



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

苯並咪唑衍生物 MPTB 誘發人類軟骨瘤細胞凋亡

The novel benzimidazole derivative, MPTB, induced cell apoptosis in human
chondrosarcoma cells

指導教授：湯智昕 博士

研究生：林倉裕

中華民國九十九年六月

誌謝

六月的台中，已經透露出夏天的炎熱，而我，也將隨著鳳凰花開的季節，完成修業兩年的碩士班生活。此刻的我，腦海中浮現的是這些日子以來的點點滴滴，有歡笑、有淚水，有挫折壓力、也有溫暖的感動。

首先，我要感謝親愛的父母，因為你們對我的栽培，還有無微不至的照顧，才能造就我今天的成就。還有兩位弟妹，謝謝你們對我這個哥哥的關心。雖然發生很多事情兩年前，對實驗一竅不通的我，從最基礎的開始學起。在此要感謝我的指導老師：湯智昕老師，在這段期間對我的指導以及關心，並且給予我最好的實驗環境及資源，讓我可以充分的發揮。還有要感謝另一位老師：譚思濰老師，對於我在生活和學業和感情上的關心及鼓勵，因為有兩位老師的照顧，才能使我順利完成碩士修業。同時，也感謝口試委員曾文培老師和楊順發老師和盧大宇老師對於論文的修改指正。除此之外，還要感謝在這兩年中陪我度過的實驗室夥伴們：軒輕學長和小天學長，謝謝你帶領我熟悉實驗室的生活，並且教導我許多實驗的事情；小蝦米及巧雯，有你在的實驗室總是充滿歡笑，我不會忘記跟你吃香喝辣、唱歌的日子；先賜學長，謝謝你陪伴我度過最難熬的二年級，在這期間不斷的聽我訴苦並且安慰我，讓我可以順利的繼續走下去；容慈，謝謝妳對我國文上的造詣有大大的提升，也是妳讓我對詩詞的認識有更開闊的見識；如芳學姐，感謝你在實驗上的大力相助，讓這本論文得以順利誕生；雅惠學姐、筱琪學姐、柏村學長、欣珊學姐、大頭學長、將軍學弟、咩學弟、婉瑜、諾萇、以及實驗室的各位，由衷感謝你們的陪伴。還有基醫所的同学、學長姊們：馬老師的實驗室的永國同學以及各位學弟妹跟我的陪伴，並給予我許多鼓勵。還有我的女朋友惠詒，謝謝你一路來的陪伴在研究所期間我們從認識而交往謝謝妳對我的包容以及支持。這一路走來，雖然辛苦，卻也受益良多，慶幸我始終沒有放棄，一直走到最後。要感謝的實在太多，我將會永遠把這段日子的點點滴滴，永銘在心。

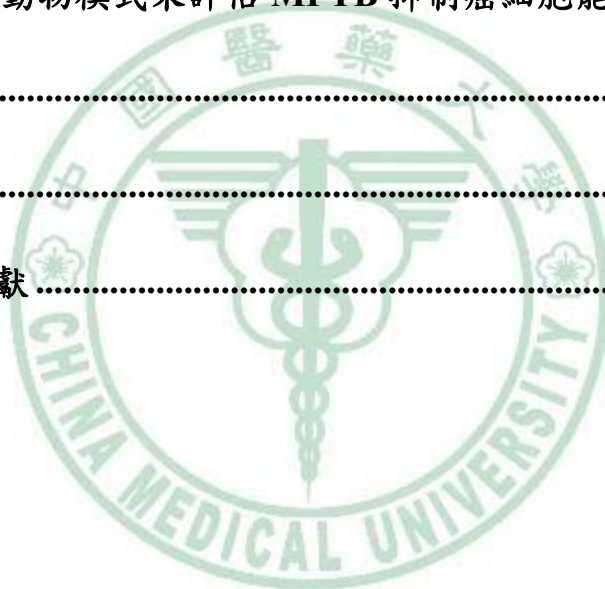
倉裕 2010/6/30

目錄

目錄	I
附圖目錄	IV
附表目錄	V
縮寫對照表	VI
縮寫對照表	VI
中文摘要	VIII
英文摘要	IX
第一章 緒言	1
第一節 軟骨癌	1
1. 軟骨	1
第二節 軟骨肉瘤分類	3
1. 典型軟骨肉瘤(classic chondrosarcoma)	3
2. 去分化型軟骨肉瘤(dedifferentiated chondrosarcoma)	4
3. 間葉型軟骨肉瘤(mesenchymal chondrosarcoma)	4
第三節 凋亡	5
1. 細胞凋亡介紹	5
2. 細胞凋亡和細胞壞死的區別	6
3. 細胞凋亡的機制路徑	10

4. 第一階段	10
5. 第二階段	15
6. 鈣離子 Ca^{2+} 與細胞凋亡	19
7. 細胞週期	19
第四節 藥物介紹	23
第二章 材料與方法	27
第一節 實驗材料	27
1. 細胞培養及來源	27
2. 儀器設備與材料	29
第二節 實驗方法	32
1. 藥物對細胞存活率測定	32
2. 流式細胞儀去觀察細胞凋亡	34
3. 蛋白質定量及西方墨點法 (western blot)	38
4. 凋亡蛋白的活性測定	40
5. 定量聚合連鎖反應 (q-PCR)	42
6. 體外動物試驗 (In Vivo)	43
7. 統計方法	44
第三章 結果	45
1. 苯並咪唑衍生物對人類軟骨肉瘤細胞之影響	45

2. 苯並咪唑衍生物對人類軟骨肉瘤細胞是否會誘發凋亡.....	46
3. 苯並咪唑衍生物誘發人類軟骨肉瘤細胞凋亡是否和粒線體有關	46
4. MPTB 引發人類軟骨肉瘤細胞內鈣離子的濃度改變	47
5. MPTB 增加 GRP78, GRP94 及 calpain 的活性	48
6. MPTB 引起細胞凋亡現象中 caspases 所扮演的角色	51
7. 利用動物模式來評估 MPTB 抑制癌細胞能力	52
第四章 討論	54
第五章 結論	58
第六章 參考文獻	59



附圖目錄

Fig 1. Structural changes of cells undergoing necrosis or apoptosis.	8
Fig 2. Apoptosis 和 necrosis 的圖像及英文比較表	9
Fig 3. Caspase structure.	17
Fig 4. Conducted cell cycle	22
Fig 5. Benzimidazole structure.....	26
Fig 6. MPTB structure.....	26
Fig 7. The effects of MPTB on cell viability and colony formation in human chondrosarcoma cells.	67
Fig 8. MPTB induced apoptosis of human chondrosarcoma cells.....	69
Fig 9. Assay mitochondrial membrane potential and mitochondrial membrane potential stain. Detection of Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xl and cytochrome c release after MPTB treating.	71
Fig 10. MPTB induced Ca^{2+} release in chondrosarcoma cells.....	73
Fig 11. GRP78, GRP94, calpain I and calpain II activation are involved in MPTB-mediated cell apoptosis in human chondrosarcoma cells.	75
Fig 12. MPTB induces the activation of caspases in human chondrosarcoma cells.....	77
Fig 13. MPTB reduces tumor growth in SCID mice.	79

附表目錄

Table 1. 市面上販售有 Benzimidazole 基團的藥物..... 25



縮寫對照表

AIF : Apoptosis-inducing factor

APS : Ammonium persulfate

ATF6 : Activating transcription factor 6

Bak : Bcl-2 antagonist / Killer 1

Bax : Bcl-2 associated X protein

BAPT/AM : 2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

Bcl-2 : B cell lymphoma-2

BSA : Bovine serum albumin

Caspase : Cysteine dependent aspartate specific Protease

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phenylindole

DMSO : Dimethyl sulfoxide

ECL : Enhanced chemiluminescence reagents

Endo G : Endonuclease G

ER : Endoplasmic reticulum

FACS : Flow cytometry

FBS : Fetal bovin serum

GRP 78 : Glucose-regulated protein 78

GRP 94 : Glucose-regulated protein 94

MMP : Mitochondria membrane potential

MAPKKK : Mitogen-activated protein kinases kinases kinases

PBS : Phosphate buffer saline

PARP : Poly ADT-ribose polymerase

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis

PCD : Programmed cell death

PCR : Polymerase chain reaction

PI : Propidium iodide

PVDF : Polyvinylidene difluoride

RT : Reverse transcription

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SCID : Severe Combined Immune Deficiency

siRNA : Small interfering RNA

shRNA : Small hairpin RNA

SRB : Sulforhodamine B

TEMED : *N,N,N',N'*-Tetramethyl-ethylenediamine

TUNEL : Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling



中文摘要

人類軟骨肉瘤是一種惡性初級的骨頭腫瘤，化學療法和放射性治療對其治療成效不大，新藥之開發時為一件刻不容緩之工作。之前研究表示苯並咪唑衍生物可治療癌症和骨頭方面的病症，以及 metabotropic glutamate receptor type 1 (mGlu1) 相關的疾病(如：抑制神經細胞死亡、帕金森氏症、偏頭痛、大腦栓塞、抗焦慮等…)。本篇論文主要是探討苯並咪唑衍生物 5-methyl-2(pyridine-3-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl) benzimidazole; MPTB 對人類軟骨肉瘤細胞的影響，我們發現 MPTB 對兩株人類軟骨肉瘤細胞株 JJ012 和 SW1353 能誘發細胞凋亡，但對正常軟骨細胞沒有影響，給予細胞 MPTB 能誘發粒線體功能缺失和 Bak 和 Bax 正向調控，另外一方面 MPTB 能觸發內質網壓力及改變細胞質鈣離子的平衡和增加 glucose-regulated protein 78 和 glucose-regulated protein 94 表現，MPTB 也增加 calpain 表現及活性，將 glucose-regulated protein 78 和 calpain siRNA 轉染入細胞能抑制 MPTB 對 JJ012 所誘發的細胞凋亡，重要的是動物試驗展現給予 MPTB 治療 21 天後的能抑制腫瘤的生長，在本篇研究中證實 MPTB 能成為治療人類軟骨腫瘤細胞新的抗癌藥劑。

英文摘要

Chondrosarcoma is a malignant primary bone tumor that responds poorly to both chemotherapy and radiation therapy. Therefore, it is important to explore novel and adequate remedies. The benzimidazole derivatives are used for treatment of cancer and bone diseases and treatment of metabotropic glutamate receptor type 1 (mGlu1)-related diseases (epilepsy, inhibition of nerve cell death, Parkinson's disease, migraine headache, cerebral infarction, neurogenic pain, and anxiety disorder). This is the first study of investigate the anticancer effects of the benzimidazole derivative (5-methyl-2(pyridine-3-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzimidazole; MPTB) in human chondrosarcoma cells. Here we found that MPTB induced cell apoptosis in two human chondrosarcoma cell lines, JJ012 and SW1353 but not in primary chondrocytes. Treatment of cells with MPTB induced mitochondrial dysfunction and Bax and Bak up-regulation. On the other hand, MPTB triggered endoplasmic reticulum (ER) stress, as indicated by changes in cytosol calcium levels, and increased glucose-regulated protein 78 (GRP78) and GRP 94 expression. MPTB also increased calpain expression and activity. Transfection of cells with GRP78 or calpain siRNA reduced MPTB-mediated cell apoptosis in JJ012 cells. Importantly, animal studies have revealed a dramatic 44% reduction in tumor volume after 21 days of treatment. This study demonstrates that MPTB may be a novel anticancer agent for the treatment chondrosarcoma cells.

第一章 緒言

第一節 軟骨癌

軟骨肉瘤是惡性原發性骨腫瘤，不易使用化學及放射線來治療，因而對於軟骨肉瘤的治療便成了相當大的挑戰；目前臨床上常以手術作為治療軟骨肉瘤的首選；然而缺乏有效的輔助療法，使得軟骨肉瘤產生了不好的預後及常接著有著續發性惡性的發展，所以，研發軟骨肉瘤新的治療方式是當務之急。

正常人的軟骨組織位於關節表面，是一層不具有血管以及神經的透明組織，其功能是使外來的衝擊力均勻分布，讓承受的表面積擴大，以及有效的緩衝外來的衝擊力並保護軟骨組織本身不會受到損傷軟骨，主要是由特定的細胞外間質以及軟骨細胞所組成，細胞外間質主要是負責軟骨的正常功能，軟骨細胞則是負責維持細胞外間質的維持，當細胞外間質的合成率和降解率持平時，軟骨組織則維持恆定，只要出現問題迫使穩定的狀態受到破壞，軟骨組織將收到傷害以及改變(Aigner et al., 2006)。

1. 軟骨

軟骨，是脊椎動物特有的胚胎性骨骼。可分為透明軟骨、彈性軟骨和纖維軟骨，為一種略帶彈性的堅韌組織，在有機體內負起支持和保護作用。由軟骨細胞、纖維和基質構成。基質含有 70%的水分，有機成分主

要是多種蛋白，如軟骨粘蛋白、膠原和軟骨硬蛋白等。在胎兒和年幼期，軟骨組織分佈較廣，後來逐漸被骨組織代替。成年人軟骨存在於骨的關節面、肋軟骨、氣管、耳廓、椎間盤等處。

軟骨可分為三種：

(1) 透明軟骨(hyaline cartilage)

透明軟骨是一種有點堅硬，半透明的物質；含有大量第二型 collagen 和 proteoglycan。形成關節的光滑表面蓋住骨頭的末端。它在耳朵，喉嚨裡、肋骨、胸骨之間也被發現。

(2) 有彈性的軟骨(elastic cartilage)

有彈性的軟骨包含大量有彈性的纖維(elastin)，在整個基體(matrix)散佈。硬而有彈性，包覆著關節處的骨頭末端。可在耳廓及耳內的管狀通道及會厭裡發現。

(3) 纖維軟骨(fibrocartilage)

纖維軟骨主要由第一型collagen構成；形成緻密的結構為特點。提供高張力及支撐力，這是一種白色，非常堅韌的物質。與透明軟骨相比較，它包含更多的collagen 和較少的 proteoglycan。因此，它的特性比透明軟骨更接近於肌腱。常分佈在需要頻繁接受壓力處像是椎間盤，恥骨癒合線和與肌腱與韌帶相連接之處。

第二節 軟骨肉瘤分類

軟骨肉瘤就是由軟骨產生的惡性腫瘤。可分為下列三種軟骨瘤類型：

典型軟骨肉瘤(classic chondrosarcoma)：年紀較大，低惡性度，局部性積極治療。

去分化型軟骨肉瘤(dedifferentiated chondrosarcoma)：高度惡性腫瘤。

間葉型軟骨肉瘤(mesenchymal chondrosarcoma)：年紀較輕，需要整合治療。

各類軟骨肉瘤介紹

1. 典型軟骨肉瘤(classic chondrosarcoma)

惡性的原發性骨腫瘤：

(1) 特徵是惡性的軟骨增殖，佔所有原發性骨腫瘤的 20%，在惡性骨腫瘤的發生率僅次於骨肉瘤。男女發生率相同；通常大於 40 歲；會發生在任何骨頭，常見在骨盆和股骨。發生在年紀較輕病人傾向是高惡性度的腫瘤，會轉移。

(2) 病因學：

以原發性腫瘤發生，或是以一個良性骨軟骨瘤(osteochondroma)或一個內生軟骨瘤(enchondroma)發生惡性退化(malignant degeneration)的次發性腫瘤。

(3) 分期方式：

- (a) 原發病灶的電腦斷層或核磁共振。
- (b) 胸部電腦斷層：排除肺轉移。
- (c) 骨骼掃描：排除其它位置的骨轉移。

2. 去分化型軟骨肉瘤(dedifferentiated chondrosarcoma)

(1) 罕見的高惡性度腫瘤：

特徵是低惡性度的軟骨肉瘤經過惡性退化(degeneration)產生完全惡性的軟組織腫塊；此軟組織腫塊與 malignant fibrosarcoma or MFH 難以區分。男女發生率相同；常見於年紀較大族群(>60 歲)。皆是致命的，因為肺轉移在疾病早期發生。大約 10%的軟骨肉瘤可能經歷"去分化"變成為 fibrosarcoma 或 osteosarcoma。

(2) 組織病理學：

軟組織腫塊中一個完全惡性的纖維狀基質，與 MFH or fibrosarcoma 相同。病灶的骨髓內或骨頭的部分通常包含低惡性的軟骨區域。

3. 間葉型軟骨肉瘤(mesenchymal chondrosarcoma)

(1) 罕見的惡性骨腫瘤：

可以一個軟組織原發腫瘤出現。由一個包含紡錘形細胞成分的未分化圓細胞或小細胞基質和腫瘤的軟骨形成所組成(惡性的未分化圓形細胞成分，所以具高度惡性)。比較而言具放射敏感性，對電療反應很好，因為認為它的圓細胞(round cell)成分就像其它的 round cell sarcoma 一樣，對放

射線具有高度之敏感性。男女發生率相同；於年輕族群，很少小於 20 歲或大於 40 歲。最常見於股骨，其次是扁平骨(骨盆、肋骨、顱骨、脊椎)。可能發生在腦膜旁區(parameningeal area)，傾向在腦膜旁的區域(頭頸部, 脊椎)。

(2) 組織病理學：

由一大片未分化的惡性圓細胞所組成(有時候和伊汶氏肉瘤相當類似)。也可能包含較具分化或胖嘟嘟的紡錘形細胞(與骨肉瘤所見類似)。在多數腫瘤之內可以見到大量的腫瘤性軟骨(Aigner et al., 2006)。

第三節 凋亡

1. 細胞凋亡介紹:

細胞凋亡(apoptosis)是一種細胞自發性的死亡方式，又可稱為細胞計劃性死亡(programmed cell death, PCD)，當細胞於生理或病理情況或受到外來的傷害，像是物理性的傷害、缺氧等，細胞就會為了維持細胞間的恆定，而進行細胞凋亡(Lam et al., 2001)。在1964年的文獻得知細胞會發生死亡並非是意外，而是遵循一系列安排好的步驟然後慢慢的進行有計劃性的自我毀滅(Lockshin and Williams, 1965)，1972年，Kerr 與他的同事們首次創造了Apoptosis 這個名詞，來解釋細胞在正常的情況下經歷衰老、凋亡而完成一個生長週期的現象(Kerr et al., 1972)。此外，細胞凋亡也會啟動一系列的訊息傳遞串聯 (signal transduction cascade) 影響各階

段的進行，精密地調控程序性死亡的效果。

細胞凋亡和細胞壞死(necrosis)最大的不同就是凋亡不會引起發炎反應，而凋亡也扮演幾個重要生理意義：

(1) 形態發生:個體生長時確保其正常生長發育，例如:蛙趾發生過程中，趾間組織會形獨立分開的蛙趾，在組織生成時，一開始細胞製造的數量過多，這時細胞的凋亡開始進行調控，選擇留下來的功能細胞 (Zuzarte-Luis and Hurle, 2002)，所以器官型態的生成和細胞凋亡有關。

(2) 維持內環境穩定(homeostasis):主要是跟細胞增殖與凋亡取到平衡。例如，免疫系統產生數百萬的B細胞和T細胞，而免疫細胞在成熟時卻會有百分之九十五的細胞會經由細胞凋亡的途徑而死亡 (Rathmell and Thompson, 2002)。

(3) 將受損的細胞和危險性的細胞排除:凋亡發揮了有效的防禦機制。當防禦機制出現問題，就會出現不正常的細胞凋亡，因而導致數種人類疾病的產生，包括癌症、自體免疫疾病、AIDS、神經退化性疾病等 (Mignotte and Vayssiere, 1998)。

2. 細胞凋亡和細胞壞死的區別

細胞凋亡主要的特徵是會產生一連串的細胞形態變化，包括:(1)細胞皺縮 (cell shrinkage)、(2)染色質濃縮 (chromatin condensation)、(3)細胞膜磷脂質外翻 (phosphatidylserine externalization) 、(4)DNA片段化 (DNA

fragmentation)和(5)凋亡小體 (apoptotic body) 形成(Fig. 1), 最終由吞噬細胞將凋亡小體吞噬, 過程並不會引起發炎反應(Robertson and Orrenius, 2000)。

細胞壞死則是受到嚴重的外來刺激分子或構造上有嚴重損傷時所引發的病理反應, 細胞會因脹大而至細胞膜破裂, 由於細胞發生破裂, 因此會釋放出一些發炎物質而引起局部發炎反應, 傷害到鄰近的細胞或組織, 引發一連串發炎反應。其特徵有: (1)胞質內粒線體和內質網腫脹細胞核內DNA發生斷裂或濃縮, (2) 細胞膜被破壞, 釋放內容物而引起發炎反應, (3) 不能活化核酸內切酶(Formigli et al., 2000; Majno and Joris, 1995)(Fig. 2)。



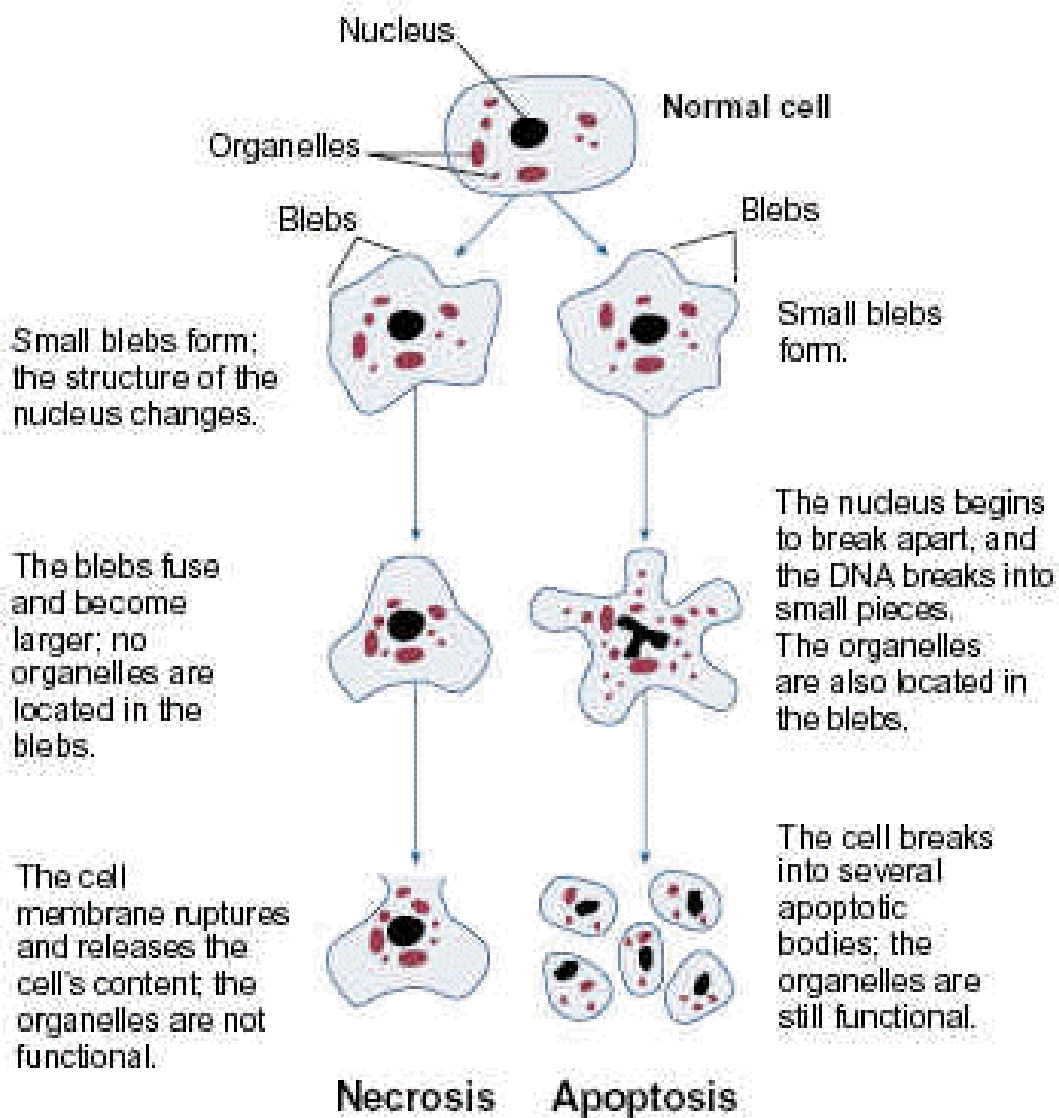


Fig 1. Structural changes of cells undergoing necrosis or apoptosis.

Necrosis occurs when neurons are damaged by a trauma or metabolic injury and typically involves the concurrent death of groups of adjacent cells. Cells undergoing necrosis initially swell and their internal components, or organelles, break down. The cells eventually rupture and spill debris that leads to local inflammation. This inflammation can then result in the death of adjacent cells. (Goodlett and Horn, 2001)

Differential features of apoptosis and necrosis	
Apoptosis	Necrosis
Affects single cells	Affects groups of neighboring cells
No inflammatory response	Significant inflammatory response
Cell shrinkage	Cell swelling
Membrane blebbing but integrity maintained	Loss of membrane integrity
Increased mitochondria membrane permeability, release of proapoptotic proteins and formation of apoptotic bodies	Organelle swelling and lysosomal leakage
Chromatin condensation and non-random DNA fragmentation	Random degradation of DNA
Apoptotic bodies ingested by neighboring cells	Lysed cells ingested by macrophages

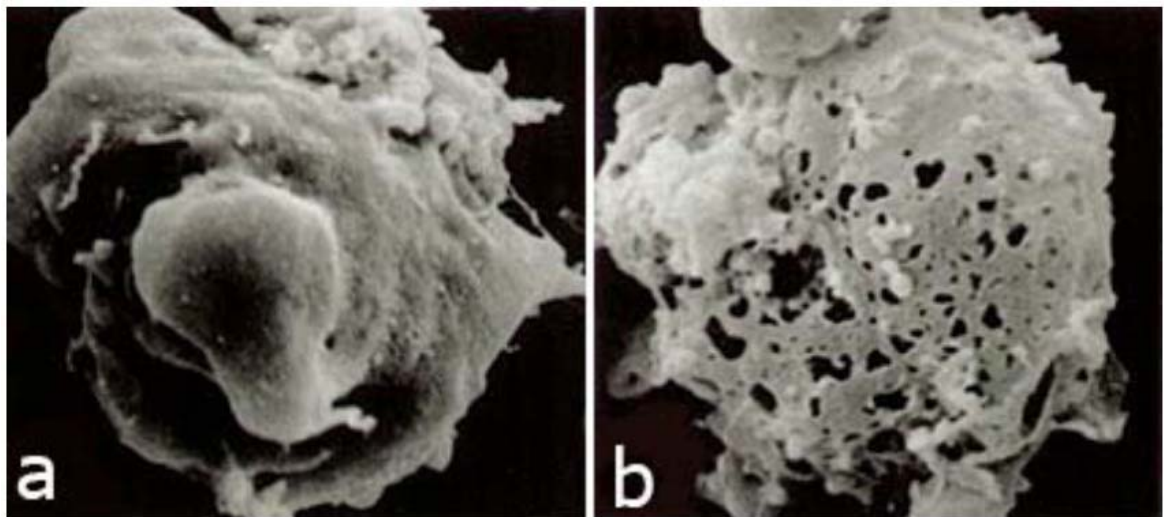


Fig 2. Apoptosis 和 necrosis 的圖像及英文比較表

(a) SEM of an apoptotic cell, 5000 × magnification; (b) SEM of a necrotic cell, 5000 × magnification

Reprinted from the Purdue CDROM Vol 4, Purdue University with permission. Publisher: J. Paul Robinson

3. 細胞凋亡的機制路徑

細胞凋亡的過程分兩個階段：

(1) 第一階段：細胞凋亡之調控機制包括兩大類外生性路徑 (extrinsic pathway)：配體 (ligand) 與受體 (receptor) 之結合，也稱為死亡接受器引發的路徑 (the death receptor-initiated pathway)。內生性路徑 (intrinsic pathway)：起始於Bax 轉位至粒線體上和Bcl-2 競爭，決定 cytochrome c 是否被釋放並活化下游caspase酵素，也稱為粒線體路徑 (the mitochondrial pathway)。

(2) 第二階段：經由 caspase 酵素作用使得細胞內蛋白質和切割 DNA，引起細胞凋亡。

影響細胞凋亡的基因蛋白包括：Bcl-3 families、caspase families、p53、Apaf-1.....等等。

4. 第一階段

(1) 內生性路徑 (intrinsic pathway) — 粒腺體路徑 (mitochondrial pathway)

引發細胞凋亡最具代表性的粒線體途徑(Parone et al., 2002)。細胞受到細胞內或細胞外的氧化壓力 (stress) 如缺氧、放射性傷害及DNA損傷時，粒線體膜電位下降、孔道會打開使 cytochrome c 由粒線體的 intermembrane space 釋放到細胞質，再與 Apaf-1 (apoptotic protease

activating factor 1) 、pro-caspase-9 結合成複合體apoptosome，ATP 或 dATP 存在下進而活化caspase-9，導致下游之caspase-3、6、7 等之活化，最後誘導細胞凋亡發生(Hengartner, 2000)。

(a) Bcl-2 家族蛋白質 (Bcl-2 family proteins):

1988年研究人員發現Bcl-2 基因為人類致癌基因(oncogene)，發現Bcl-2 基因可以延長細胞的存活，Bcl-2 蛋白質依功能可分為兩群，anti-apoptotic: Bcl-2、Bcl-xL等；pro-apoptotic: Bax、Bak、Bad、Bid 等(Alnemri et al., 1996; Thornberry and Lazebnik, 1998)。Bak/Bax 原本位在內質網，受外在刺激後轉移到粒線體表面。數個Bak/Bax 會組成通道，粒線體內凋亡因子可藉此通道釋出，促進凋亡進行 (Breckenridge et al., 2003)。Bcl-2 則可以抑制Bak/Bax 的作用，維持粒線體外膜完整，防止cyt c 自粒線體膜間腔釋出 (Marsden and Strasser, 2003)。Bad 可以拮抗Bcl-2 的作用，使凋亡順利進行。此外，Bcl-2 蛋白質也具調控內質網鈣離子濃度的功能，作用類似鈣離子結合蛋白 (Demaurex and Distelhorst, 2003)。Bcl-2 存在於粒線體外層，一般抑制凋亡分子 (Bcl-2) 平時都存在於粒線體膜上、內質網膜上或核膜上；而促進細胞凋亡分子 (Bax) 平時都存在於細胞質當中，當收到凋亡訊息後就會轉位 (translocation) 至粒線體膜上和促進凋亡分子結合進而影響膜電位的平衡，造成粒線體膜形成孔洞，粒線體通透性的改變而致使cyt c 或AIF (apoptosis induced factors) 外流至細胞

質(Kroemer et al., 1995)。此外，粒線體膜電位下降，粒線體孔洞打開造成大量的 ROS (reactive oxygen species) 聚積，進而造成細胞傷害(Kowaltowski et al., 1996)，另外，cytochrome c 釋放到細胞質時會與細胞質中dATP、Apaf-1結合後活化caspase-9，進而引發細胞凋亡。

(b) Cytochrome c :

Cytochrome c 位在粒線體膜間腔，是粒線體呼吸鏈上的一員，負責傳遞電子 (Mayer et al., 1995)。除了參與電子傳遞也和細胞凋亡有關。細胞受外在刺激後，cytochrome c 會經粒線體膜上的孔道釋出進入細胞質和 Apaf 1、caspase-9 結合形成apoptosome 以活化caspase 3 執行細胞凋亡 (Cai et al., 1998)。

(c) 凋亡誘導因子 (apoptosis inducing factor, AIF):

AIF分子量67 kDa，蛋白質結構在1999年被確立。AIF受活化後會由粒線體膜間腔 (intermembrane space)釋出，經細胞質最後到達細胞核，而後誘導染色質濃縮 (chromatin condensation)，最後產生有別於caspase的50 Kb DNA片段 (Susin et al., 1999)。

(2) 外生性路徑 (extrinsic pathway)

死亡受體 (death receptor)，包含TNFR1 (tumor necrosis factor receptor-1 或稱 p55)、CD95 (Fas) 或TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) 等)，結構上的一特殊片段接到ligand受體 (如 CD 95、TNF、FasL 等)，就會吸引細胞內 FADD (fas-associated death domain protein) 聚集，接著

吸引未活化的 caspase 形成 DISC (death-inducing signaling complex) (如 caspase-8)，這些 procaspase 進而活化下游的caspase，使細胞走向凋亡。許多訊息傳遞，外在路徑在細胞凋亡的過程中扮演相當重要的角色，最後活化caspase cascade 而引起細胞凋亡，引起凋亡的速度較快。

(a) CD95 或稱 Fas

為tumor necrosis factor receptor superfamily 家族成員，Fas receptor 和 Fas ligand 結合後產生會招集adapter molecules。Fas ligand (FasL)為三聚體(trimer)結構，和 Fas receptor 結合促進Fas receptor 形成三合體化 (trimerisation)，接著細胞膜內側的 receptor 稱death domains (DD) 開始聚合在一起，death domains 聚合後使得轉接者蛋白FADD (fas-associated death domain) 和 death domains 利用其上的同源結構的地方連接上。接下來FADD 透過另一個domain 將訊號轉送給DED (death effector domain)，具有 caspase-8 zymogen。FADD-DD-DED-pro-caspase-8 complex 會使pro-caspase-8 切除並且活化，被活化的caspase-8 接著活化 caspases-3 and -7。經由此途徑產生凋亡的作用稱為 death Inducing Signaling Complex (DISC)。DISC 於生理性的細胞凋亡扮演重要角色 (Barnhart et al., 2003; Bedi, 2002)。

一種稱為FLIP 的蛋白質可以抑制CD95 所傳導的apoptosis，因為FLIP 會和pro-caspase-8 結合而不會切割pro-caspase-8，也造成無法活化接下

來連續的caspase，再依些病毒或normal的細胞內發現這種蛋白質，若病毒表現FLIP保護自己被感染的細胞不會瓦解，提供病毒養分充足，如果是在正常的細胞其目的是要防止細胞在不對的時機被分解，使細胞生理正常作用(Bedi, 2002)。

(b) TNFR1 (tumor necrosis factor receptor-1)

TNF- α 是被身體受到感染的時候T-cell和活化的巨噬細胞所產生。TNF α 和位於細胞膜表面的TNFR1結合後，導致TNFR1產生trimerisation並且膜內側的death domains聚集在一起，這個動作會使膜內側的轉接分子adapter molecule稱TRADD(TNFR-associated death domain)結合，(TNFR-associated factor 2)和death domains產生相互作用。TRADD可使多數不同的蛋白恢復形成活化的receptor，例如可使RIP(receptor interacting protein)及TRAF 2(TNF-associated factor 2)恢復活性，導致NF- κ B pathway活化，誘導細胞存活；並且TRADD和FADD相關，可經由pro-caspase 8切除活化caspase-8也可以活化caspase-2，誘導細胞凋亡(Chou et al., 1998)。

(c) TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)

TRAIL傳導的路徑和CD95比較不同的是CD95路徑中的DD由DR4或DR5所取代，然後TRAIL路徑中也沒有FADD存在。所能直接結合DR4或DR5造成凋亡，DR4或DR5蛋白位於細胞膜內側部分具有death

domains，但DR4、DR5 無轉接蛋白，因此DR4、DR5 receptors 直接啟動apoptosis。自從DR4、DR5 的mRNA 表現在許多組織中被找到後，顯示TRAIL 也有保護細胞免於細胞凋亡的誘導，其中可能的機轉是基於一套decoy receptors，decoy receptors 被稱為DcR1 及 DcR2，DcR1 及 DcR2 可伴隨DR4、DR5 和TRAIL 結合，並且可相互競爭TRAIL，但是DcR1、DcR2 和TRAIL 結合並不會啟始apoptosis(Medema et al., 1997)。

5. 第二階段

(1) Caspase families (家族) (Fig. 3)

依執行功能可將caspase 分為三類(Thornberry and Lazebnik, 1998)：

- (a) Inflammatory caspases: caspase-1、4、5、11、13、14，這些跟發炎反應有較大的關聯。
- (b) Effector caspases: caspase-3、6、7，負責執行細胞凋亡，使下游蛋白裂解改變細胞原本作用。
- (c) Initiator caspases: caspase-2、8、9、10、12，負責活化 apoptotic executioners 而能執行apoptosis。

Apoptosis過程中，會活化一群蛋白水解酶（protease）來執行凋亡動作。即caspase 是具有專一性的cysteine protease，專門切割aspartic acid residues(Alnemri et al., 1996)。Caspase 蛋白系列均具有相似的氨基酸序列、結構和專一性，都是經非活化態的 pro-caspase（約30-50 kDa）之裂

解所致。這些 pro-caspase 包含三個主要的部位 (domain) : NH2 terminal、large subunit、small subunit。Pro-caspase活化時必須先經由其他caspases 進行一連串蛋白分解，裂解這些domain，移除pro-domain 和linker region，使得大、小subunit 結合形成複合體，成為活化態的caspase (Nicholson and Thornberry, 1997)。Caspase又可分為initiator caspase和effector caspase，initiator caspase受到外來或細胞內凋亡訊息傳遞活化後，在進一步活化effector caspase。Initiator caspase包含有caspase-2、8、9、10；而effector caspase包含有caspase-3、6、7。於粒線體路徑中，cytochrome c釋出與Apaf-1 結合，活化caspase-9，進而活化caspase-3、6、7。結果造成細胞核膜蛋白的分解、PARP 裂解，PARP具有修復受損DNA的作用，當caspase-3活化會裂解PARP，則會由116 kDa裂解成85 kDa，而失去修復功能。以及活化的caspase-3會將ICAD (inhibitor of CAD) 切除放出CAD (caspase-activated dnase)，而造成DNA fragmentation，進而導致細胞凋亡。形成片段的DNA造成 p53累積，阻止細胞週期，就是要讓DNA進行修復時間，當DNA修復的機轉出問題時，就會引起細胞凋亡，p53調控許多蛋白，當p53累積增加時將同時增加pro-apoptotic protein 轉錄作用，然後造成細胞凋亡。(Chipuk et al., 2004)。

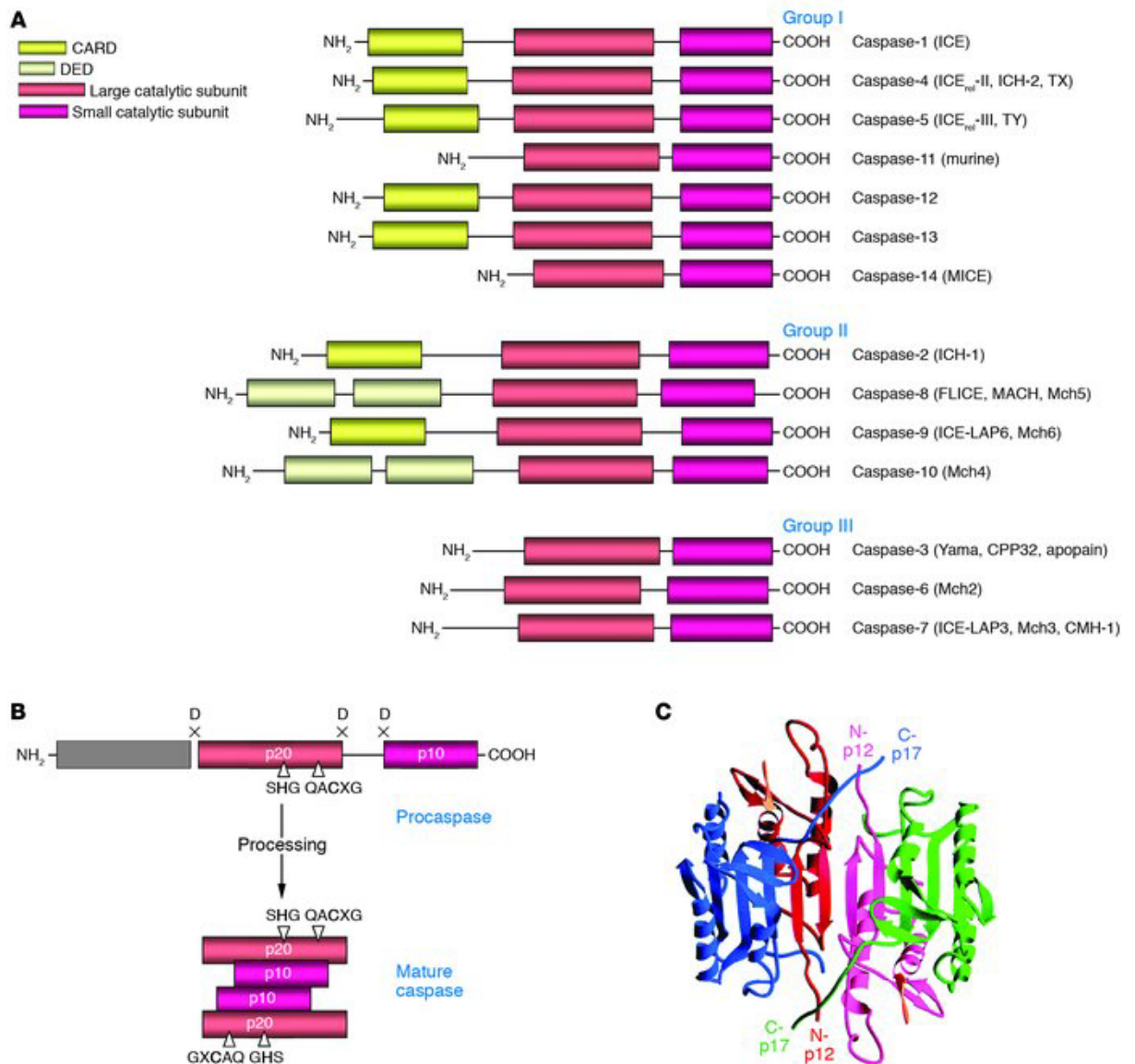


Fig 3. Caspase structure.

(A) The caspase family (B) Scheme of procaspase activation. (C) The 3D structure of caspase-3 heterotetramer(Lavrik et al., 2005)

(2) Caspase 依存性細胞凋亡 (caspase-dependent apoptosis):

Caspase 通常以不活化前驅物 (zymogen) 存在細胞內，一旦細胞表面接受器接收到凋亡訊息 (如TNF- α)或受外在刺激，粒線體釋出cytochrome c 後將會活化 initiator caspase，接著活化 effector caspase 啟動凋亡機制。Caspase-3 是effector caspase 一員，受活化後會使數種蛋白受質失去活性，如PARP 被caspase-3 切割後即喪失DNA 修補功能 (Tewari et al., 1995)。Lamin A 為核膜蛋白，一旦被caspase-3 分解則DNA 易受損害，有利凋亡進行。內在路徑由細胞內的organelles壓力引發，包括：粒線體和內質網，基本上，於細胞質中有Bcl-2:Bad表現，可以偵測來自細胞傷害或壓力的訊息，如果蛋白質和訊息分子結合後，將會移到原先存在於粒線體表面抗凋亡蛋白：Bcl-2，因為pro- and anti-apoptotic protein 之間的交互作用干擾了正常的Bcl-2 protein的作用，導致在粒線體形成孔洞；然後會從粒線體 space 釋放出cytochrome C和其他的凋亡蛋白釋放到細胞質，和細胞質中一蛋白質Apaf-1結合，結果改變Apaf-1的結構，變成不穩定的結構狀態，然後和ATP結合組合的結構穩定的複合物就是凋亡小體，輪狀的凋亡小體會活化 procaspase-9 變成 caspase-9 而進行細胞凋亡(Sato et al., 1995; Ueda et al., 1998)。

(3) Caspase 非依存性細胞凋亡(caspase-independent apoptosis):

從病理學觀點認為caspase-independent apoptosis 與老化及疾病的

生成有較強烈關連性，如: Huntington's disease 等 (Borner and Monney, 1999; Jackson et al., 1998)。目前已知有數個凋亡因子負責執行 caspase-independent apoptosis，包括AIF (apoptosis-inducing factor)、Endo G (endonuclease G)、calpain 和Omi/HtrA2 等。由AIF 所執行的apoptosis 會產生50 Kb 的DNA 片段，別於caspase。

6. 鈣離子 Ca^{2+} 與細胞凋亡

鈣離子可扮演second messenger 參與並調控數種訊息傳遞，此外，細胞收縮 (contraction)、胞內物質釋放 (secretion)、生殖細胞受精 (fertilization)，細胞增生 (proliferation) 及細胞正常代謝 (metabolism) 等細胞生理機能也需要鈣離子參與 (Pozzan et al., 1994)。一般鈣離子 Ca^{2+} 會儲存在內質網 (endoplasmic reticulum; ER) 中，當死亡訊息或藥物刺激下，會促使鈣離子 Ca^{2+} 從內質網釋放出來，導致細胞內鈣離子 Ca^{2+} 恆定 (intracellular calcium homeostasis) 改變 (Beyersmann and Hechtenberg, 1997; Shen et al., 2001)，近來研究指出，鈣離子會影響粒線體膜電位的消散，致使cytochrome c 釋出以及大量ROS產生，而導致細胞凋亡 (Bae et al., 2003; Lemarie et al., 2004)。

7. 細胞週期

細胞開始進行細胞分裂 (cell division) 到由原來的親代細胞 (mother cell) 分裂成兩個子代細胞 (daughter cell) 時期，稱之為『細胞週期』也稱『細胞

分裂週期』，細胞開始進行細胞核分裂到細胞分裂成兩個獨立子細胞時期稱為細胞分裂期mitosis (M) phase，兩個細胞分裂期之間稱為間期(interphase)，間期又可分為Gap 0, Gap 1, S , G 2 phase。細胞在G1 期完成必要的生長和物質準備，在S期完成其遺傳物質—染色體DNA的複製，在G2 期進行必要的檢查及修復以保證DNA 複製的準確性，然後在M期完成遺傳物質到子細胞中的均等分配，並使細胞一分為二(Fig. 4)。

(1) G0 phase :

細胞處於靜止期，此時細胞會停止細胞分裂的進行而去執行一定的生物功能，這些細胞稱之為靜止期細胞(quiescent cells)，很多真核細胞生物的非增殖細胞一般從G1進入G0 phase 可能維持休止靜態很長一段時間，可能是無限期(神經元細胞就是其中一種)，細胞衰老的情形發生在DNA損傷或老化，使一個細胞無法存活，他就會走向細胞凋亡自我毀滅的生化替代方式。

(2) G1 phase :

此期細胞開始生長，同時產生RNA 及合成蛋白質，複製胞器，細胞體積增加，目的是為DNA 複製做好準備，此時期染色體數目為 $2N$ 。G1phase 進入 S phase 有一個checkpoint，這個 checkpointy的控制機制是來確保一切就緒進行 DNA 得合成，若細胞走向分裂，則可以進入 S phase 進行 DNA synthesis。

(3) S phase :

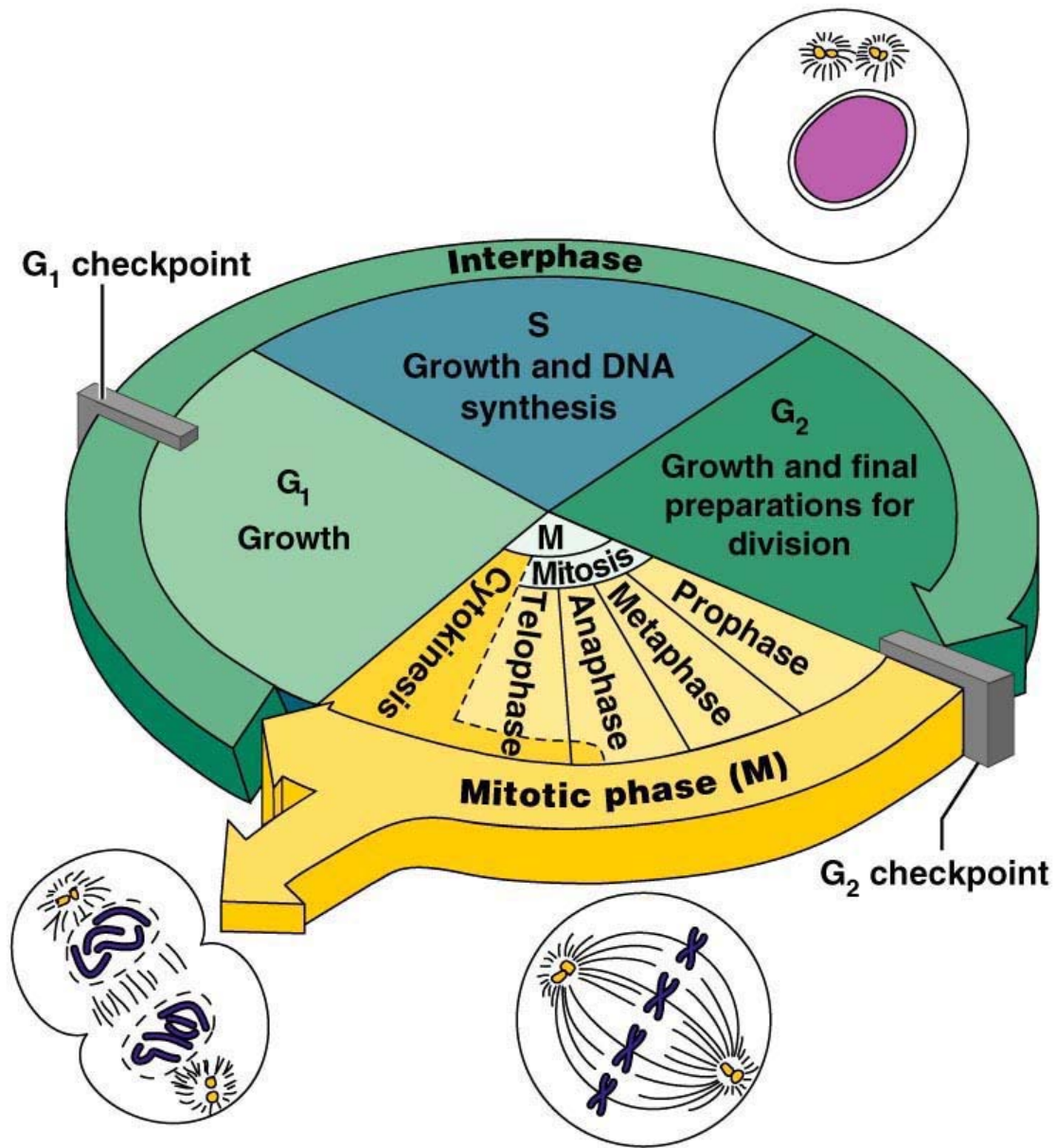
此期細胞進行DNA 合成(DNA synthesis)及複製工作，染色體數目介於2N~4N之間。在這一階段細胞中的DNA數量增加了一倍，但 ploidy 是一樣的。

(4) G2 phase :

DNA複製到有絲分裂的期間之間，此時在細胞核內的DNA含量由G1 phase的2N 變成4N。而由G2 phase 進入M phase 時有第二個check point，檢查DNA 是否完成複製，細胞大小是否生長至合適大小。在這一階段明顯的蛋白質合成發生，主要涉及微管的生成，這是有絲分裂需要的，在G2 期抑制蛋白質合成可以阻斷細胞發生有絲分裂。

(5) M phase :

細胞行有絲分裂(mitosis)，為細胞週期最短的一期，這階段的細胞停止生長及蛋白質合成，在M phase 又可分為五個時期，按順序為前期(prophase)、前中期(prometaphase)、中期(metaphase)、後期(anaphase)、末期(telophase)。而其中metaphase 為染色體排列於赤道板上，準備進行分裂此時為細胞週期的第三個checkpoint (Cameron and Greulich, 1963; Nelson et al., 2002; Wu and Bonner, 1981)。



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig 4. Conducted cell cycle

The fundamental cell cycle events of DNA replication and cell division occur during interphase and mitosis, respectively. Interphase is the longer phase and includes the sub-phases G₁, S and G₂.

調節細胞週期涉及細胞生存重要的過程，包括基因損傷的偵測和修護，以及防止不受控制的細胞分裂，當DNA damage 時，cell cycle 無法通過check point 而停滯(arrest)，此時細胞會進行DNA 修復(DNA repaired)，一但修補完成時才進入下一期，若是發現無法彌補的錯誤時，細胞就會選擇走向細胞凋亡路徑，而且控制細胞週期的是有順序性和方向性的，這就說明在每一個過程的方式是連續的並且無法逆轉期細胞週期(Smith and Fornace, 1996)。

第四節 藥物介紹

本實驗中所使用的藥物 MPTB，其結構式 5-methyl-2(pyridine-3-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl) benzimidazole ；它是由benzimidazole這個結構，以其結構為藍圖來合成的衍生物，benzimidazole 的分子量118.14，benzimidazole 基團是一常見於各種重要的藥物中的結構，benzimidazole 其功能常用來治療被線蟲或吸蟲所感染產生的疾病，所以被廣泛的應用，後來在其他文獻都有提到含有其benzimidazole 基團具有多樣的藥理活性，如抗B型肝炎、抗真菌、抗細菌、抗原蟲、抗高血壓、抗發炎、抗病毒、抗過敏、抗精神病等(Abdel-Aziz et al., 2009)，在這篇文獻中也有提到，和有這個基團的 compounds 可以治療癌症和骨頭疾病 metabotropic glutamate receptor type 1(mGlu1)-related diseases (如癲癇、抑制神經細胞死亡、帕金森氏症、偏

頭痛、焦慮)(Abdel-Aziz et al., 2009)。

Benzimidazole 的作用機制在有些文獻中發現可以跟 free tubulin 結合，尤其是 β -tubulin 的秋水仙鹼(colchicine) 結合位，使微管(microtubule) 的形成分裂和抑制細胞有絲分裂，還有另外的作用影響 microtubule-dependent glucose uptake (Hess and Nakai, 2000; Hollomon et al., 1998; Lacey, 1990)。

所以本篇的所使用的藥物 MPTB，因為是 benzimidazole 的衍生物，應有可以抑制癌細胞的生長，引導其走向凋亡的潛力。在下列繪圖是其結構式。



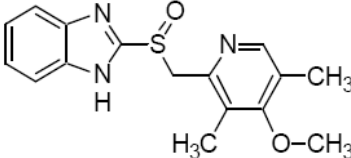
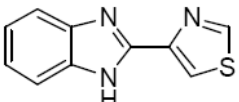
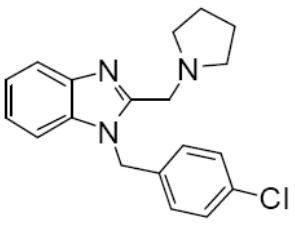
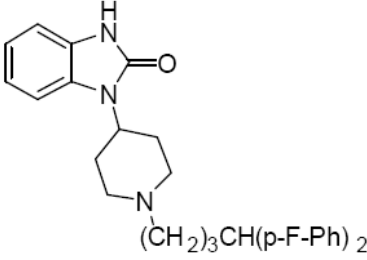
成份名	商品名	製造商	用途	結構
Omeprazole	Losec	Astra	制酸劑	
Thiabendazole	Mintezol	Merck.MSD	腸道驅 蟲劑	
Clemizole	Allercur	Schering	抗組織 胺劑	
Pimozide	Orap	Janssen	精神藥 劑	

Table 1.市面上販售有 Benzimidazole 基團的藥物

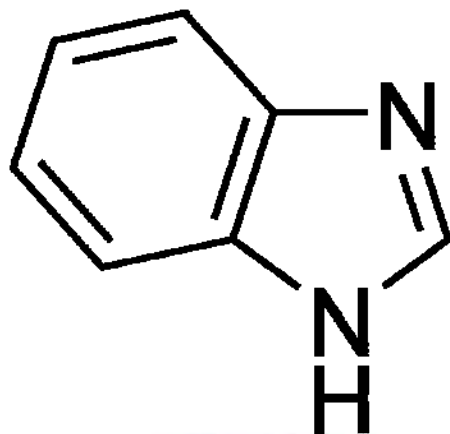
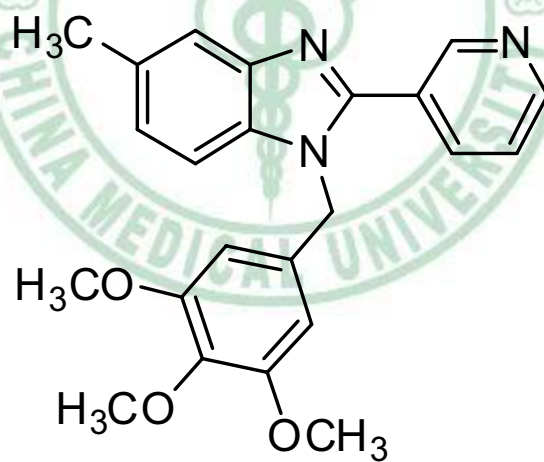


Fig 5. Benzimidazole structure



5-methyl-2-(pyridin-3-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzimidazole

Fig 6. MPTB structure

第二章 材料與方法

第一節 實驗材料

1. 細胞培養及來源

軟骨肉瘤的細胞株，本實驗所使用的人類軟骨肉瘤細胞為 JJ012，為貼附性細胞，由美國邁阿密大學醫學院的 Dr. Sean P Scully 提供；SW1353 購買至 American Type Culture Collection，為貼附性細胞。Chondrocyte 為 primary cell。

JJ012 細胞使用含 10% fetal bovine serum(FBS)之 DMEM/ α -MEM，於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養。

SW1353 所使用的培養基為 L15 培養液，額外添加 FBS 及抗生素 (penicillin-streptomycin, PS)。細胞培養於 5% CO₂ 及 37°C 環境下的無菌細胞培養箱中，且約 2 至 3 天更換一次培養基，當細胞長至八分滿時進行繼代培養或分盤供實驗用。

人類軟骨細胞(chondrocyte)是來至於關節炎病人在置換成人工關節時所取出，人類關節軟骨細胞分離，首先先將軟骨組織切成碎片，加入含有 collagenase II 0.2%的 DMEM 培養液，反應 1 小時，在利用 70 μ M nylon 過濾器分離出人類軟骨細胞，細胞培養於 5% CO₂ 及 37°C 環境下的無菌細胞培養箱中，且約 3 至 4 天更換一次培養基，當細胞長至八分滿時進

行繼代培養或分盤供實驗用(Chiu et al., 2007)。

(1) 細胞計數

繼代或分盤時，以磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS)清洗細胞，再以 0.05 mg/ml Trypsin-EDTA 處理 3 至 5 分鐘，接著加入培養基減緩 Trypsin-EDTA 的作用，並轉至離心管中離心 1500 rpm，五分鐘。離心後，加入培養基稀釋並回種於新的培養皿中進行繼代；分盤則以少量培養基稀釋，利用血球計數板與 Trypan blue 計算細胞數。取少量的混合液(約 10 μ l)自血球計數盤上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於倒立顯微鏡下觀察，死細胞會被 Trypan blue 染上，在計數板上呈現藍色、活細胞則否。計數四個大方格之細胞總數，在除以四，乘以稀釋倍數，最後乘以 10^4 ，即為每毫升中細胞懸浮之細胞數。之後接種需要的細胞數至培養品或培養盤內以備實驗用。

(2) 人類軟骨肉瘤細胞株冷凍保存與活化

細胞經大量培養後需給予保存，以維持最正常的狀態，因此細胞經數次繼代後，以 Trypsin 收下，經血球計數板計算細胞數，將細胞數調為 $2-5 \times 10^5$ cell/mL，再以含有 10% DMSO (在此做為抗凍劑)與 10% FBS medium 混勻，並分裝置冷凍小管中。分別於 4°C 存放 30 分鐘，-20°C 存放 60 分鐘，最後於-80°C 存放隔夜，再轉放於液態氮桶中即可。而活化細胞時，以快速解凍為最佳，如此可避免冰晶生成影響細胞存活。故自液

態氮桶取出細胞後，以 37°C 恆溫水浴槽快速回溫，待其溶解後以培養基稀釋凍液中 DMSO 濃度，並離心除去抗凍劑。移去上清液後加入新鮮的培養基，並接種於培養瓶中進行活化。

2. 儀器設備與材料

(1) 儀器及材料

無菌操作台(Nature Class- II type A/B3，USA)、細胞培養皿、冷凍管、細胞培養箱、恆溫離心機、血球計數板(haemocytometer)、倒立式相位差顯微鏡、Dispenser、1.5/15/50 ml 離心管、Pipetment、去離子水製造機、電源供應器、酸鹼值測定計、PVDF 膜、震盪器、SDS-PAGE 電泳槽套組、加熱板、流式細胞儀(FACS Calibur™ system，BD，USA)、高速離心機、酵素免疫分析儀。

(2) 試劑

(a) 流式細胞儀試劑

Annexin V kit：購自 BD, USA。

Fluo-3/AM：購自 Molecular probe Invitrogen. USA。

TUNEL kit：購自 Millpore, USA。

JC-1：購自 Sigma-aldrich. USA。

PI：購自 Sigma-aldrich. USA。

(b) 一般試劑

Sulforhodamine B colorimetric (SRB) : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

Acrylamide/bis 40% (Acryl/Bis 29 : 1) : 購自 Amresco, USA ◦

Agarose : 購自 MD 生化有限公司 ◦

Ammonium persulfate (APS) : 購自 Amresco, USA ◦

BioMax Flim : 購自 Kodak, USA ◦

顯影劑、定影劑 : 購自 Kodak, USA ◦

Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Thermo. USA ◦

Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amresco ◦

Fetal bovine serum (FBS) : 購自 Gibco ◦

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

Ethanol : 購自 TEDIA, USA ◦ ◦

Formaldehyde : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

JC-1 : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

Methanol : 購自 TEDIA, USA ◦ ◦

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) : 購自 Amresco, USA ◦ ◦

Penicillin-Streptomycin (PS) : 購自 Gibco, USA ◦ ◦

Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck, USA ◦

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) : 購自 Merck, USA ◦

Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad, USA ◦

Protein marker : 購自 Fermentas, USA ◦

Sodium chloride (NaCl) : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

Sodium dodecyl sulfate (SDS) : 購自 Amresco, USA ◦

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) : 購自 Amresco, USA ◦

Triton X-100 : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

Trypsin-EDTA : 購自 Sigma-aldrich. USA ◦

Tween-20 : 購自 Amresco, USA ◦

Fixer, developer : 購自 Kodak, USA ◦

一抗(Primary antibody)

Anti- β actin : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-PARP : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-Caspase 3 : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-Caspase 12 : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-Caspase 9 : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-GRP 78 : 購自 BD biosciences Pharmingenc, USA ◦

Anti-GRP 94 : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-calpain I : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-calpain II : 購自 Santa cruz, USA ◦

Anti-Bax: 購自 Santa cruz, USA。

Anti-Bak: 購自 Santa cruz, USA。

Anti-Bcl-xL: 購自 Santa cruz, USA。

Anti-Bcl-2: 購自 Santa cruz, USA。

Anti-cytochrome c: 購自 Santa cruz, USA。

二抗(Secondary antibody)

Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody: 購自 Santa cruz, USA。

Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody: 購自 Santa cruz, USA。

第二節 實驗方法

1. 藥物對細胞存活率測定

(1) 細胞生長測定方法 (sulforhodamine B assay, SRB assay)

將細胞分盤至 96 孔盤中，每一孔洞的細胞數約為 5000 顆，待細胞貼好後，吸掉原有的培養液，加入新的沒有血清之培養液，在分別加入不同濃度藥物處理，此時也加入 10% trichloroacetic acid (TCA)，固定一組零時間點細胞。培養 48 小時後，再將其他的細胞固定，固定室溫下 15 分鐘，利用 PBS 清洗，風乾孔盤後，以 0.4% (W/V) SRB 染 10 分鐘，吸掉 SRB 再以 1% acetic acid 清洗五次，待乾燥後以 10 mM Tris-Base 溶解，

每一孔洞加入 100 μ l，最後進行 ELISA reader，吸光值為 515 nm，即可以得知細胞內的蛋白含量。吸光值之計量方式:生長百分比計算出不同濃度之藥物抑制生長情形。

Ci:加藥組 Cz:零時機點 C:對照組

生長抑制比率(%): $[(Ci-Cz)/(C-Cz)] \times 100\%$

細胞毒性(%): $[(Cz-Ci)/ Cz] \times 100\%$

IC50: $[(Ci-Cz)/(C-Cz)] \times 100\%=50$

為對照組細胞含量之淨值所增加的蛋白質到 50%減少的藥物濃度。

(2) 細胞群落試驗 (colony formation assay)

(a) 實驗原理：

細胞群落分析為用來計算細胞存活率(cell survival fraction)的一種方法，在此死亡細胞被定義為失去增殖能力(reproductive death)的細胞，因此它們的生理狀態可以是完整，包括可以合成 DNA、製造蛋白質，可能可以分裂一到兩次，但無法產生大量的子代，因此細胞群落分析是將細胞少量的種殖在培養載體上，經過 7-14 天的培養，觀察可以形成群落的細胞數，在此一個群落需要有 50 顆以上，才可以被認定此細胞具有增殖能力。

(b) 實驗步驟：

將 100 顆細胞種於 6 cm dish 中，培養 24 小時，待細胞都貼附於盤底

後，加入不同濃度之藥物作用 24 小時，更換新鮮的培養液，在放回 5% CO₂ 及 37°C 環境下的無菌細胞培養箱中，培養七天，最後以 PBS 清洗，再以 3.7% 福馬林固定 10-15 分鐘，再以結晶紫染色 15 分鐘，洗淨後，風乾，觀察並計算培養皿中的群落數，加入 33% Acetic acid 溶出，並以吸光值 550 nm 測定之。

2. 流式細胞儀去觀察細胞凋亡

(1) Annexin V assay

(a) 實驗原理：

細胞凋亡早期是改變發生在細胞膜表面，細胞膜表面上面具有 phosphatidyl serine (PS) 磷脂從細胞膜內會轉出來到細胞膜外，使著 PS 暴露在外，PS 是一個帶負電荷的磷脂。而 annexin V 是一種 Ca²⁺ 依賴的磷脂結合蛋白，annexin V 可以與帶負電荷的磷脂結合。因此蛋白可作為敏感的探針來檢測在細胞膜表面的 PS，不過細胞壞死的時候，PS 也是會外翻的。壞死的細胞跟凋亡細胞的差別就是在細胞凋亡的早期細胞膜是完整的，而壞死的細胞早期細胞膜就是不完整的，因此通常都是跟 PI 染料一起反應，才可以達到分辨細胞是為凋亡或為壞死。

(b) 實驗方法與步驟：

將 JJ012 細胞種植於 6-well plate 中，細胞數約 2×10^5 cell/ml/well，再經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，加入不同濃度的藥物 (0.1、0.3、1、3 及 10 μ M)，持續培養 48 小時。首先將培養皿中的上清液吸取至 1ml

離心管中，以 PBS 清洗培養皿中的細胞，清洗後的液體也放置於離心管中。加入 0.1% Trypsin 於培養皿中，其量覆蓋過培養皿表面即可，靜置三分鐘後輕拍培養皿使其貼附的細胞懸浮，再將其細胞懸浮液吸取至前步驟的離心管，以 1500 rpm 離心五分鐘，再次去除上清液，在避光的環境下加入 2.5 μ l PI 及 2.5 μ l annexin V 使細胞可以均勻懸浮，染 30 分鐘，儘速以流式細胞儀測定細胞數目為一萬顆細胞，以測定細胞為凋亡或是壞死。

(2) 細胞週期分析(cell cycle assay)

(a) 實驗原理：

當細胞細胞膜破損，propidium iodide (PI) 會跟 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，觀察細胞的螢光表現量；反之，當細胞膜是完整的結構，那 propidium iodide 則無法入核與 DNA 結合，此方法是利用了 propidium iodide (PI) 為染劑，是一種核酸染劑，會跟 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，以辨認細胞的死亡狀況。

(b) 實驗方法與步驟：

將 JJ012 細胞種植於 6-well plate 中，細胞數約 2×10^5 cell/ml/well，再經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，加入不同濃度的藥物 (0.1、0.3、1、3 μ M)，持續培養 48 小時。首先，將培養皿中的上清液吸取至 1 ml 離心管中，以 PBS 清洗培養皿中的細胞，清洗後的液體也放置於離心管中。

加入 0.1% Trypsin 於培養皿中，其量覆蓋過培養皿表面即可，靜置三分鐘後輕拍培養皿使其貼附的細胞懸浮，再將其細胞懸浮液吸取至前步驟的離心管，以 1500 rpm 離心五分鐘，再次去除上清液，加入 75% 酒精，固定兩小時，以 1500 rpm 離心五分鐘，去除上清液，再以 PBS 清洗，以 1500 rpm 離心五分鐘，去除上清液，在避光的環境下加入 PI 使細胞可以均勻懸浮，染 30 分鐘，儘速以流式細胞儀測定細胞數目為一萬顆細胞，以測定細胞週期之 G0/G1、S、G2/M 及 sub G1 的分佈。

(3) 細胞內鈣離子(Ca^{2+})釋出改變

(a) 實驗原理：

細胞內鈣離子濃度可做為細胞凋亡的關鍵，是細胞凋亡過程中重要的功能因子，細胞內鈣離子濃度大約在 100 nM 左右，最近有文獻指出若是內質網或高基氏體釋出鈣離子使得胞內鈣離子濃度大於 $1\mu\text{M}$ 就有可能使細胞走向細胞凋亡途徑。所利用的染劑是 Fluo-3/acetomethoxyester (Fluo-3/AM)，為一種親脂性螢光染劑，易侵入細胞內，一旦進入細胞內親脂性基團會被非特異性酯酶切斷，而不易從細胞內溢出，而進入細胞後會與細胞內鈣離子螯合後釋放出螢光，再利用螢光的強度變化來測定細胞內鈣離子的量。在流式細胞儀可由 488 nm 所激發，可激發 525 nm 的螢光。

(b) 實驗步驟：

首先將細胞懸浮液吸取到離心管中，依不同的時間用藥物處理，最後十分鐘時加入已配製鈣離子染劑 Fluo-3/AM (1 μ l Fluo-3 /AM working sol'n 500 μ l PBS)，每管 sample 加入 500 μ l 的 Fluo-3/AM 染劑；此外，須有一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 500 μ l PBS，之後將 sample 置於 37°C 水浴避光反應，以流式細胞儀進行樣品分析，每管 sample 收集 10000 顆細胞，分析鈣離子釋出程度。

此外我們也利用鈣離子螯合劑(BAPTA)的檢測是否可以抑制細胞走向凋亡，BAPTA [1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid]，是一種鈣離子螯合劑，以類似 EDTA 的螯合方式抓住細胞內鈣離子。本實驗預處理 BAPTA 半小時之後，才開始處理藥物，目的是探討藥物是否經由鈣離子相關路徑誘導 JJ012 cells 走向細胞凋亡。

(4) 細胞內粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)的變化

(a) 實驗原理：

細胞凋亡的早期，可以觀察到細胞內粒線體膜電位的改變，可做為細胞凋亡的指標，是細胞凋亡過程中重要因子，觀察細胞內粒線體膜電位的改變，所利用的染劑是 JC-1，可以反應粒線體負電的高低，JC-1 有兩種不同的存在形式，分別為單體或多聚體，在正常的狀況下，粒線體的負電較多，因此 JC-1 以多聚體的型式存，且可以發散出紅的螢光；反之，當細胞走向凋亡時，粒線體去極化產生，負電性降低，則以單體存，可

以發散出綠色螢光。

(b) 實驗步驟：

將 JJ012 細胞種植於 6-well plate 中，細胞數約 2×10^5 cell/ml/well，再經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，加入不同濃度的藥物處理，持續培養 48 小時。首先將培養皿中的上清液吸取至 1ml 離心管中，以 PBS 清洗培養皿中的細胞，清洗後的液體也放置於離心管中。加入 0.1% Trypsin 於培養皿中，其量覆蓋過培養皿表面即可，靜置三分鐘後輕拍培養皿使其貼附的細胞懸浮，再將其細胞懸浮液吸取至前步驟的離心管，以 1500 rpm 離心五分鐘，再次去除上清液，在避光的環境下加入 JC-1 使細胞可以均勻懸浮，染 30 分鐘，儘速以流式細胞儀測定細胞數目為一萬顆細胞，以測定細胞粒線體膜電位的改變。

3. 蛋白質定量及西方墨點法 (western blot)

(1) 細胞蛋白萃取

將 JJ012 細胞種植於 6-well plate 中，細胞數約 2×10^5 cell/ml/well，再經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，加入不同時間點的藥物 0、8、16、24 小時。首先，將培養皿中的上清液吸掉，以 PBS 清洗培養皿中的細胞，每一孔洞加入 150 μ L lysis buffer，冰上放置十分鐘，將細胞刮破均勻後，吸取轉置 1.5 ml 離心管中，置於冰上 30 分鐘，以 13200 rpm 離心 15 分鐘，取其上清液，即為細胞蛋白液。

(2) 細胞蛋白定量

使用 Thermo 公司的 BCA Protein Assay Reagent，利用了胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA)，當作蛋白質標準品，配製不同濃度之蛋白質標準品後，也取 sample protein 10 μ L 與 200 μ L BCA Protein Assay Reagent，反應 30 分鐘，利用酵素免疫分析儀，求出趨勢線方程式及 R^2 值，算出 sample 的蛋白質含濃度。

(3) SDS-PAGE

調配適合比例的電泳膠片，膠體可分為兩層，上層膠主要目的是將蛋白質鋪平，下層膠目的是將依不同大小將蛋白質分開，待膠架好，小心的將混好 5x sample dye 的 sample 和標記蛋白加入電泳膠中的 well 中，固定電壓 100v，等蛋白底達下膠時，可以加大電壓至 120V，直到標記蛋白帶到底，即可。

(4) 轉漬膜 (transfer)

將 PVDF 轉漬膜，利用甲醇先潤濕，目的在於穩定孔隙，可使蛋白質卡在膜上，組合轉印夾，把膠片與 PVDF 轉漬膜夾在 3M 濾紙及海棉中間，膠片面朝負極，膜向正極，放進轉漬器，並加入轉漬液，固定電流 400 mV，轉印兩小時，取出轉印好的 PVDF 轉漬膜倒入阻斷劑，以阻斷膜上未有蛋白結合的部分之非特異結合，在室溫下搖 1 小時，以 TBST 清洗三次，每次 15 分鐘。放入適當稀釋之一級抗體，在室溫下搖 1 小時，以 TBST 清洗三次，每次 15 分鐘，在加入，放入適當稀釋之二級抗體，

在室溫下搖 1 小時，以 TBST 清洗三次，每次 15 分鐘。到暗房加入 ECL 顯色劑顯影於 X-film。

4. 凋亡蛋白的活性測定

(1) Caspase-3/7, 8,9 活性分析

(a) 實驗原理：

本實驗購買了 promega 具有呈色物質的 caspase-3/7 substrate bis-(N-CBZL-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide; Z-DEVD-R110)及caspase-8 substrate、caspase-9 substrate來監測凋亡細胞相關蛋白caspase-3/7及caspase-8、caspase-9之產生，當caspase substrate遇到了caspase 就會形成綠色的p-nitroaniline產物，可以利用螢光去偵測，即可以知道caspase酵素的活性高低。

(b) 實驗方法：

將細胞分盤至 96 孔盤中，每一孔洞的細胞數約為 5000 顆，待細胞貼好後，吸掉原有的培養液，加入新的沒有血清之培養液，在分別加入不同濃度藥物處理，待 48 小時，避光加入 caspase substrate 50 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下反應半小時，即可以利用螢光測定其讀值。

(2) GRP78、calpain I、calpain II siRNA 干擾序列(siRNA-small interfering RNA)

將 JJ012 細胞種植於 6-well plate 中，細胞數約 2×10^5 cell/ml/well，再經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，加入沒有血清之培養液，在放回

5% CO₂ 及 37°C 環境下的無菌細胞培養箱中，配製稀釋 50 倍的 Lipofectamine 2000，小心的混合，室溫下放置 5 分鐘使 liposome 成形，再加入 GRP78、calpain I、calpain II siRNA 均勻混合，放置 20 分鐘 RNA/Lipofectamine 複合體即形成。取出培養皿加入複合體，待 16 小時，可加上藥物處理，來進行欲想進行的實驗，最後通常都會使用西方墨點法確定轉染是否成功。

(3) 轉染實驗及基因報導實驗(transfection and reporter gene assay)：

(a) 實驗原理：

形成雙體的蛋白質一般具有模組化的結構，在此蛋白質上可能有一部份專司形成雙體之功能，而另有其他部分負責執行其他的功能。如果突變只破壞了執行其他功能的部分，卻未破壞形成雙體的區域，則這個突變的蛋白質將有機會與野生型的蛋白質形成雙體。此時這一個混合型的雙體 (heterodimer)，有可能因為缺少了一半的功能而失去了原有的功能。因此當一個細胞中同時表現野生型的與突變的蛋白質時，突變的蛋白質會抑制蛋白質的功能，而呈現顯性抑制的現象。

(b) 實驗方法：

人類的腫瘤細胞 0.8 μg GRP78-luciferase plasmid 或 GRP94-luciferase plasmid 和 0.4 μg β-galactosidase 的表現載體(expression vector)做 co-transfection 送到細胞內。當腫瘤細胞在 12 孔盤長約八分滿時，利用

Lipofectamine 2000(LF2000; Invitrogen) 去做 transfection 。首先將 DNA 和 LF2000 混合，在加入細胞反應 24 小時後，加入 MPTB 再經過 24 小時；使用 100 μ L reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI) 加到每個 well 中，置於冰上 15 分鐘後將細胞刮取下來；再以 13,000rpm 離心 15 分鐘後吸取上清液；每 20 μ L 的細胞上清液中含有等量(20-30 μ L)的蛋白，將其置於不透光的 96 孔盤中，加入 80 μ L 的螢光受質(luciferase substrate)加到所有的樣品中，螢光藉由 lumnometer 偵測。

5. 定量聚合連鎖反應 (q-PCR)

(1) 抽 RNA

將 JJ012 細胞種植於 6-well plate 中，細胞數約 2×10^5 cell/ml/well，經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，加入沒有血清之培養液及不同濃度藥物處理，再經過 24 小時的靜置培養，首先，將培養皿中的上清液吸掉，以 PBS 清洗培養皿中的細胞，每一孔洞加入 100 μ L TRI reagent，放置十分鐘，將 RNA 充分溶解後，吸取轉置 1.5 ml 離心管中，再加入氯仿 500 μ L，劇烈搖晃 1 分鐘，靜置 3 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 下，13200 rpm 離心 15 分鐘，離心後可以看到兩個液相，下層為綠色與上層為無色，而 DNA 和蛋白質介於介面和下層，小心的將上層移到新的離心管，再加入異丙酮 500 μ L，小心混均勻後，靜置 10 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 下，13200 rpm 離心 10 分鐘，小心的抽掉上清液，此時可以看到 RNA 位於管的下端，再加入 1 mL 75% 乙

醇，混合均勻，在 4 °C 下，以 7500rpm 離心 5 分鐘，移去上清液，將 RNA 風乾，加入 DEPC 水溶解 RNA，再定 RNA 量，即可。

(2) RT (Reverse Transcription)

取樣品 RNA 2 μg ，加入 Oligo-dT 及 DEPC 水後，於 70 °C，作用 10 分鐘，之後在冰上加入了 5 μl dNTP、5 μl 5X reaction buffer 及 1 μl RTase，於 42 °C，作用 1 小時，100 °C，作用 5 分鐘，即可以得到 cDNA 產物。

(3) qPCR

取樣品 cDNA 2 μg ，加入 DEPC 後，另外取 forward 及 reverse primer 加上二次水，混合均勻，最後加入 Taqman Master Mix，使全部為 20 μl ，將樣品上樣至 PCR 盤中，放入 PCR 機器中，PCR 條件為：

STEP 1: 95 °C，2 分 30 秒，1 cycle

STEP 2: 95 °C，15 秒

60 °C，60 秒

40 cycle

待結束，即可以得到 Ct 值。

6. 體外動物試驗 (In Vivo)

(1) 實驗動物

由台大動物中心所購買之嚴重混合免疫缺陷老鼠(severe combined immune deficiency, SCID) CB17，約四周大的公鼠，體重約 20g，再由本校動物中心飼養。

(2) SCID mice 腫瘤誘發模式 (SCID mice xenograft model)

嚴重混合免疫缺陷老鼠，在近年來，許多的研究將腫瘤細胞施打至 SCID 小鼠以進行癌症研究實驗模式，優點是利用了 SCID mice 作為載體來提供模擬人體腫瘤生長的狀況，另外也施打藥物來模擬活體內腫瘤生長與藥物相互作用。

(a) 實驗方法

將 JJ012 細胞種植於 10 cm dish 中，再經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，將培養皿中的上清液吸取至 1 ml 離心管中，以 PBS 清洗培養皿中的細胞，加入 0.1% Trypsin 於培養皿中，其量覆蓋過培養皿表面即可，靜置三分鐘後輕拍培養皿使其貼附的細胞懸浮，再將其細胞懸浮液吸取至離心管，以 1500 rpm 離心五分鐘，再次去除上清液，加入沒有血清培養液均勻打散，細胞數約 1×10^6 cell/ μ l，將細胞培養液 200 μ l 利用皮下注射至每一隻老鼠的下腹部，待腫瘤長至 100 mm^3 ，即開始給藥，以觀察每一隻老鼠的腫瘤變化情形及體重改變，直到 21 天。

7. 統計方法

每個實驗均進行三次以上獨立試驗，實驗結果以 Mean \pm S.E. 表示，以 Student's *t* test 進行數據分析， $p < 0.05$ 於統計上表示有顯著差異。

第三章 結果

1. 苯並咪唑衍生物對人類軟骨肉瘤細胞之影響

我們第一步先將苯並咪唑衍生物對人類軟骨肉瘤細胞進行細胞存活率的測試，我們所實驗的試驗室在本校藥物化學研究所合成一系列苯並咪唑衍生物。分別在人類軟骨肉瘤細胞 JJ012、SW1353 和人類軟骨細胞 chondrocyte 下處理，在依照不同濃度 0、3、10、30 (μM) 作用，處理 48 小時，利用了 SRB assay 去觀察細胞的存活率，發現苯並咪唑衍生物中 MPTB (AQ136) 對人類軟骨肉瘤細胞有毒殺作用，其他的苯並咪唑衍生物對人類軟骨肉瘤細胞沒有毒殺作用，但是對人類軟骨正常細胞並無毒殺作用 (Fig. 7A,B)。所以在這一系列衍生物中，發現 AQ136 (5-methyl-2(pyridine-3-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzimidazole; MPTB) 對人類軟骨肉瘤細胞有最佳的毒殺作用，在 JJ012 細胞的 IC_{50} 的值為 7.1 μM ，SW1353 細胞的 IC_{50} 為 7.5 μM ，並且對正常的軟骨細胞並沒有影響 (Fig. 7C,D)，這時發現 MPTB 對細胞的毒殺作用隨因為使用的濃度升高而增加，所以我們推論 MPTB 對細胞的毒殺性是有濃度上的依賴，所以之後我們也用 MPTB 作細胞群落實驗來觀察是否有抑制至細胞的生長能力，結果發現 MPTB 可以因為劑量的提高抑制細胞的群落生長 (Fig. 7E)，所以經由這樣的結果發現 MPTB 可以有效的抑制人類軟骨瘤細胞的生長。

2. 苯並咪唑衍生物對人類軟骨肉瘤細胞是否會誘發凋亡

接下來要探討 MPTB 是否會透過細胞凋亡來抑制細胞的生長。我們將不同濃度的 MPTB 分別加入細胞中，等待 48 小時後，根據實驗資料顯示，細胞的週期若被終止後，就表示細胞不再進行增值、分裂、藉由流式細胞儀分析 JJ012 細胞株，在不同濃度的 MPTB 處理下對於細胞週期的情形，根據實驗結果發現到不同濃度的 MPTB，JJ012 細胞 sub-G1(即 apoptosis)的表現量隨著濃度的升高而增加，在濃度 10 μ M 其 sub-G1 的比例達到百分之五十左右(Fig. 8A,B)，為了能更證明是否 MPTB 會誘發細胞凋亡，因此我們測試將不同濃度的 MPTB 分別加入細胞中，待 48 小時後，利用 annexin V/PI 染色，最後利用流式細胞儀偵測螢光強度，觀察細胞死亡的情況。實驗中可以發現不同濃度的 MPTB 作用 48 小時後，隨著 MPTB 不同濃度，細胞的數量及凋亡的情形也都有改變(Fig. 8C,D)，所以可以確認細胞因為 MPTB 的作用而產生凋亡，因為細胞凋亡會使細胞的細胞核產生驟縮而產生凋亡小體，所以我們先用不同的濃度 MPTB 作用 48 小時後，使用 DAPI 染劑來染細胞，使用雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡觀察，發現 MPTB 濃度 10 μ M 時，細胞型態改變有明顯增加凋亡小體的表現量，且 JJ012 細胞外觀呈現破碎狀(Fig. 8E)。

3. 苯並咪唑衍生物誘發人類軟骨肉瘤細胞凋亡是否和粒線體有關

在前面的緒言中也有提到誘發細胞凋亡其實跟粒線體有關，我們給於

不同濃度的 MPTB，經過 48 小時後，給予 JC-1 染劑此染劑是偵測細胞膜電位的變化，經由流式細胞分析儀分析，在實驗結果中看到當隨著 MPTB 不同濃度細胞的膜電位就會有明顯的改變，在圖中 P2 所圈選的細胞為細胞粒線體膜電位正常的細胞，當細胞膜電位變弱細胞將會從 P2 的範圍往 P3 的範圍移動，實驗結果顯示在 10 μ M 濃度下細胞在 P3 範圍內的比例達到百分之五十左右，所以我們確認 MPTB 可以影響 JJ012 細胞膜電位的改變(Fig. 9A,B)，為了確認 MPTB 對人類軟骨肉瘤細胞對其粒線體膜電位有改變，也是先用 MPTB 給予種在玻片 JJ012 細胞，經過 48 小時，使用 JC-1 染劑跟細胞作用，用雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡觀察，在結果中發現經 MPTB 處理之後，膜電位有明顯的改變，所以可以更確認 MPTB 可以影響 JJ012 細胞膜電位的改變(Fig. 9C)，在文獻有提到依賴性滲透性轉移孔洞的粒線體膜通透性是由 Bcl-2 家族所調控(Green and Kroemer, 2004)，我們用西方墨點法看抗凋亡蛋白 Bcl-2, Bcl-xl 和凋亡蛋白 Bak, Bax 的表現量，以及觀察 cytochrome c 在細胞質中的表現量，實驗結果中發現 Bak, Bax 和 cytochrome c 其表現量會隨著時間點上升而增加 (Fig. 9D)。

4. MPTB 引發人類軟骨肉瘤細胞內鈣離子的濃度改變

當細胞的內質網累積大量折疊錯誤的蛋白質，產生內質網壓力，會導致鈣離子通透失衡，將導致儲存在內質網中的鈣離子釋放出來，誘發細

胞死亡(Bernales et al., 2006)。我們進一步想了解鈣離子在 MPTB 所會造成人類軟骨肉瘤細胞凋亡過程中所扮演的角色，於是加入會和細胞內鈣離子結合的螢光物質 Fluo 3/AM，觀察加入 MPTB 後 JJ012 細胞內鈣離子的濃度改變。先將細胞以 Fluo 3/AM 染 30 分鐘，在依不同時間給藥，最後利用流式細胞儀偵測螢光強度。經由結果得知，隨著時間的增加，偵測到細胞內鈣離子會明顯的增加，經由結果顯示，MPTB 會造成 JJ012 細胞內鈣離子改變，並隨著時間的增加而增加(Fig. 10A)。經由上述結果，證明在 MPTB 作用下，會造成細胞內鈣離子增加，為了更進一步的證實，在 MPTB 作用下，會造成細胞內鈣離子濃度上升的來源，可能是由細胞內胞器所釋放而來，而造成細胞凋亡，當細胞內的鈣離子的增加受到抑制時，是否可以有效的抑制 MPTB 所造成細胞凋亡。我們使用了細胞內的鈣離子螯合劑 (BAPTA-AM)，先讓細胞在鈣離子螯合劑中作用半小時，之後再加入 MPTB，作用 48 小時，在用 PI 染劑處理後，最後利用流式細胞儀偵測螢光強度。由結果可知，細胞內的鈣離子螯合劑可以有效的抑制 MPTB 所造成細胞凋亡，因為在結果裡發現鈣離子螯合劑(BAPTA-AM)可以抑制 JJ012 細胞 Sub-G1 的產生，因此也可以確認出 MPTB 可以使著內質網的鈣離子流出，進而促使細胞走向凋亡 (Fig. 10B)。

5. MPTB 增加 GRP78, GRP94 及 calpain 的活性

先前的實驗結果已證實出 MPTB 會引起鈣離子濃度上升，主要是由細

胞內內質網所釋放出來，當細胞內產生內質網壓力，會導致細胞走向凋亡，當一般的細胞產生內質網壓力，細胞內的 GRP 78 和 GRP 94 基因就會被誘發而大量的表現出。我們利用西方墨點法來觀察 GRP 78 和 GRP 94 當做細胞內質網壓力的指標。結果發現 GRP 78 和 GRP 94 的表現量有明顯增加(Fig. 11A)。另外，我們使用不同濃度 MPTB 給予細胞靜置 24 小時後，收細胞 RNA，最後利用定量 PCR 來分析。由結果可知，當細胞處理 MPTB 後，也由定量 PCR 的結果可得知給 MPTB 有明顯的增加 GRP 78 和 GRP 94 之 mRNA 表現(Fig. 11B)，為了再確認 GRP 78 和 GRP 94 活性，將 GRP 78 和 GRP 94 質體轉染 JJ012 細胞靜置 24 小時後，再給不同濃度 MPTB 24 小時後收集細胞溶解液測試其活性，發現 GRP 78 和 GRP 94 其 promoter activity 隨著 MPTB 濃度增加而增加(Fig. 11C)，經由上述結果，已證明 MPTB 會造成細胞內 GRP 78 有明顯的增加，為了更進一步的證實 MPTB 作用會造成細胞內 GRP 78 上升，而造成細胞凋亡，因此當細胞內的 GRP 78 的增加受到抑制時，是否可以有效的抑制 MPTB 所造成細胞凋亡。我們先將細胞轉染入 GRP 78 siRNA，利用了西方墨點法證實出 GRP 78 siRNA 是有轉染成功 (Fig. 11D)。之後再加入 MPTB 作用 48 小時，最後利用 PI 染劑測定期細胞週期 Sub-G1 的表現量。由結果可知，該實驗以 GRP 78 siRNA 證明 GRP 78 跟 MPTB 所造成細胞凋亡是有相關，當轉染入 GRP 78 siRNA 後給予藥物處理，可以有效的抑制細胞凋

亡，也確認 MPTB 可以使細胞內產生了內質網壓力(ER Stress)，使細胞內的 GRP 78 基因就會被誘發，進而使著細胞走向凋亡 (Fig. 11D)。

內質網是細胞內儲存鈣離子最大的胞器，胞內的鈣離子濃度是穩定的，當內質網遭受到刺激或傷害導致細胞內鈣離子濃度失調，鈣離子會從內質網釋放出鈣離子造成細胞內的鈣離子濃度上升，當細胞內鈣離子濃度上升，會使 calpain 活化，也會引發下游的 caspase-12 活化。我們想確認 calpain 是否有介入 MPTB 所導致的細胞凋亡。因此我們利用西方墨點法來觀察 calpain I 和 calpain II 的表現，由結果可知，當細胞處理 MPTB 後，有明顯的增加 calpain I 和 calpain II 之蛋白表現 (Fig. 11A)，經由上述結果，證明在 MPTB 作用下，會造成細胞內 calpain I 和 calpain II 有明顯的增加，為了更進一步的證實在 MPTB 作用下，會造成細胞內 calpain 上升，而造成細胞凋亡，當細胞內的 calpain 的增加受到抑制時，是否可以有效的抑制 MPTB 所造成細胞凋亡。我們先將細胞轉染入 calpain I 和 calpain II siRNA，利用了西方墨點法證實出 calpain I 和 calpain II siRNA 是有轉染成功 (Fig. 11E)。之後再加入 MPTB 作用 48 小時，經由 PI 染劑染色，最後利用流式細胞儀偵測螢光強度。由結果可知，利用 calpain I 和 calpain II siRNA 證明出 calpain 跟 MPTB 所造成細胞凋亡是有相關，當轉染入 calpain I 和 calpain II siRNA 後給予 MPTB 處理，可以有效的抑制細胞凋亡 (Fig. 11E)，也確認 MPTB 可以使細胞內產生了內質網壓

力，使著細胞內的 calpain 就會被誘發，進而使著細胞走向凋亡。

6. MPTB 引起細胞凋亡現象中 caspases 所扮演的角色

細胞進行凋亡時，常常會伴隨著 caspases 家族蛋白質的參與，且 caspases 是在細胞凋亡中一個重要的角色。而過去的文獻也研究過，當內質網受到傷害後，會使著內質網中的鈣離子釋放到細胞中，而使 calpain 活化，進而引起下游的 caspase-12、caspase-9 及 caspase-3 的活化，最後就會造成細胞的凋亡 (Kass and Orrenius, 1999)。而在前言有提到 initiator caspases 包括 caspase-8, caspases-9, executioner caspases 的 caspase-3, caspase-7，藉自我切割而活化聚集，執行細胞凋亡，而 caspases 的活化通常都是伴隨著讓 PARP (poly ADP-ribose polymerases) 裂解。為了探討 MPTB 是否會藉由內質網引起 caspase-12, caspase-9, caspase-7, caspase-8, caspase-3 及 PARP 最後使著細胞凋亡，因此我們利用西方墨點法來探討，我們在 0、8、16 及 24 小時，這四個時間點探討 MPTB 對於 caspase-12, caspase-9, caspase-7, caspase-8, caspase-3 及 PARP 表現的影響。結果顯示，在 24 小時內可以看到 caspase-12, caspase-9, caspase-7, caspase-8, caspase-3 及 PARP 裂解(Fig. 12A)，另外我們也想進一步確認 MPTB 可以活化 caspase，因此我們利用了 caspase activity 來確認，當細胞給予不同的濃度的 MPTB，待 24 小時後，測試 caspase-8, caspase-9 及 caspase-3 的活性，也發現隨著濃度的增加，caspase-8, caspase-9 及 caspase-3 的活性

也會隨著上升(Fig. 12B,C,D)，經由上述結果，證明在 MPTB 作用下，會造成 caspas-12, caspase-9, caspase-7, caspase-8 及 caspase-3 活化，為了更進一步的證實在 MPTB 作用下，會造成 caspase-12, caspase-9, caspase-7, caspase-8 及 caspase-3 活化來使著細胞凋亡，所以當 caspase-8, caspase-9 及 caspase-3 的活化受到抑制時，是否可以有效的抑制 MPTB 所造成細胞凋亡。我們使用了 caspase-8, caspase-9 及 caspase-3 抑制劑，先讓細胞在 caspase-8, caspase-9 及 caspase-3 抑制劑中作用半小時，之後再加入 MPTB 作用 48 小時，在用 PI 染劑，最後利用流式細胞儀偵測螢光強度。由結果可知，caspase-8, caspase-9 及 caspase-3 抑制劑可以有效的抑制 MPTB 所造成細胞凋亡(Fig. 12E)。由上列結果推論在 MPTB 處理後所造成的細胞凋亡，是會透過鈣離子的活化 calpain，最後活化了 caspase-12, caspase-9, caspase-7 及 caspase-3，而讓人類軟骨肉瘤產生細胞凋亡。

7. 利用動物模式來評估 MPTB 抑制癌細胞能力

在細胞實驗中，確認了 MPTB 可以有效的促使人類軟骨肉瘤細胞進行凋亡，於是進一步的在動物實驗中，評估 MPTB 是否在活體中也可以抑制腫瘤生長，我們使用 SCID CB17 小鼠為載體，先將 JJ012 細胞皮下注射到 SCID 小鼠中，經由公式(長×寬²)/2 算出其體積大小，當細胞長至 100 mm³ 後，開始以腹腔注射之方式給予不同濃度的藥物，一天一次，給足 21 天後，並開始測量腫瘤大小及體重改變，由結果發現給予 MPTB 濃度

較高者，可以抑制腫瘤大小較明顯，且體重上也是沒有太大的變化 (Fig. 13A,B,C)。我們將小鼠中的腫瘤取出，為了要確認藥物對腫瘤組織的作用，抑制腫瘤的路徑跟我們所探討的結果是否一致，所以取出腫瘤，抽取腫瘤組織蛋白質，利用西方墨點法來探討，結果也確認出動物模式跟細胞模式的結果是相符合 (Fig. 13D)，因為細胞凋亡會使細胞產生 DNA 片段化，我們想要探討 MPTB 是否抑制腫瘤組織生長，會使細胞 DNA 片段化，使用 TUNEL assay kit，把腫瘤組織切片做免疫螢光染色，發現給予 MPTB 的小鼠腫瘤組織，具有 TUNEL labeling (Fig. 13E)。綜和以上結果在動物模式的實驗也可以發現和細胞實驗相符。



第四章 討論

間葉性腫瘤如 osteosarcoma 及 Ewing's sarcom，病患經由化學治療後，有明顯的增加其存活率，chondrosarcoma 卻在手術後缺乏有效的術後用藥治療(Fong et al., 2007)，因此我們想開發是否有新的藥物可以幫助治療人類軟骨肉瘤，因此設計一系列苯並咪唑衍生物，也具有許多的生物活性及抗癌活性(Beaulieu et al., 2004; Zschiesche et al., 1970)，一開始先對 JJ012、SW1353 和 chondrocytes 其增生和生存率作測試，發現衍生物 AQ136 (MPTB) 對 JJ012 和 SW1353 有抑制其增生和存活率，但對 chondrocytes 卻沒有明顯的抑制效果，所以就發現 MPTB 其會選擇性對 chondrosarcoma 細胞但是對正常的 chondrocytes 是不會有影響，因此我們開始以 AQ136 (MPTB) 探討其對人類軟骨肉瘤作用的基轉。

不同細胞凋亡的例子中發現粒線體的功能失調是有關聯的關鍵機制來造成細胞凋亡，當粒線體功能失調造成細胞凋亡會發現兩件重要的事件，其中一件事就是粒線體膜的通透性會改變，隨後另一件事就是粒線體膜電位會改變，之後凋亡蛋白就會被釋放其中也包括 cytochrome c 從粒線體內膜被釋放到細胞質(Liu et al., 1996; Susin et al., 1997; Zamzami et al., 1998)，在結果中也發現當使用 MPTB 給予 JJ012 細胞，其膜電位也會降低和 cytochrome c 釋放到細胞值的量增加，跟文獻所提到因為粒線體

功能失調所誘發細胞凋亡的看法一致，Bcl-2 家族蛋白調控粒線體引起的凋亡和平衡抗凋亡分子和前凋亡分子掌管其細胞生與死(Adams and Cory, 2001)，實驗結果中發現給了 MPTB 給予 JJ012 細胞，Bak 和 Bax 有明顯的增加，可以驅使細胞產生凋亡，所以根據實驗結果 MPTB 所誘發的人類軟骨肉瘤細胞凋亡是經過粒線體功能失調。

內質網與細胞凋亡的相關研究也越來越多，內質網是個具多功能的胞器，可以調控許多重要的因子，像是鈣離子的平衡、蛋白質的合成、蛋白質的摺疊及細胞凋亡，當受到不同壓力條件下，沒有摺疊或摺疊錯誤的蛋白質會機具在內質網結果導致內質網壓力產生(Kaufman, 1999)，在細胞質中鈣離子恆定被破壞，代表著細胞受到不同的刺激，也會造成內質網內的蛋白質合成產生了錯誤，造成了未摺疊或是摺疊錯誤的蛋白質會堆疊在內質網中，而造成內質網的壓力，而且會活化一系列的訊息傳導路徑。而我們想要探討是否MPTB誘發細胞凋亡因為細胞內的鈣離子被釋放出來，在實驗結果中發現MPTB可以誘導出細胞內的鈣離子被釋放，因此我們利用了鈣離子的螯合劑BAPTA-AM可以有效的阻斷MPTB所誘導出的細胞凋亡，因此我們確認出MPTB所造成的人類軟骨肉瘤細胞凋亡是可以透過內質網壓力產生而造成的。

文獻中提出，內質網鈣離子恆定環境產生改變，會使沒有摺疊或是摺疊失敗的蛋白積聚在內質網內，產生內質網壓力，這樣的反應統稱未摺

疊蛋白質反應(unfolded protein response)，而其中牽涉到葡萄糖調節蛋白 (glucose-regulated protein)的表現，GRP78/BiP、GRP94 增加此類蛋白質在細胞內的含量，以協助蛋白質折疊，進而舒緩內質網壓力，於我們研究結果中發現 MPTB 可以促使在西方墨點法中 GRP78 和 GRP94 蛋白表現量增加，GRP 78 和 GRP 94 在報告基因分析 GRP78 和 GRP94 的表現量有明顯的增加，GRP78 和 GRP94 mRNA 的表現量都有明顯的增加，我們進一步利用了 GRP 78 siRNA 來拮抗 MPTB 所導致的細胞凋亡，我們發現 MPTB 誘發人類軟骨肉瘤細胞凋亡會促進 GRP 78 和 GRP 94 活化而促進凋亡。

當內質網遭受到刺激或傷害導致細胞內鈣離子濃度失調，內質網釋放出鈣離子，就會使下游 calpain活化，也會造成caspase 活化， calpains 及 caspases 是屬於 cysteine proteases 的兩種家族它們調控著病理學上的細胞死亡(Tan et al., 2006)，caspase cytoskeletal proteins, Bax, 和 Bid本身這蛋白酶 (proteases)擔任很多死亡相關的受質(Fettucciari et al., 2006)，然而 calpains and caspases 對調控病理學上的細胞死亡扮演重要的腳色，這兩個家族的蛋白酶 (proteases)的相互作用還不是很清楚，而在細胞凋亡中，最常被探討的就是 m-calpain (calpain II)和 μ -calpain (calpain I)，在我們研究中給予 JJ012 細胞 MPTB，都會活化 calpain I 和 calpain II 的表現量，進而利用 calpain I 和 calpain II 的 siRNA 來確認是否能抑制

MPTB 所誘發的細胞凋亡，經由研究成果發現 calpain siRNA 可以抑制 MPTB 所誘發的 calpain 活化，抑制細胞凋亡，因此我們也認為 MPTB 可以活化 calpain，促進細胞凋亡。而 calpain 可活化下游的 caspase-12，因此我們也認為 MPTB 可以藉由 calpain 可活化下游的 caspase-12，而造成細胞凋亡。

除了上述的 caspase-12 可能參與調控細胞凋亡，caspase 在細胞凋亡中也是扮演重要的角色，caspase 又分為 initiator caspase 和 effector caspase，initiator caspase 受到外來或細胞內凋亡訊息傳遞活化後，在進一步活化 effector caspase。Initiator caspase 包含有 caspase-2、8、9、10；而 effector caspase 包含有 caspase-3、6、7。於粒線體路徑中，cytochrome c 釋出與 Apaf-1 結合，活化 caspase-9，進而活化 caspase-3、6、7。結果造成細胞核膜蛋白的分解、PARP 裂解，進而促進細胞凋亡，在我們研究中發現 MPTB 給予 JJ012 caspase-3, 8, 9 和 7 蛋白表現量在西方墨點法中有明顯增加，在測試 caspase-3, 8, 及 9 的活性都有明顯的增加，進而使用 caspase-3, 8 及 9 的抑制劑，都可以抑制 MPTB 所誘發 JJ012 細胞凋亡。所以在我們研究中發現 MPTB 可以誘發 caspase 活化進而影響細胞凋亡。

第五章 結論

綜合以上我們所做的研究，可以得到苯並咪唑衍生物 MPTB 可以抑制人類軟骨肉瘤細胞生長並誘使走向凋亡，在動物實驗成果上也得到同樣的結果，MPTB 可能可以經由活化 Bak, Bax，改變粒線體膜電位，使粒線體釋放出 cytochrome c，活化其下游 caspase-9 及 caspase-3 蛋白，PARP 裂解，使人類軟骨肉瘤細胞走向凋亡抑制其生長，也可能走 ER stress，活化了 GRP 78 和 GRP 94 也增加了鈣離子濃度，進而活化了 calpain、caspase-12、caspase-9 及 caspase-3，結果導致人類軟骨肉瘤細胞走向凋亡。



第六章 參考文獻

- Abdel-Aziz, H.A., Gamal-Eldeen, A.M., Hamdy, N.A., and Fakhr, I.M. (2009). Immunomodulatory and anticancer activities of some novel 2-substituted-6-bromo-3-methylthiazolo[3,2-a]benzimidazole derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)* 342, 230-237.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26, 61-66.
- Aigner, T., Soeder, S., and Haag, J. (2006). IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater* 12, 49-56; discussion 56.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Bae, J.H., Park, J.W., and Kwon, T.K. (2003). Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca^{2+} depletion and cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 1073-1079.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.
- Beaulieu, C., Wang, Z., Denis, D., Greig, G., Lamontagne, S., O'Neill, G., Slipetz, D., and Wang, J. (2004). Benzimidazoles as new potent and selective DP antagonists for the treatment of allergic rhinitis. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 3195-3199.
- Bedi, A. (2002). On the TRAIL from death receptors to prostate cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 1, 638-639.
- Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded

protein response. *PLoS Biol* 4, e423.

Beyersmann, D., and Hechtenberg, S. (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 144, 247-261.

Borner, C., and Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6, 497-507.

Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608-8618.

Cai, J., Yang, J., and Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366, 139-149.

Cameron, I.L., and Greulich, R.C. (1963). Evidence for an essentially constant duration of DNA synthesis in renewing epithelia of the adult mouse. *J Cell Biol* 18, 31-40.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.

Chiu, Y.C., Yang, R.S., Hsieh, K.H., Fong, Y.C., Way, T.D., Lee, T.S., Wu, H.C., Fu, W.M., and Tang, C.H. (2007). Stromal cell-derived factor-1 induces matrix metalloprotease-13 expression in human chondrocytes. *Mol Pharmacol* 72, 695-703.

Chou, J.J., Matsuo, H., Duan, H., and Wagner, G. (1998). Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* 94, 171-180.

Demaurex, N., and Distelhorst, C. (2003). Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science* 300, 65-67.

- Fettucciari, K., Fettriconi, I., Mannucci, R., Nicoletti, I., Bartoli, A., Coaccioli, S., and Marconi, P. (2006). Group B Streptococcus induces macrophage apoptosis by calpain activation. *J Immunol* 176, 7542-7556.
- Fong, Y.C., Yang, W.H., Hsu, S.F., Hsu, H.C., Tseng, K.F., Hsu, C.J., Lee, C.Y., and Scully, S.P. (2007). 2-methoxyestradiol induces apoptosis and cell cycle arrest in human chondrosarcoma cells. *J Orthop Res* 25, 1106-1114.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., and Orlandini, S.Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182, 41-49.
- Goodlett, C.R., and Horn, K.H. (2001). Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health* 25, 175-184.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hess, R.A., and Nakai, M. (2000). Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol Histopathol* 15, 207-224.
- Hollomon, D.W., Butters, J.A., Barker, H., and Hall, L. (1998). Fungal beta-tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2171-2173.
- Jackson, A.L., Chen, R., and Loeb, L.A. (1998). Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12468-12473.
- Kass, G.E., and Orrenius, S. (1999). Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1, 25-35.

- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (1996). Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett* 378, 150-152.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., and Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9, 1277-1287.
- Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6, 112-115.
- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.
- Lavrik, I.N., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115, 2665-2672.
- Lemarie, A., Lagadic-Gossmann, D., Morzadec, C., Allain, N., Fardel, O., and Vernhet, L. (2004). Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic Biol Med* 36, 1517-1531.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.

- Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1965). Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol* *11*, 123-133.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* *146*, 3-15.
- Marsden, V.S., and Strasser, A. (2003). Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* *21*, 71-105.
- Mayer, A., Neupert, W., and Lill, R. (1995). Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* *270*, 12390-12397.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* *16*, 2794-2804.
- Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* *252*, 1-15.
- Nelson, D.M., Ye, X., Hall, C., Santos, H., Ma, T., Kao, G.D., Yen, T.J., Harper, J.W., and Adams, P.D. (2002). Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol Cell Biol* *22*, 7459-7472.
- Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* *22*, 299-306.
- Parone, P.A., James, D., and Martinou, J.C. (2002). Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* *84*, 105-111.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* *74*, 595-636.

- Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell 109 Suppl*, S97-107.
- Robertson, J.D., and Orrenius, S. (2000). Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol 30*, 609-627.
- Sato, N., Iwata, S., Nakamura, K., Hori, T., Mori, K., and Yodoi, J. (1995). Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *J Immunol 154*, 3194-3203.
- Senderowicz, A.M. (2004). Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr Opin Cell Biol 16*, 670-678.
- Shen, H.M., Dong, S.Y., and Ong, C.N. (2001). Critical role of calcium overloading in cadmium-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Toxicol Appl Pharmacol 171*, 12-19.
- Smith, M.L., and Fornace, A.J., Jr. (1996). Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutat Res 340*, 109-124.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature 397*, 441-446.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med 186*, 25-37.
- Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S., and Greer, P.A. (2006). Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem 281*, 16016-16024.

Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1995). Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

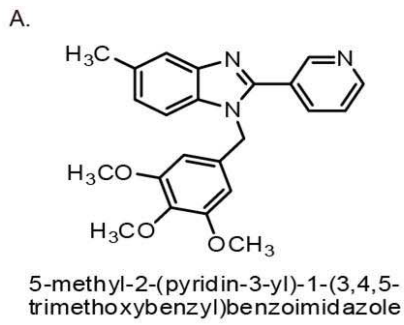
Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., Yonehara, S., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., and Yodoi, J. (1998). Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J Immunol* 161, 6689-6695.

Wu, R.S., and Bonner, W.M. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* 27, 321-330.

Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., and Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16, 2265-2282.

Zschiesche, W., Augsten, K., Ozegowski, W., and Krebs, D. (1970). Alkylating anticancer agents and phagocytosis. I. Effects of a homologous series of 1,2-substituted 5-bis(beta-chloroethyl)-amino-benzimidazole derivatives on carbon clearance. *J Reticuloendothel Soc* 8, 538-549.

Zuzarte-Luis, V., and Hurle, J.M. (2002). Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* 46, 871-876.



B.

cell line / compounds	JJ012	SW1353	chondrocyte
AQ140	>30	>30	>30
AQ115	>30	>30	>30
AQ129	>30	>30	>30
MPTB(AQ136)	<30 (IC ₅₀ =7.1 μM)	<30 (IC ₅₀ =7.5 μM)	>30
AQ160	>30	>30	>30
AX163	>30	>30	>30
AJ067	>30	>30	>30

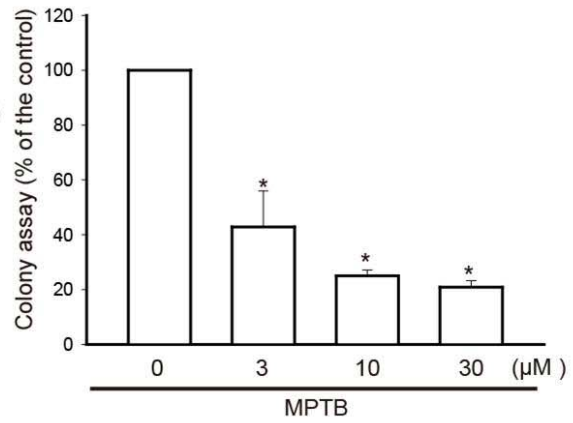
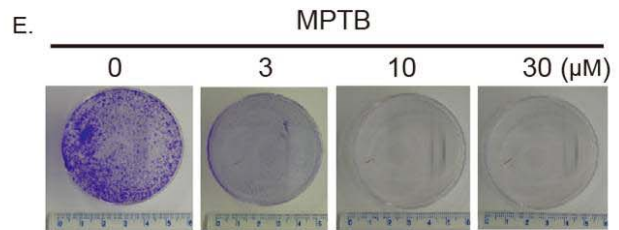
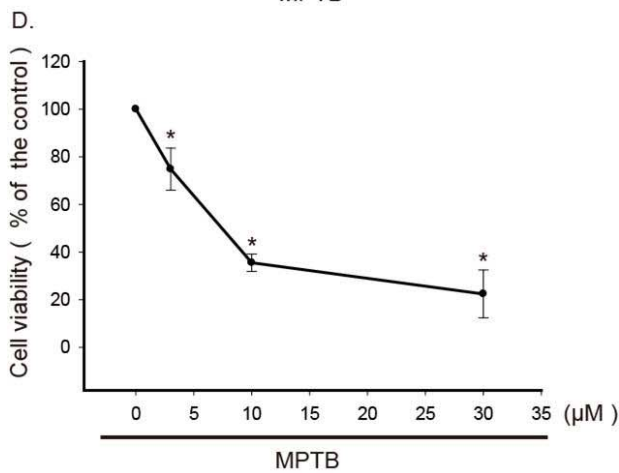
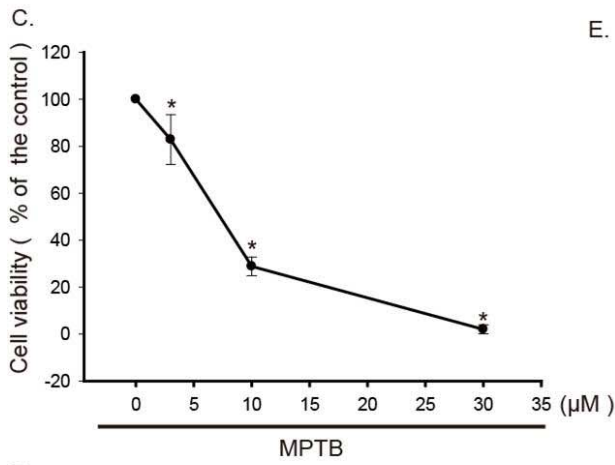
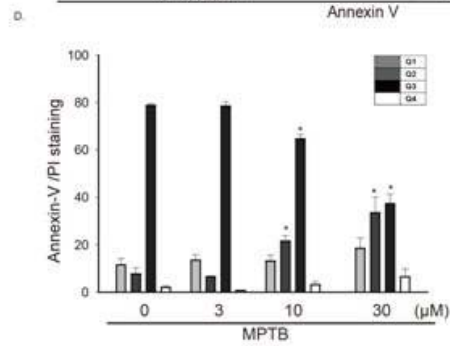
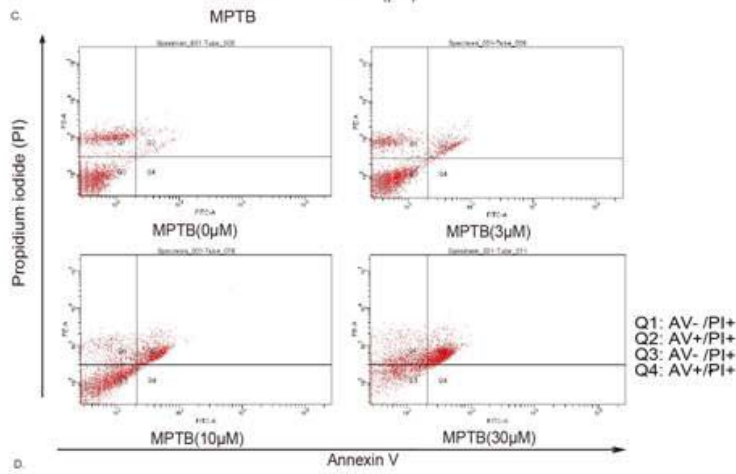
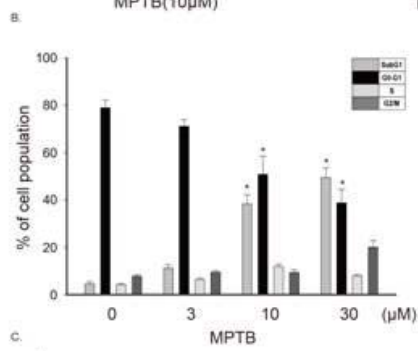
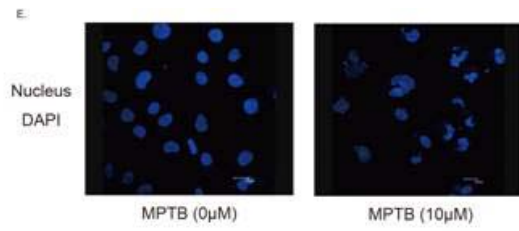
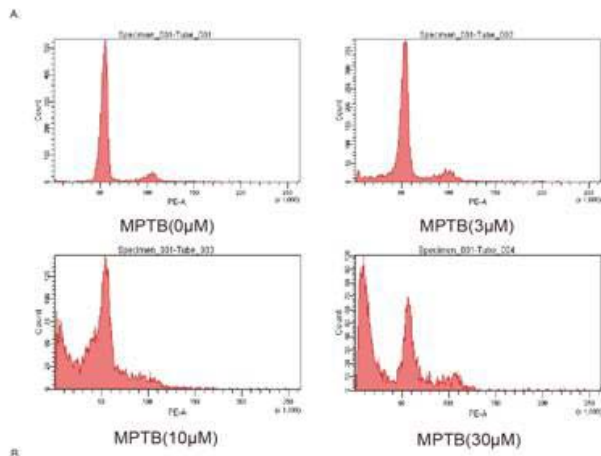


Fig 7. The effects of MPTB on cell viability and colony formation in human chondrosarcoma cells.

(A) Chemical structure of MPTB. (B) Benzimidazole derivatives induced apoptosis of human chondrosarcoma cells, JJ012, SW1353 and primary chondrocytes were incubated with various concentrations of benzimidazole derivatives for 48 h, the cell viability was examined by SRB assay. The IC₅₀ values of different cell lines were examined. (C) JJ012 cells were incubated with various concentrations of MPTB for 48 h, and the cell viability was examined by SRB assay (n = 5). (D) SW1353 cells were incubated with various concentrations of MPTB for 48 h, and the cell viability was examined by SRB assay (n = 5). (E) For the colony-forming assay, the clonogenic assay was performed as described under Section 2. The quantitative data are shown in the lower panel. Results are expressed as the mean ±S.E. * p < 0.05 compared with controls.



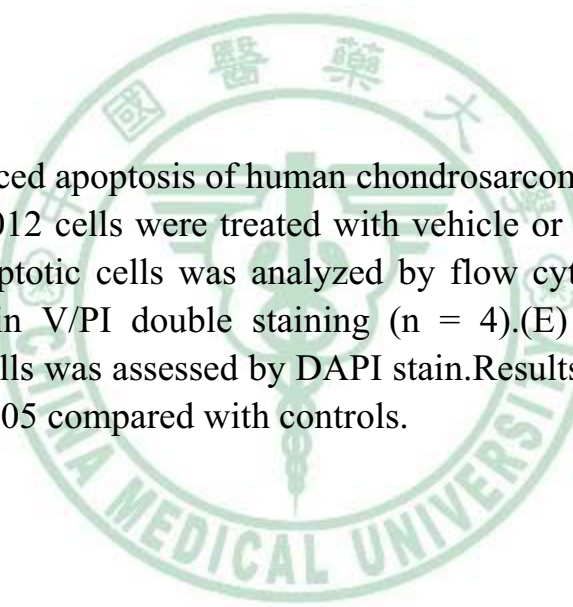


Fig 8. MPTB induced apoptosis of human chondrosarcoma cells. (A,B,C and D) JJ012 cells were treated with vehicle or MPTB for 48 h. The percentage of apoptotic cells was analyzed by flow cytometry of cell cycle assay and Annexin V/PI double staining (n = 4).(E) Apoptotic effect of MPTB in JJ012 cells was assessed by DAPI stain. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with controls.

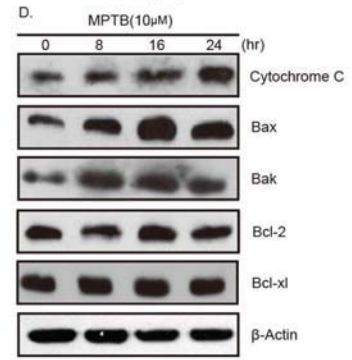
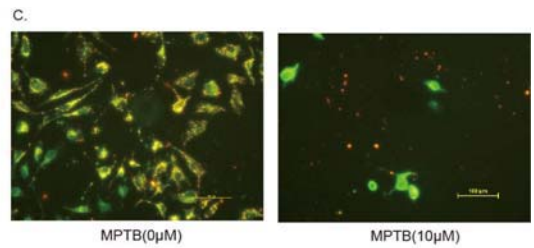
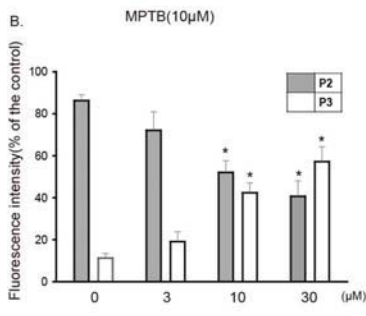
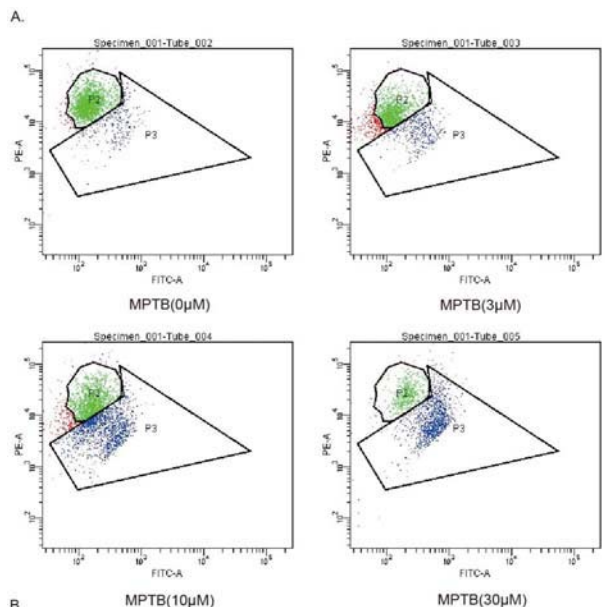
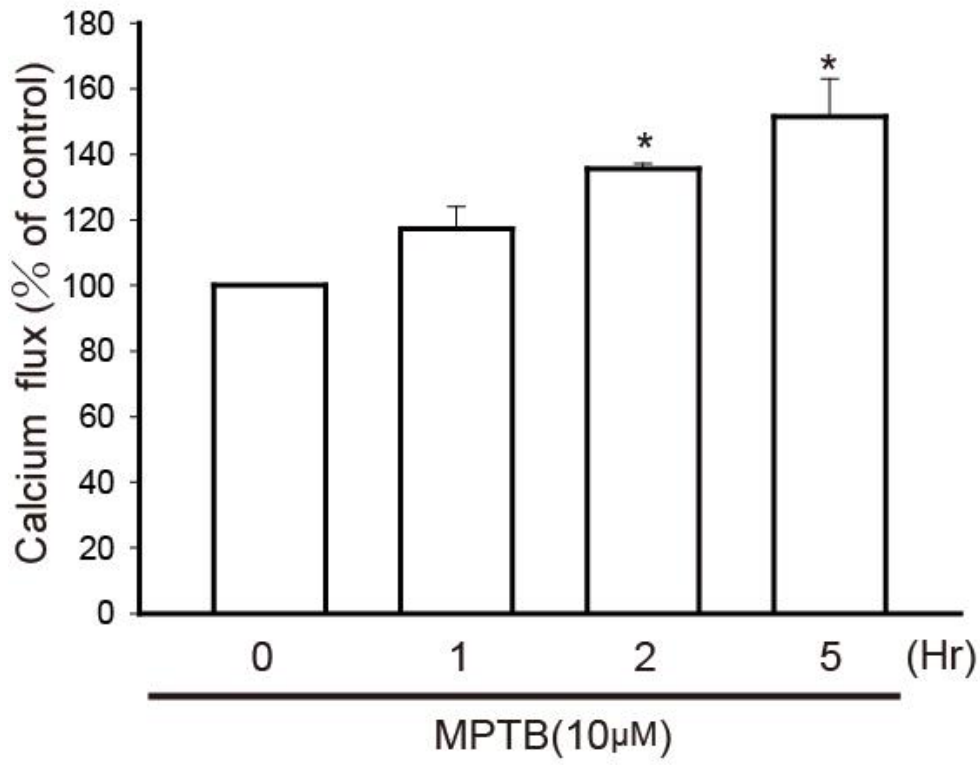


Fig 9. Assay mitochondrial membrane potential and mitochondrial membrane potential stain. Detection of Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xl and cytochrome c release after MPTB treating.

(A and B) JJ012 cells were treated with vehicle or MPTB for 48 h. The mitochondrial membrane potential of apoptotic cells was analyzed by flowcytometry of JC-1 staining. (C) JJ012 cells treated with MPTB for 48 h and JC-1 immunofluorescence was examined by confocal microscopy. (D) The levels of Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xl and cytochrome c were determined by western blot. Results are expressed as the Mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with controls.

A.



B.

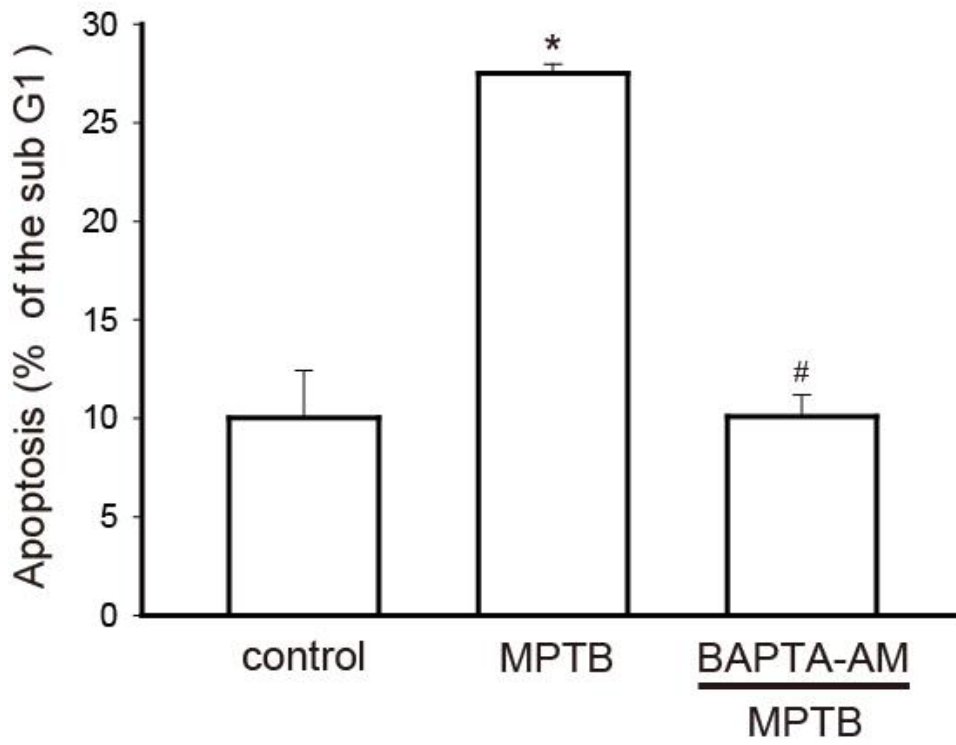


Fig 10. MPTB induced Ca^{2+} release in chondrosarcoma cells.

(A) JJ012 cells were incubated with MPTB (10 μM) for different time intervals. The Ca^{2+} flux was examined by flow cytometry (n = 4)(B) JJ012 cells were pretreated for 30 min with BATA-AM (10 μM) followed by stimulation with MPTB (10 μM) for 24 h. The percentage of apoptotic cells was the analyzed by flow cytometry of PI-stained cells. Results are expressed as the Mean \pm S.E. * p < 0.05 compared with controls; # p < 0.05 compared with the MPTB-treated group.

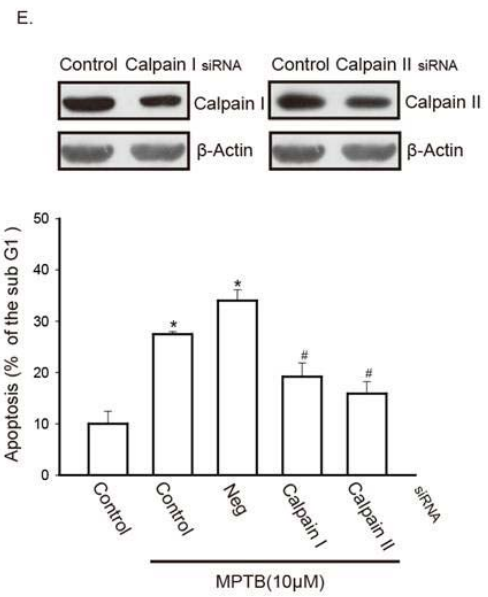
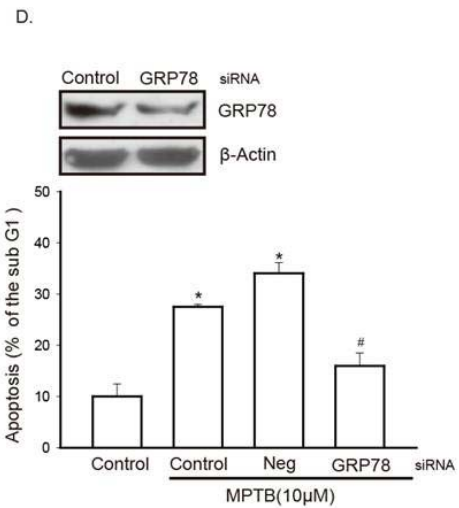
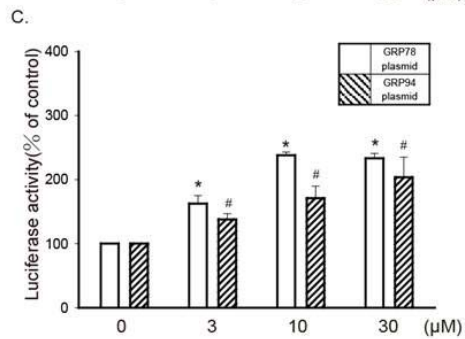
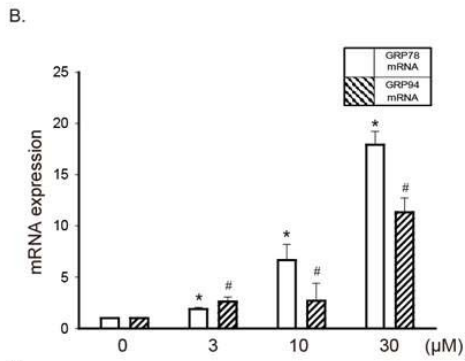
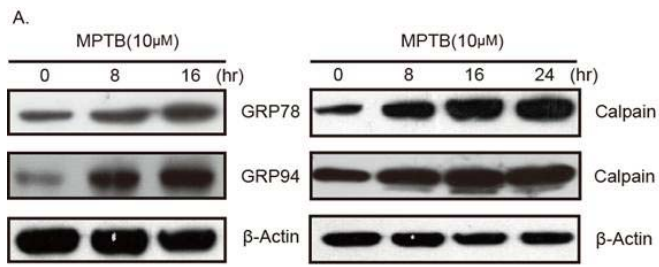


Fig 11. GRP78, GRP94, calpain I and calpain II activation are involved in MPTB-mediated cell apoptosis in human chondrosarcoma cells.

(A) JJ012 cells were incubated with MPTB (10 μ M) for different time intervals. GRP78, GRP94, calpain I and calpain II expression was examined by western blot analysis. (B) JJ012 cells were incubated with MPTB for 24 h. mRNA expression of GRP78 and GRP94 was examined by qPCR analysis. (C) Cells were transfected with GRP78 or GRP94 plasmid for 24 h, before incubation with different concentration MPTB for 24 h. Luciferase activity of GRP78 and GRP94 were examined (D) Cells were transfected with GRP78 or control siRNA for 24 h. GRP78 expression was examined by western blot analysis. Cells were transfected with GRP78 and control siRNA for 24 h, before incubation with or without MPTB for 24 h. (E) Cells were transfected with calpain I, calpain II or control siRNA for 24 h, before incubation with or without MPTB for 24 h. Calpain I and calpain II expression was examined by Western blot analysis. Cells were transfected with GRP78, calpain I, calpain II or control siRNA for 24 h, before incubation with or without MPTB for 24 h. The percentage of apoptotic cells was also analyzed by flow cytometry of PI staining. (D,E; lower panel). Results are expressed as the Mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with controls; # $p < 0.05$ compared with the MPTB-treated group.

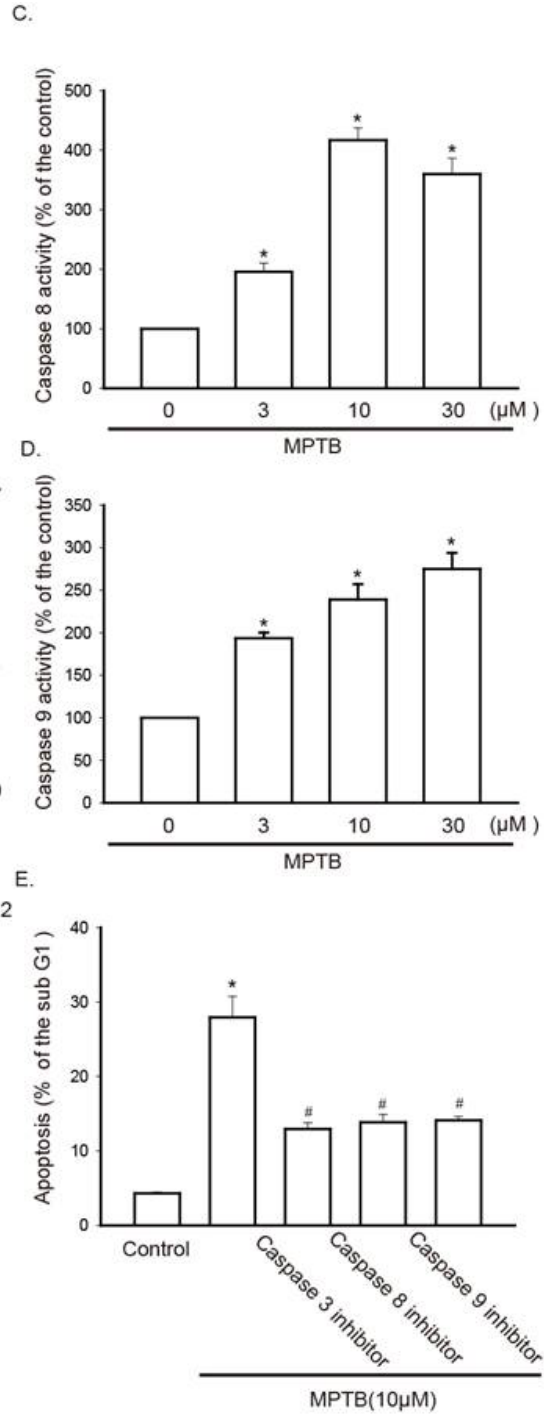
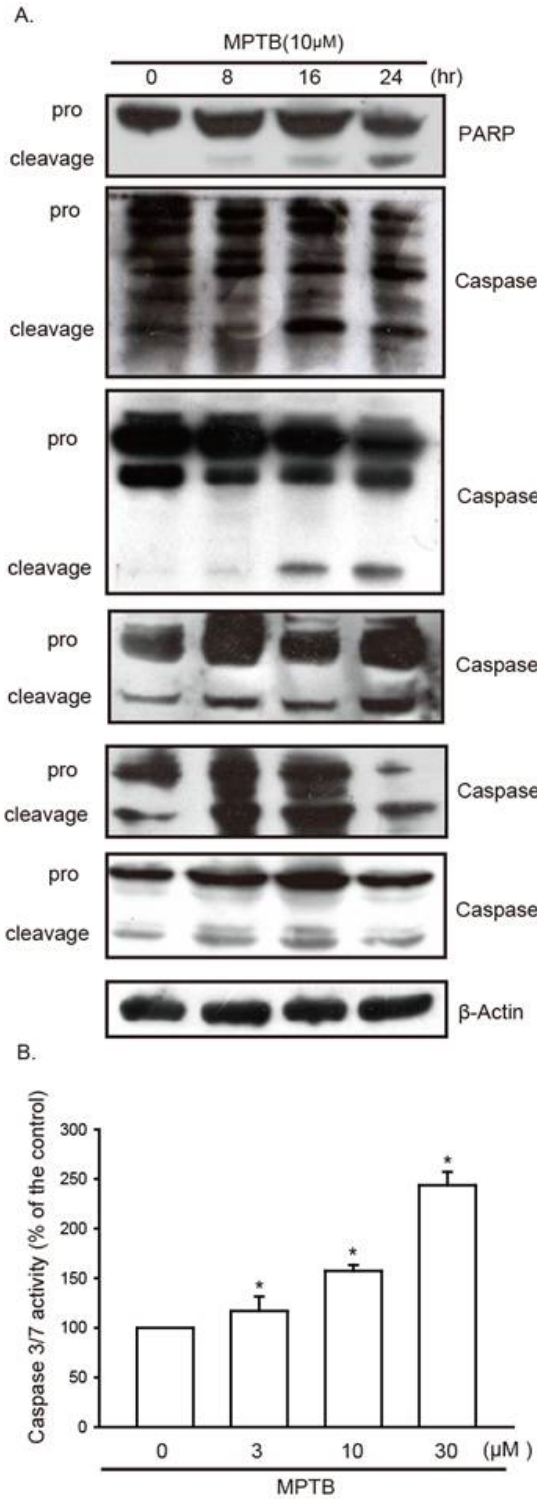
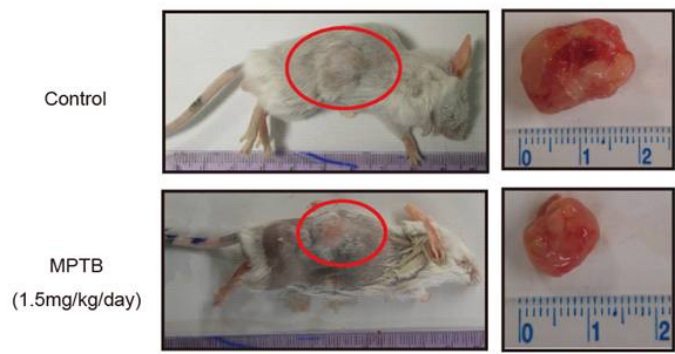


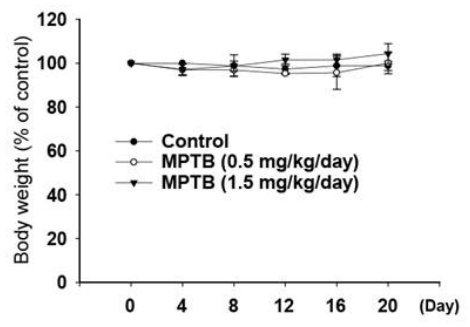
Fig 12. MPTB induces the activation of caspases in human chondrosarcoma cells.

(A) JJ012 cells were incubated with MPTB (10 μ M) for different time intervals. Levels of PARP, caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 and caspase-12 expressions were examined by Western blot analysis. JJ012 cells were incubated with MPTB for 24 h. Caspase-3/7 (B), caspase-8 (C), and caspase-9(D) activities were examined by caspase ELISA kit.(E) Cells were pretreated for 30 min with z-DEVD-FMK (caspase-3 inhibitor), z-LEHD-FMK (caspase-9 inhibitor) and z-IETD-FMK (caspase-8 inhibitor) followed by stimulation with MPTB for 24 h. The percentage of apoptotic cells was analyzed by flow cytometry of PI-stained cells. Results are expressed as the Mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with controls; # $p < 0.05$ compared with the MPTB-treated group.

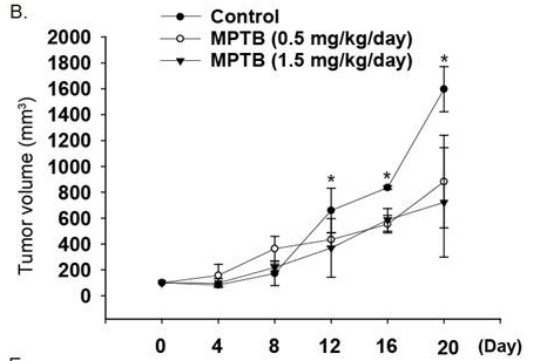
A.



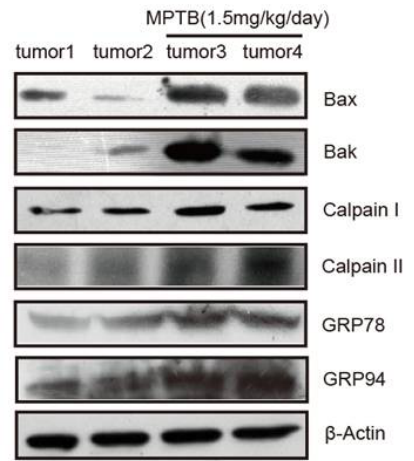
C.



B.



D.



E.

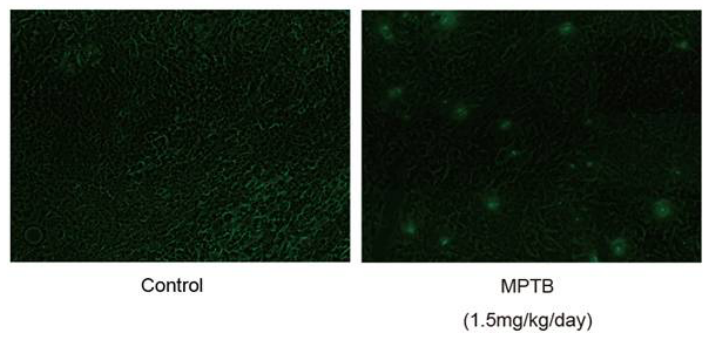


Fig 13. MPTB reduces tumor growth in SCID mice.

(A and B) MPTB inhibits tumor growth in SCID mice. Mice were injected s.c. with JJ012 tumor cells. After the tumors reached 100 mm³ in size, MPTB (0.5 or 1.5 mg/kg) or vehicle was administered daily for 3 weeks. Mean tumor volume was measured at the indicated number of days after implantation (n = 8–10). (C) Mean body weight was measured at the indicated number of days after implantation. (D) Western blot analysis determined levels of Bax, Bak, GRP78, GRP94, calpain I and calpain II expression in tumors with and without MPTB treatment. (E) TUNEL immunofluorescence determined TUNEL expression in tumors with and without MPTB treatment. Results are expressed as the Mean ± S.E. * p < 0.05 compared with controls.