秋開小白花，子如龍葵子，熟時紫赤色。」；《綱目拾遺》：「莖、葉皆有白毛，八、九月開花藕合色，結子生青熟紅，鳥雀喜食之。」<sup>10</sup>。



圖 2-1 白英果實、花、葉之型態

白英在台灣之分布為全台低海拔地區，常於矮林內、曠野、路旁可見。根據諸家所言，白英屬於味甘性寒之藥用植物。在《本經》中，也將白英列為上品藥，可全草入藥<sup>11</sup>。地上部份應於春夏採收，日曬乾，煮汁飲。功能為清熱利濕、祛風止痛、益氣止渴。主治頭風頭痛、耳膿、血淋腹痛、瘡癤黃疸<sup>12-15</sup>。

根據先前研究得知白英之藥理作用有很多，其中包括抗過敏作用：口服白英水萃物，對於 passive cutaneous anaphylaxis 有抑制作用；另外也可抑制 histamine 的釋放<sup>16</sup>。而在抗腫瘤方面，實驗結果顯示，白英水萃物對人類血癌細胞 HL-60 有抑制生長之作用<sup>17</sup>；而乙酸乙酯萃取物則是可

以誘導人類肝癌細胞 Bel-7404 凋亡<sup>18</sup>；並且能夠使人類大腸腺癌細胞 colo 205 藉由活性氧物質增加及 DNA 受損，進而影響對抗凋亡及促進凋亡的蛋白質，使粒線體膜電位下降，而活化 caspase-3，最終導致 colo 205 細胞凋亡。以白英複方注射液，對人類胃癌細胞 BGC-823 和人類乳腺癌細胞 MCF-7 均有較強的毒殺作用，並使 BGC-823 的細胞週期停滯於 G1 期。

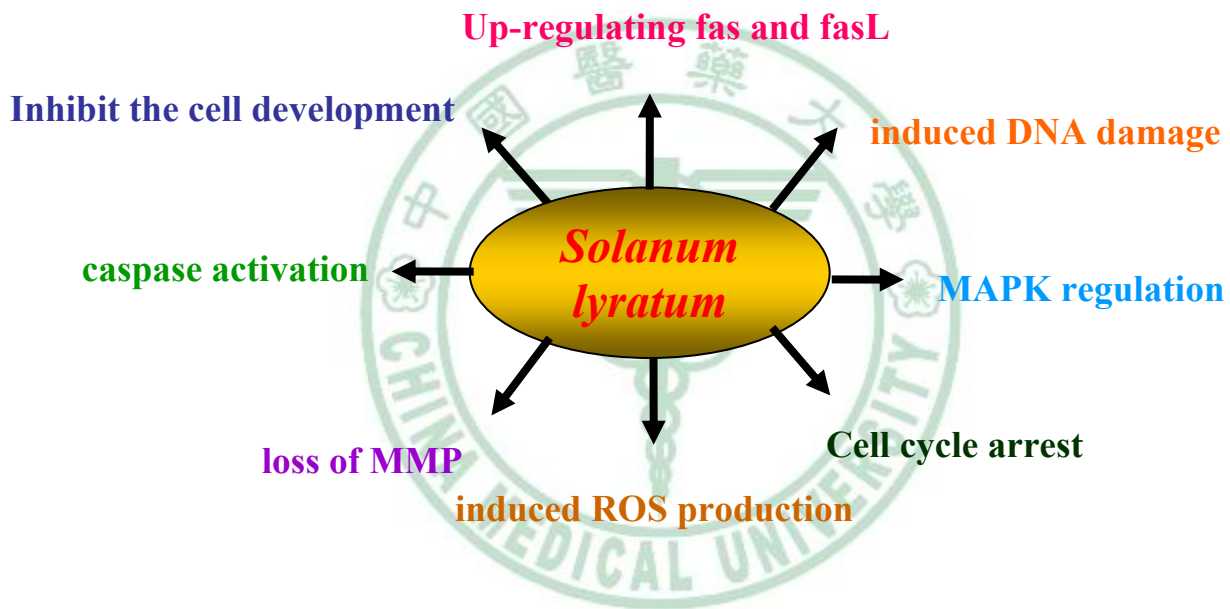


圖 2-2 白英與細胞凋亡相關之功能<sup>19-23</sup>

## 第二節 細胞凋亡 ( Apoptosis )

細胞的死亡主要有三種方式：細胞凋亡 ( Apoptosis )、細胞自噬 ( Autophagy )，以及細胞壞死 ( Necrosis )。其中細胞凋亡一詞來自於希臘語，有墜落、死亡之意。它是在生物演化中保存下來的一種細胞程序性死亡 ( Programmed cell death, PCD ) 的基本調節機制，在個體的生長 ( growth ) 和分化 ( differentiation ) 過程中，一旦細胞形成碎裂的凋亡小體或細胞片段馬上被附近正常細胞或吞噬細胞吃掉，例如：人體胚胎發育中，胚胎長到第五週時，手指和腳趾之間的蹼，會因為細胞進行凋亡而消失。因此細胞凋亡有助於維持生物體內恆定 ( homeostasis ) 的功用<sup>24-26</sup>。細胞凋亡與細胞壞死的病理特徵為下表<sup>27</sup>：

表 2-2-1 細胞凋亡 ( Apoptosis ) 與細胞壞死 ( Necrosis ) 辨別

	細胞凋亡 ( APOPTOSIS )	細胞壞死 ( NECROSIS )
死亡模式	單一細胞	一群相鄰細胞
細胞大小	皺縮	腫脹
細胞膜	發泡但保持完整性 磷脂 phosphatidylserine 外翻	完整性喪失
粒線體	通透性增加 Cytochrome c、AIF 釋放至細胞質	脹大
胞器外型	收縮，形成凋亡小體	瓦解
核仁	染色質聚集凝縮	核膜瓦解
DNA 降解	細胞溶解前 DNA fragmentation	細胞溶解後 DNA fragmentation
細胞降解	胞吞作用，無發炎反應	有發炎反應產生，巨噬細胞侵入

引起細胞凋亡的途徑主要分為外在路徑 ( Extrinsic pathway )、內在路徑 ( Intrinsic pathway ) 以及內質網壓力 ( Endoplasmic reticulum stress, ER stress )<sup>28-29</sup>。

### 一、內在路徑 (Intrinsic pathway)<sup>30</sup>

內在路徑依據是否有 caspases (cysteinyll aspartate-specific proteases) 的參與，分為 caspase-dependent pathway 及 caspase-independent pathway<sup>31</sup>；前者引起的細胞凋亡為 DNA 小片段斷裂(約 180-200 bp)，而後者引起的細胞凋亡為 DNA 大片段斷裂(約 300 bp)。Caspase 為細胞凋亡過程中非常重要的媒介，普遍以未活化狀態 (inactive form) 存在於細胞質，必須藉由其他蛋白酶(proteases)、其他 caspases 或自行水解成活化態(active form)，隨後才得以進行細胞凋亡的工作<sup>32</sup>。其中 caspase-dependent pathway 內在路徑藉由一群在粒線體膜上與細胞質之間的蛋白調控；當細胞受到細胞外或細胞內的壓力及傷害時，像是：放射性輻射、缺氧、藥物、DNA damage 等，會使粒線體膜電位下降。而此路徑中最重要的是 Bcl-2 家族<sup>33</sup>，如下列表 2-2-2:

分類	蛋白質	功能
促進凋亡蛋白質 (Pro-apoptotic proteins)	Bad、Bax、Bak、Bid、Bik、Bim、Blk、Bok、Bcl-Xs、Bcl-GL、Bcl-Gs、Bmf、Hrk、Noxa、MAP-1、PUMA	受到凋亡刺激時會轉移至粒線體，進而引起膜電位下降，Cytochrome <i>c</i> 從粒線體釋放，而使下游 caspase-9 活化，接著活化 caspase-3，引起凋亡 <sup>34</sup> 。
抑制凋亡蛋白質 (Anti-apoptotic proteins)	Bcl- $X_L$ 、Bcl-2、Bcl-w、Mcl-1	當細胞受到凋亡刺激時，可維持粒線體膜的完整性，避免 Cytochrome <i>c</i> 釋放至細胞質。

其中 Bcl-2 位於粒線體膜的外層，調控細胞的存活，另外會促使 Cytochrome *c* 從粒線體的 intermembrane space 釋放到細胞質中，與 Apaf-1 和 Caspase-9 結合刺激形成 apoptosome，之後 ATP 進而活化 Caspase-9 的複合物，Caspase-9 也促使下游的 caspase 活化，最後誘導走向細胞凋亡。

另外，caspase-independent pathway 指粒線體的通道發生改變，會從粒線體膜間腔釋出 Apoptosis inducing factor (AIF) 及 Endonuclease G (Endo G)。AIF 經細胞質最後到細胞核，誘導染色質濃縮；Endo G 被活化後會進行轉位 (translocation)，由粒線體膜間腔進入細胞核，執行 nuclease 的功能將 DNA 分解<sup>35</sup>。

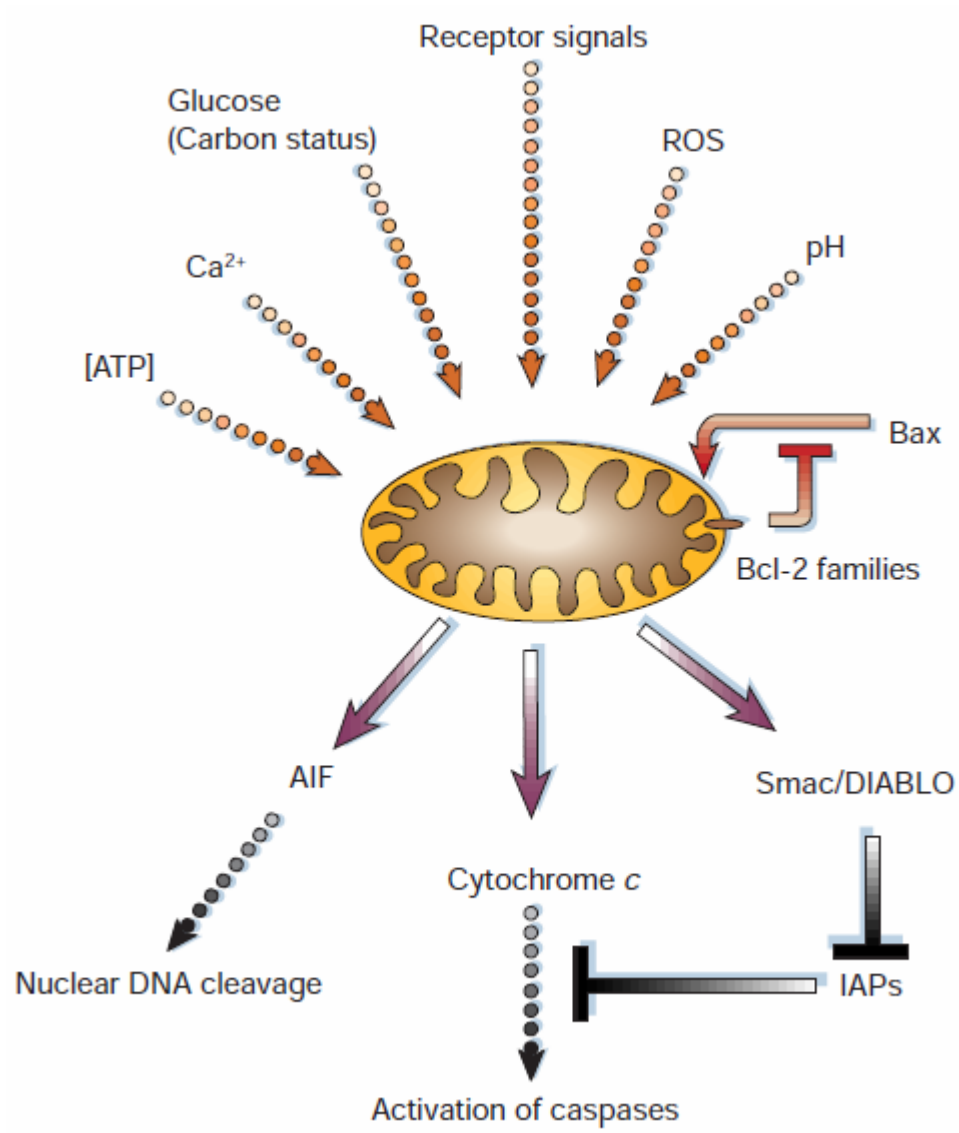


圖 2-3 經由粒線體所造成的細胞死亡途徑<sup>36</sup>





### 三、內質網壓力<sup>39</sup>

內質網最主要的功能為幫助蛋白質摺疊成穩定的結構和分泌蛋白質。而有研究指出，腫瘤組織內部往往缺乏氧氣和養分，導致細胞的內質網聚集大量折疊錯誤的蛋白質或鈣離子通透失衡，會產生所謂的內質網壓力 (ER stress)。細胞為因應此壓力而改變許多訊息傳遞和基因表現的現象，即稱為未折疊蛋白質反應 unfolded protein response (UPR)。參與UPR的相關蛋白包括：inositol requiring enzyme 1 (IRE-1)、activating transcription factor-6 (ATF-6) 和 PKR-like ER kinase (PERK)<sup>40</sup>。當ER stress時，ATF-6 可當作一個轉錄因子(transcription factor)，使伴隨蛋白(chaperone) GRP78-HSP70、GRP94-HSP90的表現量上升，幫助不完全蛋白的折疊。IRE-1 和 PERK可藉由自我磷酸化，形成同質複體 (homodimer) 而活化，其中PERK可再藉由磷酸化eIF-2 $\alpha$ ，減緩轉譯作用，使新蛋白質無法合成；而IRE-1不但可調控伴隨蛋白的表現，亦可使未折疊蛋白降解移除<sup>41</sup>。這些與UPR相關的蛋白質可以在許多惡性腫瘤檢體中被偵測到，並且種類與含量跟其惡性程度、腫瘤轉移和抗藥性有關，因此可用於臨床檢測與治療上。目前此臨床應用分為兩種策略，一是阻斷那些能幫助癌細胞存活的UPR，另一種策略則是引發過度的內質網壓力讓癌細胞無法承受而凋亡。例如，使鈣離子由內質網內釋放至細胞質中，進而使粒線體釋放 Cytochrome *c*，開啟細胞凋亡途徑。

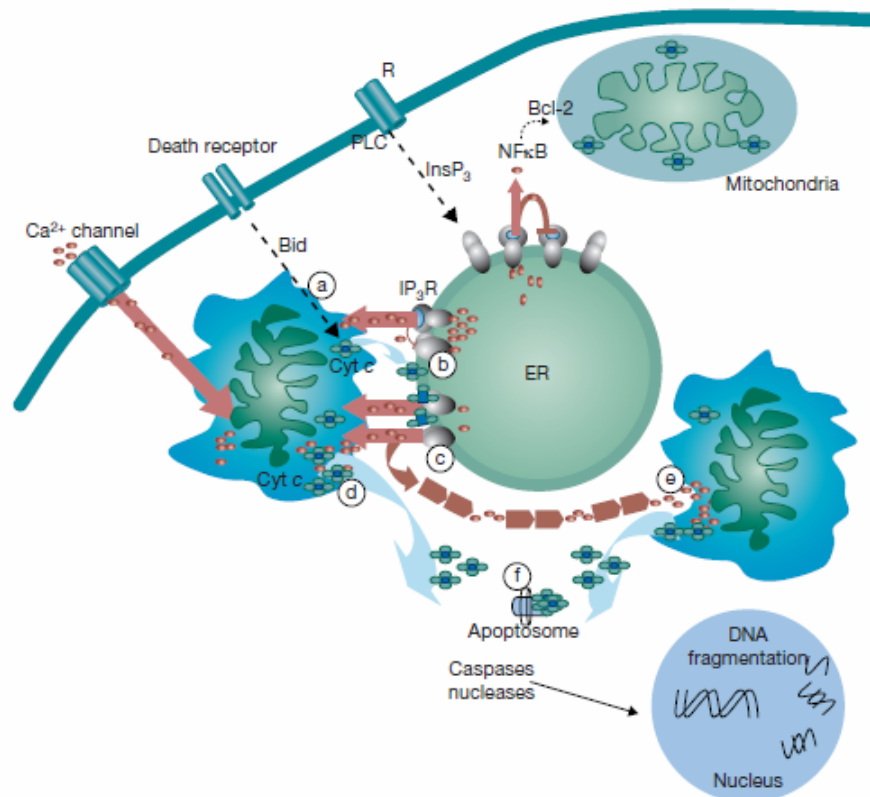


圖 2-5 鈣離子與 cytochrome *c* 在細胞凋亡中，扮演了胞器內訊息傳遞者的角色<sup>42</sup>。(a) 死亡刺激 (鈣離子在粒線體內累積或與 Bid 蛋白一起結合到粒線體膜上) 誘導鄰近粒線體膜的通透性改變，使 cytochrome *c* 從粒線體釋放。(b) 接著 cytochrome *c* 擴散至附近的內質網 (ER)，並且結合到 InsP3 接受體上，(c) 此時鈣離子從內質網大量釋放，(d) 造成細胞質內鈣離子濃度增加，(e) 粒線體攝入鈣離子刺激 cytochrome *c* 釋放。(f) cytochrome *c* 釋放至細胞質與 Apaf-1 及未活化的 caspase-9 構成凋亡小體 (apoptosome)，進而活化 caspase-9。最後 caspases 和 nucleases 藉由裂解不同的蛋白和 DNA 來完成整個細胞死亡的過程。鈣離子從內質網釋放可當作細胞凋亡的訊號，同時它也可以活化細胞存活途徑的相關蛋白，像是轉錄因子 NF- $\kappa$ B 以及穩定粒線體膜之蛋白 Bcl-2。

### 第三節 細胞週期 (Cell cycle)

細胞週期，是指能持續分裂的真核細胞從一次有絲分裂結束後生長，再到下一次分裂結束的循環過程。細胞週期的長短反映了細胞所處狀態，這是一個細胞分裂的循環過程。癌變的細胞常常有異常的分裂週期。完整的細胞週期可分為間期 Interphase (G0、G1、S、G2 phase) 及細胞分裂期 Mitosis (M) phase<sup>43</sup>。

1. G0 期：細胞處於暫時休眠或者是永久性休眠，需要有適當的訊息，使細胞進入細胞週期或分化 G1 期，為進入細胞週期的前期。
2. G1 期：細胞開始正常代謝並且生長，並產生 RNA 及蛋白質，此時的染色體數目是 2N。G1 進入 S 期為第一個 checkpoint。
3. S 期：進行 DNA 合成及將原本的二十三對染色體複製另一份。此染色體數目 2N~4N 之間。
4. G2 期：DNA 複製到有絲分裂的期間，染色體從 2N 變 4N。細胞持續生長並且合成蛋白質。G2 進入 M 期為第二個 checkpoint。
5. M 期：細胞週期最短的一期，細胞停止生長及合成蛋白質。由一個母細胞變成兩個子細胞，複製完成的染色體會各自分配到子細胞內，使子細胞內的染色體與母細胞相同。

## 一、Cyclins 與細胞週期相關調控因子<sup>44</sup>

真核細胞的細胞週期之所以能正常的進行，是經由一系列特殊的 Cyclin-CDK complex 來調控。當 DNA damage、分化和老化時，會促使 Cdk 的抑制者有向負向調控細胞週期，而造成抑制細胞增生。目前已發現之 Cdk 包含 Cdk1 (Cdc2)、Cdk2、Cdk3、Cdk4、Cdk5、Cdk6 與 Cdk7。而細胞週期數包含了 Cyclin A、B、C、D、E、F 及 H 等。細胞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 時期，CDK4、6 會和 Cyclin D 結合；而 CDK2 也會與 Cyclin D 結合，但主要還是在 G<sub>1</sub> 期及 G<sub>1</sub>-S 過渡期與 Cyclin A、E 結合<sup>45</sup>。

## 二、p53<sup>46</sup>

p53 在細胞中扮演的角色在於避免細胞癌化的功能，在正常細胞中是不活化的，它會與 MDM2 結合並被分解。但當細胞的遺傳物質遭受如 UV 或某些會破壞 DNA 的致癌物質所影響後就會被活化。上述的 DNA 異常狀況會在 cell cycle 中的 check point 被偵測出來，並且會造成某些蛋白質如：ATM, Chk1 和 Chk2 對 p53 進行磷酸化。一旦 p53 被活化後使 p21 開始轉錄，使 p21 蛋白表現量增加。p21 是 p53 的下游因子，可抑制 Cyclin-Cdk4 使細胞週期停滯在 G<sub>1</sub>/S 期，以修復受損的 DNA，但若當受損太嚴重時則會引起細胞凋亡 (Apoptosis) 或自噬 (Autophagy) 的機制，讓細胞走向死亡避免將受損的 DNA 繼續遺傳下去<sup>47</sup>。另外某些致癌基因的作用如：Ras, Myc 等則會透過 p14ARF 抑制 MDM2 與 p53 的作用，進而激發 p53 的功能。綜觀以上所述，若 p53 受損，細胞將會失去此修復 DNA 異常的功能而可能導致癌症的發生。

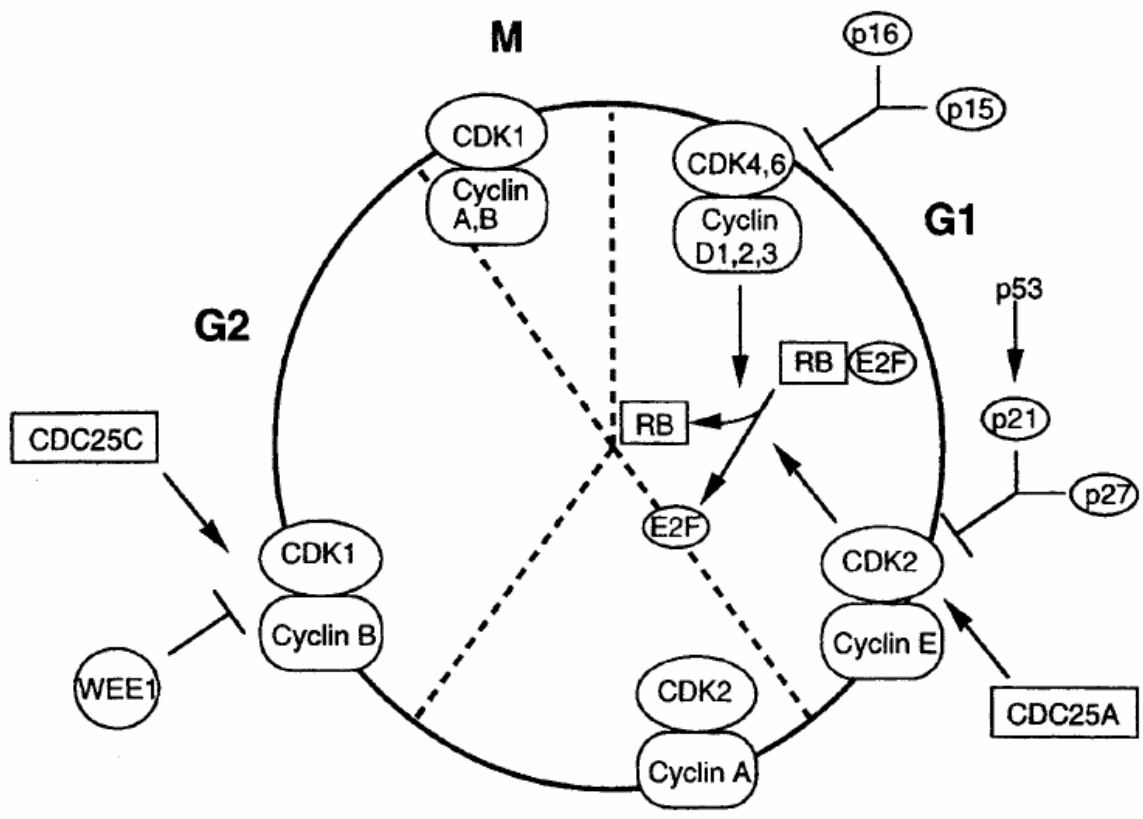


圖 2-6 細胞週期路徑和相關蛋白調控圖<sup>48-50</sup>

#### 第四節 癌細胞轉移 (Metastasis)

當細胞受到自我分泌 (autocrine) 或副分泌 (paracrine) 生長因素刺激時，原位 (primary site) 癌細胞會離開原本存在的地方，進入血管或淋巴管中，破壞細胞外基質的基底膜，透血液循環、淋巴循環送達器官周邊的微血管、淋巴球等聚積成血栓塊，之後穿過內皮細胞及基底膜進入新的組織中，並在新的組織內繼續增殖，形成新的癌化區，這樣癌細胞的轉移的步驟稱為轉移癌 (metastatic cancer)。癌細胞轉移時，需要基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs) 來分解細胞外間質(Extracellular matrix, ECM)，而 MMPs 可分為膜型金屬蛋白酶類(MT-MMP)、金屬彈性蛋白酶 (Metalloelastase)、明膠酶 (Gelatinase)等，每種不同 MMP 負責分解不同的 ECM<sup>51</sup>。MMPs 在正常細胞的細胞外基質的降解或是受到外在影響造成組織改變、組織潰爛還有癌細胞侵入、轉移、血管新生的過程都會分泌 MMPs<sup>52</sup>。尤其在癌細胞在生長時會大量釋放 MMPs，因此有一些研究證實當 MMPs 過量表現時，可能對於血管的新生、癌細胞侵入所產生的不良預後都有相關。目前 MMPs 已發現有超過二十種，當中 MMP-2、MMP-9 最常見，特別在皮膚癌、乳癌、子宮頸癌最常見，而且這兩個金屬酶跟腫瘤的轉移及侵入有關<sup>53</sup>。

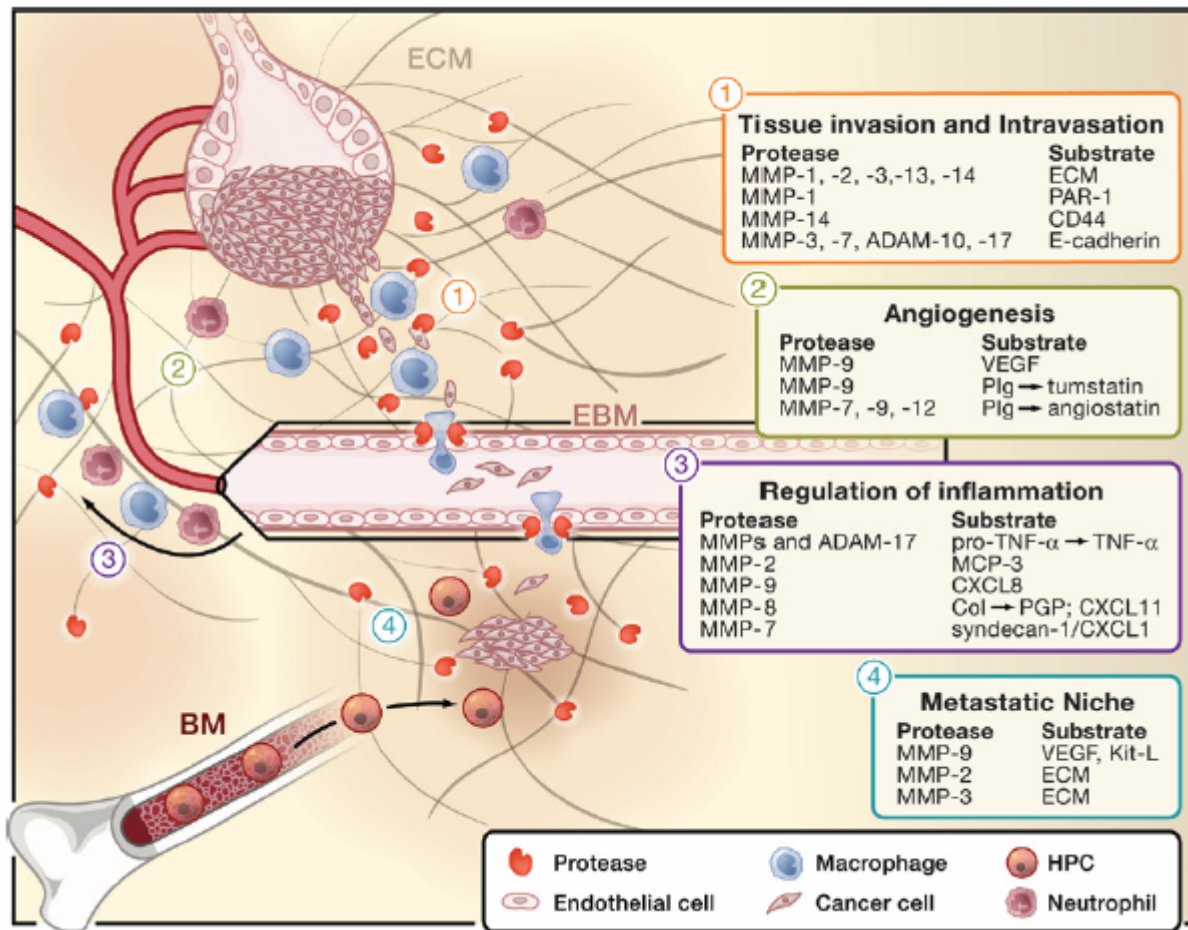


圖 2-7 MMPs 在腫瘤環境的多種功能<sup>54</sup>



### 第三章 研究目的與實驗設計

#### 第一節 實驗目的

白英 *Solanum lyratum* Thunb. 以前在臨床上大多用來抗發炎、治療眼病、腹瀉、清熱解毒，近十年來有越來越多學者使用白英的萃取物來進行抗癌的 *in vitro* 和 *in vivo* 實驗，也發現白英對許多癌細胞株都有毒殺的作用，但目前還沒有針對人類骨癌做過相關的研究，因此本實驗的目的為，利用人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞經由白英乙醇粗抽物誘導後，觀察其生長抑制的情形及細胞凋亡機制的探討。

#### 第二節 實驗設計

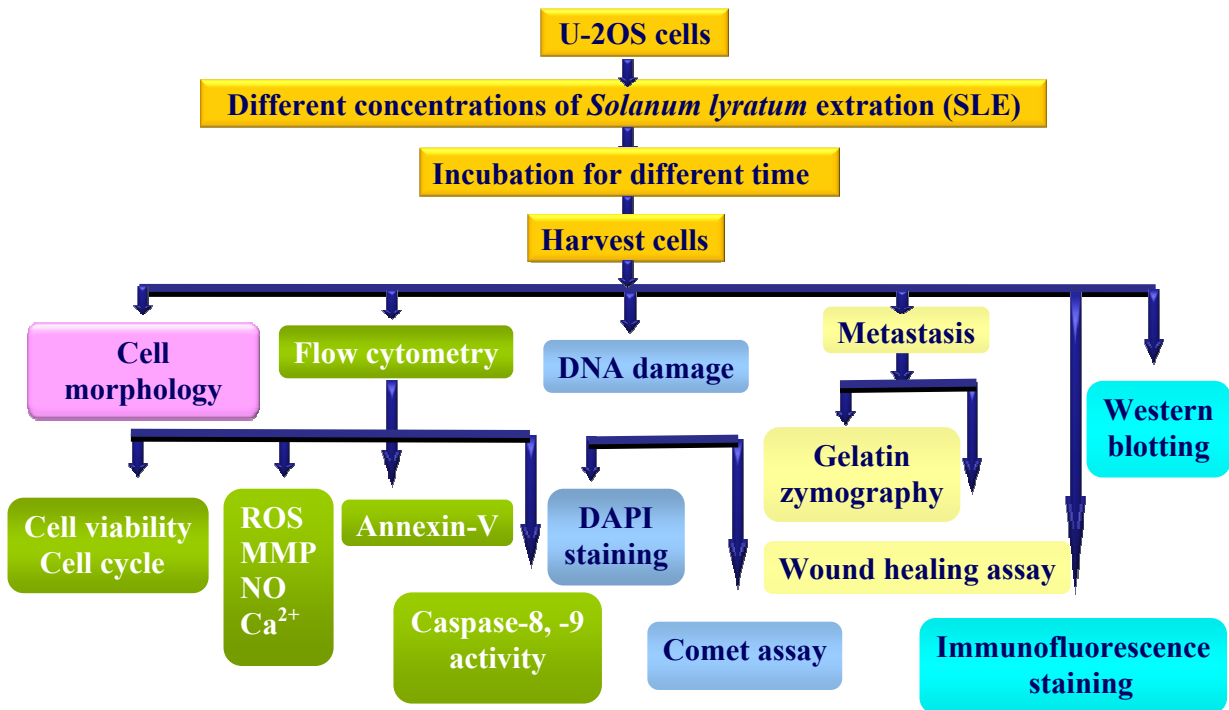


圖 3-1 本研究實驗流程圖

## 第四章 材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 一、藥物來源與製備

本實驗所以用之白英採集於南投縣杉林溪，取地上部份 200 克以 50% ethanol，加熱抽取 60 分鐘，過濾收集濾液，重複抽取一次，合併濾液，60 °C 濃縮成流浸膏，40 °C 充分烘乾，得浸膏片 18.980 克，研粉後備用，生藥和粗抽物比值為 9.54 : 1。

#### 二、細胞株來源

本實驗使用之細胞株 U-2 OS 為人類骨肉瘤細胞細胞株 ( Human bone osteosarcoma cells )，由新竹食品工業研究所 ( Food Industry Research and Development Institute ) 購得。

#### 三、藥品試劑

1. 10X TG-SDS buffer：購自 Amresco
2. 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))：購自 calbiochem
3. 5X TBE buffer：購自 Amresco
4. Acrylamide/Bis 40% (ACRYL/BISTM 29:1)：購自 Amresco
5. Agarose I：購自 MD 生工有限公司
6. Ammonium persulfate (APS)：購自 Amresco
7. Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit：購自 BD
8. BAPTA：購自 Molecular Probes, Invitrogen

9. BioMax Film : 購自 Kodak
10. Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Merck
11. DAF-FM : 購自 Invitrogen
12. Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 購自 Sigma chemical Co.
13. Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) : 購自 Merck
14. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amersham
15. Ethanol : 購自 TEDIA
16. Fetal bovine serum (FBS) : 購自 Hyclone
17. Fluo-3/AM : 購自 Invitrogen
18. Formaldehyde : 購自 Sigma chemical Co.
19. Glycine : 購自 Amresco
20. L-Glutamine (LG) : 購自 Gibco
21. Low melting agarose (LMA) : 購自 USB
22. McCoy's 5A Medium modified : 購自 Gibco
23. Methanol : 購自 TEDIA
24. N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) : 購自 Amresco
25. Normal melting agarose (NMA) : 購自 USB
26. Penicillin-Streptomycin (PS) : 購自 Gibco
27. PhiPhiLux<sup>®</sup> kit : 購自 OncoImmulin (Gaithersburg, MD, USA)
28. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
29. Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : 購自 Merck
30. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma chemical Co.
31. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
32. Protein extraction solution (PRO-PREP) : 購自 iNtRON Biotechnology,

Inc.

33. Protein marker : 購自 Fermentas
34. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amresco
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、定影劑 : 購自 Kodak
43. Primary antibody (1° 抗體) :
  - (1) Anti-b actin : 購自 Sigma chemical Co.
  - (2) Anti-AIF : 購自 BD
  - (3) Anti-Bax : 購自 Upstate
  - (4) Anti-caspase 3 : 購自 Sigma chemical Co.
  - (5) Anti-caspase 8 : 購自 BD
  - (6) Anti-caspase 9 : 購自 Upstate
  - (7) Anti-catalase : 購自 calbiochem
  - (8) Anti-cdk4 : 購自 Upstate
  - (9) Anti-cdk6 : 購自 Upstate
  - (10) Anti-Cyclin D : 購自 Upstate
  - (11) Anti-Cyclin E : 購自 Upstate
  - (12) Anti-cytochrome *c* : 購自 calbiochem

- (13) Anti-Fas：購自 Upstate
- (14) Anti-Fas ligand：購自 Upstate
- (15) Anti-p21：購自 Upstate

44. Secondary antibody (2° 抗體)：

- (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

#### 四、儀器設備、器材

- 1. 無菌操作台、細胞培養皿、細胞培養盤、細胞培養箱、倒立式顯微鏡、冷凍管、血球計數板、溫控離心機、1.5/15/50 ml 離心管、Pipetment、Dispensor、Pipet-Aid。
- 2. 去離子水製造機、酸鹼值測定計、加熱板、震盪器、電源供應器、SDS-PAGE 電泳槽套組、PVDF membrane、Transfer Cell Blot 套組。
- 3. 流式細胞計數儀、高速離心機、酵素免疫分析儀、DNA 電泳槽、單細胞電泳槽、乾浴槽。

## 第二節 實驗方法

### 一、配置藥物（白英乙醇粗抽物；*Solanum Lyratum* ethanol extraction (SLE)）

白英粗抽物粉末以 50% 酒精為溶劑配置濃度為 40 mg/ml 的庫存液 (stock solution)，分裝於 1.5 ml 離心管並保存於 -20 °C 以供之後實驗使用。待實驗時再利用 DMSO 將 stock solution 稀釋成實驗所需之加藥濃度。因考慮到 DMSO 濃度在 1% 時對細胞較無傷害，因此最終濃度則是加藥濃度的 0.01 倍。

### 二、人類骨肉瘤細胞株 U-2 OS 培養

#### 1. 細胞株培養條件

人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 使用的培養基為 McCoy's 5A Medium modified，額外添加使培養基最終含有 10% fetal bovine serum、1% penicillin-Streptomycin、2 mM L-glutamine。細胞培養於 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 環境的細胞培養箱中，約兩天更換一次培養基，觀察細胞生長至八分滿時，即可進行繼代培養或分盤供實驗使用。

#### 2. 細胞繼代與分盤

待細胞生長至八分滿時，於無菌操作台內，將培養瓶內的培養基抽出丟棄，以 PBS 清洗細胞，加入 0.1% Trypsin-EDTA 以打斷細胞鍵結，於細胞培養箱中反應約 3 分鐘後，輕拍培養瓶使原本貼附細胞均能懸浮，接

著加入新鮮培養基中和 Trypsin-EDTA 的作用，再將所有瓶中液體集中吸至 50 ml 離心管中，離心 5 分鐘，離心後將上清液丟棄，加入新鮮培養基並利用電動吸量管反覆抽吸使之均勻混合，培養瓶中加入 10 ml 培養基並回種細胞懸浮液進行繼代；若需要分盤則取細胞懸浮液加入 Trypan blue (0.4% w/v trypan blue) 溶液，混合均勻後以血球計數板計算細胞數目，活細胞因細胞膜完整而不被染色，死細胞則會被 trypan blue 染成藍色。計算完細胞數目後，依實驗所需的細胞數目，從細胞懸浮液中取出足夠的細胞量來進行分盤以供實驗使用。

### 3. 細胞冷凍保存

細胞大量培養後可進行冷凍保存於液態氮桶中，供日後實驗備用。在冷凍保存前，須先確認細胞的狀態為生長良好且存活率高，才能避免影響實驗結果。在冷凍細胞前先配置好冷凍保存液，應選擇試劑等級的 DMSO 作為冷凍保護劑，DMSO 加入 FBS 中混合均勻，使最終濃度為 5%。將細胞用 Trypsin 懸浮後，取少量細胞懸浮液以血球計數板計算細胞濃度，離心後丟棄上清液並加入配置好的冷凍保存液，將細胞調整為  $2-5 \times 10^6$  cells/ml，分裝到冷凍小管中並標示清楚細胞名稱、冷凍日期。

冷凍順序為：4 °C，30 分鐘 ➡ -20 °C，60 分鐘 ➡ -80 °C，overnight  
➡ 液態氮桶長期保存。

### 4. 冷凍細胞活化

冷凍細胞活化的原則為快速解凍，避免冰晶重新結晶對細胞造成傷害，影響到存活率。從液態氮桶取出冷凍小管，迅速至 37 °C 水浴槽回溫，確認冰晶完全溶解後，吸取至離心管中，並以新鮮培養基稀釋冷凍保存液

中 DMSO 的濃度，準備新 T75 flask 先加入 10 ml 培養基，再將細胞液注入培養。剛活化的細胞比較脆弱，因此解凍隔天應更換新鮮培養基，並且應培養約一週，待細胞生長狀態恢復正常後再進行實驗。





### 三、細胞存活率 ( Viability) 分析<sup>55</sup>

#### (1) 實驗原理：

利用 Propidium Iodide (PI) 染劑檢測癌細胞經過實驗藥物處理後，癌細胞存活率的變化。PI 染劑是一種核酸染劑，會與 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，經 488 nm 雷射光機發後，產生散射光波長的螢光，由流式細胞儀的偵測器接收，最後以 Cell Quest® 軟體分析。PI 染劑會藉由細胞膜構造的改变、細胞膜通透性的改变、細胞膜結構的破損進而進入細胞並與 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，使其細胞具有較高的螢光強度。反之若細胞膜具有完整的結構及正常的通透性，PI 則無法順利通過細胞膜與 DNA 結合，所以此細胞則會產生較弱的螢光。藉此細胞特性及染色原理，本實驗可區分經 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。

#### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，每個 well 加入不同濃度之白英乙醇粗抽物 (SLE) 處理，分別培養 12、24、48 小時後，先用顯微鏡觀察細胞存活情形，接著收取細胞。首先，將培養盤中的上清液吸取至 15 ml 離心管中，以 Phosphate Buffer Saline (PBS) 清洗培養盤中的細胞，清洗後的液體也吸至離心管中，再加入 0.1% Trypsin 於培養盤中，其量覆蓋過細胞表面即可，37°C 靜置三分鐘後經拍培養盤使其貼附的細胞懸浮，以培養基中和 Trypsin 作用，再將其細胞懸浮液吸至離心管，以 1500 rpm 離心五分鐘，經 PBS 清洗細胞後，再次去除上清液，在避光環

境下加入 PI 染劑 1 ml (染劑加入的量可依細胞數多寡做調整)，使其均勻混合後，轉至 FACS 中，最後以流式細胞儀進行分析，固定其細胞數及流速，觀察並記錄細胞存活之百分比 (%)。

(3) PI 染劑之配製：

先配製濃度為 20 mg PI/100 ml PBS 作為 PI Stock，於實驗需要時再利用 PBS 將 PI Stock 稀釋 50 倍，最後以 0.4 mg PI/100 ml PBS 作為實驗使用濃度。

表 4-3-1 1 X Phosphate Buffer Saline (PBS) 之配製：

組成	體積 (ml)
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g

最後以 DDW (distilled, deionized water；蒸餾，去離子水) 定量至 1000 ml。

#### 四、細胞週期 (Cell cycle) 分析<sup>56</sup>

##### (1) 實驗原理：

利用 Propidium iodide (PI) 可與核酸鍵結專一結合之特性，另以酒精固定以增加細胞膜通透性，利於 PI 進入細胞內與核酸進行鍵結，則可利用流式細胞儀 (Flow cytometry; FACS) 偵測 PI 產生的螢光，進而能夠分析細胞內 DNA 狀態以及細胞週期分布情形。

##### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，並加入不同濃度之白英乙醇粗抽物 (SLE)，培養 24 小時後，先用顯微鏡觀察細胞情形，再將 well 中培養基抽至離心管，以 1X PBS 清洗細胞，細胞再以 Trypsin 處理，置於 37 °C 細胞培養箱中反應 3 分鐘後，加入培養基中和 Trypsin 作用，將所有液體裝到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，離心後將上清液丟棄，以 1X PBS 清洗細胞，再次以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞完全打散後，離心管置於震盪器上以慢速震盪，4 °C 的 70% 乙醇一滴一滴緩慢滴入，進行細胞固定，固定完的細胞放置 -20 °C 冰箱 overnight。隔天將樣品取出，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除乙醇後，打散細胞並加入 1X PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心 5 分鐘後，倒掉上清液，每管分別加入 500  $\mu$ l 之 PI 染劑，室溫避光 30 分鐘，最後以流式細胞儀進行分析，每秒細胞數不超過 300 顆細胞，數據以 Modifit LT<sup>®</sup> 軟體進行處理分析。

表 4-4-1 Cell cycle PI 染劑配製

組成	體積 (ml)
20 mg/ 100 ml PBS CAT PI stock	1 ml
5% Triton X-100	10 ml
RNase (10 mg/ml in PBS)	2 ml
1 X PBS	將體積補至 50 ml



## 五、細胞核質濃縮現象觀察<sup>57</sup>

### DAPI ( 4-6-diamidine-2-phenylindole ) 螢光染色

#### (1) 實驗原理：

DAPI ( 4-6-diamidine-2-phenylindole ) 是一種能快速進入細胞內與 DNA minor groove 上 AT 區強力結合的螢光染劑，常用於細胞凋亡的檢測，因細胞凋亡時會有 DNA 斷裂 ( DNA fragmentation ) 及染色體濃縮 ( chromosomes condensation ) 的特徵出現，故可利用顯微鏡來觀察，若細胞凋亡越嚴重，DNA 斷裂也越嚴重，minor groove 暴露出來之 AT 區也就越多，則可結合上更多 DAPI 染劑，所觀察到的白色亮點螢光強度就會越強。

#### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $5 \times 10^4$  cells/well 接種於 6 well plate 中，培養 24 小時待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，加入不同濃度( 12.5、25、50、75、100  $\mu\text{g/ml}$  ) 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 處理，作用 24 小時後，去除 well 中培養基，用 1X PBS 清洗細胞，再以 4 °C 之 3% Formaldehyde/ in PBS 固定，以 1X PBS 清洗，加入 1 ml 之 0.1% Triton X-100/ in PBS ( 蓋過細胞即可) 反應 15 分鐘後，以 1X PBS 清洗，加入 DAPI 染劑避光反應約 30 分鐘，以 1X PBS 洗去多餘染劑，最後以螢光顯微鏡 200X 物鏡拍照。

## DNA 彗星拖尾試驗 (Comet assay)<sup>58</sup>

### (1) 實驗原理：

單細胞電泳分析 (Single cell gel electrophoresis assay) 即是所謂的彗星試驗，可用來分析及定量 DNA damage 的程度，是一個簡單、快速以及敏感性高的技術。利用 DNA damage 後發生斷裂，並藉由電泳的原理將斷裂的 DNA 拖出膜外，之後加以染色，DNA 受損越嚴重，斷裂也就越多，拖尾越明顯；又因其外觀似彗星狀而命名之，由此可藉由拖尾的長短，觀察 DNA 的損傷程度。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，並加入不同濃度之白英乙醇粗抽物 (SLE)，培養 24 小時後，以 Trypsin 將細胞收至 15 ml 離心管中，1500 rpm 離心五分鐘，去上清液，加入 1X PBS 約 1 ml，將細胞 transfer 至 1.5 ml eppendorf，經高速離心後去上清液，打散 pellet 加入 1X PBS 100  $\mu$ l (體積依細胞數多寡調整)，放置冰上備用。接著配製上層膠 (0.5% LMA) 與下層膠 (0.5% LMA+ 0.5% NMA)，以微波溶解並置於 55°C 水浴鍋保溫。將 70  $\mu$ l 的下層膠加在載玻片上，以蓋玻片以 45° 角慢慢蓋上以防氣泡產生，待膠凝固後去除蓋玻片，再以 10  $\mu$ l 的細胞懸浮液與 60  $\mu$ l 的上層膠混合均勻後，加在下層膠之上，蓋玻片再以 45° 角慢慢蓋上，待膠凝固後去除蓋玻片，此時將玻片浸入以配製好的 lysis buffer 中，反應 1 小時後，將玻片移至 alkaline buffer 中反應 20 分鐘。將

電泳槽置於冰上，以 alkaline buffer 為電泳緩衝液，進行電泳 30 分鐘 (25 V； 300 mA)。電泳結束後，將玻片移至 0.4 M Tris buffer 作用 5 分鐘，使其 pH 值回到中性，再以甲醇脫水 5 分鐘，避免水分干擾染劑作用，最後加入 40  $\mu$ l PI，以螢光顯微鏡進行觀察。

(3) 試劑配製：

表 4-5-1 A. Lysis buffer (需新鮮配製，pH=8~10)：可破壞細胞膜結構，以方便後續 DNA 電泳。

組成	體積 (ml)
5 M NaCl	100 ml
1 M Tris	2 ml
0.5 M EDTA	40 ml
Triton X-100	2 ml
DDW	56 ml
Total	200 ml

表 4-5-2 B. alkaline buffer (pH=13)：可將 DNA 雙股螺旋解開成單股 DNA，當電泳時，即可區分出不同片段大小的 DNA。

組成	重量 (g)
NaOH	12 g
EDTA	0.3724 g
DDW	將體積定量至 1000 ml

表 4-5-3 C. Tris buffer (0.4 M，以 HCl 調整 pH=7.5)：使 sample 恢復  
中性

組成	重量 (g)
Tris	48.456 g
DDW	將體積定量至 1000 ml





## 六、早期細胞凋亡測定<sup>59</sup>

### (1) 實驗原理：

細胞凋亡早期會在細胞膜表面發生改變，其中之一為帶負電的磷脂絲氨酸（phospholipid phosphatidylserine；PS）會從細胞膜內轉而暴露到細胞膜外，而 Annexin V 是一種  $\text{Ca}^{2+}$  依賴的磷脂結合蛋白，它對 PS 有高度的親合性，但 PS 外翻也可能發生於壞死細胞上，因此利用 Annexin V 搭配 Propidium iodide (PI) 染劑，使用流式細胞儀即可區分出凋亡細胞與壞死細胞。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，培養 24 小時待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，每個 well 加入 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之白英乙醇粗抽物（SLE）處理，分別培養 3、6、12、24 小時後，以 trypsin 收集細胞，以 PBS 清洗細胞，加入 100  $\mu\text{l}$  PBS 轉至 FACS 管中，分別加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 與 5  $\mu\text{l}$  PI，震盪均勻後置於室溫避光反應，再加入 400  $\mu\text{l}$  1X binding buffer 終止反應，最後以流式細胞儀收集 10000 顆細胞分析螢光量，再以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析。

## 七、粒線體膜電位 ( Mitochondria membrane potential; $\Delta\psi_m$ ) 之檢測<sup>60</sup>

### (1) 實驗原理：

Rhodamine 123 也稱為 2-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl) benzoic acid methyl ester，可以快速通過細胞膜，特異性的染在活細胞的粒線體上的螢光染劑，即活細胞結合上的螢光量較強，反之死細胞結合上的螢光量較弱，其螢光強度的改變可反映出細胞膜電位(mitochondrial membrane potential) 改變的情形。粒線體膜功能不良 ( mitochondrial dysfunction ) 通常伴隨早期細胞凋亡發生，而細胞粒線體膜電位的改變也因此當作早期凋亡偵測上的指標。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新培養基，每個 well 加入 25  $\mu\text{g/ml}$  之白英乙醇粗抽物 (SLE) 處理，分別培養 1、3、6、24、48 小時後，先用顯微鏡觀察細胞情形，再將 well 中培養基抽至離心管，以 1X PBS 清洗細胞一次，細胞再以 trypsin 處理，置於 37 °C 細胞培養箱中反應 3 分鐘後，加入培養基中和 trypsin 作用，將所有液體裝到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，離心後將上清液丟棄，以 1X PBS 清洗細胞，再次以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞完全打散後，每管分別加入 500  $\mu\text{l}$  之 Rhodamine 123 染劑 (需另準備一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 1ml PBS)，37 °C 水浴並避光，30 分鐘後取出樣本並 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀收集 10000 顆細胞分析螢光量，最後以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析數據。

## 八、細胞內活性氧化物質 ( Reactive oxygen species, ROS ) 之檢測<sup>61</sup>

### (1) 實驗原理：

利用 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ( H<sub>2</sub>DCF-DA ) 本身不具螢光的特性來偵測細胞內 ROS 的產生。H<sub>2</sub>DCF-DA 是一種脂溶性染劑，可以通過細胞膜並特異性的追蹤評估 ROS 產生的多寡，H<sub>2</sub>DCF-DA 進入細胞後，被細胞內乙醯脂酶 ( esterases ) 去乙醯化 ( deacetylated ) 成非螢光性的 DCFH，DCFH 在細胞內被 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化成螢光物質的 DCF，並聚集在粒線體中，比較發散出的螢光強度，即可反應出細胞內 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的濃度變化。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新培養基，每個 well 加入 25  $\mu$ g/ml 之白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 處理，分別培養 1、3、6、12、24 小時後，先用顯微鏡觀察細胞情形，再將 well 中培養基抽至離心管，以 1X PBS 清洗細胞一次，細胞再以 trypsin 處理，置於 37 °C 細胞培養箱中反應 3 分鐘後，加入培養基中和 trypsin 作用，將所有液體裝到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，離心後將上清液丟棄，以 1X PBS 清洗細胞，再次以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞完全打散後，每管分別加入 500  $\mu$ l 之 H<sub>2</sub>DCF-DA 染劑 (需另準備一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 1ml PBS)，37 °C 水浴並避光 30 分鐘，30 分鐘後取出樣本並 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀收集 10000 顆細胞分析螢光量，最後以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析數據。

## 九、細胞內一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 含量之檢測<sup>62</sup>

### (1) 實驗原理：

DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate) 會被細胞內的乙醯脂酶 (esterases) 去乙醯化 (deacetylated) 成非螢光性的 DAF-FM 進入細胞內，此時螢光強度十分微弱。當細胞內表現 Nitric oxide 時，會使 DAF-FM 變為帶有螢光性的 Benzotriazole derivative，藉由 495 nm 激發偵測散射光 515 nm 可知細胞內 Nitric oxide 表現的變化。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新培養基，每個 well 加入 25  $\mu$ g/ml 之白英乙醇粗抽物 (SLE) 處理，分別培養 1、3、6、12、24 小時後，先用顯微鏡觀察細胞情形，再將 well 中培養基抽至離心管，以 1X PBS 清洗細胞一次，細胞再以 trypsin 處理，置於 37 °C 細胞培養箱中反應 3 分鐘後，加入培養基中和 trypsin 作用，將所有液體裝到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，離心後將上清液丟棄，以 1X PBS 清洗細胞，再次以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞完全打散後，每管分別加入 500  $\mu$ l 之 DAF-FM 染劑 (需另準備一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 1ml PBS)，37 °C 水浴並避光 60 分鐘，60 分鐘後取出樣本並 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀收集 10000 顆細胞分析螢光量，最後以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析數據。

## 十、細胞內鈣離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 釋出的變化<sup>63</sup>

### (1) 實驗原理：

細胞內鈣離子可作為細胞信號傳遞的分子，是細胞激活過程中重要的功能因子。若將鈣離子螢光染劑 Fluo-3/AM 通過乙醯甲酯 (Acetatoxymethyl Ester; AE) 導入細胞後，Fluo-3/AM 會與鈣離子特異性結合。這螢光染劑的結構式，一般與 EDTA 相似，可螯合鈣離子，染劑會有光學特性上的改變，在 UV (紫外線) 的激發下，Fluo-3/AM 放射光 (emission) 的強度會隨著細胞內鈣離子濃度的改變，而散發出不同強度的螢光，故可用比例法測得或直接測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值，實際濃度需經校對後獲得。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新培養基，每個 well 加入 25  $\mu\text{g/ml}$  之白英乙醇粗抽物 (SLE) 處理，分別培養 1、3、6、12、24 小時後，先用顯微鏡觀察細胞情形，再將 well 中培養基抽至離心管，以 1X PBS 清洗細胞，細胞再以 trypsin 處理，置於 37 °C 細胞培養箱中反應 3 分鐘後，加入培養基中和 trypsin 作用，將所有液體裝到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，離心後將上清液丟棄，以 1X PBS 清洗細胞，再次以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞完全打散後，每管分別加入 800  $\mu\text{l}$  之 Fluo-3/AM 染劑 (需另準備一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 1ml PBS)，37 °C 水浴並避光 30 分鐘，每 15 分鐘上下均勻混合，30 分鐘後將樣本取出，並以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 PBS 清洗細胞

並離心後，每管樣本加入 500  $\mu$ l PBS，再 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀收集 10000 顆細胞分析螢光量，最後以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析數據。



## 十一、粒線體膜氧化程度測定<sup>64</sup>

### (1) 實驗原理：

(bisphosphatidyl glycerol) 為一類存在於粒線體內膜的脂質，在正常情況下能與 nonyl acridine orange (NAO) 結合。NAO 能在 489 nm 的波長下受到激發，產生在波長 525 nm 可測得的螢光。藉此，當粒線體內膜受到氧化傷害時，Cardiolipin 與 NAO 結合能力會變差，所產生的螢光量會降低，因此藉由螢光量的改變，即可觀察粒線體膜氧化的程度。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，每個 well 加入 25  $\mu$ g/ml 之白英乙醇粗抽物 (SLE) 處理，分別培養 1、3、6、24、48 小時後，先用顯微鏡觀察細胞情形，再將 well 中培養基抽至離心管，以 1X PBS 清洗細胞一次，細胞再以 trypsin 處理，置於 37 °C 細胞培養箱中反應 3 分鐘後，加入培養基中和 trypsin 作用，將所有液體裝到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，離心後將上清液丟棄，以 1X PBS 清洗細胞，再次以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞完全打散後，每管分別加入 500  $\mu$ l 之 NAO 染劑 (需另準備一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 1ml PBS)，37 °C 水浴並避光 30 分鐘，30 分鐘後將樣本取出，並以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 PBS 清洗細胞並離心 2 次後，每管樣本加入 500  $\mu$ l PBS，再 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀收集 10000 顆細胞分析螢光量，最後以 CellQuest<sup>®</sup> 軟體分析數據。

## 十二、Caspase-8, -9 活性分析<sup>59</sup>

### (1) 實驗原理：

利用 Caspase-8 substrate (PhiphiLux-L<sub>1</sub>D<sub>2</sub>)、Caspase-9 substrate (PhiphiLux-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub>) 來檢測凋亡細胞相關蛋白 caspase-8, -9 之產生，PhiphiLux kit 基質是種含有螢光物質胺基酸序列 ( amino acid sequence )，而活化之 caspase-8, -9 可以裂解胺基酸序列之特定位置，使得含有螢光物質釋放出來，再經由流式細胞儀 ( Flow Cytometry ) FL-1 detector 偵測後，CellQuest<sup>®</sup> 分析、統計後可得知若螢光產量越多則產生 caspase-8, -9 活性亦越多。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well 接種於 12 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，每個 well 加入 25  $\mu$ g/ml 之白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 處理後，培養 6、12、24、48 小時，收細胞，取 10  $\mu$ M substrate (for caspase-8, -9)，每管加入 25  $\mu$ l，之後置於 37  $^{\circ}$ C 水浴並避光 60 分鐘，60 分鐘後將樣本取出，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 PBS 清洗細胞並離心後，每管樣本加入 500  $\mu$ l Flow Cytometer Buffer，再 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀進行 caspase-8, -9 活性分析，peak 往右代表 caspase-8, -9 活性增加



### 十三、西方墨點法 ( Western Blotting )<sup>65</sup>

#### (1) 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專一性，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結合。經給予 Enhanced chemiluminescence ( ECL ) 呈色後，藉由感光底片接收冷光，而底片經顯影與定影後，觀察曝光區塊程度即可知道蛋白質表現量的變化。

#### (2) 實驗方法：

##### A. 細胞蛋白質之萃取 ( Protein extraction )：

將 U-2 OS 細胞  $1 \times 10^6$  cells/dish 接種於  $10 \text{ cm}^2$  dish 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換新鮮培養基，每個 dish 加入  $25 \mu\text{g/ml}$  之白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 處理後，培養 6、12、24、48 小時，收細胞，並以 PBS 清洗，離心後，加入 1 ml PBS，將其 transfer 至 1.5 ml 微量離心管中，離心後將 PBS 吸乾，再加入  $200 \mu\text{l}$  Lysis buffer ( PRO-PREP for Cell ) 將細胞震盪混合均勻後，置於  $-20^\circ\text{C}$  overnight，之後離心 (13000 rpm，10 分鐘) 取其上清液，亦即 lysis buffer 與細胞蛋白混合之液體，之後進行蛋白質定量的動作。

##### B. 蛋白質濃度測定：

先製作蛋白質標準品檢量線，以 Bradford 定量法，使用胎牛血清白蛋白 ( Bovine serum albumin ; BSA ) 當作蛋白質標準品，配置不同濃度之蛋白質標準品後，利用酵素免疫分析儀 ( ELISA reader ) 在 O.D. 595

nm 條件下測量其吸光值做檢量線 (standard curve) 分析，求出趨勢線方程式及  $R^2$  值。步驟：將 Bradford 染劑 5X 稀釋，混合均勻備用，取 20  $\mu\text{l}$  配置好之蛋白標準品 BSA 加 980  $\mu\text{l}$  Bradford 染劑混合均勻，置於 96 well plate 中，每 well 加入 100  $\mu\text{l}$ ，三重覆，靜置 5 分鐘後以 O.D. 595 nm 測量吸光值，求其平均值，以 O.D. value (Y) 對蛋白濃度  $\mu\text{g/ml}$  (X)，求出趨勢線方程式  $y=ax+b$ ， $R^2$  值要趨近於 0.99。

表 4-13-1 BSA 標準曲線之配製

BSA 濃度 (mg/ml)	5 mg/ml BSA	DDW ( $\mu\text{l}$ )
1	200	800
0.5	100	900
0.25	50	950
0.125	25	975
0.0625	12.5	987.5
0	0	1000

C. 樣品蛋白質定量：

取 18  $\mu\text{l}$  DDW 加上 2  $\mu\text{l}$  sample protein (以 DDW 將蛋白 5 倍稀釋) 與 980  $\mu\text{l}$  的 1X Bradford dye 混合均勻後，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  $x=(y-b)/a$  ( $\mu\text{g/ml}$ )。

## D. SDS-PAGE 分析

I. 膠片製作與電泳步驟：將配置好的下層膠 Separation gel 注入鑄膠台中，再以 isopropanol 去除氣泡並壓平下膠，靜置約 30 分鐘後，可觀察下層膠管中剩餘膠液是否凝固，待凝固後，將 isopropanol 倒掉，並用 DDW 再潤洗一次，之後注入上層膠並插上 comb，避免氣泡產生，戴上層膠凝固後，將鑄好的膠體放置於電泳槽中，加入電泳緩衝液（1X TG-SDS buffer），接著將萃取出蛋白依定量後的體積與 5X protein loading dye 混合，並以 100 °C 加熱 10 分鐘使蛋白變性，10 分鐘後，依序將標示標準分子量的 Marker 及各 sample 注入孔槽中，通以電壓 80 volts，待樣品通過 stacking gel 後，電壓調為 110 volts，進行電泳，當追蹤染料 bromophenol blue 達到底端時，即可停止電泳。

II. 轉漬步驟：先將 PVDF membrane，以甲醇濕潤約 5 分鐘，再浸入轉印緩衝液（transfer buffer）中，接著將濾紙先浸泡在 transfer buffer 中，將轉漬夾打開後，黑色面朝下，將海綿墊片先以 transfer buffer 潤濕並鋪在黑夾上，再將 3M 濾紙鋪上，接下來裁剪下層膠（Separation gel）中所要轉漬的區域後，將 SDS-PAGE gel 小心的擺放於 3M 濾紙上，可在濾紙上加入多量的 transfer buffer，在鋪上 gel 時勿產生任何氣泡，再依序放上 PVDF membrane，同樣避免氣泡產生，及 3M 濾紙，最後再放上一片海綿墊片，即可把整個轉漬夾裝好，形成似三明治夾層狀之構造。置入已裝有 transfer buffer 的電泳槽中將黑面朝負極，紅夾朝正極，電泳槽外圍放置足夠冰塊，使整個系統維持低溫狀態。以 400 mA、2 小時的條件下進行蛋白質轉漬步驟。轉印完成後取出轉印膜，裁去多餘部分，轉印膜後以 0.1% PBST 清洗 10 分鐘共 3 次。緊接將轉印膜以 2% FBS（溶於 0.1%

PBST 中 )進行 Blocking 步驟，以室溫 1 小時為條件進行。取出 PVDF membrane 後以 0.1% PBST 清洗 10 分鐘共 3 次。倒掉清洗液，加入一級抗體 (以 2% FBS/ in PBST 配製，稀釋倍數依不同抗體有所不同 )，4 °C 隔夜進行搖盪。隔天取出，回收一級抗體，以 0.1% PBST 清洗轉印膜 10 分鐘共 3 次。加入 8 ml 稀釋 5000-10000 倍的 anti IgG ( HRP ) horseradish peroxidase conjugated antibody 二級抗體 (以 2% FBS/ in PBST 配製)，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出轉印膜後以 0.1% PBST 清洗 10 分鐘共 3 次。

III. 暗房壓片步驟：將 PVDF membrane 浸泡於 ECL 試劑之混合液 ( 每瓶各取 1.5 ml 等比例混合 ) 中 1 分鐘反應。以兩張投影片黏貼固定於壓片卡匣 ( cassette ) 內，轉印膜正面朝上放置於壓片卡匣的兩張投影片中間，以 Hyperfilm 軟片置於上層投影片上，對準轉印膜進行壓片，感光時間依轉印膜上螢光亮度決定時間長短，約 5 秒至 20 分鐘不等。感光完成後放入顯影劑進行顯影步驟 ( 時間依實際觀察決定 )，再以清水沖洗 30 秒後放入定影劑中直至底片呈透明狀後，再以清水沖洗乾淨。

表 4-13-2 SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel)之配製及組成

組成	10% Separating gel (四片量)	12% Separating gel (四片量)
DDW	9.6 ml	8.6 ml
40% Acryamine/Bis (29:1)	5 ml	6 ml
1.5 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	20 $\mu$ l	15 $\mu$ l

表 4-13-3 SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel)之配製及組成

組成	5% Stacking gel (四片量)
DDW	4.06 ml
40% Acryamine/Bis (29:1)	1.02 ml
0.5 M Tris (pH=6.8)	1.66 ml
10% SDS	66 $\mu$ l
10% APS	33.4 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l

表 4-13-4 1.5 M Tris-HCl, pH=8.8

組成	重量
Tris	36.3 g
DDW	150 ml
HCl	調整至 Ph=8.8
加 DDW 將總體積定量至 200 ml	

表 4-13-5 0.5 M Tris-HCl, pH=6.8

組成	重量
Tris	3 g
DDW	40 ml
HCl	調整至 pH=6.8
加 DDW 將總體積定量至 50 ml	

表 4-13-6 電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer) 之組成

組成	體積
10 X TG-SDS buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS)	200 ml
以 DDW 定量至總體積 2000 ml	

表 4-13-7 轉印緩衝液 (Transfer buffer) 之組成

組成	重量
Tris	4.5 g
Glycine	21.6 g
Methanol	300 ml
以 DDW 定量至總體積 1500 ml	

表 4-13-8 PBS-tween 20 (PBST) 之組成

組成	體積
Tween-20	1 ml
PBS	1000 ml

#### 十四、基質金屬蛋白酶 ( Matrix metalloproteinases, MMPs ) 活性測定<sup>66</sup>

##### (1) 實驗原理：

當癌症轉移 (Metastasis)、血管新生 (Angiogenesis) 或侵入 (Invasion) 時，需要一些特定酵素去分解細胞間質 (ECM)，而基質金屬蛋白酶 ( Matrix metalloproteinases, MMPs ) 就是特定酵素之一，利用基質金屬蛋白酶 MMP-2 ( Gelatinase A ) 及 MMP-9 ( Gelatinase B ) 對 Gelatin 具有分解能力的特性進行 SDS-PAGE 電泳，而因 Gelatin 在 SDS-PAGE 中會被 Coomassie Brilliant Blue R ( CBR ) 染劑上色。若 MMPs 活性強，分解較多 gelatin，使得膠片部份區塊因無 Gelatin 而無法呈色，可由白色區塊觀察 MMP-2,-9 的活性，也藉此判斷實驗所使用的藥物是否能夠抑制癌細胞的轉移。

##### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞  $2 \times 10^5$  cells/well 接種於 24 well plate 中，經過 24 小時靜置培養待細胞貼附，加藥前更換無血清培養基，well 中加入 12.5、25  $\mu\text{g/ml}$  之白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 處理後，培養 12、24 小時後，將 well 中上清液取出 5  $\mu\text{l}$  加上 5  $\mu\text{l}$  追蹤染劑，37 °C 水浴 15 分鐘。將樣品注入含有 Gelatin 之 7.5% SDS-PAGE 膠片進行電泳分析 ( 110 volt，60 分鐘 )，之後以 2.5% Triton X-100 洗去追蹤染劑，並以 Incubation buffer ( 0.05 M Tris-HCl，10 mM CaCl<sub>2</sub>，50 mM NaCl，0.05% Brij 35 ) 培養 12 小時。再以 CBR 染色，並以退染劑 ( 10% Acetic acid，30% Methanol ) 退染，再掃描膠片，觀察白色區塊。



## 十五、細胞傷口癒合試驗 (Wound Healing assay)<sup>67</sup>

### (1) 實驗原理：

正常細胞在受到傷害後會啟動修復機制，由傷口周圍往中間生長或移動，而部分癌細胞也具有相同功能。藉由人為方式，在細胞平面上製造傷痕，以顯微鏡拍照觀察細胞移動至空白痕跡處。依時間與移動距離可推測細胞移動的速率，進而觀察細胞經處理後對於移動能力的影響。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 以  $1 \times 10^6$  cells/well 接種於 6 well plate 中，待貼盤後，以 200  $\mu$ l Tip 筆直的在孔盤中畫出一條直線製造傷痕，再以 PBS 洗去刮除的細胞，再將培養基更換為 2% FBS 的 McCoy's 培養基培養，並加入 12.5、25  $\mu$ g/ml 之白英乙醇粗抽物 (SLE)，依不同時間點 (0、6、12、24 小時)，以倒立式顯微鏡紀錄細胞狀態。

## 十六、免疫螢光染色 (Immunofluorescence Staining)<sup>68</sup>

### (1) 實驗原理：

利用抗體特異性，以一級抗體送入細胞內結合所需偵測的蛋白質，再藉二級抗體連接 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光的方式，使標定的蛋白產生螢光，接著使用不同的螢光染劑標記細胞內胞器，如：細胞核、粒線體。藉由共軛焦顯微鏡 (Confocal microscope) 觀察細胞質表現量的差異，以及將兩種不同的螢光個別拍照，最後將兩者疊合觀察蛋白是否有轉位、釋放入細胞核的現象發生，進行控制組與實驗組的比較。

### (2) 實驗方法：

將 U-2 OS 細胞以  $1 \times 10^4$  cells/dish 種植在載玻片上培養，並以 25  $\mu\text{g/ml}$  之白英乙醇粗抽物 (SLE) 處理 24 小時。取出載玻片進行甲醇固定細胞，以 PBS 清洗數次，再以 0.1% Triton X-100 作用 15 分鐘增加細胞通透性，反應後用 PBS 清洗數次，加入一級抗體 overnight。隔天以 PBS 清洗 3 次，加入二級抗體 (需避光)，再以 PBS 清洗，依需要加入不同的螢光染劑，最後 PBS 清洗後以封片膠將其封片，利用共軛焦顯微鏡觀察細胞內蛋白質相對分布的位置。

## 十七、統計分析 (Statistics analysis)

實驗結果以平均值標準差 (mean  $\pm$  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意義，以 \* 表示  $p < 0.05$ 。

## 第五章 研究結果

### 第一節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 (U-2 OS cells) 形態之影響

人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 處理不同濃度 SLE ( 0、12.5、25、50、75、100  $\mu\text{g/ml}$  )，並培養 12、24 小時之後，以倒立式位像差顯微鏡 200 倍放大觀察細胞型態變化，可以發現細胞經過 SLE 處理後，確實能夠毒殺細胞使細胞死亡，隨著藥物濃度的提高，細胞在外觀上有皺縮變小的現象，並無法貼附而浮起，活細胞數目明顯減少，但死亡的細胞維持完整，並無破裂分解之情形，故初步推測 SLE 可能誘導 U-2 OS 細胞走向凋亡。



白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 (U-2 OS cells) 形態之影響

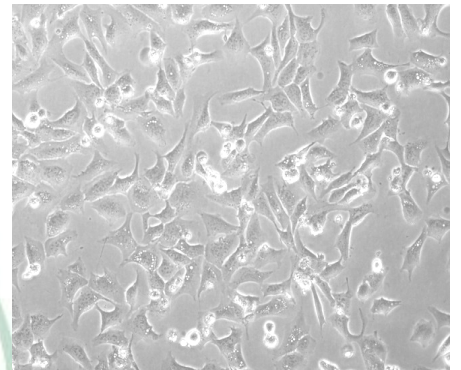
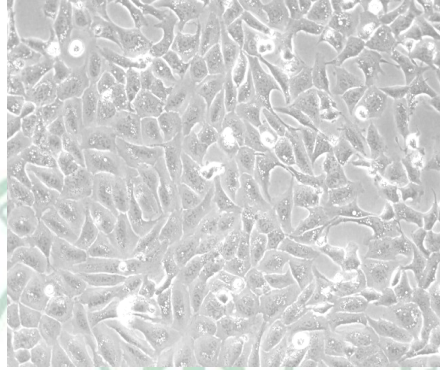
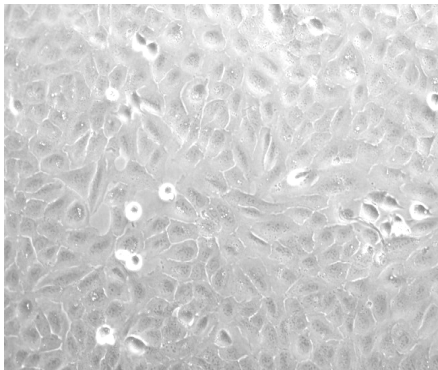
24 h

(A)

**Control**

**12.5  $\mu\text{g/ml}$**

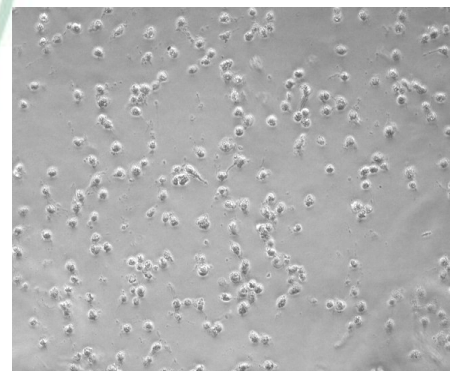
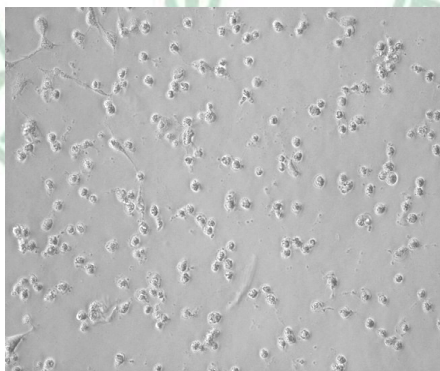
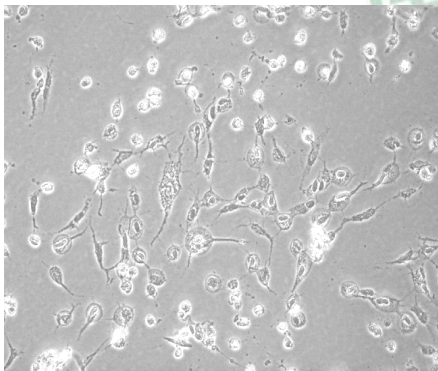
**25  $\mu\text{g/ml}$**



**50  $\mu\text{g/ml}$**

**75  $\mu\text{g/ml}$**

**100  $\mu\text{g/ml}$**



白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 (U-2 OS cells) 形態之影響

48 h

(B)

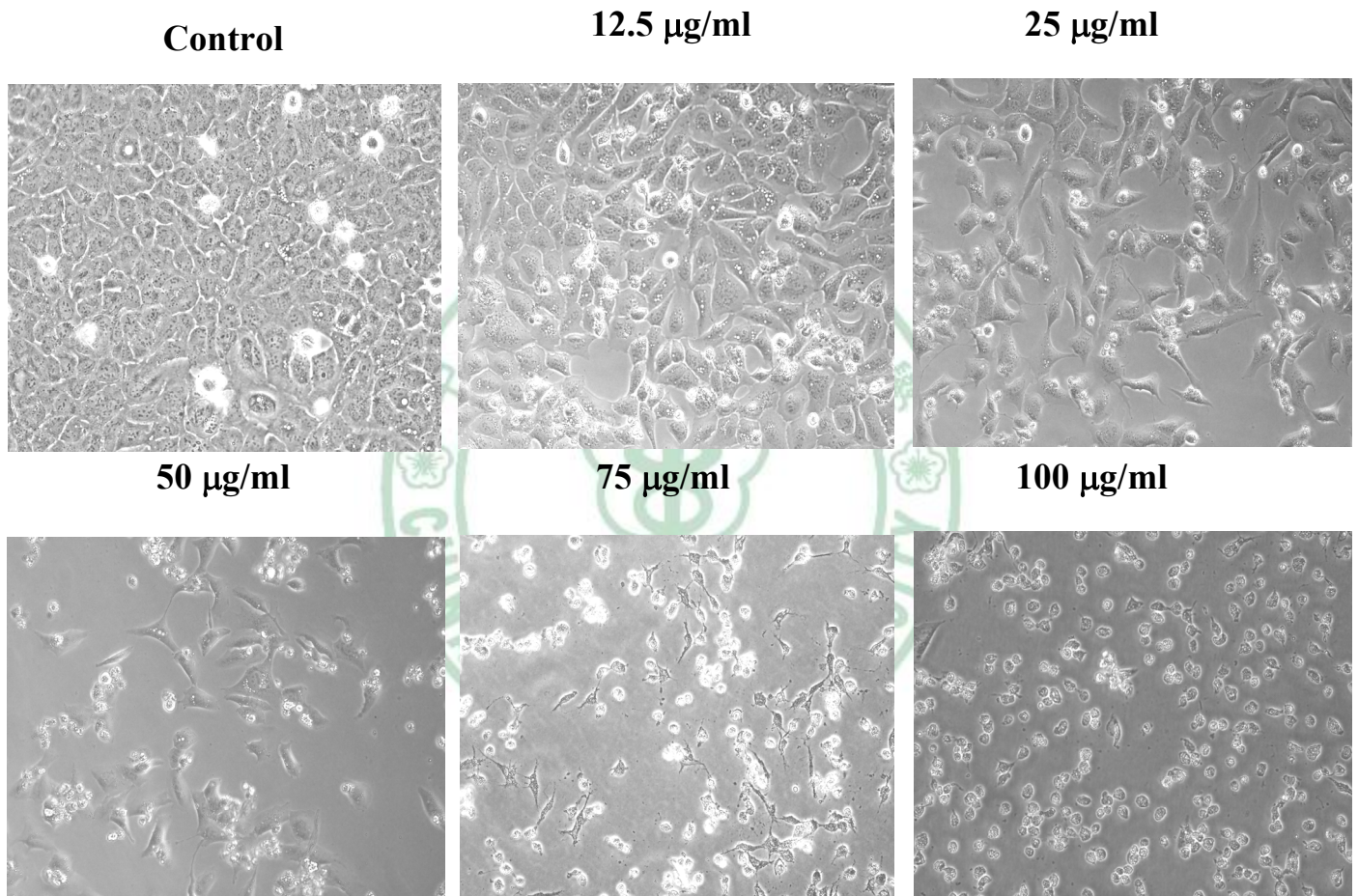


圖 5-1 利用倒立式位像差顯微鏡觀察 U-2 OS 細胞經 SLE 處理不同濃度，培養 24、48 小時細胞型態之變化。觀察到 U-2 OS 細胞隨著 SLE 濃度上升呈現皺縮現象。(A) 24 小時，(B) 48 小時 (200 X)。

## 第二節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 存活率之影響

利用流式細胞儀分析細胞存活率，經過核酸染劑 PI 染色後，螢光強度較弱為活細胞，螢光較強為死細胞，依螢光強弱的差別即可分析出細胞存活率。結果得知 SLE 所誘導 U-2 OS 細胞死亡，並在量化中顯示有藥物劑量依存性 (dose-dependent) 的現象，亦即隨著藥物濃度提高 (0、12.5、25、50、75、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 細胞存活率隨之下降。

根據存活率試驗的結果，以 SLE 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用於 U-2 OS 細胞 24 小時之存活率，可達半數致死率。故以 SLE 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作為之後大部分實驗的濃度依據。



# 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 存活率之影響

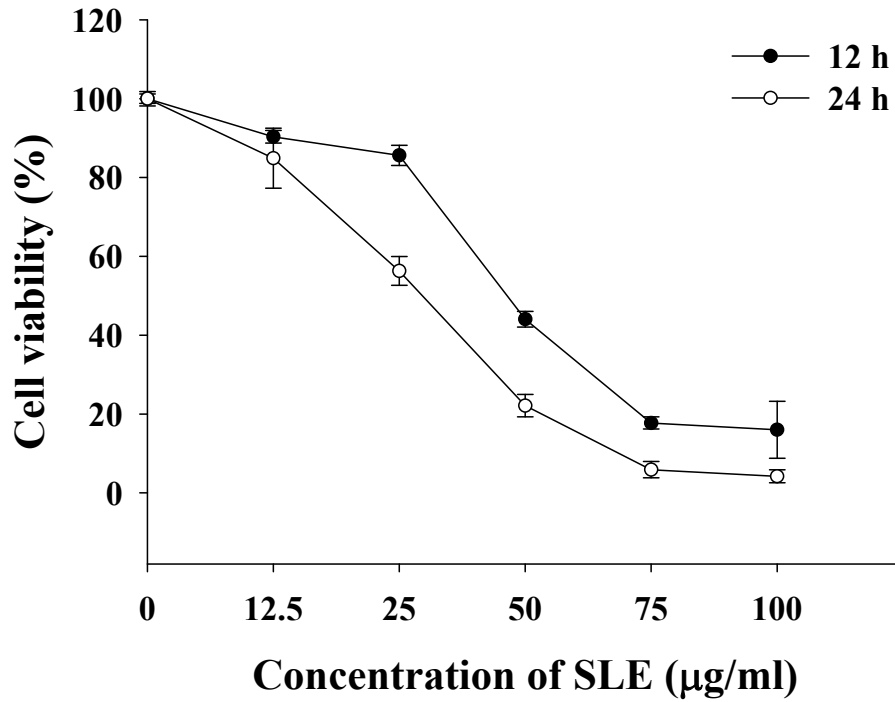
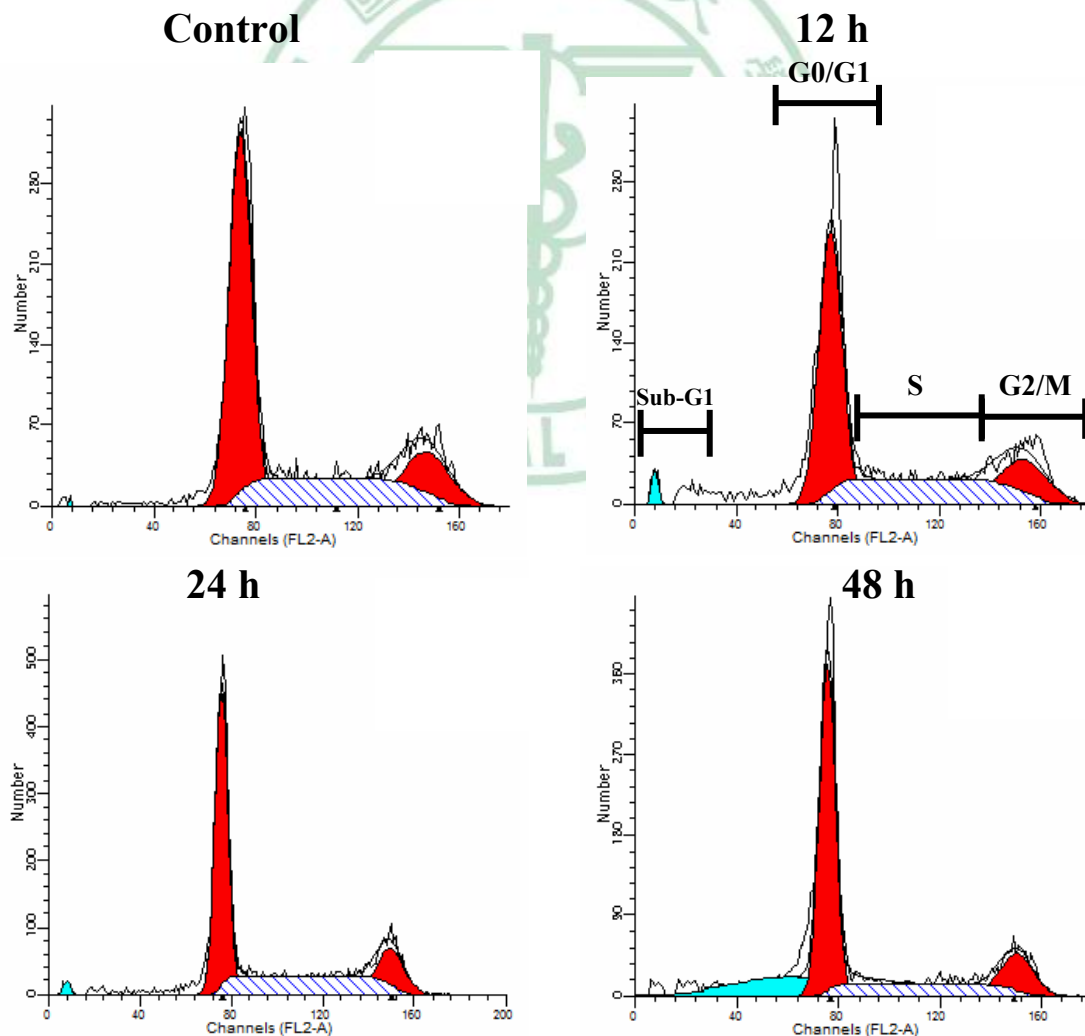


圖 5-2 利用流式細胞儀偵測得知 U-2 OS 經 SLE 不同藥物濃度 (0、12.5、25、50、75、100 µg/ml) 培養不同時間點 (12、24 h) 之細胞存活率。\*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

### 第三節 探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞週期之影響

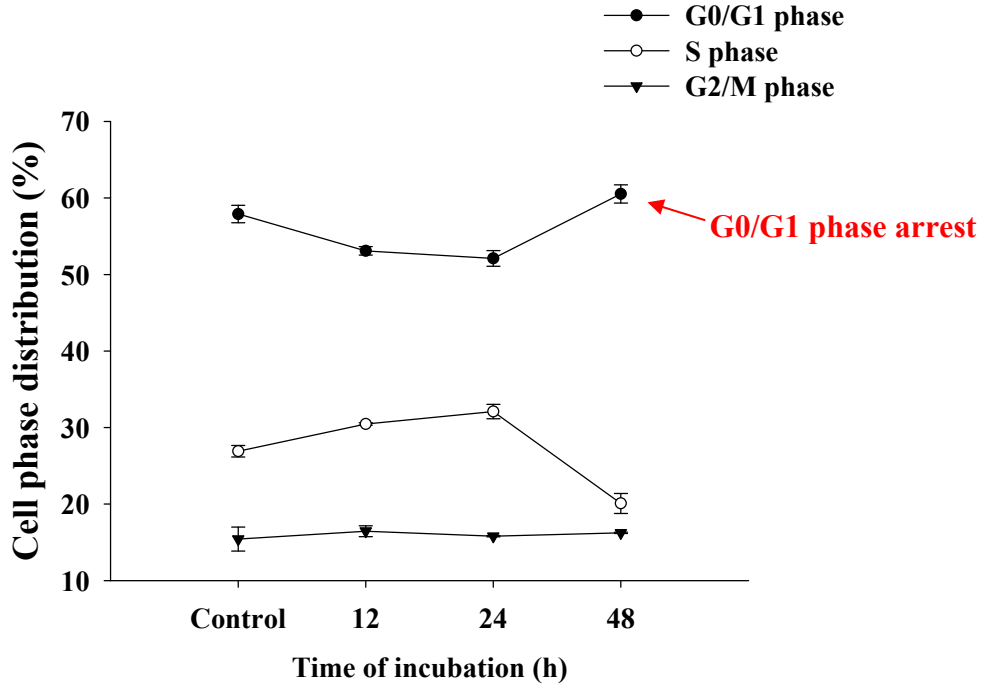
由本實驗結果得知，以 25  $\mu\text{g/ml}$  SLE 培養不同時間點 (0、12、24、48 h) 之人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞，與未經過藥物處理之控制組比較，由量化圖顯示細胞週期停滯於 G0/G1 期，並且 Sub-G1 期的比例隨著 SLE 濃度增加而上升。

(A)





(B)



(C)

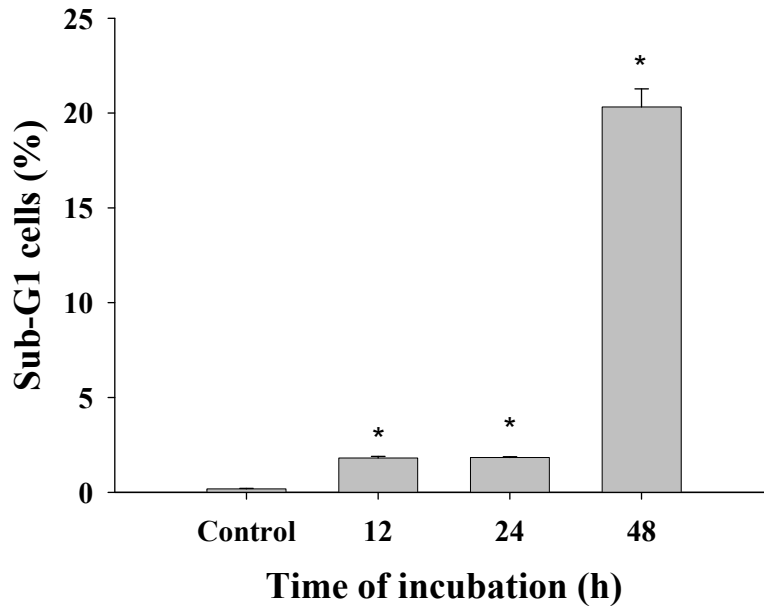


圖 5-3 (A) 以 25  $\mu\text{g/ml}$  SLE 處理不同時間點 (0、12、24、48 h) 之人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞，細胞週期停滯之情形。(B) 細胞週期變化之量化圖。(C) Sub-G1 細胞比率量化圖。\*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

#### 第四節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞週期 (Cell cycle) 相關蛋白之影響

利用西方墨點法觀察調控 G0/G1 期停滯相關蛋白質表現量之變化。實驗結果發現 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 引起細胞週期停滯於 G0/G1 期，是藉由 p21 的活化，進而抑制下游 Cdk6 及 Cyclin E 表現所導致。

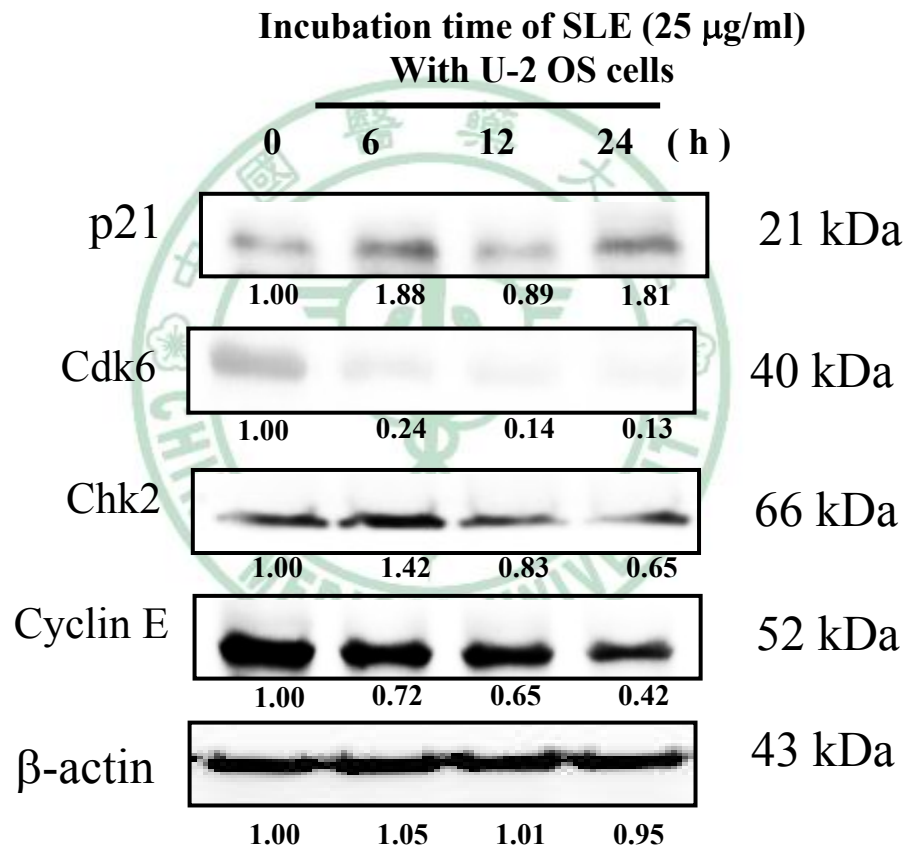


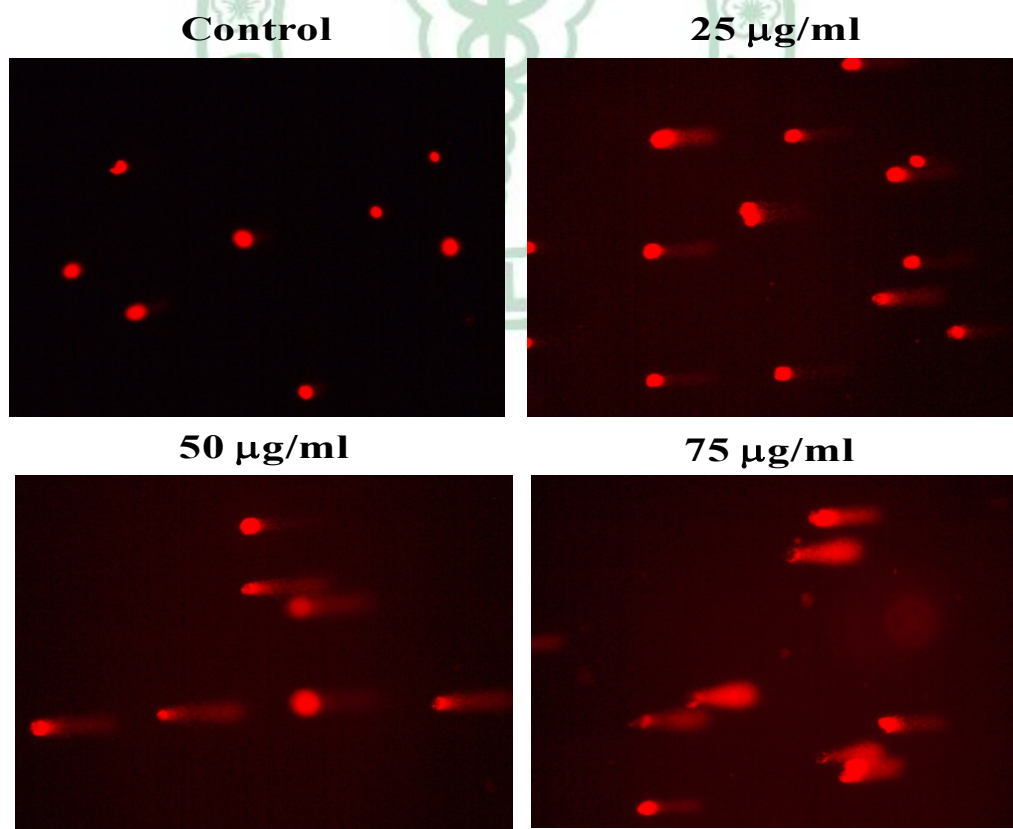
圖 5-4 以 25  $\mu\text{g/ml}$  SLE 處理不同時間點 (0、6、12、24 h) 之人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞，利用西方墨點法檢測 G0/G1 期之細胞週期停滯相關蛋白 (如：p21、Cdk6、Chk2) 之表現變化。

## 第五節 觀察白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS DNA 傷害之情形

### 1. 以彗星試驗 (Comet assay) 觀察 DNA 拖尾程度

利用 Comet assay 觀察 DNA 斷裂及拖尾情形，經過電泳後受損的 DNA 會被拖出膜外，經由 PI 染劑的染色，在螢光顯微鏡下觀察會形成拖尾的外觀，可依據拖尾的長度來判斷 DNA 損傷嚴重程度。實驗結果顯示 U-2 OS 細胞經過不同藥物濃度 (0、25、50、75  $\mu\text{g/ml}$ ) 處理 24 小時，明顯觀察到隨藥物濃度增加，拖尾長度也隨之增長，表示 DNA 受損程度也趨於嚴重。

(A)



觀察白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS DNA 傷害之情形

(B)

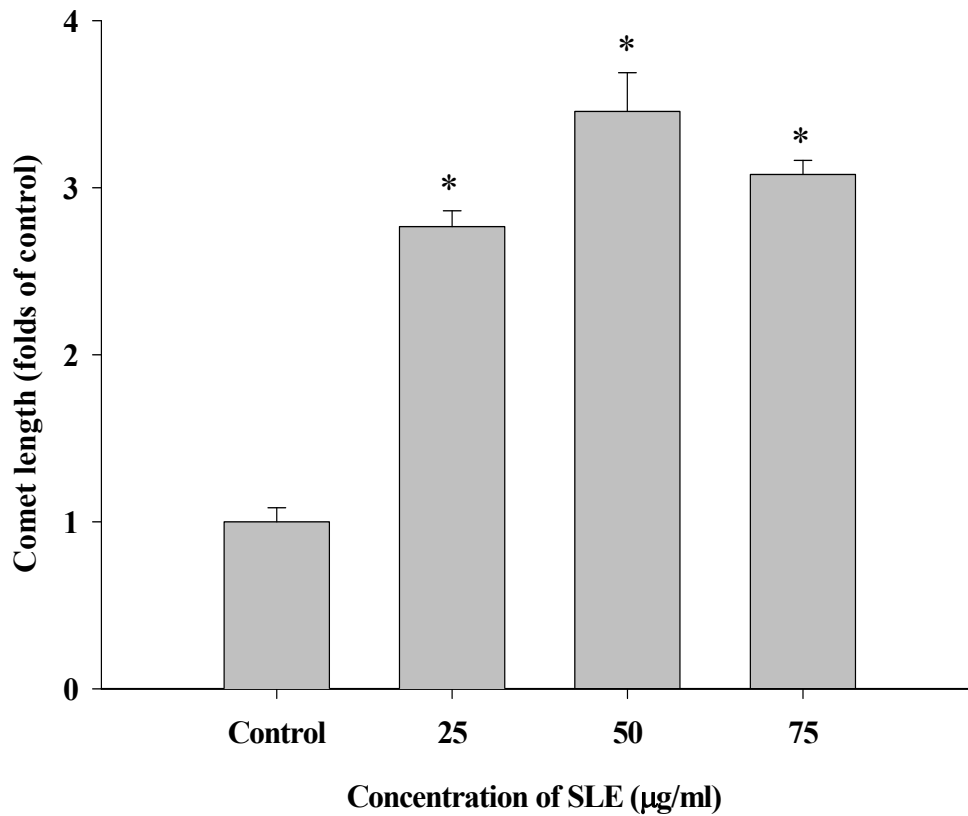
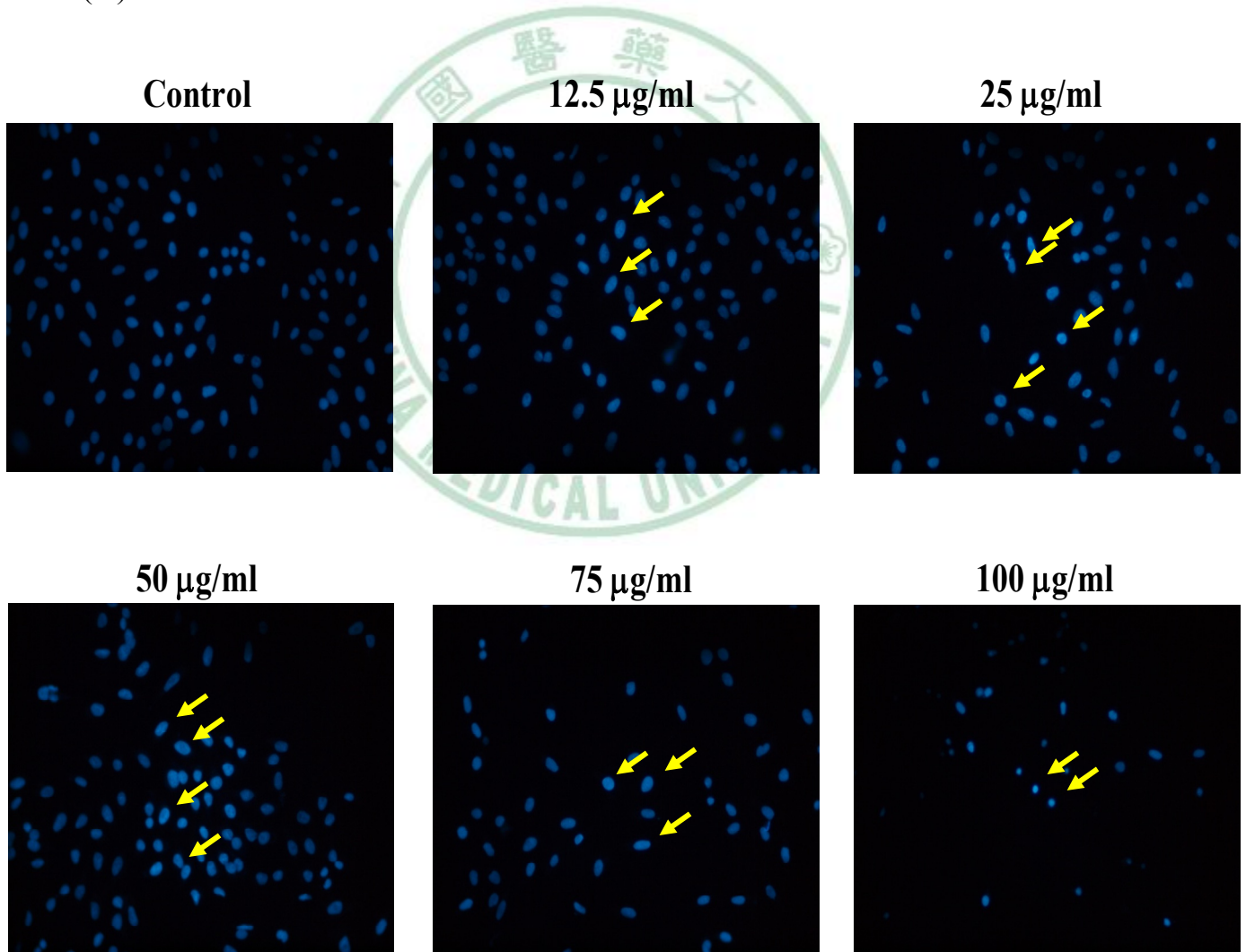


圖 5-5 以不同濃度 SLE ( 0、25、50、75 µg/ml) 作用於 U-2 OS 細胞 24 小時後，以 (A) 以單細胞凝膠電泳觀察到高濃度有 DNA 受損情形，(B) 量化拖尾程度 (200 X)。\*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

## 2. 利用 DAPI 染色法觀察細胞染色質濃縮情形 (chromatin condensation)

細胞經 ( 0、12.5、25、50、75、100  $\mu\text{g/ml}$  ) SLE 處理 24 小時後，可觀察到隨著藥物濃度增加，DAPI 染劑的螢光強度提升，代表隨藥物濃度增加，其細胞 DNA 斷裂與染色質濃縮情形越嚴重。

(A)



利用 DAPI 染色法觀察細胞染色質濃縮情形 (chromatin condensation)

(B)

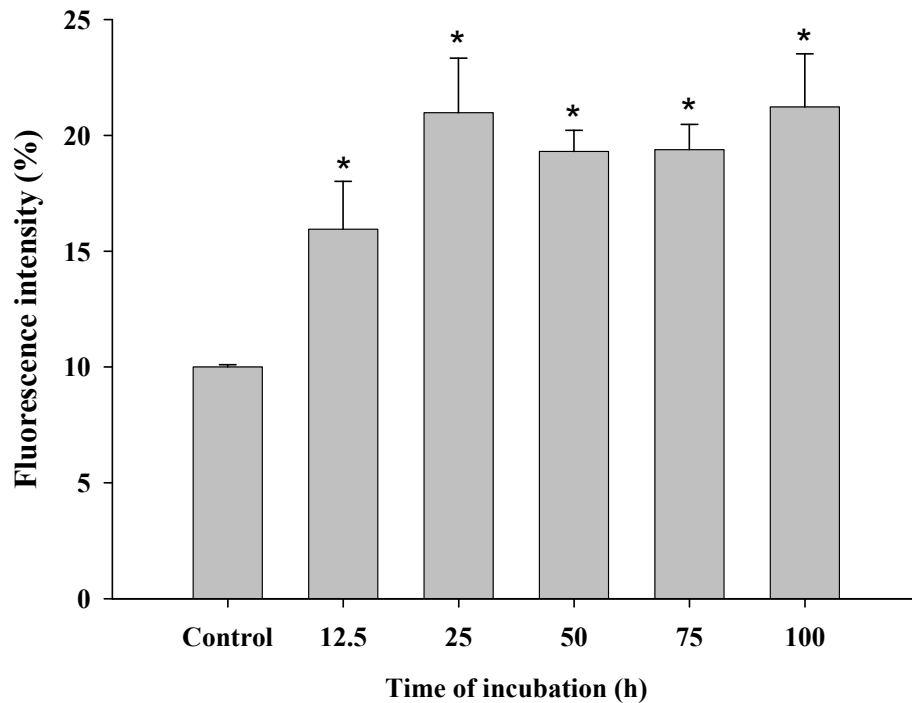
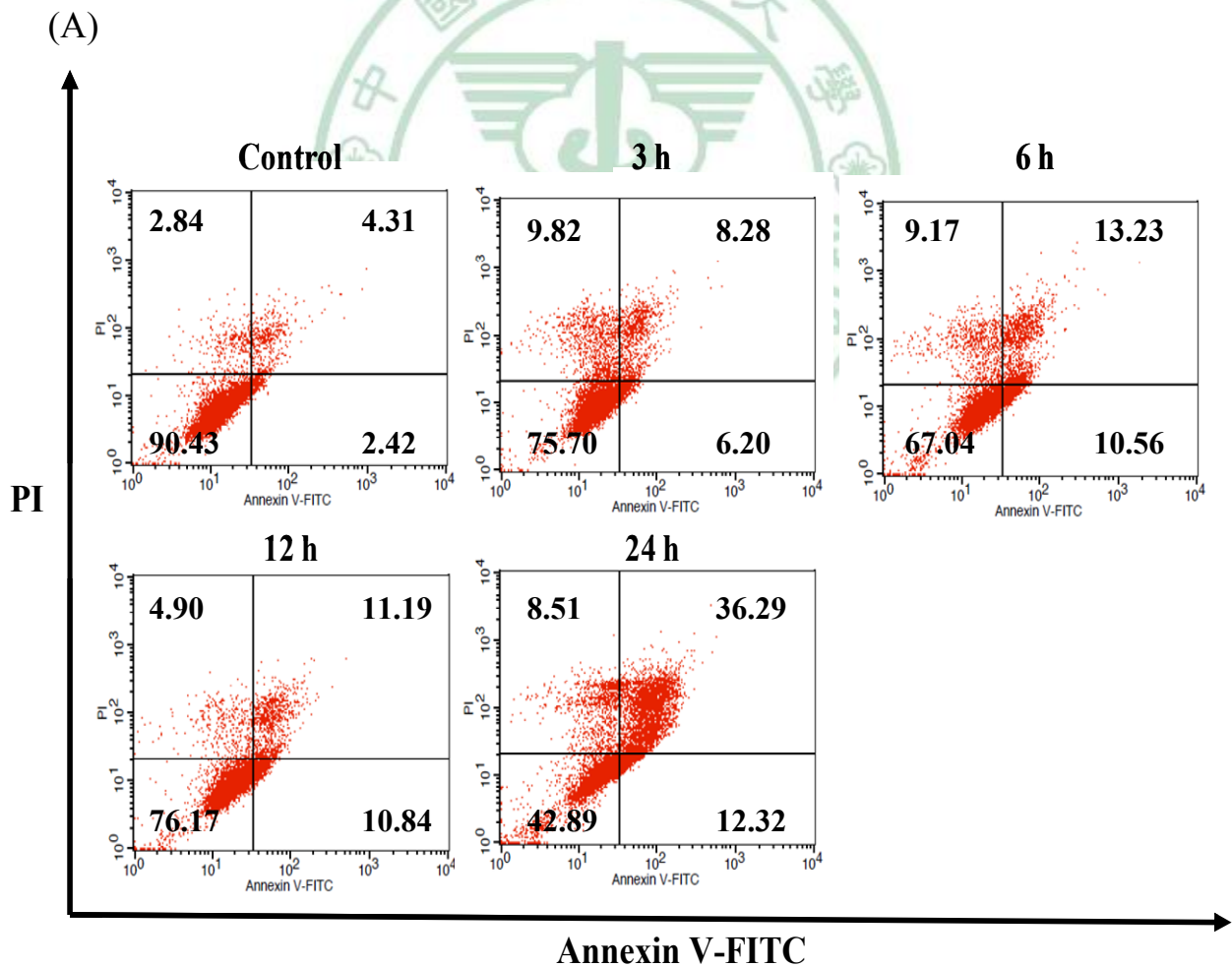


圖 5-6 以不同濃度 SLE (0、12.5、25、50、75、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 作用於 U-2 OS 細胞 24 小時後，(A) 以 DAPI 染色法觀察到細胞有 DNA 受損與染色質濃縮的現象，(B) 量化 DAPI 螢光強度(200 X)。\*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

## 第六節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 誘導凋亡之影響

當細胞凋亡時，磷脂絲氨酸 (PS) 會外翻至細胞膜外，藉由 Annexin V 與 PS 有高度結合性的特性，在 Annexin V 上標定 FITC 螢光物質，並以流式細胞儀偵測其螢光量，即可得知細胞凋亡程度。由圖 5-7 (A、B) 結果顯示，當 U-2 OS 細胞經 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 誘導，隨時間增加 (3、6、12、24 h)，凋亡程度也隨之增加，代表 SLE 確實可以引起 U-2 OS 細胞凋亡。



白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 誘導凋亡之影響

(B)

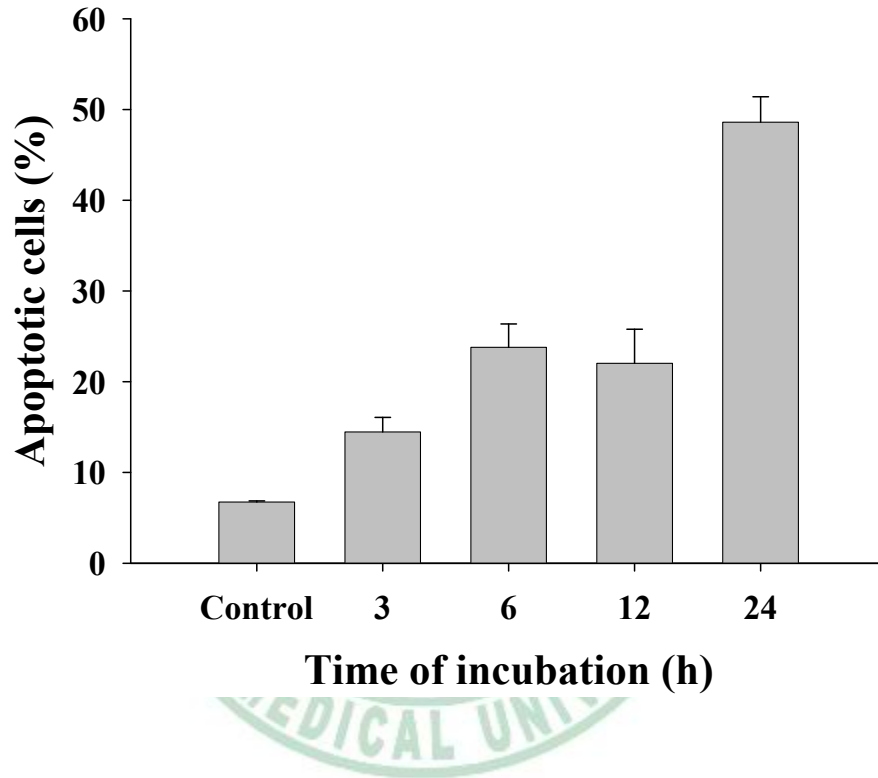


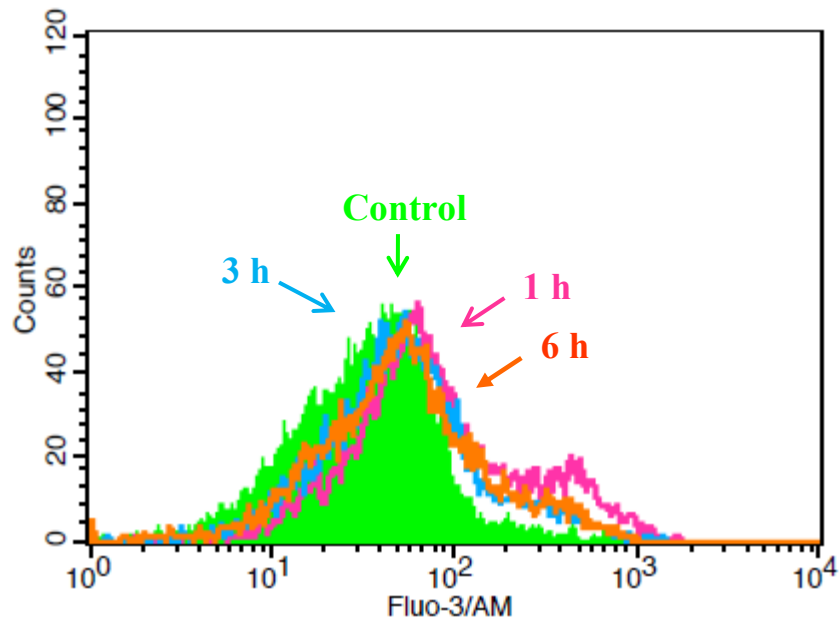
圖 5-7 U-2 OS 細胞處理 25 µg/ml SLE 後培養不同時間點，(A) 利用流式細胞儀偵測早期細胞凋亡，(B) 凋亡細胞量化圖。 \*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。



## 第七節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 鈣離子釋放之影響

鈣離子在許多細胞訊息傳送中扮演傳遞者的重要角色，主要儲存於內質網及高基氏體中，有文獻指出當內質網受到壓力時會釋放出大量鈣離子，進而影響到粒線體膜電位，最後走向凋亡。在本實驗中 U-2 OS 細胞經 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 誘導，培養 1、3、6 小時後，圖 5-8 (A) 以流式細胞儀與 Fluo/3-AM 染劑偵測細胞內鈣離子濃度變化，圖 5-8 (B) 量化結果發現鈣離子於 1 小時後釋放。另以西方墨點法得知 ER stress 之標的蛋白 GRP 78、GADD153 表現量在藥物處理後 6 小時均有增加。

(A)



白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 鈣離子釋放之影響

(B)

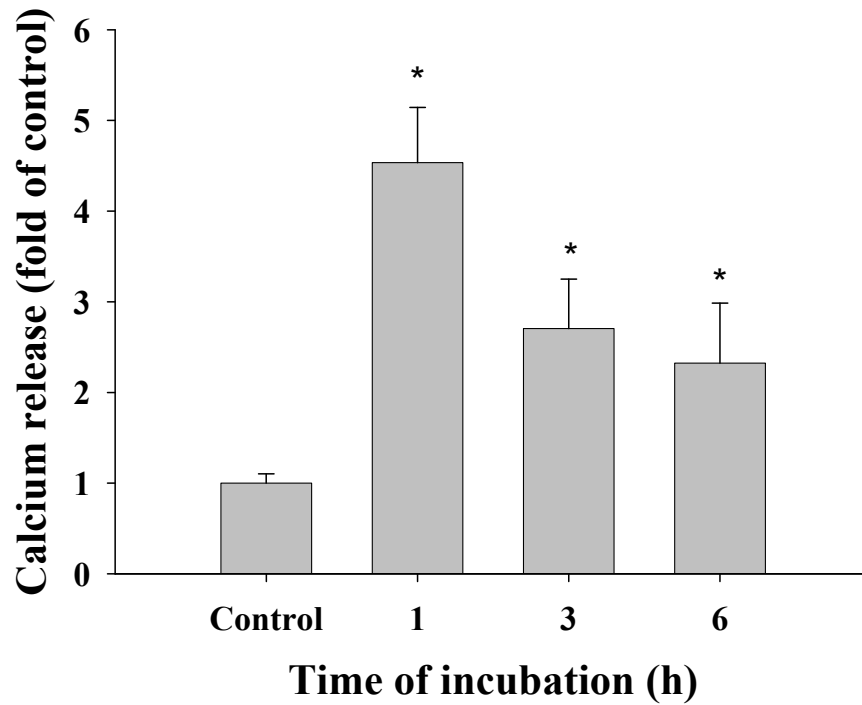


圖 5-8 當 U-2 OS 細胞經 25 µg/ml 之 SLE 誘導，培養 1、3、6 小時，以流式細胞儀偵測，發現鈣離子於 1 小時釋放至最大量。\* 表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

## 第八節 探討白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 的細胞凋亡內質網壓力路徑 (Endoplasmic reticulum-ER stress dependent apoptotic pathway)相關蛋白之表現

利用西方墨點法觀察幫助蛋白質折疊之伴隨蛋白GRP78及反應細胞壓力的轉錄因子GADD153及ER stress相關蛋白caspase-4、PERK。實驗結果(圖5-9)發現，25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之 SLE 誘導GRP78、GADD153蛋白在6小時表現量上升，而PERK在較後期的12小時開始表現，此結果說明SLE的確可經由鈣離子的釋放導致U-2 OS細胞內產生內質網壓力。



探討白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 的細胞凋亡內質網壓力路徑 (Endoplasmic reticulum-ER stress dependent apoptotic pathway)相關蛋白之表現

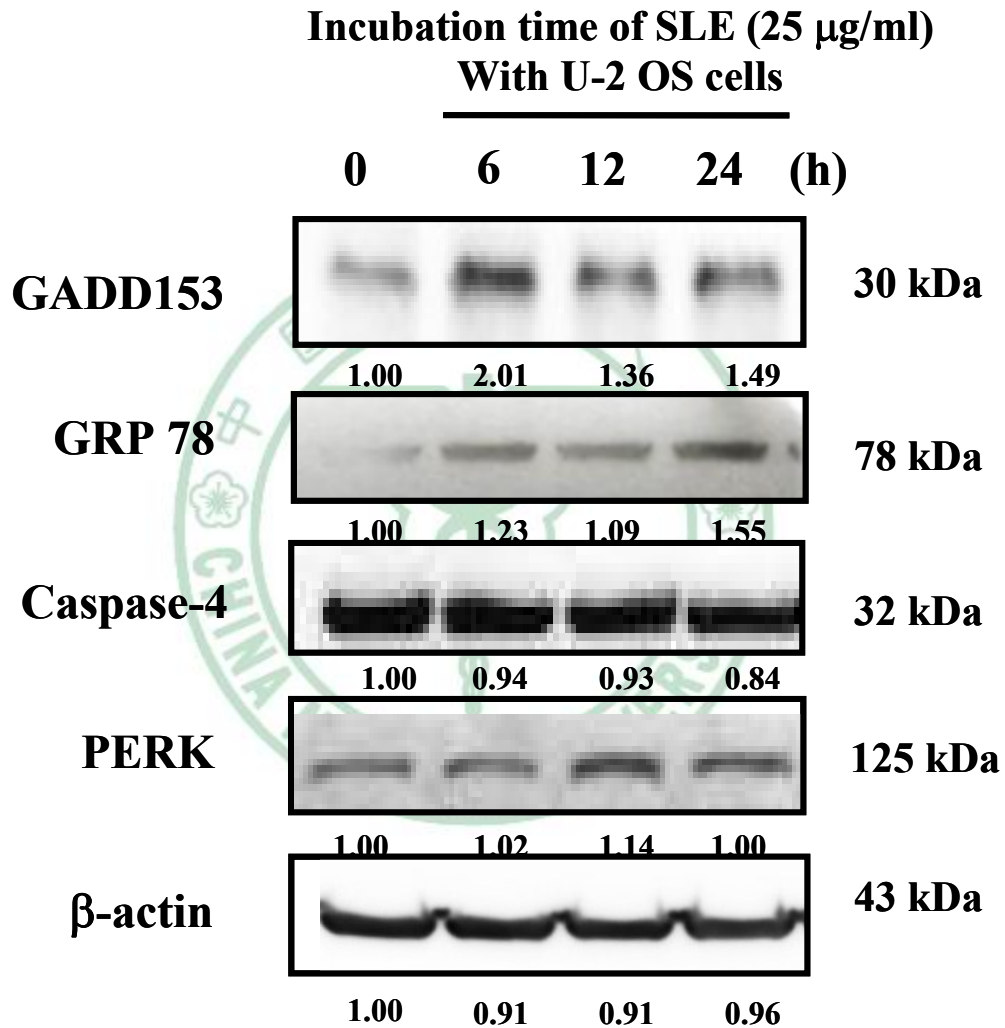
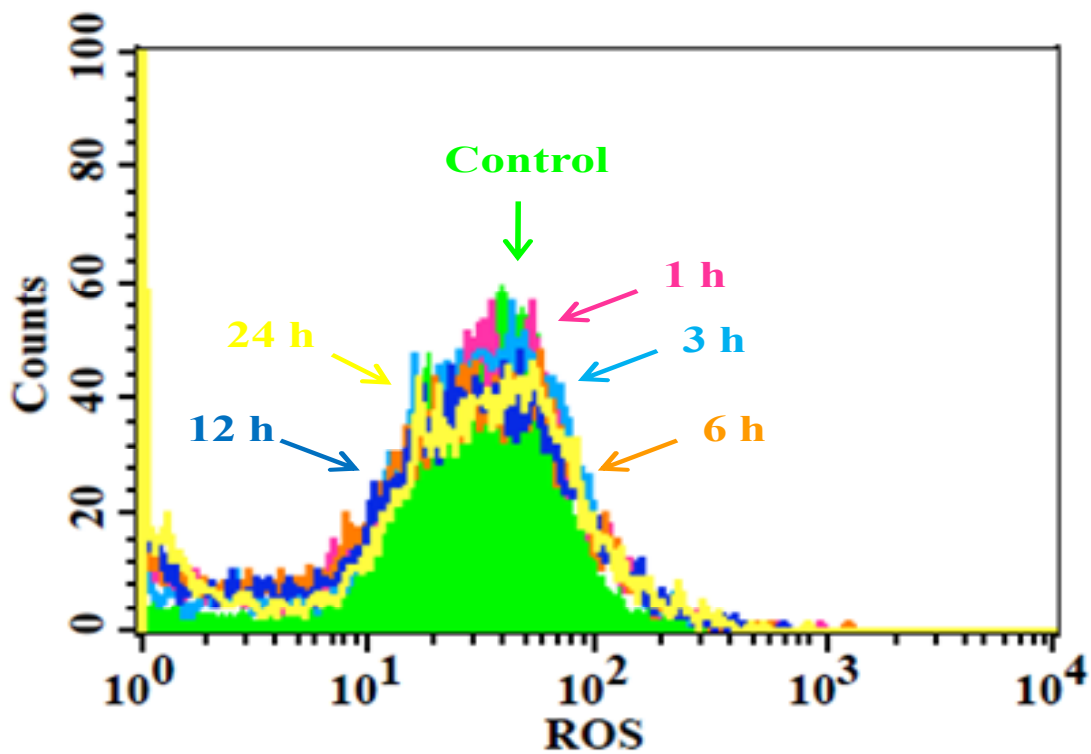


圖 5-9 以 25  $\mu$ g/ml SLE 處理不同時間點 (0、6、12、24 h)之人類骨肉瘤細胞 U-2 OS，利用西方墨點法檢測 ER stress 相關蛋白 (如：GADD153，GRP78，Caspase-4，PERK) 之表現量變化。

## 第九節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 產生活性氧物質 (ROS) 能力之影響

本實驗以 25  $\mu\text{g/ml}$  SLE 處理不同時間點 (1、3、6、12、24、48 h) 之人類骨肉瘤細胞 U-2 OS，以流式細胞儀偵測  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  螢光量，進一步觀察 ROS 在細胞內的表現量。由實驗得知  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  螢光量之 peak 經過 SLE 處理後並無明顯改變。

(A)



白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 產生活性  
氧物質 (ROS) 能力之影響

(B)

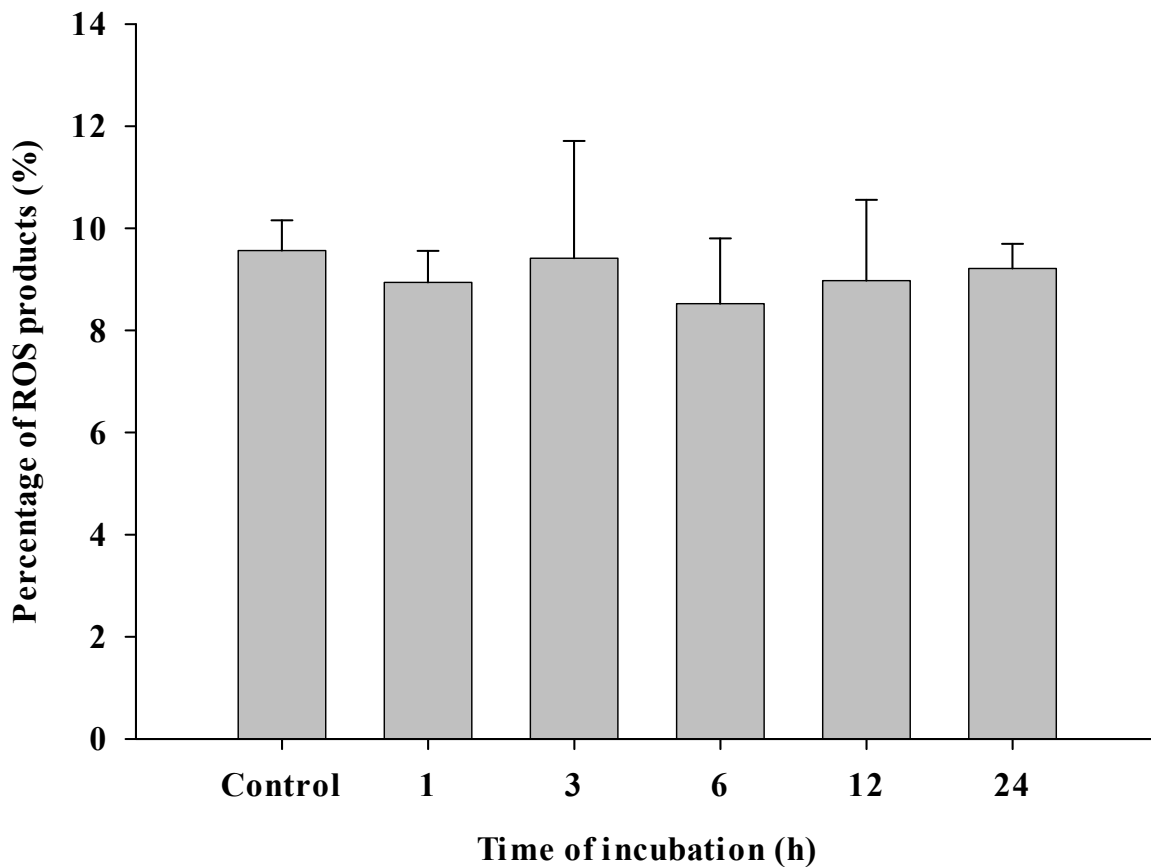


圖 5-10 U-2 OS 細胞經 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 誘導，培養 1、3、6、12、24 小時後，(A) 以流式細胞儀偵測  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  螢光量，(B) 螢光量經量化後發現 ROS 表現並無差異。 \*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

## 第十節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞抗氧化相關蛋白之影響

利用西方墨點法觀察抗氧化蛋白表現變化。實驗結果(圖5-11)發現，經 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 誘導後，細胞質中的 SOD 和 Catalase 表現量並無明顯變化，此結果與流式細胞儀偵測ROS (圖5-10)之結果相符。

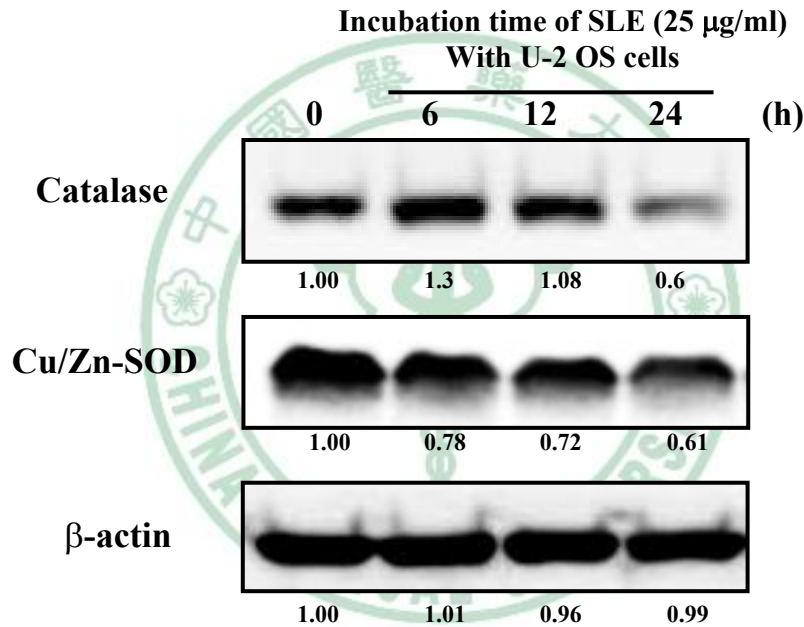
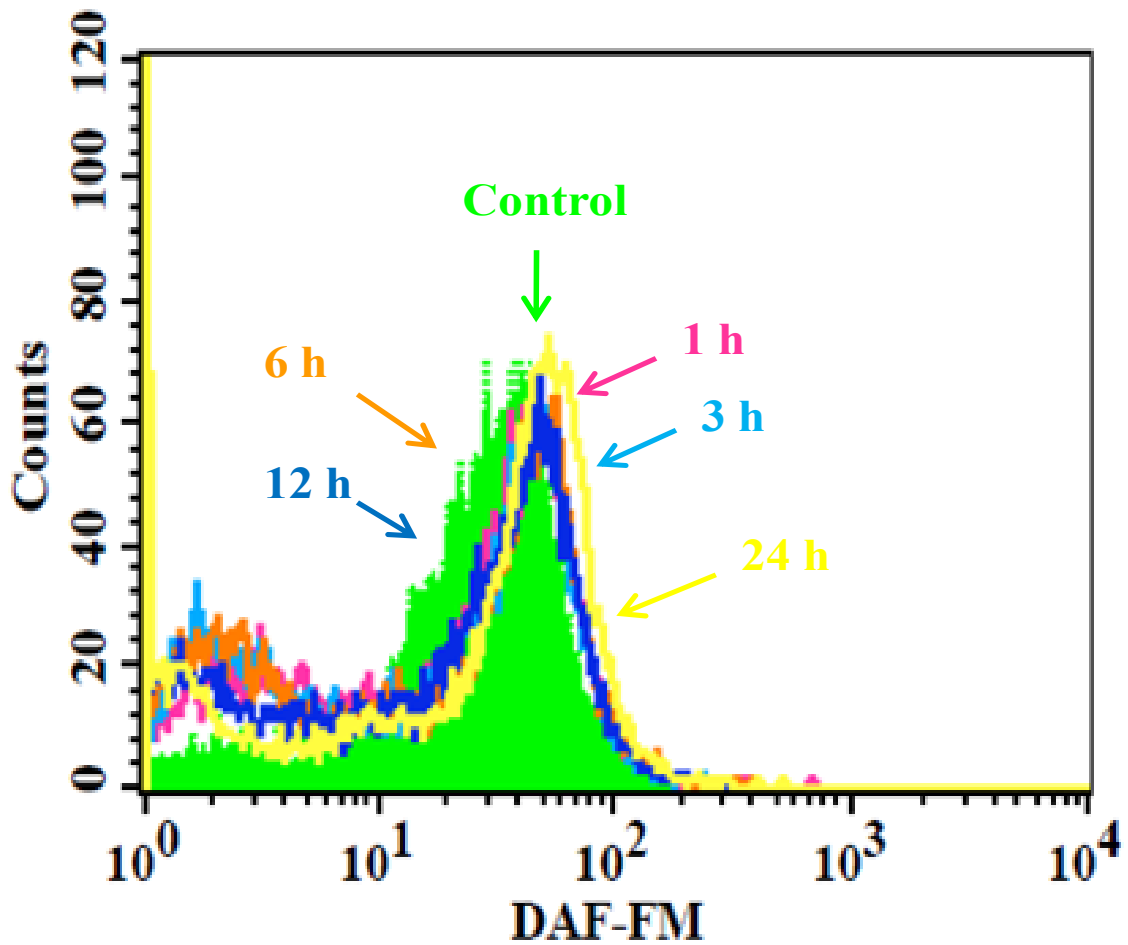


圖 5-11 以 25  $\mu\text{g/ml}$  SLE 處理不同時間點 (0、6、12、24 h) 之人類骨肉瘤細胞 U-2 OS，利用西方墨點法檢測抗氧化相關蛋白 (如：Catalase、Cu/Zn-SOD) 之表現量變化。

第十一節 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 產生一氧化氮(Nitric oxide, NO) 能力之影響

以 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 作用不同時間點後，利用 DAF-FM 偵測細胞內一氧化氮含量，結果顯示一氧化氮於 1 小時即有表現，至 24 小時達最大值。

(C)





白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 產生一氧化氮(Nitric oxide, NO) 能力之影響

(D)

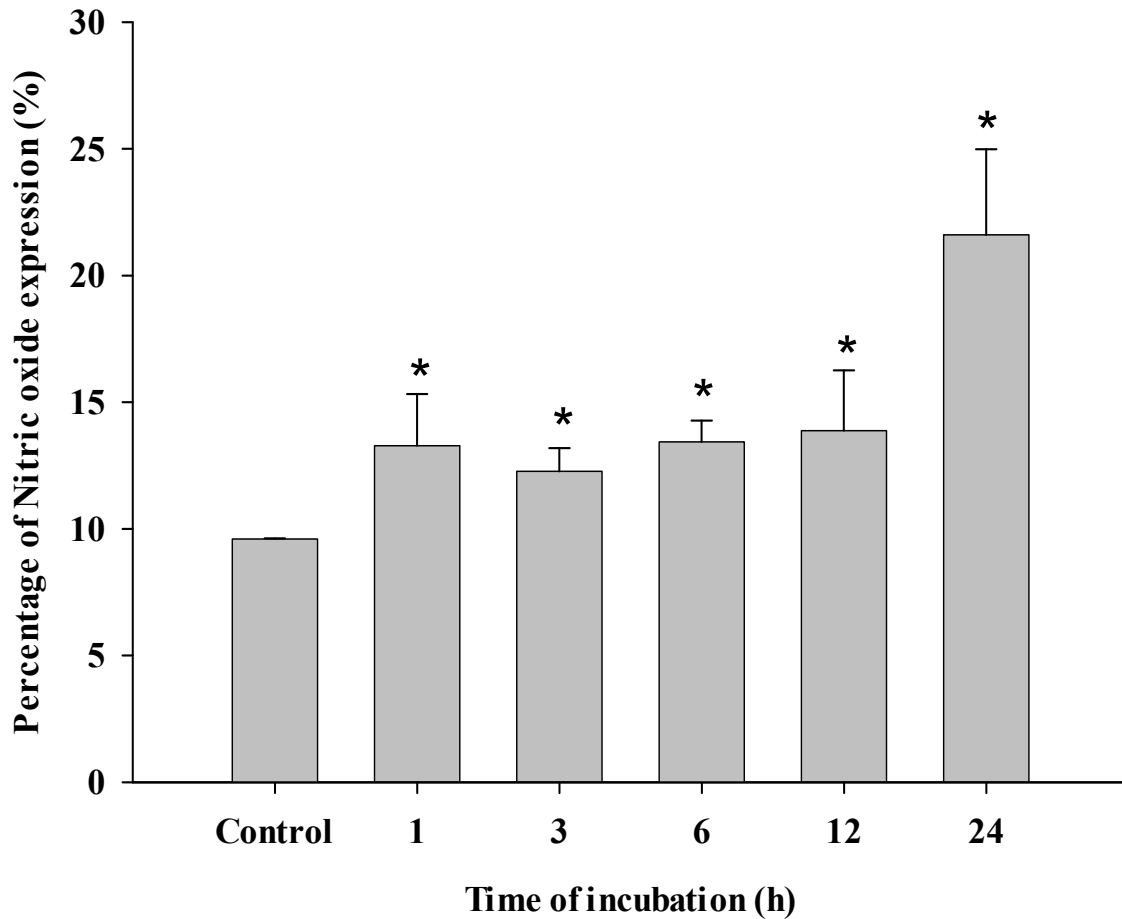
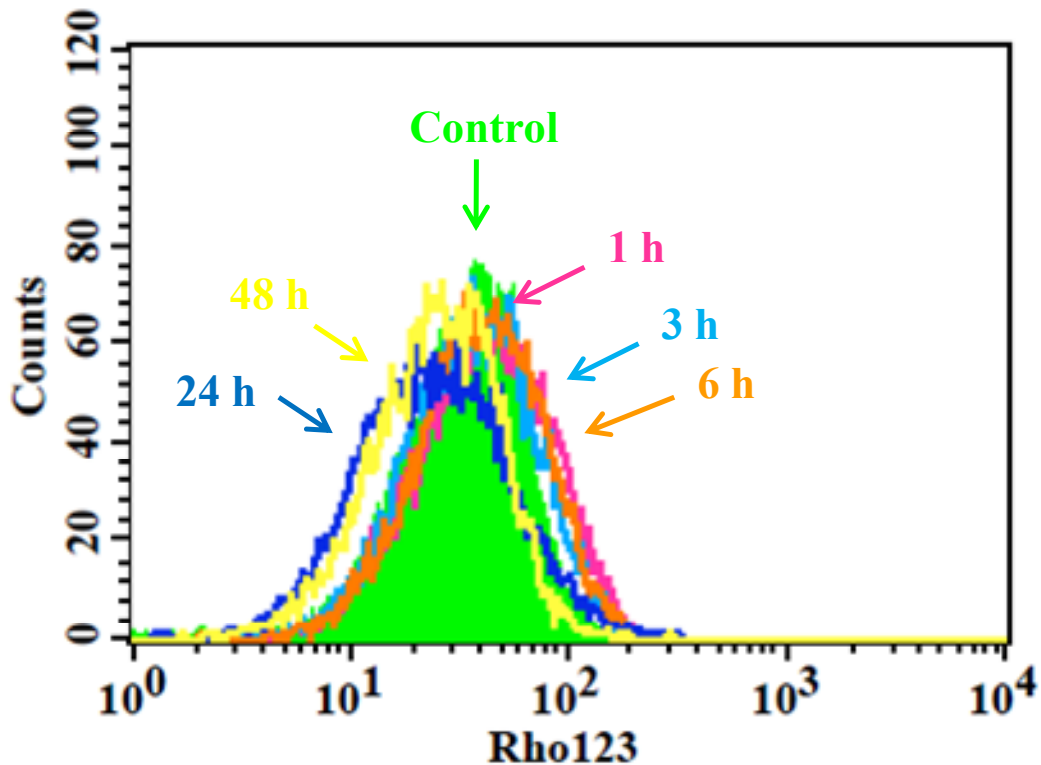


圖 5-12 U-2 OS 細胞經 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 誘導，培養 1、3、6、12、24 小時後，(A) 以流式細胞儀偵測 DAF-FM 螢光量，(B) 經量化後發現 NO 表現量由 1 小時開始上升。 \*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

## 第十二節 白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 粒線體之影響

U-2 OS 細胞經過 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 作用不同時間點後，以 Rhodamine 123 觀察粒線體膜電位 (MMP;  $\Delta\psi_m$ ) 變化。以流式細胞儀偵測可知，於 SLE 誘導後 24 小時，Rhodamine 123 螢光量 peak 往左移，代表粒線體膜電位於 24 小時開始下降。

(A)



白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 粒線體之影響

(B)

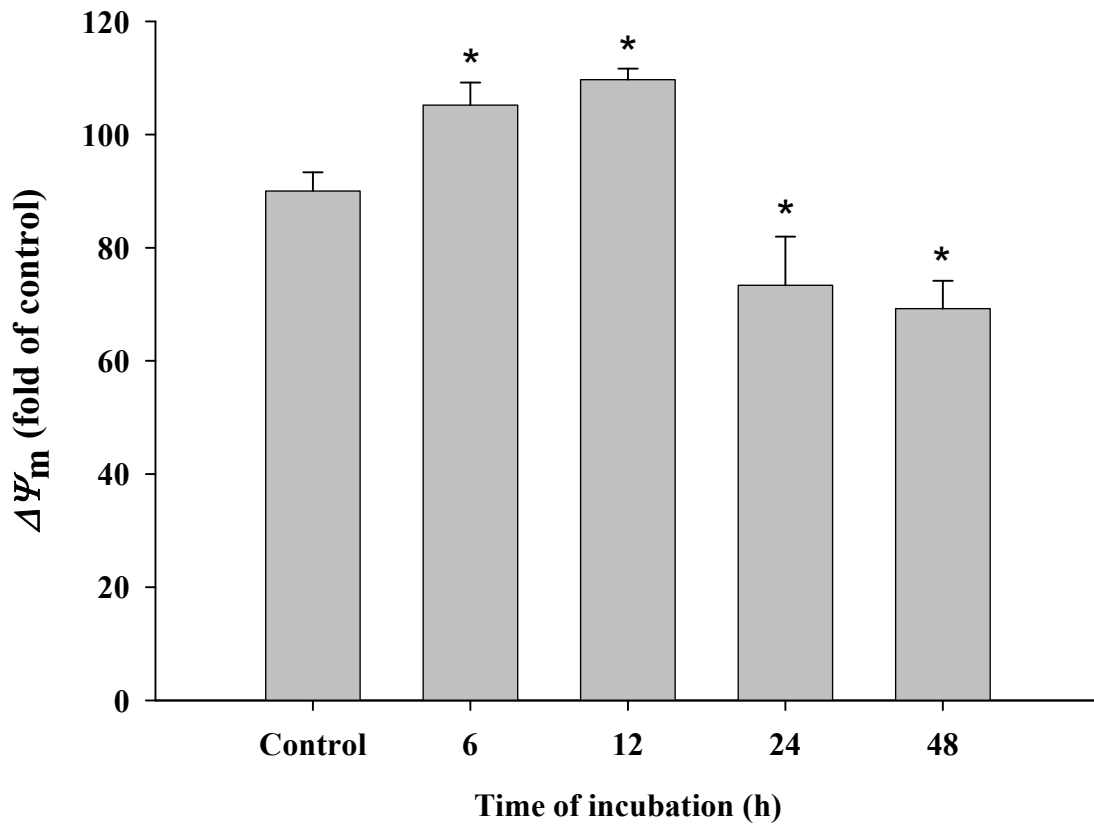
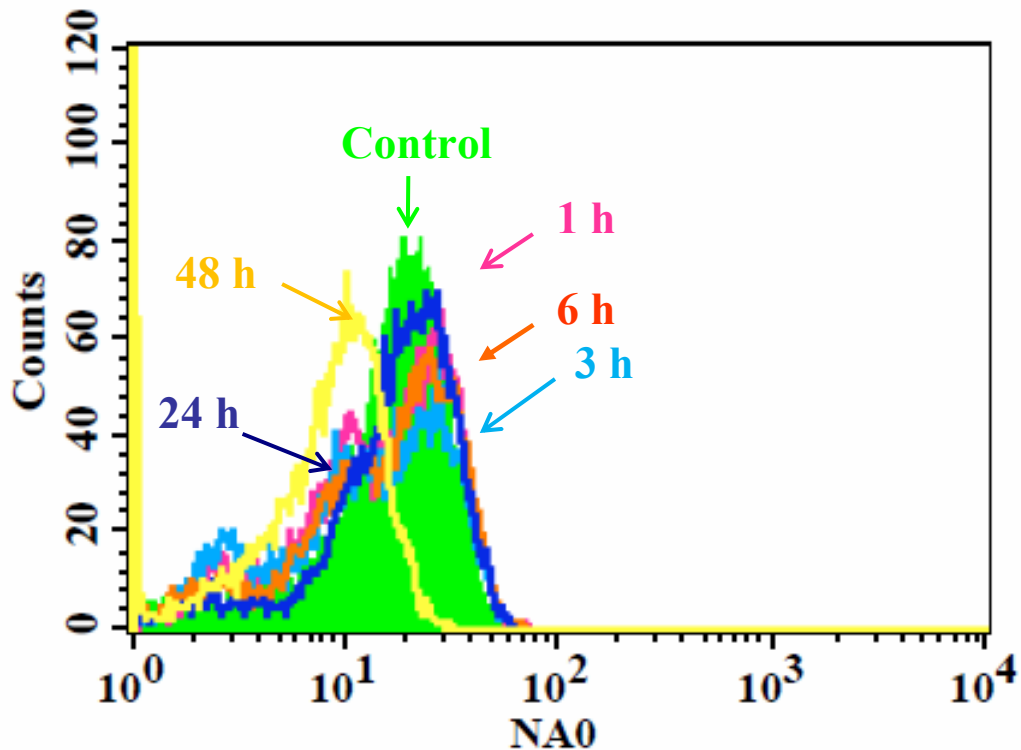


圖 5-13 25  $\mu\text{g/ml}$  SLE 對 U-2 OS 細胞粒線體膜電位之影響。(A) 藉由流式細胞儀分析 Rhodamine 123 螢光量，以判斷粒線體膜電位之變化。(B) Rhodamine 123 螢光量化統計圖。\*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

### 第十三節 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 粒線體膜氧化之影響

當粒線體內膜受到氧化傷害時，粒線體內膜之 Cardiolipin 與 NAO 染劑結合能力會變差，所產生的螢光量會降低，因此藉由螢光量的改變，即可觀察粒線體膜氧化的程度。實驗結果得知，經 SLE 誘導後和控制組相比，氧化程度有增加的現象。

(A)



白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 粒線體膜  
氧化之影響

(B)

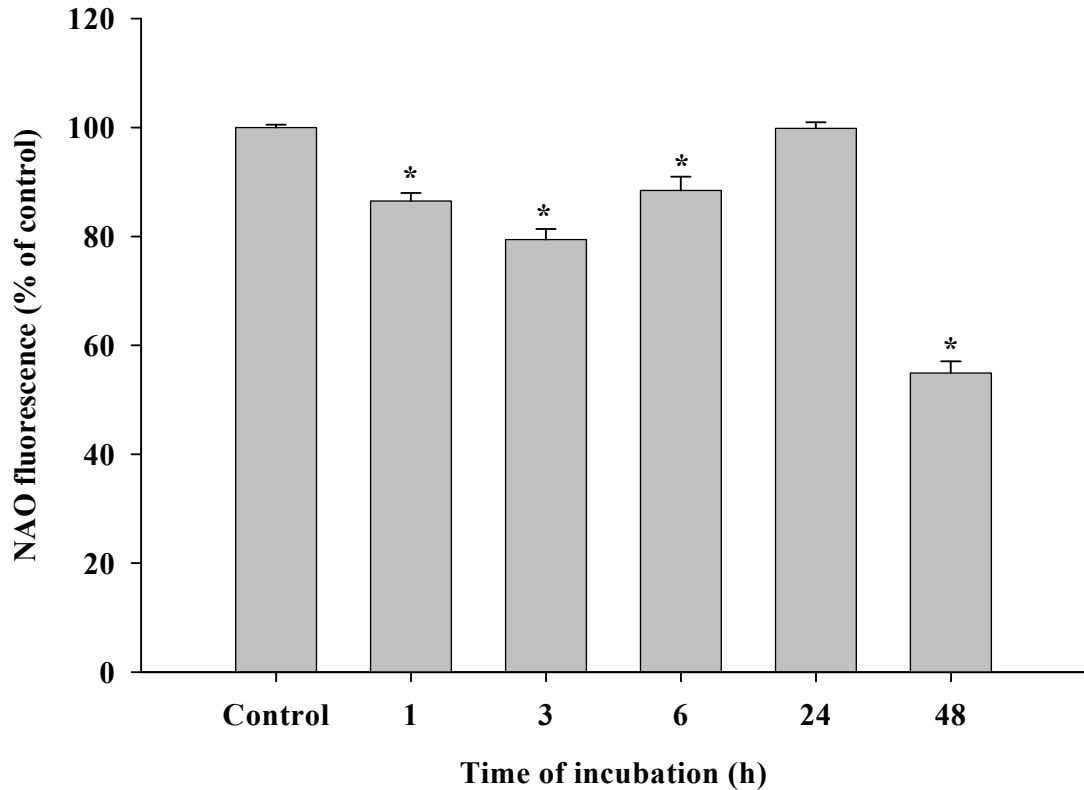
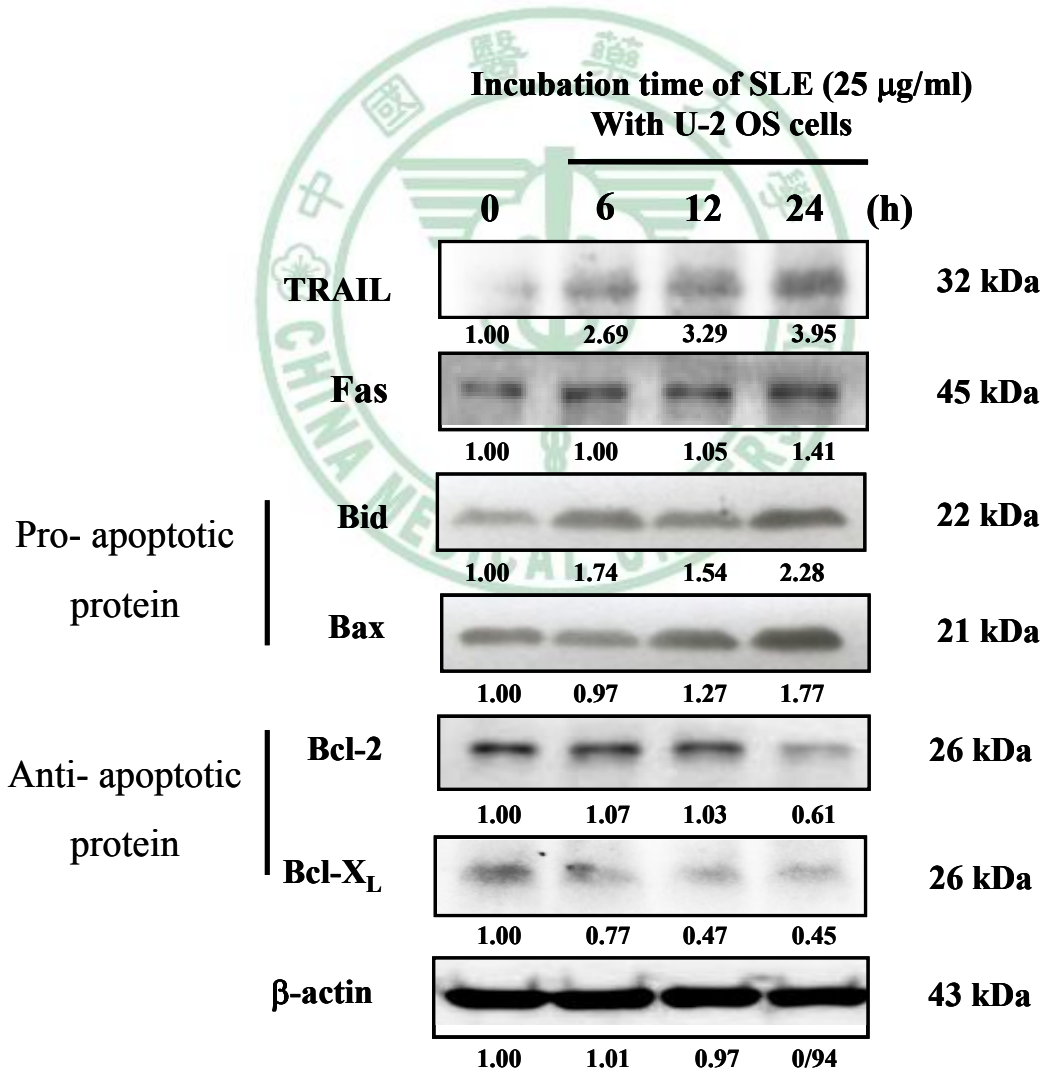


圖 5-14 25 µg/ml SLE 對 U-2 OS 細胞粒線體膜氧化程度之影響。(A)  
藉由流式細胞儀分析 NAO 螢光量，依螢光量判斷粒線體膜氧化程度。(B)  
NAO 螢光量化統計圖。 \* 表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控  
制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第十四節 探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞凋亡粒線體路徑 (Mitochondria-dependent apoptotic pathway) 相關蛋白之影響

以西方墨點法觀察粒線體路徑相關蛋白，發現 anti-apoptosis 蛋白 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 均被抑制，促進了死亡接受體蛋白 Fas、TRAIL 表現量以及 cytochrome c、Bax、Endo G 及 Caspase-3 等蛋白的表現量。



探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS細胞凋亡粒線體路徑 (Mitochondria-dependent apoptotic pathway) 相關蛋白之影響

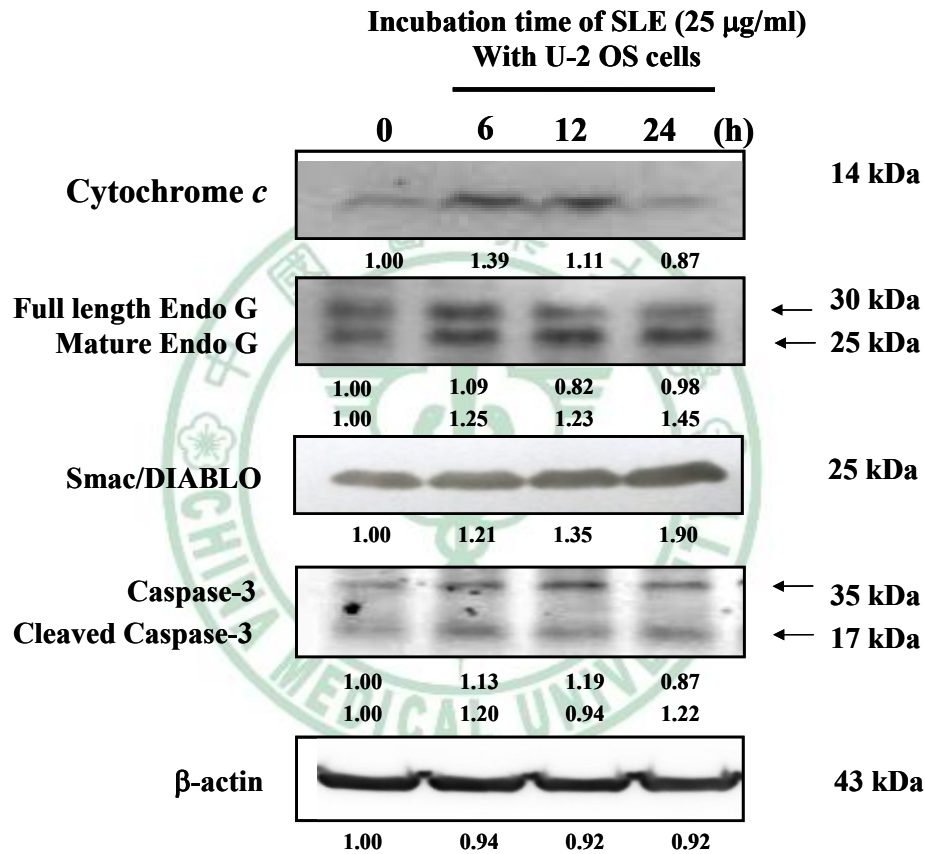
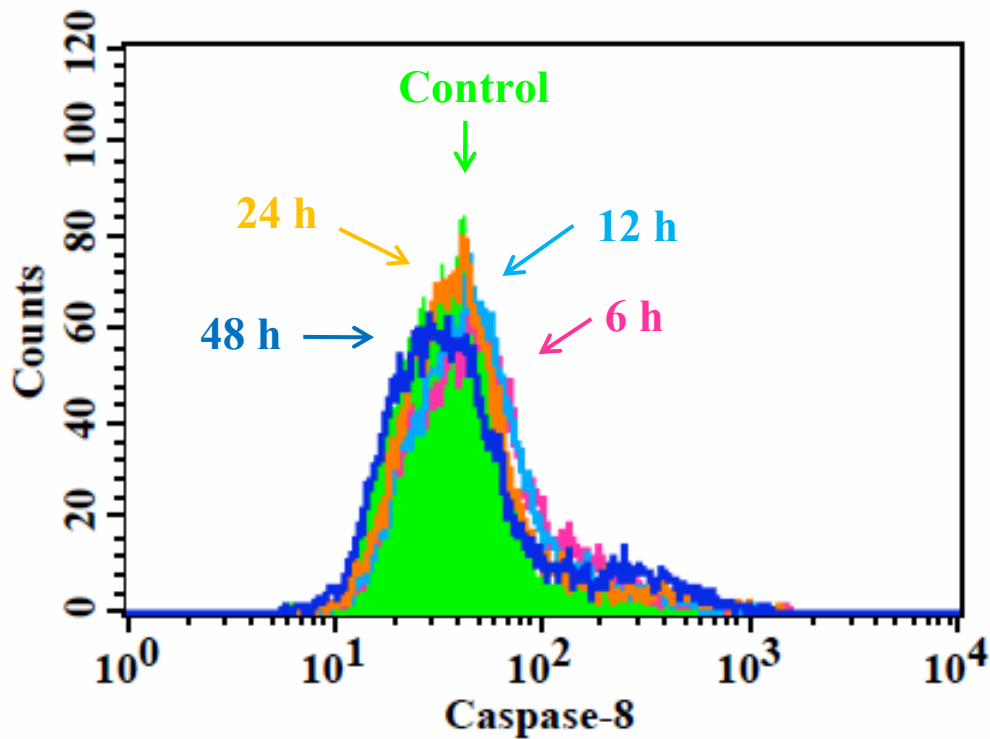


圖5-15 以25  $\mu$ g/ml SLE處理不同時間點 (0、6、12、24 h) 之人類骨肉瘤細胞 U-2 OS，利用西方墨點法檢測粒線體路徑相關蛋白 (如：外在路徑Fas、TRAIL，以及Bcl-2、Bax、Bcl-X<sub>L</sub>、cytochrome c、AIF、Endo G、caspase-3) 之表現量變化。

## 第十五節 利用流式細胞儀探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 之 Caspase-8, -9 活性之影響

本實驗主要利用流式細胞儀偵測 CaspaLux kit 來偵測細胞內 caspase-8, -9 活性之變化, peak 往右移動代表螢光量增加, 意即 caspase-8, -9 活性增加。由實驗結果得知, U-2 OS 細胞經過 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 處理 6 小時之後, caspase-8, -9 的螢光強度明顯增加, 我們可以由此推測 SLE 所造成的細胞凋亡可能是經由內在及外在路徑。

(A)





利用流式細胞儀探討白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 之 Caspase-8. -9 活性之影響

(B)

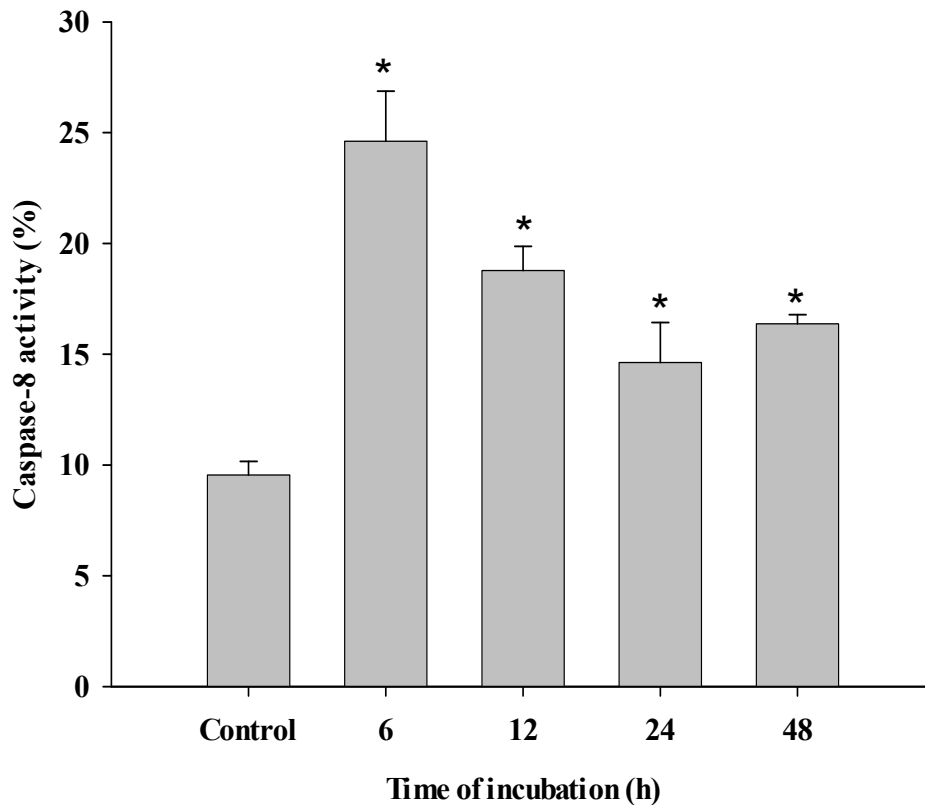


圖 5-16 25 µg/ml 之 SLE 作用於 U-2 OS 細胞不同時間點，以 CaspaLux 螢光染劑分析細胞內 caspase-8 活性的變化。(A) 以流式細胞儀分析細胞內 caspase-8 活性分析圖以及 (B) caspase-8 活性量化統計圖。\* 表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

利用流式細胞儀探討白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 之 Caspase-8. -9 活性之影響

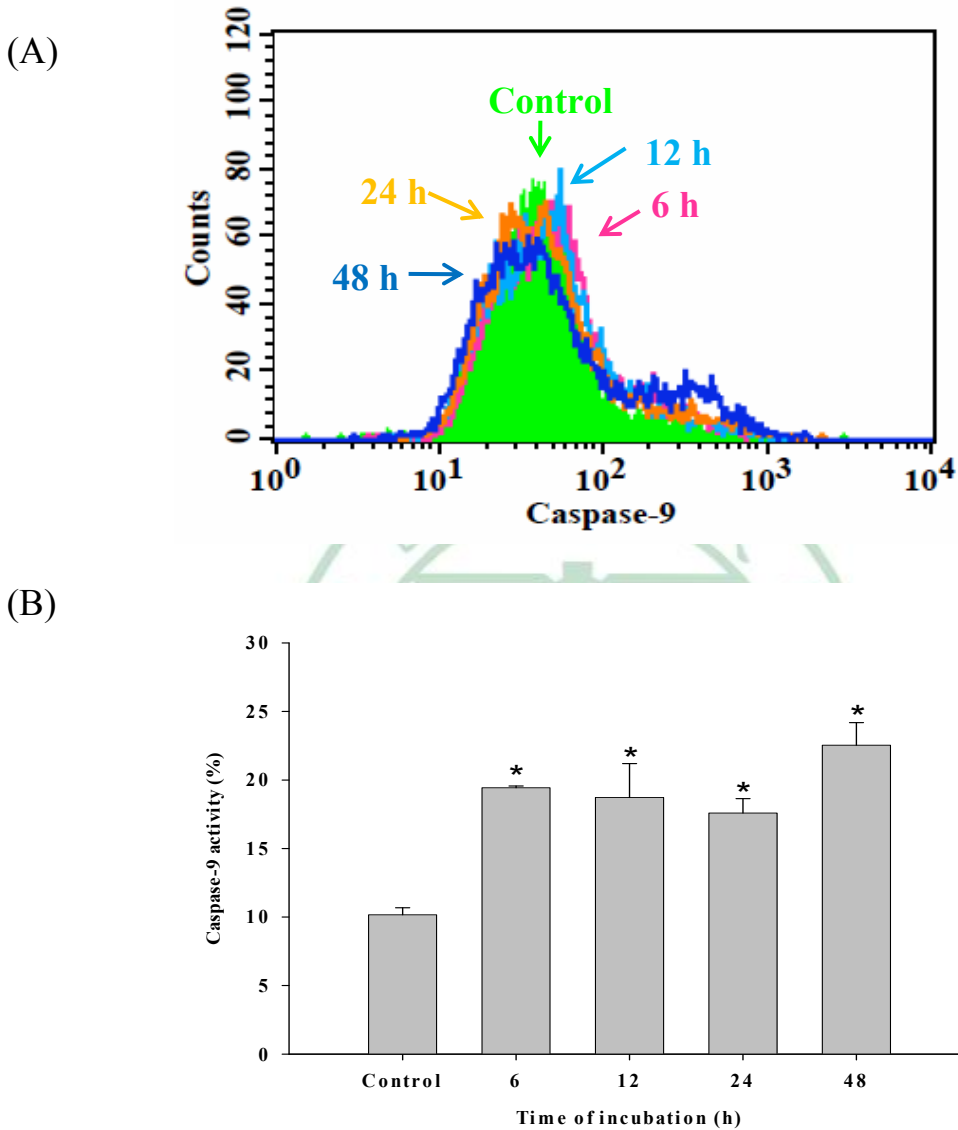


圖 5-17 25  $\mu\text{g/ml}$  之 SLE 作用於 U-2 OS 細胞不同時間點，以 CaspaLux 螢光染劑分析細胞內 caspase-9 活性的變化。(A) 以流式細胞儀分析細胞內 caspase-9 活性分析圖以及 (B) caspase-9 活性量化統計圖。\*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第十六節 利用免疫螢光染色法探討白英乙醇粗抽物 (SLE) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞蛋白轉位 (translocation) 表現

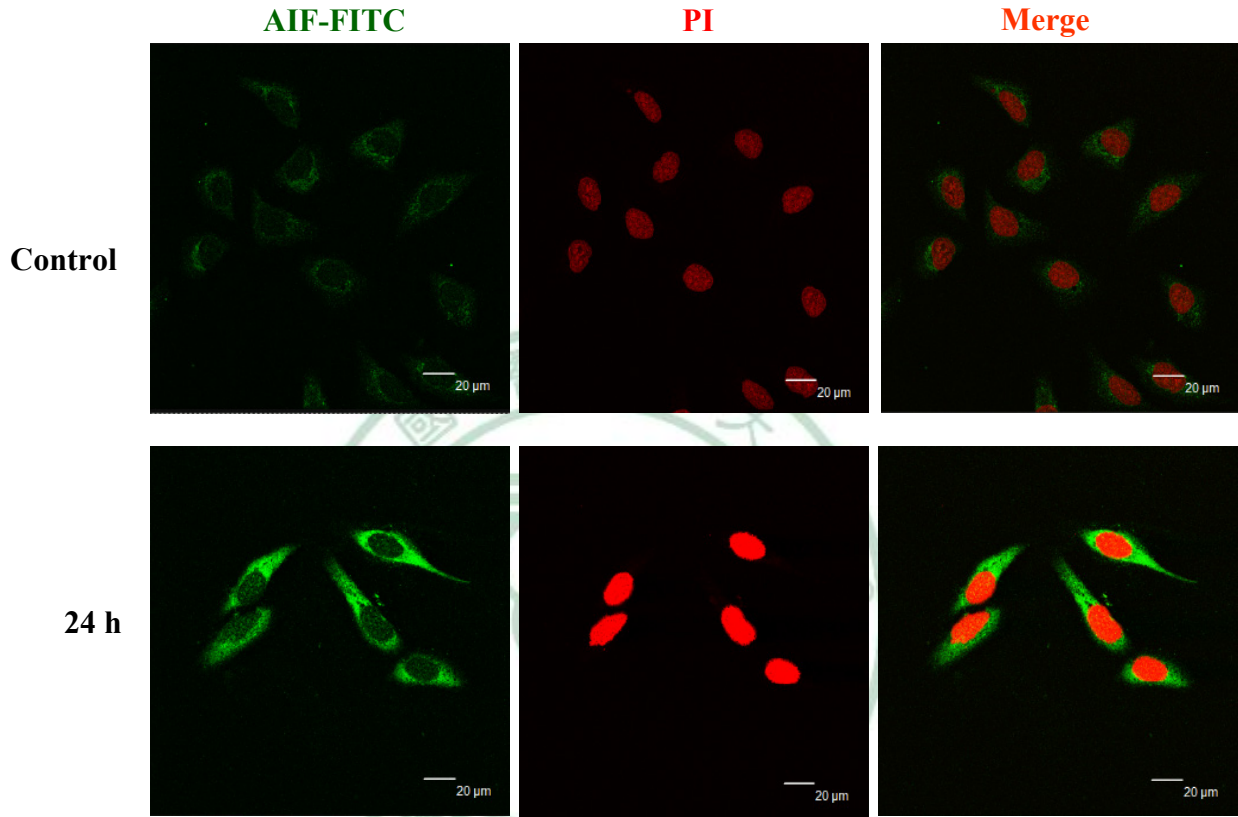


圖 5-18 利用共軛焦顯微鏡觀察 U-2 OS 細胞經 25 μg/ml 之 SLE 處理後，AIF 從粒線體釋放至細胞質，再轉位至細胞核中。一級抗體為 AIF，二級抗體標定 FITC 綠色螢光，細胞核染 PI。

利用免疫螢光染色法探討白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞蛋白轉位 ( translocation ) 表現

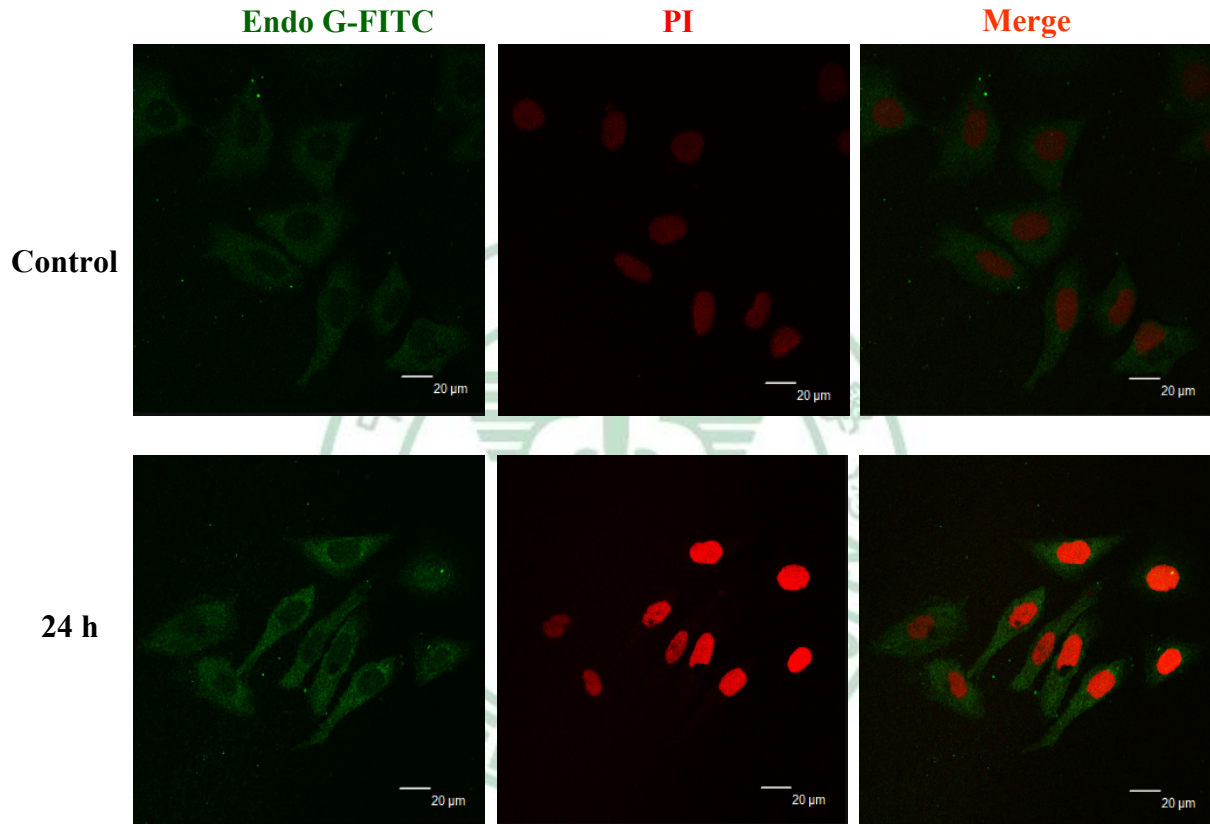


圖 5-19 利用共軛焦顯微鏡觀察 U-2 OS 細胞經 25 μg/ml 之 SLE 處理後，Endo G 從粒線體釋放至細胞質，再轉位至細胞核中。一級抗體為 Endo G，二級抗體標定 FITC 綠色螢光，細胞核染 PI。

利用免疫螢光染色法探討白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞蛋白轉位 ( translocation ) 表現

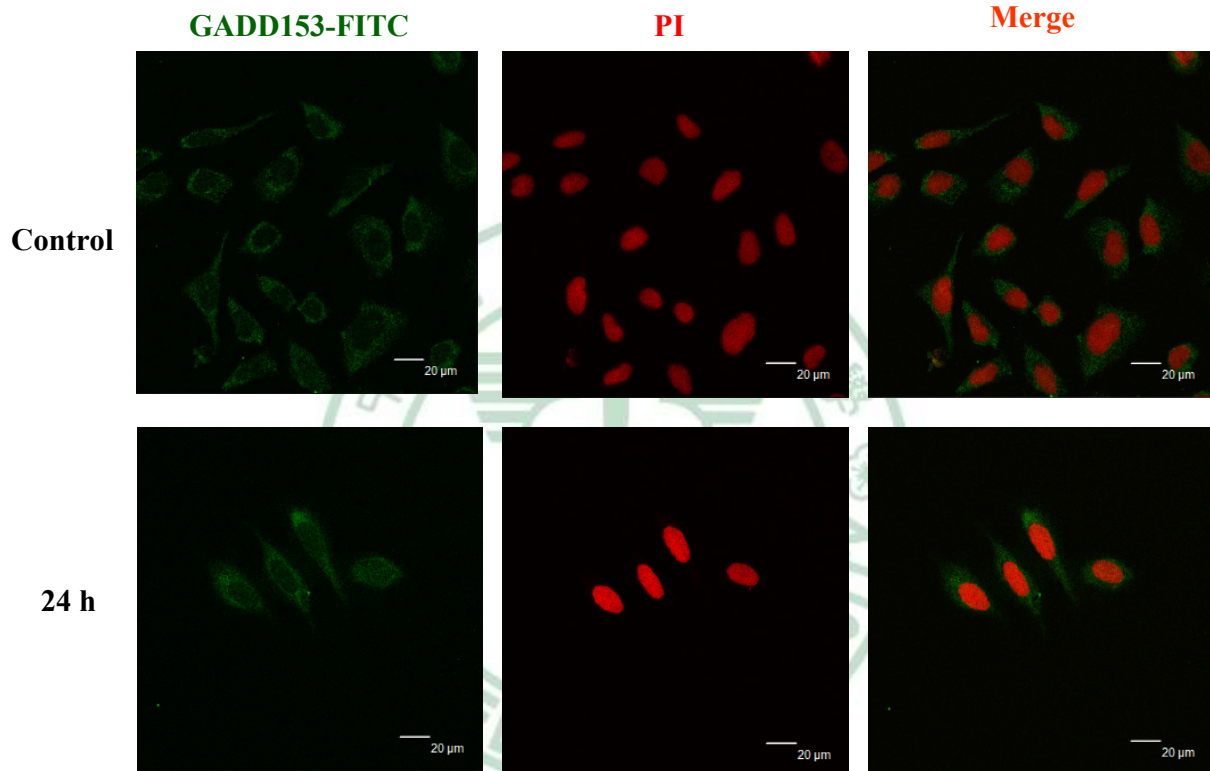


圖 5-20 利用共軛焦顯微鏡觀察 U-2 OS 細胞經 25 μg/ml 之 SLE 處理後， GADD153 蛋白表現量增加，並且轉位至細胞核中。一級抗體為 GADD153，二級抗體標定 FITC 綠色螢光，細胞核染 PI。

## 第十七節 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞轉移 (Migration)的影響

本實驗以 Wound Healing assay 觀察細胞經低濃度 (12.5  $\mu\text{g/ml}$  ) 與 IC50 濃度 25  $\mu\text{g/ml}$  之白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 誘導後,對 U-2 OS 細胞移動能力之影響。使用低濃度藥物主要是為了排除濃度太高導致細胞死亡,而非轉移的疑慮。實驗結果發現,在濃度 12.5 及 25  $\mu\text{g/ml}$  時 SLE 均可抑制 U-2 OS 細胞移動的能力。



白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS 細胞轉移 (Migration) 的影響

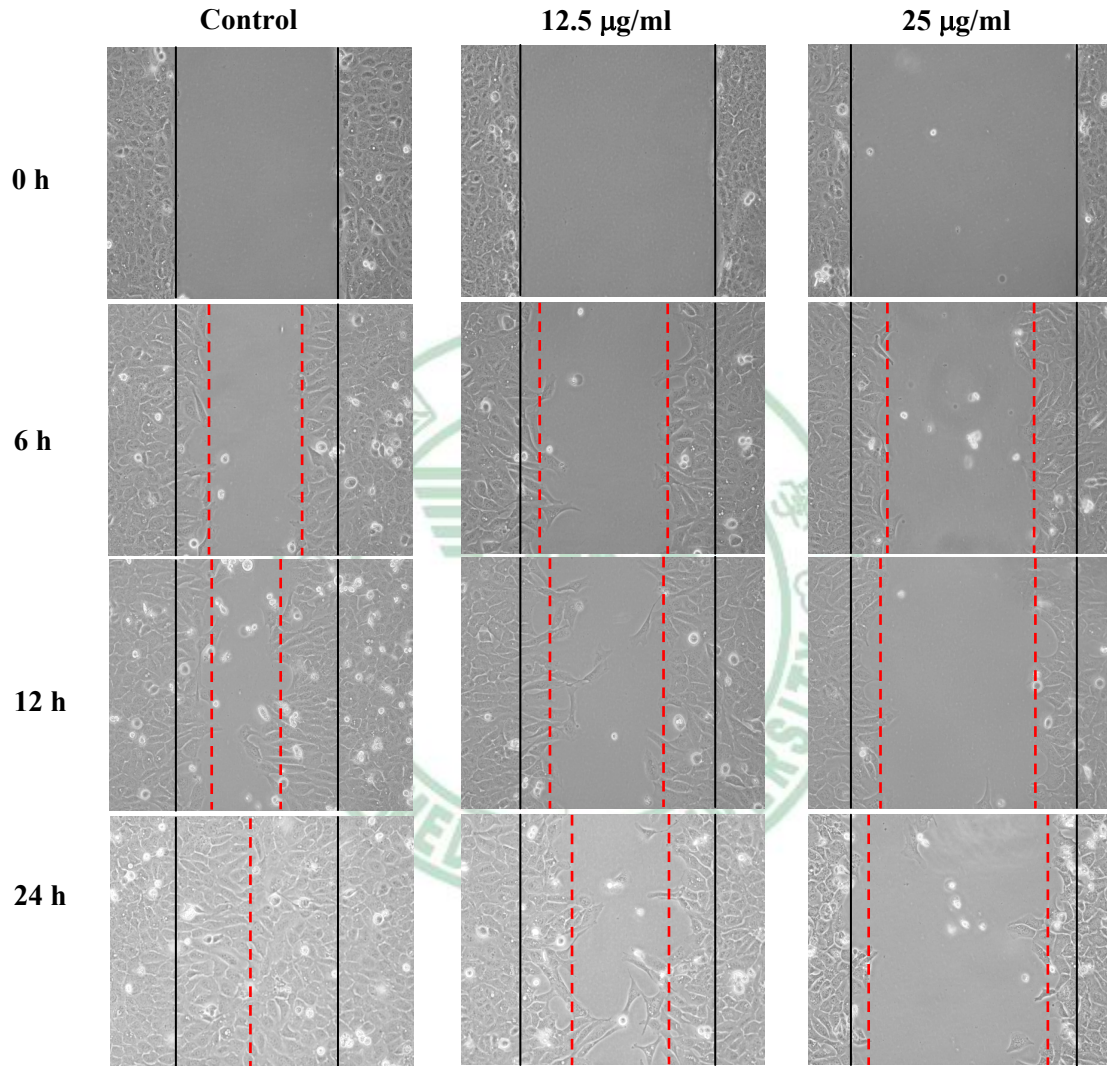


圖 5-21 U-2 OS 細胞經 12.5 及 25 µg/ml SLE 誘導後，以 Wound Healing assay 可觀察到控制組細胞有向外爬行的現象，而實驗組則明顯爬行能力受到抑制。

## 第十八節 白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 對人類骨肉瘤細胞 U-2 OS MMP-2 及 MMP-9 之影響

癌細胞轉移時需要基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases) 來分解細胞間質 (ECM)，利用 MMP-2、MMP-9 會分解 gelatin 的特性，進行 gelatin zymography 試驗，活性強所分解的 gelatin 就會較多，依 SDS-PAGE 上被分解的白色區塊，來判斷 MMPs 的活性強弱。細胞經以 25、50  $\mu\text{g/ml}$  白英乙醇粗抽物 ( SLE ) 誘導後，可明顯看到 MMP-9 與 MMP-2 的活性均被抑制。

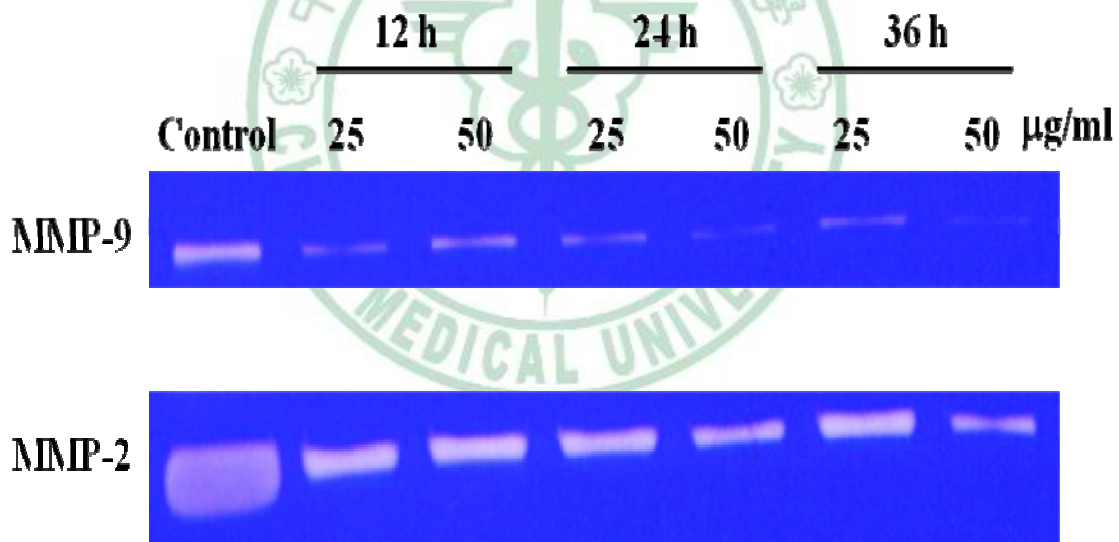


圖 5-22 U-2 OS 細胞經 25 及 50  $\mu\text{g/ml}$  SLE 誘導後，以 gelatin zymography 可觀察到 MMP-9 與 MMP-2 的活性均被抑制。



## 第六章 結果討論

白英 (*Solanum Lyratum* Thunb) 在傳統中醫藥治療中，早已流傳多年。本草綱目記載，白英對於清熱、解毒、祛風濕均有非常好的療效，前人也用來治療風濕關節痛、急性黃疸型肝炎，及抗發炎、抗腫瘤等<sup>69</sup>。而臨床上也使用白英來治療多種癌症，例如子宮頸癌、肺癌、骨癌、食道癌、肝癌等。

在過去研究當中，有學者提出，乙醇萃取之白英粗抽物對於人類肝癌細胞 BEL-7402、人類胃癌細胞 SGC-7901<sup>69</sup>、人類黑色素瘤 A375-S2 細胞、人類子宮頸癌 HeLa 細胞<sup>19</sup> 及人類胃癌 SGC-7901 細胞<sup>22</sup> 均有細胞毒性的情形產生；另外在動物模式中，隨著白英濃度的增加，小鼠肉瘤癌 S 180 細胞及小鼠肝癌 H22 細胞生長速率的抑制，均呈現藥物劑量依存性 (dose-dependent)<sup>69</sup>。也有研究將白英製成膠狀，注入大鼠皮下長達 90 天，由大鼠的血液生化指數及病理切片結果顯示，白英對大鼠的皮膚細胞並無毒性產生<sup>70</sup>。另外，也藉由抗氧化的作用來避免 oxLDL 造成內皮細胞的傷害<sup>71</sup>。

目前為止，有關白英的文獻並不多，最早的文獻大多著墨於成份分析<sup>72-76</sup>，到後來得知白英對正常細胞無毒性<sup>71</sup>，對許多癌細胞株卻能夠抑制生長，近十年，學者們開始更深入的去探討白英萃取物誘導細胞死亡的分子機制，例如有研究指出，白英萃取物藉由活化 Fas 及 Fas L 基因的表現，進而使人類子宮頸癌 HeLa 細胞生長受到抑制<sup>19</sup>。另外也藉由調控 Bcl-X<sub>L</sub>、caspase-9 和 Bid 基因表現，及活化 caspase-3 活性，進而誘導人類胃癌 SGC-7901 細胞凋亡<sup>22</sup>。雖然越來越多研究指出白英萃取物對

許多癌細胞株具有細胞毒性，但是卻無針對人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞做過相關研究，故本實驗的目的為探討白英乙醇粗抽物，是否有抑制 U-2 OS 細胞增生和轉移的能力。

本實驗利用白英 50% 乙醇粗抽物〔*Solanum Lyratum* ethanol extraction (SLE)〕作為實驗藥物，處理人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞 12、24 小時後，以流式細胞儀觀察其存活率 (圖 5-2)，結果發現劑量範圍從 12.5、25、50、75、100  $\mu\text{g/ml}$ ，存活率呈現劑量依存性 (dose-dependent)，即濃度越高細胞數減少，在 100  $\mu\text{g/ml}$  的濃度存活率甚至只剩下約 10%，並且細胞型態明顯皺縮變小 (圖 5-1)，此形態與文獻指出之細胞凋亡特性相符 (表 2-2-1)。

根據文獻指出，當細胞 DNA damage 發生時，細胞會先行修復 (DNA repair) 和細胞週期停滯 (Cell cycle arrest)，若受損情形無法修復，則會走向細胞凋亡 (Apoptosis)。因此我們利用 DAPI staining 及 Comet assay 等實驗來觀察 DNA damage 情形。當 DNA 斷裂時會結合上較多 DAPI 染劑，使螢光量增強<sup>77</sup>。由本實驗結果 (圖 5-6) 得知 U-2 OS 細胞經 12.5、25、50、75、100  $\mu\text{g/ml}$  白英乙醇粗抽物處理 24 小時後，其螢光亮度高於控制組，確實引起 U-2 OS 細胞核內染色質濃縮；另以 Comet assay 觀察，若 DNA 斷裂嚴重時，電泳時會將 DNA 拖出膜外形成長拖尾，由圖 5-5 細胞加入不同濃度 (25、50、75  $\mu\text{g/ml}$ ) 白英乙醇粗抽物培養 24 小時，實驗發現實驗組確實造成 DNA 斷裂，且隨濃度增加，拖尾長度也更加明顯。

在細胞週期方面，我們利用流式細胞儀偵測細胞週期的改變，所得到的結果為 (圖 5-3)，以 25  $\mu\text{g/ml}$  SLE 培養不同時間點 (0、12、24、48 h) 之人類骨肉瘤 U2 OS 細胞之細胞週期統計量化圖。在白英乙醇粗抽物

IC 50濃度 25  $\mu\text{g/ml}$  處理下，U-2 OS 細胞的 G0/G1 phase 和 sub G1 所量化的結果是比控制組明顯來得高。由上述結果說明了白英乙醇粗抽物不僅能使U-2 OS 細胞 cell cycle arrest，也促使產生細胞凋亡。

G1 phase 主要的角色為檢查染色體是否正常，為了之後進入負責染色體複製的 S 期做準備。其中調控細胞週期的蛋白為 Cyclin，而 Cyclin 藉由 Cdk 活化，當 Cyclin 與 Cdk 結合形成 Complex 才能夠活化下游基因，使細胞週期進行<sup>78</sup>。若加入藥物使癌細胞走向凋亡時，細胞週期也會跟著停滯。在過去文獻中所提及，p53 為 tumor suppressor protein，當 DNA 受損或者加入有細胞毒性的藥物時 p53 會被活化，停止細胞週期的進行，來修復 DNA，若其受損過度嚴重，無法修復時，會使細胞進行細胞凋亡反應。而當 p53 活化時，p21 亦被活化，p21 進而抑制 G0/G1 phase 的相關蛋白，使細胞停滯<sup>79</sup>。因此我們利用西方墨點法檢測調控細胞週期 G0/G1 phase 的蛋白質，例如 Cyclin E、Cdk6、p21、chk2 等相關蛋白。結果顯示 (圖 5-4)，白英乙醇粗抽物在短時間就會使 p21 及 Chk2 被活化，而在 6 小時也可看到下游蛋白 G0/G1 的 Cdk6 及 S phase 的蛋白 Cyclin E 表現量明顯被抑制，此結果說明了白英乙醇粗抽物確實使細胞週期停滯於 G0/G1 期，無法往 S 期前進。

本實驗使用流式細胞儀來檢測一系列 Apoptosis 途徑的分析，一開始我們著手的是觀察早期細胞凋亡的情形。因為凋亡早期的特色為細胞膜內的 Phosphatidyl Serine (PS) 會外翻至膜外，而利用 Annexin V 染劑對 PS 有高度親和性的特性，搭配 PI 染劑只能染死細胞的特性，就能夠辨別細胞死亡的方式<sup>80</sup>。由實驗量化的結果顯示 (圖 5-7 (B))，25  $\mu\text{g/ml}$  的白英乙醇粗抽物隨著時間增加 ( 3、6、12、24 小時) ，早期凋亡細胞的比

例也越來越高，但晚期細胞死亡的比例相對的也增加了(圖 5-7 (A))，這可能是白英粗抽物對癌細胞有直接毒殺效果所造成。

鈣離子釋出也是細胞凋亡的指標之一<sup>81-83</sup>。內質網最主要的功能為幫助蛋白質摺疊成穩定的結構和分泌蛋白質。當內質網受到破壞後，會有大量折疊錯誤的蛋白質聚集或鈣離子通透失衡，會產生所謂的內質網壓力(ER stress)。正常情況下，內質網上的跨膜蛋白(如：IRE1 $\alpha$ 、PERK、ATF6 $\alpha$ )會與幫助蛋白折疊的伴隨蛋白(Chaperone)，如：GRP78 (glucose-regulated protein 78)結合，ER stress產生時使得GRP78無法正確折疊蛋白，這些錯誤折疊的蛋白會競爭性的與GRP78結合，而解離掉IRE1 $\alpha$ 、PERK。另外GADD153 (growth arrest and DNA damage inducible gene 153)是一種轉錄因子，當內質網受到壓力時會使GADD153表現增加，走向細胞凋亡路徑，另外當細胞生長抑制時及DNA受損時GADD153亦會增加<sup>84</sup>。有文獻提及，GADD153能調控抑制Bcl-2的表現及促進Bax的表現以調節細胞凋亡<sup>85</sup>，因此鈣離子與粒線體之間與細胞凋亡有著非常密切的關係。本實驗以螢光染劑Fluo-3/AM偵測細胞內鈣離子濃度，結果發現(圖5-8)，當U-2 OS細胞經過25  $\mu$ g/ml白英乙醇粗抽物處理後，鈣離子在較短時間1、3、6小時皆明顯的釋放，而鈣離子路徑相關蛋白(圖5-9) GRP78、GADD153及caspase-4在6小時表現量皆有上升，而PERK在較後期的12小時開始表現，此結果說明白英乙醇粗抽物的確可經由鈣離子的釋放導致U-2 OS細胞內產生內質網壓力。

接著觀察細胞活性氧物質(ROS)的變化(圖5-10)，我們發現經過藥物處理後，U-2 OS細胞的ROS在統計上的結果並無顯著差異，且負責清除自由基的抗氧化蛋白(圖5-11)，包含Catalase及存在細胞質中的Zn/Cu-SOD，則可能因為沒有大量的ROS產生而呈現下降的情形。有文獻

指出，ROS並不是唯一造成細胞凋亡的因子，而是經由其他的路徑，像是 caspase-3-dependent pathway使細胞走向凋亡。

細胞凋亡主要可分為三條路徑。其一，經由 caspase-8 調控 caspase-3 走向細胞凋亡的外在路徑；第二，經由粒線體一連串反應活化 caspase-3 走向細胞凋亡的內在路徑（又稱為粒線體路徑）；第三，及內質網路徑。其中粒線體路徑再細分又可分為，caspase 相關路徑：主要受到 Bcl-2 family 的調控，結合至粒線體膜上影響膜電位，釋放 Cytochrome *c* 流至細胞質，活化 caspase-9 使 caspase-3 亦被活化走向細胞凋亡。不經由 caspase 的路徑：Bcl-2 family 結合至粒線體膜上造成孔洞，造成粒線體間質釋放出 apoptosis-inducing factor (AIF)和 Endonuclease G (Endo G) 至細胞質中，進而轉入細胞核內，造成 DNA 斷裂成片段最後走向細胞凋亡<sup>86</sup>。這些蛋白的釋放被認為與粒線體膜上一種稱為 mitochondrial permeability transition pore (MPTP)的巨大通道有關。MPTP 包含了兩大部分：1.在粒線體內膜與 adenine nucleotide translocator (ANT) 相關之蛋白質。2.在外膜的蛋白質 (voltage-dependent anion channel, VDAC)。MPTP 的開啟也被認為是使粒線體膜電位下降的主要原因。我們利用 Rhodamine 123 染劑專一性結合到粒線體上的特性，以流式細胞儀偵測粒線體膜電位的改變，實驗結果得知 (圖 5-13)，U-2 OS 細胞經由白英乙醇粗抽物處理後，從 24、48 小時粒線體膜電位開始下降。另外，Cardiolipin 在粒線體內膜會與 Cytochrome *c* 結合，受到過氧化氫的影響之後，兩者會分離，再由 Bid、Bax 使 Cytochrome *c* 引起下游蛋白活化導致細胞凋亡<sup>87</sup>。我們的實驗結果為 (圖 5-14)，U-2 OS 細胞經由白英乙醇粗抽物處理後，Cardiolipin 氧化的程度在 6 小時以內氧化約 10~20%，而到 48 小時甚至氧化

了 45%，猜測應為細胞死亡情形嚴重所導致的結果。在粒線體相關蛋白表現方面，可以觀察到 (圖 5-15)，U-2 OS 細胞經由白英乙醇粗抽物處理後，活化了粒線體路徑中 pro-apoptotic protein：Bax 表現，抑制 anti-apoptotic protein：Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>，使得 Cytochrome *c*、AIF、Endo G 釋放，caspase-3 跟著被活化。而外在路徑相關蛋白的表現，可由圖 5-15 得知，TRAIL 及 Fas 的表現量在 24 小時內明顯上升，caspase-8 在 24 小時被活化，以上結果和圖 5-16，利用 CaspaLux kit 偵測 caspase-8, -9 活性的結果分析圖 (圖 5-17、18)皆可說明，白英乙醇粗抽物可能經由外在及內在路徑誘導 U-2 OS 細胞凋亡。

另外利用免疫螢光染色法 (Immunofluorescence staining) 觀察 AIF、Endo G、GADD153 蛋白質在細胞內的分布情形，由圖 5-19、20、21 可以觀察到當加入白英乙醇粗抽物刺激時，AIF、Endo G 從粒線體釋放到細胞質中；而轉錄因子 GADD153 也在被活化後，轉位入細胞核中造成 DNA 的斷裂及反應細胞壓力的狀態。

在細胞轉移 (Matastasis) 方面我們利用 Wound healing assay<sup>88</sup> 以人為的方式製造傷口，觀察細胞爬行癒合的情形；及利用 Gelatin Zymography<sup>89</sup> 試驗，依金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteases, MMPs)的活性，以 MMPs 分解 gelatin 的區塊大小判斷細胞轉移的能力。實驗結果得知 (圖 5-22)，實驗組 12.5、25  $\mu\text{g/ml}$  白英乙醇粗抽物與控制組比較之下，確實能夠抑制 U-2 OS 細胞的爬行能力。而圖 5-23 的結果也可觀察到，實驗組 25、50  $\mu\text{g/ml}$  的白英乙醇粗抽物，有效抑制了 MMP-2 與 MMP-9 的活性。

## 第七章 實驗結論

綜觀以上實驗結果，白英乙醇粗抽物 (SLE) 誘導人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞生長抑制及細胞凋亡的機制，可列出下列幾點：

1. 白英乙醇粗抽物 (SLE)引起人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞死亡具有濃度依存性，實驗所測得之 IC50 為 25  $\mu\text{g/ml}$ 。
2. 以 DAPI 染色及彗星試驗得知白英乙醇粗抽物使得 U-2 OS 細胞染色質濃縮及斷裂。
3. 經過藥物刺激後，細胞週期停滯於 G0/G1 期，相關蛋白 p21、Chk2 被活化，負責週期前進之蛋白 Cyclin E、Cdk6 表現則被抑制。
4. 以流式細胞儀檢測凋亡相關之分子機制，實驗結果得知，白英乙醇粗抽物會使凋亡細胞比例、鈣離子釋放量、一氧化氮 (Nitric oxide)、Caspase-8, -9 的螢光量增加，以及 MMP、Cardiolipin 螢光量下降，這些結果都可推測其細胞死亡的路徑。
5. 以西方墨點法觀察，抑癌蛋白 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 下降，而 Bax、Fas、AIF、Endo G、cytochrome c、caspase-3, -8 表現量上升，證明細胞會經由外在及內在路徑誘導細胞凋亡，搭配免疫螢光染色的結果，更證實了 AIF、Endo G 及 GADD153 均有釋放到細胞質中，再轉位進入核內的表現。
6. 另外在轉移相關的實驗當中，我們也發現白英乙醇粗抽物能夠有效的抑制人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞的爬行與轉移。

目前本實驗大多的數據已經證實，白英乙醇粗抽物是經由多條路徑，包括內在、外在及內質網路徑而對人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞具有生長抑制及誘導凋亡的效果。由於鈣離子的釋放在時間點上，是整個實驗當中最先發生的一個變化，而 caspase-3 則是凋亡過程最下游的蛋白，當然我們想更進一步去了解整個凋亡的路徑，是否由鈣離子的變化來主導。因此在存活率的實驗，一組預處理鈣離子螯合劑 BAPTA，另一組預處理 caspase-3 抑制劑(z-DEVD-fmk)，來觀察這兩組細胞的存活率是否會回升，而結果顯示（資料無附於本論文中），兩組細胞的存活率均沒有回升的現象。因此我們猜測，加了抑制劑，其存活率沒有回升的原因可能為：白英為一個生物活性很強，但成分十分複雜的粗抽物，實驗證實它能夠經由多條的途徑來毒殺細胞，當其中一條途徑被抑制時，依然能由其他條路徑使細胞死亡；即使抑制掉最下游的蛋白 caspase-3，或許還能夠經由 caspase-independent pathway 來進行。

以目前針對白英的研究得知，無論是 *in vitro* 或 *in vivo* 的研究結果都顯示出白英具有很強的生物活性，加上生長遍佈台灣低海拔地區，取得容易，若有更多學者一同努力，鑽研白英對抗腫瘤的機轉研究及臨床試驗，白英可望成為未來醫療保健或抗癌藥物的一顆明日之星。也期望本研究能為抗癌天然藥物方面盡一份微薄之力，未來造福癌症病友遠離苦痛。



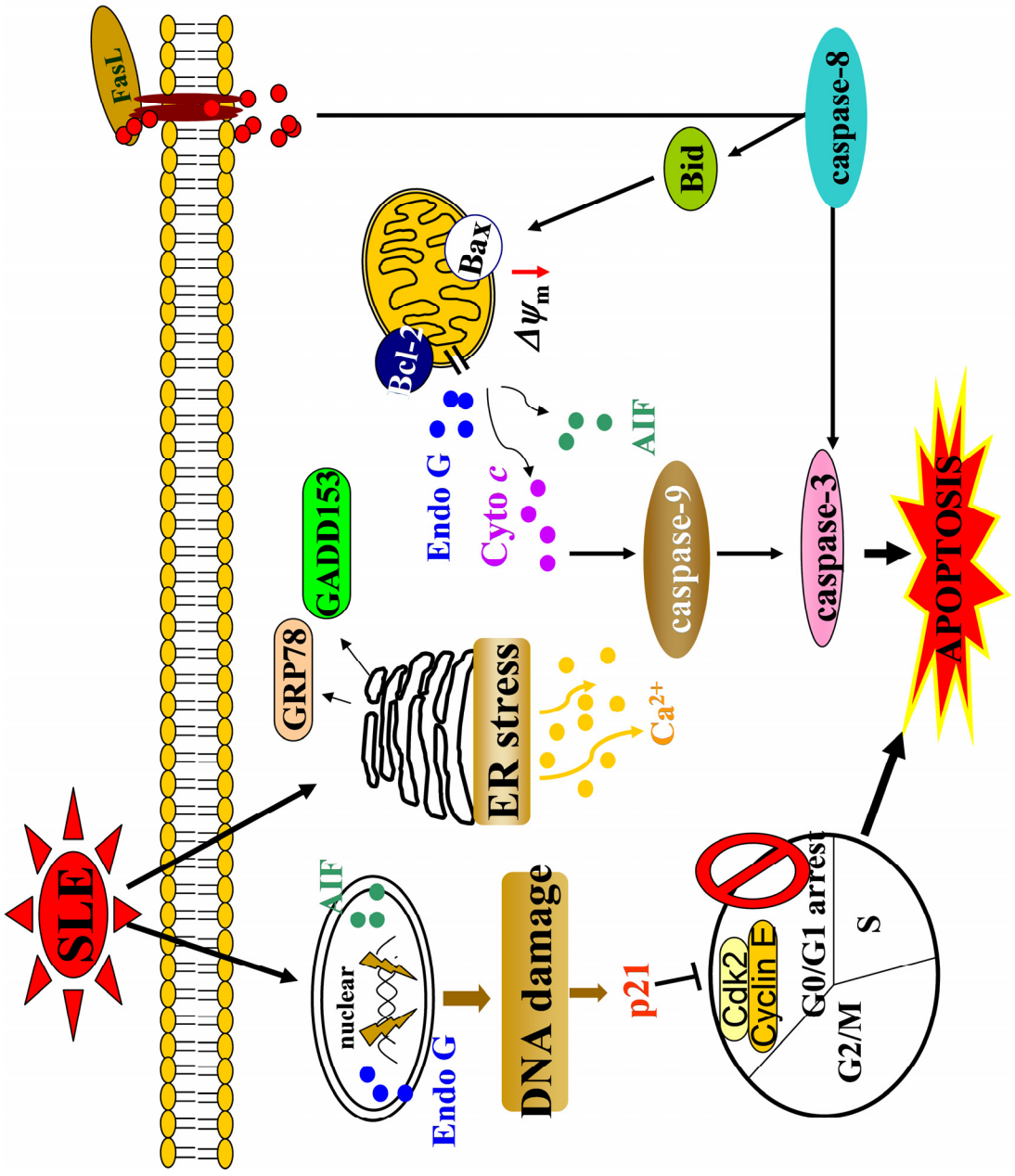


圖 5-23 白英乙醇粗抽物 (SLE) 誘導人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞凋亡之路徑圖

## 第八章 參考文獻

- 1 行政院衛生署. <http://www.doh.gov.tw> (2009).
- 2 Eyre R, F. R., Mubwandarikwa E, et al. . Incidence and survival of childhood bone cancer in northern England and the West Midlands, 1981-2002. *Br J Cancer* (2009).
- 3 中華民國兒童癌症基金會. <http://www.ccfroc.org.tw/child/> (2007).
- 4 Mahajan S, J. M., George T. . Osteosarcoma as a second neoplasm after chemotherapeutic treatment of hereditary retinoblastoma: a case report. . *Quintessence Int* (2008).
- 5 P, A. Surgical management of primary bone cancer. . *Bull Acad Natl Med* (2009).
- 6 Enneking WF, S. S., Goodman MA. . A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. . *Clin Orthop Relat Res* (1980).
- 7 Portugal J, B. M., Mansilla S. . Cell death pathways in response to antitumor therapy. . *Tumori* (2009).
- 8 台灣野生植物資料庫. <http://plant.tesri.gov.tw/plant/>.
- 9 謝文全. 神農本草經 (古今功能輯注本). 中國醫藥學院 中國藥學研究所 (1995).
- 10 清、趙學敏. 本草綱目拾遺. 人民衛生出版社 (1986).
- 11 梁、陶弘景. 神農本草經集注. 人民衛生出版社 (1986).
- 12 尚志鈞. 名醫別錄輯校. 人民衛生出版社 (1986).
- 13 岡西為人. 重輯新修本草. 國立中國醫藥研究所 (1982).
- 14 那琦、謝文全、林麗玲. 重輯本草拾遺. 華夏文獻資料出版社 (1988).
- 15 謝文全、林豐定. 重輯開寶重定本草. 中國醫藥學院 中國藥學研究所 (1998).
- 16 Murakami K, e. a. chem. *Pharm bull* (1985).
- 17 Shi, W. R. Y., L. Influence of Solanum lyratum Thunb on HL-60. *J. of Fujian College of TCM* **12**, 36-38 (2002).
- 18 Shan, C. M., Hu, J. J., Du, G. H. Apoptosis of hepatoma cell line BEL-7404 induced by extracts of Solanum lyratum Thunb. *Chinese Journal Of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (2001).
- 19 Wei, X., Li, C. G., Nong, S., Zhu, X. Y. & Huang, X. M. The influence of Solanum lyratum Thunb extract on apoptosis and the expression of fas/fasL genes in Hela cells. *Zhong Yao Cai* **29**, 1203-1206 (2006).

- 20 Lee, J. H. *et al.* Caspase and mitogen activated protein kinase pathways are involved in Solanum lyratum herba induced apoptosis. *J Ethnopharmacol* **123**, 121-127 (2009).
- 21 Hsu, S. C. *et al.* Crude extracts of Solanum lyratum induced cytotoxicity and apoptosis in a human colon adenocarcinoma cell line (colo 205). *Anticancer Res* **28**, 1045-1054 (2008).
- 22 Wan, F. S., Wu, J., Li, H., Tu, S. & Yu, L. H. Study on apoptosis of human stomach SGC-7901 cells induced by extracts of Solanum lyratum. *Zhong Yao Cai* **32**, 245-249 (2009).
- 23 Liu, H. R. *et al.* Antiproliferative activity of the total saponin of Solanum lyratum Thunb in Hela cells by inducing apoptosis. *Pharmazie* **63**, 836-842 (2008).
- 24 H, S. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* (1995).
- 25 Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354 (1997).
- 26 Wood W, T. M., Weber R, Camp V, et al. Mesenchymal cells engulf and clear apoptosis footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* (2000).
- 27 Kindt TJ, O. B., Goldsby RA. *Kuby Immunology* (2006).
- 28 Raffray M, C. G. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacology & therapeutics* (1997).
- 29 Budihardjo I, O. H., Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and development biology* (1999).
- 30 Li YC, L. H., Yang JH, et al. Baicalein-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress through elevations of reactive oxygen species and mitochondria dependent pathway in mouse-rat hybrid retina ganglion cells. *Neurochem Res* (2008).
- 31 Lockshin, R. A. & Zakeri, Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* **23**, 2766-2773 (2004).
- 32 Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316 (1998).
- 33 Reed, J. C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236 (1998).
- 34 Li YC, L. H., Yang JH, et al. Baicalein-Induced Apoptosis via Endoplasmic Reticulum Stress Through Elevations of Reavtive Oxygen Species and Mitochondria Dependent Pathway in Mouse-Rat Hybrid Ganglion Cells. *Neurochem Res* (2008).
- 35 Miller, M. D., Cai, J. & Krause, K. L. The active site of Serratia endonuclease contains a conserved magnesium-water cluster. *J Mol Biol* **288**, 975-987 (1999).

- 36 Eric Lam, N. K., Michael Lawton. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* (2001).
- 37 H, W. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* (2002).
- 38 Dale E. Bredesen, R. V. R., Patrick Mehlen. Cell death in the nervous system. *Nature* (2006).
- 39 Ferri KF, K. G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* (2001).
- 40 Shen, J., Snapp, E. L., Lippincott-Schwartz, J. & Prywes, R. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol* **25**, 921-932 (2005).
- 41 Rutkowski, D. T. & Kaufman, R. J. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* **14**, 20-28 (2004).
- 42 Mark P.Mattson, S. L. C. Calcium orchestrates apoptosis. *NATURE CELL BIOLOGY* (2003).
- 43 Golias CH, C. A. a. C. K. Cell proliferation and cell cycle control: A mini review. *Int J Clin Pract* (2004).
- 44 Wang CJ, H. Y., Chu CY. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by escultin. *Cancer Letter.* (2002).
- 45 Martinez AM, A. M., Martin F, Cavadore JC, Labbe JC, Doree M. Daul phosphorylation of the T-loop in Cdk7: Its role in controlling Cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* (1997).
- 46 Lundberg AS, W. R. Control of the cell cycle and apoptosis. . *Eur J Cancer.* (1999).
- 47 Gartel AL, T. A. The role of the Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* (2002).
- 48 Hartwell, L. H. & Kastan, M. B. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828 (1994).
- 49 Norbury C, N. P. Animal cell cycle and thier control. *Annu Rev Biochem* **61**, 411-470 (1992).
- 50 Pines, J. Arresting development in cell-cycle control. *Trends Biochem Sci.* **19**, 143-145 (1994).
- 51 Nagase H, V. R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* (2006).
- 52 Wartenberg M, D. F., Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB J.* (2001).
- 53 Eves P, K. E., Simpson C, Layton C, Dawson R, Evans G, Mac NS. Melanoma invasion in reconstructed human skin is influenced by skin

- cells-investigation of the role of proteolytic enzymes. . *Clin Exp Metastasis*. (2003).
- 54 Kai Kessenbrock, V. P., Zena Werb. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *CELL* (2010).
- 55 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63 (1983).
- 56 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).
- 57 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).
- 58 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).
- 59 Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**, 167-190 (2000).
- 60 Koizumi, S. *et al.* Flow cytometric functional analysis of multidrug resistance by Fluo-3: a comparison with rhodamine-123. *Eur J Cancer* **31A**, 1682-1688 (1995).
- 61 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).
- 62 Sheng, J. Z., Wang, D. & Braun, A. P. DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein)diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 931-940 (2005).
- 63 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).
- 64 Rosa Ide, A., Einicker-Lamas, M., Bernardo, R. R. & Benchimol, M. Cardiolipin, a lipid found in mitochondria, hydrogenosomes and bacteria was not detected in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* **120**, 215-220 (2008).
- 65 Wada, A. *et al.* Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **44**, 142-150 (2006).
- 66 Deryugina, E. I. & Quigley, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor

- metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 9-34 (2006).
- 67 Enever, P. A., Shreiber, D. I. & Tranquillo, R. T. A novel implantable collagen gel assay for fibroblast traction and proliferation during wound healing. *J Surg Res* **105**, 160-172 (2002).
- 68 Donaldson, J. G. Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 21**, Unit 21 23 (2002).
- 69 Ren, J., Feng, G. N., Wang, M. W. & Sun, L. X. Primary study on the anti-tumor effect of ethanol extracts of *Solanum lyratum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **31**, 497-500 (2006).
- 70 Su, X. Y., Qu, C. H., Zhang, G. Y. & Lai, W. Study of long-term toxicity on applying *Solanum lyratum* on rat skin. *Zhong Yao Cai* **30**, 1282-1285 (2007).
- 71 Kuo, W. W. *et al.* Crude extracts of *Solanum lyratum* protect endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action. *J Vasc Surg* **50**, 849-860 (2009).
- 72 Yahara, S., Morooka, M., Ikeda, M., Yamasaki, M. & Nohara, T. Two New Steroidal Glucuronides from *Solanum lyratum*, III. *Planta Med* **52**, 496-498 (1986).
- 73 Murakami, K., Saijo, R., Nohara, T. & Tomimatsu, T. Studies on the constituents of *Solanum* plants. I. On the constituents of the stem parts of *Solanum lyratum* Thunb (author's transl). *Yakugaku Zasshi* **101**, 275-279 (1981).
- 74 Lee, Y. Y., Hsu, F. L. & Nohara, T. Two new soladulcidine glycosides from *Solanum lyratum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **45**, 1381-1382 (1997).
- 75 Ye, W., Wang, H., Zhao, S. & Che, C. Steroidal glycoside and glycoalkaloid from *Solanum lyratum*. *Biochem Syst Ecol* **29**, 421-423 (2001).
- 76 Yang, J. Z., Guo, G. M., Zhou, L. X. & Ding, Y. Studies on chemical constituent of *Solanum lyratum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **27**, 42-43 (2002).
- 77 Hua ZJ, X. M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res.* (2000).
- 78 Wang CJ, H. Y., Chu CY. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculin. . *Cancer Letter.* (2002).
- 79 Adrian M Senderowicz, E. A Sausville preclinical and clinical development of Cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute.* (2000).

- 80 Kirsch, T., Swoboda, B. & Nah, H. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **8**, 294-302 (2000).
- 81 Rao RV, H. E., Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *J Biol Chem.* (2001).
- 82 McCullough KD, M. J., Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. GADD153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* (2001).
- 83 JJ., L. Dying a thousand deaths: Redundant pathway from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology.* (2005).
- 84 Kadowaki H, N. H., Ichijo H. . Survival and apoptosis signals in ER stress: The role of protein kinases. *J Chem Neuroanat.* (2004).
- 85 McCullough KD, M. J., Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. . GADD153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* (2001).
- 86 Fumarola C, G. G. Stress-induced apoptosis: Toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis.* (2004).
- 87 Kumar, B., Kumar, A., Pandey, B. N., Mishra, K. P. & Hazra, B. Role of mitochondrial oxidative stress in the apoptosis induced by diospyrin diethylether in human breast carcinoma (MCF-7) cells. *Mol Cell Biochem* **320**, 185-195 (2009).
- 88 Rodriguez, L. G., Wu, X. & Guan, J. L. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* **294**, 23-29 (2005).
- 89 Ratnikov, B. I., Deryugina, E. I. & Strongin, A. Y. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest* **82**, 1583-1590 (2002).