



中國醫藥大學
生物科技學系碩士班
碩士學位論文
編號:BST-9809(0009)

魚藤素誘發人類非小細胞肺癌細胞株
NCI-H460 之凋亡機制

The mechanism of deguelin-induced apoptosis in human
non-small cell lung cancer (NCI-H460)

指導教授: 鍾景光 教授

共同指導教授: 陳柏源 助理教授

研究生: 徐于絜

中華民國一百年五月

中國醫藥大學 生物科技系碩士班

碩士候選人學位考試

論文題目

中文：魚藤素誘發人類非小型細胞肺癌凋亡之機制
探討

英文：The mechanism of deguelin-induced apoptosis in
human non-small cell lung cancer.

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

考試委員

鍾景先

周淑安

陳柏源

吳永忠

林仁淵

系主任：

中華民國 一 百 年 六 月 八 日

中文摘要

魚藤素是從魚藤屬植物中所萃取出的一種天然化合物。在過去的文獻中已證實魚藤素可以透過細胞凋亡之機制誘導人類乳癌及血癌細胞死亡並且抑制癌細胞增生。然而，尚未有研究指出魚藤素對於人類非小細胞肺癌之抗癌相關機轉，因此，本研究的目的主要是在探討魚藤素對人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株之凋亡分子機制。

首先，觀察不同魚藤素濃度對非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株型態的改變；利用流式細胞儀和 Trypan blue 染色分析存活率和細胞生長抑制情形；Annexin V, DAPI 染色，彗星試驗和 DNA 膠體電泳檢測細胞凋亡之現象；運用流式細胞儀檢測細胞內粒腺體膜電位及鈣離子濃度之改變，西方墨點法，凋亡蛋白酶活性檢測，AKT 激酶活性分析和免疫螢光染色法探討細胞內訊息傳遞路徑。

根據研究結果顯示，魚藤素能有效抑制人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株的增生，造成細胞死亡而降低細胞存活率；魚藤素可誘發細胞凋亡和 DNA 受損，致使磷脂絲胺酸蛋白外翻，DNA 斷裂和染色質濃縮形成凋亡小體；西方墨點和免疫螢光染色法證實，魚藤素能抑制 p-AKT 蛋白表現，促進 BAD 的活化，並且使之從細胞質轉移至粒腺體外膜上，進而影響促細胞凋亡相關蛋白 (Bid, Bax, Bak) 和抑制抗凋亡蛋白 (Bcl-2, Bcl-X) 的表現，致使粒腺體膜電位下降，釋出 AIF 和 cytochrome c，cytochrome c, Apaf-1 和 caspase-9 結合形成凋亡體，活化 caspase-3，最後誘發細胞凋亡；AIF 轉移至細胞核中造成 DNA 受損。總觀以上結果，我們認為魚藤素會引起人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株之粒腺體功能喪失並誘導細胞經由 AKT 和 Bad 相關粒腺體內在路徑走向細胞凋亡。

英文摘要

Deguelin, is a natural product, isolated from *Derris trifoliata Lour.* It was reported that deguelin inhibited cell proliferation and caused cell death in human leukemia and breast cancer cells through the induction of apoptosis. Therefore, we investigate deguelin whether or not affect human lung cancer cells *in vitro*. First, we observed the change of cell morphology and percentage of cell viability after various doses of deguelin treatment, flow cytometric analysis and trypan blue staining were used to detect the cell viability and the cell growth inhibition of NCI-H460 cells. Second, we used annexin V, DAPI staining, comet assay and DNA gel electrophoresis to determined the phenomenon of apoptosis. Finally, we investigated signal transduction by examining the intracellular change of mitochondria membrane potential ($\Delta\psi_m$) and Ca^{2+} levels, western blotting, caspase activity, AKT kinase assay and immunofluorescence were used in NCI-H460 cell line. Based on these results, we found that deguelin greatly suppressed cell proliferation and decreased cell viability in time- and dose-dependent manners. Deguelin induced cell apoptosis and DNA damage including chromatin condensation, the formation of apoptotic bodies, and translocation of phosphatidylserine (PS) of the plasma membrane. Western blotting and immunofluorescence proved that deguelin inhibited p-AKT protein expressions, resulting in activation of Bad and then translocate from cytosol to mitochondria where it binds to Bcl-2 and Bcl-X, followed by promoted the influence of Bcl-2 family proteins. There is a decrease in mitochondria membrane potential ($\Delta\psi_m$), causing release of cytochrome *c* and AIF. Cytochrome *c* combined with apaf-1 and caspase-9 to an apoptosome, activated caspase-3, leading to apoptosis. Then, AIF translocated into nuclear causing DNA damage. Overall, we suggest that the major mechanism of deguelin-induced apoptosis in NCI-H460 is through AKT and Bad-related signaling pathway.

誌謝

首先特別感謝口試委員：台灣大學醫學院 林仁混教授，靜宜大學食品營養學系 周淑姿教授，中國醫藥大學中醫學院 吳永昌教授，生物科技學系 鍾景光教授，陳柏源助理教授，感謝您們的指導與建議，讓我的論文內容更加豐富與完整。

碩士的研究生涯短暫，在這段期間，要感謝的人有如天上繁星之多，特別是我的指導教授鍾景光老師，謝謝老師對我的栽培與照顧，讓我在這兩年無論是專業領域亦或是處事方面皆成熟許多；謝謝楊家欣，黃雯雯老師實驗上的提供和指引；感謝鈞隆，啟誠，MOMO，郡誌學長和若華，馨中，怡廷學姊，謝謝你們的耐心與無私，把許多實驗經驗和技巧傳授給我；謝謝我的同班同學節文，暉煜，景嵐，我們之間的互相扶持是我精神上的支柱；碩一學弟妹士鋒，慧玉，季娟，彭勃，謝謝你們這一年來的幫忙，你們的用心和認真讓我很感動；最後謝謝我的爸爸，媽媽，因為有你們支持與開導，我才有毅力和恆心念完研究所。

在未來的日子裡，我會將這份感激永存心底，不忘你們的幫助和陪伴，也因為有你們，我才得以順利完成碩士學業。最後，我願將這份喜悅分享給大家。

徐于絮 謹致於

中國醫藥大學生命科學院 生物科技碩士班

June, 2010

總目錄

總目錄	I
表目錄	IV
圖目錄	V
第一章 前言	
第一節 研究背景	
一、肺癌之介紹	1
二、魚藤素之介紹	2
三、細胞凋亡之介紹	4
四、AKT 訊息傳遞路徑	7
五、AKT 與細胞凋亡之關係	8
六、AKT 與 Bcl-2 蛋白質家族之關係	9
第二節 研究目的	12
第二章 材料與方法	
第一節 實驗材料	
一、細胞來源	13
二、藥品試劑	13
三、儀器設備	16
第二節 實驗方法	
一、藥品配製	17
二、人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株培養與繼代	17
三、細胞冷凍保存	18
四、冷凍細胞活化	18
五、細胞存活率分析	18
六、細胞生長抑制分析	19
七、細胞染色質凝集現象	20

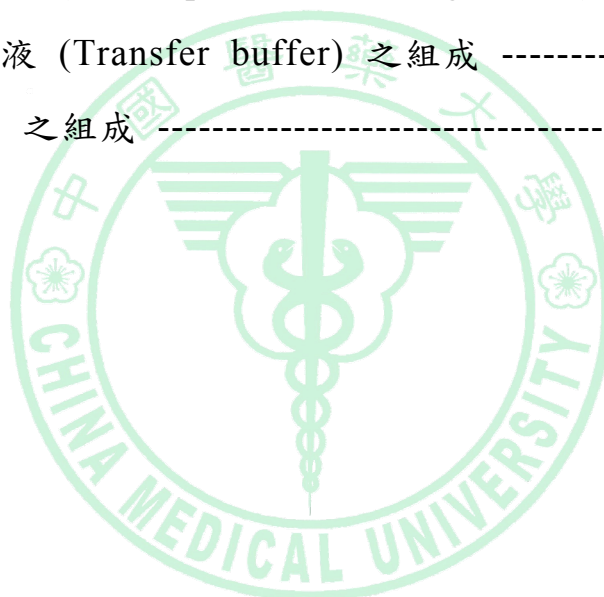
八、DNA 膠體電泳分析	-----	20
九、彗星試驗	-----	21
十、Annexin V affinity assay	-----	23
十一、粒腺體膜電位之檢測	-----	24
十二、鈣離子釋出之檢測	-----	25
十三、Caspase-3 活性分析	-----	25
十四、西方墨點法	-----	26
十五、免疫螢光染色	-----	31
十六、p-AKT 活性分析	-----	31
十七、統計分析	-----	33
第三章 研究結果		
第一節 魚藤素對人類非小細胞肺癌形態之影響	-----	34
第二節 魚藤素對人類非小細胞肺癌細胞存活率之影響	-----	35
第三節 魚藤素對人類非小細胞肺癌細胞生長抑制之影響	-----	36
第四節 魚藤素對人類非小型肺癌細胞 NCI-H460 細胞株誘導凋亡之影響	-----	37
第五節 觀察魚藤素對人類非小細胞肺癌 DNA 受損之情形	-----	38
第六節 魚藤素對人類非小型細胞肺癌粒線體之影響	-----	41
第七節 魚藤素對人類非小細胞肺癌粒線體凋亡路徑蛋白之影響	-----	42
第八節 利用免疫螢光染色探討魚藤素對人類非小細胞肺癌凋亡相關蛋白之表現與轉移之影響	-----	44
第九節 魚藤素對人類非小細胞肺癌之凋亡蛋白酶活性之影響	-----	45
第十節 Pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) , caspase-3 inhibitor (Z-DEVE-FMK) 及 caspase-9 inhibitor (Z-LEDH-FMK) 凋亡蛋白酶抑制劑對人類非小細胞肺癌之存活率影響	-----	46

第十一節 魚藤素對人類非小細胞肺癌細胞內鈣離子釋出的影響	-----47
第十二節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 Bad 蛋白之調控	-----48
第十三節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 PI3K/AKT 路徑相關蛋白之影響	-----50
第十四節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 p-AKT 之活性影響	-----51
第四章 討論	-----52
第五章 結論	-----56
第六章 參考文獻	-----57



表目錄

表一	Alkaline buffer -----	22
表二	Lysis buffer -----	23
表三	Tris buffer -----	23
表四	SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel) 之配製及組成 -----	28
表五	SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel) 之配製及組成 -----	29
表六	1.5 M Tris-HCl, pH=8.8 -----	29
表七	0.5 M Tris-HCl, pH=6.8 -----	29
表八	電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer) 之組成 -----	30
表九	轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 之組成 -----	30
表十	10X TBS 之組成 -----	30



圖目錄

圖一 魚藤素結構式 -----	2
圖二 魚藤葉, 花, 果實之型態 -----	3
圖三 細胞死亡的三種方式 -----	4
圖四 細胞凋亡外在與內在路徑 -----	6
圖五 內質網壓力 (ER stress) 誘導細胞凋亡之機制 -----	7
圖六 AKT 抑制細胞凋亡之機制 -----	9
圖七 AKT 調控 BAD 之機制 -----	10
圖八 Calcineurin 調控 BAD 之去磷酸化作用 -----	11
圖九 本研究實驗流程圖 -----	17
圖十 魚藤素對 NCI-H460 細胞株之細胞型態的影響 -----	34
圖十一 魚藤素對 NCI-H460 細胞株之細胞存活率的影響 -----	35
圖十二 魚藤素對 NCI-H460 細胞株之細胞生長抑制的影響 -----	36
圖十三 魚藤素誘導 NCI-H460 細胞株之早期細胞凋亡現象 -----	37
圖十四 魚藤素對 NCI-H460 細胞之染色體凝集現象 -----	38
圖十五 魚藤素對 NCI-H460 細胞之 DNA 斷裂現象 -----	39
圖十六 魚藤素對 NCI-H460 細胞之 DNA 受損現象 -----	40
圖十七 魚藤素對 NCI-H460 細胞之粒腺體膜電位的影響 -----	41
圖十八 粒腺體內在路徑之凋亡相關蛋白表現變化 -----	43
圖十九 魚藤素對 NCI-H460 細胞內 AIF 的表現與轉位 -----	44
圖二十 魚藤素對 NCI-H460 細胞 caspase-3 活性的影響 -----	45
圖二十一 凋亡蛋白酶抑制劑對魚藤素誘發 NCI-H460 細胞凋亡現象之 存活率變化 -----	46
圖二十二 魚藤素對 NCI-H460 細胞內鈣離子 (Ca^{2+}) 濃度之影響 ----	47
圖二十三 Bad 促凋亡蛋白表現量變化 -----	48

圖二十四 魚藤素對 NCI-H460 細胞內 Bad 的表現與轉移之影響 ----49
圖二十五 PI3K/AKT 路徑相關蛋白之表現量 -----50
圖二十六 魚藤素對 NCI-H460 細胞 p-AKT (Ser473) 之活性分析-----51
圖二十七 魚藤素誘導人類非小細胞肺癌 (NCI-H460) 細胞凋亡路徑 -56



第一章 前言

第一節 研究背景

一、肺癌 (Lung cancer) 之介紹

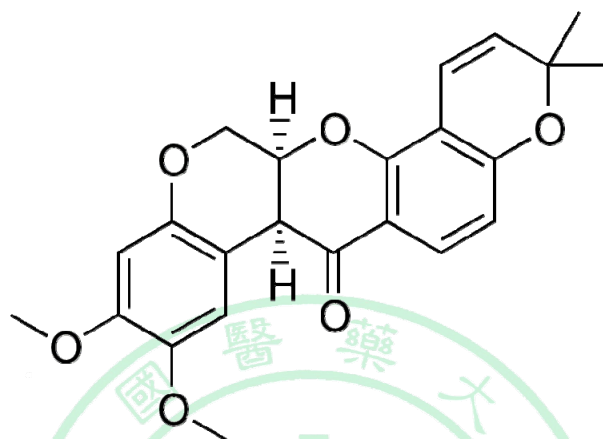
世界各國肺癌的發病率和死亡率急劇上升，台灣地區的危險度較他國偏高，尤以女性及年輕男性患者增加最為顯著。根據行政院衛生署統計，民國 98 年十大主要癌症順位與死亡人數占率分別為：(1) 氣管，支氣管和肺癌 19.9%，(2) 肝和肝內膽管癌 19.4%，(3) 結腸，直腸和肛門癌 11.4%，(4) 女性乳房癌 4.0%，(5) 胃癌 5.7%，(6) 口腔癌 5.6%，(7) 前列腺(攝護腺) 癌 2.3%，(8) 食道癌 3.7%，(9) 胰臟癌 3.7%，(10) 子宮頸及部位未明示子宮癌 1.6%¹。從以上統計資料可顯示，肺癌已成為惡性腫瘤中居首位之死亡因素，且其死亡率增加最快²。

肺癌的成因不是單一因素，而是多因素的影響所造成的：如抽菸，二手菸，家族史，曝露於環境中之致癌物質³。肺癌形成的過程中，最早由致癌因子引發基因受損導致形成癌細胞的時間相當漫長，但是一旦繁衍成一群癌細胞群時，其擴散速度就非常快，且此時期的治療效果不佳。

肺癌分為兩大類型：小細胞肺癌及非小細胞肺癌。小細胞肺癌多好發於男性，抽菸為其中之主要因素，占全部肺癌的 12% 至 25%，小細胞肺癌生長速度快，且容易擴散轉移至其他器官；非小細胞肺癌較小細胞肺癌常見，占全部肺癌的 75% 至 88%，其中又包括腺癌 (adenocarcinoma)，鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma) 以及大細胞肺癌 (large cell carcinoma)，非小細胞肺癌其擴散和轉移的速度也較慢⁴。在臨床上，治療小細胞肺癌的第一線治療是以化療為主⁵，而對化學敏感度低的非小細胞癌而言，其唯一根治的辦法即是將腫瘤完全切除⁶，但是此方法僅限於肺癌早期 (第一期，第二期，第三期早期) 的病患。然而由於肺癌的轉移能力強，因此就算將腫瘤切除，但即有可能在手術前，癌細胞

就已轉移至其他器官，所以要改善肺癌的治癒率，局部和全身性治療皆很重要。

二、魚藤素 (Deguelin) 之介紹



圖一 魚藤素 (deguelin) 結構式

魚藤屬於豆科，魚藤屬，最早出自於《福建民間草藥》，學名為 *Derris trifoliata Lour*，別稱有：毒魚藤，箕藤，臺灣魚藤，三葉魚藤，水藤⁷。

魚藤生於河岸，溼地，沿海路邊，濱海或攀附於海邊礁石上，主要分佈於台灣，中國，印度，馬來西亞等地，而在臺灣常見於恆春半島，蘭嶼，小琉球海岸叢林邊緣⁸。

自古以來，魚藤即被居民廣泛利用於毒魚，《臺灣通史》記載「魚藤：葉並生，性毒，服之死。鄉人用以毒魚。」早期台灣在鄉間大小溪流皆清澈有魚，許多人會採取魚藤的根部或莖，以石頭打碎，絞出汁液混入在溪水中，使毒液在溪中漂流，不久，下游的魚類，被毒液麻痺而失去活力，魚肚翻白易於捕捉，對蝦則沒有作用，毒液流過之後，未死亡的魚類會逐漸甦醒，由於汁液量有限，影響河段不長⁹；另外魚藤其最具毒性的根和莖可提製農藥用殺蟲劑，搗汁取用作蔬菜害蟲之除蟲劑可作成農用殺蟲劑；藥用方面若將魚藤溶於肥皂水中，應用於外用洗滌，塗

皮膚病和毒蟲咬傷¹⁰。

魚藤植物的內含物有魚藤酮 (Rotenone), 魚藤素 (Deguelin), 灰葉素 (Tephrosin), 異灰葉素 (Toxicarol)。其中以魚藤酮的毒力最強, 魚藤素次之, 其餘極弱。根據文獻記載, 魚藤酮對昆蟲及魚類之毒性很強, 水中含三十五萬分之一即可殺死魚類, 然而對哺乳動物和人類之毒性很小, 對人類的致死劑量為 3.6~20g。犬靜脈注射致死量為 0.5 mg/kg, 而口服則需加大 600 倍, 一般口服 0.2 g/kg 不致引起死亡。魚藤口服毒性似乎比魚藤酮強, 尤其莢果有大毒, 可能與其中所含的其它有毒成分有關¹¹。

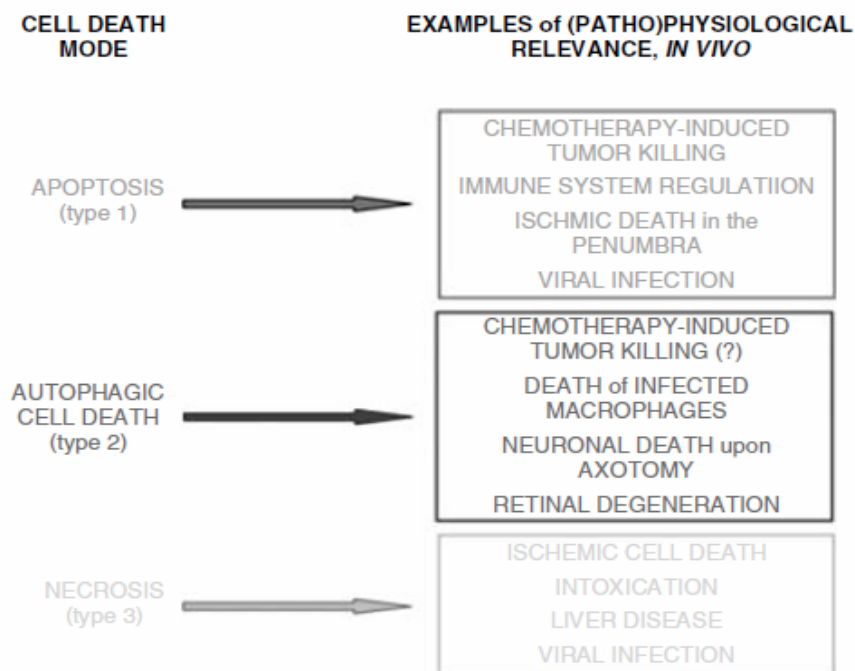


圖二 魚藤葉, 花, 果實之型態¹²

中草藥在中國已有幾千年歷史, 這些經先人口耳相傳的天然植物, 其療效經現代科學證實後, 已開發出許多受矚目的藥物及保健品, 例如紫杉醇, 銀杏等。在臨床治療上也有許多癌症病人除了化學療法外, 另以傳統中草藥作為輔助療法, 以期降低化療之副作用。許多研究指出中草藥材將是未來藥物的重要來源, 若經實驗證實能達到有效的抗癌作用, 則是研究癌症治療藥物的重要發展之一。在過去的研究顯示, 魚藤素對肝癌, 血癌, 乳癌以及口腔癌細胞具有腫瘤毒殺性和誘發癌細胞 DNA 受損導致細胞週期停滯之特性¹¹⁻¹³, 除此之外, 魚藤素亦可抑制癌細胞的生長及轉移, 最後導致癌細胞走向細胞凋亡, 達到抗癌的效果^{14, 15}。

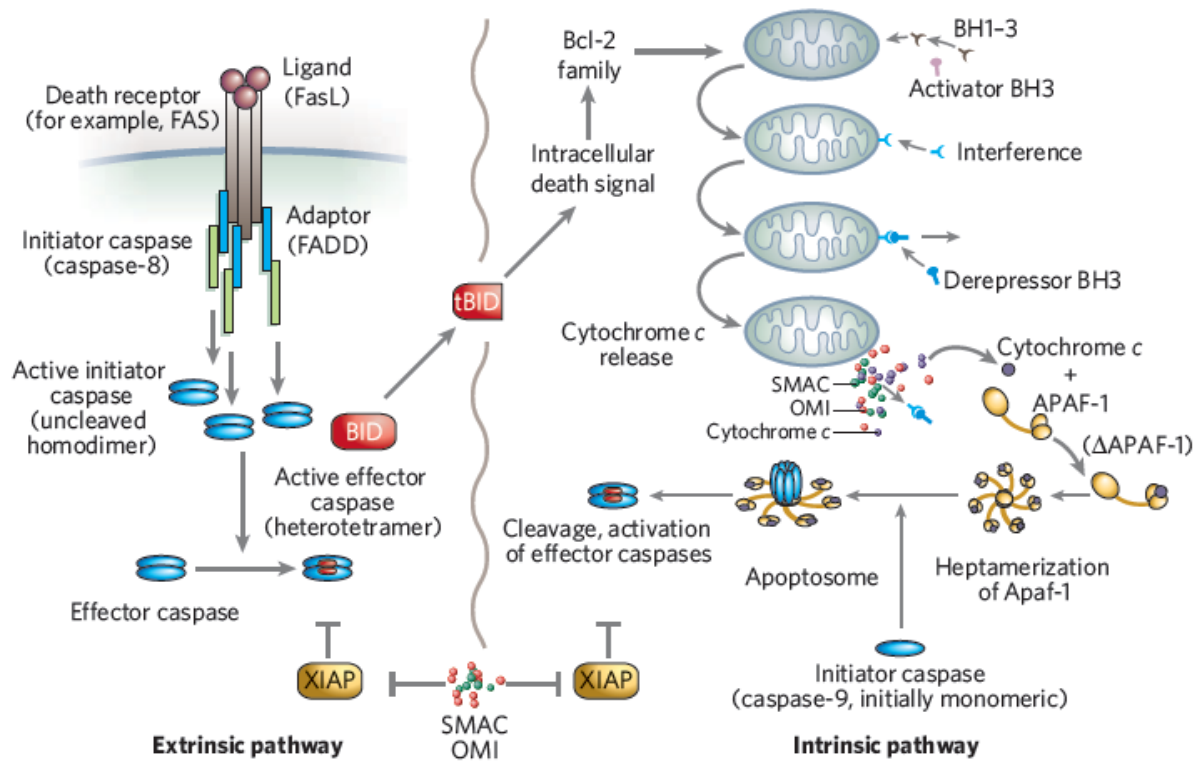
三、細胞凋亡之介紹

細胞的死亡主要有三種方式：細胞凋亡 (Apoptosis) , 細胞自噬 (Autophagy) 以及細胞壞死 (Necrosis) 。細胞凋亡 (apoptosis) 希臘文之原意「秋葉脫落」, 與一般病理學家所謂細胞壞死截然不同。細胞壞死, 是細胞受到細胞外的物理或化學因素, 造成細胞損傷而致死亡; 而細胞凋亡是細胞受到外來或內生性的因子影響, 產生細胞計畫性死亡 (Programmed cell death, PCD) 的基本調節機制。細胞凋亡常常發生在單一細胞或是一小群細胞群落, 進行凋亡的過程非常快速, 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, 相較於細胞壞死, 較不易被組織學方法觀察到。基本上, 細胞凋亡的過程分成四個部分: 一, 引發細胞凋亡的細胞內訊息傳遞; 二, 控制並整合細胞內訊息; 三, 執行細胞凋亡; 四, 移除凋亡細胞。細胞死亡三種方式特徵為下表:



圖三 細胞死亡的三種方式¹⁶

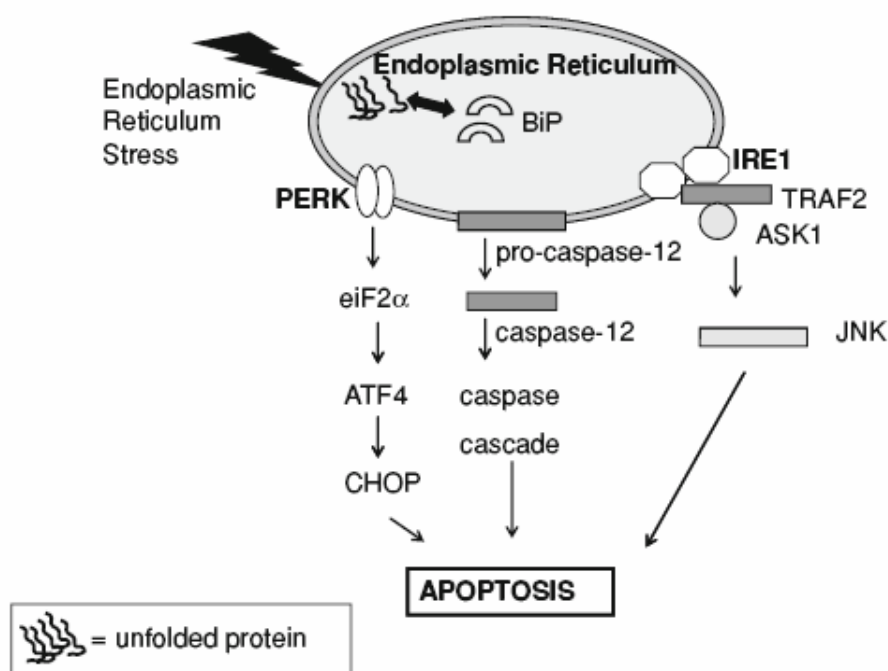
引起細胞凋亡的途徑主要分為外在路徑 (Extrinsic pathway), 內在路徑 (Intrinsic pathway) 以及內質網壓力 (Endoplasmic reticulum stress, ER stress)¹⁷。內在路徑是藉由粒線體或內質網所引起的一連串反應^{18, 19}。其中最重要調節者的為 Bcl-2 蛋白家族²⁰, Bcl-2 蛋白家族根據功能又分為抑制凋亡蛋白 (anti-apoptosis) 與促進凋亡蛋白 (pro-apoptosis)。抑制凋亡蛋白有 Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 等, 而促進凋亡蛋白 Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-X_s, Bim 等。以粒線體路徑為例, 當細胞受到刺激時 Bax 會轉移至粒線體膜上引起膜電位下降, cytochrome *c*, AIF (apoptosis-inducing factor), Endo G (Endonuclease G) 會釋放到細胞質中。Cytochrome *c* 會誘發 caspase-9 的活性進而去活化下游的 caspase-3 蛋白並引起細胞凋亡²¹。另一方面, AIF 與 Endo G 會直接進入細胞核中對 DNA 進行裂解, 引起細胞凋亡²¹。外在路徑又稱為死亡接受路徑, 主要經由許多死亡接受體 (death receptor) 來傳遞訊息, 例如 Fas (CD95) 與 FasL 結合後, 啟動下游 Fas-associated death domain (FADD) 蛋白, 進而開啟 caspase-8, 活化下游 caspase-3, 或經由裂解 Bid, 走向粒線體相關路徑, 最終導致細胞凋亡。此外死亡接受器還有 tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor (TRAIL R1), TRAIL R2 (DR5)²²。



圖四 細胞凋亡外在與內在路徑²³

內質網最主要的功能為幫助蛋白質摺疊成穩定的結構和分泌蛋白質。而有研究指出，腫瘤組織內部往往缺乏氧氣和養分，導致細胞的內質網聚集大量折疊錯誤的蛋白質或造成鈣離子通透失衡，因而產生內質網壓力 (ER stress)¹⁹。細胞為因應此壓力而改變許多訊息傳遞和基因表現的現象，即稱為未折疊蛋白質反應 unfolded protein response (UPR)。參與 UPR 的相關蛋白包括：inositol requiring enzyme 1 (IRE-1), activating transcription factor-6 (ATF-6) 和 PKR-like ER kinase (PERK)¹⁹。當內質網產生壓力時，ATF-6 可當作一個轉錄因子 (transcription factor)，使伴隨蛋白 (chaperone) GRP78-HSP70, GRP94-HSP90 的表現量上升，幫助不完全蛋白的折疊。IRE-1 和 PERK 可藉由自我磷酸化，形成同質複體 (homodimer) 而活化，其中 PERK 可再藉由磷酸化 eIF-2，減緩轉譯作用，使新蛋白質無法合成；而 IRE-1 不但可調控伴隨蛋白的表現，亦可使未折疊蛋白降解移除²⁴。這些與 UPR 相關的蛋白質可以在許多惡性腫

瘤檢體中被偵測到，並且種類與含量跟其惡性程度，腫瘤轉移和抗藥性有關，因此可用於臨床檢測與治療上。目前此臨床應用分為兩種策略，一，阻斷幫助癌細胞存活的 UPR；二，引發過度的內質網壓力讓癌細胞無法承受而凋亡，例如，迫使鈣離子由內質網內釋放至細胞質中，進而引起粒線體功能喪失釋出 cytochrome *c*，開啟細胞凋亡途徑。



圖五 內質網壓力 (ER stress) 誘導細胞凋亡之機制^{25, 26}

四、AKT 訊息傳遞路徑

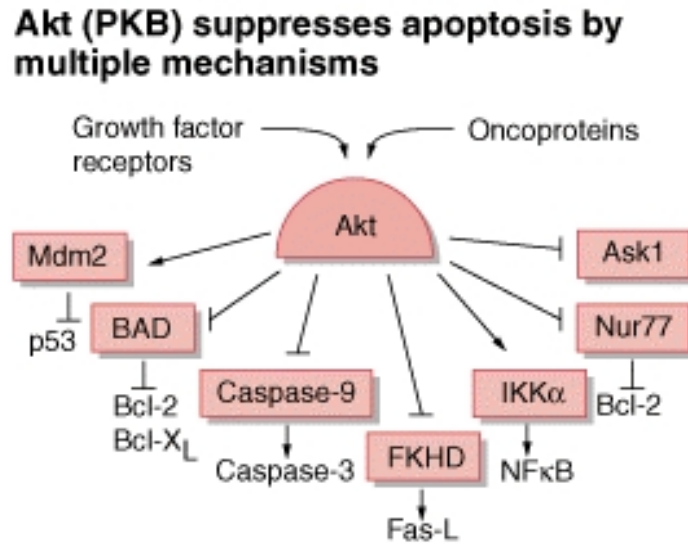
AKT 又稱作蛋白質激酶 B (protein kinase B, PKB)，為一種絲氨酸/蘇氨酸之蛋白質激酶 (serine/threonine protein kinase)，廣泛分佈於細胞質中²⁶，目前在哺乳類動物中存在有 AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) 以及 AKT3 (PKB γ) 三種異構型 (isoforms)^{26, 27}。當細胞受到生長因子刺激，例如：表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF)，神經生長因子 (nerve growth factor, NGF)，血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor;

PDGF) 與胰島素 (insulin) 等^{9, 28, 29}, AKT 激酶活性會被活化。研究發現 AKT 的活化主要藉由磷酸肌醇激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 來調控, 稱作 PI3K 依賴性路徑 (PI3K dependent pathway)。當生長因子與酪氨酸激酶受體 (receptor tyrosine kinase, RTK) 結合而活化磷酸肌醇激酶時, 磷酸肌醇激酶能夠將細胞膜中的磷酸肌醇 (Phosphoinositides/PtdIns) 磷酸化成 PtdIns3P, PtdIns(3,4)P₂ 及 PtdIns(3,4,5)P₃, 這些磷酸化的磷酸肌醇可與 AKT 結構上之 pleckstrin homology (PH) 區域結合^{30, 31}, 使位於 AKT 激酶區 P-loop 中第 308 絲胺酸 (Thr308) 及疏水端的第 473 絲胺酸 (Ser473) 被磷酸化, 其這兩個磷酸化位點具有調控 AKT 活性的能力³¹; 然而, 最近有研究指出 AKT 的活化可藉由 PI3K 非依賴性路徑 (PI3K independent pathway), 在人類乳腺上皮細胞, 發現 p38-MAPK 參與 AKT 磷酸化之調控, 在人類急性淋巴性血癌細胞中也發現了 AKT 的活化是透過 PI3K 非依賴性路徑¹⁵。因此推測 AKT 可透過不同蛋白之訊息傳遞路徑進而調控其他作用。

五、AKT 與細胞凋亡之關係

1977 年, Staal, S.P. 等人在老鼠身上發現一個具有轉形能力且與自發性淋巴瘤和血癌有關的病毒, 他們稱這段病毒 DNA 為 AKT8, AKT8 即稱為 v-AKT (viral oncogene AKT)³², 而後又發現 AKT8 可在裸鼠 (nude mice) 動物模式中引發癌症的形成, 尤其是胸腺淋巴瘤 (thymic lymphoma), 因此他們推測 AKT 具有致癌的潛力³³。而在近年來的研究報告顯示, 當 AKT 的調控出現問題時, 與人類惡性腫瘤的生成有關, 例如: 胃腺體癌 (gastric adenocarcinoma), 卵巢癌 (ovarian cancer), 乳癌 (breast cancer) 和甲狀腺癌 (thyroid cancer)³⁴⁻³⁶。AKT 在細胞中參與了許多生理作用包含: 醣類代謝 (glucose metabolism), 細胞生長 (cell growth), 細

胞增殖 (cell proliferation), 血管新生 (angiogenesis), 細胞凋亡 (apoptosis) 等³⁶⁻³⁸。



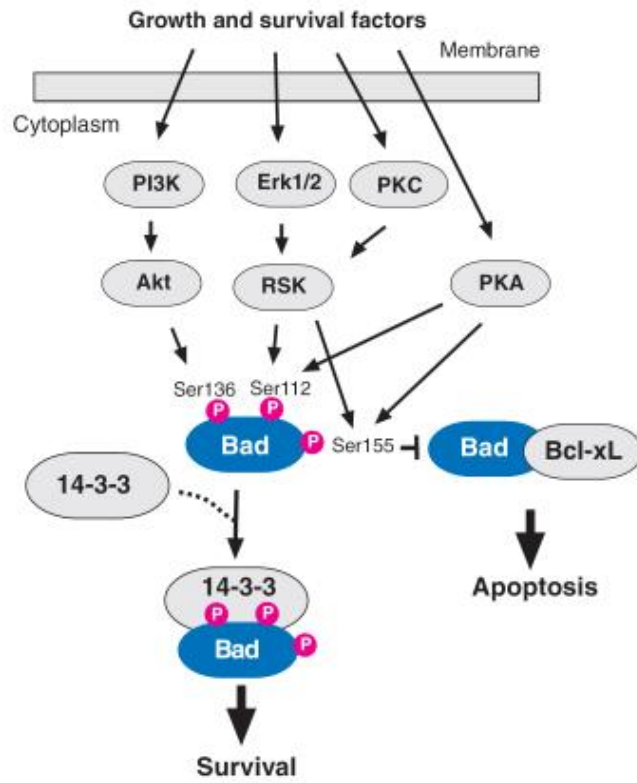
圖六 AKT 抑制細胞凋亡之機制³⁹

AKT 可藉由多種機制調控細胞凋亡，包括使 BAD, caspase-9 及 FKHD 轉錄因子之蛋白表現下降進而抑制細胞凋亡；或活化 NF-κB，而促進細胞存活^{34, 40, 41}。

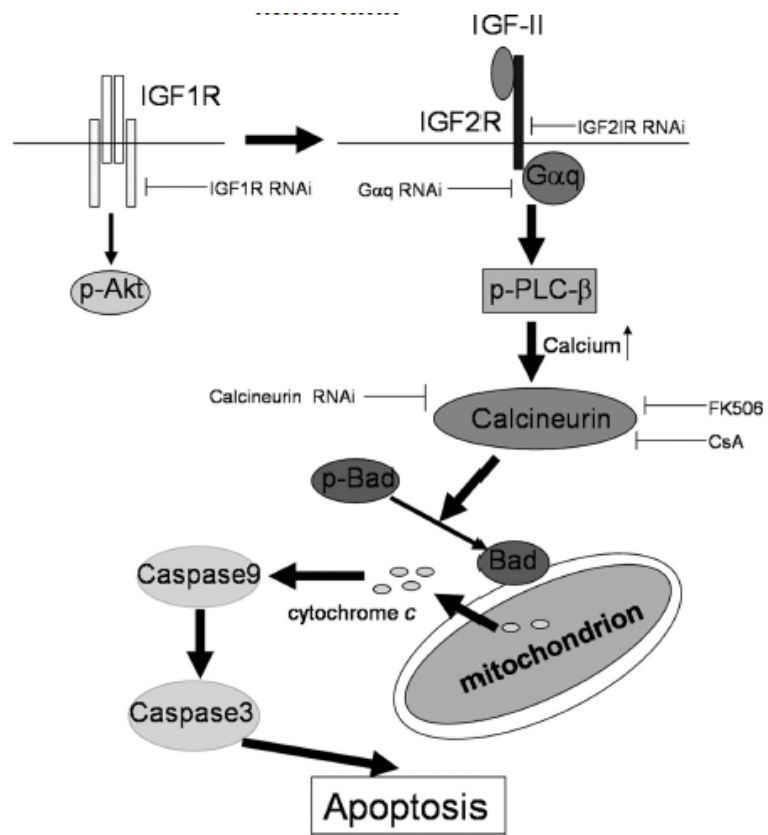
六、AKT 與 Bcl-2 蛋白質家族之關係

BAD 屬於 Bcl-2 蛋白質家族中之促凋亡蛋白 (pro-apoptotic protein)。細胞在正常情形下，AKT 能磷酸化 BAD 於 Ser136, Ser112 和 Ser155，造成 BAD 與 14-3-3 蛋白質結合以抑制 BAD 的活性，進而使細胞存活⁴²；但是，當 BAD 接收到凋亡信號 (apoptotic signal) 時，calcineurin 蛋白會伴隨著細胞內鈣離子的濃度的提高將 BAD 去磷酸化並釋放，使活化態的 BAD 從細胞質轉移至粒腺體膜上與 Bcl-2 或 Bcl-X_L 結合，進而抑制 Bcl-2 或 Bcl-X_L 的抗凋亡功能；此時位於粒腺體膜上之促凋亡蛋白形成

二聚體 (dimer) ，使粒線體膜上形成孔洞 (PT pore) ，將原位於粒線體膜內之 cytochrome c 從孔洞釋出，與 Apaf-1, dATP 及 caspase-9 結合形成凋亡體 (apoptosome) ，活化 caspase-3 ，傳遞凋亡訊息⁴²。



圖七 AKT 調控 BAD 之機制⁴³



圖八 Calcineurin 調控 BAD 之去磷酸化作用⁴⁴

第二節 研究目的

魚藤素 (deguelin) 對肝癌, 血癌, 乳癌以及口腔癌細胞具有腫瘤毒殺性和誘發癌細胞 DNA 受損導致細胞週期停滯之特性; 除此之外, 魚藤素亦可抑制癌細胞的生長及轉移, 誘發癌細胞走向凋亡, 達到抗癌的效果。目前應用中草藥物干擾癌細胞生長, 代謝, 增殖等過程, 最後誘導細胞凋亡, 已成為治療癌症之新途徑。因此本研究計畫主要以分子層次來研究魚藤素 (deguelin) 對人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株之凋亡作用機轉, 探討魚藤素是否能有效抑制肺癌細胞生長並誘發凋亡途徑, 達到抗癌的功效。



第二章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、細胞來源

本論文實驗所使用的細胞為人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株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. Deguelin, purity > 98% (HPLC) : 購自 Sigma
2. 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine 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. Annexin V-FITC apoptosis detection kit : 購自 BD
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 (Na_2HPO_4) : 購自 Merck
11. 10X TG-SDS buffer : 購自 Amresco
12. ELC kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amresco
13. Ethanol : 購自 TEDIA
14. Fetal bovine serum (FBS) : 購自 Invitrogen
15. Formaldehyde : 購自 Sigma Chemical Co.
16. Glycine : 購自 Amresco
17. L-Glutamine : 購自 Invitrogen
18. Low melting agarose (LMA) : 購自 USB

19. Methanol : 購自 TEDIA
20. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) : 購自 Amresco
21. N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) : 購自 Amresco
22. Normal melting agarose (NMA) : 購自 USB
23. Penicillin-Streptomycin (PS) : 購自 Invitrogen
24. Phenethyl isothiocyanate : 購自 Sigma Chemical Co.
25. PhiPhi Lux® kit : 購自 OncoImmulin (Gaithersburg, MD, USA)
26. CaspaLux8® kit : 購自 OncoImmulin (Gaithersburg, MD, USA)
27. CaspaLux9® kit : 購自 OncoImmulin (Gaithersburg, MD, USA)
28. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
29. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) : 購自 Merck
30. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
31. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
32. Protein extraction solution (PRO-PREP) : 購自 iNtRON Biotechnology, Inc.
33. Protein marker : 購自 Fermentas
34. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amresco
35. RPMI-1640 medium : 購自 Invitrogen
36. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck
37. Sodium dodecyl sulfat (SDS) : 購自 Amresco
38. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) : 購自 Amresco
39. Triton X-100 : 購自 Sigma Chemical Co.
40. Trypan Blue : 購自 Sigma Chemical Co.
41. Trypsin-EDTA : 購自 Sigma Chemical Co.
42. Tween-20 : 購自 Amresco
43. 顯影劑 : 購自 Kodak

44. 定影劑：購自 Kodak
45. AKT kinase kit: 購自 Cell Signaling Technology
46. Primary antibody (1° antibody)
- (1) Anti- β actin：購自 Sigma Chemical Co.
 - (2) Anti-AIF：購自 BD
 - (3) Anti-Apaf-1：購自 Calbiochem
 - (4) Anti-Bad：購自 Cell Signaling Technology
 - (5) Anti-p-Bad：購自 Cell Signaling Technology
 - (6) Anti-Bax：購自 upstate
 - (7) Anti-Bcl-2：購自 biovision
 - (8) Anti-Bid：購自 Chemicon
 - (9) Anti-Caspase-3：購自 Sigma Chemical Co.
 - (10) Anti-Caspase-9：購自 biovision
 - (11) Anti-Caspase-8：購自 biovision
 - (12) Anti-p53: 購自 Cell Signaling Technology
 - (13) Anti-PI3K p110: 購自 biovision
 - (14) Anti-PI3K p85 α : 購自 biovision
 - (15) Anti-AKT: 購自 biovision
 - (16) Anti-p-AKT (Thr308): 購自 Millipore
 - (17) Anti-p-AKT (Ser473): 購自 Millipore
 - (18) Anti-cytochrome *c*：購自 biovision
 - (19) Anti-Bcl-X: 購自 Cell Signaling Technology
47. Secondary antibody (2° antibody)
- (1) Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody:
購自 Chemicon
 - (2) Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody:

購自 Chemicon

(3) Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody:

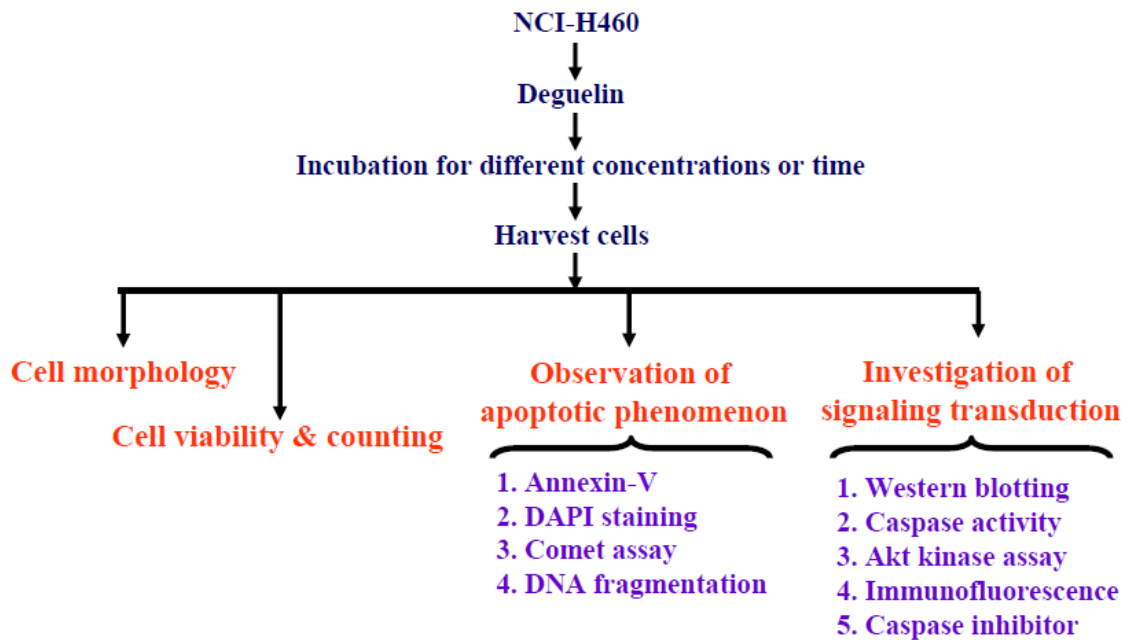
購自 Chemicon

三、儀器設備

1. 無菌操作臺，細胞培養皿，細胞培養箱，冷凍管，恆溫離心機，血球計數板，倒立式顯微鏡，Dispenser，1.5/ 15/ 50 ml 離心管，Pipetmen。
2. 去離子水製造機，電源供應器，酸鹼值測定器 (pH meter)，PVDF membrane，震盪器，SDS-PAGE 電泳槽套組，Transfer Cell Bolt Kit 加熱板。
3. 流式細胞儀，高速離心機，酵素免疫分析儀，單細胞電泳槽。



第二節 實驗方法



圖九 本研究實驗流程圖

一、藥品配製

Deguelin 為固體粉末藥物，分子量為 394.42，純度為 98% 以上。利用 DMSO 為溶劑配製成 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、人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株培養與繼代

NCI-H460 細胞株所使用之培養基為 RPMI-1640，額外添加胎牛血清 (FBS)，抗生素 (PS) 與 L-Glutamine，使細胞培養基最終含有 10% FBS, 1% PS 與 2 mM L-Glutamine，培養於 5% CO_2 , 37°C 之環境。由於 NCI-H460 細胞株為貼附型細胞，因此每次繼代或分盤時需要利用 Trypsin-EDTA 將細胞懸浮。首先利用磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline,

PBS) 清洗細胞，再加入 0.5 mg/ml Trypsin-EDTA，等待 3~5 分鐘，當細胞完全懸浮時，加入培養基以終止 Trypsin-EDTA 的反應。離心 1500 rpm，5 分鐘，完成後去除上清液，加入培養基稀釋細胞，取出稀釋後的細胞種至新的培養瓶中完成繼代培養。

三、細胞冷凍保存

NCI-H460 細胞株大量培養後，當細胞處於生長旺盛與存活率高之條件下進行細胞冷凍保存。細胞收集完成，加入與 FBS 混和配製成含有 5% DMSO 之抗凍劑，最後將細胞分裝於冷凍小管中，分別依序按照以下步驟進行降溫，4°C 存放 30 分鐘，-20°C 存放 60 分鐘，最後於 -80°C 存放至隔夜後在移至液態氮桶中保存。

四、冷凍細胞活化

解凍細胞的過程以快速為原則，避免冰晶的產生與濃度過高之 DMSO 對細胞產生傷害。將細胞從液態氮桶中取出後，以 37°C 水浴槽快速回溫。待溶解後加入培養基，利用離心作用將抗凍劑去除，離心完成後，移去上清液加入新鮮培養基，種細胞於培養瓶中並於隔日更換新的培養基。

五、細胞存活率分析⁴⁵

實驗原理：

Propidium iodide (PI) 是一種核酸染劑，會與 DNA 雙股螺旋中之 A=T, C≡G 鍵結的氫鍵 (hydro bond) 結合。當細胞死亡時，其細胞膜會失去完整性，使得 PI 可進入細胞內與核酸結合；相反之，存活的細胞因其細胞膜完整，因此 PI 無法進入細胞內與核酸結合。經 PI 染色完成的細胞可利用流式細胞儀偵測，死亡的細胞會呈現較強紅色螢光，然而存活

的細胞則呈現較弱紅色螢光。

實驗方法：

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附後加入不同濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 48 小時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管，完成離心後，除去上清液，加入 PI 染劑，均勻混合後利用流式細胞儀進行樣品分析。樣品之活細胞與死細胞數量及比率，利用 CellQuest[®] 軟體分析。

六、細胞生長抑制分析⁴⁶

實驗原理：

利用 Trypan blue 染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因細胞膜完整，染料無法滲入而不會呈色，藉此來分辨出活細胞與死細胞，再配合血球計數盤以倒立式位像差顯微鏡觀察便可以計算出活細胞數。

實驗方法：

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附後加入 250 nM 濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 0, 24, 48, 72 小時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管。完成離心後，除去上清液，加入 10 ml 培養基於細胞懸浮液中。最後取 10 ml 細胞液與 90 ml Trypan blue (0.4% w/v trypan blue) 溶液，混合均勻後以血球計數板計算 0, 24, 48, 72 小時之活細胞數目。

七、細胞染色質凝集現象⁴⁷

實驗原理：

DAPI (4- 6-diamidino-2-phenylindole) 是一種可與 DNA 上的小溝 (minor groove) AT 區域結合之核酸螢光染劑。細胞凋亡時會出現染色質凝集 (chromosomes condensation) 與 DNA 斷裂 (DNA fragmentation) 的現象。當凋亡現象越嚴重，DNA 斷裂也越嚴重，minor groove 暴露出來之 AT 區域也就越多，則可結合上更多 DAPI 染劑，在螢光顯微鏡下所觀察到的白色亮點螢光強度就會越強

實驗方法：

將 NCI-H460 細胞株以 2×10^4 cells/ml 的濃度種於 6 孔培養盤中，待細胞貼附後加入不同濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 48 小時，利用 4% Formaldehyde 固定細胞，PBS 清洗完成，加入 0.1% Triton X-100 1 ml 反應。最後，加入 DAPI 染劑於室溫下進行避光反應，利用螢光顯微鏡以 UV 光激發 DAPI 螢光並觀察照相。

八、DNA 膠體電泳分析 (DNA gel electrophoresis)⁴⁸

實驗原理：

細胞凋亡時會伴隨 DNA 斷裂現象的發生，其細胞核內 DNA 會裂解成 180~200 bp (base pair)。因此純化 DNA 後，經電泳跑膠，觀察 DNA 斷裂現象。若有 DNA 斷裂情形，其膠體經 UV 照射後會呈現階梯狀 (ladder)，可藉由 DNA marker 來得知其斷裂鹼基對，判斷是否為細胞凋亡之特徵。

實驗方法：

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，細胞貼

附後利用不同濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 48 小時，利用 Tissue and Cell Genomic DNA Purification Kit (Gene Mark) 純化 DNA。將上清液收至離心管中，加入 PBS 清洗細胞，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至離心管。完成離心後，去除上清液，加入 200 μ l PBS 混合細胞後移至 1.5 ml eppendorf，加入 48 μ l RNase A (10 mg/ml)，靜置室溫 5 分鐘後，加入 20 μ l Proteinase K 和 200 μ l Binding buffer，混和均勻放入 70°C 乾浴鍋作用 10 分鐘，反應完成加入 200 μ l Ethanol 並移至 spin column，高速離心 13000 rpm，1 分鐘；丟棄液體，加入 300 μ l Binding buffer，高速離心；丟棄液體，加入 600 μ l Washing solution，高速離心；丟棄液體，加入 600 μ l Washing solution，高速離心 5 分鐘；丟棄液體，並更換已去上蓋之新 1.5 ml eppendorf，放入 55°C 烘箱 3~5 分鐘，藉以揮發殘留 Ethanol；將 Elution Solution 預熱至 70°C，每個樣品加入 60 μ l Elution solution 後，高速離心 1 分鐘，其液體內含 DNA。將樣品與 6X DNA loading dye 以 5:1 比例混勻，注入至 2% agarose (1g agarose, 50 ml 0.5X TBE buffer, 10 μ l Ethidium bromide) 膠體，以 100 V 進行電泳跑膠，完成後將膠體放至 UV 下照射拍照。

九、彗星試驗 (Comet assay)⁴⁹

實驗原理:

彗星試驗又稱作單細胞電泳分析 (Single cell gel electrophoresis assay)，可用來分析及定量 DNA 受損的程度，屬於一種簡單、快速以及敏感性高的技術。當 DNA 受損後發生斷裂，藉由電泳之方式將斷裂 DNA 拖出膜外，之後加以染色。DNA 受損越嚴重，拖尾現象越明顯，由此可藉由拖尾的長短，觀察 DNA 損傷程度。

實驗方法:

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附加入不同濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 48 小時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮。待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管，完成離心後，除去上清液，加入 1 ml PBS，將細胞移至 1.5 ml eppendorf，經高速離心後去上清液打散細胞，加入 100 μ l PBS (體積依細胞數多寡調整)，放置冰上備用。接著配製上層膠 (0.5% LMA) 與下層膠 (0.5% LMA + 0.5% NMA)，以微波溶解並置於 55°C 水浴鍋保溫。取 70 μ l 下層膠至於載玻片上，蓋玻片以 45° 斜角慢慢蓋上以防氣泡，待膠凝固後去除蓋玻片。取 10 μ l 細胞懸浮液與 60 μ l 上層膠混合均勻，加在下層膠之上，蓋上蓋玻片，待膠凝固後去除蓋玻片。此時將載玻片浸入配製好的 lysis buffer 中，反應 1 小時後，移至 alkaline buffer 中反應 20 分鐘。將電泳槽置於冰上，以 alkaline buffer 為電泳緩衝液，進行電泳 30 分鐘 (25 V ; 300 mA)。電泳結束後，將載玻片移至 0.4 M Tris buffer 作用 5 分鐘，使 pH 值回到中性，再以甲醇脫水 5 分鐘，避免水分干擾染劑作用，最後加入 40 μ l PI 染劑，以螢光顯微鏡進行觀察。

試劑配製：

表一 Alkaline buffer (pH=13)

組成	重量 (g)
NaOH	12 g
EDTA	0.347 g
DDW	將體積定量至 1000 ml

表二 Lysis buffer (需新鮮配製，pH=8~10)

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

表三 Tris buffer (0.4 M，以 HCl 調整 pH=7.5)

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

十、Annexin V affinity assay⁵⁰

實驗原理：

細胞進行程式性死亡-細胞凋亡 (apoptosis) 時，phospholipid phosphatidylserine (PS) 會從細胞膜內層向外轉移至外層，由於 Annexin V 為一種具有鈣離子依存性的磷脂質，它會與 PS 具有高度的專一性，因此當在 Annexin V 上標記螢光物質時，便可偵測 PS 外翻的情形，同時搭配 Propidium Iodide (PI) 染劑，透過雙染模式區別凋亡與壞死細胞。

實驗方式：

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附後加入 250 nM 濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 0, 24, 30, 36, 48 小

時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管，離心完成去除上清液，加入 5 μ l Annexin V-FITC 與 5 μ l PI，均勻混合後置於室溫避光反應 15 分鐘。完成後加入 400 μ l 1X binding buffer 終止反應，利用流式細胞儀進行樣品分析。樣品之螢光比率以 CellQuest[®] 軟體分析。

十一、粒腺體膜電位 (Mitochondrial membrane potential, $\Delta \Psi_m$) 之檢測⁵¹

實驗原理:

在活細胞中，粒線體內膜電位較高，此時粒線體內膜間會充滿 H^+ ，致使膜電位探針 DiOC₆ (3-3-Dihexyloxacarbocyanine iodine) 穿透細胞膜，專一性結合於活細胞之粒腺體表面，此時利用流式細胞儀測得之螢光亮度也越強；反之，細胞凋亡的過程中，粒腺體上由多個蛋白組成之通透性轉變通道 (PT pore) 打開，使得粒腺體內膜通透性改變，造成粒腺體內膜 H^+ 梯度下降，相對結合的 DiOC₆ 變少螢光強度變弱。其螢光強度的改變可反映出細胞膜電位 (mitochondrial membrane potential) 改變的情形。

實驗方法:

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附後加入 250 nM 濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 0, 12, 24, 36, 48 小時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管，離心完成去除上清液，加入 DiOC₆，混合均勻於 37°C 水浴槽反應 30 分鐘後，利用流式細胞儀進行樣品分析。樣品之螢光量以 CellQuest[®] 軟體分析。

十二、鈣離子 (Ca^{2+}) 釋出之檢測⁵²

實驗原理:

細胞內鈣離子可作為細胞信號傳遞的分子，是細胞啟動過程中重要的功能因子。將螢光染劑 Fluo-3/AM 導入細胞後，在細胞內被內生性的 (endogenous esterases) 水解 (hydrolyze) 成 Fluo-3，Fluo-3 能滯留在細胞內並跟鈣離子具有專一性的結合力。隨著細胞內鈣離子濃度的改變，而散發出不同強度的螢光，故可利用流式細胞儀偵測螢光強度而得知鈣離子濃度的相對值。

實驗方法:

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附後加入 250 nM 濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 0, 12, 24, 36, 48 小時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管，離心完成去除上清液，加入 Fluo-3/AM，混合均勻於 37°C 水浴槽反應 30 分鐘後，利用流式細胞儀進行樣品分析。樣品之螢光量以 CellQuest[®] 軟體分析。

十三、Caspase-3 活性分析⁵⁰

實驗原理:

利用 Caspase-3 substrate (PhiPhiLux-G₁D₂) 來檢測凋亡蛋白 caspase-3 之活性。PhiPhiLux- G₁D₂ 基質是種含有螢光物質之胺基酸序列 (amino acid sequence)，當 caspase-3 具有活性時，可裂解胺基酸序列之特定位置，使得內含之螢光物質釋放出來，如此可利用流式細胞儀分析螢光含量得知 caspase-3 活性。

實驗方法:

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/ml 的濃度種於 12 孔培養盤中，待細胞貼附後加入 250 nM 濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 0, 12, 24, 36, 48 小時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管，離心完成去除上清液，加入 Caspase-3 substrate (PhiPhiLux-G₁D₂)，混合均勻於 37°C 水浴槽反應。反應完成，加入 Flow Cytometer Buffer，利用流式細胞儀進行樣品分析。樣品之螢光量以 CellQuest[®] 軟體分析。

十四、西方墨點法 (Western blotting)⁵³

實驗原理:

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

實驗方法:

(一)、蛋白質萃取 (protein extration)

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/dish 的濃度種於培養皿中，待細胞貼附後加入 250 nM 濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 0, 12, 24, 36, 48 小時，將上清液收至離心管，加入 PBS 清洗細胞，利用 Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，待細胞懸浮後加入 1 ml 培養基中和反應並將細胞收至離心管，離心完成去除上清液，加入 400 μ l 的 Lysis buffer (PRO-PREP for Cell/Tissue)，細胞混合後置於 -20°C 冰箱，24 小時後以高速離心取其上清液至 1.5 ml eppendorf 進行蛋白質定量。

(二)、蛋白質定量分析

Bradford 定量法，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 與標準品和樣品混合。混合均勻後，取至 96 孔培養盤利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 以波長 O.D.595 nm 測量其吸光值，並以標準品之數據做出標準曲線 (standard curve)，並求出標準曲線的回歸方程式與 R^2 值，之後將樣品吸光值帶入回歸方程式並得知蛋白質濃度。

(三)、SDS-PAGE 分析

(1) 膠片製作與電泳分析：將配置完成下層膠 Separation gel 注入鑄膠台中，以 isopropanol 去除氣泡並壓平下膠，靜置約數分鐘，待下膠層凝固。之後注入上層膠 (Stacking gel) 並插上齒梳 (comb)，避免氣泡產生，待上層膠凝固後，將鑄好的膠體放置於電泳槽中，加入電泳緩衝液 (1X TG-SDS buffer)，接著將萃取出蛋白依定量後之體積與 5X protein loading dye 混合，並以 95°C 乾浴加熱 10 分鐘使蛋白質變性。完成後依序將標示標準分子量的 Marker 及各樣品注入孔槽中，通以電壓 80 volts，待樣品通過 stacking gel 後，電壓調為 110 volts，繼續電泳直到染劑到達底端並停止。

(2) 轉漬

將轉漬夾打開後，黑色面朝下，將海綿墊片以 transfer buffer 潤濕並鋪在黑夾上，放入 3M 濾紙，裁剪下層膠 (Separation gel) 中所要之轉漬區域後，將 SDS-PAGE gel 小心擺放於 3M 濾紙上，依序放上 PVDF membrane (PVDF membrane 必須先以甲醇潤濕脫水)，3M 濾紙和海綿墊片，完成後即可把整個轉漬夾裝好，置入已裝有 transfer buffer 的電泳槽中。電泳槽外圍放置足夠碎冰，使整個系統維持低溫狀態，以 400 mA, 2 小時之條件進行蛋白質轉漬。

(3)、影像呈現

轉漬完成後，以麗春紅 (Poncean S) 染劑染色，可看出蛋白質轉漬至膜上的情形。用 0.1% TBST 清洗蛋白質轉漬膜至紅色褪去，加入 blocking buffer (5% Fat free milk in TBST) 於室溫搖晃 2 小時，可使膜上面未轉漬上蛋白的部分填滿酪蛋白以防抗體之非專一性結合。之後加入一級抗體，放置 4°C 搖晃；隔天，回收一級抗體並以 0.1% TBST 清洗轉漬膜後加入二級抗體，於室溫下搖晃 1 小時，最後取出轉漬膜，將其與 ECL kit 中之試劑混合液反應，並將轉漬膜夾於透明投影片中以感光底片顯影之。

試劑配製：

表四 SDS-PAGE 下層膠 (Separating gel) 之配製及組成

組成	10% Separating gel (四片量)	12% Separating gel (四片量)
DDW	9.6 ml	8.6 ml
40% Acryamine/Bis (29:1)	5 ml	6 ml
1.5 M Tris (pH=8.8)	5 ml	5 ml
10% SDS	0.2 ml	200 μ l
10%APS	0.2 ml	200 μ l
TEMED	20 μ l	15 μ l

表五 SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel) 之配製及組成

組成	5% Stacking gel (四片量)
DDW	4.06 ml
40% Acryamine/Bis (29:1)	1.02 ml
1.5M Tris (pH=8.8)	1.66 ml
10% SDS	66 μ l
10% APS	33.4 μ l
TEMED	15 μ l

表六 1.5 M Tris-HCl, pH=8.8

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

表七 0.5 M Tris-HCl, pH=6.8

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

表八 電泳緩衝液 (Electrophoresis running buffer) 之組成

組成	體積
10 X TG-SDS buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)	200 ml
加 DDW 將總體積定量至 2000 ml	

表九 轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 之組成

組成	重量 (g)
Tris	4.5 g
Glycine	21.6 g
Methanol	300 ml
加 DDW 將總體積定量至 1500 ml	

表十 10X TBS之組成。配製成 1X TBST = 100 ml of TBS 10X + 900 ml DDW + 1ml Tween-20

組成	重量 (g)
Tris	24.23 g
NaCl	80.06
DDW	800 ml
HCl	調整至 pH=7.6
加 DDW 將總體積定量至 1000 ml	

十五、免疫螢光染色 (Immunofluorescence Staining)⁵⁴

實驗原理:

利用抗體專一性，以一級抗體送入細胞內結合所需偵測的蛋白質，藉由二級抗體連接 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光的方式，使標定蛋白產生螢光，接著使用不同的螢光染劑標記細胞內胞器，如：細胞核，粒線體。藉由共軛焦顯微鏡 (Confocal microscope) 觀察細胞表現量的差異，以及將兩種不同的螢光個別拍照，最後將兩者疊合觀察蛋白是否有轉位 (translocation) 的現象發生，進行控制組與實驗組的比較。

實驗方法:

NCI-H460 細胞株以 1×10^4 cells/dish 種植在載玻片上培養，並以 250 nM 魚藤素 (deguelin) 處理 24, 48 小時。取出載玻片利用甲醇固定細胞，再以 0.1% Triton X-100 作用 15 分鐘增加細胞通透性，反應後用 PBS 清洗，加入一級抗體。隔天，加入二級抗體 (需避光)，最後依需要加入不同胞器之螢光染劑，封片膠將其封片，利用共軛焦顯微鏡觀察細胞內蛋白質相對分佈的位置。

十六、p-AKT 活性分析⁵⁵

實驗原理:

AKT 又稱作蛋白質激酶 B，為一種絲氨酸/蘇氨酸之蛋白質激酶，廣泛分佈於細胞質中，目前存在有 AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) 以及 AKT3 (PKB γ) 三種異構型。當細胞受到生長因子刺激，例如：表皮生長因子，神經生長因子，血小板衍生生長因子與胰島素等，AKT 激酶活性會被活化。AKT 在細胞中參與了許多生理作用包含：醣類代謝，細胞生長，細胞增殖，血管新生，細胞凋亡等。

實驗方法:

(1) 蛋白質萃取

NCI-H460 細胞株以 1×10^5 cells/dish 的濃度種於培養皿中，待細胞貼附後加入 250 nM 濃度之魚藤素 (deguelin)，等待 0, 12, 24, 36, 48 小時。反應時間終止，將培養基去除，以冰的 1X PBS 清洗細胞表面，加入 0.2 ml 1X Cell Lysis Buffer (20 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% TrionX-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -Glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 mM PMSF)，至於冰上 5 分鐘，將細胞自培養皿中刮下，移至 1.5 ml eppendorf，利用液態氮反覆回溫動作將細胞破碎，完成後以 14000 rpm 高速離心 10 分鐘，將上清液吸至新的 1.5 ml eppendorf。

(2) 免疫沉澱

取 200 μl 蛋白質樣本，加入 20 μl Immobilized phospho-AKT (Ser 473) Rabbit mAb (Bead conjugate) 於 4°C 環境中均勻搖晃 24 小時進行免疫沉澱反應。

(3) Kinase Assay

隔天，以高速離心除去上清液，用 0.5 ml Cell Lysis Buffer 和 0.5 ml Kinase Buffer (25 mM Tris pH7.5, 5 mM β -Glycerolphosphate, 2 mM DTT, 0.1 mM Na_3VO_4 , 10 mM Mgcl_2) 各別清洗 beads。完成後於每一樣品中加入 50 μl Kinase Buffer, 10 μl ATP 及 2 μg GSK 3 Fusion Protein，置於 30°C 乾浴作用 30 分鐘，之後加入 25 μl 3X SDS Sample Buffer (187.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 6% w/v SDS, 30% glycerol, 150 mM DTT, 0.3% W/V bromphenol blue) 終止反應。

(4) 西方墨點法

將樣本以 95°C 處理 5 分鐘，至於冰上，用西方墨點法 (請參考前述步驟) 分析樣品中 p-GSK α/β 的量。

十七、統計分析 (Statistics analysis)

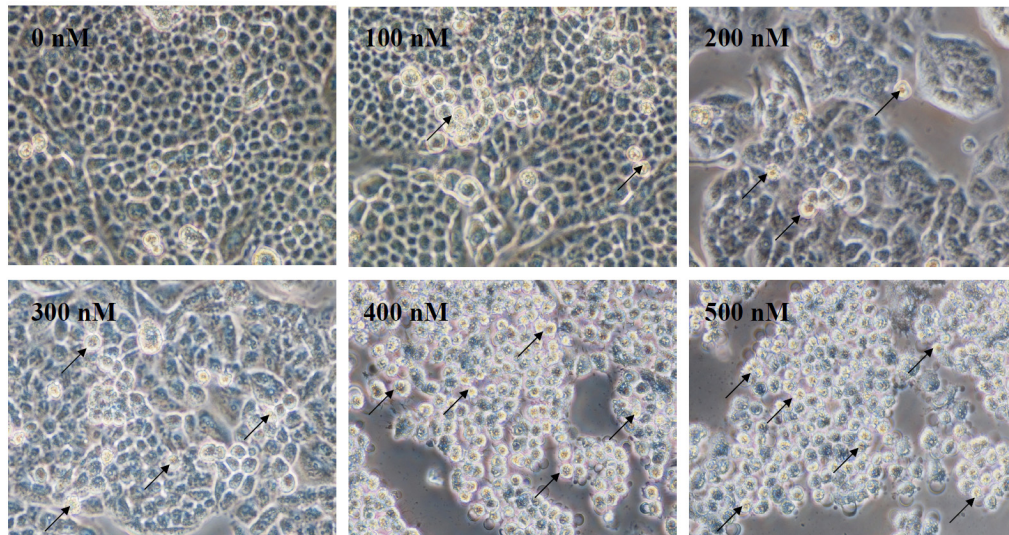
實驗結果以平均值標準差 (mean \pm SD) 表示，使用 Student's *t*-test 來決定實驗組與對照組之差異。當 *p* 值小於 0.05 時則認為具有統計上意義，以*表示 $p < 0.05$ 。



第三章 研究結果

第一節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 細胞形態之影響

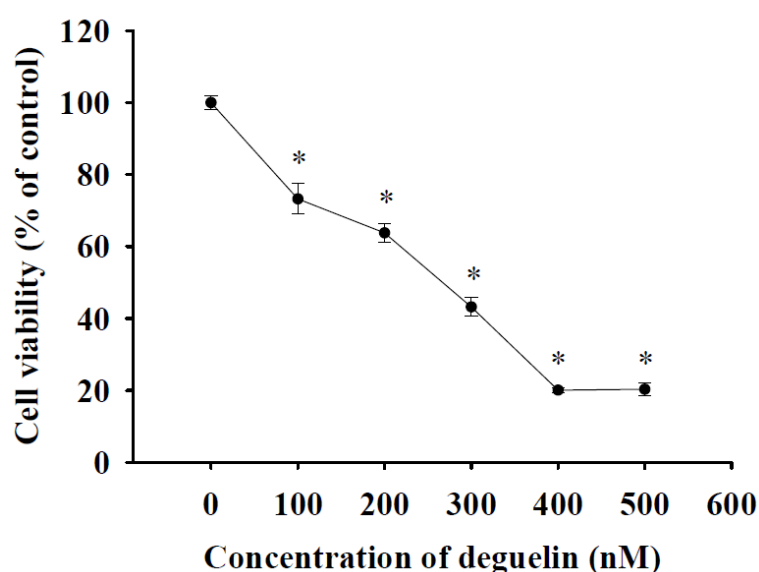
人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株處理不同濃度之魚藤素 (0, 100, 200, 300, 400, 500 nM)，培養 48 小時之後，以倒立式像位差顯微鏡放大觀察細胞型態變化，可以發現細胞經魚藤素處理，隨著藥物濃度的提高，細胞在外觀上有皺縮變小的現象。



圖十 利用倒立式像位差顯微鏡觀察 NCI-H460 細胞株經不同濃度魚藤素處理培養 48 小時，細胞型態之變化。 NCI-H460 細胞株隨著魚藤素藥物濃度上升，細胞呈現皺縮現象。

第二節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 細胞存活率之影響

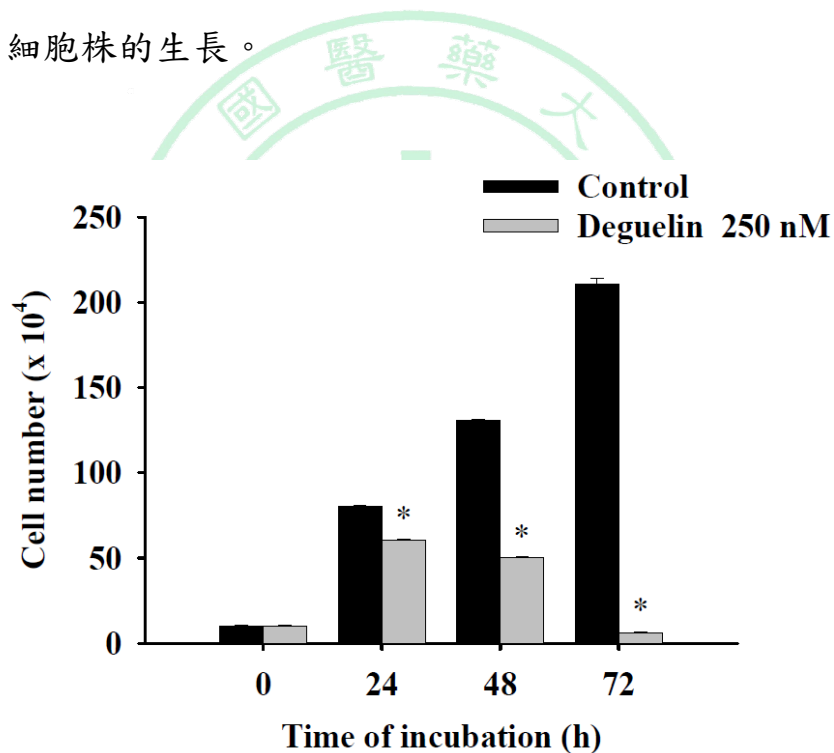
利用流式細胞儀分析細胞存活率，經核酸染劑 PI 染色後，螢光強度較弱為活細胞，螢光較強為死細胞，依螢光強弱的差別即可分析出細胞存活率。結果得知魚藤素對 NCI-H460 細胞株具有毒殺作用，並在量化中顯示有藥物劑量依存性 (dose-dependent) 的現象，亦即隨著藥物濃度提高 (0, 100, 200, 300, 400, 500 nM) 細胞存活率隨之下降。根據存活率試驗的結果，當利用 250 nM 之魚藤素藥物作用於 NCI-H460 細胞株 48 小時，可達半數致死率，故選擇此 IC_{50} 作為之後實驗的濃度依據。



圖十一 利用流式細胞儀偵測得知 NCI-H460 細胞株經不同魚藤素藥物濃度 (0, 100, 200, 300, 400, 500 nM) 處理後培養 48 小時之細胞存活率。*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第三節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 細胞生長抑制之影響

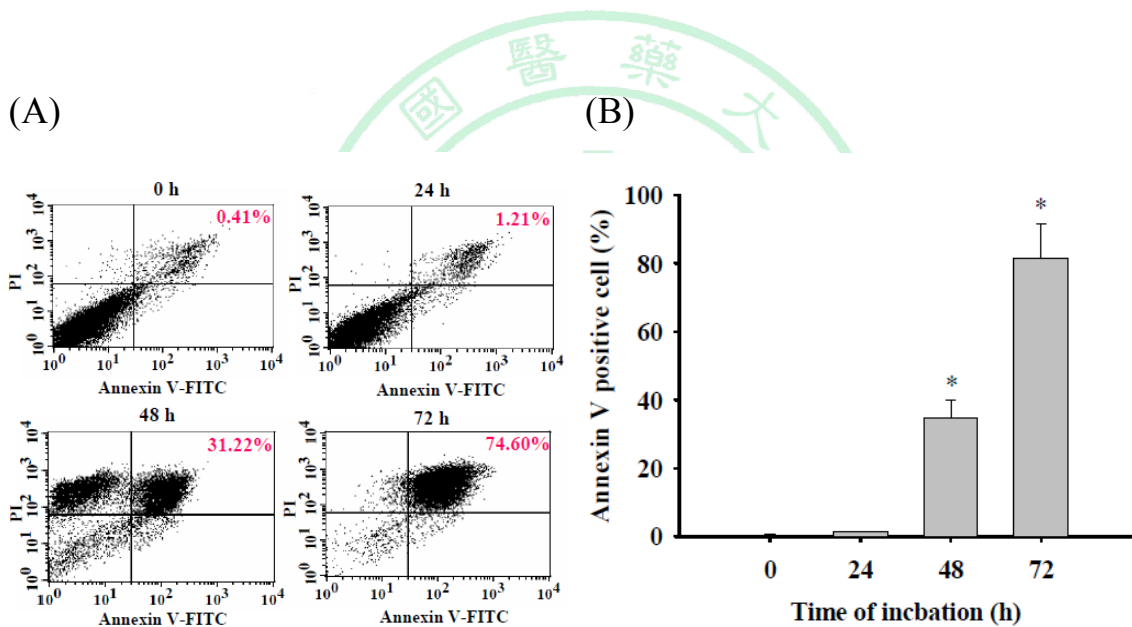
取魚藤素藥物劑量 250 nM 作用於 NCI-H460 細胞株不同時間點 (0, 24, 48, 72 h) 後，利用血球計數盤與 Trypan blue 計算細胞數。由於 Trypan blue 可以染死細胞而活細胞不會被染色，藉此來分辨出活細胞與死細胞，再配合血球計數盤以倒立式像位差顯微鏡觀察便可以計算出活細胞數。根據此實驗可得知，魚藤素 250 nM 作用於 NCI-H460 細胞株 0, 24, 48, 72 小時之後，其細胞數持續減少，由量化分析顯示魚藤素能抑制 NCI-H460 細胞株的生長。



圖十二 利用 Trypan blue 染色計算細胞數，以倒立式像位差顯微鏡觀察 NCI-H460 細胞株經 250 nM 魚藤素處理不同時間點，細胞數目之變化。
*表示以 student's *t*-test 進行分析各時間點實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第四節 魚藤素對人類非小型肺癌細胞 NCI-H460 細胞株誘導凋亡之影響

當細胞凋亡時，磷脂絲氨酸 (PS) 會外翻至細胞膜外，藉由 Annexin V 與 PS 有高度結合性的特性，在 Annexin V 上標定 FITC 螢光物質，另外搭配 PI 染劑進行細胞雙染，以流式細胞儀偵測其螢光量，即可得知細胞凋亡及壞死程度。由結果顯示，當 NCI-H460 細胞株經 250 nM 之魚藤素誘導，隨時間增加 (0, 24, 30, 36, 48 h)，凋亡程度明顯上升，代表魚藤素可誘發 NCI-H460 細胞株之凋亡作用。



圖十三 NCI-H460細胞株經 250 nM 魚藤素處理後，培養不同時間點。

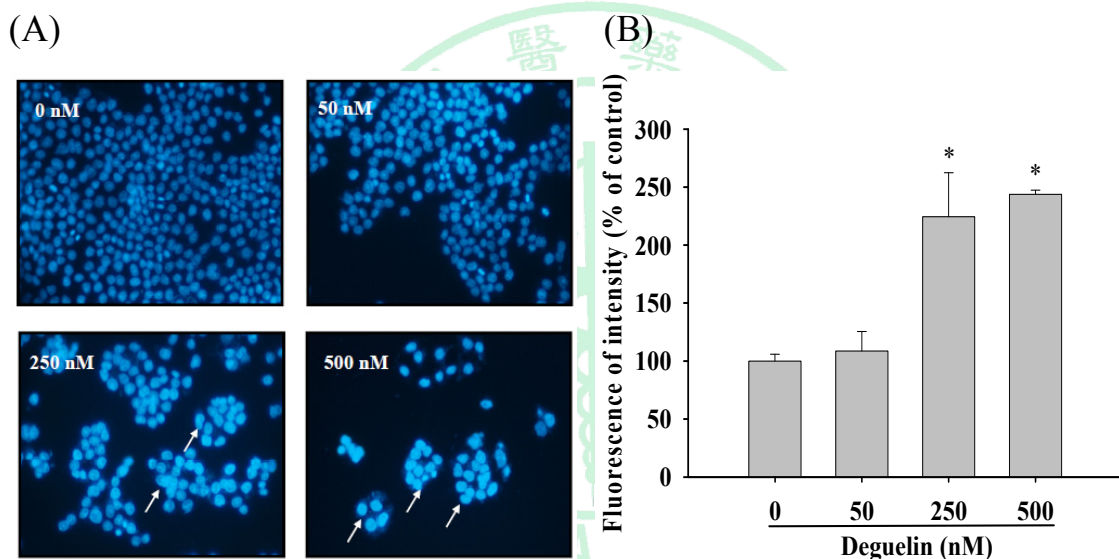
(A) 利用流式細胞儀偵測早期細胞凋亡。(B) 凋亡細胞量化圖。

*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第五節 觀察魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) DNA 受損之情形

一、DAPI 染色法

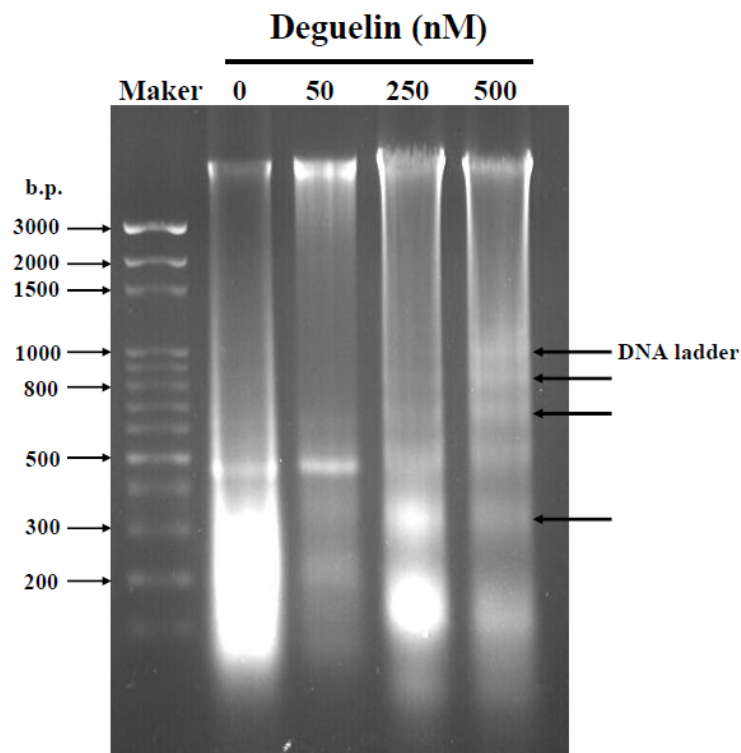
細胞經不同濃度魚藤素 (0, 50, 250, 500 nM) 處理 48 小時後，伴隨著藥物濃度增加，DAPI 染劑的螢光強度提升。代表魚藤素能致使 NCI-H460 細胞株之核內 DNA 受損，造成染色質濃縮，並且此現象具有濃度依存性 (dose-dependent)。



圖十四 以不同濃度魚藤素 (0, 50, 250, 500 nM) 作用於 NCI-H460 細胞株 48 小時後，(A) 以 DAPI 染色法觀察到細胞有 DNA 受損與染色質濃縮的現象。(B) 量化 DAPI 螢光強度。*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

二、DNA膠體電泳 (DNA gel electrophoresis)

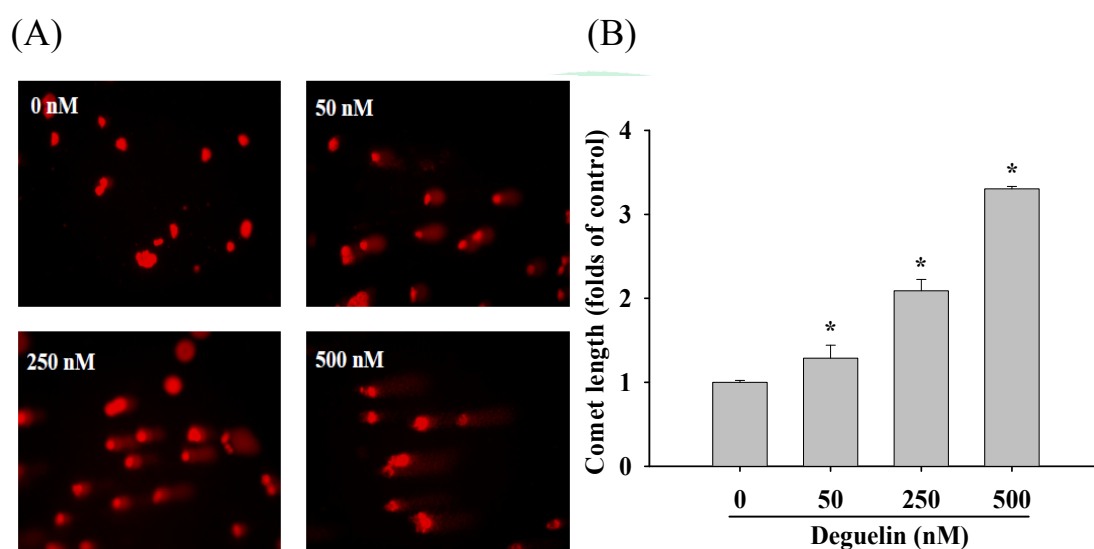
當細胞 DNA 受損的時候，利用 DNA 膠體電泳可看出其成階梯狀分佈，即有所謂的 DNA ladder 的表現。實驗結果顯示，伴隨著處理藥物濃度的增加，DNA 斷裂的現象有明顯的表現。結果顯示魚藤素會造成 NCI-H460 細胞株之 DNA 受損。



圖十五 魚藤素對 NCI-H460 細胞株之 DNA 斷裂的影響。經不同濃度魚藤素 (0, 50, 250, 500 nM) 處理細胞 48 小時後，利用 DNA 膠體電泳偵測 DNA 斷裂之現象。圖中箭頭所指之處為 DNA ladder 現象。

三、彗星試驗

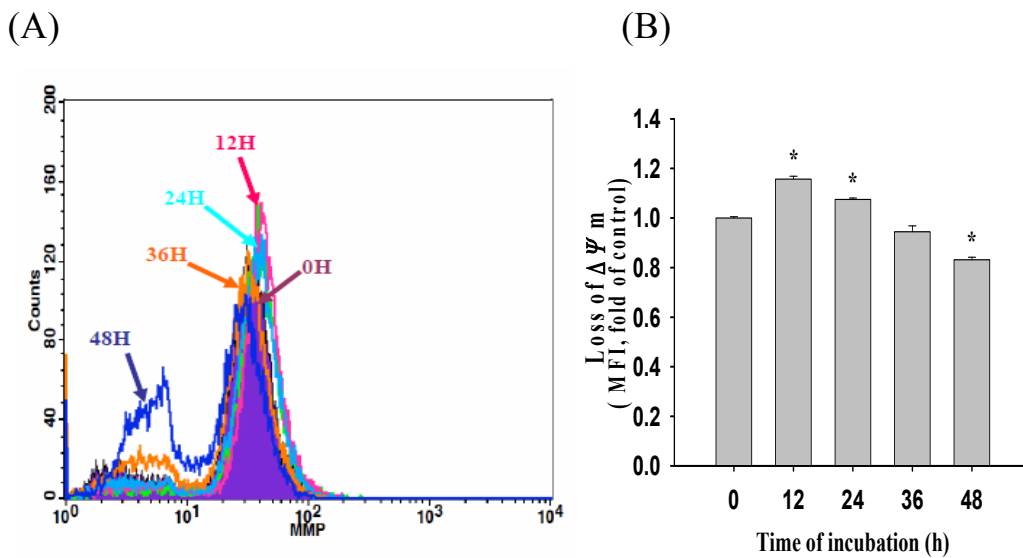
利用 Comet assay 觀察 DNA 斷裂及拖尾情形，電泳後，受損的 DNA 會被拖出細胞膜外，經 PI 染劑染色，在螢光顯微鏡下觀察 DNA 拖尾的現象。可依據拖尾的長度來判斷 DNA 損傷程度。實驗結果顯示 NCI-H460 細胞株經不同藥物濃度 (0, 50, 250, 500 nM) 處理 48 小時，明顯觀察到伴隨藥物濃度增加，拖尾長度隨之增長，表示 DNA 受損嚴重。



圖十六 以不同濃度魚藤素 (0, 50, 250, 500 nM) 作用於 NCI-H460 細胞株 48 小時後，(A) 以單細胞凝膠電泳觀察到有 DNA 受損之情形；(B) 量化拖尾程度。*表示以 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第六節 魚藤素對人類非小型細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 粒線體之影響。

以 250 nM 之魚藤素處理 NCI-H460 細胞株後，經 0, 12, 24, 36, 48 小時，利用流式細胞儀偵測 DiOC₆ 螢光量觀察粒線體電位 (Mitochondrial membrane potential, MMP, $\Delta\psi_m$) 的變化。隨著處理藥物時間越長，DiOC₆ 螢光量下降，結果顯示魚藤素會影響粒線體膜電位並使其下降。



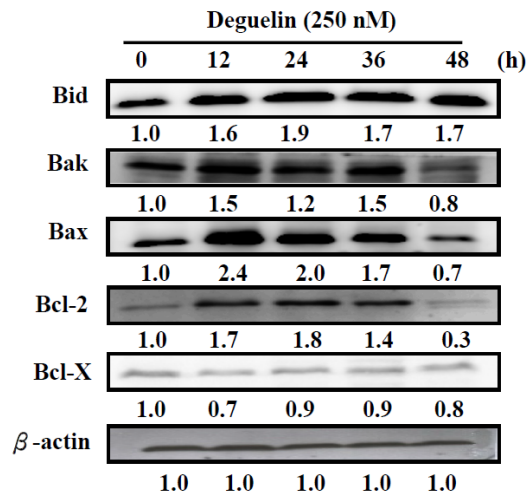
圖十七 250 nM 魚藤素對 NCI-H460 細胞株粒線體膜電位之影響。(A) 藉由流式細胞儀分析 DiOC₆ 螢光量，以判斷粒線體膜電位之變化；(B) DiOC₆ 螢光量化統計圖。*表示 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第七節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 粒線體凋亡路徑 (Mitochondria-dependent apoptotic pathway) 相關蛋白之影響

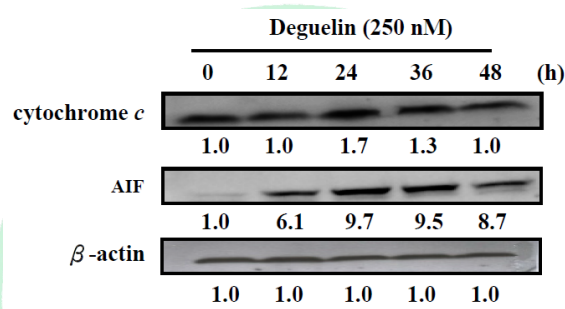
以西方墨點法觀察粒線體凋亡路徑相關蛋白，發現促凋亡 (pro-apoptosis) 蛋白 - Bid, Bak, Bax 蛋白表現量上升；抗凋亡 (anti-apoptosis) 蛋白 - Bcl-2 蛋白表現量被抑制；促進 cytochrome *c* 和 AIF 蛋白表現量。另外，cytochrome *c* 會誘發 Apaf-1 和 caspase-9 結合，形成凋亡體 (apoptosome)，進而引起 caspase-3 之活化，實驗結果顯示 Apaf-1 之表現量上升，且 caspase-9 與 caspase-3 有被裂解的情形。此現象證明魚藤素會影響粒線體，使其功能喪失而促使凋亡相關蛋白的表現，



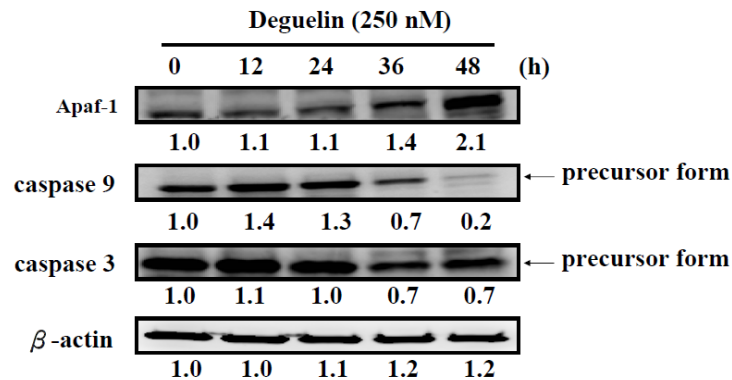
(A)



(B)



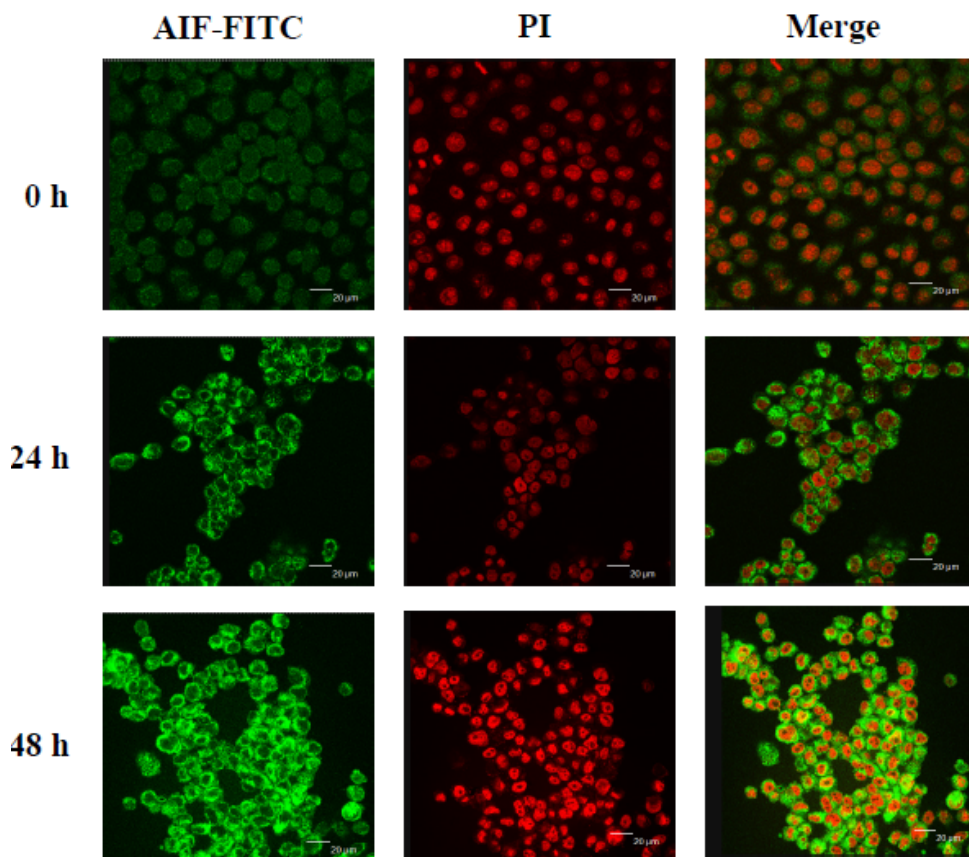
(C)



圖十八 粒線體路徑之凋亡相關蛋白表現變化。NCI-H460 細胞株以 250 nM 之魚藤素處理後，經 0, 12, 24, 36, 48 小時，利用西方墨點法檢測 (A) 粒線體膜上促凋亡蛋白 (Bid, Bak, Bax) 表現量之變化；(B) 存於粒線體內之凋亡相關蛋白 cytochrome *c* 和 AIF 之蛋白表現變化；(C) 關於粒線體內在路徑之凋亡相關蛋白 Apaf-1, caspase-9, caspase-3 之表現變化。

第八節 利用免疫螢光染色探討魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 凋亡相關蛋白之表現與轉移之影響

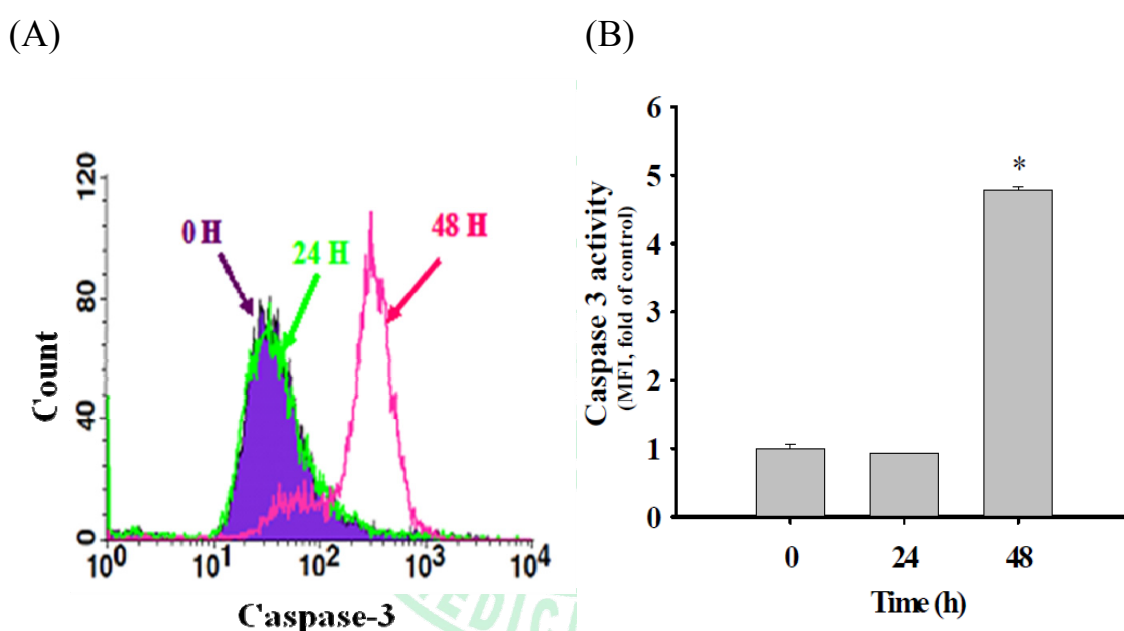
以 250 nM 魚藤素處理 NCI-H460 細胞株 0, 24, 48 小時後，利用免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡觀察凋亡蛋白轉移之現象。實驗結果顯示，當細胞以藥物處理 24, 48 小時之後，AIF 大量的表現並轉位至細胞核中，造成 DNA 受損。



圖十九 魚藤素對於 NCI-H460 細胞株內 AIF 的表現與轉移之影響。NCI-H460 細胞株以 250 nM 魚藤素處理，經過 0, 24, 48 小時，利用免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡觀察 AIF 蛋白的表現與轉位。

第九節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 之凋亡蛋白酶 (caspase) 活性之影響

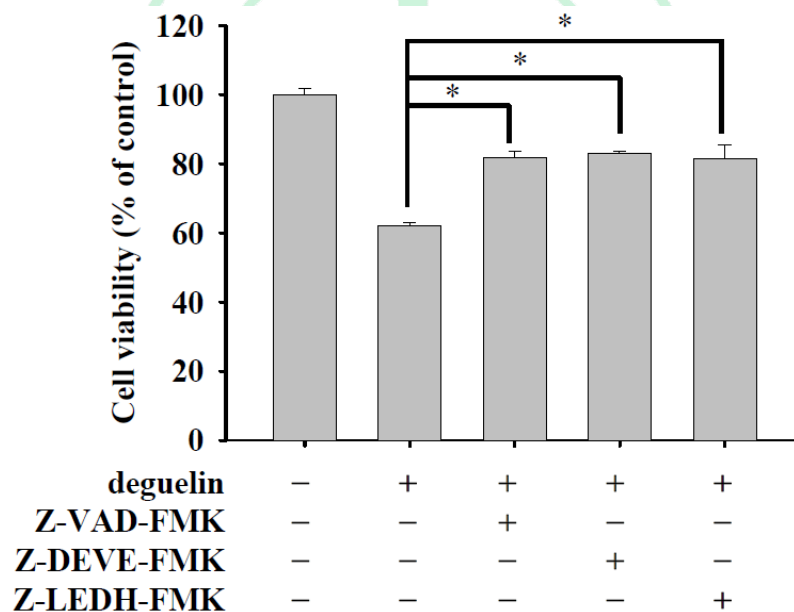
本實驗利用 PhiPhiLux 偵測細胞內 caspase-3 活性之變化。由實驗結果得知，NCI-H460 細胞株經 250 nM 魚藤素處理 0, 24, 48 小時之後，caspase-3 螢光強度增加，即代表 caspase-3 之活性明顯上升。故可由此推測魚藤素可誘導 NCI-H460 細胞株走向細胞凋亡。



圖二十 250 nM 魚藤素作用於 NCI-H460 細胞株不同時間點，以 PhiPhiLux 螢光染劑分析細胞內 caspase-3 活性的變化。(A) 以流式細胞儀偵測細胞內 caspase-3 活性之螢光強度；(B) Caspase-3 活性量化統計圖。*表示 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第十節 Pan-caspase (Z-VAD-FMK) , caspase-3 (Z-DEVE-FMK) 及 caspase-9 (Z-LEDH-FMK) 凋亡蛋白酶抑制劑對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 之存活率影響

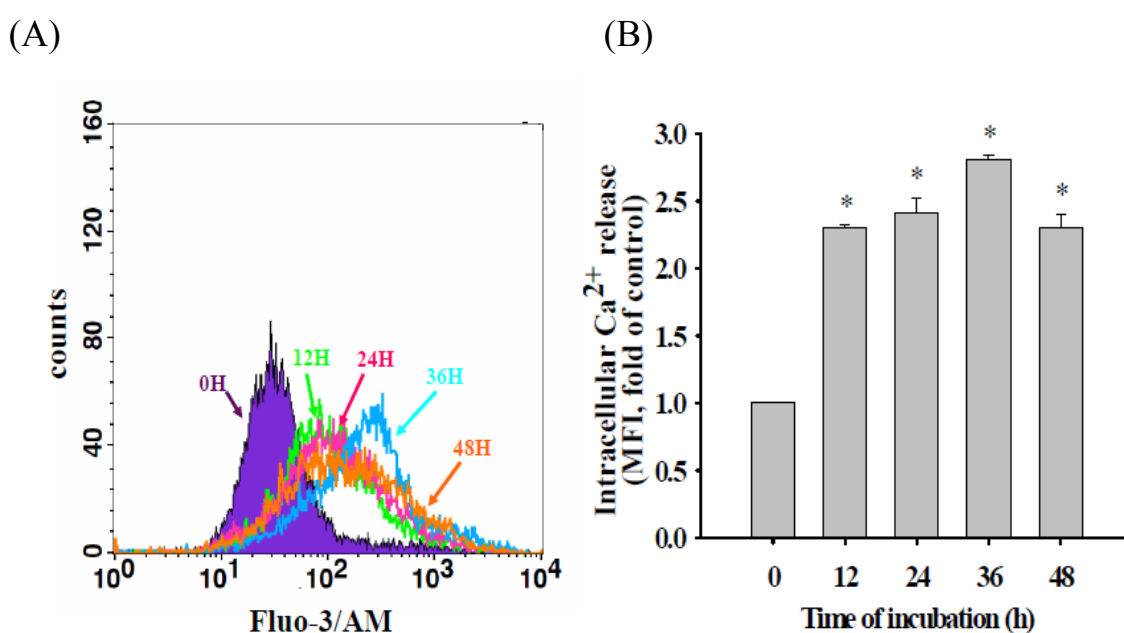
利用 Z-VAD-FMK (2 μ M), Z-DEVE-FMK (10 μ M) 和 Z-LEDH-FMK (2 μ M) 先加入細胞前處理 (pre-treatment) 2 小時, 之後再以 250 nM 魚藤素作用於 NCI-H460 細胞株 48 小時後, 利用流式細胞儀偵測其存活率。實驗結果顯示, 加入 Z-VAD-FMK, Z-DEVE-FMK 和 Z-LEDH-FMK 凋亡蛋白酶抑制劑能使細胞存活率有回升之趨勢, 亦即代表本研究推測魚藤素能誘發細胞凋亡之粒腺體內在路徑是被證實的。



圖二十一 凋亡蛋白酶抑制劑對魚藤素誘發 NCI-H460 細胞株凋亡現象之存活率變化。*表示 student's *t*-test 進行分析各抑制劑添加實驗組與魚藤素單獨處理組之間存在之顯著差異, $p < 0.05$ 。

第十一節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) 細胞內鈣離子 (Ca^{2+}) 釋出的影響

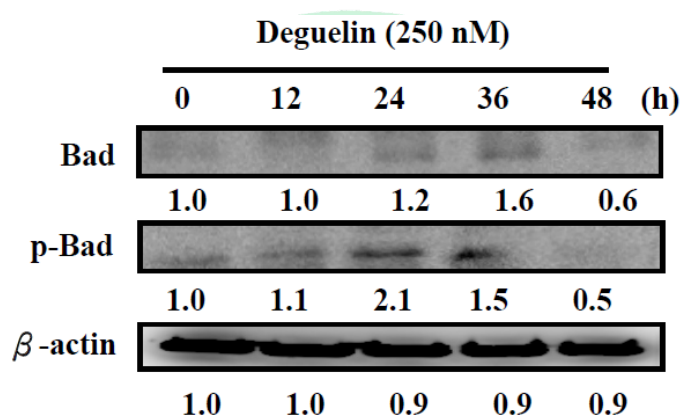
以 250 nM 魚藤素處理 NCI-H460 細胞株後，經 0, 12, 24, 36, 48 小時，利用流式細胞儀偵測 Fluo-3/AM 螢光量，觀察 Ca^{2+} 在細胞內的濃度變化情形。當細胞經藥物處理後，由圖可觀察到 Fluo-3/AM 螢光量有增強之趨勢，即推測魚藤素可誘使 NCI-H460 細胞內之 Ca^{2+} 濃度增加。



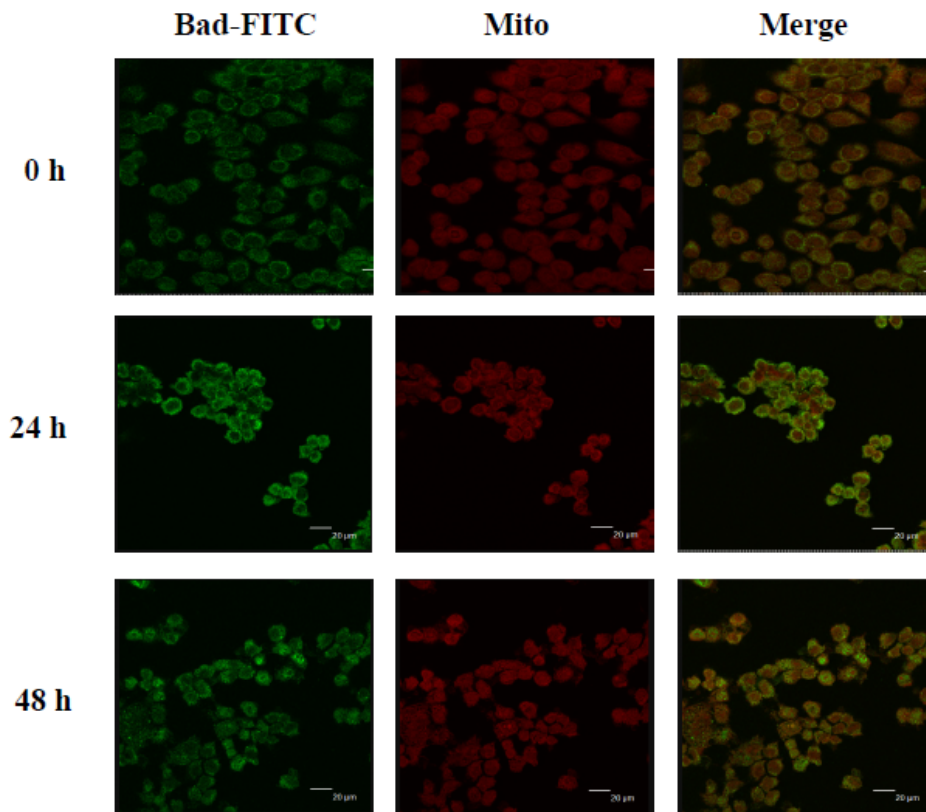
圖二十二 魚藤素對 NCI-H460 細胞內鈣離子 (Ca^{2+}) 濃度之影響。NCI-H460 細胞以 250 nM 魚藤素處理後，經 0, 12, 24, 36, 48 小時後，利用流式細胞儀觀察鈣離子在細胞內的表現情形。(A) 利用流式細胞儀觀察鈣離子在細胞質內之螢光變化量；(B) 鈣離子於細胞內釋出之量化圖。*表示 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第十二節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) Bad 蛋白之調控

以西方墨點法觀察 Bad 促凋亡蛋白之表現。由圖可得知，當細胞經魚藤素藥物處理在 24~36 小時之間，能促進具有促凋亡作用之 Bad 表現量上升，並且從細胞質轉移至粒腺體膜上，影響粒線體的功能。反之，未活化態之 p-Bad 在 24 小時之後表現量驟減，從此結果推測魚藤素對 NCI-H460 細胞誘發凋亡作用之關鍵起始點為 24 小時。



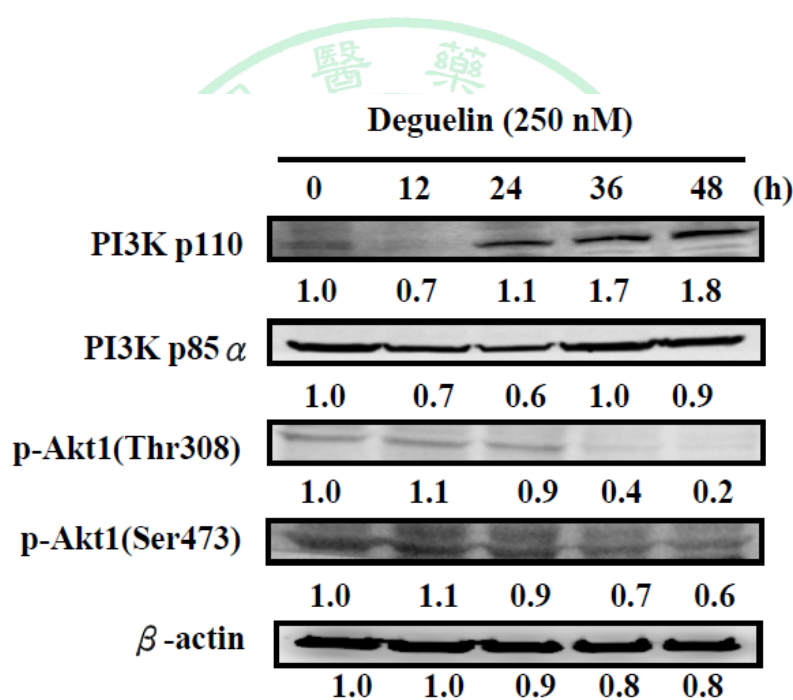
圖二十三 Bad 促凋亡蛋白表現量變化。NCI-H460 細胞株以 250 nM 魚藤素處理後，經 0, 12, 24, 36, 48 小時，利用西方墨點法檢測 Bad 和 p-Bad 表現。



圖二十四 魚藤素對於 NCI-H460 細胞株內 Bad 的表現與轉位之影響。NCI-H460 細胞株以 250 nM 魚藤素處理，經過 0, 24, 48 小時，利用免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡觀察 Bad 蛋白的表現與轉位。

第十三節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) PI3K/AKT 路徑相關蛋白之影響

以西方墨點法觀察 PI3K/AKT 路徑蛋白之表現。由圖可得知，當細胞經魚藤素藥物處理後，能致使 AKT 及 p-AKT 蛋白的表現量下降；但是，PI3K 的表現量並沒有因魚藤素的加藥處理而隨之下降，推測 p-AKT 的活化和抑制主要不是透過 PI3K。因此得知，魚藤素誘導人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株走向凋亡之途徑是透過 PI3K 非依賴 (PI3K-independent) 路徑。

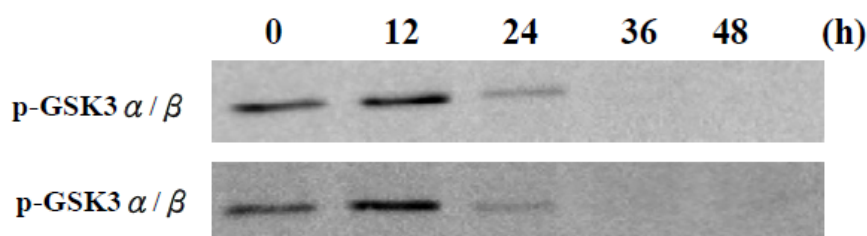


圖二十五 PI3K/AKT 路徑相關蛋白之表現量。NCI-H460 細胞株以 250 nM 之魚藤素處理後，經 0, 12, 24, 36, 48 小時，利用西方墨點法檢測 PI3K 和 AKT 蛋白表現。

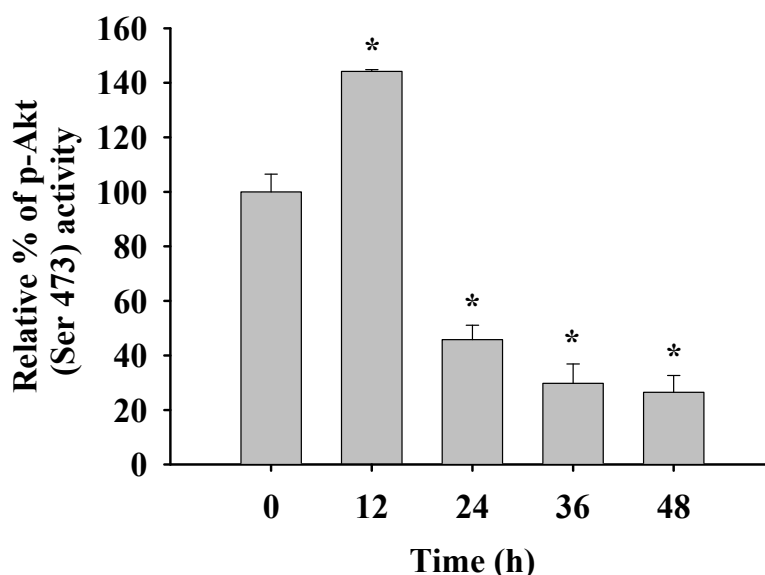
第十四節 魚藤素對人類非小細胞肺癌 (NCI-H460 cells) p-AKT 之活性影響

經由西方墨點法證實魚藤素能有效影響 AKT 蛋白的表現，在其活性分析方面，利用 Kinase assay 得知 AKT 活性是否能被成功抑制而促進下游凋亡蛋白的表現。經二次實驗證實，魚藤素在 NCI-H460 細胞中能明顯抑制 p-AKT (Ser 473) 的活性。

(A)



(B)



圖二十六 魚藤素對 NCI-H460 細胞株 p-AKT (Ser 473) 之活性分析。

(A) p-GSK3 α/β 蛋白之表現量；(B) p-AKT (Ser 473) 活性之量化圖。

*表示 student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第四章 討論

過去文獻指出魚藤素能活化人類胃癌細胞 (SNU-484, AGS, MKN-2) caspase-3,-9 的表現導致細胞凋亡⁵⁶；在乳癌 MCF-7 細胞中，能抑制細胞的生長並且透過 PI3K/AKT 路徑誘導細胞凋亡⁵⁷；在大腸癌 HT-29 細胞中，能造成細胞週期停滯並且產生凋亡現象¹²。

本實驗利用魚藤素作為實驗藥物處理人類非小細胞肺癌 NCI-H460，細胞型態明顯皺縮變小 (圖十)，利用流式細胞儀分析細胞存活率 (圖十一)，結果顯示存活率趨勢具有劑量依存性 (dose-dependent)，同時亦能有效抑制 NCI-H460 細胞的生長 (圖十二)。因此進一步探討魚藤素造成 NCI-H460 細胞死亡的原因是否為細胞凋亡現象。

細胞凋亡有幾個重要的特徵，包括：細胞膜變化和 DNA 受損及片斷化¹⁸。在本實驗中利用 Annexin V affinity assay 偵測細胞膜磷脂質絲胺酸外翻的變化，結果顯示 NCI-H460 細胞在加藥處理後，磷脂質絲胺酸外翻之現象在 24 - 30 小時之間明顯劇增 (圖十三)，推測在此 6 小時之間，細胞大量產生凋亡信號，是導致細胞快速死亡之關鍵時刻；利用 DAPI 染色法，彗星試驗和膠體電泳觀察 DNA 受損及片斷化之現象。結果顯示魚藤素能導致 NCI-H460 細胞之 DNA 受損，當藥物濃度提高時，結合至 DNA 上的 DAPI 染劑增多，螢光量有增加趨勢 (圖十四)。彗星試驗的結果顯示，當 DNA 斷裂嚴重時，經單細胞電泳後，拖尾現象會隨著魚藤素濃度的提高而明顯 (圖十六)。

過去有一些文獻指出，AKT 的活化主要是透過 PI3K 調控，意即 PI3K 依賴路徑 (PI3-dependent pathway)。例如在人類胃癌 SGC7901 細胞株中，藉由抑制 PI3K/AKT 的表現，影響 NF- κ B 的活性進而誘導細胞凋亡⁵⁸；在人類血癌細胞中，藉由抑制 PI3K/AKT 之訊息傳遞路徑，

導致粒線體膜電位下降，活化下游凋亡蛋白酶的表現⁵⁹。然而另有文獻指出 AKT 的活化可透過其他蛋白的影響，意即 PI3K 非依賴路徑 (PI3K-independent pathway)，例如在人類乳腺上皮細胞中發現 p38-MAPK 參與 AKT 磷酸化之調控⁶⁰；在神經細胞中發現鈣依賴蛋白質激酶 (CaM-KK) 可磷酸化 Akt 蛋白 Thr 308 之位點，並且促進神經細胞的生長分化⁶¹。在本實驗中發現，魚藤素能抑制 p-Akt (Ser 473) (圖二十五, 二十六) 的蛋白表現及活性，反觀其上游 PI3K 的表現量 (圖二十五) 並沒有下降之趨勢，是否意味 AKT 的活化不是透過 PI3K，因此推測魚藤素抑制人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株之 AKT 活性是透過 PI3K 非依賴路徑，此現象與過去文獻中所述魚藤素誘導人類惡性支氣管上皮細胞之凋亡研究相符合¹⁵。總觀以上，我們推測魚藤素可選擇性抑制 AKT 的活性，進而誘發細胞凋亡機制。

BAD 屬於 BH3-only Bcl-2 家族，為促進細胞凋亡蛋白。當有生長或存活因子時，BAD 會被磷酸化處在非活化態，使細胞得以存活；反之，當缺少生長或存活因子時，BAD 會去磷酸化而處於活化態，使得 Bax 和 Bak 促凋亡蛋白被活化，或使 Bcl-2 和 Bcl-X 抗凋亡蛋白去活化，導致細胞凋亡⁶²。根據文獻指出，calcineurin 調控 BAD 去活化作用進而使 BAD 轉移至粒線體外膜，釋出 cytochrome *c*，加上胞內鈣離子的濃度提高，引起神經細胞凋亡⁴²；在海馬神經元研究中指出，藉由鈣離子誘導細胞凋亡之過程，是透過 calcineurin 將 BAD 去磷酸化⁶³；在外傷性脊髓損傷的過程，calcineurin 會調控 BAD 去磷酸化而活化 caspase-3 凋亡蛋白酶，引起細胞凋亡⁶⁴。而在本實驗中發現，魚藤素能引起細胞內鈣離子濃度的提升 (圖二十二)，並參與 BAD 之去磷酸化過程，造成 p-BAD 表現量下降 (圖二十三)，使其從細胞質轉移至粒線體外膜上與 Bcl-2 結合 (圖二十四)，釋出 cytochrome *c*，誘發下游凋亡蛋

白酶活化 (圖十八)，導致細胞凋亡。

鈣離子釋出是細胞凋亡的指標之一^{65,66}。在癌細胞中，鈣離子主要儲存於內質網⁶⁷，內質網最主要的功能為幫助蛋白質摺疊成穩定的結構和分泌蛋白質。當內質網受到破壞後，會有大量折疊錯誤的蛋白質聚集或鈣離子通透失衡，會產生所謂的內質網壓力 (ER stress)²⁵。當 ER stress 時，GRP78 (glucose-regulated protein 78) 和 GADD153 (growth arrest and DNA damage inducible gene 153) 這兩種基因會大量表現⁶⁸。有文獻提及，GADD153 能抑制 Bcl-2 及促進 Bax 的表現以調控細胞凋亡⁶⁶，因此鈣離子和粒線體之間與細胞凋亡有著非常密切的關係。實驗結果顯示，當 NCI-H460 細胞經 250 nM 處理後，細胞內鈣離子濃度在 12 小時皆明顯的升高 (圖二十二)，而 ER stress 相關蛋白 GRP78, GADD153 表現量與螢光強度之趨勢相符合(實驗結果未放於論文中)，此結果說明魚藤素的確可經由內質網壓力導致 NCI-H460 細胞之鈣離子釋放。至於在經魚藤素處理後 NCI-H460 細胞中，鈣離子的釋出是否會引起粒線體膜上蛋白的表現，目前在本研究中沒有直接的實驗數據證實，但是可以利用鈣離子螯合劑 BATPA-AM 處理後，觀察細胞粒線體膜上蛋白之表現即可得知其之間的關係，最終是否能減少細胞凋亡現象。

細胞凋亡途徑主要分為外在路徑 (Extrinsic pathway), 內在路徑 (Intrinsic pathway) 以及內質網壓力 (Endoplasmic reticulum stress, ER stress)¹⁷。內在路徑細分為凋亡蛋白酶依賴 (caspase dependent) 路徑以即凋亡蛋白酶非依賴 (caspase independent) 路徑。凋亡蛋白酶依賴路徑主要受到 Bcl-2 家族的調控，因其結合至粒線體膜上影響膜電位，使粒線體功能喪失進而釋放 cytochrome *c*，並與 caspase-9 結合，活化 caspase-3 而走向細胞凋亡；凋亡蛋白酶非依賴路徑主要是因 Bcl-2 蛋白家族結合至粒線體膜上形成孔洞，導致粒線體間質釋出 apoptosis-inducing factor

(AIF) 和 endonuclease G (Endo G) 至細胞質中，進而轉位進入細胞核內，造成 DNA 受損及斷裂，最後走向細胞凋亡⁶⁹。這些蛋白的釋放被認為與粒線體膜上稱為 mitochondrial permeability transition pore (MPTP) 的巨大通道有關，有研究顯示，MPTP 的開啟被認為是使粒線體膜電位下降的主要因素之一。在本研究中，NCI-H460 細胞經魚藤素加藥處理後，可活化促凋亡相關蛋白 (Bid, Bax, Bak) 和抑制抗凋亡蛋白 (Bcl-2, Bcl-X) 的表現 (圖十八)，至使粒線體膜電位下降 (圖十七)，釋出 AIF 和 cytochrome *c* (圖十八)，cytochrome *c*, Apaf-1 和 caspase-9 結合形成凋亡體，活化 caspase-3 (圖十八)，且利用 CaspaLux kit 偵測 caspase-3 的活性，亦也證實 caspase-3 之活性明顯上升 (圖二十)；另一方面，AIF 轉位至細胞核中造成 DNA 受損引發細胞凋亡 (圖十九)。以上結果證實魚藤素能經由粒線體內在路徑誘導 NCI-H460 細胞凋亡。

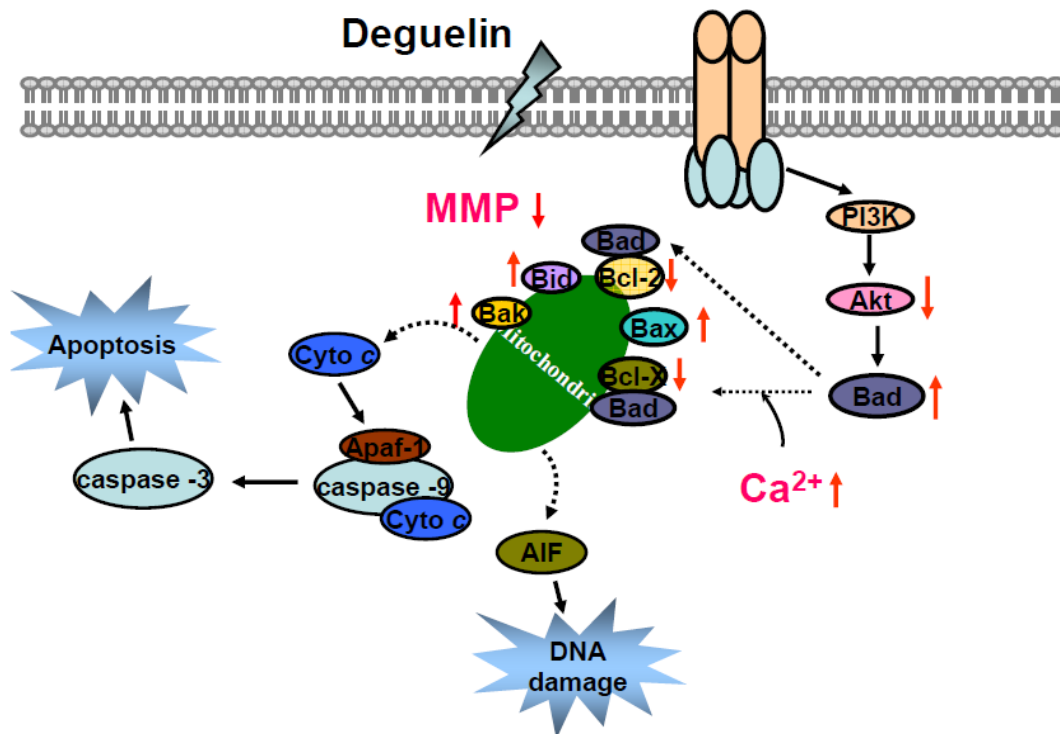


第五章 結論

魚藤素能有效抑制人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株的增生，造成細胞死亡而降低細胞存活率；並且誘發細胞凋亡和 DNA 受損，致使磷脂絲胺酸蛋白外翻，DNA 斷裂和染色質濃縮形成凋亡小體。

經由西方墨點法和免疫螢光染色法證實，魚藤素會抑制 p-AKT 蛋白表現，促進 BAD 的活化，並且使之從細胞質轉位至粒腺體外膜上，與 Bcl-2 或 Bcl-X 結合，進而影響促細胞凋亡相關蛋白 (Bid, Bax, Bak) 和抑制抗凋亡蛋白 (Bcl-2, Bcl-X) 的表現，至使粒腺體膜電位下降，釋出 AIF 和 cytochrome c。cytochrome c, Apaf-1 和 caspase-9 結合形成凋亡小體，活化 caspase-3，最後誘發細胞凋亡；然而，AIF 轉移至細胞核中造成 DNA 受損。

總觀以上結果，我們認為魚藤素會引起人類非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞株之粒腺體功能喪失並誘導細胞經由 Akt 和 Bad 相關粒腺體內在路徑走向細胞凋亡。



圖二十七 魚藤素誘導人類非小細胞肺癌 (NCI-H460) 細胞凋亡路徑圖

第六章 參考文獻

1. 行政院衛生署. 【cite ; Available from <http://www.doh.gov.tw/>.(2009)】
2. 世界衛生組織. 【cite ; Available from <http://www.who.int/en/>.(2009)】
3. DeMarini DM, Claxton LD. Outdoor air pollution and DNA damage. *Occup Environ Med* 2006;63(4): 227-9.
4. Furuta M, Hayakawa K, Saito Y, et al. Clinical implication of symptoms in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Lung Cancer* 1995;13(3): 275-83.
5. Murray N, Turrisi AT, 3rd. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006;1(3): 270-8.
6. Clegg A, Scott DA, Hewitson P, Sidhu M, Waugh N. Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax* 2002;57(1): 20-8.
7. Portugal J, Bataller M, Mansilla S. Cell death pathways in response to antitumor therapy. *Tumori* 2009;95(4): 409-21.
8. 醫學百科. 【cite ; http://big5.wiki8.com/yuteng_81614/】
9. 台灣野生植物資料庫. 【cite ; <http://plant.tesri.gov.tw/plant/>.】
10. 台南縣本土教育資源網. 【cite ; <http://ltrc.tnc.edu.tw/modules/tadbook2>】.
11. Kuehne FC, Bethe U, Freedberg K, Goldie SJ. Treatment for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected patients: clinical benefits and cost-effectiveness. *Arch Intern Med* 2002;162(22): 2545-56.
12. Murillo G, Salti GI, Kosmeder JW, 2nd, Pezzuto JM, Mehta RG. Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Eur J Cancer* 2002;38(18): 2446-54.
13. Li R, Chen Y, Shu WX, Chen Z, Ke WJ. Involvement of SRC-3 in deguelin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Int J Hematol* 2009;89(5): 628-35.
14. Chen Y, Wu Q, Cui GH, Chen YQ, Li R. Deguelin blocks cells survival signal pathways and induces apoptosis of HL-60 cells in vitro. *Int J Hematol* 2009;89(5): 618-23.
15. Chun KH, Kosmeder JW, 2nd, Sun S, et al. Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(4): 291-302.
16. Kindt TJ OB, Goldsby RA. *Kuby Immunology* 2006.
17. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15: 269-90.
18. Raffray M, Cohen GM. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol Ther* 1997;75(3): 153-77.
19. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001;3(11): E255-63.
20. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993;361(6410): 365-9.
21. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397(6718): 441-6.
22. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296(5573): 1635-6.
23. Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature* 2006;443(7113): 796-802.

24. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004;14(1): 20-8.
25. Joo JH, Liao G, Collins JB, Grissom SF, Jetten AM. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 2007;67(16): 7929-36.
26. Coffey PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 1991;201(2): 475-81.
27. Altomare DA, Guo K, Cheng JQ, Sonoda G, Walsh K, Testa JR. Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene* 1995;11(6): 1055-60.
28. Franke TF, Yang SI, Chan TO, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995;81(5): 727-36.
29. Andjelkovic M, Suidan HS, Meier R, Frech M, Alessi DR, Hemmings BA. Nerve growth factor promotes activation of the alpha, beta and gamma isoforms of protein kinase B in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur J Biochem* 1998;251(1-2): 195-200.
30. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997;275(5300): 665-8.
31. James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, Alessi DR. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 1996;315 (Pt 3): 709-13.
32. Staal SP, Hartley JW, Rowe WP. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(7): 3065-7.
33. Staal SP, Hartley JW. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *J Exp Med* 1988;167(3): 1259-64.
34. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13(22): 2905-27.
35. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(7): 489-501.
36. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 2001;492(3): 199-203.
37. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 2001;26(11): 657-64.
38. Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(10): 760-8.
39. Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55(17): 3902-7.
40. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999;9(11): 601-4.
41. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14(5): 381-95.
42. Shou Y, Li L, Prabhakaran K, Borowitz JL, Isom GE. Calcineurin-mediated Bad translocation regulates cyanide-induced neuronal apoptosis. *Biochem J* 2004;379(Pt 3): 805-13.
43. She QB, Solit DB, Ye Q, O'Reilly KE, Lobo J, Rosen N. The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient

- tumor cells. *Cancer Cell* 2005;8(4): 287-97.
44. PET scanning said to save money and improve staging of lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 1995;9(11): 1200.
45. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2): 55-63.
46. Ito S, Oyake T, Murai K, Ishida Y. Deguelin suppresses cell proliferation via the inhibition of survivin expression and STAT3 phosphorylation in HTLV-1-transformed T cells. *Leuk Res* 2010;34(3): 352-7.
47. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, 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* 2009;57(16): 7596-604.
48. Wagner L, Lai E. Separation of large DNA molecules with high voltage pulsed field gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1994;15(8-9): 1078-83.
49. Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 2009;48(1): 46-53.
50. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243(1-2): 167-90.
51. Tan TW, Tsai HR, Lu HF, 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* 2006;26(6B): 4361-71.
52. Lu HF, Hsueh SC, Yu FS, et al. The role of Ca²⁺ in (-)-menthol-induced human promyelocytic leukemia HL-60 cell death. *In Vivo* 2006;20(1): 69-75.
53. Wada A, Fukui K, Sawai Y, et al. Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006;44(1): 142-50.
54. Donaldson JG. Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Immunol* 2002;Chapter 21: Unit 21 3.
55. Hovelmann S, Beckers TL, Schmidt M. Molecular alterations in apoptotic pathways after PKB/Akt-mediated chemoresistance in NCI H460 cells. *Br J Cancer* 2004;90(12): 2370-7.
56. Lee H, Lee JH, Jung KH, Hong SS. Deguelin promotes apoptosis and inhibits angiogenesis of gastric cancer. *Oncol Rep* 2010;24(4): 957-63.
57. Chu ZH, Liang XH, Zhou XL, Huang RF, Zhan QZ, Jiang JW. [Effects of deguelin on proliferation and apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway.]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2011;9(5): 533-38.
58. Chao X, Zao J, Xiao-Yi G, Li-Jun M, Tao S. Blocking of PI3K/AKT induces apoptosis by its effect on NF-kappaB activity in gastric carcinoma cell line SGC7901. *Biomed Pharmacother* 2010;64(9): 600-4.
59. Cheong JW, Min YH, Eom JI, Kim SJ, Jeung HK, Kim JS. Inhibition of CK2{alpha} and PI3K/Akt synergistically induces apoptosis of CD34+CD38- leukaemia cells while sparing haematopoietic stem cells. *Anticancer Res* 2010;30(11): 4625-34.
60. Woods Ignatoski KM, Livant DL, Markwart S, Grewal NK, Ethier SP. The role of phosphatidylinositol 3'-kinase and its downstream signals in erbB-2-mediated transformation. *Mol Cancer Res* 2003;1(7): 551-60.
61. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 1998;396(6711): 584-7.
62. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003;424(6951): 952-6.
63. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999;284(5412): 339-43.

64. Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA, Kennedy SE. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2000;20(19): 7246-51.
65. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001;276(36): 33869-74.
66. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001;21(4): 1249-59.
67. Bergner A, Huber RM. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-store in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8(7): 705-9.
68. Liu H, Qian J, Wang F, et al. Expression of two endoplasmic reticulum stress markers, GRP78 and GADD153, in rat retinal detachment model and its implication. *Eye (Lond)* 2010;24(1): 137-44.
69. Fumarola C, Guidotti GG. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 2004;9(1): 77-82.

