



中國醫藥大學
生物科技學系碩士班
碩士學位論文

編號：BST-9810(0010)

蔓荊子黃素誘導人類黑色素瘤 A375. S2
細胞株細胞週期停滯在 G2/M 期和細胞凋亡

Casticin induces Cell Death through G2/ M Phase
Arrested and Apoptosis in Human Melanoma
Cancer A375.S2 Cells

指導教授：鍾景光 教授

共同指導教授：黃雯雯 助理教授

學生：薛茆文

中華民國一百年五月

碩士候選人學位考試

論文題目

中文：蔓荊子黃素誘導人類黑色素瘤 A375.S2 細胞株細胞週期停滯在 G2/M 期和細胞凋亡

英文：Casticin induces Cell Death through G2/ M Phase Arrested and Apoptosis in Human Melanoma Cancer A375.S2 Cells.

本論文係 薛節文 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

鍾孝先

林仁昆

楊家欣

黃雯雯

楊仁宏

系主任：

中華民國 一 百 年 六 月 八 日

中文摘要

從古自今蔓荊子黃素(Casticin)廣泛當做抗發炎劑使用，過去研究顯示可促使癌症細胞的凋亡。本研究中我們探討 Casticin 誘導人類黑色素瘤 A375.S2 細胞株細胞凋亡的機制，首先我們利用 MTT 試驗測定 A375.S2 細胞存活率和觀察細胞形態變化，藉由流式細胞儀偵測 A375.S2 細胞株的細胞週期變化、粒線體膜電位改變、活性氧基群的變化和 Caspase-3 活性表現。由 DAPI 試驗, 彗星試驗和 DNA 凝焦電泳試驗也可發現 DNA 損傷、斷裂情形。並藉由西方墨點法檢測凋亡相關蛋白和細胞週期調控蛋白的表現量。最後利用 EMSA 觀察 NF- κ B 與 DNA 結合能力。在我們的研究結果顯示，Casticin 誘導 A375.S2 細胞存活率呈現劑量依賴性而下降並能夠引起 A375.S2 細胞的細胞週期停滯於 G2/M 期和 DNA 受損。Casticin 也造成 A375.S2 細胞內活性氧基群的增加和粒線體膜電位的減少。西方墨點法證實凋亡相關蛋白 Cytochrome c, Bax, Bak, AIF, Endo G, Caspase-3 蛋白表現量增加和抗凋亡蛋白 Bcl-2, Bcl-xL, x-IAP, Mcl-1 蛋白表現量下降。另外西方墨點法也證明細胞週期 G2/M 調控蛋白 CHK-2, p21 蛋白表現量增加和 Cyclin B, Cyclin A, CDK-1 和 Cdc25c 蛋白表現量減少。此外利用免疫螢光染色法觀察 AIF 與 Endo G 被釋放到細胞質誘導下游路徑的活化並造成細胞凋亡。然而 Casticin 也抑制 NF- κ B 與核內 DNA 結合的活性。基於上述結果，我們證實 Casticin 誘導人黑色素瘤 A375.S2 細胞週期停滯在 G2 / M 期並藉由粒線體內凋亡路徑造成細胞凋亡。

英文摘要

Castacin have long been widely used as an anti-inflammatory agent, has been shown to apoptosis promoting activite in cancer cell lines. In this study, we explored the mechanism of casticin-induced cell apoptosis in human melanoma A375.S2 cells. First, we determined cell viability by MTT assay and the impact of cell morphology by phase-contact microscope were observed in A375.S2 cells. Flow cytometry analysis for the changes of the cell cycle distribution, reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), intracellular release of caspase-3 activity in A375.S2 cells were examined. DNA damage and DNA breakage were examined by DAPI staining and Comet assay. Apoptosis associated protein and cell cycle protein expressions were examined by Western blotting. Finally we also used EMSA to measure the DNA binding ability in A375.S2 cells.

Our results showed that casticin induced the decrease of cell viability in a dose-dependent manner. Casticin induced cell cycle arrest at G2/ M phase and induced DNA damage in A375.S2 cells. Castacin caused intracellular ROS increased and loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). Caspase-3 activity was significantly increased after treatment with casticin at different time. Western blot analytics proved the increase of pro-apoptotic proteins such as Bax, Bak, AIF, Endo G, cytochrome c, caspase-3, and declined the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, Mcl-1.

In addition, Western blotting showed an increase in the levels of CHK-2, p21 and a decrease in the levels of Cdc25c, Cyclin B, Cyclin A, and CDK-1. The intracytosolic release of AIF and Endo G contributing to the occurrence of apoptosis were demonstrated by confocal microscopy. The translocation and DNA binding ability of NF- κ B were decreased in A375.S2 cell line of the exposed to casticin. Based on the above results, we confirm that casticin inhibit the proliferation of human melanoma A375.S2 cells through the cell cycle arrest at G2/ M phase and induction of apoptosis through mitochondrial apoptosis pathway.

誌 謝

兩年的研究生涯中，承蒙許許多多老師以及學長姐的照顧，剛開始從一個連細胞都不會養的研究生進入到了實驗室學習，每天一點一滴的慢慢學著實驗，直到現在終於成為一個會許多實驗的研究生，而在這兩年除了實驗上的專業知識與技巧外，我還學習到了生活中待人處事的態度。

碩士這兩年期間，首先我要先感謝我的指導老師鍾景光老師，在這兩年鍾老師雖因學校事務繁忙，但仍不辭辛勞的教導我，提醒我實驗的進度與方向。我也感謝楊家欣老師和黃雯雯老師在實驗技術上給予我許多建議與協助。此外，對於兩位口試委員，台大醫學院林仁混老師、中山醫學大學醫學院楊仁宏老師也萬分感謝，在論文上給了我指點與改正，使自己的論文可以更加的完整。另一方面也感謝博士班鈞隆學長、啟誠學長、若華學姐。助理MO哥、馨中學姐、瑋婷學姐、郡誌學長、怡婷學姐。在我懵懂無知的情況下，不厭其煩的指導我實驗正確的操作方法及專業知識。也謝謝碩士班同學于絜、碩一學弟妹士鋒、彭勃、季娟、葦玉、大學部的詠庭、方于及其他學弟妹，在這兩年給了我無限的幫助，讓我順利完成我的研究論文，很謝謝大家的幫忙。

最重要的是我要感謝我的父母親，這二十幾年無怨無悔的為我付出，給予我最大的鼓勵和支持，即便我遇到挫折迷失方面時，您們還是引導我走向正確的方向，能出生在此家庭讓我深感榮幸。

總目錄

總目錄	I
圖目錄	V
表目錄	VII
縮寫表	VIII
第一章、研究緣起	1
第一節、惡性腫瘤	1
第二節、皮膚癌	2
第二章、文獻回顧	5
第一節、蔓荊子黃素 (Casticin)	5
第二節、細胞凋亡 (Apoptosis)	7
第三節、細胞核轉錄因子 - κ B (NF- κ B)活化路徑	11
第四節、細胞週期 (cell cycle)介紹	13
第五節、研究目的	14
第三章、研究材料與方法	15
第一節、實驗設計流程	15
第二節、實驗材料	16
一、細胞來源	16
二、藥品試劑	16
三、儀器設備	20

第三節 實驗方法	21
一、Casticin 的配製	21
二、人類黑色素瘤A375.S2細胞培養	21
三、細胞的冷凍保存	22
四、冷凍細胞的活化	22
五、細胞存活率 (Cell Viability)	23
六、彗星試驗 (Comet assay)	24
七、細胞核質濃縮現象	25
八、DNA膠體電泳 (DNA gel electrophoresis)	26
九、細胞週期 (Cell cycle)分析	28
十、活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS)	30
十一、粒線體膜電位 ($\Delta\psi_m$)	31
十二、Caspase-3活性測試 (Caspase-3 activity)	32
十三、西方點墨法 (Western blotting)	33
十四、免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining)	37
十五、特異性抑制劑檢測 ROS scavenger	38
十六、凝膠電泳位移測定(EMSA)	39
十七、即時定量 PCR (Quantitative PCR Analysis)	40
十八、統計分析	41

第四章、結果-----	42
第一節 Casticin 對人類黑色素瘤 A375.S2 細胞型態變化-----	42
第二節 Casticin 對人類黑色素瘤 A375.S2 與正常角質細胞 HaCaT 細胞存活率之影響-----	44
第三節 彗星試驗(Comet assay)-----	46
第四節 DAPI 染色法 (DAPI staining)-----	48
第五節 DNA 膠體電泳 (DNA gel electrophoresis)-----	49
第六節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞週期的影響-----	50
第七節 西方墨點法探討 Casticin 對黑色素瘤 A375.S2 細胞週 期蛋白表現-----	52
第八節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞產生活性氧物 質(Reactive oxygen species, ROS)的影響-----	54
第九節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞抑制劑檢測 ROS scavenger (<i>N</i> -acetyl cysteine -NAC) 的影響-----	55
第十節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞粒線體膜電位的影 響(Mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)-----	56
第十一節 Casticin 藥物誘導 A375.S2 細胞受到 Caspase-3 activity 的影響-----	57
第十二節 探討 Casticin 對 A375.S2 細胞產生細胞凋亡之相關蛋 白表現-----	58

第十三節 免疫螢光染色探討Casticin對A375.S2細胞中凋亡相關蛋白 表現與轉移之影響-----	60
第十四節 Casticin藥物對黑色素瘤A375.S2細胞Caspase 抑制劑檢測細胞存活之影響-----	62
第十五節 Quantitative PCR Analysis探討Casticin對A375.S2細 胞產生凋亡相關蛋白之mRNA表現-----	63
第十六節 探討 Casticin 對 A375.S2 細胞 NF-κB 之上游相關蛋白表 現-----	65
第十七節 Casticin對A375.S2細胞核內NF-κB蛋白表現變化-----	66
第十八節 探討 Casticin 對 A375.S2 細胞 NF-κB 與核內 DNA 結合 變化-----	67
第十九節 探討Casticin對A375.S2細胞內NF-κB之轉移位置影響-----	68
第五章、實驗討論-----	69
第六章、結論-----	75
第七章、參考文獻-----	76

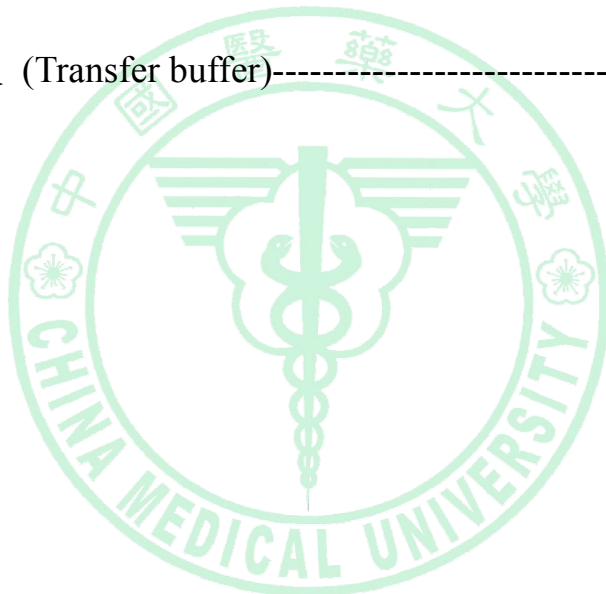
圖目錄

圖一：民國九十八年台灣十大主要死因死亡率-----	4
圖二：民國九十七、九十八年台灣十大主要死因比較-----	4
圖三：(A) <i>Vitex rotundifolia</i> 外觀(B) <i>Fructus Viticis</i> 外觀-----	5
圖四：Casticin 結構式與相關功效-----	6
圖五：外在、內在與其他相關的凋亡路徑圖-----	10
圖六：NF- κ B 活化相關路徑-----	12
圖七：本研究的實驗流程圖-----	15
圖八：Casticin 對 A375.S2 細胞型態 24 小時之變化-----	43
圖九：Casticin 對 A375.S2 細胞型態 24 小時之變化-----	43
圖十：Casticin 對於 A375.S2 與 HaCaT 細胞 24 小時細胞影響-----	45
圖十一：Casticin 對於 A375.S2 與 HaCaT 細胞 48 小時細胞影響-----	45
圖十二：Casticin 對於 A375.S2 細胞核拖尾之現象-----	47
圖十三：Casticin 對於 A375.S2 細胞染色質凝集之現象-----	48
圖十四：Casticin 對 A375.S2 細胞 DNA 斷裂之現象-----	49
圖十五：Casticin 對 A375.S2 細胞週期變化-----	51
圖十六：細胞週期之量化圖-----	51
圖十七：Casticin 對於 A375.S2 細胞週期調控蛋白的表現變化-----	53
圖十八：Casticin 對於 A375.S2 細胞產生活性氧物質影響-----	54
圖十九：Casticin 藥物對於 A375.S2 細胞特異性抑制劑 NAC 的影響-----	55

圖二十：Casticin 對於 A375.S2 細胞粒線體膜電位的影響-----	56
圖二十一：Casticin 對 A375.S2 細胞 Caspase-3 活性影響-----	57
圖二十二：Casticin對A375.S2細胞粒線體相關蛋白表現-----	58
圖二十三：Casticin對A375.S2細胞之細胞凋亡相關蛋白表現-----	59
圖二十四：Casticin對A375.S2細胞之抗細胞凋亡相關蛋白表現-----	59
圖二十五：免疫螢光染色觀察AIF的表現與轉移-----	61
圖二十六：免疫螢光染色觀察Endo G的表現與轉移-----	61
圖二十七：Casticin對A375.S2細胞Caspase抑制劑細胞存活的影响-----	62
圖二十八：Casticin對A375.S2細胞凋亡蛋白之mRNA影響-----	64
圖二十九：Casticin 對 A375.S2 細胞 NF- κ B 之上游相關蛋白表現-----	65
圖三十：Casticin 對 A375.S2 細胞 NF- κ B 蛋白表現-----	66
圖三十一：Casticin 對 A375.S2 細胞 NF- κ B 與核內 DNA 結合變化-----	67
圖三十二：免疫螢光染色法觀察NF- κ B之表現與轉移-----	68
圖三十三：Casticin誘導人類黑色素瘤A375.S2細胞凋亡之路徑模式-----	75

表目錄

表一：細胞凋亡 (Apoptosis) 與細胞壞死 (Necrosis)-----	7
表二：Agarose Gel 的配置-----	27
表三：Cell cycle 之 PI 染劑-----	29
表四：SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel)之配置與組成-----	36
表五：SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel)之配置與組成-----	36
表六：電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer)-----	36
表七：轉漬緩衝液 (Transfer buffer)-----	36



縮寫表

AIF : Apoptosis-inducing factor

CDK : Cyclin-dependent kinase

DMSO : Dimethylsulfoxide

Endo G : Endonuclease G

FBS : Fetal bovine serum

IAPs : Inhibitor of apoptosis proteins

PBS : Phosphate buffer saline

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

I κ B : Inhibitor of kappa B

Ikk : I κ B kinase

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

DiOC6 : 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodine

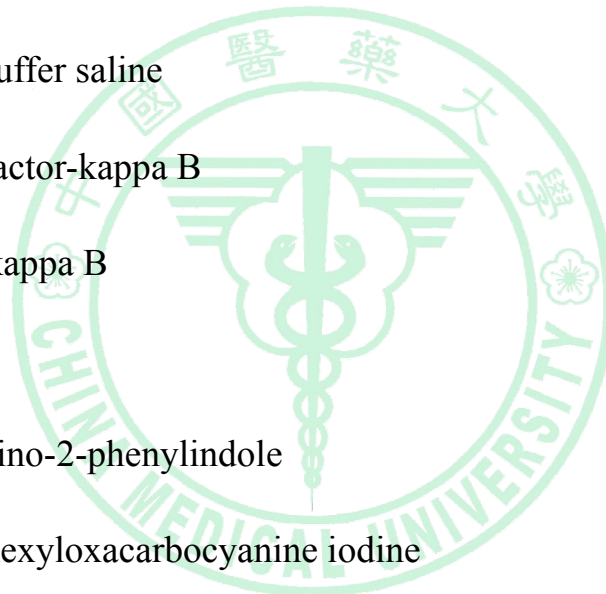
FITC : Fluorescein isothiocyanate

HRP : Horseradish peroxidase

MMP : Mitochondrial membrane potential

ROS : Reactive oxygen species

NAC : *N*-acetyl-cysteine



第一章、研究緣起

第一節、惡性腫瘤

癌症是基因錯誤引起的疾病，當細胞變成異常且持續的自行分裂形成更多的細胞時就產生癌症。癌症又稱為惡性腫瘤，是目前全球最常見的疾病，也是台灣十大死因之首。行政院衛生署公佈國人 98 年度主要死因統計，惡性腫瘤(癌症) 連續 28 年高居首位，平均每 13 分 10 秒有一人死於癌症，其餘各主要死因包括心臟疾病、腦血管疾病、肺炎、慢性下呼吸道疾病、自殺與腎臟相關疾病(圖一)¹。衛生署也指出，若和 97 年死因統計比較，98 年度所統計的十大主要死因結果，內容相同。其中仍以惡性腫瘤占 28.1% 最多(圖二)²。

癌症的主要特性是細胞持續生長而不受外在訊息調控，使使得原致癌基因(proto-oncogene)轉變為致癌基因(oncogene)，將細胞導入到癌變狀態³⁻⁴。現今社會上致癌物質有很多種，基本上可分為化學性致癌物與物理性致癌物。例如接觸放射性物質，或是一些環境因子，例如，香煙、輻射、酒精。還有一些病毒可將本身的基因插入細胞的基因裡中，激活致癌基因⁵。

第二節、皮膚癌

人體皮膚顏色改變的主要因素為皮膚色素細胞(melanocytes)內之酪胺酸(tyrosine)受酪胺酸酶(tyrosinase)催化，經氧化而生成黑色素細胞(melanin)⁶。皮膚癌是一種生長在皮膚上的一種癌症，最常見的三種皮膚癌是基底細胞癌、鱗狀細胞癌和黑色素瘤。人類黑色素細胞癌的發生率占所有癌症的百分之三至八成，較血癌和胃癌的發生率都高⁷。據世界衛生組織報告，全球每年發生黑色素瘤有關的死亡人數約 48000 人，而在英國，截止至 2009 年，在 20 歲到 30 歲的人群中，平均每年有 9500 人罹患此病，2300 人死亡⁸⁻⁹。黑色素瘤是最嚴重類型的皮膚癌，多由長時間的太陽照射造成，男性多發現在肩膀或頭部和頸部。女性則多發現在下肢¹⁰。目前造成黑色素瘤的病因有很多，例：紫外線照射、結構不良痣、遺傳、外傷、免疫缺陷或免疫功能減退。惡性黑色素瘤可細分為下列種類¹¹⁻¹³：

- 1.惡性雀斑樣痣(Lentigo maligna melanoma)
- 2.結節狀黑色素瘤(nodular malignant melanoma)
- 3.表面擴散型黑色素瘤(superficial spreading melanoma)
- 4.肢端型黑色素瘤(acrak lentiginous)

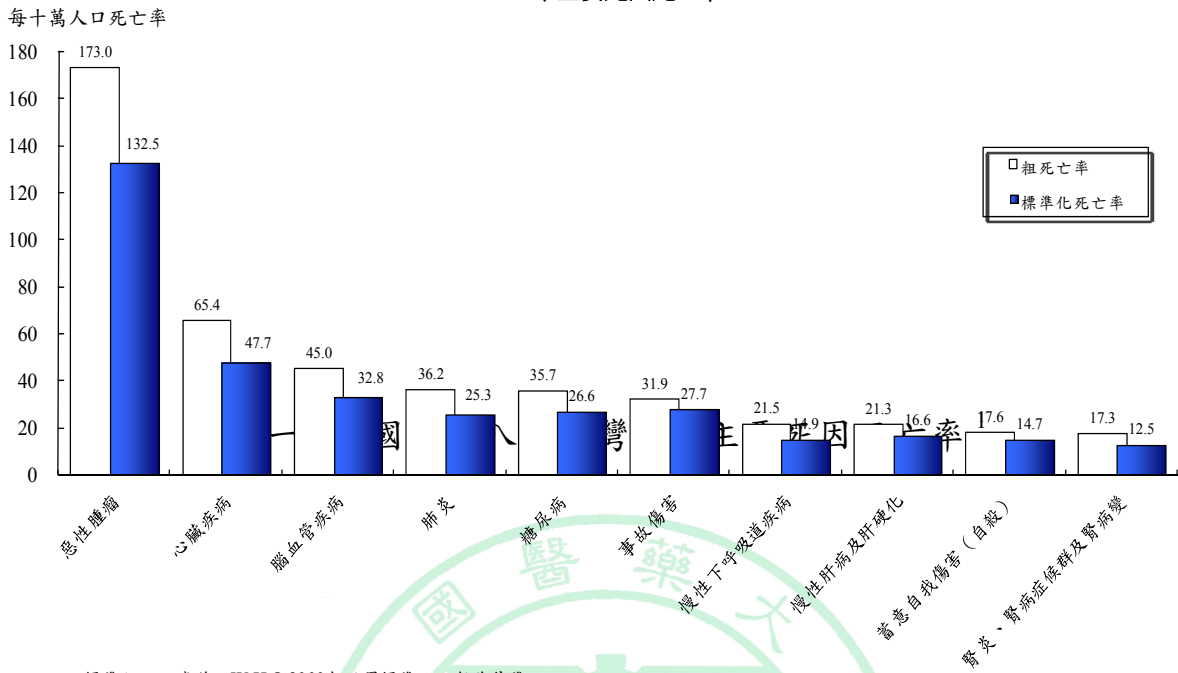
現今對於黑色素瘤，雖可藉由外科治療(切除)、放射治療、化學治療、

免疫治療¹⁴⁻¹⁵, 等方式來去除。但有時這些治療方法的效果並不是非常顯著。在最嚴重的情況下, 即使使用各種化療或生物療法、免疫療法, 也只是暫時使腫瘤變小, 延後死亡, 對於完全康復還有待評估。

隨著醫療技術的進步, 針對許多癌症病患已不單單只有使用化學治療的方式, 另還伴隨著傳統的中草藥作為輔助療法。抗癌藥物的治療主要以干擾癌細胞生長、代謝、增殖、誘導細胞凋亡為主軸¹⁶, 若中草藥具備有這些療效, 那對癌症病患真是一大福音。因此, 本研究利用中草藥化合物蔓荊子黃素(Casticin)作為研究的材料, 初步檢測對於人類黑色素瘤細胞生長的抑制與誘導細胞凋亡的機轉, 作為未來Casticin發展為抗癌藥物之參考。

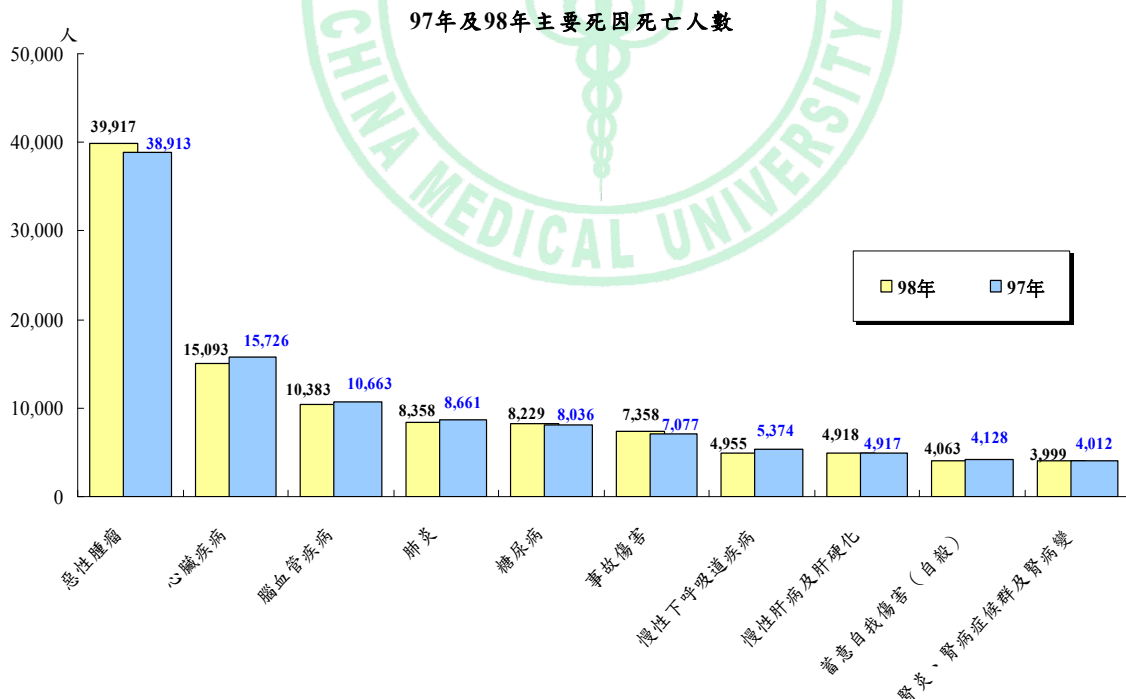


98年主要死因死亡率



附註：標準化死亡率係以W.H.O.2000年世界標準人口數為基準。

圖一：民國九十八年台灣十大主要死因死亡率



圖二. 民國九十七、九十八年台灣十大主要死因比較¹

第二章、文獻回顧

第一節 蔓荊子黃素(Casticin)

Casticin 主要是 *Vitex rotundifolia*(圓葉蔓荊) 成分之一，*Vitex rotundifolia*(圖三)在東方國家已廣泛應用為一種抗發炎藥物有數千年之久¹⁷。

其 *Vitex rotundifolia* 成熟的果實被稱為 *Fructus Viticis* (蔓荊子) (圖三)。

(A)



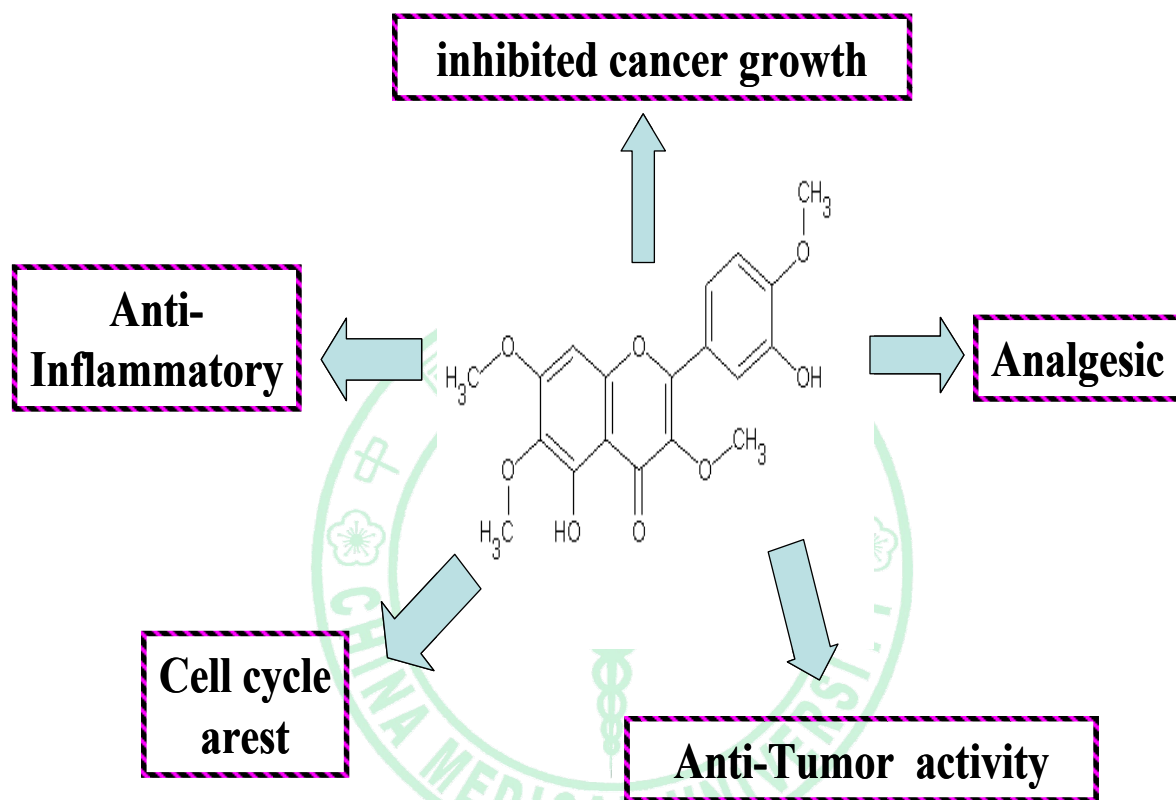
(B)



圖三. (A) *Vitex rotundifolia* 外觀(B) *Fructus Viticis* 外觀¹⁸⁻¹⁹

Casticin 是一種黃酮類的化合物，別名為 Vitexicarpin，其分子量為 374.35 g/mol。有研究指出 Casticin 具有顯著抑制脂質過氧化作用²⁰，並已發現能夠抑制 T 淋巴細胞以及 B 淋巴細胞增殖，在體內具有消炎的作用²¹⁻²²。在抗癌方面，Casticin 的類黃酮具有多種腫瘤細胞毒性作用機制，Casticin 可抑制人類肺癌細胞 (PC-12) 和人類結腸癌細胞(HCT-116)的活性²³。細胞週期調控中可誘導 p21 蛋白，抑制 CDK-1 蛋白，使細胞週期調控蛋白 Cyclin A 表現量減少，造成細胞週期 G2/M 停滯²²。另一方面 Casticin 也可誘導血癌細胞內抗凋亡蛋白 Bcl-2 表現量下降，讓血癌細胞走向凋亡²⁴。根據以上研究報告顯示，Casticin 對於癌症的治療是非常有潛力(圖四)，但目前還沒

有研究指出，Casticin 對於人類黑色素瘤的抗癌機制，因此本論文探討 Casticin 對於人類黑色素瘤細胞株 A375.S2 是否有抗癌效果與相關機制。



圖四. Casticin 結構式與相關功效

第二節 細胞凋亡 (Apoptosis)

當細胞受到損傷，而細胞無法自我修復的時候，細胞將漸漸的走入死亡，細胞死亡的方式有三種：細胞凋亡 (Apoptosis)、細胞自噬 (Autophagy)，以及細胞壞死 (Necrosis)。細胞凋亡這一名詞源自希臘語，又可稱為程序性細胞死亡²⁵。細胞凋亡與細胞壞死比較(表1)。細胞凋亡常常發生在單一細胞或是一小群細胞群落，細胞形態上和生化特徵發生改變，如細胞膜的皺縮 (Zeiosis or rapid blebbing)、胞內DNA被降解、細胞會逐漸皺縮 (shrink) 與聚集 (condense)、磷脂醯絲胺酸 (PS) 從胞內向外翻，同時細胞凋亡體 (apoptotic body) 形成，一旦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²⁶⁻²⁷。

表一. 細胞凋亡 (Apoptosis) 與細胞壞死 (Necrosis)²⁸⁻²⁹

	Apoptosis	Necrosis
組織學	個別細胞染色質濃縮，凋亡體 (apoptotic body)	細胞腫脹、凝固性壞死、胞器瓦解
細胞膜	磷脂 phosphatidylserine 外翻	完整性喪失
機轉	基因活化，核酸內切酶	ATP 用盡，細胞膜受損、自由基傷害
細胞反應	沒有發炎反應，凋亡體被吞噬	有發炎反應
DNA 降解	斷裂成約 180-200 bp 的片斷	隨意性且廣泛性斷裂

引發細胞凋亡的路徑可分為兩種類型：一種是內在路徑(Internal pathway)，另一種是外在路徑(External pathway)³⁰。

第一、內在路徑(Internal pathway)

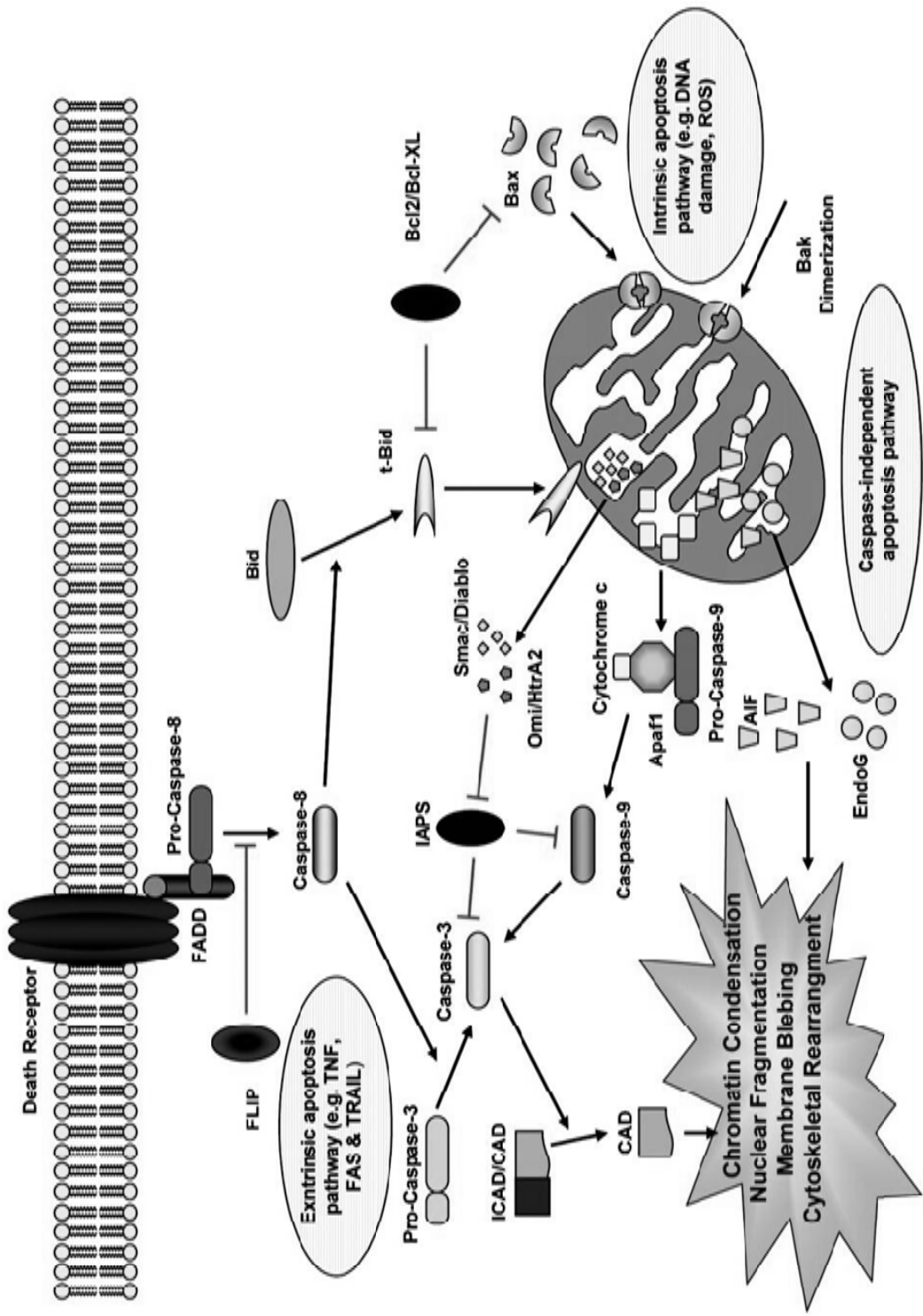
內在路徑主要是藉由粒線體(mitochondrial)或是內質網(endoplasmic reticulum)所引起³¹，其中最重要的調控著是 Bcl-2 家族蛋白³⁰，Bcl-2 本身為凋亡抑制基因，根據功能和結構可將 Bcl-2 基因家族分為兩類，一類是抗凋亡的 (anti-apoptotic)，如：Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1；一類是促進凋亡的 (pro-apoptotic)，如：Bax、Bak、Bad、Bid、Bim。而整個 Bcl-2 家族在粒線體參與的凋亡途徑調控作用³²⁻³³，當粒線體接受到促死刺激時，Bax 會轉移至粒線體外膜引起膜電位下降，使其打開線粒體膜孔，釋放出 Cytochrome *c*、AIF、Endo G。Cytochrome *c* 會誘導 Apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)跟 proCaspase-9 結合，引起 Caspase-9 的活性進而活化下游的 Caspase-3 活性並引起細胞凋亡³⁴。而 AIF、Endo G 會直接進入細胞核中對 DNA 進行裂解，而引起細胞凋亡³⁵。

第二、外在路徑(External pathway)

外在路徑(External pathway)，又稱為死亡受器路徑，此路徑是指細胞膜表面存在著接受 apoptotic signals 的受器 (receptor)，當特殊的 ligand 結合受器之後，便可誘使某些蛋白鍵結在受器上，並引發下游的 caspases 活化

³⁶。CD95(Fas) 是死亡受器家族的一員，當 Fas 與配位體 (ligand)Fas Ligand (FasL)結合後會啟動下游蛋白 FADD (Fas-associated death domain)³⁷，將 Procaspase-8 裂解使之活化 Caspase-8，。活化的 Caspase-8 再使 Caspase-3 活化而導致細胞凋亡³⁸。另外有文獻指出，部分活化 Caspase-8 的會去裂解 Bid，Bid 會活化 Bax 使得粒線體膜電位下降和 Bcl-2(抗凋亡蛋白)受到抑制，進一步地導致粒線體內 Cytochrome *c* 釋放，引發內在路徑的開啟，最後形成細胞凋亡³⁹。

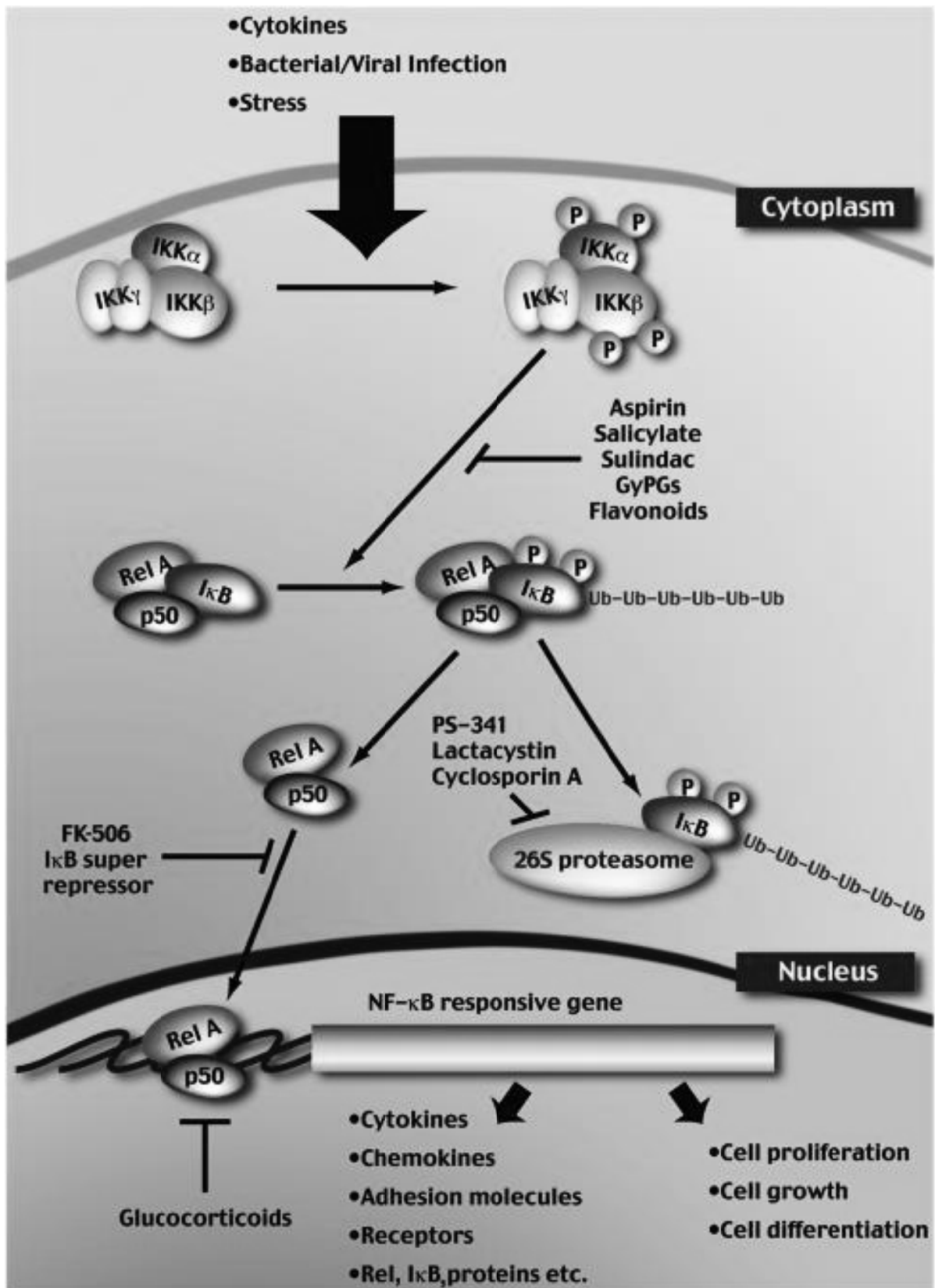




圖五. 外在、內在與其他相關的凋亡路徑圖⁴⁰

第三節 細胞核轉錄因子- κ B (NF- κ B)活化路徑

NF- κ B是由不同的次單元體(subunits)組成的同二聚體(homodimers)。家族成員依結構蛋白質的不同被分為五種：p50, p52, p65 (Rel A)⁴¹。Rel B 以及 c-Rel。而p65, Rel B 及 c-Rel 都具有一段活化區域 (activation domains)，這一段活化區域的氨基酸序列稱為 Rel homology region (RHR) 是用來與 DNA 鍵結或形成二聚體的區域。有研究已指出，NF- κ B的活化作用與調控細胞凋亡 (apoptosis) 有關⁴²⁻⁴³。大多數細胞中NF- κ B以p65/p50 heterodimer存在⁴¹。在未活化狀態下NF- κ B在細胞質中與I κ B結合而抑制活性。當細胞受到外來的刺激，如TNF- α 、LPS，便會活化IKK (I κ B kinase)，活化型的 IKK 則會磷酸化與NF- κ B相結合的I κ B，磷酸化的I κ B受到 ubiquitination而被26S proteasome分解而使 NF- κ B被釋放⁴⁴⁻⁴⁶。NF- κ B被釋放後即進入細胞核中成為轉錄因子或是抑制細胞凋亡作用⁴⁷⁻⁴⁸。許多研究已經顯示出，NF- κ B抑制細胞凋亡似乎是因為NF- κ B活化，促進x-IAP (X-linked inhibitor of apoptosis)、cIAPs (caspase inhibitors of apoptosis proteins)、Bcl-x (B cell lymphoma x)、以及 Bcl-2 (B cell lymphoma 2) 表現，而抑制細胞凋亡起始因子 Caspase-8 和 9 的活化作用⁴⁹⁻⁵¹。此外NF- κ B除了跟調控細胞凋亡 (apoptosis) 有關外，也參與細胞循環、細胞分化、細胞移動、血管新生以及發炎反應，如調控基質金屬蛋白酶 9 (MMP-9)、血管內皮細胞生長因子 (VEGF)、一氧化氮合成酶 (iNOS) 的改變⁵²⁻⁵³。



圖六. NF- κ B活化相關路徑⁵⁴

第四節 細胞週期(cell cycle)介紹

細胞週期可分四階段，分別為DNA合成前期 (G₁, gap 1)，DNA合成期 (S, synthesis) 和DNA合成後期 (G₂, gap 2)，有絲分裂期 (M, mitosis)⁵⁵。在有絲分裂期的階段又可細分為五期，分別為prophase (前期)、metaphase (中期)、anaphase (後期)、cytokinesis (細胞質分裂期)、telophase (末期)⁵⁶。當細胞由G₁期→S期→G₂期→M期分裂完時會離開細胞週期並停止分裂以等待下次分裂的開始，此時稱為G₀ phase⁵⁷。

細胞週期主要受到 cyclin, cyclin-dependent kinase (CDK) 以及 CDK inhibitor (CKIs) 調控。其中 cyclin 及 CDK 兩者會在細胞質中結合形成 complex 並進入核內促進 cell cycle 進行，如在 G₁ 期→S 期主要是由 cyclin D、E、CDK4、6 結合調控，G₂ 期→M 期主要由 cyclin A、B、CDK2 調控。而 CKIs 則會和 cyclin, CDK 所形成的 complex 結合，因而使 cyclin 及 CDK 分離造成 cell cycle 的停止⁵⁸⁻⁵⁹。

然而細胞週期在每個階段也都設有 checkpoint 的機制來阻礙細胞週期的進行。Checkpoint 可分為 (1) G₁ checkpoint：主要決定是否應該細胞分裂、延遲、停止分裂並檢查 DNA 是否受損。(2) G₂ checkpoint，主要檢查細胞的大小和 DNA 的複製過程是否完全。(3) spindle assembly checkpoint，主要檢查染色體是否附著在紡錘體上⁶⁰⁻⁶¹。

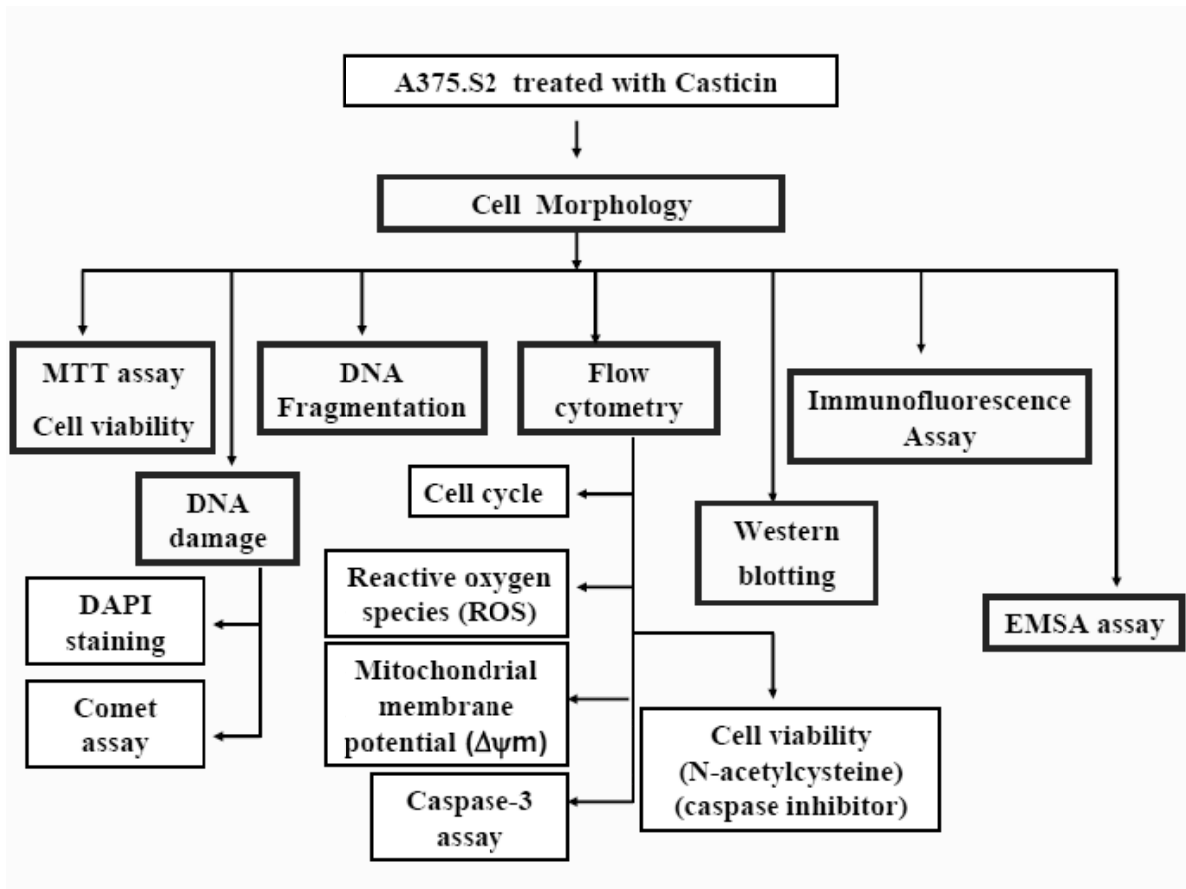
第五節 研究目的

綜合有關 Casticin 相關研究指出，Casticin 早期只當做抗發炎藥劑使用，但現今逐漸被應用在抗癌方面。但未有研究指出 Casticin 對於人類黑色素瘤細胞株 A375.S2 的抗癌效果與機制。因此本研究主要是利用 Casticin 是否對人類的黑色素瘤細胞株 A375.S2 具有毒殺的效果，並進一步的推斷其造成細胞死亡與細胞週期停滯而誘發產生細胞凋亡的分子機轉。



第三章、研究材料與方法

第一節 實驗設計流程



圖七. 本研究的實驗流程圖

第二節 實驗材料

一、細胞來源

本論文實驗所使用的細胞為人類黑色素瘤 (Human Melanoma cancer)細胞株 A375.S2，購自新竹食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute)

二、藥品試劑

1. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)：購自 Amresco
2. 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodine (DiOC₆)：購自 calbiochem
3. 40% Acrylamide/Bis (29:1)：購自 Amresco
4. Agarose：購自 MD 生化有限公司
5. Ammonium persulfate (APS)：購自 Amresco
6. Casticin：購自 Sigma Chemical Co
7. BioMax Flim：購自 Kodak
8. Bovine serum albumin (BSA)：購自 Merck
9. Dimethyl sulfoxide (DMSO)：購自 Sigma Chemical Co.
10. Disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄)：購自 Merck
11. ELC kit (Enhanced chemiluminescent kit)：購自 Amresco
12. Ethanol：購自 TEDIA
13. Fetal bovine serum (FBS)：購自 Invitrogen

14. Formaldehyde : 購自 Sigma Chemical Co.
15. 1Glycine : 購自 Amresco
16. L-Glutamine : 購自 Invitrogen
17. Low melting agarose (LMA) : 購自 USB
18. Methanol : 購自 TEDIA
19. N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) : 購自 Amresco
20. Fluo-3/AM : 購自 Molecular Probes, Invitrogen
21. Penicillin-Streptomycin (PS) : 購自 Invitrogen
22. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
23. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) : 購自 Merck
24. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
25. MEM medium : 購自 Gibco 3
26. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
27. Normal melting agarose (NMA) : 購自 USB
28. PhiPhiLuxR kit : 購自 OncoImmulin (Gaithersburg, MD, USA)
29. Protein extraction solution (PRO-PREP) : 購自 iNtRON
Biotechnology, Inc.
30. Protein marker : 購自 Fermentas
31. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amresco
32. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck

33. Sodium dodecyl sulfate (SDS) : 購自 Amresco
34. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) : 購自 Amresco
35. Triton X-100 : 購自 Sigma Chemical Co.
36. Trypan Blue : 購自 Sigma Chemical Co.
37. Tween-20 : 購自 Amresco
38. Trypsin-EDTA : 購自 Sigma Chemical Co.
39. Tween-20 : 購自 Amresco
40. 顯影劑、定影劑 : 購自 Kodak
41. Primary antibody (1°antibody)
 - I. Anti-β actin : 購自 Sigma Chemical Co.
 - II. Anti-AIF : 購自 BD
 - III. Anti-Bid : 購自 Chemicon
 - IV. Anti-Bax : 購自 Upstate
 - V. Anti-Bcl-2 : 購自 Upstate
 - VI. Anti-Caspase-3 : 購自 Sigma Chemical Co.
 - VII. Anti-Caspase-9 : 購自 Upstate
 - VIII. Anti-Cdc25c : 購自 BD
 - IX. Anti-Cytochrome c : 購自 biovision
 - X. Anti-Endo G : 購自 Santa cruz
 - XI. Anti-CDK-1 : 購自 Upstate

- XII. Anti-CHK-2 : 購自 Upstate
- XIII. Anti-CyclinA : 購自 BD
- XIV. Anti-CyclinB : 購自 BD
- XV. Anti-Bcl-xL : 購自 Santa cruz
- XVI. Anti-Bak : 購自 Cell Signaling Technology
- XVII. Anti-x-IAP : 購自 Santa cruz
- XVIII. Anti-Mcl-1 : 購自 Santa cruz
- XIX. Anti-PCNA : 購自 Santa cruz
- XX. Anti-P65 NF- κ B : 購自 Santa cruz
- XXI. Anti-P50 NF- κ B : 購自 Santa cruz
- XXII. Anti-I κ B : 購自 Santa cruz
- XXIII. Anti-p-I κ B : 購自 Santa cruz
- XXIV. Anti-Ikk : 購自 Santa cruz
- XXV. Anti-p-Ikk : 購自 Santa cruz
42. Secondary antibody (2°antibody)
- I. Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody : 購自 Chemicon
- II. Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody : 購自 Chemicon
- III. Goat anti-sheep IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody : 購自 Chemicon

三、儀器設備

1. 無菌操作台、細胞培養皿、細胞培養箱、冷凍管、Pipetmen、恆溫離心機、血球計數板、倒立式顯微鏡、Dispenser。
2. 去離子水製造機、電源供應器、酸鹼值測定器 (pH meter)、震盪器、SDS-PAGE 電泳槽套組、Transfer Cell Bolt Kit、加熱板。
3. 流式細胞儀、高速離心機、酵素免疫分析儀、單細胞電泳槽。



第三節 實驗方法

一、Casticin 的配製

Casticin 為固體藥物，別名 Vitexicarpin。Casticin 的分子量為 374.35 g/mol，純度為 98%，黃酮類化合物。利用 DMSO 為溶劑配置成 10 mM 的庫存液 (stock solution)，並分裝於 1.5 ml 微量離心管。庫存液儲存於-20°C 冰箱中備用，於每次實驗前利用 DMSO 稀釋成所需之濃度。

二、人類黑色素瘤 A375.S2 細胞培養

A375.S2 所使用的培養基為 MEM medium，額外添加胎牛血清 (FBS)、抗生素(PS)與 L-Glutamine (LG)，使細胞培養基最終含有 10% FBS、1% PS 與 2 mM L-Glutamine。細胞培養箱環境具有 5% CO₂ 與 37°C 的溫度。約隔 1 至 2 天換一次培養基，當細胞在細胞培養瓶中生長至八、九分滿時，避免細胞生長過於擁擠而導致細胞狀態不良，甚至死亡，所以可進行繼代培養或分盤以供實驗之用。

A375.S2 屬貼附型細胞，因此每次繼代培養或分盤實驗時都需要利用 Trypsin-EDTA 將細胞懸浮。先以磷酸緩衝液 (Phosphate buffer saline, PBS) 清洗細胞，再加入 1~3 ml 的 0.5 mg/ml Trypsin-EDTA 處理 3 至 5 分鐘，當細胞完全懸浮時，加入培養基以終止 Trypsin-EDTA 的反應，移至離心管中，並離心 1500 rpm，5 分鐘。離心完後去除上清液，加入培養基稀釋細胞。一部分細胞至新的培養瓶中進行繼代。剩餘的細胞則是利用血球計數盤與

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

三、細胞的冷凍保存

將 A375.S2 細胞大量培養後，在細胞處於生長狀態良好且存活率高之情況下進行冷凍細胞。首先冷凍保存之細胞濃度： 5×10^6 cells/ml。配置抗凍劑，使用 DMSO 與 FBS 混和配置成含有 5% DMSO 的 FBS，置於室溫下待用。將細胞收集後，將抗凍液加入細胞中並分裝置冷凍小管中，標示好細胞名稱、數目及冷凍日期。冷凍順序分別依序按照以下步驟進行降溫： 4°C 存放 30 分鐘， -20°C 存放 60 分鐘，最後於 -80°C 存放至隔夜，之後再移至液態氮桶中保存。

四、冷凍細胞的活化

解凍細胞的過程需要以快速為原則，如此可避免冰晶的產生與濃度過高的 DMSO 對細胞造成的傷害，導致細胞的死亡。因此將細胞從液態氮桶中取出後，馬上以 37°C 水浴槽快速回溫。等待溶解後加入培養基並均勻混和以便稀釋 DMSO 濃度，並使用離心機轉速 1500 rpm 5 分鐘，將抗凍劑去除。移去上清液後加入新鮮培養基。種細胞於培養瓶中並於隔日更換新的培養基，約培養一週後，待解凍的細胞恢復正常活性後才能開始實驗。

五、細胞存活率 (Cell Viability)⁶²

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

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 1×10^4 cells/ml 的濃度接種於 96 孔盤培養盤中，等待貼附後使用連續稀釋加入不同濃度 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 μ M 的 Casticin 藥物，分別培養 24 與 48 小時後去除上清液，並且加入 200 μ L 的 MTT (0.5 mg/mL) 試劑，待反應時間 3.5 小時後，去除上清液並加入 200 μ L 的 DMSO 使紫色的 formazan 結晶物溶解出後，再利用 ELISA reader 以 570 nm 測吸光值，以得知細胞的存活率。

六、彗星試驗 (Comet assay)⁶³

實驗原理

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

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 2×10^5 cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後加入不同濃度 1, 2, 4 μM 的 Casticin 藥物。等待 24 小時後，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心，去除上清液後加入 PBS。在磨砂載玻片上標上號碼，置 70 μL 的下層膠於載玻片上，將蓋玻片蓋上並防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片。取 10 μL 細胞液混合 60 μL 上層膠加在下層膠上，將蓋玻片蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片。將做好的載玻片置於 Lysis buffer 中。反應後，將玻片移至 alkaline buffer 中。進行電泳以 25 V、300 mA 的條件電泳。電泳完後將膠移至 0.4 M Tris buffer。接著將膠置於 methanol 中脫水 5 分鐘。最後於膠上滴 40 μL 的 PI 染色，再利用螢光顯微鏡觀察拍照。

七、細胞核質濃縮現象⁶⁴

實驗原理

DAPI (4'-6-diamidine-2-phenyl indole)是一種核酸螢光染劑，會專一性的與 DNA 雙股螺旋上的小溝 (minor groove)結合，當細胞凋亡時會出現染色質凝集與 DNA 斷裂 (DNA fragmentation)等現象。當細胞凋亡的越嚴重時，DNA 的損害相對地也就越嚴重，因此 DAPI 染劑就會染上的越多，在螢光顯微鏡下觀察就會發現螢光強度越亮。

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 5×10^4 cells/ml 的濃度接種於 24 孔盤培養盤中，再將培養盤放置 37°C、5% CO₂ 培養箱中，待細胞貼附後分別以 1.57, 3.14, 6.25, 12.5, 25 μ M 的 Casticin 藥物處理後，等待 24 小時後。先去除培養盤中的培養基，再以 PBS 清洗。利用 3% Formaldehyde 在 4 °C 下固定。以 PBS 清洗並加入 Triton X-100 1mL (蓋過細胞即可) 反應 15 分鐘後，再以 PBS 清洗，加入 DAPI 染劑室溫避光反應約 30 分鐘後，最後利用 PBS 洗去多餘的 DAPI 染劑。利用螢光顯微鏡觀察並照相。

八、DNA 膠體電泳 (DNA gel electrophoresis)⁶⁵

實驗原理

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

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 1×10^5 cells/ml 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，再將培養盤放置 37°C、5% CO₂ 培養箱中，待細胞貼附後分別以 1, 2 μM 的 Casticin 藥物處理後。經過 24 小時之後以 Tissue and Cell Genomic DNA Purification Kit (Gene Mark)抽取 DNA，將上清液收至離心管中，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。懸浮後的細胞加入 1 mL 的培養基與 Trypsin-EDTA 中和反應，並將細胞收到離心管中。接著離心 5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心 5 分鐘重複 2 次。去除上清液後將細胞打散，加入 700 μL PBS mix 後移至 eppendorf，離心 10 秒，小心移去上清液加入 200 μL 的 sterile PBS，混和均勻。加入 48 μL RNase A (10 mg/ mL)，靜置室溫 5 分鐘。加入 20 μL Proteinase K 和 200 μL Binding buffer，混和均勻後放入 70°C 乾浴鍋，等待 10 分鐘 (當加入 Binding buffer 時，可能會有白色沉澱物出現，加熱至 70°C 後會溶解) 後加入 200 μL Ethanol 後 pipet

均勻，移置到 spin column，高速離心 13000 rpm，1 分鐘。丟棄下面液體，加入 300 μ L Binding buffer (若太濃稠可再加入 200 μ L Binding buffer)，以高速離心 1 分鐘。丟棄下面液體，加入 600 μ L Washing solution，再以高速離心 1 分鐘。丟棄下面液體，加入 600 μ L Washing solution，再以高速離心 1 分鐘。最高速離心到乾，3 到 5 分鐘(更換新已去上蓋的 ependorf)。丟棄下面液體。使用新 ependorf 並放入 55°C 烘箱 3 到 5 分鐘，以揮發殘留 Ethanol。丟棄下面收集管，換上新的 ependorf，將 Elution Solution 取到 ependorf 預熱 70°C(每個 sample 約 50 μ L 到 60 μ L 的量)。放置室溫 1 到 2 分鐘，離心 1 分鐘，收集下面液體其內含 DNA。儲存於 -20°C，待 DNA 跑膠。

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

表二. Agarose Gel 的配置

組成成分	25 ml (Small Tank)			50 ml (Large Tank)		
	1%	1.5%	2%	1%	1.5%	2%
Agarose LE (g)	0.25	0.375	0.5	0.5	0.75	1
0.5X TBE (ml)	25			50		

九、細胞週期 (Cell cycle) 分析⁶⁶

實驗原理

Propidium iodide (PI) 是一種螢光染劑，可專一性的與核酸鍵結。而本實驗利用 PI 作為螢光染劑，當細胞膜完整的時候 PI 是無法與細胞內核酸做鍵結，故利用酒精來固定細胞與增加細胞膜的通透性，使 PI 可以進入細胞及核膜中。由於 PI 可以與細胞內核酸產生鍵結，因此可以利用流式細胞儀 (Flow cytometry ; FACS) 偵測 PI 之螢光，就可以知道細胞內 DNA 的狀態而進行細胞週期分析。

實驗方法

將 A375.S2 細胞依照 2×10^5 cells/ml 接種於 12 孔培養盤中，再將培養盤放置 37°C、5% CO₂ 培養箱中，待細胞貼附後加入濃度 2 μM 的 Casticin 藥物。加藥過後分別培養 12, 18, 24 小時，之後將上清液收至離心管中，加入 PBS 清洗細胞，並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。懸浮後的細胞加入 1 mL 的培養基與 Trypsin-EDTA 中和反應，並將細胞收到離心管中。接著離心 5 分鐘，去除上清液後再加入 PBS 清洗，離心 1500 rpm 5 分鐘重複 2 次，去除上清液後將細胞打散，再一邊震盪一邊緩慢的滴入 2 mL 的 70 % 酒精，以進行細胞固定。酒精固定完後置於 -20°C 隔夜。翌日將細胞離心去除上清液，加入 PBS 清洗細胞，離心並去除上清液。每管分別加入 500 μL 之 PI 染劑，室溫避光 30 分鐘，最後以流式細胞儀進行分析，數據以 Modifit

LTR 軟體進行處理分析。

表三. Cell cycle 之 PI 染劑

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



十、活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS)⁶⁷

實驗原理

利用 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)在細胞內一連串的反應並形成螢光來測量 ROS 的產生。H₂DCF-DA 可滲透至細胞內，在細胞內被乙醯酯酶 (esterases)去乙醯化 (deacetylated)而形成 DCFH，DCFH 無法通過細胞膜因而被留在細胞中。DCFH 接著會被 H₂O₂ 氧化而形成具有螢光特性的 DCF，並聚集在粒線體中，利用流式細胞儀分析螢光量便可測得細胞內 H₂O₂ 的濃度。

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 1×10^5 cell/mL 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，待貼附後分別以 2 μ M 的 Casticin 處理 1, 3, 6, 9, 12 小時後。加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基中和反應並將細胞收到離心管中。接著離心 1500 rpm，5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心 1500 rpm，5 分鐘。去除上清液後加入 H₂DCF-DA，混合均勻後於 37 °C 水浴槽中反應半小時。最後再以流式細胞儀分析，收集至少 10000 顆細胞並以 CellQuestR 軟體分析。

十一、粒線體膜電位 (Mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi_m$)⁶⁸

實驗原理

DiOC₆ (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodine)是一種可穿透細胞膜，專一性結合並累積在粒線體內，DiOC₆在細胞膜內外的分布可以反應出細胞膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可以顯示細胞膜電位改變的情形。粒線體膜功能不良的時候通常伴隨著細胞凋亡的發生，因此細胞粒線體膜電位的改變也就當作早期凋亡偵測上的指標。

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 2×10^5 cells/ml 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，再將培養盤放置 37°C、5% CO₂ 培養箱中，待細胞貼附後分別以 2 μM 的 Casticin 藥物處理 6, 12, 24, 36 小時後。之後將上清液收集至離心管中，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。加入 1 mL 的培養基與 Trypsin-EDTA 中和反應，並將細胞收到離心管中。離心完去除上清液加入 PBS 再離心，重複 2 次。去除上清液後將細胞打散，每管分別加入 500 μL 之 DiOC₆ 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 sample 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 CellQuestR 軟體分析數據。

十二、Caspase-3 活性測試⁶⁹

實驗原理

利用 Caspase-3 substrate (PhiPhiLux-G₁D₂) 來檢測凋亡細胞相關蛋白 Caspase-3 之產生，PhiPhiLux kit 基質是一種含有螢光物質之胺基酸序列 (amino acid sequence)，而活化之 Caspase-3 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，再經由流式細胞儀偵測，若螢光產量越多則產生 Caspase-3 活性亦越多。

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 2×10^5 cells/ml 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，再將培養盤放置 37°C, 5% CO₂ 培養箱中，待細胞貼附後分別以 2 μM 的 Casticin 藥物處理 12, 24 小時後。之後將上清液收至離心管中，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。懸浮後的細胞加入培養液與 Trypsin-EDTA 中和反應，並將細胞收到離心管中。接著離心 5 分鐘。離心完去除上清液加入 PBS 再離心重複 2 次。去除上清液後將細胞打散，加入 10 μL 的 Caspase-3 substrate，混合均勻後於 37°C 水浴槽中反應 1 小時。反應後，加入 PBS 再以 1500 rpm 5 分鐘離心，並去除上清液後，接著加入 500 μL 的 Flow Cytometer Buffer，再 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀收集 10000 顆細胞分析 Caspase-3 活性，最後以 CellQuestR 軟體分析。

十三、西方點墨法 (Western blotting)⁷⁰

實驗原理

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

實驗方法

(1) 蛋白質萃取 (protein extration)

將 A375.S2 細胞以 5×10^6 cell/ml 的濃度接種於 10 cm 培養盤中，待貼附後分別以 2 μ M 的 Casticin 藥物處理 6, 12, 18, 24 小時後。加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待懸浮後加入 1 mL 的培養基與 Trypsin-EDTA 中和反應並將細胞收集至離心管中。接著以 3000 rpm 離心 5 分鐘。離心完後去除上清液，加入 1 mL 的 PBS 將細胞移至 1.5 mL 微量離心管中。接著離心 13000 rpm 1 分鐘。離心完後去除上清液，加入 400 μ L 的 Lysis buffer (PRO-PREP for Cell/Tissue)。依照細胞量的多寡決定其加入的量，一般每 2.5×10^6 cell/ml 的細胞數增加 200 μ L 的 Lysis buffer。將細胞混合後置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中 24 小時後 13000 rpm 離心 10 分鐘。取其上清液至另

一微量離心管後進行蛋白質定量。

(2) 蛋白質的定量分析

以 Bradford 定量法定量，使用胎牛血清白蛋白(Bovine serum albumun ; BSA)做為標準品。配置不同濃度的標準品後，利用 Bio-rad 與標準品混和且以相同的混合方式與樣品混合。混合均勻後，取至 96 孔盤培養盤利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader)在吸光值 O.D.595 nm 下測量其吸光值並以標準品吸光值做出標準曲線 (standard curve)。求出標準曲線的線性回歸方程式與 R2 值。將樣品吸光值帶入迴線性曲線方程式並求出蛋白質濃度。其平均值，以 O.D. value (Y) 對蛋白濃度 g/ml (X) ，求出趨勢線方程式 $y=ax+b$ ，R2 值要趨近於 0.99。

(3) SDS-PAGE 分析

首先配置 SDS gel，將蛋白質利用 1%SDS 稀釋置所需濃度並取出 20 μ L 與 5 μ L 的 protein loading dye 混合均勻，以 90 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘。於電泳槽中加入 electrophoresis running buffer 後，於樣品槽中分別加入須蛋白質樣品與分子量指示劑 (marker)用以對照蛋白質分子量。以電壓 80 volt 電泳，待樣品通過 stacking gel 之後，電壓調至 110 volt 直到染劑到達底端後停止。

(4)轉漬步驟

先將蛋白質轉印膜 (PVDF membrane)與濾紙浸泡於 transfer buffer (配方如表七)中，取轉漬夾，依照海綿、濾紙、SDS 膠片、蛋白質轉印膜、濾紙、海綿依序疊於轉漬夾中。膠片與蛋白質轉印膜中不可以有氣泡。將轉漬夾移至有 transfer buffer 的轉漬槽中，蛋白質轉印膜面向正極，SDS 膠片面向負極。以 100 volt 進行轉漬 1 小時。

(5)影像呈現

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

表四. SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel)之配置與組成

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

表五. SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel)之配置與組成

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

表六. 電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer)

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

表七. 轉漬緩衝液 (Transfer buffer)

組成	體積
Tris	4.5 g
Glycine	21.6 g
Methanol	300 mL
ddH ₂ O	1200 mL

十四、免疫螢光染色(Immunofluorescence staining)⁷¹

實驗原理

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

實驗方法

將載玻片固定於 10 cm² 培養盤中接著將 A375.S2 細胞以 1×10⁶ cell/mL 的濃度接種於 10 cm² 培養盤中，待貼附後分別以 2 μM 的 Casticin 處理 12 小時。取出載玻片並以 PBS 洗過，利用甲醇 (Methanol) 將細胞固定，作用 20 分鐘。以 PBS 清洗 3 次再利用 0.1% 的 Triton-X 100 作用 30 分鐘。以 PBS 清洗 3 次加入一級抗體染劑 (50~60 μL) 放至隔天。PBS 清洗 3 次各五分鐘，再染二級抗體 PBS。清洗 3 次各五分鐘，再依其需要染細胞核、粒線體等。最後 PBS 清洗 3 次五分鐘，再以封片膠將其封片並進行共軛膠顯微鏡的觀察。

十五、特異性抑制劑檢測 ROS scavenger⁷²

實驗原理

為證實細胞是因為受到氧化壓力的影響而導致細胞凋亡，本研究藉由 *N*-acetyl cysteine (NAC) 作為 ROS 產生阻斷劑，*N*-acetyl cysteine 是一種 *L*-cysteine 的 *N*-acetyl 衍生物，*L*-cysteine 為體內 Glutathione 合成原料，藉由額外添加 Glutathione 合成原料來降低 ROS 的生成。

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 1×10^4 cells/ml 的濃度接種於 96 孔盤培養盤中，待細胞貼附後，預先處理 5 mM 的 NAC 四小時後，再加入濃度 2 μ M 的 Casticin 藥物進行誘導，待 24 小時後去除上清液，並且加入 200 μ L 的 MTT (0.5 mg/ml) 試劑，待反應時間 3.5 小時後，去除上清液並加入 200 μ L 的 DMSO 使紫色的 formazan 結晶物溶解出後，再利用 ELISA reader 以 570 nm 測吸光值，以得知細胞的存活率。

十六、凝膠電泳位移測定(EMSA)⁷³

實驗原理

EMSA 為探討 protein 和 DNA 結合之方法。原本可被 Nuclease 切割之片段，因為 protein 和 DNA 結合成功，沒辦法被切割成較小片段 DNA，只有在沒被 protein 結合之部分可進行切割，所以形成較大片段。當 DNA 片段分子量大，跑電泳時則移動力減低。本實驗利用 NF- κ B 和基因起始區特定序列產生結合的特性，將此特定序列做成一小段探針，以 g-32P 標示後和細胞的 Nuclear extract 反應，利用凝膠電泳分離結合與未結合的探針。

實驗方法

使用 Nuclear Extration Kit 將已處理過 Casticin(2 μ M/ml)的細胞抽取出核蛋白，取適當的量加入 reaction mixture 中，成分為 10X binding buffer, Poly(dI-dC), 10%NP-40, 1M KCl, 100 mM MgCl₂, 200 mM EDTA, 10 nM labeled probe。於 30°C 反應 30 分鐘，加入 5X loading dye，注入 6% polyacrylamide gels，120V 電泳 2~3 小時。當跑完時再利用 transfer system 轉漬於 Nylon membrane 上。轉漬完成時以 UV 照射 Nylon membrane，使 DNA 更加附著於膜上。Blocking buffer 搖 15 分鐘後，再加入含有 conjugate 的 blocking buffer 搖 15 分鐘。再利用 wash buffer 洗 5 分鐘四次，最後利用 substrate equilibration buffer 搖 5 分鐘，之後進行壓片。

十七、即時定量 PCR (Quantitative PCR Analysis)⁷⁴

實驗原理

操作 PCR 同時，再加入一段可與 DNA 樣品互補的探針，此探針具有螢光標記。當探針與互補 DNA 接上時，PCR 循環次數越多，DNA 濃度越高，所散發出的螢光也越強。此時儀器內設定預期達到的螢光強度，所需的 PCR 複製次數，又可稱為 threshold cycle。當 DNA 樣品濃度越多時，可以較少的 threshold cycle 達到預期的螢光強度。因此利用各已知 DNA 濃度與 threshold cycle 間反比的檢量線，來換算求出未知樣品的 DNA 濃度。

實驗方法

將 A375.S2 細胞以 1×10^5 cells/ml 的濃度接種於 12 孔盤培養盤中，分別等待細胞貼附後，再加入濃度 2 μ M 的 Casticin 藥物處理 12 小時後，加入 PBS 清洗細胞並利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，離心 PBS 清洗 2 次後，萃取 total RNA。接著將 RNA 反轉錄成 cDNA。利用有螢光標記的探針進行 PCR，根據螢光量的產生來推測 cDNA 脂含量。

十八、統計分析

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

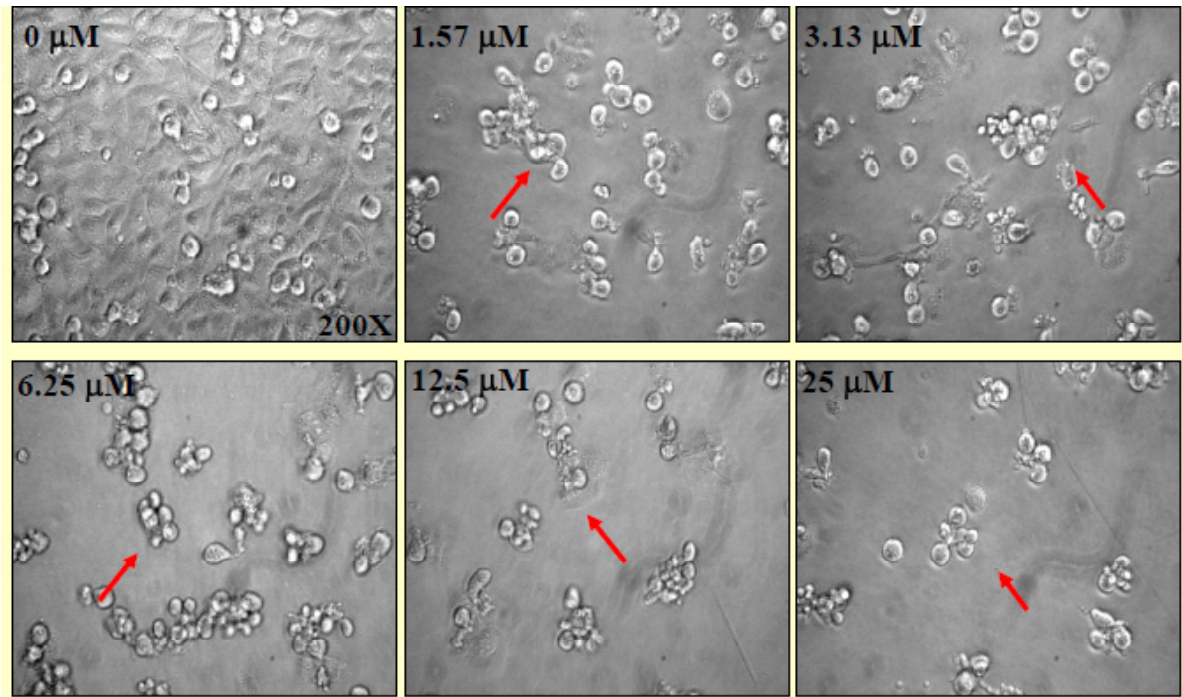


第四章、結果

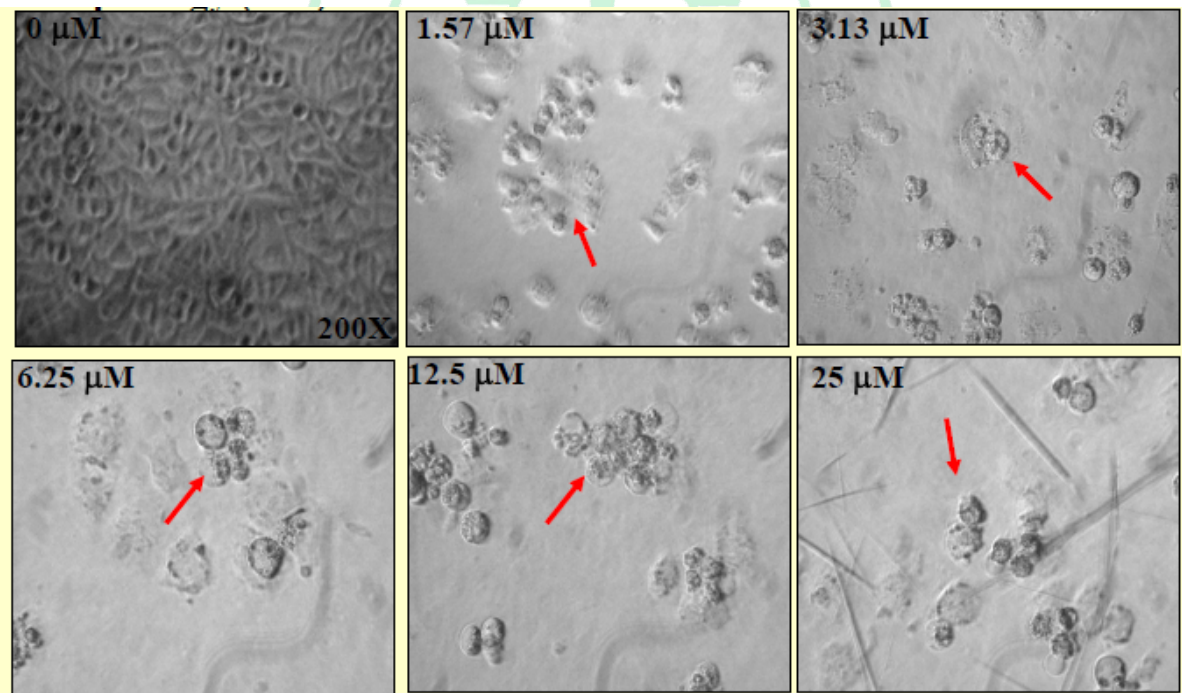
第一節 Casticin 對人類黑色素瘤 A375.S2 細胞型態變化

本實驗將人類黑色素瘤 A375.S2 細胞經過不同濃度 1.57, 3.13, 6.25, 12.5, 25 μM 的 Casticin 處理 24, 48 小時後，使用倒立式位像差顯微鏡觀察人類黑色素瘤細胞形態，可發現細胞數量減少與細胞產生皺縮的現象並且變的無法貼附而浮起，並在 Casticin 高濃度治療下有結晶物的產生(圖八、圖九)。





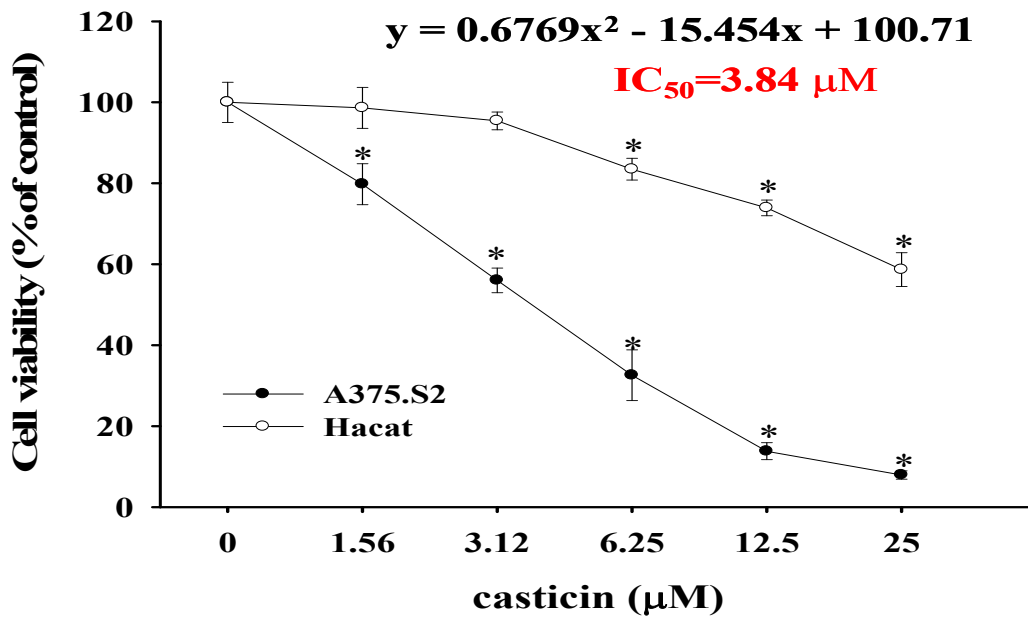
圖八. Casticin 對 A375.S2 細胞型態 24 小時之變化



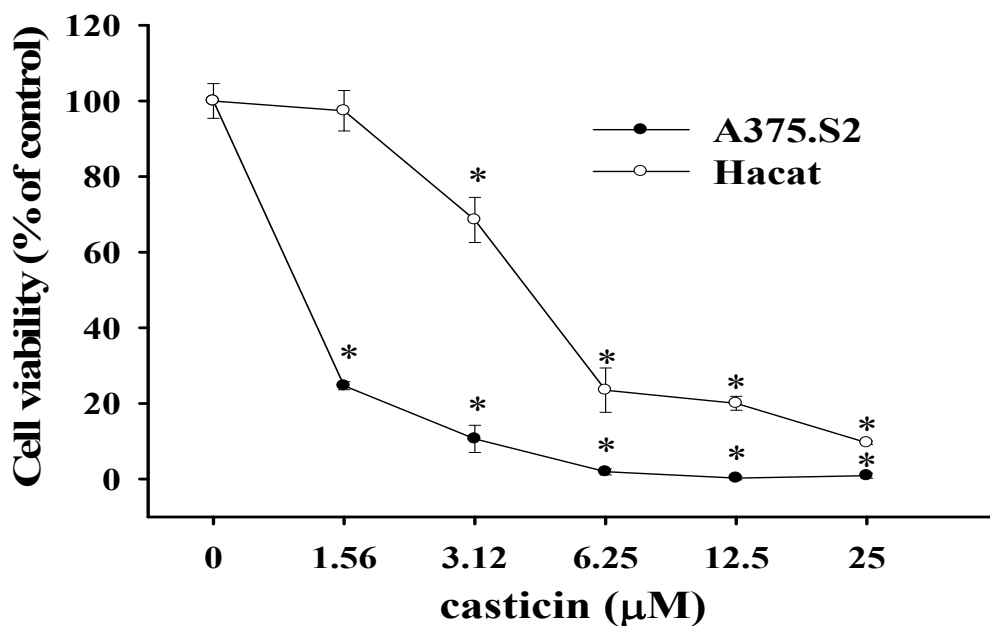
圖九. Casticin 對 A375.S2 細胞型態 48 小時之變化

第二節 Casticin 對人類黑色素瘤 A375.S2 與正常角質細胞 HaCaT 細胞存活率之影響

利用 MTT assay 測試 A375.S2 細胞株與 HaCaT 細胞株在 Casticin 治療下存活率影響，在結果發現 Casticin 在 24 (圖十)、48 (圖十一)小時對於 A375.S2 細胞的毒殺效果隨著劑量的上升而增加並隨著時間的增加存活率也隨之下降，另外 HaCaT 細胞株在處理不同濃度 Casticin 藥物並培養 24 (圖九)、48 (圖十)小時後，HaCaT 細胞株之存活率雖呈現劑量依賴性下降，但相較於 A375.S2 細胞株情況下，HaCaT 細胞株存活率還是比較高。結果顯示 Casticin 藥物對於黑色素瘤細胞株 A375.S2 細胞的毒殺效果具有劑量依賴性 (Dose-dependent) 與時間依賴性 (Time-dependent) 的現象。



圖十. Casticin 對於 A375.S2 與 HaCaT 細胞 24 小時細胞影響。以 MTT assay 方法檢測細胞存活率。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's t-test 統計分析，*表示 $p < 0.05$



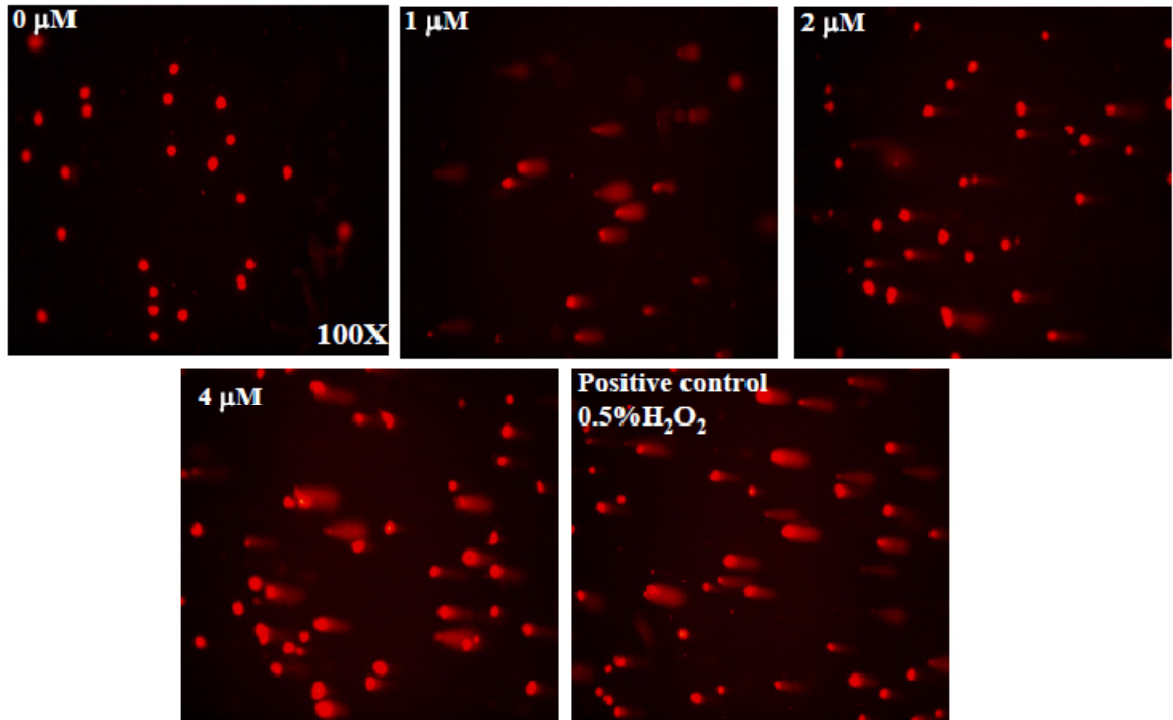
圖十一. Casticin 對於 A375.S2 與 HaCaT 細胞 48 小時細胞影響。以 MTT assay 方法檢測細胞存活率。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's t-test 統計分析，*表示 $p < 0.05$

第三節 彗星試驗 (Comet assay)

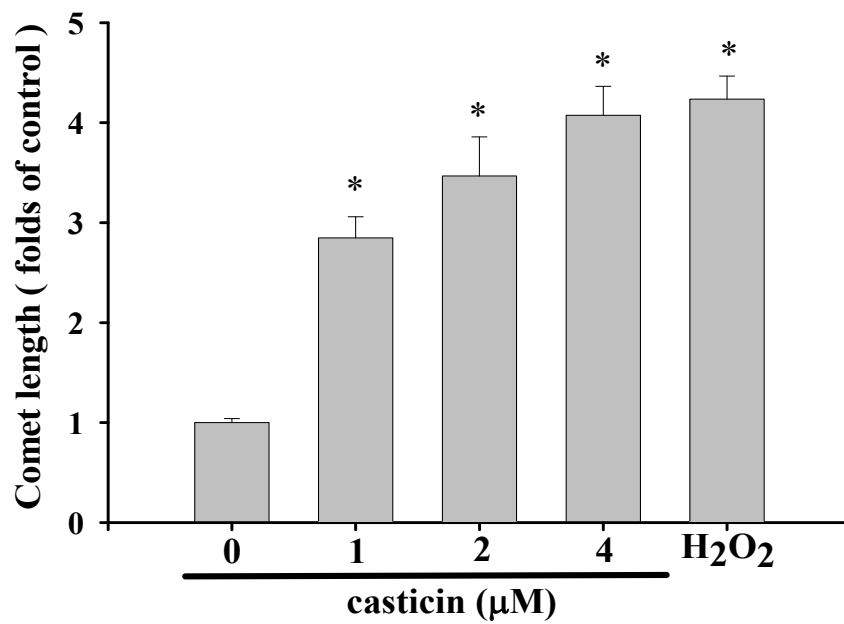
分析 DNA 損傷 (DNA damage) 的程度。當 DNA 受損而產生斷裂時，利用電泳的原理方式將斷裂成大小不同片段的 DNA 拖出膜外，再利用具有專一性結合的螢光染劑染色，藉由拖尾的長短來判斷 DNA 的損害情況。A375.S2 細胞經過 1, 2, 4 μM 的 Casticin 藥物處理後，可得知隨著 Casticin 藥物濃度的增加其細胞拖尾的現象越明顯 (圖十二)，代表細胞受到 Casticin 藥物處理會使之 DNA 產生斷裂與受損的情形。



(A)



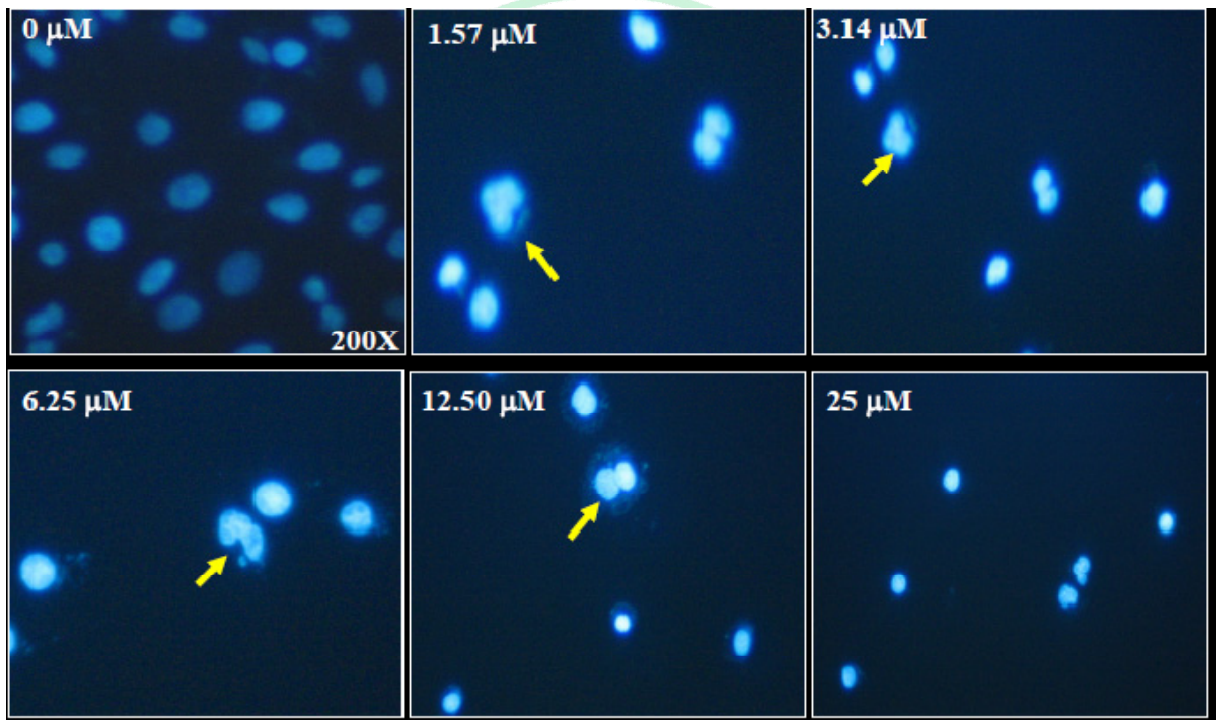
(B)



圖十二. Casticin 對於 A375.S2 細胞核拖尾之現象。(A) 利用倒立式螢光顯微鏡所觀察並拍攝圖。(B) 細胞核拖尾之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，*表示 $p < 0.05$

第四節 DAPI 染色法 (DAPI staining)

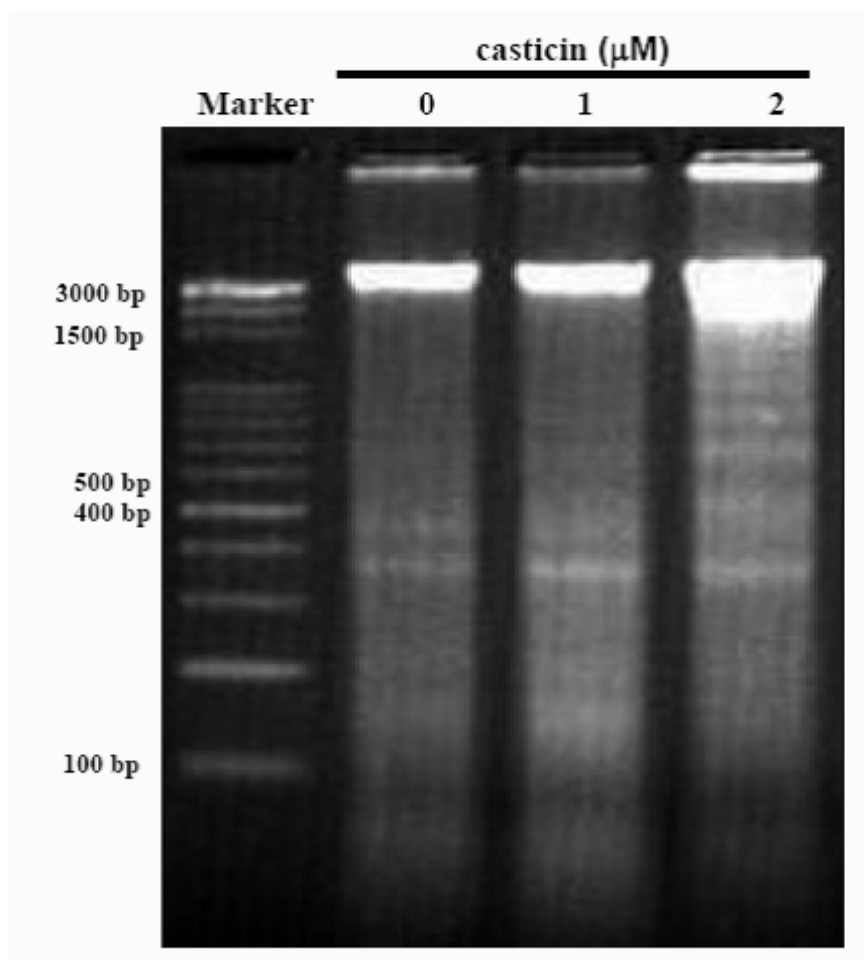
DAPI (4'-6-diamidine-2-phenyl indole) 是一種核酸螢光染劑，會專一性的與 DNA 雙股螺旋上的小溝 (minor groove) 結合，當細胞凋亡時會出現染色質凝集與 DNA 斷裂等現象。結合時在螢光顯微鏡下觀察到的螢光強度越強，表示 DNA 斷裂的情形越嚴重。A375.S2 細胞經過不同濃度的 Casticin 藥物處理後，可發現隨著濃度增加其螢光強度明顯增強(圖十三)，表示 DNA 斷裂與核質濃縮的現象越明顯。



圖十三. Casticin 對於 A375.S2 細胞染色質凝集之現象。A375.S2 細胞以不同濃度之 Casticin 處理 24 小時後。利用倒立式螢光顯微鏡所觀察其染色質凝集之現象與拍攝。

第五節 DNA 膠體電泳 (DNA gel electrophoresis)

利用膠體電泳法去偵測藥物對癌細胞所造成的 DNA 傷害程度分析，當細胞凋亡的時候會有 DNA 斷裂現象發生，以 DNA 膠體電泳可看出 DNA ladder 的表現。A375.S2 細胞經過不同濃度的 Casticin 藥物處理後，可發現隨著濃度增加其 DNA 受損的情況有明顯的表現 (圖十四)。代表細胞受到 Casticin 藥物的處理後，細胞內的 DNA 產生受損。

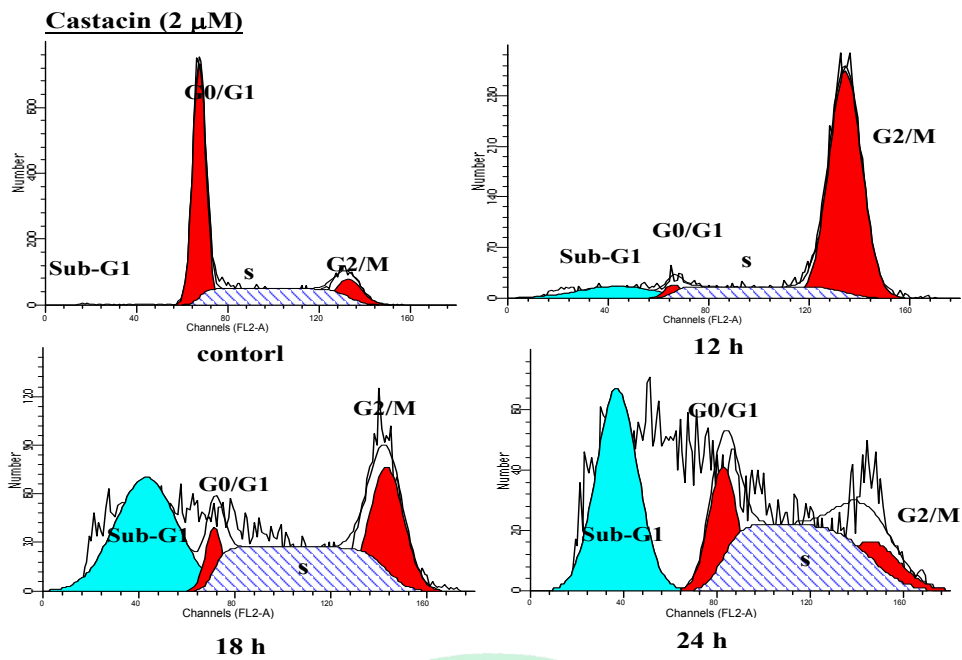


圖十四. Casticin 對 A375.S2 細胞 DNA 斷裂之現象。利用 DNA 膠體電泳偵測 DNA 斷裂之現象。

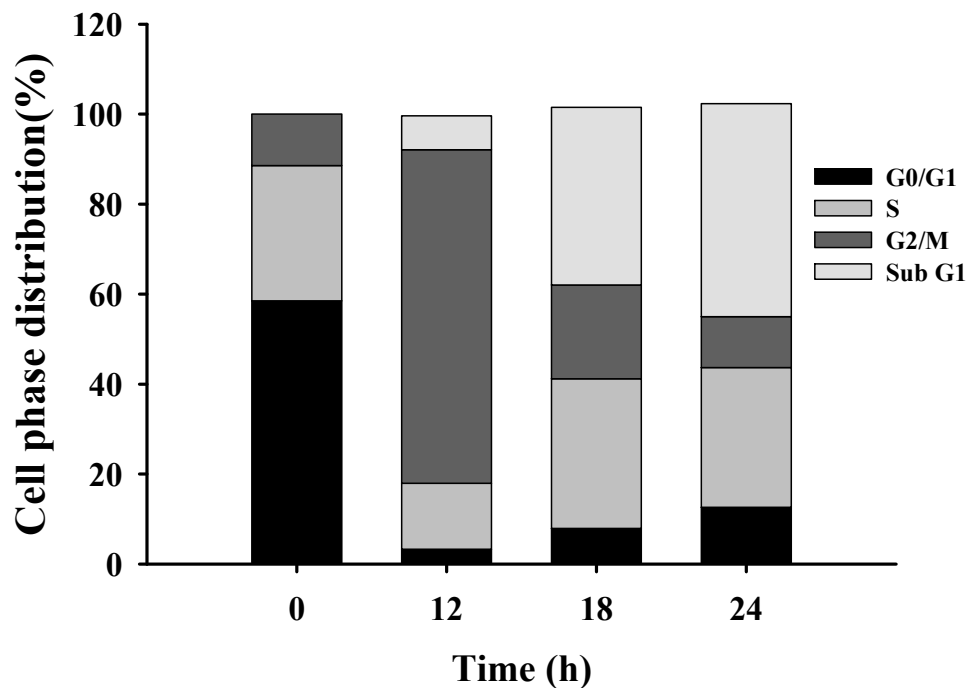
第六節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞週期的影響

利用流式細胞儀檢測細胞內 DNA 的含量用以判別細胞週期的分布。當 A375.S2 細胞以濃度 2 μ M 的 Casticin 共同培養 12, 18, 24 小時後，由分析圖可發現 G2/M 的比例隨著處理時間的增長而增加 (圖十五)。由量化圖更可明顯的看到細胞出現停滯在 G2/M 期的現象 (圖十六)。





圖十五. Casticin 對 A375.S2 細胞週期變化。以濃度 2 μ M 的 Casticin 藥物處理 12, 18, 24 小時後，細胞週期停滯之情形。

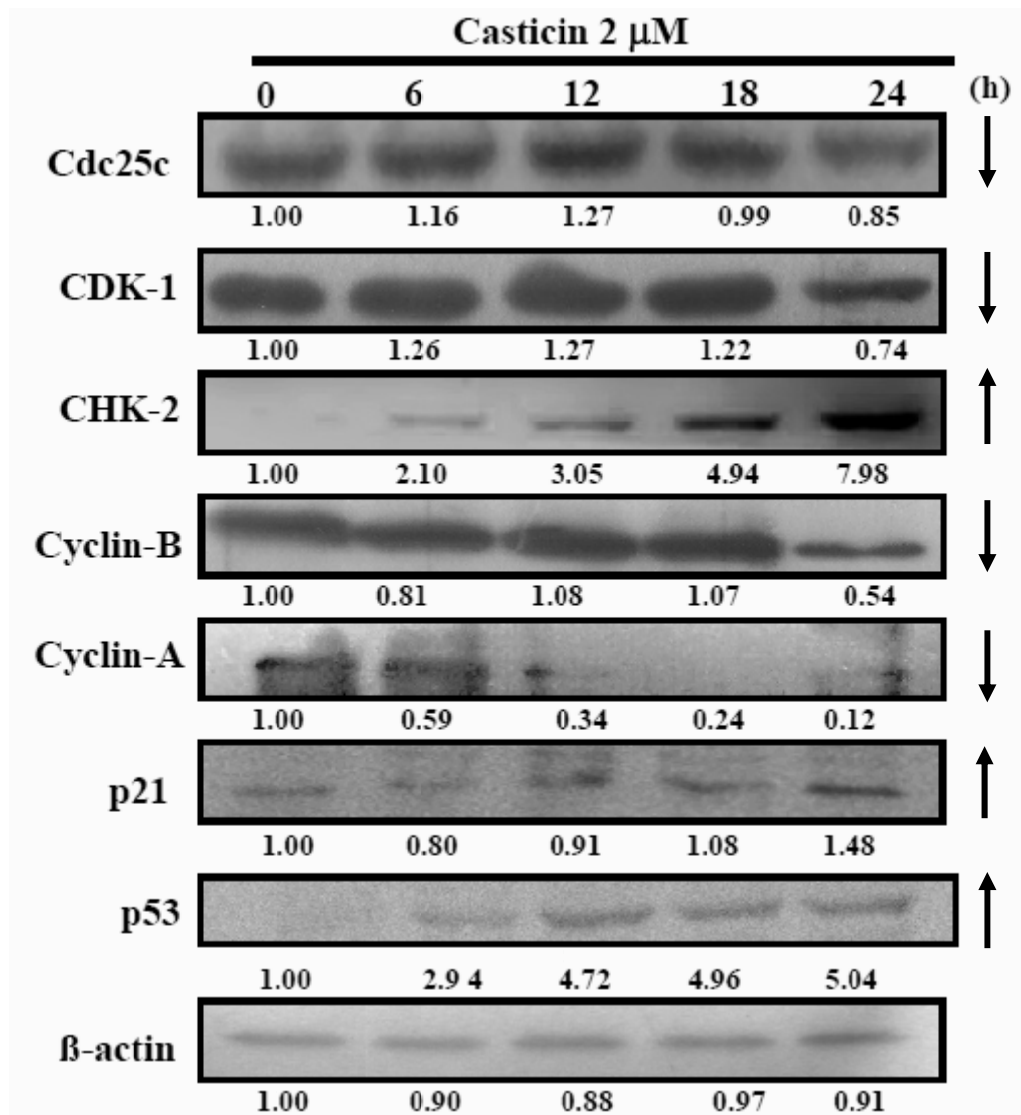


圖十六. 細胞週期之量化圖。

第七節 西方墨點法探討 Casticin 對黑色素瘤 A375.S2 細胞週期蛋白表現

當細胞 DNA 受損時，細胞週期會停滯，以西方墨點法觀察 G2/ M phase 停滯相關蛋白質表現量的變化。經實驗結果發現，Casticin 藥物會引起 G2/ M 期的相關蛋白 Cdc25c, Cyclin A, Cyclin B, CDK-1 蛋白質表現量下降與 CHK-2, p21 蛋白質表現量上升 (圖十七)。顯示 Casticin 藥物引起細胞週期停滯至於 G2/ M phase 是藉由 CHK-2 活化，進而抑制下游 Cyclin A 與 Cyclin B 表現所導致，可證明 Casticin 藥物可誘使 A375.S2 細胞的細胞週期停滯在 G2/ M。



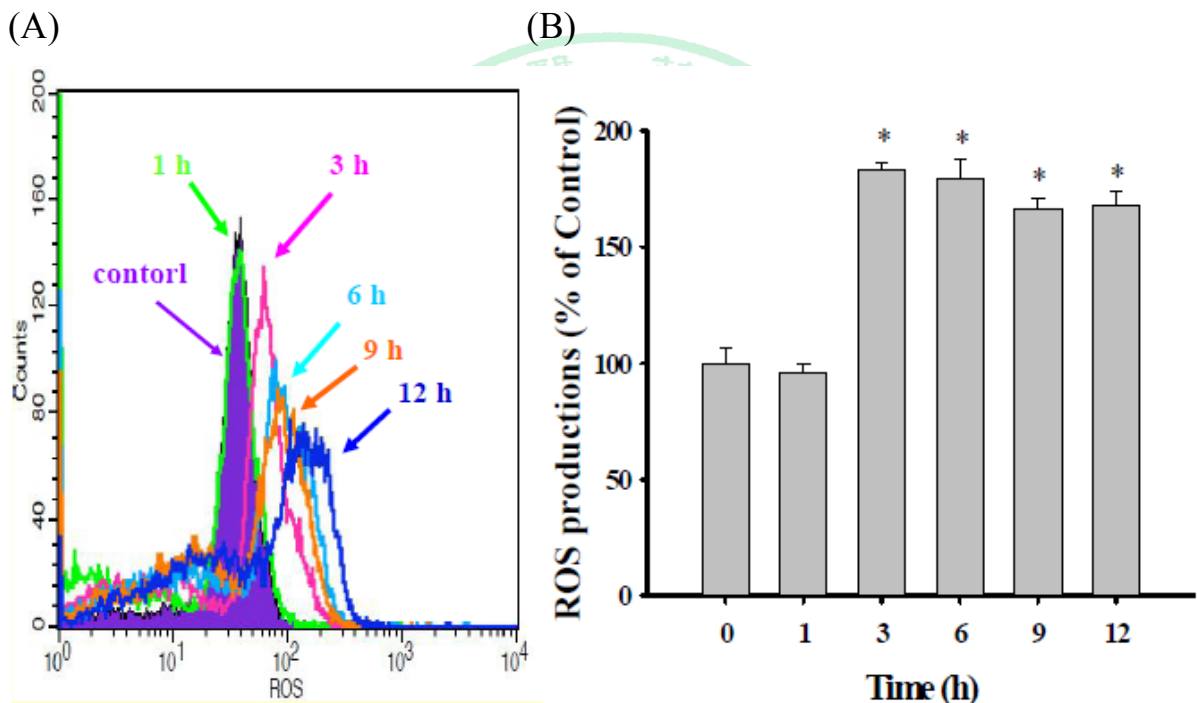


圖十七. Casticin 對於 A375.S2 細胞週期調控蛋白的表現變化。以 2 μ M 的 Casticin 藥物處理 A375.S2 細胞後，利用西方墨點法檢測細胞週期調控蛋白的表現變化。

第八節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞產生活性氧物

質(Reactive oxygen species, ROS)的影響

A375.S2 細胞以 2 μM 的 Casticin 藥物處理後，經過 1, 3, 6, 9, 12 小時後，利用流式細胞儀偵測 DCF 螢光量，觀察 ROS 在細胞內的表現情形。隨著處理藥物的時間越長 DCF 螢光量就開始有上升明顯增加的趨勢(圖十八)，結果顯示 Casticin 藥物會促進細胞活性氧物質。

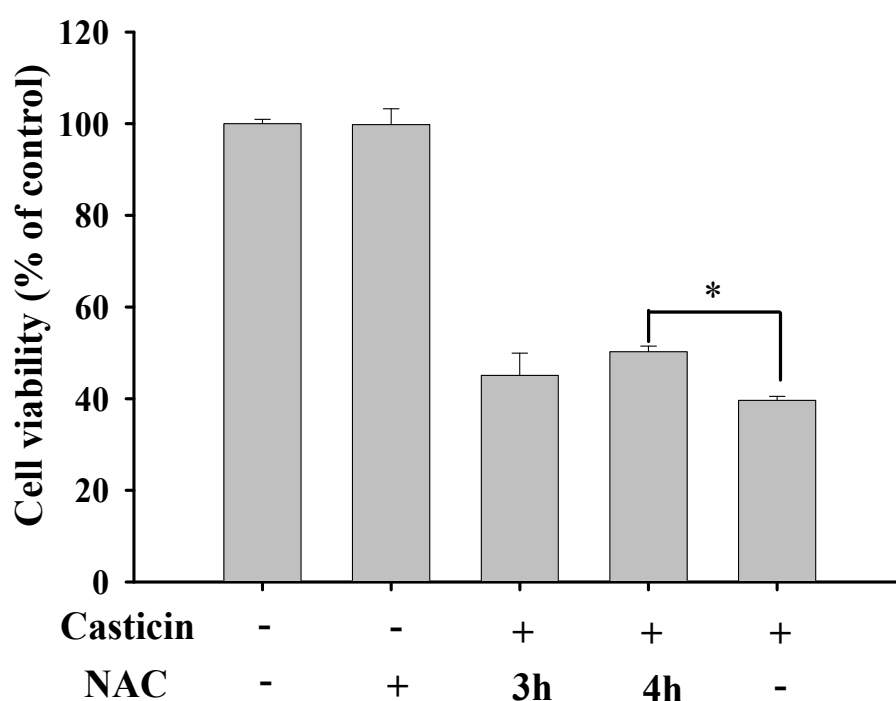


圖十八. Casticin 對於 A375.S2 細胞產生活性氧物質影響。A375.S2 細胞以 2 μM 的 Casticin 處理後，利用流式細胞儀觀察 ROS 在細胞內的表現。(A) 流式細胞儀觀察 ROS 在細胞內表現分析圖。(B) ROS 在細胞內表現量化圖，實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student' s *t*-test 統計分析，*表示 $p < 0.05$

第九節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞抑制劑檢測

ROS scavenger (*N*-acetyl cysteine -NAC) 的影響

為了證實細胞是因為受到氧化壓力的影響而導致細胞的死亡，本實驗藉由 *N*-acetyl cysteine (NAC) 做為 ROS 產生清除劑。A375.S2 細胞預先處理 5 mM NAC 3, 4 小時後，再添加 Casticin 藥物對細胞進行誘導。實驗結果發現，經 5 mM NAC 預先處理的細胞之細胞存活率明顯的提升(圖十九)。

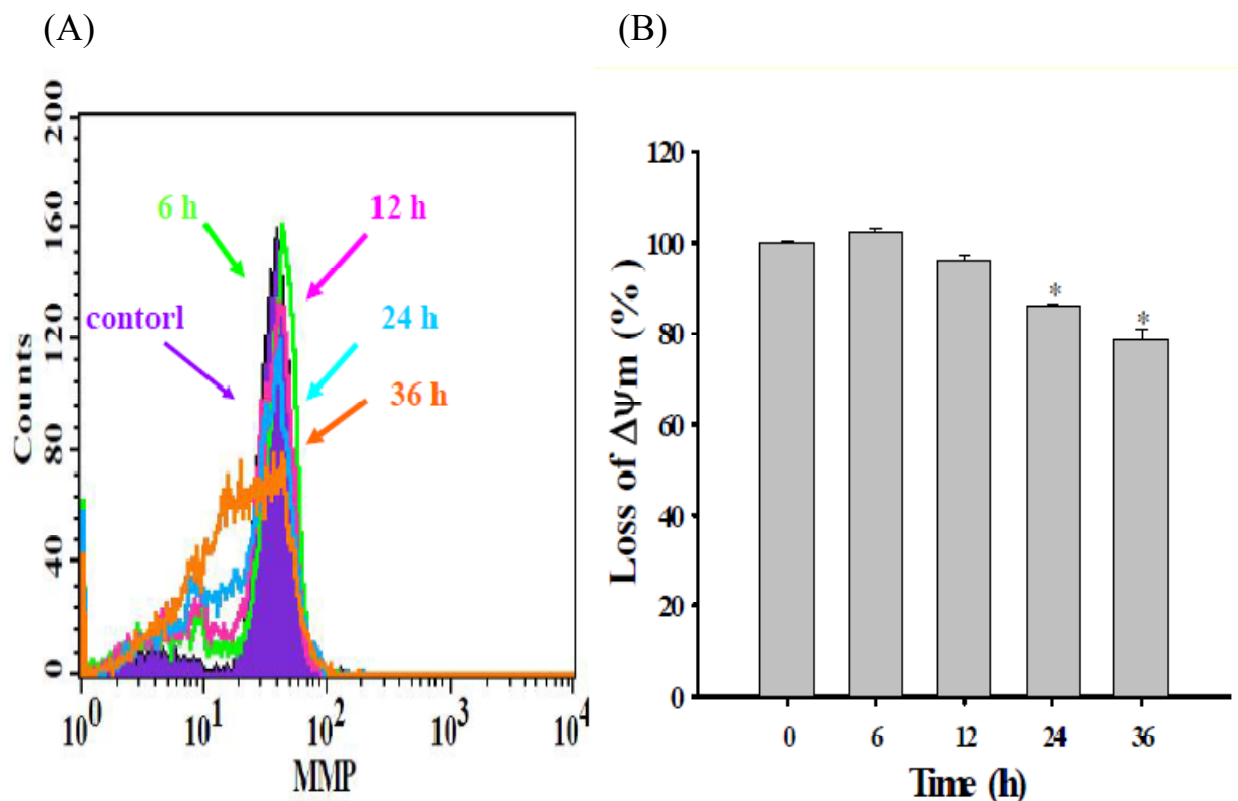


圖十九. Casticin 藥物對於 A375.S2 細胞特異性抑制劑 NAC 的影響。A375.S2

細胞先後處理 5 mM NAC 及 2 μ M 的 Casticin 藥物，對存活率的影響。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's t-test 統計分析，*表示 $p < 0.05$ 。

第十節 Casticin 藥物對黑色素瘤 A375.S2 細胞粒線體電位的影響
(Mitochondrial membrane potential, MMP, $\Delta\psi_m$)

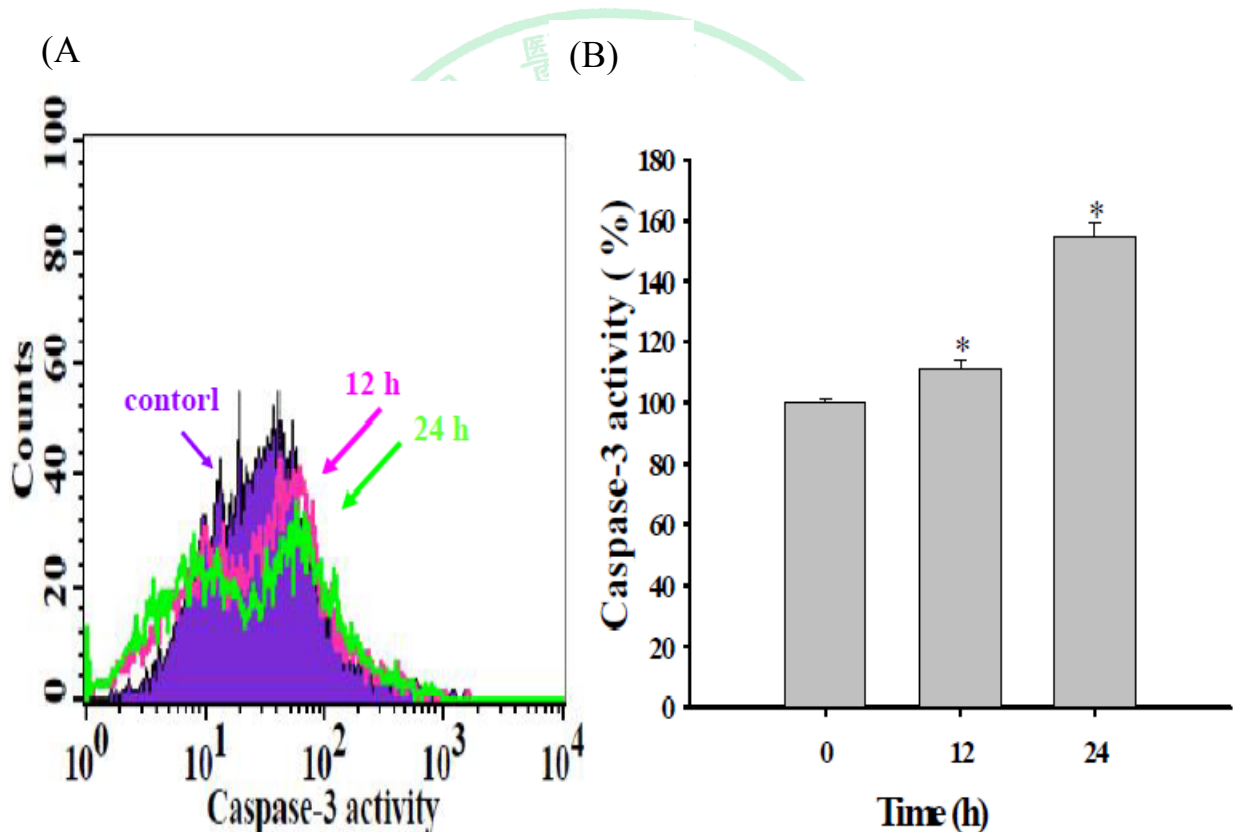
A375.S2 細胞以 2 μM 的 Casticin 藥物處理後，經過 6, 12, 24, 36 小時後，利用流式細胞儀偵測 DiOC₆ 螢光量來觀察粒線體電位 ($\Delta\psi_m$) 的變化。隨著處理藥物的時間越長 DiOC₆ 螢光量顯著下降的趨勢(圖二十)，結果顯示 Casticin 藥物會影響 A375.S2 細胞內粒線體膜電位並使之下降。



圖二十. Casticin 對於 A375.S2 細胞粒線體膜電位的影響。(A) 粒線體膜電位的變化之分析圖。(B) 粒線體膜電位的變化之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，*表示 $p < 0.05$

第十一節 Casticin 藥物誘導 A375.S2 細胞受到 Caspase-3 activity 的影響

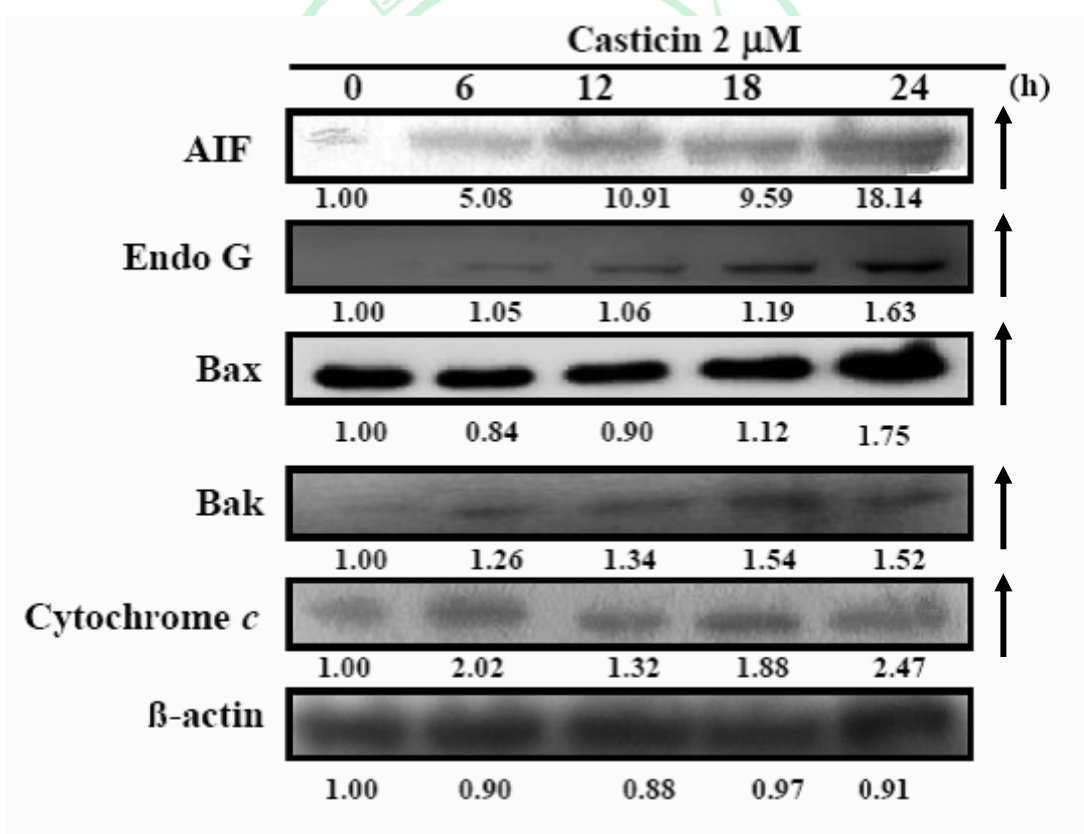
Caspase-3 的活性常被做為細胞凋亡的指標之一，利用流式細胞儀偵測 PhiPhiLux，螢光的強度越強表示 Caspase-3 的活性增加。隨著處理 Casticin 藥物時間的增加，Caspase-3 的活性也就越高。Casticin 藥物可以誘發 Caspase-3 的活性也進一步的確認 Casticin 藥物可以引起細胞的凋亡。由實驗結果得知，A375.S2 細胞經過 2 μM 之 Casticin 藥物處理 12, 24 小時之後，Caspase-3 的螢光強度明顯增加 (圖二十一)，



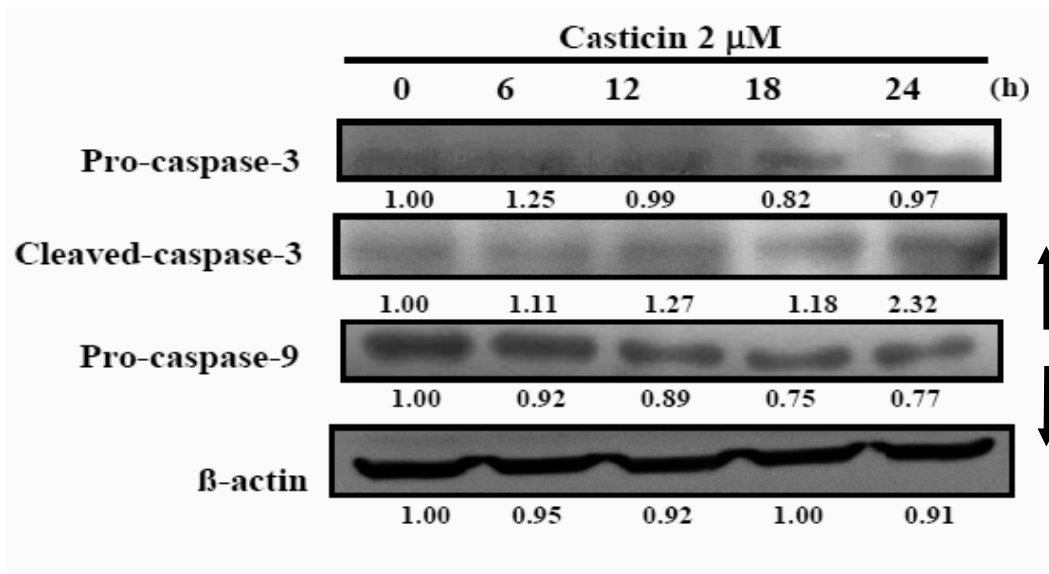
圖二十一. Casticin 對 A375.S2 細胞 Caspase-3 活性影響。(A) caspase-3 活性之分析圖。(B) caspase-3 活性之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以 student's *t*-test 統計分析，*表示 $p < 0.05$

第十二節 探討 Casticin 對 A375.S2 細胞產生細胞凋亡之相關蛋白表現

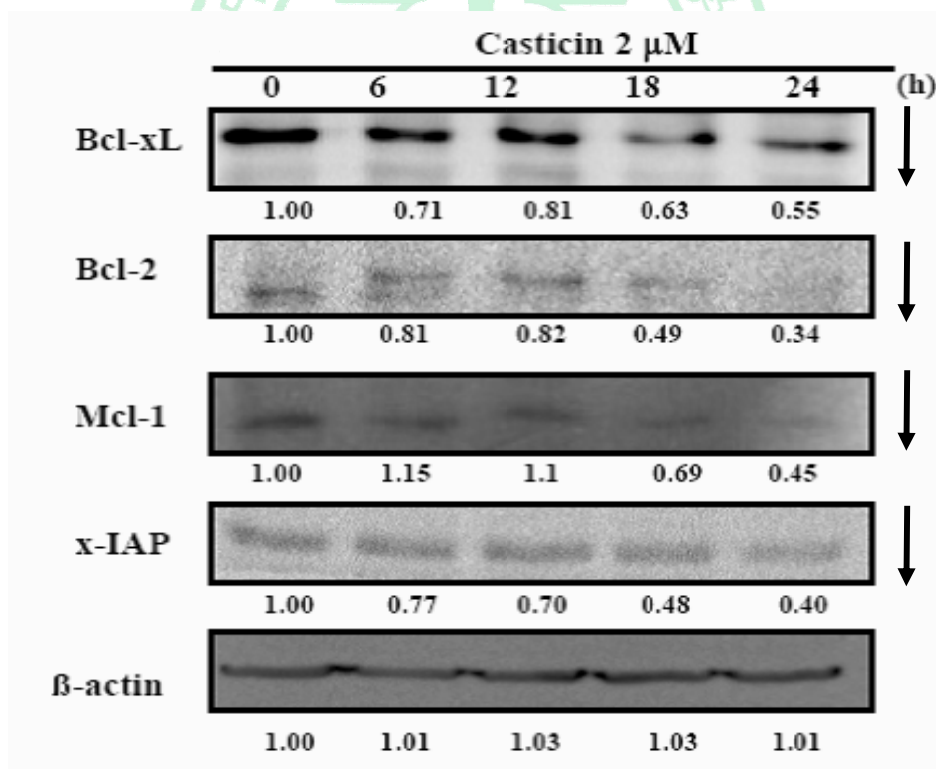
將細胞以 2 μM 的 Casticin 處理並利用西方墨點法分析處理藥物後之 0, 6, 12, 18, 24 小時的蛋白表現實驗結果顯示中 Bak、Bax 表現有上升的情形。在由粒線體中釋放出的與凋亡相關蛋白中 AIF, Endo G, Cyto *c* 表現量也有明顯的上升 (圖二十二)。Cytochrome *c* 會引起下游的一系列的 Caspase 活化，實驗結果證實且下游的 Caspase-9 與 Caspase-3 有被裂解的情形 (圖二十三)。此外 anti-apoptosis 蛋白 Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, x-IAP 表現量有隨著處理藥物的時間增加而表現量下降 (圖二十四)。



圖二十二. Casticin 對 A375.S2 細胞粒線體相關蛋白表現。A375.S2 細胞以 2 μM 的 Casticin 處理後，經過 6, 12, 18, 24 小時後，利用西方墨點法檢測凋亡相關蛋白表現變化。



圖二十三. Casticin對A375.S2細胞之細胞凋亡相關蛋白表現。A375.S2細胞以 2 μ M 的 Casticin 處理後，經過 6, 12, 18, 24 小時後，利用西方墨點法檢測凋亡相關蛋白之表現變化。



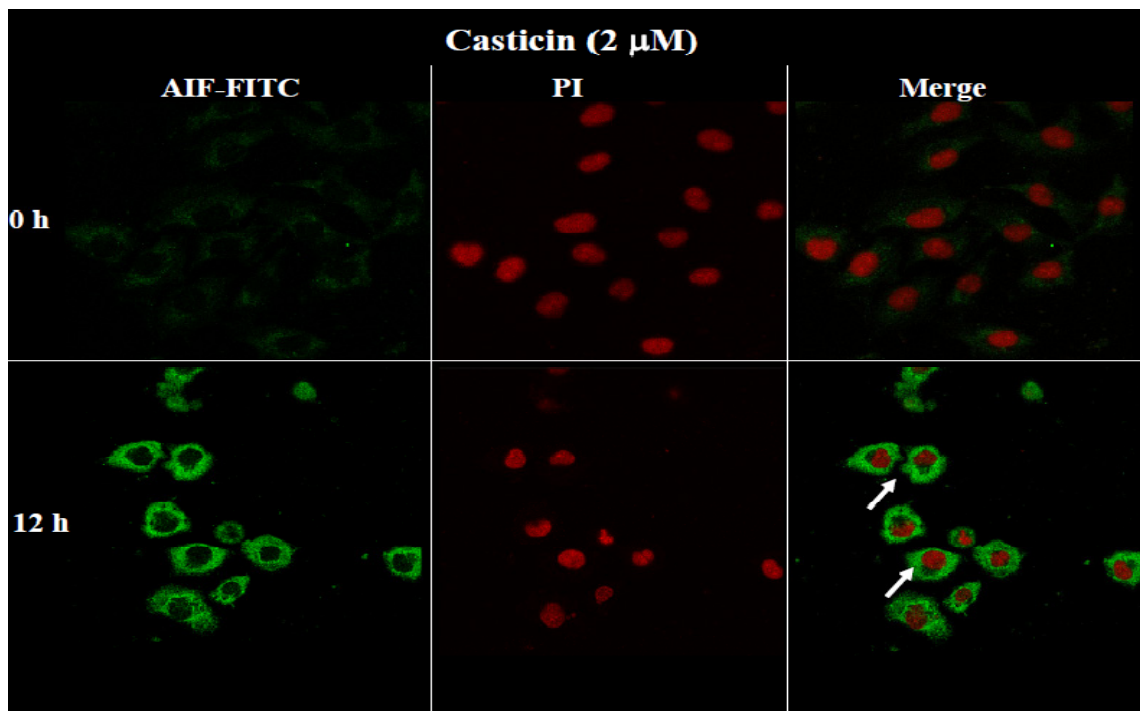
圖二十四. Casticin對A375.S2細胞之抗細胞凋亡相關蛋白表現。A375.S2細胞以 2 μ M 的 Casticin 處理後，經過 6, 12, 18, 24 小時後，利用西方墨點法檢測抗凋亡相關蛋白表現變化。

第十三節 免疫螢光染色探討Casticin對A375.S2細胞中凋亡相關蛋白

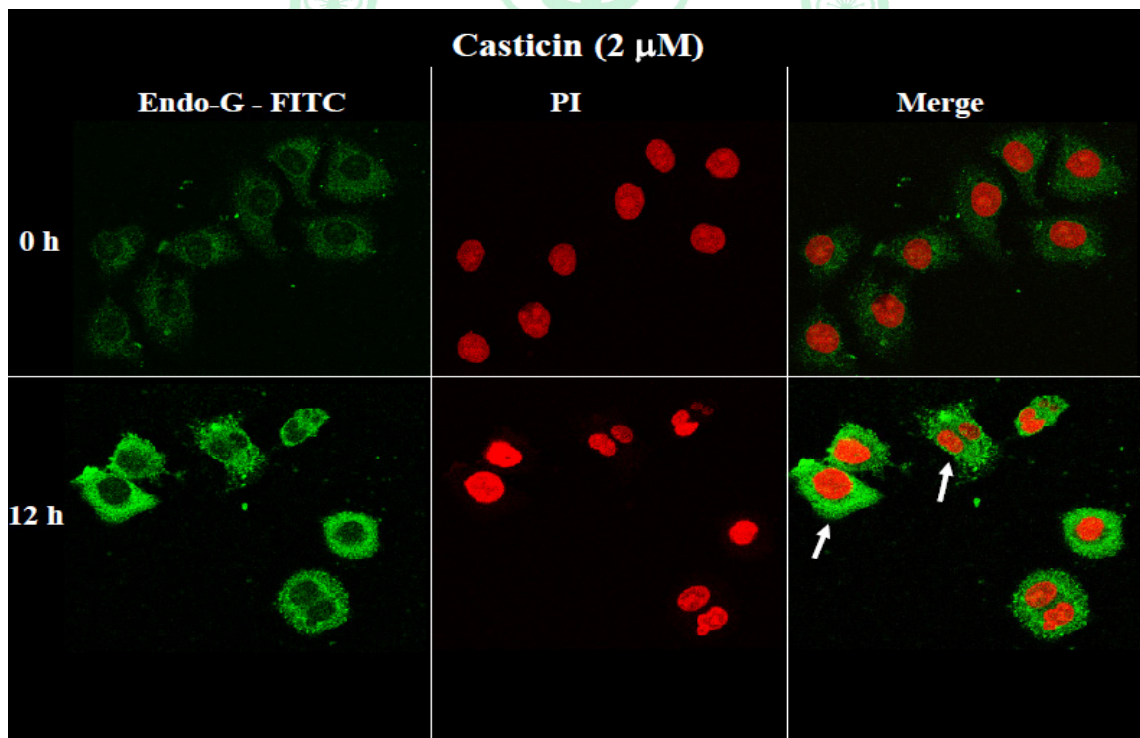
表現與轉移之影響

利用免疫螢光染色法去觀察細胞中蛋白的表現與移動的現象。以2 μM 的Casticin藥物處理A375.S2細胞12小時後，以免疫螢光染色與共軛膠顯微鏡觀察。實驗結果顯示，當細胞以藥物處理12小時之後AIF (圖二十五)和Endo G (圖二十六)大量的表現與釋放之細胞質中。





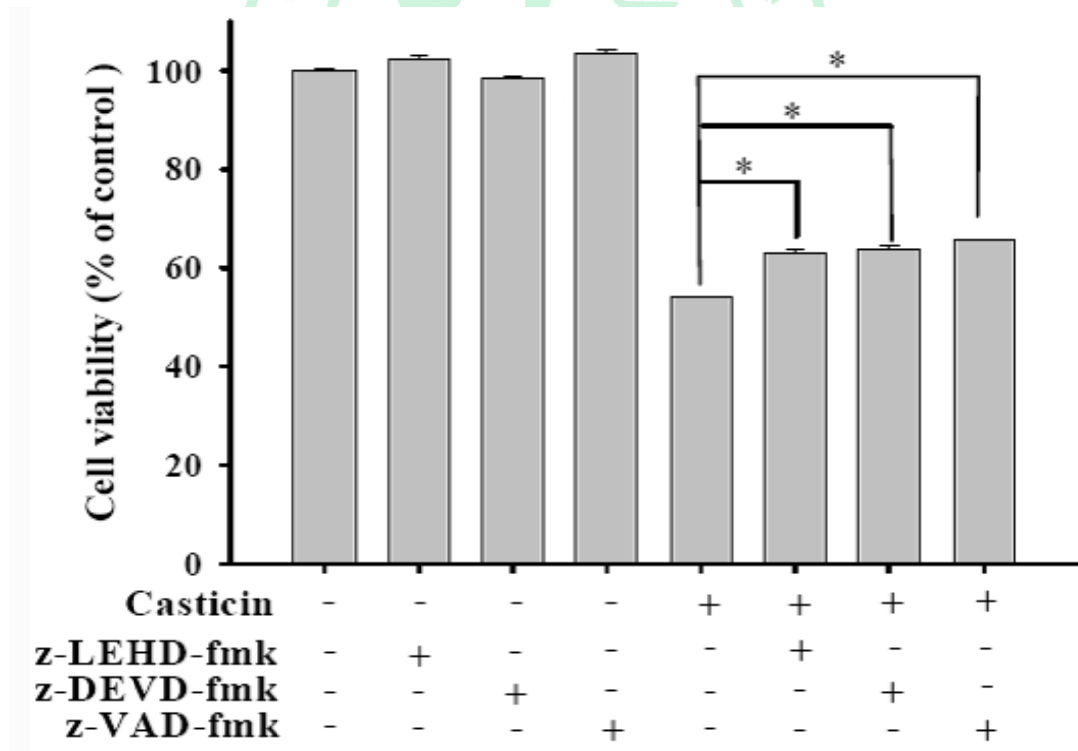
圖二十五. 免疫螢光染色觀察AIF的表現與轉移。A375.S2細胞以2 μM 的 Casticin處理，並經過12小時後，觀察AIF的表現與轉移。



圖二十六. 免疫螢光染色觀察Endo G的表現與轉移。A375.S2細胞以2 μM 的 Casticin處理，並經過12小時後，觀察Endo G的表現與轉移。

第十四節 Casticin藥物對黑色素瘤A375.S2細胞Caspase抑制劑檢測細胞存活的影響

為了證實細胞是因為受到 Caspase 的影響而導致細胞的死亡，本實驗藉由 Caspase-3,-9,廣泛性 Caspase 抑制劑做為阻斷劑。A375.S2 細胞預先處理廣泛性 Caspase 抑制劑 (z-VAD-fmk, 20 μ M), Caspase-3 抑制劑 (z-DEVD-fmk, 20 μ M), caspase-9 抑制劑(z-LEHD-fmk, 20 μ M) 4 小時後，再添加 Casticin 藥物對細胞進行誘導。實驗結果發現，經 z-VAD-fmk , z-DEVD-fmk, z-LEHD-fmk 預先處理的細胞之細胞存活率明顯的提升 (圖二十七)。實驗證實 Casticin 可透過 Caspase 誘導 A375.S2 細胞株細胞凋亡。



圖二十七. Casticin對A375.S2細胞Caspase抑制劑細胞存活的影響。實驗數據

以三重複求其平均值與標準差，並以student's t-test統計分析，*表示 $p < 0.05$ 。

第十五節 Quantitative PCR Analysis探討Casticin對A375.S2細胞產生凋亡

相關蛋白之mRNA表現

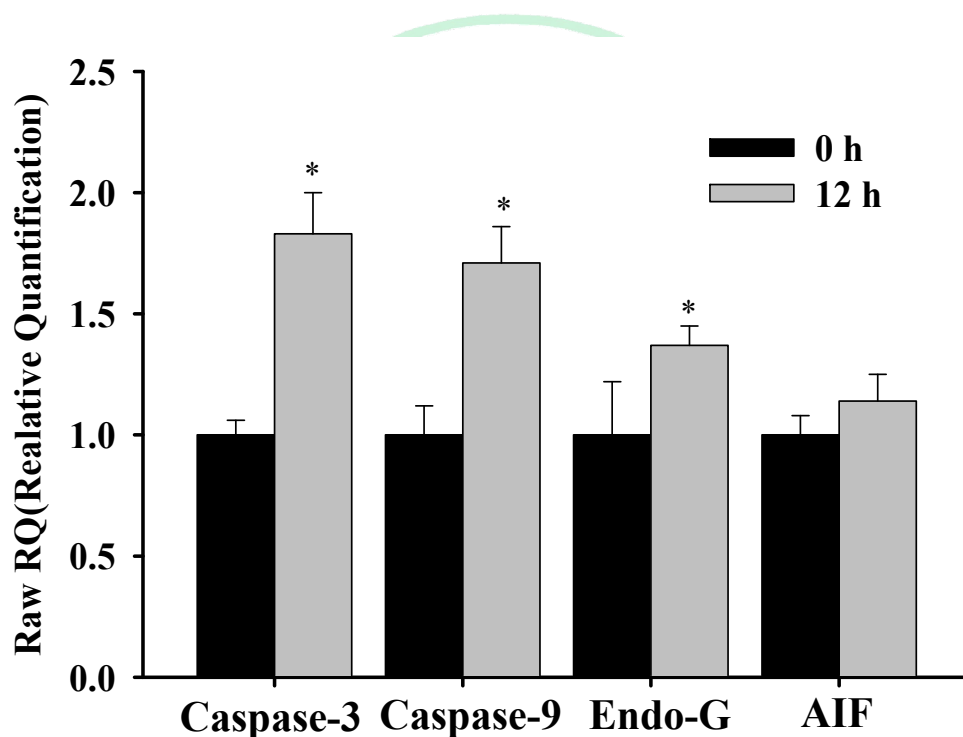
利用Quantitative PCR Analysis探討當A375.S2細胞處理2 μ M Casticin藥物之後，AIF, Endo G, Caspase-3, -9 mRNA表現量。實驗結果顯示在2 μ M Casticin藥物處理下Endo G, Caspase-3, -9 mRNA表現在12小時有上升的情形 (圖二十八)。



(A)

Primer Name	Primer sequence
Human caspase-3-F	CAGTGGAGGCCGACTTCTTG
Human caspase-3-R	TGGCACAAAGCGACTGGAT
Human caspase-9-F	TGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTT
Human caspase-9-R	GTGAGCCCACTGCTCAAAGAT
Human AIF-F	GGGAGGACTACGGCAAAGGT
Human AIF-R	CTTCCTTGCTATTGGCATTCTG
Human Endo G-F	GTACCAGGTCATCGGCAAGAA
Human Endo G-R	CGTAGGTGCGGAGCTCAATT
Human GAPDH-F	ACACCCACTCCTCCACCTTT
Human GAPDH-R	TAGCCAAATTCGTTGTCATACC

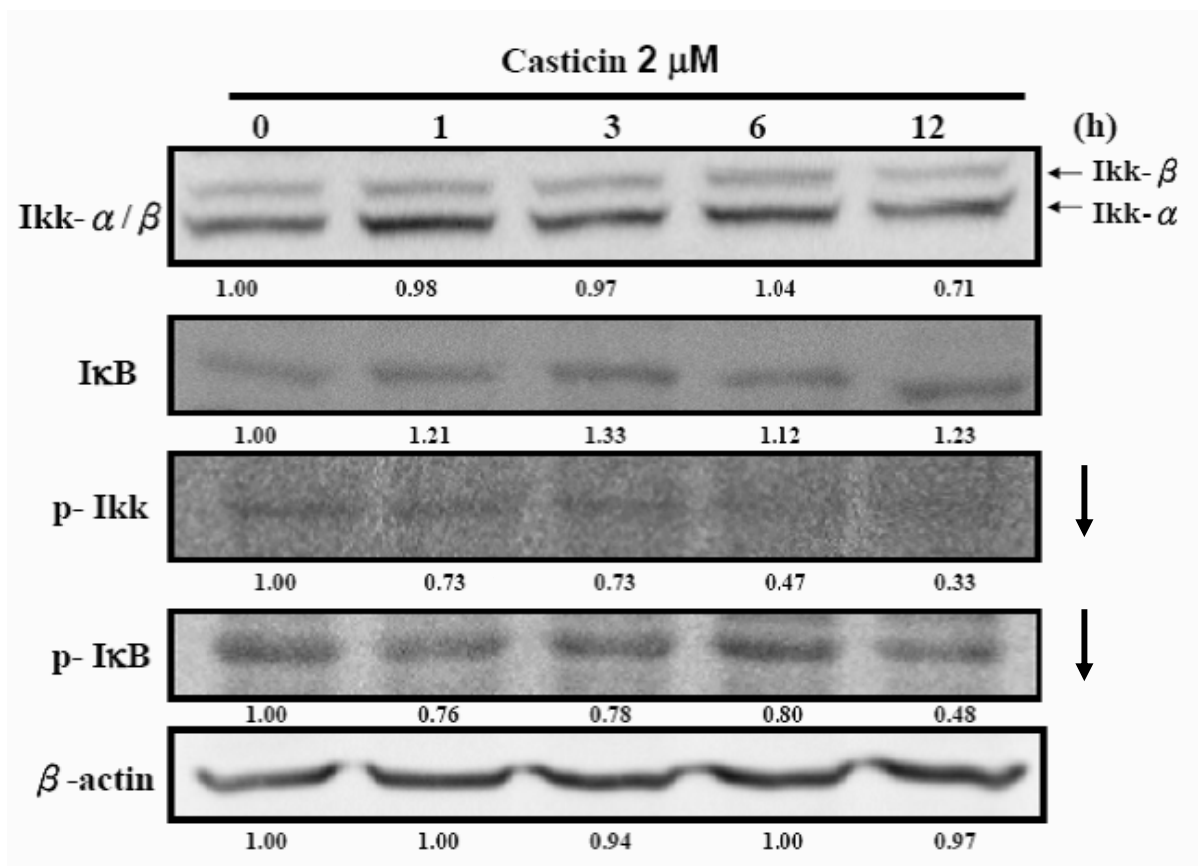
(B)



圖二十八. Casticin對A375.S2細胞凋亡蛋白之mRNA影響。利用Quantitative PCR Analysis檢測AIF, Endo G, Caspase-3, -9 mRNA表現量。(A) 所設計的primer。(B) mRNA表現量之量化圖。實驗數據以三重複求其平均值與標準差，並以student's t-test統計分析，*表示 $p < 0.05$ 。

第十六節 探討 Casticin 對 A375.S2 細胞 NF- κ B 之上游相關蛋白表現

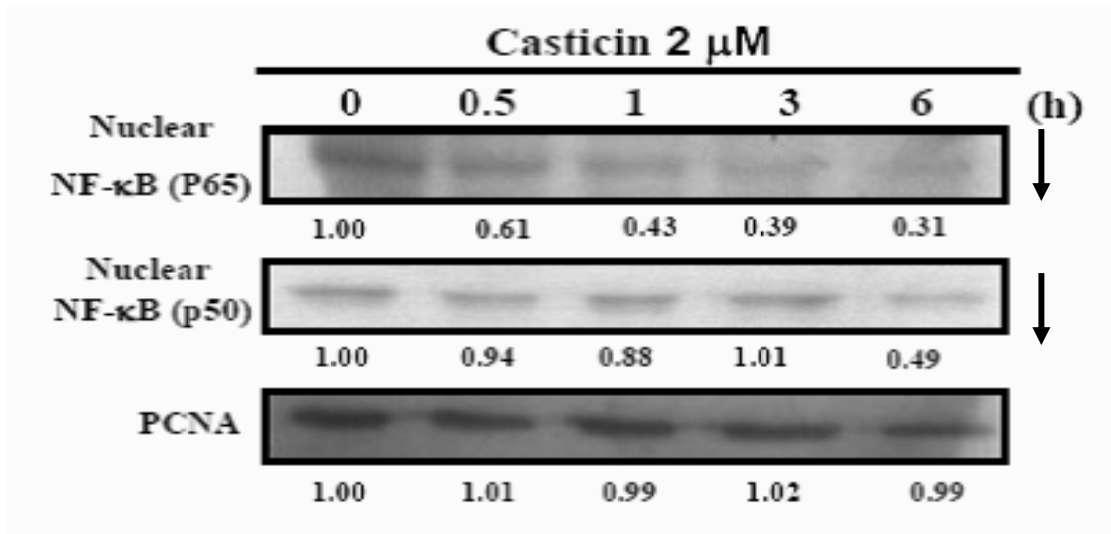
將細胞以 2 μ M 的 Casticin 處理並利用西方墨點法分析處理藥物後之 0, 1, 3, 6, 12 小時的蛋白表現。實驗結果顯示 p-Ikk, p-I κ B 蛋白有下降的情形 (圖二十九)。



圖二十九. Casticin對A375.S2細胞NF- κ B之上游相關蛋白表現。利用西方墨點法檢測p-Ikk、p-I κ B、Ikk- α/β 、I κ B的蛋白表現變化。

第十七節 Casticin 對 A375.S2 細胞核內 NF- κ B 蛋白表現變化

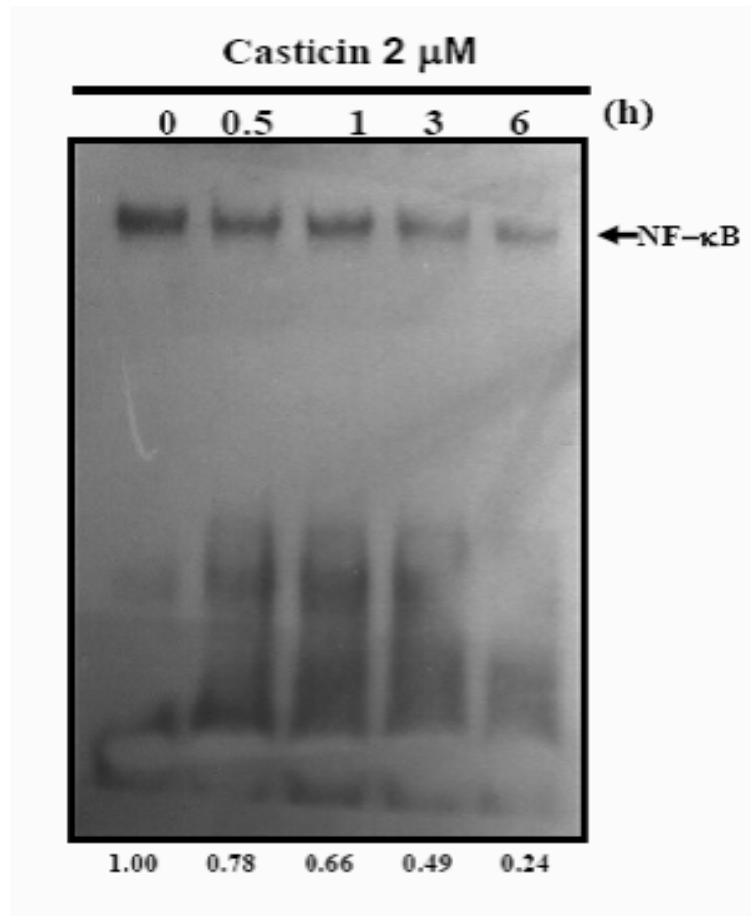
將細胞以 2 μ M 的Casticin處理並利用西方墨點法分析處理藥物後之0, 0.5, 1, 3, 6小時的蛋白表現。實驗結果顯示NF- κ B(P65)、NF- κ B(P50)蛋白有下降的情形 (圖三十)。



圖三十. Casticin對A375.S2細胞NF- κ B蛋白表現。利用西方墨點法檢測NF- κ B(P65)、NF- κ B(P50)的蛋白表現變化。

第十八節 探討 Casticin 對 A375.S2 細胞 NF- κ B 與核內 DNA 結合變化

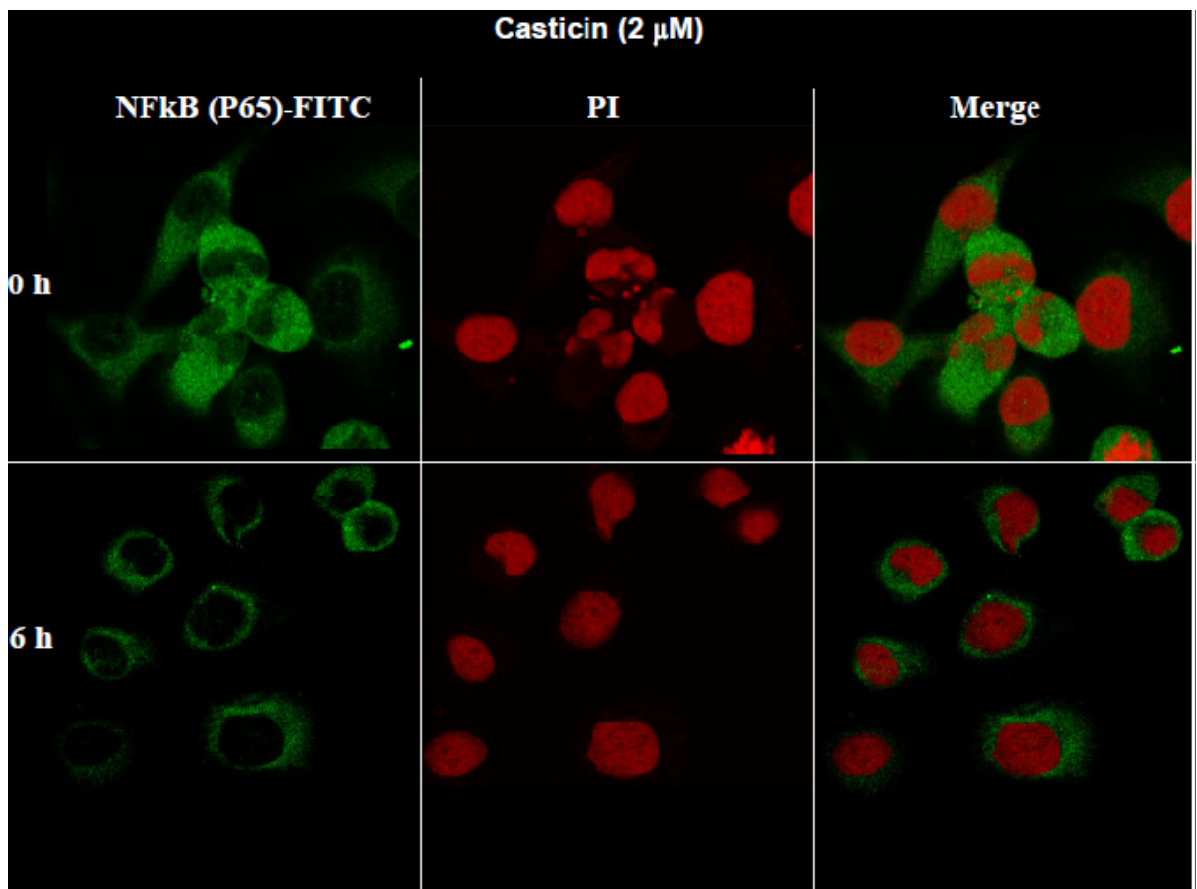
將細胞以 2 μ M 的 Casticin 處理並利用 EMSA 分析處理藥物後之 0, 0.5, 1, 3, 6 小時的 NF- κ B 與細胞核內 DNA 結合變化。實驗結果 NF- κ B 與細胞核內 DNA 結合有下降的情形 (圖三十一)。



圖三十一. Casticin 對 A375.S2 細胞 NF- κ B 與核內 DNA 結合變化。

第十九節 探討Casticin對A375.S2細胞內NF- κ B之轉移位置影響

利用免疫螢光染色法去觀察細胞中蛋白的表現與移動的現象。以2 μ M的Casticin藥物處理A375.S2細胞6小時後，以免疫螢光染色與共軛膠顯微鏡觀察。實驗結果顯示，當細胞以藥物處理6小時之後NF- κ B被抑制進入細胞核內與DNA結合（圖三十二）。



圖三十二. 免疫螢光染色法觀察NF- κ B之表現與轉移。A375.S2細胞以2 μ M的Casticin處理，並經過6小時後，免疫螢光染色與共軛膠顯微鏡觀察NF- κ B的表現與轉移。

第五章 實驗討論

惡性腫瘤 (癌症) 連續28年高居台灣國人十大死因首位，平均每13分10秒有一人死於癌症。而惡性腫瘤其中之一疾病黑色素瘤的發生率占所有癌症的百分之三至八成，據世界衛生組織報告，全球每年發生黑色素瘤有關的死亡人數約48000。現今針對黑色素瘤的治療方式不外乎藉由外科治療(切除)、放射治療、化學治療(DTIC, BCNU)、免疫治療，這些方式來去除。但有時這些治療方法並不是非常顯著也帶有一定的副作用。因此我們極力尋找中草藥，看是否可替代這些治療方式。許多研究指出，Casticin的類黃酮具有多種腫瘤細胞毒性作用機制，Casticin可抑制人類肺癌細胞 (PC-12) 和人類結腸癌細胞 (HCT-116) 的活性²³。細胞週期調控中可誘導 p21蛋白，抑制CDK-1蛋白，使細胞週期調控蛋白Cyclin A表現量減少，造成細胞週期G2/M停滯²²。另一方面Casticin也可誘導血癌細胞內抗凋亡蛋白Bcl-2表現量下降，讓血癌細胞走向凋亡²⁴。然而並沒有文獻或相關的資料顯示出Casticin會對人類惡性的黑色素瘤細胞造成影響，所以我們藉由Casticin藥物來對人類黑色素瘤細胞株是否誘導細胞凋亡以及抗癌分子的機轉來加以探討。

本研究中從細胞的形態來看，發現經Casticin藥物治療後的A375.S2細胞株的細胞型態改變呈現皺縮，並隨著濃度增加與時間的增長，細胞數目減少、細胞膜變的不規則與細胞質呈空泡化 (圖八、圖九)。然而由細胞存活率得知Casticin有時間與劑量的依存性 (time-dependent and dose-dependent)

抑制A375.S2細胞生長，並在高濃度、長時間下對於人類正常角質細胞 (HaCaT cell)才具有毒殺效果 (圖十、圖十一)。當細胞凋亡時，DNA會嚴重受損(damage)與斷裂(fragmentation)，細胞質產生凝集現象，細胞膜會往內皺縮形成凋亡小體。由彗星試驗 (comet assay)可檢測DNA受損情形，當DNA受損情形越嚴重則彗星拖尾的現象越長，實驗結果顯示隨著Casticin濃度的增加彗星拖尾的情形越長 (圖十二)。由DAPI試驗與DNA膠體電泳可觀察DNA是否斷裂 (fragmentation)，細胞質是否產生凝集現象。實驗結果顯示經Casticin處理過後的A375.S2細胞，DAPI所發出的螢光隨著濃度增加而變強，細胞質產生凝集 (圖十三)。DNA斷裂的情形也越來越嚴重(圖十四)。

有研究指出Casticin可誘導 p21蛋白，抑制CDK-1蛋白，使細胞週期調控蛋白Cyclin A表現量減少，造成細胞週期G2/M停滯²²。但還沒有文獻指出說Casticin是否可調控G2/M期的Cyclin B, CHK-2, p53, Cdc25等相關蛋白表現。

本研究中利用流式細胞儀來分析Casticin藥物對於人類黑色素瘤細胞A375.S2是否產生細胞週期停滯及細胞凋亡的現象，結果顯示隨著藥物處理的時間增加，細胞週期逐漸停滯G2/M期，而Sub-G1也有明顯的增加(圖十五)。另一方面藉由西方墨點法來分析蛋白變化 p53, p21, CHK-2蛋白明顯得增加，而Cyclin A, B, Cdc25c表現有被抑制的情形 (圖十七)。上述結果可得知Casticin也調控Cyclin B, Cdc25c, p53, CHK-2等蛋白造成A375.S2細胞株的細胞週期停滯G2/M期和細胞凋亡。

另外我們也藉由流式細胞儀來觀察細胞凋亡時的變化，有研究指出，活

性氧化物自由基群ROS (Reactive oxygen species)的增加會引起粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$, Mitochondrial membrane potential)下降，而活化下游的caspase的活性，造成細胞凋亡⁷⁵。而在相關文獻部分並無指出說Casticin可造成ROS大量釋放引起粒線體膜電位的改變。藉由實驗結果得知，利用Casticin處理A375.S2細胞後，活性氧化物自由基群ROS的螢光量在1小時後開始上升 (圖十八)，為了證實ROS是否影響細胞凋亡，我們使用了ROS清除劑N-Acetyl-cysteine (NAC)，在加藥前預先處理後，以MTT assay來檢測細胞存活率，發現在加藥前預先處理ROS清除劑N-Acetyl-cysteine (NAC)，細胞存活有回升的情形 (圖十九)。另外實驗結果也顯示粒線體膜電位在12小時後開始下降 (圖二十)。最後檢測與粒線體相關凋亡路徑中Caspase-3的活性，結果顯示在A375.S2處理藥物後，Caspase-3活性有上升的情形 (圖二十一)由以上結果可得知Casticin可藉由ROS大量釋放造成細胞凋亡並促使粒線體膜電位的下降，同時引起下游Caspase-3活性增加。

細胞凋亡的內在路徑與粒線體和Bcl-2家族蛋白調控有極大的關係，proapoptosis蛋白Bax與Bak在非活化態時存在於細胞質中，當細胞凋亡被誘發時，Bax與Bak會轉移至粒線體外膜上，造成粒線體外膜的通透性產生改變，另一方面粒線體膜上抗凋亡蛋白，如 Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1也會被抑制⁷⁶⁻⁷⁷。當粒線體膜電位下降時，粒線體內會啟動細胞凋亡活化的蛋白，如 Apoptosis-inducing factor (AIF), Endonuclease G (Endo G), Cytochrom *c*釋放到細胞質中。當Cytochrom *c*釋放到細胞質中可促使Apaf-1(apoptosis-protease

activating factor 1)與Procaspase-9結合，引起Caspase-9的活性進而去活化下游的Caspase-3活性。而AIF、Endo G被釋放到細胞質中會轉移至細胞核內直接造成染色質的凝集與細胞凋亡⁷⁸。在相關文獻指出Casticin可藉由調控Bax、Bcl-2、PARP 和Caspase-3造成血癌細胞 (K562 cell) 凋亡²⁴。但並無文獻指出說Casticin是否可調控粒線體其它相關蛋白產生變化。因此藉由西方墨點法來證實A375.S2細胞再受到藥物的影響下，粒線體相關調控蛋白Bax、Bak蛋白表現量隨著藥物處理時間增加有上升的情形，粒線體膜電位下降時所釋放的Apoptosis-inducing factor(AIF)、Endonuclease G(Endo G)、Cytochrom *c* 蛋白也有上升的趨勢 (圖二十二)。Cytochrom *c* 釋放時Apaf-1與Procaspase-9蛋白結合造成蛋白表現量下降，而下游的活化型Caspase-3蛋白表現量有增加的情形 (圖二十三)。另外我們也藉由西方墨點法來檢測粒線體膜上抗凋亡蛋白的變化，A375.S2細胞在受到藥物處理下Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1蛋白表現量隨著時間增加而減少，而在細胞質中會抑制Caspase活性IAPs家族中的x-IAP蛋白表現量也隨著藥物時間的增加而下降 (圖二十四)。當AIF、Endo G蛋白表現量有上升時，我們進一步利用免疫螢光染色法再用共軛膠顯微鏡去觀察蛋白轉移位子，結果發現經藥物處理的12小時後，AIF與Endo G則有大量的表現並進入細胞核中，使細胞核產生破損(圖二十五、二十六)。

接著我們為了證實A375.S2細胞再受到藥物的處理後是否受到Caspase的影響造成細胞凋亡，所以我們利用廣泛性Caspase抑制劑 (z-VAD-fmk),

Caspase-3 抑制劑(z-DEVD-fmk), Caspase-9 抑制劑(z-LEHD-fmk)以MTT assay來檢測細胞存活率變化。在加藥前預先處理Caspase抑制劑(z-VAD-fmk), Caspase-3 抑制劑(z-DEVD-fmk), Caspase-9 抑制劑(z-LEHD-fmk)後,細胞存活有回升的情形(圖二十七)。此外利用Quantitative PCR Analysis 分析Caspase-9, Caspase-3, AIF, Endo G的mRNA表現變化。實驗結果顯示Casticin會誘使A375.S2細胞的Caspase-9, Caspase-3, AIF, Endo G的mRNA表現上升,使基因進行轉錄(圖二十八)。由以上實驗結果發現Casticin除了調控Bax, Bcl-2, 和Caspase-3外,也可調控Bak、Bcl-xL, Mcl-1, x-IAP蛋白表現並引起下游AIF, Endo G, Caspase-9活性增加,讓A375.S2細胞株走向凋亡。

另一方面目前有許多研究指出Nuclear factor kappa B (NF- κ B) 參與癌症細胞的生長、轉移及抗細胞凋亡反應,當NF- κ B活化,可以促進cIAPs (caspase inhibitors of apoptosis proteins), x-IAP (X-linked inhibitor of apoptosis), Bcl-x (B cell lymphoma x) 以及 Bcl-2 (B cell lymphoma 2) 表現,而抑制細胞凋亡起始因子 Caspase-9與-8的活化作用⁷⁹,目前NF- κ B被陸續發現還調控其它抗細胞凋亡的基因,如 Bcl-2 homologues、Fas、Fas ligand、TNF- α 、TNFR1⁸⁰。最新的研究指出Casticin可抑制NF- κ B pathway來治療過敏性哮喘所產生的發炎反應⁸¹。因此,我們利用西方墨點法檢測NF- κ B相關調控蛋白變化,實驗結果顯示當A375.S2細胞受到藥物的處理後,磷酸化Ikk與磷酸化IkB蛋白隨著時間增加有下降的情形(圖二十九)。而我們抽取出細

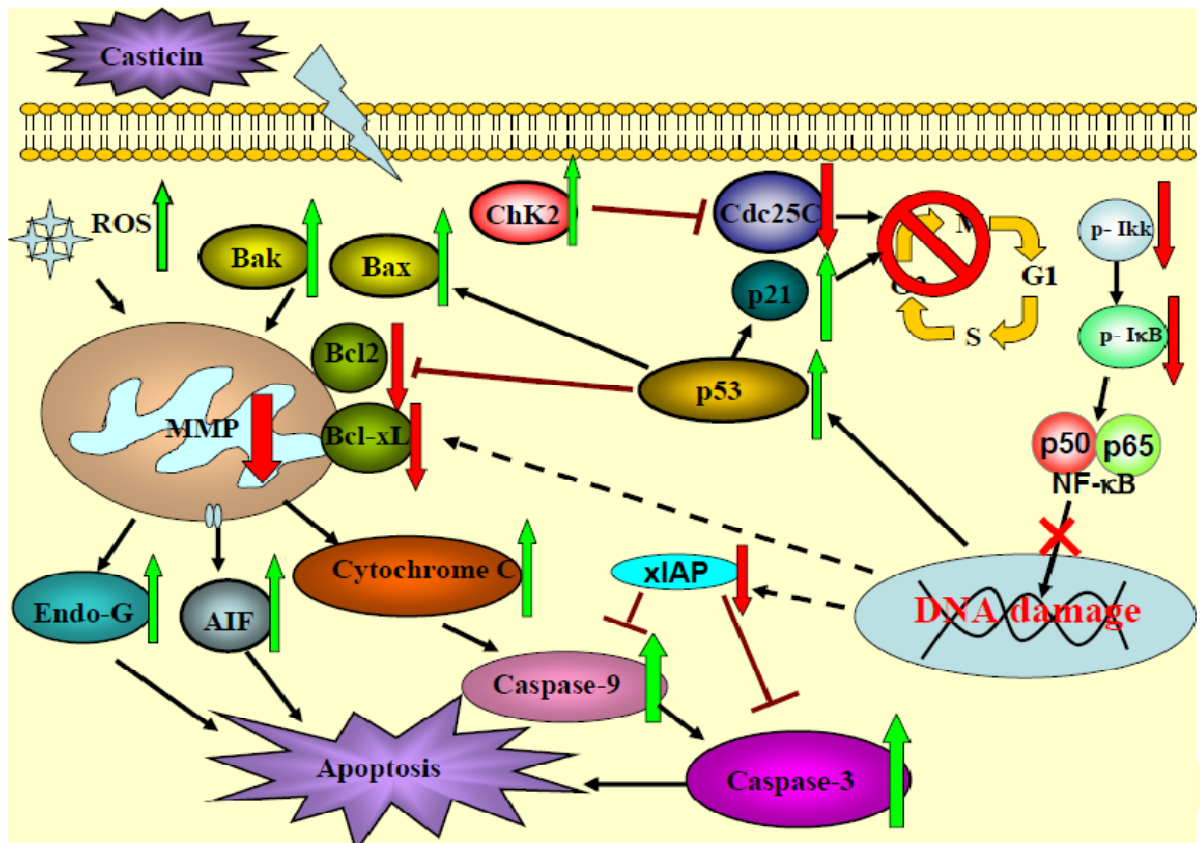
胞核內蛋白來檢測NF- κ B p65, p50蛋白變化，發現受到藥物的處理後核內NF- κ B p65, p50蛋白隨著時間增加由細胞質轉位至細胞核內的蛋白表現量有下降的趨勢（圖三十）。接著我們使用EMSA去探討NF- κ B與細胞核內DNA結合情形,結果確實隨著藥物處理的時間增加，NF- κ B結合的能力也明顯下降（圖三十一）。接著進一步利用免疫螢光染色法再用共軛膠顯微鏡去觀察NF- κ B蛋白轉移位子。實驗結果顯示，當細胞以藥物處理6小時之後NF- κ B被抑制進入細胞核內與DNA結合（圖三十二）。

以上實驗結果發現Casticin可抑制NF- κ B的活性，間接影響下游抗凋亡蛋白Bcl-2, Bcl-xL, x-IAP表現下降，因此我們評估，Casticin抑制NF- κ B pathway除了可治療發炎反應外，也與細胞凋亡有關。

根據以上所有實驗顯示，本研究認為Casticin藥物能有效抑制A375.S2細胞的生長，並藉由ROS產生，經由粒線體相關路徑來引起人類黑色素瘤A375.S2走向細胞凋亡。但是否其它路徑所引起的凋亡仍需待日後更進一步研究。另外綜合這些結果顯示，Casticin藥物可能具有潛力，或許可以發展成為治療惡性黑色素瘤的藥物。

第六章 結論

綜合以上結果，我們認為Casticin可以造成A375.S2細胞核內DNA損傷使細胞週期停滯，以及抑制調控NF- κ B活化的相關蛋白，始NF- κ B進入核內與DNA結合的能力降低，間接影響下游凋亡相關蛋白表現，並經由mitochondria-dependent pathway來引起細胞凋亡。



圖三十三. Casticin誘導人類黑色素瘤A375.S2細胞凋亡之路徑模式

第七章 參考文獻

1. 世界衛生組織, [cited; Available from <http://www.who.int/en/>]
2. 行政院衛生署, [cited; Available from <http://www.doh.gov.tw/>]
3. Rebbeck, T.R., *et al.* Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, and cancer prevention research: two journals, a common goal. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 2903-2905 (2008).
4. Thiery, G. [Carcinogenic power of the thymonucleoproteins extracted from Sticker's sarcoma.]. *C R Seances Soc Biol Fil* **144**, 745-747 (1950).
5. Reedy, J. Galen on cancer and related diseases. *Clio Med* **10**, 227-238 (1975).
6. Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M. & Hearing, V.J. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *J Invest Dermatol* **127**, 751-761 (2007).
7. National Cancer Institute - Common Cancer Types [<http://www.cancer.gov/cancertopics/commoncancers>]
8. <http://www.mirror.co.uk/news/top-stories/2009/04/08/skin-cancer-killing-sunbed-generation-115875-21262348>
9. Saravanan, B., Paramu, M.K. & Ranganathan, E. Supravesical hernia--a rare cause of intestinal obstruction. *Int J Surg* **6**, 471-472 (2008).
10. Berwick, M., Roush, G. & Thompson, W.D. Evaluating the efficacy of skin self-exam and other surveillance measures in persons at various levels of risk for cutaneous malignant melanoma: an ongoing case-control study. *Prog Clin Biol Res* **293**, 297-305 (1989).
11. DrSkin [www.drskin.com.tw]
12. <http://www.hudong.com/wiki/皮膚性黑色素瘤>
13. Tribius, S., Petersen, C., Knecht, R. & Ihloff, A.S. [Radiation therapy in head and neck cancer : Highlights from ASCO 2010.]. *HNO* (2010).
14. 呂俠卿, 中藥鑑別大全(2002), 中華人民共和國湖南科學技術出版社。(Simple Chinese)
15. 原思通, 醫用中藥飲片學(2001), 中華人民共和國人民衛生出版社。(Simple Chinese)
16. Xu, B. & Liu, P. 5-FU pretreatment potentiates cisplatin-induced apoptosis through up-regulation of thrombospondin-1 in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Chemother Pharmacol* **63**, 1181-1183 (2009).
17. Mesaik, M.A., *et al.* Isolation and immunomodulatory properties of a flavonoid, casticin from *Vitex agnus-castus*. *Phytother Res* **23**, 1516-1520 (2009).
18. Sunder, S., Kalra, O.P., Nashine, S., Waghmare, V. & Ruchi, R. Comparative study of adequacy of dialysis and health-related quality of life in patients on CAPD and APD. *Perit Dial Int* **28**, 542-544 (2008).

19. Van Biesen, W., Veys, N., Vanholder, R. & Lameire, N. The role of APD in the improvement of outcomes in an ESRD program. *Semin Dial* **15**, 422-426 (2002).
20. Hajdu, Z., *et al.* Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytother Res* **21**, 391-394 (2007).
21. Vakifahmetoglu, H., Olsson, M. & Zhivotovsky, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **15**, 1153-1162 (2008).
22. Haidara, K., Zamir, L., Shi, Q.W. & Batist, G. The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. *Cancer Lett* **242**, 180-190 (2006).
23. You, K.M., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. & Kim, H.P. Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines in vitro. *Planta Med* **64**, 546-550 (1998).
24. Shen, J.K., Du, H.P., Yang, M., Wang, Y.G. & Jin, J. Casticin induces leukemic cell death through apoptosis and mitotic catastrophe. *Ann Hematol* **88**, 743-752 (2009).
25. Qiao, J., Lin, L. & Tianhong, W. [Progress in research on apoptosis in filamentous fungi--a review]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **48**, 551-555 (2008).
26. Lin, J.G., Zhang, C.X. & Suzuki, S. An anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family from Marine Birnavirus inhibiting apoptosis of insect cells infected with baculovirus. *Virus Genes* **31**, 185-193 (2005).
27. Hong, J.R., Gong, H.Y. & Wu, J.L. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* **295**, 217-229 (2002).
28. Wood, W., *et al.* Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* **127**, 5245-5252 (2000).
29. Cilloni, D., *et al.* Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **96**, 3637-3643 (2000).
30. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241-251 (1993).
31. Bratton, S.B. & Cohen, G.M. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* **22**, 306-315 (2001).
32. Jacobson, M.D., *et al.* Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* **361**, 365-369 (1993).
33. Miyashita, T. & Reed, J.C. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* **81**, 151-157 (1993).
34. Susin, S.A., *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446 (1999).
35. Daugas, E., *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* **476**, 118-123 (2000).

36. Fabre & Jost. [Cylindroma of external auditory pathway.]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* **73**, 955-957 (1956).
37. Ristic, T., Djordjevic, V.B., Deljanin-Ilic, M., Cosic, V. & Kundalic, S. Serum Fas/FasL levels in dependence on clinical presentations of coronary disease and their relationship with risk factors. *Vojnosanit Pregl* **67**, 537-542 (2010).
38. Lin, P.F., Hao, Y.B., Guo, H.L., Liu, H.L. & Rui, R. [Role of Fas/FasL on apoptosis of porcine follicular granulosa cells derived from isolated follicles during culture in vitro]. *Dongwuxue Yanjiu* **31**, 268-274 (2010).
39. Wu, F., *et al.* Studies of phosphoproteomic changes induced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK) highlight deregulation of tumor necrosis factor (TNF)/Fas/TNF-related apoptosis-induced ligand signaling pathway in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1616-1632 (2010).
40. Ghavami, S., *et al.* Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* **46**, 497-510 (2009).
41. Gilmore, T.D., Koedood, M., Piffat, K.A. & White, D.W. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* **13**, 1367-1378 (1996).
42. Kim, H.J., *et al.* Aqueous extract of *Tribulus terrestris* Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF-kappaB signaling in liver cancer cells. *J Ethnopharmacol* (2011).
43. Hamid, T., *et al.* Cardiomyocyte NF-kappaB p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovasc Res* **89**, 129-138 (2011).
44. Zhuang, W.J., *et al.* Involvement of NF-kappaB and c-myc signaling pathways in the apoptosis of HL-60 cells induced by alkaloids of *Tripterygium hypoglaucom* (levl.) Hutch. *Phytomedicine* **11**, 295-302 (2004).
45. Kim, Y.S., *et al.* Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-alpha-stimulated human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **50**, 41-49 (2007).
46. Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H. & Vierstra, R.D. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J* **20**, 7096-7107 (2001).
47. Baldwin, A.S., Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* **107**, 3-6 (2001).
48. Waiwut, P., *et al.* Gomisin N enhances TNF-alpha-induced apoptosis via inhibition of the NF-kappaB and EGFR survival pathways. *Mol Cell Biochem* **350**, 169-175 (2011).
49. Lee, H., *et al.* Disruption of microtubules sensitizes the DNA damage-induced apoptosis through inhibiting nuclear factor kappaB (NF-kappaB) DNA-binding activity. *J Korean Med Sci* **25**, 1574-1581 (2010).

50. Shoji, K., *et al.* Mangiferin induces apoptosis by suppressing Bcl-xL and XIAP expressions and nuclear entry of NF-kappaB in HL-60 cells. *Arch Pharm Res* **34**, 469-475 (2011).
51. Fischer, C.D., *et al.* Anti-Inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: tulathromycin induces caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF-kappaB signaling and CXCL8 transcription. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 338-348 (2011).
52. Yu-hui, H., Yun, F., Fen, J. & Xing, L. [Study about cardiomyocyte apoptosis in myocardial ischemic-reperfusion injury of rats and NF-kappaB p65, iNOS expression]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **26**, 868-870 (2010).
53. Lukiw, W.J., *et al.* Coordinate activation of HIF-1 and NF-kappaB DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 4163-4170 (2003).
54. Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* **107**, 135-142 (2001).
55. Moir, R.D., *et al.* Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle--relationship between structure and function. *J Struct Biol* **129**, 324-334 (2000).
56. Delaval, B. & Birnbaum, D. A cell cycle hypothesis of cooperative oncogenesis (Review). *Int J Oncol* **30**, 1051-1058 (2007).
57. McDonald, E.R., 3rd & El-Deiry, W.S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). *Int J Oncol* **16**, 871-886 (2000).
58. Chiu, A., *et al.* Review of chromium (VI) apoptosis, cell-cycle-arrest, and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **28**, 188-230 (2010).
59. Singhal, S., Vachani, A., Antin-Ozerkis, D., Kaiser, L.R. & Albelda, S.M. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* **11**, 3974-3986 (2005).
60. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**, 131-149 (2003).
61. Michalides, R.J., van de Brekel, M. & Balm, F. Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. *Head Neck* **24**, 694-704 (2002).
62. Oka, M., Maeda, S., Koga, N., Kato, K. & Saito, T. A modified colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 1472-1473 (1992).
63. 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).
64. 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).
65. Liu, G.H., Harada, T., Amemiya, T. & Itoh, K. Novel two-dimensional DNA gel electrophoresis mapping for characterizing complex bacterial communities in environmental samples. *J Biosci Bioeng* **107**, 646-651 (2009).
 66. 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).
 67. Yu, T., Robotham, J.L. & Yoon, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2653-2658 (2006).
 68. Tan, T.W., *et al.* Curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells via MMP changes and caspase-3 activation. *Anticancer Res* **26**, 4361-4371 (2006).
 69. Wu, C.C., *et al.* Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. *Mutat Res* **601**, 71-82 (2006).
 70. Wada, A., *et al.* Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **44**, 142-150 (2006).
 71. Pei, Y., Xing, D., Gao, X., Liu, L. & Chen, T. Real-time monitoring full length bid interacting with Bax during TNF-alpha-induced apoptosis. *Apoptosis* **12**, 1681-1690 (2007).
 72. Xue, C., Liu, W., Wu, J., Yang, X. & Xu, H. Chemoprotective effect of N-acetylcysteine (NAC) on cellular oxidative damages and apoptosis induced by nano titanium dioxide under UVA irradiation. *Toxicol In Vitro* **25**, 110-116 (2011).
 73. Hellman, L.M. & Fried, M.G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2**, 1849-1861 (2007).
 74. Sorbello, V., *et al.* Quantitative real-time RT-PCR analysis of eight novel estrogen-regulated genes in breast cancer. *Int J Biol Markers* **18**, 123-129 (2003).
 75. Tang, X.Q., *et al.* Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res* **1057**, 57-64 (2005).
 76. Gillissen, B., *et al.* Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* **188**, 851-862 (2010).
 77. Pearce, A.F. & Lyles, D.S. Vesicular stomatitis virus induces apoptosis primarily through Bak rather than Bax by inactivating Mcl-1 and Bcl-XL. *J Virol* **83**, 9102-9112 (2009).
 78. Kang, M.H. & Reynolds, C.P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic

- pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* **15**, 1126-1132 (2009).
79. Chen, F., Castranova, V. & Shi, X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* **159**, 387-397 (2001).
 80. Hatano, E., *et al.* NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* **120**, 1251-1262 (2001).
 81. Koh, D.J., *et al.* Inhibitory effects of casticin on migration of eosinophil and expression of chemokines and adhesion molecules in A549 lung epithelial cells via NF-kappaB inactivation. *J Ethnopharmacol* (2011).

