

中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

編號：GICMS-317

指導教授：江素瑛 助理教授

共同指導教授：鍾景光 教授

林昭庚 教授

論文題目

大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株  
A549 生長抑制的分子作用機轉研究

The Molecular Mechanism of Growth Inhibition Effects Of  
Chrysophanol on Human Hepatoma Hep3B Cells And Lung Carcinoma  
A549 Cells

研究生：倪健航

中華民國九十六年七月二十三日

# 目錄

中文摘要	1
第一章 前言	1
第一節 研究背景	1
第二節 研究目的	1
第二章 緒論	3
第一節 大黃酚(Chrysophanol)	3
第二節 肝癌與肺癌	5
第三節 細胞週期	11
第四節 細胞轉移	14
第五節 細胞壞死與細胞凋亡的比較	17
第三章 研究設計與研究架構	20
第一節 研究設計	20
第二節 研究架構	20
第四章 材料與方法	21
第一節 實驗材料	21
一. 細胞來源	21
二. 實驗藥物	22
三. 藥品試劑	22
四. 儀器設備	25
第二節 實驗方法	26
一. 細胞解凍	26
二. 人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 的培養	27
三. 細胞計數與細胞死活的辨別	28
四. 大黃酚與 PBS 的配製	28
五. 檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 生長 的影響	29
A. 利用倒立式位相差顯微鏡觀察細胞形態的變化	29
B. 利用流式細胞儀檢測細胞存活率	29

六. 檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 細胞週期的影響	32
A. 利用流式細胞儀分析人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 的細胞週期	32
B. 利用西方墨點法 (Western blotting) 檢測參與 Hep3B 與 A549 細胞週期的調控蛋白表現量的差異	32
七. 檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 產生細胞壞死的影響	39
A. 利用 DAPI 染色觀察細胞核內 DNA 破壞情況	39
B. 利用 Comet assay 觀察細胞拖尾的情況	40
C. 利用流式細胞儀檢測細胞內粒線體膜電位、ROS、鈣離子在大黃酚作用下的變化	42
八. 檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 內 ATP 產量的變化	47
九. 檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 轉移能力的影響	49
A. 細胞移行實驗 (Migration assay)	49
B. 細胞穿透試驗 (Invasion assay)	49
C. 西方墨點法檢測參與 Hep3B 與 A549 細胞轉移的調控蛋白表現量的差異	50
十. 統計方法	50
<b>第五章 實驗結果</b>	<b>51</b>
第一節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 與肺癌細胞株 A549 形態的影響	51
第二節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 抑制增殖作用	58
第三節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞週期的影響	61
第四節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內粒線體膜電位的影響	74

第五節	大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內 活性氧化物(ROS)產生之影響	79
第六節	大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞 A549 細胞內鈣 離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 產生之影響	85
第七節	大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內 ATP 產生之影響	89
第八節	大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內 DNA 產生之影響	92
第九節	西方墨點法檢測參與 Hep3B 與 A549 細胞壞死的調控蛋白 表現量的差異	97
第十節	大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 在轉移 相關步驟所造成的影響	108
(一)	以細胞移動試驗分析大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 之細 胞移動現象的影響	108
(二)	以細胞穿透試驗分析大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的 細胞穿透現象之影響	111
(三)	利用西方點墨法探討大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 細胞 轉移相關調控蛋白表現量的差異	112
(四)	以細胞移動試驗分析大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 的細胞 移動現象之影響	116
(五)	以細胞穿透試驗分析大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 之細胞 穿透現象之影響	119
(六)	利用西方點墨法探討大黃酚對 A549 細胞轉移相關調控蛋白 之表現量的差異	120
<b>第六章</b>	<b>討論</b>	<b>124</b>
<b>第七章</b>	<b>結論</b>	<b>129</b>
<b>參考文獻</b>		<b>131</b>
<b>Abstract</b>		<b>145</b>

## 圖目錄

圖 2-1 大黃酚的化學結構	3
圖 2-2 細胞凋亡與細胞壞死的形態區別	18
圖 3-1 實驗架構	20
圖 4-2-A 流式細胞儀 Propidium Iodide 染色之細胞存活率分析圖	30
圖 4-2-B 西方墨點法-轉漬夾的內部組成	37
圖 4-2-C DAPI 染劑鍵結在 DNA 雙股螺旋小溝上	39
圖 4-2-D MMP 軟體的分析圖	43
圖 4-2-E ROS 軟體分析圖	44
圖 4-2-F 鈣離子軟體分析圖	46
圖 5-1-A Hep3B 細胞處理 chrysophanol 24 小時形態變化	52
圖 5-1-B Hep3B 細胞處理 chrysophanol 48 小時形態變化	53
圖 5-1-C Hep3B 細胞處理 chrysophanol 72 小時形態變化	54
圖 5-1-D A549 細胞處理 chrysophanol 24 小時形態變化	55
圖 5-1-E A549 細胞處理 chrysophanol 48 小時形態變化	56
圖 5-1-F A549 細胞處理 chrysophanol 72 小時形態變化	57
圖 5-2-A Hep3B 細胞處理 chrysophanol 各個時間點存活率變化	59
圖 5-2-B A549 細胞處理 chrysophanol 各個時間點存活率變化	60
圖 5-3-A Hep3B 細胞處理 chrysophanol 24 小時細胞週期變化	62
圖 5-3-B Hep3B 細胞處理 chrysophanol 48 小時細胞週期變化	63
圖 5-3-C Hep3B 細胞處理 chrysophanol 72 小時細胞週期變化	64
圖 5-3-D Hep3B 細胞處理 chrysophanol 不同時間的細胞週期電腦分析 圖	65
圖 5-3-E Hep3B 細胞處理 chrysophanol 不同時間的細胞週期變化	66
圖 5-3-F A549 細胞處理 chrysophanol 24 小時細胞週期變化	67
圖 5-3-G A549 細胞處理 chrysophanol 48 小時細胞週期變化	68
圖 5-3-H 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 CDK2 和 thymidylate synthase 之變化	69
圖 5-3-I 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 cyclin-D 和 p21 之變化	70

圖 5-3-J 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 p27 和 p53 之變化 -----	71
圖 5-3-K 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 CDK2 和 thymidylate synthase 之變化 -----	72
圖 5-3-L 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 cyclin D 之變化 -----	73
圖 5-4-A chrysophanol 對 Hep3B 細胞內粒線體膜電位的影響 -----	75
圖 5-4-B chrysophanol 對 Hep3B 粒線體膜電位影響的相對量統計圖 --	77
圖 5-4-C chrysophanol 對 A549 粒線體膜電位的影響 -----	78
圖 5-5-A chrysophanol 對 Hep3B 細胞內 ROS 之 6 小時內的影響 -----	80
圖 5-5-B chrysophanol 對 Hep3B 之 12 到 72 小時的 ROS 的影響 -----	82
圖 5-5-C chrysophanol 對 Hep3B 的 ROS 的相對表現量統計圖 -----	83
圖 5-5-D chrysophanol 對 A549 細胞內 ROS 的影響 -----	84
圖 5-6-A chrysophanol 對 Hep3B 細胞內鈣離子 6 小時內的影響 -----	86
圖 5-6-B chrysophanol 對 Hep3B 之 $Ca^{2+}$ 6 小時內的表現量之統計圖 --	87
圖 5-6-C chrysophanol 對 A549 細胞內鈣離子的影響 -----	88
圖 5-7-A 細胞內 ATP 濃度檢測原理 -----	89
圖 5-7-B chrysophanol 對 Hep3B 細胞內 ATP 之的影響 -----	90
圖 5-7-C chrysophanol 對 A549 細胞內 ATP 之的影響 -----	91
圖 5-8-A DAPI 試驗來觀察 chrysophanol 對 Hep3B 的 DNA 傷害 -----	93
圖 5-8-B 利用彗星試驗來觀察 A549 的拖尾現象 -----	94
圖 5-8-C DAPI 試驗來觀察 chrysophanol 對 Hep3B 的 DNA 傷害 -----	95
圖 5-8-D 利用彗星試驗來觀察 A549 的拖尾現象 -----	96
圖 5-9-A 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 GST 的變化 -----	97
圖 5-9-B 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 SOD (Mn) 和 SOD (Cu) 的變 -----	98
圖 5-9-C 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 catalase 和 PARP 的變化 -----	99
圖 5-9-D 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白	

caspase 8 和 caspase 9 的變化 -----	100
圖 5-9-E 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 cytochrome <i>c</i> 和 Apaf-1 的變化 -----	101
圖 5-9-F 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 AIF 的變化 -----	102
圖 5-9-G 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 GST 和 catalase 的變化 -----	103
圖 5-9-H 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 SOD (Mn) 和 SOD (Cu) 的變化 -----	104
圖 5-9-I 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 cytochrome <i>c</i> 和 PARP 的變化 -----	105
圖 5-9-J 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 caspase 3 和 caspase 8 的變化 -----	106
圖 5-9-K 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 Apaf-1 和 AIF 的變化 -----	107
圖 5-10-A~E chrysophanol 對於 Hep3B 細胞移動現象之影響 -----	108
圖 5-10-F chrysophanol 對於 Hep3B 細胞穿透現象之影響 -----	111
圖 5-10-G 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 PI3K 和 ERK 的變化 -----	112
圖 5-10-H 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 MMP-1 和 MMP-2 的變化 -----	113
圖 5-10-I 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 MMP-7 和 COX-2 的變 -----	114
圖 5-10-J 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 Hep3B 細胞內蛋白 VEGF 和 EPO 的變化 -----	115
圖 5-10-K~O chrysophanol 對 A549 細胞移動現象之影響 -----	116
圖 5-10-P chrysophanol 對於 A549 細胞穿透現象之影響 -----	119
圖 5-10-Q 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白 PI3K 和 ERK 的變化 -----	120
圖 5-10-R 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白	

JNK 和 MMP-1 的變化 -----	121
圖 5-10-S 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白	
MMP-7、MMP-9 和 NF- $\kappa$ B 的變化 -----	122
圖 5-10-T 以西方墨點法分析 chrysophanol 對於 A549 細胞內蛋白	
VEGF 和 EPO 的變化 -----	123
圖 7-1 大黃酚影響細胞週期的路徑圖 -----	130
圖 7-2 大黃酚影響細胞壞死的路徑圖 -----	130



## 表目錄

表 2-1：細胞凋亡與細胞壞死在形態上的差異	-----17
表 4-1：Hep3B 細胞株相關資料	-----21
表 4-2：A549 細胞株相關資料	-----22
表 4-3：10 倍磷酸鹽緩衝溶液	-----29
表 4-4：蛋白質標準品之配製	-----33
表 4-5：SDS-PAGE 下層膠(separation gel)之配製及組成	-----34
表 4-6：SDS-PAGE 上層膠(stack gel)之配製及組成	-----34
表 4-7：Running buffer( 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 )之組成	-----35
表 4-8：Stacking buffer( 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 )之組成	-----35
表 4-9：轉印緩衝液( Transfer buffer )之組成	-----37
表 4-10：PBS-tween 20 之組成	-----38
表 4-11：comet assay 之 lysis buffer 配製	-----41
表 4-12：alkaline buffer 之配製	-----41
表 4-13：Tris buffer 之配製	-----41

## 縮寫對照表

AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptosis activating factor-1
APS	Ammonium persulfate
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
Caspase	Cysteine asparate protease
CDK2	Cyclin-Dependent Kinase 2
COX-2	Cyclooxygenase 2
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
D.D.Water	Double Deionized Water
DioC6	3,3'-Dihexyloxacarboyanine iodide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Emodin	1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Endo-G	Endonuclease G
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
GADD153	Growth arrest and dna damage-inducible gene 153
GRP78	Glucose-regulated protein 78
GSH	Glutathione
GST	Glutathione s-transferase
HIF-1	Transcription factor Hypoxia-Inducible Factor 1

H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
Indo-1-AM	[1-[2-amino-5(4-carboxylindol-2-yl)-phenoxy]-2-(2' amino-5-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
JNK	Jun N-terminal kinase
LG	L-glutamate
LMA	Low-meliting gel
MTT	3-(4,5)-dimethylthiahiazo (-z-y1)-3,5-di-phenytetrazoliumromide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP ( $\Delta\psi_m$ )	Mitochondrial membrane potential
MMPS	Matrix metalloproteinases
NAC	N-acetyl cysteine
NF $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NMA	Normal melting point agarose
PS	Penicillin / Streptomycin
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerases
PI	Propidium Iodide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superoxide Dismutase
TEMED	N,N,N',N'-Tetrame
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

# 中文摘要

研究生：倪健航

指導教授：江素瑛 博士

中國醫藥大學中國醫學研究所

大黃酚 (chrysophanol, 1,8-Dihydroxy-3-methyl-9,10-anthracenedione) 是從蓼科植物大黃萃取得來的蒽醌類 (anthraquinone) 衍生物的生物鹼。一些相關文獻顯示大黃酚具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗老化、降血脂、治療動脈粥狀硬化、抗記憶衰退、與抗癌作用。大黃酚的抗癌分子作用機轉尚未被詳細報導。

本研究即針對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 來探討大黃酚是否具有抑制這兩株細胞的增殖及轉移相關表現的能力。由存活率結果顯示，在處理大黃酚 24 小時後，大黃酚對 Hep3B 細胞與 A549 細胞的增殖就能有效的抑制，其  $IC_{50}$  皆大約為  $50 \mu M$ 。

由細胞形態變化、DAPI 試驗陽性表現及彗星試驗的拖尾現象，顯示大黃酚對於此兩株細胞的 DNA 具有破壞的能力，進而導致細胞死亡。

大黃酚使細胞內的活性氧化物 (ROS) 增加、鈣離子 ( $Ca^{2+}$ ) 濃度增加，進而粒線體膜電位改變及 ATP 濃度下降；但 Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1)、caspase 8 與 caspase 9 蛋白質表現量無顯著變化，綜合上述實驗結果，大黃酚誘使 Hep3B 細胞與 A549 細胞死亡是以壞死性的細胞死亡方式進行。

在細胞週期的檢測結果顯示，發現大黃酚促使細胞傾向於 S 期的比例增長，檢測細胞週期調控蛋白的表現；隨著加藥的時間增加，*p21*、*p27* 及 *p53* 蛋白質表現量上升，而 cyclin D、CDK2、thymidine synthase 等蛋白表現下降，可能由於 DNA 損傷後被磷酸化，使的在細胞週期過程中從 S 期到 G<sub>2</sub> 期的推移蛋白 cyclin A/CDK2 complex 受到抑制。

在移動和穿透性試驗的結果顯示，大黃酚能抑制兩株細胞在在轉移相關的表現，且會抑制轉移相關調控蛋白 PI3K、ERK、MMPs 及 VEGF、EPO、NF- $\kappa$ B 的表現。

綜合以上結果，大黃酚對於Hep3B細胞及A549細胞的增殖及轉移的相關表現確實有顯著的抑制作用，值得進一步研究發展成為抗癌藥物。



# 第一章 前言

## 第一節 研究背景

根據衛生署統計，從民國 71 年起，癌症已成為國人十大死因之首，其中肺癌與肝癌更在近年來已成為癌症死亡率的前兩名<sup>1</sup>。

由於現今社會人口的年齡結構逐漸提高，因老化所伴隨而來的疾病也日益增加，儘管醫療儀器日益先進以及醫療技術日漸發達，人類仍無法擺脫癌症的威脅，反而日益嚴重<sup>2-5</sup>。另外，癌細胞會對目前臨床的化學療法或是放射療法產生抗藥性以及耐受性，使得原本已難以治療的癌症更增加醫療人員的困擾<sup>6-9</sup>。因此，除了不斷研發新的製劑以及診斷技術外，針對腫瘤的抗藥性及轉移能力而採取的抗癌策略成了未來研究的新主流<sup>10-13</sup>。

目前世界各國及台灣對中草藥等天然藥物或藥膳食品日漸重視，若能採取較科學化的步驟，研發其中的有效成分以及作用機轉，尤其是在癌症預防藥物的開發，取其副作用較小的優點，既可有助於癌症的預防及治療，又可提升病人的生活品質<sup>14-17</sup>。

## 第二節 研究目的

關於癌症的因應之道，唯有「早期發現早期治療」是唯一的治療法則，當惡性腫瘤仍位於原發病的病灶區而尚未突破外在包覆的基底膜之前，此時是最易於治療的階段，主要以手術切除為主，再視情況輔以放射線療法或化學療法，如此，將有很高的治癒率<sup>18,19</sup>。不幸的是當病人因出現腫瘤所造成的症狀而就醫時，往往病程已處於中、末期，此時的腫瘤除了對於原病灶區的組織或器官形成混雜的共生結構，更甚者，因為癌細胞具有微血管增生的特性以資對外交通，進而轉移到許多遠方的組織與器官，在治療上形成很棘手的狀況<sup>20-22</sup>。因此，為能達到早期治療的目標，則必須要有良好的診斷工具，若能針對癌細胞的各種病理過程的分子機轉進行深入研究，將有助於開發有效的臨床篩檢工具，相信對於治療方面也能不斷找到新方向以因應癌細胞的抗藥性<sup>23-25</sup>。

本論文研究目的，以蒽醌類的大黃酚（chrysophanol；1，

8-dihydroxy-3-methyl-9, 10-anthracenedion) 進行體外癌細胞研究，探討對人類肝癌細胞株 Hep3B 及人類肺癌細胞株 A549 是否具有生長抑制及轉移抑制的作用，並探討其分子機轉，以期在診斷及治療方面能有良好的輔助。



## 第二章 緒論

### 第一節 大黃酚 (Chrysophanol)

#### 一. 大黃酚的化學性質

1. 藥品名：大黃酚
2. 化學名：1,8-dihydroxy-3-methyl-9,10-anthracenedion；  
1,8-dihydroxy-3-methyl-anthraquinon；3-methylchrysazin<sup>26,27</sup>。
3. 異名：chrysophanic acid<sup>28</sup>
4. 分子式：C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>
5. 分子量：254.23
6. 化學結構式<sup>29</sup>：

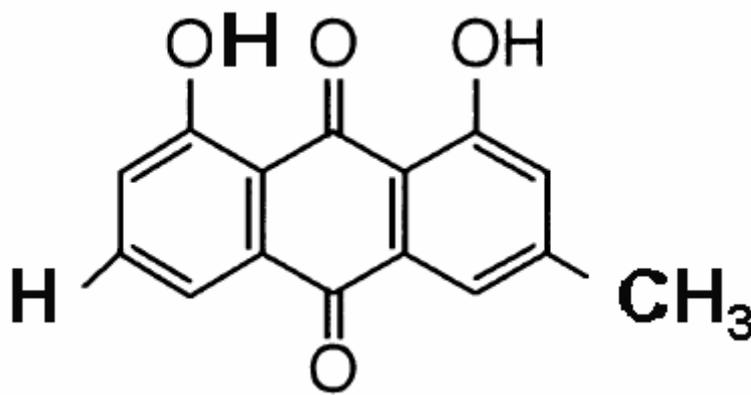


圖 2-1 大黃酚的化學結構

7. 植物來源：
  - a. 掌葉大黃 (*Rheum palmatum* L.) 的根與莖<sup>30</sup>。
  - b. 唐古特大黃 (*Rheum tanguticum* Maxim.) 的根與莖<sup>31</sup>。
  - c. 藥用大黃 (*Rheum officinale* Baill.) 的根與莖。
  - d. 蓼科植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb.) 的乾燥根莖和根。
  - e. 蓼科植物何首烏 (*Polygonum multiflorum* Thunb) 的乾燥塊根。
  - f. 豆科植物決明子 (*Cassiae obtusifolia* L.) 的乾燥成熟種子。

## 二. 大黃酚的性質與研究進展：

1. 經皮吸收性：大黃酚在酸性介質中的透皮效果最佳，且 Azone 對其透皮吸收有顯著增強作用<sup>32</sup>。
2. 抗衰老：大黃酚對 AlCl<sub>3</sub> 致急性衰老小鼠記憶障礙有保護作用；大黃酚可顯著抑制大鼠肝、腦 LPO 的生成，減少組織 MDA 含量，在體內、外均可顯著抑制小鼠腦 AChE 的活性，且具有劑量相關性<sup>33</sup>。
3. 對心血管系統的作用：可降血脂、治療動脈粥狀硬化<sup>34</sup>。
4. 對於微生物的作用：抗菌、抗微生物、抗幽門螺旋桿菌及抗原蟲<sup>35-37</sup>。
5. 止血作用：大黃酚具有明顯縮短小鼠出血時間<sup>1,38,39</sup>。

## 三. 大黃酚

大黃酚主要是從傳統中藥植物大黃萃取而來，大黃最早記載於《神農本草經》提到：...主下瘀血，血閉寒熱，破癥瘕積聚，留飲宿食...。臨床應用極廣，主要功效包括瀉下、攻積滯、利膽、退黃、清熱解毒、瀉火涼血、止血活血及利水消腫等。

大黃的成分主要為蒽醌類 (anthraquinone) 衍生物，總量大約 3~5%，大部分為結合態，是造成瀉下的有效成分<sup>40</sup>。結合態的成分可分成兩類，分別為蒽醌苷及雙蒽醌苷。雙蒽醌苷中有六種番瀉苷其中以番瀉苷 A 的瀉下作用最強，能使大腸段的張力增加、蠕動加快，但是並不妨礙小腸的吸收。游離型的蒽醌包括大黃酸、大黃酚、大黃素、蘆薈大黃素、大黃素甲醚等，致瀉的作用較弱，大黃酚能縮短凝血時間，改善血管脆性，降低血管通透性，能使纖維蛋白原增加血管收縮活動增加及促進骨髓製造血小板，因此大黃的止血作用主要成分是大黃酚<sup>38,39</sup>。根據研究，大黃酚對於一些癌細胞具有抑制生長的作用<sup>41</sup>，早期的文獻報導指出，經由 DNA 電泳及 MTT 實驗顯示大黃酚對於血癌細胞 HL-60 具有細胞毒殺作用<sup>42</sup>；大黃酚對於大腸癌細胞株 SW620 的 Cdc25B 磷酸化具有抑制作用<sup>43</sup>，而對於人類肺癌細胞株 AGZY 83-a 及肝癌細胞株 SMMC-7721 的生長也有抑制作用<sup>44</sup>。

## 第二節 肝癌與肺癌

### 一. 肝癌

肝癌是肝細胞異常變化的一種疾病，因為分裂失控而形成癌化的腫瘤。這種癌症稱為原發性肝癌<sup>45,46</sup>。原發性肝癌又稱為惡性肝腫瘤或肝細胞癌。另外，很多年幼小孩可能會產生另一種型態的肝癌被稱為肝臟胚細胞瘤<sup>47,48</sup>。

#### 肝癌的成因

肝癌的形成與感染 B 型及 C 型肝炎有關<sup>49,50</sup>。臨床估計 10~20% 感染 B 型肝炎的人可能會罹患肝癌。在台灣有 80~90% 肝癌患者曾感染過 B 型肝炎。而 C 型肝炎和肝癌之間的確切關係仍在研究當中。

研究發現患有某些肝疾病的人們有較高的機率罹患原發性肝癌。例如，5~10% 肝硬化（一種進行性導致肝臟損傷的疾病）的病人最後會罹患肝癌。一些研究也顯示生活型態，如長期酗酒及營養失調及肝癌家族史等皆會導致肝硬化和肝癌<sup>51</sup>。

大部分的癌症都有各自獨特的致癌因素，像是黃麴毒素容易導致肝癌，石綿及煙塵易導致肺癌<sup>52</sup>。黃麴毒素易存在於發黴的食物中<sup>53</sup>，例如花生、玉蜀黍、穀類和種子，尤其在潮濕地區中或氣候下，食物保存不當而容易發黴，長期食用則易導致肝癌發生<sup>54</sup>。

#### 肝癌的症狀

早期原發性肝癌因為初期的症狀不明顯，所以是很難察覺。如同其他癌症一般，肝癌也會產生一些常見的身體不適的症狀。肝癌會容易伴隨食慾下降、體重減輕、發燒、疲倦和虛弱的現象，容易令病人誤以為只是一般的感冒症狀<sup>55</sup>。

當癌細胞不斷分裂複製，腫瘤逐漸增大，病人的右上腹部可能會產生疼痛的現象而且可能會牽延到肩背部。依病人不同體型及腫瘤大小，有些人可能會摸到上腹部有腫塊。肝癌也會導致腹部腫脹且有飽脹感。有些患者可能會有噁心或黃疸的現象<sup>56</sup>。

#### 肝癌的分期

目前臺灣對肝癌分期的標準尚未有共識，大多根據美國癌症委員會（AJCC）將肝癌分為六期<sup>57</sup>，主要是依肝癌發生部位、腫瘤數量、大小、

侵犯淋巴結及轉移作為分期之依據<sup>58-60</sup>：

第一期：

2 cm 以下之單一腫瘤，沒有侵犯血管，沒有轉移到淋巴結、其他組織或器官。

第二期：

已侵犯血管且小於 2 cm 以下的單一腫瘤；或沒有侵犯血管且大於 2 cm 以上的單一腫瘤；或所有腫瘤皆小於 2 cm 以下，並局限於單肝葉之多個腫瘤。以上腫瘤均未轉移到淋巴結、其他組織或器官。

第三期 A：

已侵犯血管且大於 2 cm 以上的單一腫瘤，或小於 2 cm 以下局限於單肝葉之多發性腫瘤；或局限於單肝葉，其中有任一腫瘤大於 2 cm 以上，不論有無侵犯血管之多個腫瘤。以上腫瘤均未轉移到淋巴結、其他組織或器官。

第三期 B：

無侵犯淋巴血管之單一腫瘤，或局限於單肝葉，不論大、小或有無侵犯血管之多個腫瘤。以上腫瘤已經有轉移到局部之淋巴結，但尚未轉移到其他組織或器官。

第四期 A：

已有多個腫瘤發生，且未局限於單個肝葉；腫瘤包含了門靜脈及肝靜脈的主要分枝；腫瘤侵入了如膽囊等相鄰器官；腫瘤造成腹膜臟層穿孔。以上腫瘤不論有、否轉移到局部之淋巴結，但未轉移到遠端其他組織或器官。

第四期 B：

不論單只有一個或多個腫瘤，不論腫瘤大、小，不論腫瘤是否局限於單個肝葉，不論腫瘤是否有侵犯到血管或相鄰器官，只要有轉移到遠端其他組織或器官，通常轉移至骨骼或肺臟。

### 肝癌的診斷

除了詢問病史、詳細的理學檢查外，血液學檢驗可以用來測試肝臟的功能以及檢查腫瘤標記，胎兒蛋白在肝癌患者通常會異常的升高。約有 50~70% 的肝癌患者其胎兒蛋白 ( $\alpha$ -fetoprotein, AFP) 指數會升高

<sup>61,62</sup>。但是其他癌症如生殖母細胞瘤、胰臟癌或胃癌患者，胎兒球蛋白指數也可能上升。胸部及腹部 X 光檢查，電腦斷層和核磁共振也可用來做診斷工具<sup>63,64</sup>。而血管攝影可以幫助醫師判斷是原發性肝癌或身體其他部位擴散來的轉移性癌症<sup>65</sup>。

若要確立肝癌的診斷，最可靠的是接受切片檢查。經由 X 光的指引使用細針進入腹腔內，在肝臟取得少量之組織在顯微鏡底下觀察是否有癌細胞的存在，此法稱為細針切片。也可以使用腹腔鏡來觀察肝臟，在腹腔鏡檢查的過程中醫師會取下一小塊的組織，利用顯微鏡觀察是否有癌細胞的存在<sup>65,66</sup>。

### 肝癌的治療

除非在腫瘤很小時就被發現，否則肝癌很難被控制。然而，治療可減輕症狀並改善患者的生活品質。依疾病的分期、肝臟功能、患者的年齡及身體一般狀況不同，臨床的常規的治療方式包括手術、化學治療、放射線治療、生物製劑療法或合併使用<sup>67</sup>。

#### 1. 手術治療

手術治療目的在切除腫瘤部份或置換肝臟，冷凍切除是一種經由冷凍殺死癌細胞的手術方法<sup>19</sup>。

#### 2. 肝動脈血管栓塞術 (Transcatheter Arterial Embolization, TAE)

正常肝臟有 70-75% 的血液是由門靜脈所供應，只有 20-30% 是來自肝動脈，而癌細胞之生長所需血液 90-95% 來自肝動脈，若能將肝動脈閉塞，則肝癌細胞會因缺少血液之供應而壞死<sup>68</sup>。肝動脈血管栓塞術是利用導管進入肝動脈靠近肝癌的地方注入含碘的油性栓塞物質

(Lipiodol) 及抗癌藥物之混合液使肝動脈閉塞。一般而言，肝動脈栓塞術對於大型肝癌、肝功能代償良好的患者，但它可能造成非肝癌部份的肝細胞壞死，所以對肝功能已失代償的肝癌患者，做完肝動脈栓塞術後可能會引發進一步肝衰竭而致死<sup>69</sup>。

#### 3. 經皮酒精注射法 (Percutaneous Ethanol Injection)

其原理是利用純酒精可以使細胞脫水、以及蛋白質凝固進而造成血管栓塞、阻塞而達到腫瘤壞死的效果。患者是否適合進行經皮酒精注射治療，其條件包括：所有腫瘤直徑不超過 3 公分，腫瘤數目少於 3 個，

無腹水無出血傾向者。經皮穿肝高濃度酒精注射療法是經由局部麻醉後，以細長的針準確的插入腫瘤內，將 99.5% 的高濃度酒精緩緩打入肝癌病灶部位。整個療程須多次進行，一般每週約 2-3 次。大部份經皮酒精注射治療之後的患者會有局部疼痛、發冷、顫抖、發燒之現象，經過服用少量止痛劑後，就可緩解<sup>70</sup>。

### 放射線治療

原理是利用高能量射線殺死癌細胞或使腫瘤縮小。放射線治療分體內及體外治療。使用機器在體外進行照射即體外放療。直接置放一個裝有放射線物質的薄塑膠管子於腫瘤部位，即體內放射線治療。放射線治療時可併用一些藥物來增加癌細胞對放射的敏感度<sup>71</sup>。

### 化學治療

肝癌的化學治療通常是插入細針到體內的靜脈或動脈。藥物會藉由血液循環進入全身以殺死肝臟外的癌細胞，故屬於全身性的治療。另外也有局部性的化學治療，將連續藥物注射的幫浦置放在體內，直接打入到達腫瘤處之血管。一般在手術移除腫瘤後，患者多半會在術後接受化學治療來殺死可能殘存的癌細胞。所以術後的化學治療稱為輔助性化學治療<sup>19,72</sup>。

### 高溫療法

因為癌細胞比正常細胞對熱更敏感，利用一種特殊的機器來加熱身體某一部份一段時間以殺死癌細胞，藉此使癌細胞會死亡、腫瘤縮小稱為高溫療法，目前仍在臨床試驗階段<sup>73</sup>。

### 生物製劑療法

又稱「生物反應調節劑療法」或「免疫治療生物製劑療法」，目前仍在臨床試驗階段，是利用一種讓身體自行對抗癌症的方法。某些物質由身體或在實驗室製造，被用來加強、指揮或恢復身體自然防禦機制以對抗疾病<sup>61</sup>。

## 二. 肺癌

由於肝炎防治的成功大大降低了肝癌的威脅，加上空氣污染日益嚴重，因此肺癌的死亡率已凌駕肝癌，成為國人癌症的頭號殺手，而在跨

入新世紀之後，預期兩者的差距還將逐漸拉大<sup>1</sup>。

肺癌的發生大多是不好的基因加上不佳的生活習慣和環境造成的。容易罹患肺癌的不良生活習慣或環境包括：吸菸及二手菸（百分之七十的男性與百分之三十的女性肺癌歸因於菸害）、空氣污染（近半的女性腺癌歸因於廚房油煙）、飲食習慣（高脂、低抗氧化物食物）、原有肺部疾病（譬如由肺結核的陳舊癥痕長出癥痕癌）、暴露於石棉粉屑或富含氡等輻射源的環境等。而不良基因是指容易致癌的不良體質或遺傳因素導致癌細胞失控、對於致癌物的清除能力較差、基因容易受損或基因受損後不易修復以及免疫功能有缺陷等<sup>52,74,75</sup>。

### 肺癌的種類

依照生長的特性、患者的臨床表現，肺癌可區分為小細胞肺癌和非小細胞肺癌兩大類型<sup>76</sup>。在台灣的小細胞肺癌患者約佔肺癌患者的12%，非小細胞肺癌患者則佔88%。

1. 小細胞肺癌（small cell lung cancer）：其發生與吸菸有關，這種肺癌生長快速，短時間就可能出現轉移，診斷時，約有一半的比例癌細胞已經擴散，常見的轉移部位為縱膈腔的淋巴結、肝臟、腦部、骨頭、骨髓與腎上腺。因此，手術通常並非適當的治療。不過，小細胞肺癌對化學治療及放射線治療比較敏感，因此，治療以全身性化學治療為主，對尚未發生轉移的病人治療期中再輔以放射線的局部治療，有八成以上的患者在治療後腫瘤明顯縮小一半以上。也有些極早期的病灶，採行手術切除腫瘤並加以化驗後，才確定為小細胞肺癌，因而在術後也應加以化學治療，以防止有潛藏的癌細胞轉移。大多數治療後腫瘤縮小一半以上的患者兩年內可能再復發，復發後易對先前使用過的化療藥有抗藥性且放射線治療效果也不佳<sup>77</sup>。

2. 非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer）：非小細胞肺癌主要包括腺癌、鱗狀細胞癌及大細胞癌三種類型，以腺癌最常見（包括肺泡細胞癌），特別是女性和不吸菸者和肺臟的舊癥痕有密切關連（癥痕癌常為腺癌），腺癌常發生在肺臟的週邊，容易在早期就波及肋膜，出現惡性積液，為惡性肋膜腔積液最常見的原因；鱗狀細胞癌常發生在較大的氣管而引起咳嗽、咳血等症狀，也易因阻塞呼吸道而出現喘鳴或阻

塞性肺炎；大細胞癌比較少見，可能出現在肺臟任何部位，細胞分化度較差。

非小細胞肺癌的生長比較緩慢，轉移也較遲緩，但對化療及放射線治療通常較不敏感，因此，理應及早開刀治療來尋求根治。但是此類的患者中，只有四分之一的患者能夠早期發現，可以完全切除的也只有 20 %。而有淋巴結轉移，特別是縱膈淋巴結轉移的患者，術後出現轉移或復發的機會比較高。較晚期尚未發現轉移的局部肺癌，常需要多形式的混合治療，以提高患者的治癒率與存活率，特別是對於局部晚期原來不適合開刀的病例，約有三分之二的病人因術前化療變成可以接受手術，其中一半病例腫瘤可完全切除。即便不能開刀切除，在化學治療之後加上放射線治療或同時放、化療，也會有比較好的治療效果，這種先化療再手術的治療觀念也可應用到早期的非小細胞肺癌病例，因為早期的病例手術切除後的復發率，尤其是轉移擴散的機會，仍然相當的高，因此也應當視為全身性的疾病加以治療<sup>78</sup>。

對於早期的非小細胞肺癌患者若身體狀況不適合開刀，接受放射線治療後，也有少部分可以獲得根治。

### 第三節 細胞週期

近年來，隨著細胞和分子生物學的發展，人們逐步認識到細胞週期不僅與細胞增殖直接相關，而且也與細胞分化和凋亡有關，可見細胞週期調節失控是細胞癌化的重要原因<sup>79</sup>。

細胞週期是指各次細胞分裂之間的時間，包括 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M 四期。細胞週期調控是在各期的控制點（check points）上進行的<sup>80</sup>。細胞週期中存在兩個重要的控制點：一個位於 G<sub>1</sub>/S 交界處，在哺乳類動物細胞中稱為限制點（restriction point）<sup>80</sup>，當 G<sub>1</sub> 期內的正調節因數累積達到適當的程度而可以越過 R 點，以後就不須依賴細胞外促生長因數而順序完成整個細胞週期；另一個位於 G<sub>2</sub>/M 交界處，它在染色體分開和細胞分裂前保證染色體均分的精確性<sup>81</sup>。

目前人們發現的細胞週期調控因數很多，可歸納三大類：（1）細胞週期素(cyclins)、（2）細胞週期素依賴性激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)、（3）CDK 抑制蛋白(cyclin dependent kinase inhibitor proteins, CKIs)。CDKs 是細胞週期調控的重要環節，其通過使下游蛋白（pRb 及其相關蛋白 p107、p130）的磷酸化來完成調節作用的<sup>82</sup>；cyclins 是 CDKs 的正調節因數，能啟動 CDK 活性；CKIs 是負調節因數，可抑制 CDK 活性。現從 CDKs 及下游調節蛋白、cyclins 和 CKIs 三方面闡述細胞週期調控因數在細胞週期調節中的作用<sup>83</sup>。

#### 一、CDKs 及其下游蛋白

目前已發現的 CDK 至少有九種<sup>84</sup>，分別命名為 CDC<sub>2</sub>（CDK1）、CDK2~CDK9，它們在基因序列上的同源性高，超過 40%。活化的 CDK 包含催化亞單位（CDK）和一個正調亞單位（cyclin），前者還需一個保守的 Thr 殘基上的磷酸化和 Tyr 殘基上的去磷酸化。

CDK 被啟動後，可使其下游蛋白發生磷酸化。未磷酸化的 pRb 能夠結合轉錄因數 E<sub>2</sub>F，並抑制 E<sub>2</sub>F 啟動 S 期相關基因的轉錄。磷酸化的 pRb 或 pRb 能導致 E<sub>2</sub>F 的游離。游離的 E<sub>2</sub>F 與 DP-1 形成異源二聚體，能夠結合到 DNA 的特定位點，啟動 S 期相關基因轉錄，使週期越過 R 點，細胞即從 G<sub>1</sub> 期進入 S 期<sup>85</sup>。

## 二、Cyclins

目前已發現的 cyclins 有 12 種，分別命名為 cyclin A~H<sup>84</sup>。根據細胞週期的時相，分為 G<sub>1</sub>、S 和 M 期以及作用尚未明確的 cyclins。cyclins 的過度表達可以啟動 CDK 活性，造成細胞週期調節失控，導致腫瘤的形成，因此 cyclins 也被稱為癌蛋白。

G<sub>1</sub> 期的 cyclins 包括 cyclin C、D、E 等三型，其中後兩型是主要的 cyclins。cyclin D 至少有 D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 等三個亞型，三型 cyclin D 的胺基酸序列同源性達 53.1% ~ 63.5%，它們的 c 末端有一個富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、天冬氨酸、絲氨酸(S)和蘇氨酸(T)的殘基序列，稱之為 PEST 序列，與蛋白質的降解有關；它們的 N 末端有一個與某些轉化蛋白如 SV40 的 T 抗原、腺病毒 E<sub>1</sub>A 蛋白、乳頭瘤病毒 E<sub>7</sub> 蛋白共同序列 Leu-X-Cys-X-Glu，此序列一樣可與 pRb 及 pRb 相關蛋白結合，隨後在 CDK4 / CDK6 的作用下，使 pRb 磷酸化，從而使細胞從 G<sub>1</sub> 期進入 S 期。一些生長因子 (growth factors, GFs) 可誘導它們的表達，一旦去除 GFs, cyclin D<sub>1</sub> 的水準會迅速下降，因此，稱它為生長因子感受器 (growth factor sensors)<sup>86</sup>。在 G<sub>1</sub> 期，給正常的成纖維細胞顯微注射抗 cyclin D<sub>1</sub> 抗體，能夠阻止細胞進入 S 期，但在接近 G<sub>1</sub> / S 交界處時則注射無效，這一結果表明 cyclin D<sub>1</sub> 在 G<sub>1</sub> 的中晚期發揮著重要作用。cyclin E 在 G<sub>1</sub> 期的表達晚於 cyclin D<sub>1</sub>，在 G<sub>1</sub> / S 交界處達到高峰，進入 S 期後逐漸下降，給細胞顯微注射抗 cyclin E 抗體，可阻止細胞進入 S 期，因此被認為是調節 G<sub>1</sub> / S 期轉換的必需蛋白<sup>87</sup>。細胞進入 S 期後，cyclin E 降解，和它結合的 CDK2 被釋放出來和 cyclin A 結合。

S 期 cyclins 包括 cyclin A。它是 cyclins 中最早被發現的，在 G<sub>1</sub> 晚

期於 cyclin E 之後表達，但直到 S 期與 CDK<sub>2</sub> 結合後才被啟動。給細胞顯微注射抗 cyclin A 抗體或反義 cyclin A 能抑制細胞 DNA 的合成，表明 cyclin A 在 S 期有重要作用<sup>88</sup>。另外，它在 G<sub>2</sub> 期與 M 期和 CDC<sub>2</sub> (CDK1) 結合，可能與有絲分裂有關，因此，cyclin A 也被稱為 M 期 cyclins。

### 三、CKIs

1992 年，Xiong 等在提煉純 cyclin-CDK 複合物時，得到了另外一些蛋白質，後來證明其中某些蛋白是該複合物的抑制因子即 CKIs<sup>89</sup>。CKIs 在細胞週期中具有負性調節作用及多數在人類腫瘤中突變失活的事實，提示其可能是抑癌基因。根據它們序列同源性，可分為兩個族：第一族包括 *p16*、*p15*、*p18* 和 *p19*，它們均包含四次錨蛋白 (ankyrin) 重複結構和特異的調控 cyclin D-CDK4 或 cyclin D-CDK6 活性；第二族包括 *p21*、*p27* 和 *p57*，它們抑制多種 cyclin-CDK 活性<sup>90</sup>。

*p21* 基因定位於染色體 6p21.2，又稱為 cip1 (CDK-interacting protein 1)，*waf1* (wild-type p53-activated fragment 1)。哺乳動物細胞中，*p21* 的功能至少有兩方面：一是 CDK 的抑制因子，另一個是能結合和抑制增殖細胞核抗原 (PCNA)，從而抑制 DNA 的複製。*p21* 的 N 端和 C 端分別擔負起這兩方面的作用<sup>91</sup>。*p21* 能抑制多種 cyclin-CDK 活性，推測其突變可能是腫瘤形成的主要原因之一。然而目前除了在膀胱癌中發現一個終止密碼子的點突變外，尚未見到關於其他腫瘤細胞中 *p21* 基因突變的報導。*p21* 基因在轉錄水準上主要受 *p53* 調節和啟動，而 *p53* 基因突變在人類腫瘤中卻是常見的，故現認為 *p21* 基因主要失活機制與 *p53* 失活有關<sup>92</sup>。

## 第四節 細胞轉移

“轉移”一詞自1829年由法國Jo sesh Claude Recamcer 提出，之後人們對腫瘤轉移機理的研究獲得很多有價值的新資訊<sup>93</sup>。逐漸瞭解癌細胞的轉移影響治療及癒後，並對於癌症的復發有重要的影響。惡性腫瘤在診斷時出現局部淋巴結轉移的比率1/3~1/4，而腫瘤致死亡的主要原因就是腫瘤細胞的轉移<sup>94</sup>。

癌細胞浸潤和轉移過程非常複雜，大致可分為以下幾個過程：

1. 腫瘤血管的形成。
2. 癌細胞從原發部位脫落。
3. 癌細胞與細胞外基質、基底膜發生黏附並降解。
4. 脫落的癌細胞穿越血管壁進入循環並到達遠處部位。
5. 在繼發部位繼續增殖形成轉移病灶。

腫瘤侵襲與轉移步驟最早是由 Liotta 所提出的粘附、降解和移動三步驟假說<sup>95</sup>，但是隨著近年來對腫瘤為血管研究的深入，發現腫瘤的轉移與微血管的形成密切相關。一些文獻顯示，腫瘤惟有具備血管形成表現型之後才能轉變成惡性和具備轉移的能力，說明微血管的形成是腫瘤侵襲和轉移的關鍵<sup>96</sup>。

腫瘤血管形成的過程類似於正常血管生成的生理機轉，當腫瘤細胞分泌血管生成因子之後，可直接刺激附近的內皮細胞改變形狀，並遷移到腫瘤附近，開始分化形成血管並伴隨著基質降解酶以破壞基底膜，遷移後的內皮細胞不斷的增殖分化，在其前緣的部份持續增殖分化，而後緣的部份逐漸形成管腔結構，最後形成新生血管。

許多研究顯示，促進血管形成的因數有很多，例如vascular endothelial growth factor (VEGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、transforming growth factor (TGF)、interleukin-8 (IL-8)、matrix metalloproteinases (MMPs) 及血小板生成刺激因子。其中，血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是最有普遍意義的刺激因子，VEGF是內皮細胞專一的促有絲分裂因數，主要作用於內皮細胞上的flk、flt1、flt4等3個受體<sup>97</sup>，一方面可促進微血管內皮細胞增殖遷移，另一方面可促進微血管通透性增加<sup>98</sup>。有實驗顯示，比較單位體積

腫瘤血管的表面積，VEGF表現的腫瘤是不表現者的六倍，而VEGF表達的減少顯著降低腫瘤體積血管密度和通透性進而造成轉移能力降低<sup>99</sup>。

腫瘤發生浸潤轉移的過程主要是指癌細胞的粘附降解及細胞移行進入微血管中的過程，此過程有共同的分子機制它們非常協調一致地組織起來以共同發揮作用<sup>100</sup>。細胞粘附（cell adhesion）在惡性腫瘤轉移過程中具有重要作用，腫瘤細胞間的附著減弱使腫瘤細胞脫離與週遭細胞的附著，此為腫瘤浸潤即轉移的初步。接著，腫瘤細胞粘附於基質和血管內皮細胞並進入循環系統造成轉移<sup>101</sup>。

在參與破壞細胞外基質的酵素中，基質金屬蛋白酶是重要的酵素，目前已知有 20 多中 MMPs，主要分類有（1）間質膠原酶類（2）明膠酶類（3）基質溶素類（4）膜類。其中明膠酶類中的 MMP-2 和 MMP-9 是研究較多的兩種。目前大量研究證實細胞外基質 ECM 的降解在腫瘤連鎖步驟中是關鍵步驟，而 MMPs 降解 ECM 的機制是因為 MMPs 家族是一個蛋白水解酶家族，能降解各類的膠原、纖維粘連蛋白、層粘連蛋白、彈性蛋白等這些基底膜骨架。另外，MMPs 也能提高內皮細胞活動性及調節黏附作用<sup>102</sup>。

PI3K 對於癌細胞的影響是多方面的，它也是轉移的上游調控蛋白及接受整合素和 FAK 上游信號的媒介之一，調節細胞的黏附與遷移。PI3K 若被專屬抑制劑渥曼青素抑制其活性，則會阻斷癌細胞的黏附，因此細胞黏附中均有 PI3K 的參與，由此認為，PI3K 在整合素介導的黏附反應中扮演了重要的角色，也證明 PI3K 在腫瘤的轉移中有重要的作用。比較直腸正常組織及其癌組織中 PI3K 蛋白表達，研究結果表明，PI3K 在癌組織中的表達明顯高於正常組織，並且隨著 DUKES 分期的進展及淋巴結轉移，PI3K 表達量逐漸升高，說明隨著腫瘤惡性度的增加 PI3K 的表達量逐漸升高，PI3K 被活化。有研究證實增加 PI3K 活性，可使高分化的結直腸癌向低分化型轉化<sup>103</sup>。

NF- $\kappa$ B 是一類廣泛存在於體內多種細胞的核轉錄因子，參與多種疾病病理生理過程。最早是由 Sen 和 Baltimore 在 1986 年首次發現的為調節小鼠 B 淋巴細胞中  $\kappa$  輕鏈表達的轉錄因子<sup>104</sup>，NF- $\kappa$ B 在抗細胞凋亡、細胞增生、細胞轉移、血管生成的機轉上也扮演重要的角色，通常以同源或

異源二聚體的形式存在，最常見的形式為P50 / P65組成的二聚體。細胞在非刺激狀態下，NF- $\kappa$ B與它的抑制物I $\kappa$ B結合而呈位活化的形式存在於胞質，當細胞受到損傷刺激後，由I-kappa B kinase (IKK) 來降解I- $\kappa$ B而使NF- $\kappa$ B可以進入細胞核。從許多研究成果中發現Protein kinase C (PKC)、Akt可促使I-kappa B kinase (IKK) 來分解I kappa B，致使NF- $\kappa$ B進入細胞核進而使NF- $\kappa$ B可以調節細胞癌化。近年研究發現，NF- $\kappa$ B 與癌症的發生、發展和轉移有關，其中重要機制就是NF- $\kappa$ B 可能通過調節COX-2 的表達在癌細胞增殖過程中起重要作用<sup>38,105</sup>。

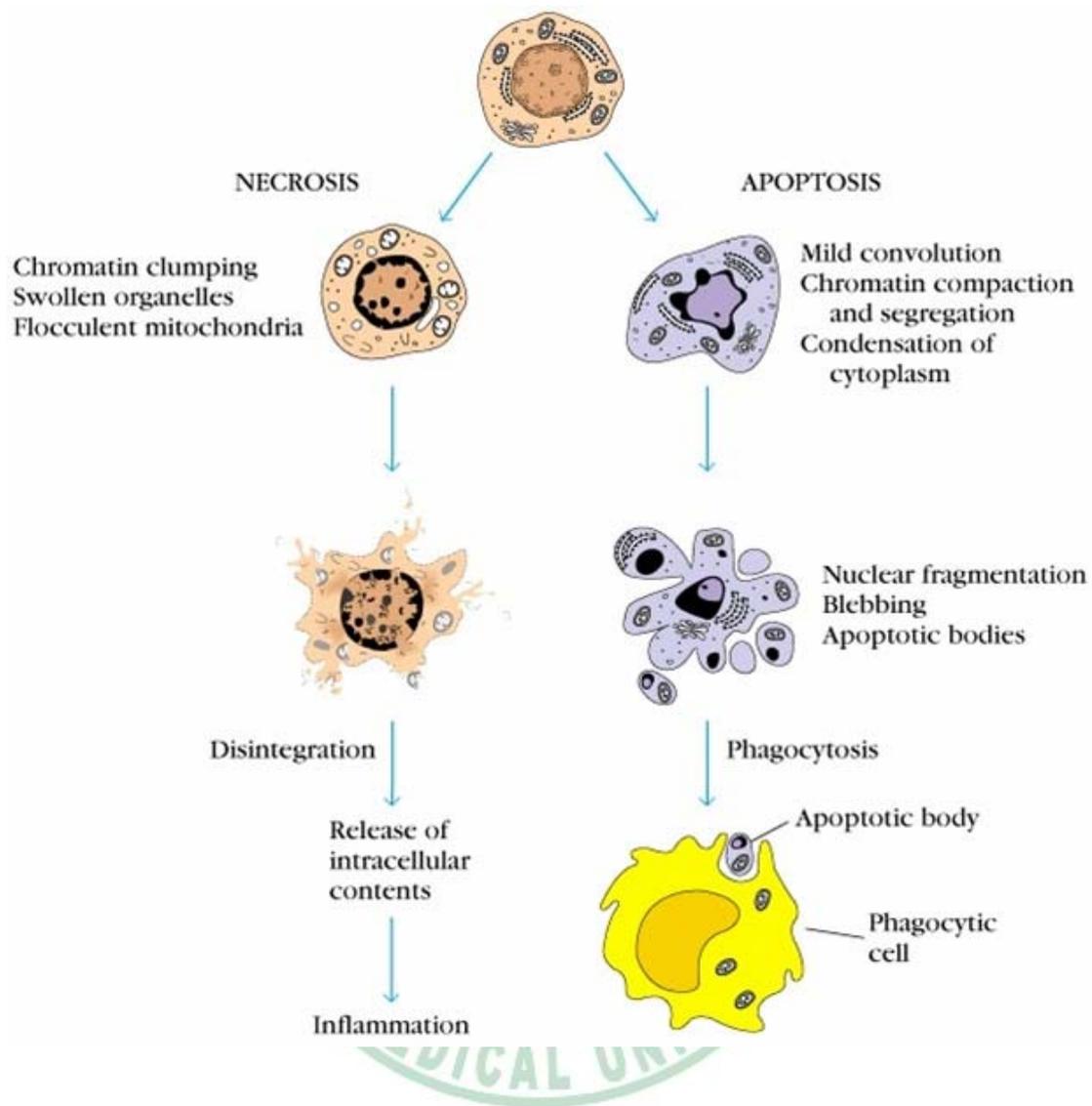
COX-2 是一種誘導性酵素，在正常生理狀態下多數組織檢測不到，只有在細胞因子、腫瘤促進劑、癌基因等刺激下才能在細胞內迅速產生。Su<sup>106</sup> 等的研究表明，COX-2 可能通過EP1 和HER-2 / Neu 受體途徑上調控血管內皮生長因子-C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 的表達，進而促進肺腺癌的淋巴管生成和淋巴結轉移。其中，血管內皮生長因數 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 是血管內皮生長因子家族中專一作用于淋巴內皮的成員。

## 第五節 細胞壞死與細胞凋亡的比較

一. 細胞凋亡與細胞壞死在形態上的差異：

表 2-1：細胞凋亡與細胞壞死在形態上的差異<sup>107</sup>

Apoptosis	Necrosis
首先細胞皺縮	首先細胞膨脹
染色質濃縮成類似新月形碎片，並貼附在細胞核內面	染色體濃縮成小叢，外表呈不規則狀，最後消失
胞器仍完整	胞器不完整，如粒線體不正常腫脹
細胞膜皺縮成不規則突起狀，最後形成凋亡小體，其外仍有完整細胞膜	細胞膜破裂形成 Necrotic debris
被鄰近巨噬細胞清除	被單核吞噬系統清除
無發炎反應	有發炎反應
為生理現象	為病理現象



[www.bion.com/biology/cellular/40103.shtml](http://www.bion.com/biology/cellular/40103.shtml)

圖 2-2 細胞凋亡與細胞壞死的形態區別

## 二. 細胞壞死細胞凋亡在分子機轉上的差異

除了形態上的差異，細胞壞死與細胞凋亡在分子機轉上也存在具體的差異。在細胞凋亡方面，caspase 系列包括屬於外在路徑的 caspase 8、

內在路徑的 caspase 9 及共同路徑的 caspase 3 皆呈現活化的現象，進而使 PARP 分裂成不活化態<sup>108</sup>。Apaf-1 由粒線體所釋放，若 Apaf-1 的表現量增加，其會與 caspase 9 及 cytochrome *c* 結合形成 apoptosome，導致 caspase 3 活化<sup>109</sup>，並活化一連串的下流反應，最終導致細胞凋亡。另外，凋亡誘導因子（AIF）與核酸內切酶（Endo-G）也是從粒線體釋放，直接作用於細胞核，引起 DNA 片斷化，進而引起細胞凋亡，這兩個蛋白的作用過程，不受 caspase 系列影響而獨立於 caspase 之外，在細胞凋亡過程中，由於胞器完整，細胞膜也完整，故蛋白的生合成是持續進行的<sup>110</sup>。

在細胞壞死的早期階段，因為胞器及細胞膜已受到損害，因此一些蛋白的生合成往往呈低落狀態，故在 caspase 系列的蛋白及 Apaf-1、AIF 及 Endo-G 的表現量皆降低；而因應 DNA 損害的修復蛋白 PARP 除了生合成會相對增加，也因為 caspase 的表現量沒有增加，PARP 的裂解也就沒有增加，故活化態的 PARP 就沒有降低，在 PARP 修復 DNA 的過程，需要消耗 ATP，因此 PARP 的表現量增加且伴隨著細胞內 ATP 濃度下降是細胞壞死的主要特徵<sup>111</sup>。

### 第三章 研究設計與研究架構

#### 第一節 研究設計

探討大黃酚對於人類肝癌細胞 Hep3B 及肺癌細胞 A549 的影響：

(1) 是否可以抑制人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 的生長；(2) 影響細胞週期及細胞凋亡或細胞壞死的進行，以找出抑制細胞生長或促使細胞壞死的調控因子；(3) 找出影響細胞移動及穿透的調控因子，透過這些因子的調控，證明大黃酚抑制人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 的機轉。

#### 第二節 研究架構

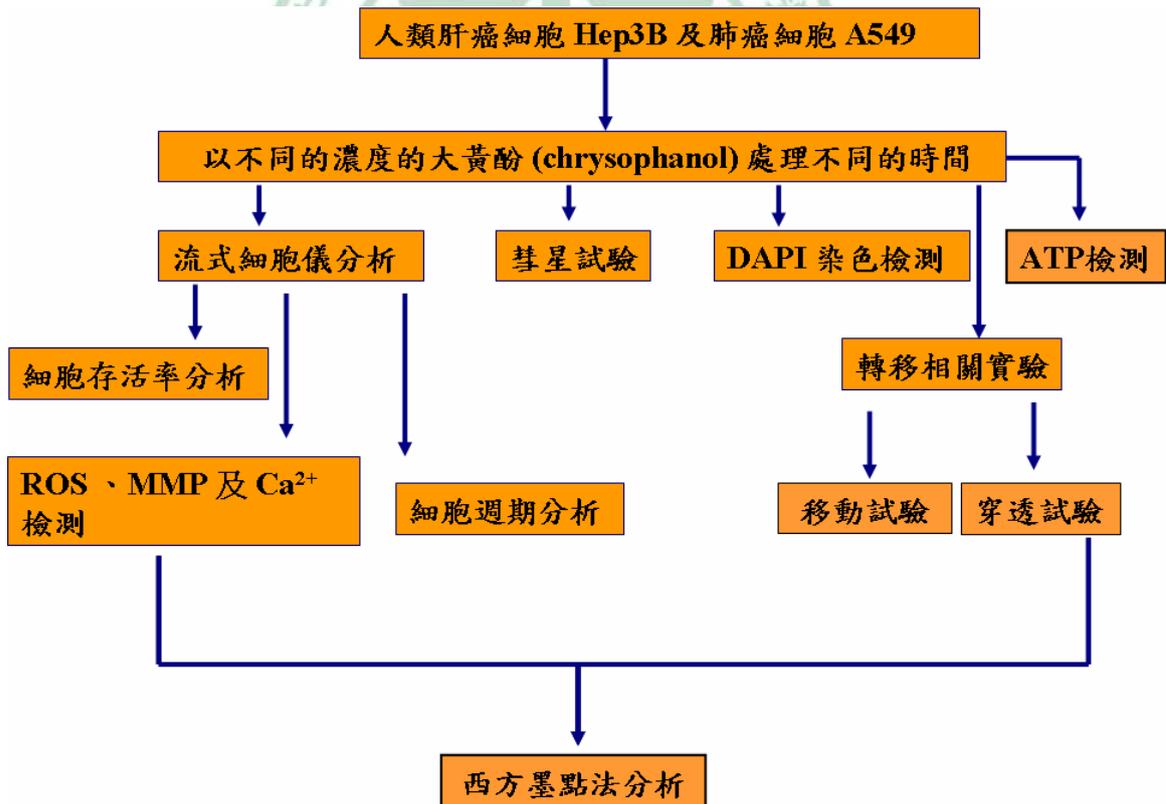


圖 3-1 實驗架構

## 第四章 材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 一、細胞來源

本論文的實驗細胞株有兩株，分別為人類肝癌細胞株 Hep3B 及人類肺癌細胞株 A549，皆購自新竹食品工業發展研究所菌種中心。

#### A. Hep3B

表 4-1：Hep3B 細胞株相關資料

Cell No.	60434
Cell type	Human hepatocellular carcinoma
Species	Homo sapiens (human)
Strain / Ethnicity	Black
Age / Stage	8 years
Gender	Male
Tissue	Liver ; hepatocellular carcinoma
Growth property	Adherent
Morphology	Epithelial
Incubation condition	37 °C ; 5% CO <sub>2</sub>
Culture medium	90% DMEM (debulco minimum essential medium) + 10% fetal bovine serum + 5 mL L-glutamine + 5 mL P/S
Freeze medium	93% culture medium + 7% DMSO

B. A549

表 4-2：A549 細胞株相關資料

Cell No.	60074
Cell type	Human lung carcinoma
Species	Homo sapiens (human)
Strain / Ethnicity	Caucasian
Age / Stage	58 years
Gender	Male
Tissue	Lung carcinoma
Growth property	Adherent
Morphology	Epithelial
Incubation condition	37 °C ; 5% CO <sub>2</sub>
Culture medium	90% Ham's F-12K medium with 2 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g / L -sodium bicarbonate + 10% fetal bovine serum
Freeze medium	93% culture medium + 7% DMSO

二、 實驗藥物

大黃酚：購自 Sigma, MO, USA 公司

三、 藥品試劑

1. Agarose I：購自 Amresco
2. Acrylamide / Bis 40% solution (ACRYL / BIS™ 29:1)：購自 Amresco
3. Ammonium persulfate (APS)：購自 Amersco
4. ATP Determination Kit：購自 Blossom Biotechnologies, Inc.
5. BioMax Flim：購自 Kodak
6. Bovine serum albumin (BSA)：購自 Merck
7. Dimethyl sulfoxide (DMSO)：購自 Sigma Chemical Co.

8. 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide (DioC6) : 購自 Molecular Probes
9. Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) : 購自 Merck
10. DMEM medium : 購自 Gibco
11. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amersham
12. Ethanol : 購自 TEDIA
13. Fetal bovine serum (胎牛血清 ; FBS) : 購自 Gibco
14. Formaldehyde : 購自 Merck
15. Glycine : 購自 Amresco
16. Ham's F-12K medium : 購自 Gibco
17. L-Glutamine (麩胺酸 ; LG) : 購自 Gibco
18. Methanol : 購自 TEDIA
19. Penicillum Streptomycin (PS) : 購自 Gibco
20. PhiPhiLux<sup>®</sup>-G<sub>1</sub>D<sub>1</sub> kit : 購自 OncoImmunin (Gaithersburg ; MD ; USA)
21. Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : 購自 Merck
22. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
23. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
24. Protein marker : 購自 Femantas
25. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
26. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amersco
27. 10X SDS buffer (Sodium dodecyl sulfate) : 購自 Amresco
28. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck Trypsin-EDTA : 購自 Amersco
29. Trypan blue : 購自 Sigma Chemical Co.
30. Triton X-100 : 購自 Sigma chemical Co.
31. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine) : 購自 Amresco
32. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane) : 購自 Amresco
33. Tween 20 : 購自 Amresco
34. 顯影劑 : 購自 Kodak

35. 定影劑：購自 Kodak
36. 核酸純化試劑組 (DNA purification kit)：購自 Gene Mark
37. 蛋白質萃取試劑 (protein extraction solution) (PRO-PREP)：購自 iNtRON Biotechnology, INC.
38. 5X TBE buffer：購自 Amresco
39. Primary antibody (1°抗體)：
  - (a). anti-actin：購自 Oncogen
  - (b). anti-caspase 3：購自 Upstate
  - (c). anti-caspase 8：購自 Upstate
  - (d). anti-caspase 9：購自 Upstate
  - (e). anti-cytochrome *c*：購自 Oncogen
  - (f). anti-CDK2：購自 Upstate
  - (g). anti-phosphorylation ERK：購自 Upstate
  - (h). anti-JNK：購自 Upstate
  - (i). anti-Phosphorylation JNK：購自 Upstate
  - (j). anti- NF kappa B Rel—α(p65)：購自 Upstate
  - (k). anti-p38：購自 Upstate
  - (l). anti-p53：購自 Oncongen
  - (m). anti-PARP：購自 Upstate
  - (n). anti-MMP-1：購自 Oncongen
  - (o). anti-MMP-2：購自 Sigma Chemical Co.
  - (p). anti-MMP-7：購自 Oncongen
  - (q). anti-MMP-9：購自 Sigma Chemical Co.
40. Secondary antibody (2°抗體)：
  - a. anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon
  - b. anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon

#### 四、儀器設備

1. 細胞培養皿：購自 FALCON
2. 細胞培養盤：購自 FALCON
3. 細胞培養箱：購自 Nuair
4. 細胞計數器 (haemocytometer)：購自 Boeco
5. 倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope)：購自 Olympus
6. 微量天平 (TE-200; MILLTER)
7. 去離子水製造機：購自 Minipore
8. 電源供應器：購自 Amersham
9. 酸鹼值測定計 (C831)：購自 Consort
10. DNA 電泳槽：購自 Mupid-2
11. Mini-3D Shaker：購自 Boeco
12. PVDF membrane：購自 Minipore
13. SDS-PAGE 電泳槽套組：購自 Bio-Rad
14. Transfer Cell Blot 套組：購自 Bio-Rad
15. 加熱板：購自 Lab-Line
16. 流式細胞計數儀 (flow cytometry)：購自 Becton Dickinson
17. 高速離心機：購自 HERMLE
18. 分光光度計：購自 Beckman
19. 光學顯微鏡 (Nikon LABOPHOT-2)：購自 Nikon
20. 酵素免疫分析儀 (Anthos 2020)：購自 Anthos Labtec, Australia

## 第二節 實驗方法

### 一、細胞解凍

細胞解凍的過程須掌握快速的原則，否則重新結晶的冰晶與濃度過高的 DMSO 將會造成細胞傷害。DMSO 具有介面活性劑的性質，對於細胞膜具有傷害性，但是 DMSO 的濃度小於 1% 的情況下是安全的，為了避免在凍細胞的過程中，因水分形成的冰晶傷害細胞，往往將 DMSO 的濃度調高到 7% 以作為抗凍的措施。所以當快速解凍後也必須快速的加入培養基以稀釋 DMSO 到 1% 以下。

在細胞解凍前，預先取 9 mL 的新鮮培養基（DMEM 或 F12K）至離心管中備用，再從液態氮桶中取出裝有 Hep3B 或 A549 的冷凍管。將冷凍管置於水浴槽內於 37 °C 下迅速回溫，在未完全解凍尚有些許小冰塊的狀態下，在無菌操作檯中，將細胞吸取到裝有培養基的離心管中，稍微搖勻之後再進行離心。轉速為 1500 rpm，需時 5 分鐘。離心後丟棄上清液，稍微拍散離心後的細胞團塊，再加入新鮮培養基 10 mL 並混合均勻形成細胞懸浮液，將細胞懸浮液注入培養瓶（flask）中培養，隔天觀察細胞貼附的狀況並更換新鮮的培養基，大約培養一星期後，在細胞恢復正常活性後才開始做實驗。

## 二、人類肝癌細胞株 Hep3B 與肺癌細胞株 A549 的培養

### (1) 培養基的製備

人類肝癌細胞株 Hep3B 以 DMEM 500 mL，內含 10% 胎牛血清、2 mM 的 Penicillin / Streptomycin 及 2 mM 的 L-glutamine。

人類肺癌細胞株 A549 以 F-12K 500 mL，內含 10% 胎牛血清、2 mM 的 Penicillin / Streptomycin 及 2 mM 的 L-glutamine。

### (2) 細胞的培養

人類肝癌細胞株 Hep3B 與肺癌細胞株 A549 的培養條件皆是培養在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的 incubator 中培養，約每隔 1~2 天更換一次培養基，直到瓶中細胞長到八分滿為止，再視需要以進行分盤或繼代。

### (3) 細胞繼代與細胞分盤

當細胞成長到八分滿即可將細胞取下進行分盤或繼代培養，以免細胞過度擁擠導致細胞狀態不佳，甚至造成細胞形態改變。

方法：當細胞長到八分滿，在無菌操作檯內將培養液取出棄於廢棄桶內，用 PBS 細胞 1~2 次，接著加入 0.1% trypsin 約 2~3 mL，細胞脫落後，用新鮮培養基中和 trypsin，將所有的細胞懸浮液取出，裝入離心管中，以 1500 rpm 離心五分鐘，離心後倒掉上清液，輕拍管底部以分散細胞團塊，加入 10 mL 新鮮培養基，用電動吸量管反覆吸吐以充分混合細胞液，分取 20  $\mu$ L 細胞懸浮液到 eppendorf 內以進行細胞計數。計算完細胞數目後，依實驗所需求的細胞數目，從細胞懸浮液中取出足夠的細胞量進行分盤，以供實驗操作進行。

若只是要繼代培養，則取  $10 \times 10^5$  個細胞或只取十分之一的細胞懸浮液回種於培養瓶中即可。

### 三、細胞計數與細胞死活的辨別

以血球計數盤 (hemocytometer) 計算細胞的數目，血球計數盤一般有溝槽所區分成兩個區塊，每個區塊中有細刻九宮格圖案，九宮格的邊長為 3 mm，深度為 0.1 mm，九宮格的四個角落的正方形再加上中間的正方形共五格，是用來計算細胞的區域。若蓋上蓋玻片後，整個九宮格的體積為  $9 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 9 \times 10^{-4} \text{ mL}$ 。其中的每一格體積為  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mL}$ 。

數細胞時，在顯微鏡下以既數器計算四個角落及中間的方格等五格內的活細胞數目，總數除以五（每格的平均細胞數），再乘以五（稀釋倍數），再乘以  $10^4$ ，即為每 mL 中的活細胞數。

取  $20 \mu\text{L}$  的細胞懸液與  $80 \mu\text{L}$  0.4% 的 trypan blue 均勻混合，形成五倍的稀釋液，再取  $20 \mu\text{L}$  的稀釋液注入於細胞計數盤上蓋玻片的邊緣，當藍色的液體完全蓋過溝槽所圍繞的區域後，在倒立式位相差顯微鏡下計數五個大方格的細胞總數，依照上述的乘除方式即為每 mL 細胞懸液的細胞數，對於位在每格週邊線上的細胞，則取每一方格同一側的格線為計數範圍。

若以 trypan blue 作為細胞染料，染料會滲入死細胞中而呈藍色，活細胞因為細胞膜完整，染料無法進入細胞中而不會呈藍色，可依此判斷細胞的死活。

### 四、大黃酚與 PBS 的配製

#### (1) 大黃酚的配製

大黃酚以 DMSO 為溶劑，大黃酚的分子量為 254.23，秤取 25.42 mg 的大黃酚溶於 10 mL 的 DMSO 中可配置成濃度為 10 mM 的大黃酚溶液，以此濃度的大黃酚溶液為 stock 以備用，待實驗所需的濃度與用量再予以稀釋，儲存時須避光於  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱。

#### (2) PBS 的配製

製備 10 倍的 PBS，秤取 NaCl 160 g; KCl 4 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  23 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g，加 D.D.Water (double deionized water) 至 2 公升，利用攪拌子攪

拌使完全溶解，以 0.2  $\mu$ m 的濾膜過濾，使用時在加以稀釋成 1 倍的濃度。

表 4-3：10 倍濃度磷酸鹽緩衝溶液（10X phosphate buffer saline, PBS）

組成	重量 (g)
NaCl	160
KCl	4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.8
Add D.D. Water 2000 mL	

#### 五、檢測大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 與肺癌細胞株 A549 成長的影響

##### A. 利用倒立式位相差顯微鏡觀察細胞形態的變化

將繼代後的細胞分盤到 6 well 的培養盤，每 well 以  $2 \times 10^5$  cells / 3 mL 的密度培養，放入培養箱中培養 24 小時後，依濃度差的方式加藥，分別在 24 h、48 h、72 h 時間後在倒立式位相差顯微鏡下以 200 倍的倍率觀察並照相。

##### B. 利用流式細胞儀檢測細胞存活率

本實驗利用流式細胞儀測定癌細胞經藥物處理後是否被藥物所毒殺或抑制增生。

##### (1) 細胞存活率的測定原理

流式細胞儀的分析原理是利用染劑在不同的狀態下會產生不同波長或不同強度的螢光，依照流式細胞儀偵測不同波長或強度螢光的量可區分、定量不同狀態的細胞，所以結合流式細胞儀與不同的染劑，可快速、精確的分析與定量細胞的各種性質。

本實驗的方式是利用 Propidium Iodide (PI) 作為染劑，由於 PI 是

一種核酸染劑，容易結合在 DNA 中的 A = T 鍵與 C ≡ G 鍵上，在雷射光的激發下會散射出紅色的螢光，經流式細胞儀內的偵測器接收後進行分析。若細胞處在健康無破壞的狀態下，PI 染劑無法進入細胞內，也就無法進入細胞核中與 DNA 結合。反之，因細胞膜破損而可以進入核中與 DNA 結合的 PI，會放出較強的紅色螢光<sup>112,113</sup>。

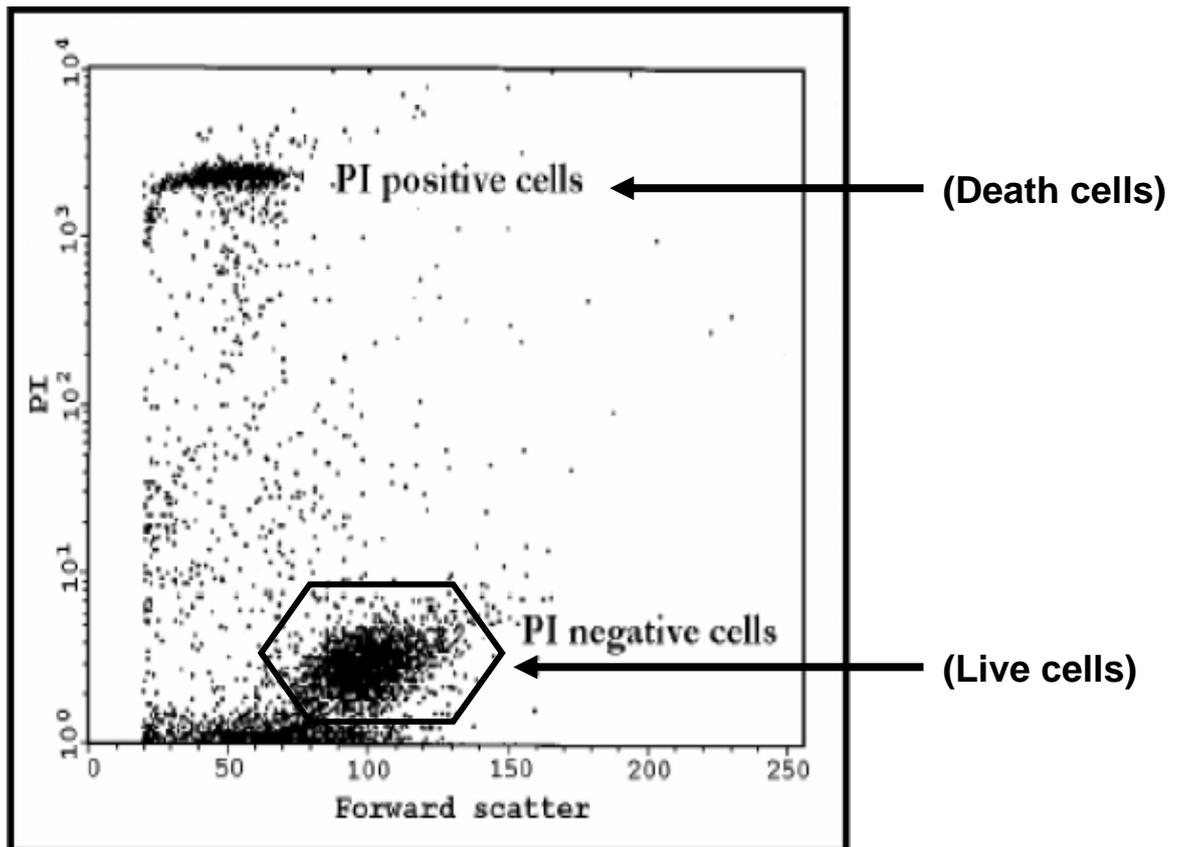


圖 4-2-A 流式細胞儀 Propidium Iodide 染色之細胞存活率分析圖。

## (2) Propidium Iodide 染劑的配製

先配製濃度為 20 mg PI / 100 mL PBS 的 PI stock 做為保存，當實驗需要時，則以 PBS 稀釋 50 倍，一般的方式是取 1 mL 的 PI stock 加入 49 mL 的 PBS 中作為稀釋。

## (3) 存活率實驗步驟

### 1. 分盤

將繼代下來的細胞種植到 6 well 的培養盤，每 well 以  $2 \times 10^5$  cells /

3 mL 的密度培養，放入培養箱中培養 24 小時，待細胞貼壁後再加藥。

## 2. 藥物處理

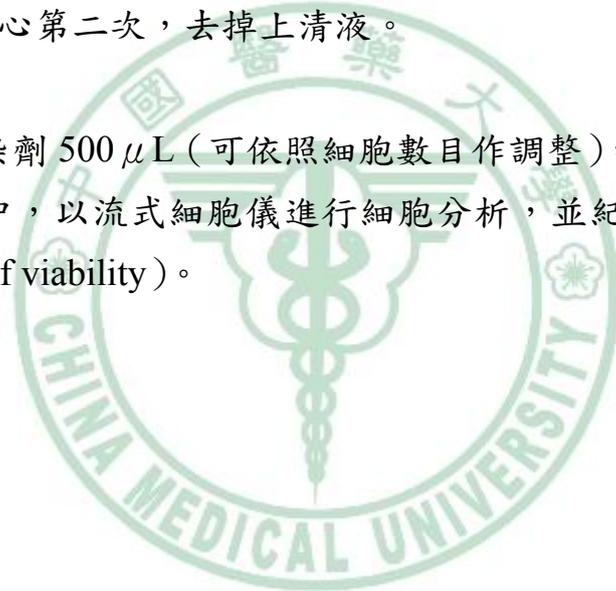
細胞在培養箱中培養 24 小時後，先觀察細胞貼壁狀況、細胞的形態是否正常及細胞疏密狀況，以決定是否適合進行實驗。本實驗依濃度差的方式加藥，藥物處理完後分別持續培養 24、48、72 小時。

## 3. 收取細胞

在藥物處理後，依不同的時間點收取細胞。首先將 well 中的培養液吸取到離心管中，用 PBS 清洗每 well 細胞，用 0.1% trypsin 處理貼壁的細胞使細胞脫落成懸浮狀態。加入 PBS 以中和 trypsin 的作用，再吸取到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉離心後的上清液，再用 PBS 清洗細胞後離心第二次，去掉上清液。

## 4. 加入染劑

加入 PI 染劑 500  $\mu$ L (可依照細胞數目作調整)，均勻混合後，轉移到 FACS 管中，以流式細胞儀進行細胞分析，並紀錄細胞存活百分比 (percentage of viability)。



## 六、檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 細胞週期的影響

A. 利用流式細胞儀分析人類肝癌細胞株 Hep3B 與肺癌細胞株 A549 的細胞週期：

本實驗分別進行濃度差及時間差兩種實驗，濃度差實驗的分盤、加藥及收細胞的方式如同前述細胞存活率實驗的步驟。時間差的藥物處理，只使用 IC<sub>50</sub> 的濃度為加藥濃度，依不同的時間點（6、12、24、48、72 hr）分別收取細胞。

### 1. 細胞固定

細胞在第二次離心後，倒掉上清液，稍微刮散細胞團塊，以 4 °C、70% 的酒精進行細胞固定（vortex 低速震盪，酒精一滴一滴沿著管壁緩慢流入），每一管約加入 2 mL 的酒精。完成後，將固定的細胞置於 -20 °C 的冰箱中使細胞均勻固定完全，一周內進行分析。

### 2. 加入染劑

細胞置於 -20 °C 的冰箱中的固定至少 overnight，隔天將細胞從冰箱取出離心（1500 rpm、5 分鐘），去除上清液，加入 2 mL 的 PBS 清洗一次後，再離心一次，倒掉上清液，刮散細胞團塊，最後在每個離心管中加入 500  $\mu$ L 的 PI 染劑（可依照細胞數目作調整），均勻混合後，形成細胞懸液，將細胞懸液轉移到 FACS 專用管中，避光 30 分鐘，之後以流式細胞儀分析，每秒鐘細胞數不超過 200 顆細胞，每個 FACS 管收集 10000 顆細胞，以 Modfit LT® 軟體進行分析<sup>113,114</sup>。

B. 利用西方墨點法（Western blotting）檢測參與 Hep3B 與 A549 細胞週期的調控蛋白活性：

#### （1）細胞蛋白萃取

將細胞以  $2 \times 10^6$  / dish 的細胞量種植於 10 cm<sup>2</sup> 的 dish 中，每 dish 的培養基量為 10 mL，細胞貼附後，加入 5 mM 濃度大黃酚 100  $\mu$ L 到每一個 dish 中，依不同的藥物作用時間（0、6、12、24、48、72 小時），依序收取細胞。首先將 well 中的培養液吸取到離心管中，用 PBS 清洗每 well 細胞，用 0.1% trypsin 處理貼壁的細胞使細胞脫落成懸浮狀態。

加入 PBS 以中和 trypsin 的作用，再吸取到離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉離心後的上清液，再用 PBS 清洗細胞後離心第二次，去掉上清液後，小心將剩餘的水分吸乾，依細胞量多寡加入 lysing buffer，一般約每  $5 \times 10^6$  的細胞需加入 400  $\mu$ L 的 lysing buffer，將細胞混合均勻後，置於 -20  $^{\circ}$ C 冰箱 overnight，隔天以 14000 rpm 離心 5 分鐘，取其內含有細胞蛋白上清液，再進行蛋白質定量。

## (2) 蛋白質濃度測定

### 1. 蛋白質標準品檢量線製作

以 bradford 定量法，使用胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 為蛋白質標準品配置不同濃度的蛋白質標準品後 (表 4-4)，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 O.D. 595 nm 的條件下測量蛋白質標準品吸光值做檢量線 (standard curve) 分析，求出趨勢線方程式及  $r^2$  value。

步驟：先取 bradford 染劑 2 mL 加 8 mL 二次水形成 5 倍稀釋，混合均勻後備用，取 15  $\mu$ L 配製好蛋白質標準品 (BSA) 加 735  $\mu$ L 的 b bradford 染劑共 750  $\mu$ L 混合均勻，以每 well 加入 200  $\mu$ L 的量，加入 96 well plate 中，靜置 5 min 後測量吸光值，測得標準品之吸光平均值，以 O.D. value (Y) 對蛋白濃度  $\mu$ g/mL (X)，求出趨勢線方程式： $Y = aX + b$ ， $R^2$  value 要趨近於 0.99。

表 4-4：蛋白質標準品之配製

蛋白質濃度 ( $\mu$ g/mL)	100 mg/mL BSA (mL)	D.D. Water (mL)
100	500	0
80	400	100
60	300	200
40	200	300
20	100	400
0	0	500

## 2. 樣品蛋白質定量

取 15  $\mu$ L 樣品蛋白質與 5 倍稀釋的 Bradford 染劑 735  $\mu$ L 混合，反應 5 分鐘後，連同蛋白質標準品一起測定吸光值，所得之吸光值平均，帶入 Y 值 ( $Y = aX + b$ )，求出該 sample 的蛋白質濃度 ( $\mu$ g/mL)。

### (3) SDS-PAGE 電泳分析

#### 1. 試劑材料 (表 4-5 至表 4-8)

表 4-5：SDS-PAGE 下層膠 (separation gel) 之配製及組成

組成	10% separation gel (四片量)	12% separation gel (四片量)
40% acrylamide/Bis (29:1)	5 mL	6 mL
running buffer	5 mL	5 mL
10% SDS	0.2 mL	0.2 mL
10% APS	0.2 mL	0.2 mL
TEMED	20 $\mu$ L	12 $\mu$ L

表 4-6：SDS-PAGE 上層膠 (stacking gel) 之配製及組成

組成	stacking gel (四片量)
D.D. Water	4.06 mL
40% acrylamide / Bis (29 : 1)	1.02 mL
stacking buffer	1.66 mL
10% SDS	66 $\mu$ L
10% APS	33.4 $\mu$ L
TEMED	12 $\mu$ L

表 4-7：電泳緩衝液（running buffer；1.5 M Tris-HCl, pH 8.8）之組成

組成	重量
Tris	36.3 g
D.D.Water	150 mL
HCl	調整至 pH 值為 8.8
加 D.D.Water 到總體積為 200 mL	

表 4-8：stacking buffer（0.5 M Tris-HCl, pH 6.8）之組成

組成	重量
Tris	3 g
D.D.Water	40 mL
HCl	調整至 pH 值為 6.8
加 D.D.Water 到總體積為 50 mL	

## 2. 電泳膠片製作

將配製好的下層膠（表 4-5）注入鑄膠台中，再以 isopropanol 去除氣泡並壓平下膠，靜置一段時間，可觀察管子當中的剩餘下層膠是否凝固，約需 40 分鐘使下層膠凝固後，將 isopropanol 倒掉，注入上層膠（表 4-6）並插上 comb，並避免 comb 的下緣有氣泡產生，待上層膠凝固約需 15 分鐘。

## 3. 電泳

將製好的膠體放置於電泳槽中，加入電泳緩衝液（running buffer；表 4-7），預先將萃取出蛋白質與 5X protein loading dye 混合並以 95 °C 加熱 10 分鐘後，在冰上冷卻後低速離心，依序將標示標準分子量的 multimaker 5  $\mu$ L 及各 sample 18  $\mu$ L 注入膠體的孔槽中，通以電壓 90 伏

特 (volts)，待樣品通過 stacking gel 後，電壓調高為 110 volts，繼續進行電泳，當 SDS-PAGE 染劑跑到 SDS-PAGE 膠片底部後或視需要，即可停止電泳。

#### 4. 轉漬步驟

先將PVDF membrane事先裁剪好，以methanol濕潤10秒後，再浸入轉漬緩衝液中 (transfer buffer；表4-9)，接著將事先裁好的3M濾紙先浸泡在transfer buffer中備用，將轉漬夾打開後，黑色面為底部並朝上，將預先以transfer buffer潤濕的海綿墊片鋪在黑夾上，再將3M濾紙鋪上，接下來裁剪下層膠中所要轉漬的區域後，將SDS-PAGE gel小心的鋪於3M濾紙上，可在濾紙上加入多量的transfer buffer，鋪上SDS-PAGE gel時勿陷入任何氣泡，依序放上PVDF membrane (同樣避免氣泡產生)，及3M濾紙，最後放上一片海綿墊片，再把整個轉漬夾裝好，形成類似三明治夾層狀之構造 (圖4-2-2)。置入已裝有transfer buffer的電泳槽中將黑夾朝負極，紅夾朝正極，電泳槽外圍放置足夠冰塊，使整各系統維持低溫狀態，以免在轉漬的過程中，因溫度過高而熔化SDS-PAGE gel。以400 mA、90分鐘的條件下進行蛋白質轉漬。轉漬完成後取出轉漬膜裁去多餘部分，轉漬膜以0.05% 的tween-20 / 1X PBS清洗3次，每次至少5分鐘。緊接將轉漬膜以2% 的FBS (溶於0.05% tween 20 / 1X PBS中) 進行blocking的步驟，以室溫1小時為條件進行。blocking之後以0.05% 的tween 20 / 1X PBS清洗轉漬膜3次，每次至少5分鐘。倒掉清洗液，加入8 mL的一級抗體 (溶於新鮮配製的blocking solution中，稀釋倍數依不同抗體有所不同)，在4 °C下進行搖盪。隔天一級抗體回收，再以0.05% 的tween 20 / 1X PBS 清洗轉漬膜3次，每次至少5分鐘。加入8 mL稀釋10000倍的goat anti-IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody 二級抗體 (溶於含2% FBS的0.05% tween 20 / 1 X PBS中)，於室溫下搖盪1小時，最後取出轉漬膜，以0.05% 的tween 20 / 1 X PBS清洗3次。

表4-9：轉印緩衝液（transfer buffer）之組成

組成	重量
Tris	4.5 g
glycin	21.6 mL
methanol	300 mL
加 D.D.Water 到總體積 1500 mL	

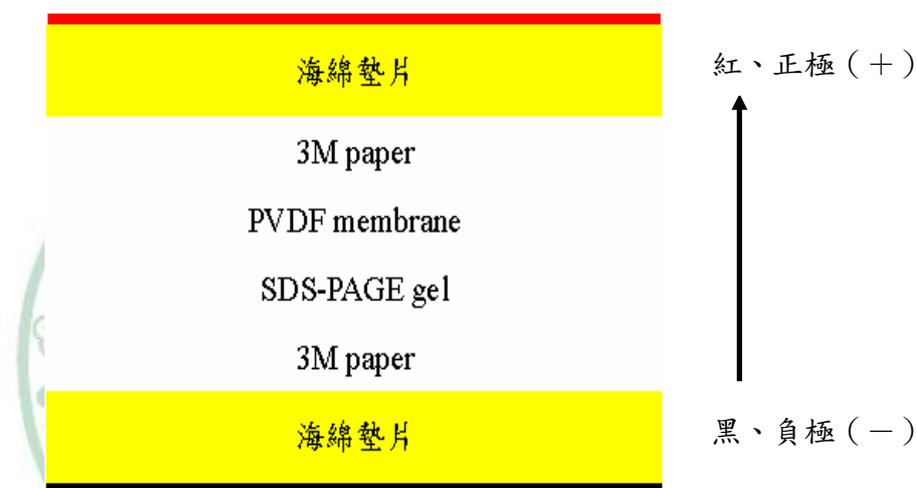


圖 4-2-B 西方墨點法-轉漬夾的內部組成

### 5. 暗房壓片步驟

將轉漬膜浸泡於ECL混合液中（每瓶各取2 mL等比例混合）1分鐘反應。轉漬膜並正面朝上放置於壓片卡匣（cassette）內的兩張透明投影片中間，以hyperfilm軟片置於上層投影片上，對齊轉漬膜進行壓片，感光時間依轉漬膜上螢光亮度決定時間長短，約15秒至30分鐘不等。感光完後放入顯影劑進行顯影步驟（時間依實際觀察決定），再以清水沖洗後浸泡在定影劑中，過30秒後再浸泡清水沖洗。

表 4-10：PBS-tween 20 之組成

組成	重量
Tween 20	500 $\mu$ L
PBS	1000 mL



## 七、檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 產生細胞壞死的影響

### A. 利用 DAPI 染色觀察細胞核內 DNA 破壞情況

#### 1. 原理

DAPI 是一種專一性的核酸螢光染劑，會 binding 在 DNA 雙股螺旋之小溝 (minor groove) 上，當 DNA 受損時會有 DNA 斷裂的情形發生，若細胞核受損越嚴重，DNA 斷裂得越多，則可接上越多的 DAPI 分子，並且 DAPI 與 DNA 接上與否，所散射的螢光強度有很大的差異，透過顯微鏡，可觀察到接上 DAPI 分子的 DNA，其螢光亮度比較強<sup>115</sup>。

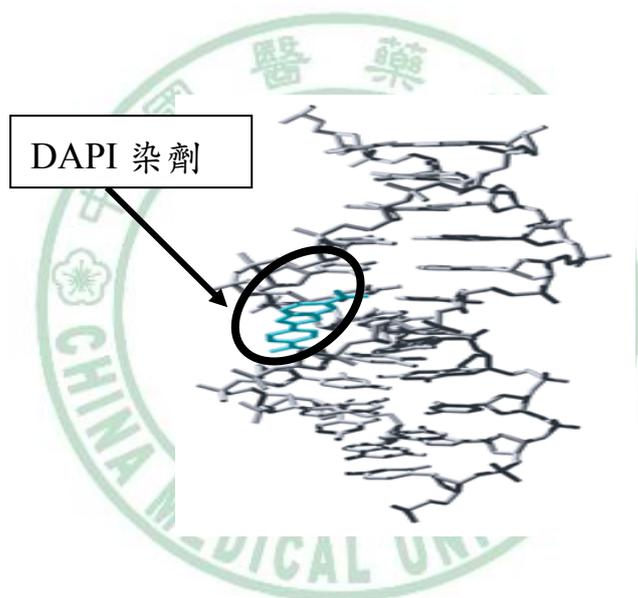


圖 4-2-C DAPI 染劑鍵結在 DNA 雙股螺旋小溝上<sup>116</sup>

#### 2. 實驗步驟

將細胞分盤，種於 6 well plate 當中，每 well 種  $2 \times 10^5$  個細胞（培養基每 well 需 2 mL），隔日細胞貼附後，加入不同濃度的大黃酚，培養 48 小時。

48 小時後進行收細胞，吸取上層液丟棄，加入 PBS 洗 3 次，加入 3% 的 formaldehyde / PBS 固定 10~15 分鐘，再加入 PBS 洗 3 次後，加入 0.1% Triton X-100 / PBS (1 mL) 15 分鐘，再用 PBS 洗 3 次，接下來在

避光下加入 DAPI 染劑 ( $1 \mu\text{L} / \text{mL}$ )  $300 \mu\text{L}$ ，置於  $37^\circ\text{C}$  培養箱避光 30 分鐘後，用 PBS 洗 3 次，在螢光顯微鏡 200 倍下觀察並照相。

## B. 利用 Comet assay 觀察細胞拖尾的情況

### 1. 原理：

彗星試驗又稱為單細胞電泳分析 (single cell gel electrophoresis assay)，可用來分析及定量 DNA 損傷 (DNA damage) 程度。利用 DNA damage 後發生斷裂，藉由電泳將斷裂的 DNA 拖出膜外，形成彗星狀而命名之，可藉由拖尾的長短，觀察 DNA 的損傷程度<sup>117</sup>。

### 2. 實驗步驟：

將細胞分盤，種於 6 well plate 中，每 well 種  $1 \times 10^4 / 3 \text{ mL}$ ，隔日細胞貼附後，分別加入不同濃度的大黃酚，培養 24 小時。加藥前須先換新鮮 medium，對照組加入 3 mM 的  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30 \mu\text{L}$  作為陽性對照組。

將上下膠分別以微波溶解後放於  $55^\circ\text{C}$  水浴鍋中備用，以 0.1% trypsin  $200 \mu\text{L}$  digestion 2 分鐘，加入 1 mL 的 PBS 中和 trypsin 作用後將 cells 吸至 15 mL 的離心管，以 1500 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，拍散 pellet 後加入一倍濃度的 PBS  $200 \mu\text{L}$  (體積依細胞量調整)，在磨砂載玻片上以鉛筆標上號碼，滴加 0.5% normal-melting-point agarose (NMA) + 0.5% low-melting-point agarose (LMA) 的混合液  $70 \mu\text{L}$  於載玻片上，將蓋玻片以 45 度角蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，取  $10 \mu\text{L}$  細胞液合併 0.5% 的 LMA 約  $60 \mu\text{L}$  加在第一層膠上，將蓋玻片以  $45^\circ$  角蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，配置 lysis buffer。將做好的膠置於 lysis buffer 中 1 小時，目的在使細胞膜上的雙層磷脂 (phospholipids) 結構破壞，以利於斷裂的 DNA 被電泳拖出，再將膠移至 alkaline buffer 中浸泡 20 分鐘，其目的是使 DNA 雙股螺旋解開，將電泳槽置於冰上，以 alkaline buffer 為電泳液跑 30 分鐘 (25 V ; 300 mA)。將膠移至 0.4 M 的 Tris buffer 使 pH 值回到中性，再將膠置於 methanol 中脫水，加入 PI 染劑 ( $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 以螢光顯微鏡觀察並照相。

表 4-11：comet assay 之 lysis buffer 配製

lysis buffer (需新鮮配置)	pH=8~10
5 M NaCl	100 mL
1 M Tris-HCl	2 mL
0.5 M EDTA	40 mL
Triton	2 mL
D. D. Water	56 mL
Total	200 mL

表 4-12：alkaline buffer 之配製

alkaline buffer (pH=13)	
NaOH	12 g
EDTA	0.3724 g
D. D. Water	1000 mL

表 4-13：Tris buffer 之配製

0.4 M Tris buffer (以 HCl 調整 pH=7.5)	
Tris	48.456 g
D. D. Water	1000 mL

C. 利用流式細胞儀檢測細胞內粒線體膜電位、ROS、鈣離子在大黃酚作用下的變化

(1) 粒腺體膜電位之檢測

1. 原理

DioC6 (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide) 是一種可穿透細胞膜、可專一性的結合並累積在細胞粒腺體中的染劑，由DioC<sub>6</sub>在細胞內外的分佈差異可反應出細胞膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可顯示細胞膜電位改變的情形，DioC6可發射綠色螢光之陽離子親脂性染劑；可不需要固定細胞或其他處理的情況下可以即時、快速的偵測活細胞內粒腺體膜電位<sup>113,118</sup>。

2. MMP試劑：DioC<sub>6</sub>

10  $\mu$  L DioC<sub>6</sub> / 500  $\mu$  L PBS

3. 實驗步驟

將細胞種植於 6 well 的細胞培養盤中，細胞依照  $2 \times 10^5$  / well 的密度種植於培養盤中再將培養盤放置於培養箱內，經過 24 小時靜置培養，待細胞貼附後依不同加藥時間，加藥組每 well 加入藥劑濃度為 5 mM 的大黃酚 30  $\mu$  L，培養時間到了之後，開始進行收細胞，將上層液移至離心管中，加入 PBS 清洗細胞一次後，以 trypsin 處理以去貼附，可置於 37 °C 培養箱中靜置 2 分鐘以利於細胞去貼附，加入 2 ml 的 PBS 中和 trypsin，再將所有液體吸取到離心管中，以 1500 rpm 轉速下離心 5 分鐘，倒掉上清液，再加入 PBS 清洗細胞，1500 rpm 再離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 MMP 染劑(每 500  $\mu$  L 的 PBS 含有 10  $\mu$  L 的 DioC<sub>6</sub>)，染劑每管加入 500  $\mu$  L，必須準備一管不加藥也不加染劑的細胞懸液作為 blank，於 37 °C 培養箱中避光 30 分鐘，再移至 FACS 管，以流式細胞儀進行分析，每管樣品偵測累計到 10000 顆細胞並以 CellQuest 軟體分析。上機後，須將對照組設定在  $M_1 = M_2$  即粒線體膜電位相等的位置，以分析加藥組的 MMP (peak 往右或不移動為膜電位未下降，若往左則代表粒線體受藥物影響使粒線體膜電位下降)。

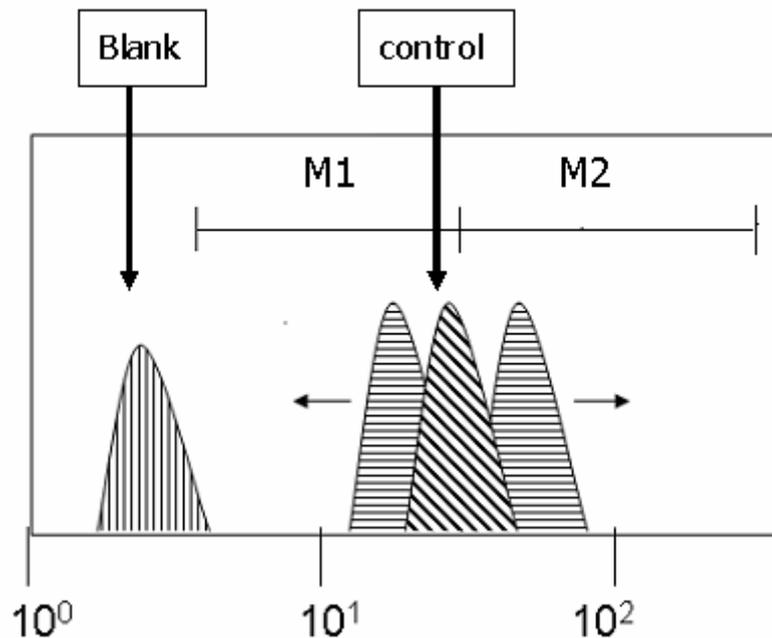


圖 4-2-D MMP 軟體的分析圖

## (2) 活性氧化物產生之檢測

### 1. 原理

本實驗測量活性氧化物的產量，依所欲偵測的 ROS 種類可選用不同的染劑，若是欲偵測  $H_2O_2$ ，可選用 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ( $H_2DCF-DA$ ) 或 dihydrorodamine 123 為染劑，如欲測量  $O_2^-$  則選用 hydroethidine 為螢光染劑<sup>119</sup>。

本實驗選用  $H_2DCF-DA$  來偵測細胞內  $H_2O_2$  產量的變化。 $H_2DCF-DA$  是一種脂溶性的染劑，可通過細胞膜。在細胞內被乙醯酯酶 (esterases) 去乙醯化而形成 DCFH，DCFH 本身仍不具螢光性，若 DCFH 被細胞內的  $H_2O_2$  氧化成 DCF 則具有螢光性，藉由比較加藥組與對照組之間螢光強度的差異可反映出不同組別間細胞內過氧化物的濃度差異。

### 2. ROS 試劑：2',7'-dichlorofluorescein diacetate ( $H_2DCF-DA$ )

$1 \mu L H_2DCF-DA / 500 \mu L PBS$

### 3. 實驗步驟

分盤、加藥及收細胞的方式如同前述的粒線體膜電位實驗的方式，而染劑（ $1\ \mu\text{L H}_2\text{DCF-DA} / 500\ \mu\text{L PBS}$ ）每管加入  $500\ \mu\text{L}$ ，需有一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入  $500\ \mu\text{L}$  的 PBS，再置於  $37^\circ\text{C}$  培養箱避光 30 分鐘後，transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每管樣品收集累計到 10000 顆細胞並以 CellQuest 的軟體分析。將 blank peak（直線的 peak）調在  $10^0 \sim 10^1$  之間，control peak（斜線的 peak）調在  $10^1 \sim 10^2$  之間， $M_1$  gated 約 50%，sample 上機後，分析 ROS（peak 往右是細胞質的 ROS 量增加，往左是 ROS 減少或被清除）。

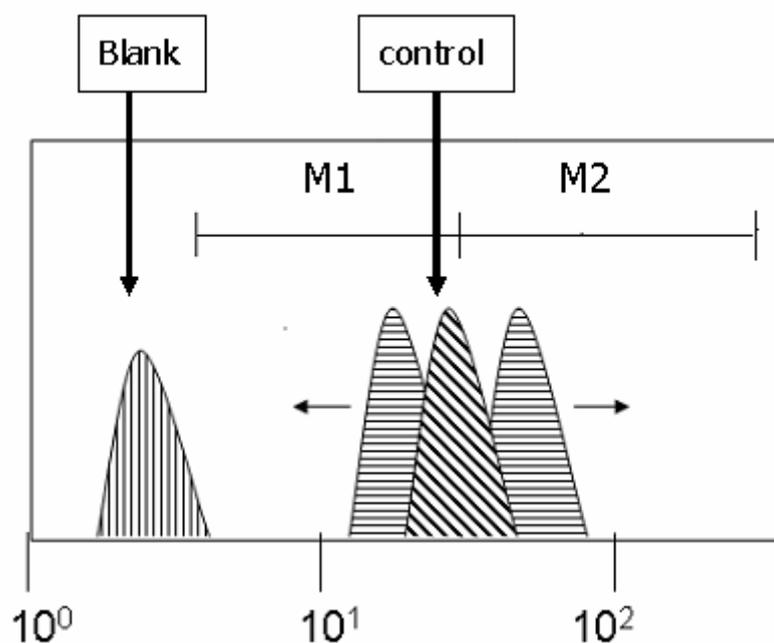


圖 4-2-E ROS 軟體分析圖

### (3) 鈣離子釋出之檢測

#### 1. 原理

胞內鈣離子是細胞信號傳遞的信使，許多複雜的細胞內訊息傳遞都與鈣離子有關，因此是細胞激活過程中重要的指標。螢光染劑如 (Fura-Red、Fluo-3 和 Indo-1) 經由乙醯甲酯 (acetoxymethyl ester, AE) 帶入細胞後，Indo-1 會與鈣離子特異性結合。這些螢光染劑的結構式與 EDTA 相似，可螯合鈣離子，螯合鈣離子之後螢光染劑會有光學特性上的改變，在紫外光 (UV) 激發下，Indo-1 散射光 (emission) 的強度會隨著細胞內鈣離子濃度的改變，而發散出不同強度的螢光，故可用測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值，實際濃度需經校對後獲得<sup>120</sup>。

2. 鈣離子染劑：[1-[2-amino-5 (4-carboxylindol-2-yl) -phenoxy]-2-(2' amino-5-methylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Indo-1-AM)]

#### 3. 實驗步驟

分盤、加藥及收細胞的方式如同前述的粒線體膜電位實驗的方式，而染劑則取Indo-1-AM染劑每管加入1000  $\mu$  L，需有一管blank不加藥也不加染劑，只加入1000  $\mu$  L 的PBS，在置於37 °C培養箱避光培養60分鐘，每十分鐘將sample上下反轉一次，避光60分鐘後加入PBS洗2次，1500 rpm離心5分鐘，倒掉上清液，每管加入400  $\mu$  L 的PBS，再transfer至FACS管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每管樣品收集10000顆細胞並以CellQuest軟體分析。將blank peak (內含垂直線的peak) 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control組 (斜線的peak) 調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M<sub>1</sub> gated約50%，所有的樣品 (斜線的peak) 上機後，分析calcium release (peak往右表示細胞質內的鈣離子濃度上升，往左為降低)。

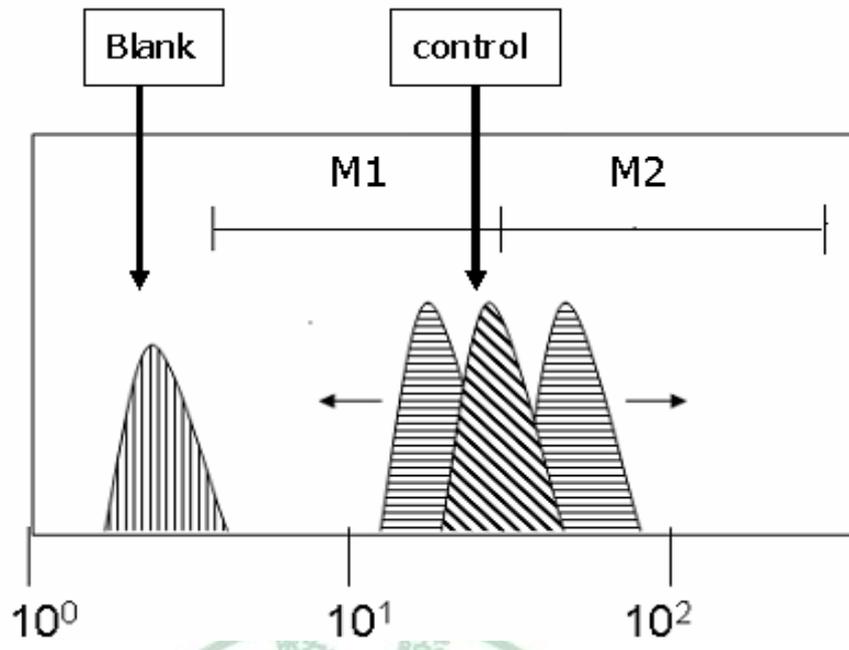


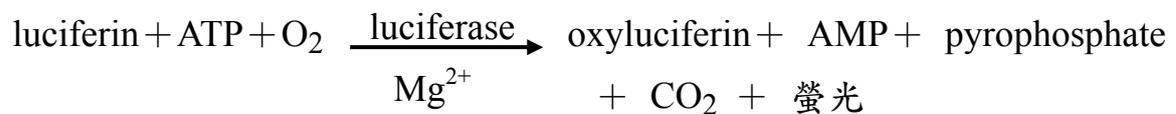
圖 4-2-F 鈣離子軟體分析圖



## 八、檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 內 ATP 產量的變化

### 1. 原理

細胞壞死不同於細胞凋亡的特徵之一是細胞內的電子傳遞鏈崩毀導致細胞製造 ATP 的能力下降，利用 luciferin 與 ATP 作用後會形成的螢光的特性，可用以檢測在不同濃度的大黃酚的作用下，癌細胞內 ATP 濃度的差異，以此推測細胞是否步向細胞壞死的途徑<sup>121</sup>。



### 2. ATP 螢光試劑的配製

- 將 3 mg 的 D-Luciferin 溶於 1 mL 的 1 倍的 reaction buffer 中，形成 10 mM 的 D-Luciferin 溶液。
- 將 25 mg 的 DTT (dithiothreitol) 溶於 1.62 mL 的 D.D. water，形成 100 mM 的 DTT stock 溶液作為以備用。
- 將 1 mL 的 D-Luciferin 及取 160  $\mu$ L 的 DTT stock 溶液加進溶液 8.9 mL 的 D.D. water 中。
- 最後再加入 20 倍的 reaction buffer 0.5 mL，形成 10 mL 的試劑，以上配製時需避光，配製完成後也必須避光冷藏。

### 3. 實驗步驟

將細胞種植於 96 well 的白色微量盤 (culture plate)，每 well 約需  $10^4$  個細胞，每 well 的培養基需要 200  $\mu$ L，分完細胞後將白色微量盤置於培養箱中靜置 24 小時以待細胞貼附，當細胞貼壁後，將白色微量盤中的培養基去掉，在加入新的培養基之前，可先依不同的最終濃度調配好溶有大黃酚的培養基，再將含有大黃酚的培養基依序加入每 well 中。

加完含有不同濃度大黃酚的培養基後，在培養箱中培養 6 小時，再將白色微量盤中的培養基去掉，在避光下，將預先配製好的試劑加入每 well 中，每 well 的劑量一律為 100  $\mu$ L，加完試劑後不可搖晃細胞盤，

靜置約 10 分鐘，使試劑與細胞能充分反應，再置於冷光螢光儀中進行檢測，儘量在 30 分鐘內完成檢測。



## 九、檢測大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 轉移能力的影響

### A. 細胞移行實驗 (Migration assay) :

#### 1. 原理

當癌細胞在無胎牛血清成分的培養基中，會因為缺乏胺基酸而無法分裂複製，利用這種性質，可以觀察癌細胞在大黃酚的作用下，細胞邊緣線的變化，藉以推測細胞的移動性是否受抑制<sup>122</sup>。

#### 2. 實驗步驟

將透明膠帶用酒精殺菌後，在無菌操作檯中取一段膠帶貼在 6 well 培養盤中央，以紫外燈照射一夜 (overnight)，隔天將癌細胞種植於培養盤中，每 well 細胞數約  $2 \times 10^6$ ，在分盤完成後，靜置於培養箱中培養 24 小時。

24 小時後，去掉培養基，撕下膠帶，用 PBS 洗一下，加入無胎牛血清的培養基，加入不同濃度的大黃酚，利用倒立式相位差顯微鏡觀察照相在不同時間下，細胞邊緣線是否出現變化及原本貼膠帶的地方是否有細胞貼附。

### B. 細胞穿透試驗 (Invasion assay) :

先將 transwell upper chamber 內底部 coating 一層 matrigel (以培養基稀釋成十分之一)，置於培養箱中等待凝固，matrigel 凝固後，將細胞種植於每個 transwell upper chamber 中，每 well 細胞數約  $10^5$ ，無胎牛血清培養基的量是  $200 \mu\text{L}$ ，種完細胞後，於培養箱靜置 24 小時，再依不同組別加入不同濃度大黃酚  $2 \mu\text{L}$ ，繼續在培養箱中培養 24 小時。

24 小時後去掉培養基並用 PBS 洗兩次，用  $0^\circ\text{C}$  的甲醇加入 transwell upper chamber 中以固定細胞並將細胞盤置於  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱中固定細胞 30 分鐘，再用 PBS 洗兩次。

加入染劑 hemotocycin 蓋過細胞並靜置 10 分鐘後將染劑去掉，用 PBS 洗兩次以退染，用棉花棒小心將 matrigel 去除，最後在顯微鏡下數細胞並拍照。

C. 西方墨點法檢測參與 Hep3B 與 A549 細胞轉移的調控蛋白表現量的差異：

實驗原理及步驟請看上述實驗方法六. B 的部份。

十、統計方法：

實驗結果以三重複取平均值  $\pm$  標準差 (mean  $\pm$  SD) 表示。數據以 student-t test 進行統計比較，以檢定影響的顯著性。當  $P < 0.05$  表示統計上有顯著的差異而將以 \* 表示，若  $P < 0.01$  表示統計上有極顯著的差異而用 \*\* 表示，統計軟體以 Sigma Plot 2000 軟體進行分析。



## 第五章 實驗結果

### 第一節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 與人類肺癌細胞株 A549 形態的影響

Hep3B 細胞與 A549 細胞 ( $2 \times 10^5$  cell / mL) 給予不同濃度的大黃酚，經過不同時間 (24、48、72 小時) 培養後，以倒立式位相差顯微鏡分別觀察這兩株細胞在不同時間不同濃度的形態，並與控制組相對照，發現大黃酚對於這兩株癌細胞的增殖都有明顯的抑制效果，而且藥物的抑制效果隨著藥物濃度增加而越明顯，在相同劑量下，大黃酚對 Hep3B 細胞有較強的生長抑制作用。

在視野下，經大黃酚處理後的細胞在分佈上，明顯比控制組稀疏。在形態上，大黃酚作用後的 Hep3B 細胞與 A549 細胞，皆顯得較圓鈍且脹大，而且細胞內胞器膨大，死亡而漂浮的細胞比較多。



(一) 大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 形態上的影響

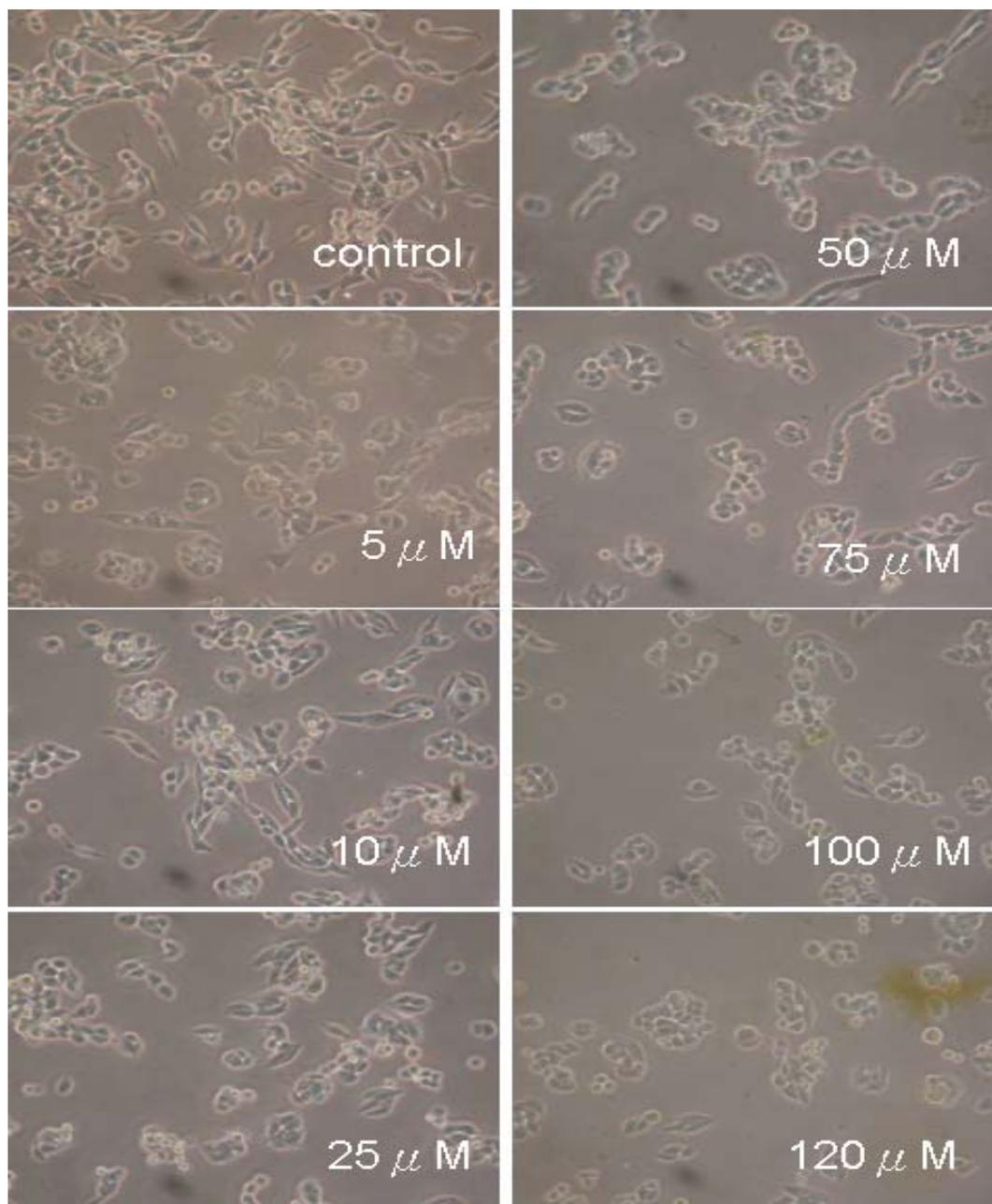


圖5-1-A. 用不同濃度 (5 ~ 120  $\mu$ M) 的大黃酚處理Hep3B細胞24小時後之形態變化 (200 X)。

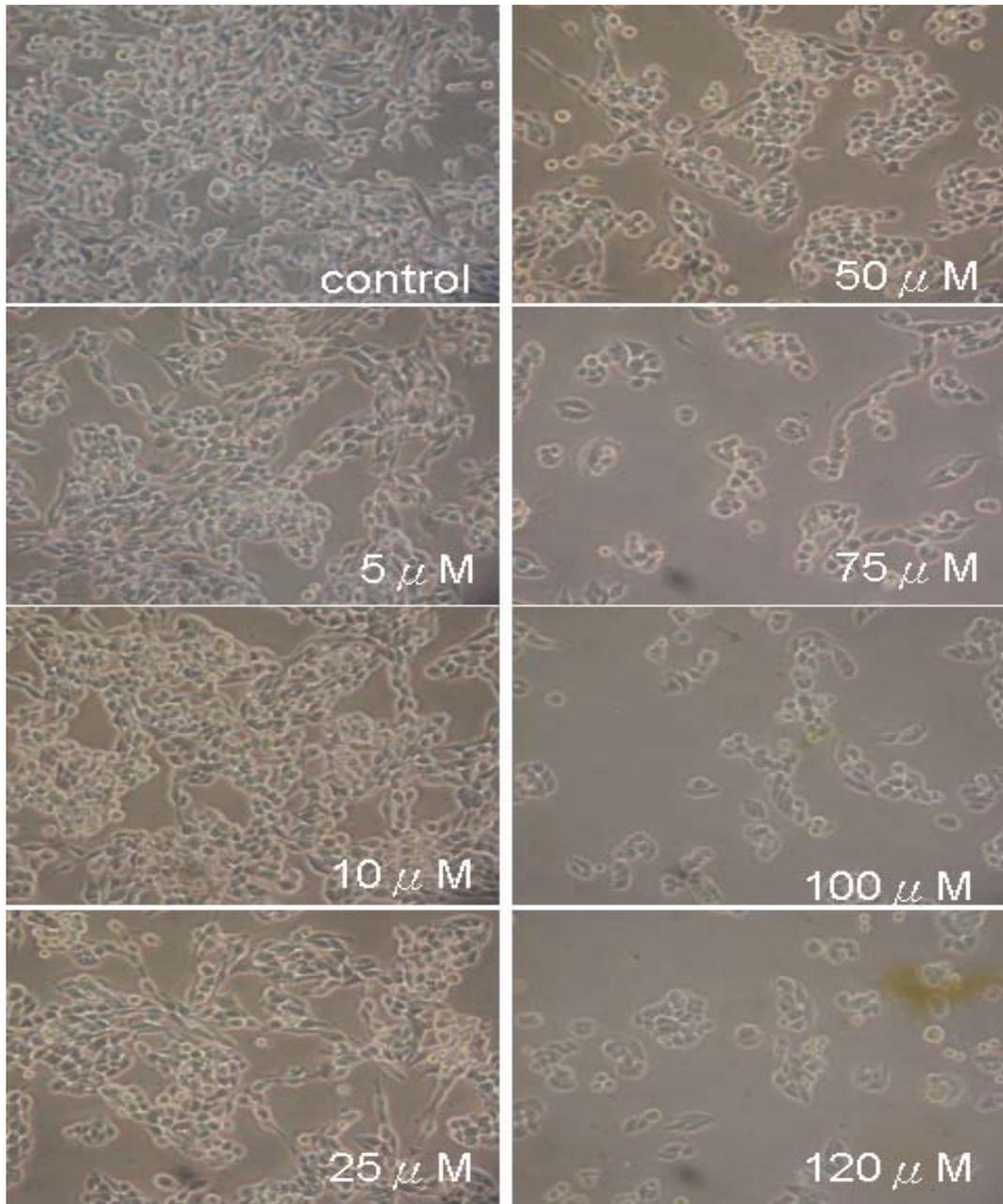


圖 5-1-B. 用不同濃度 (5~120  $\mu\text{M}$ ) 的大黃酚處理 Hep3B 細胞 48 小時後之形態變化 (200 X)。

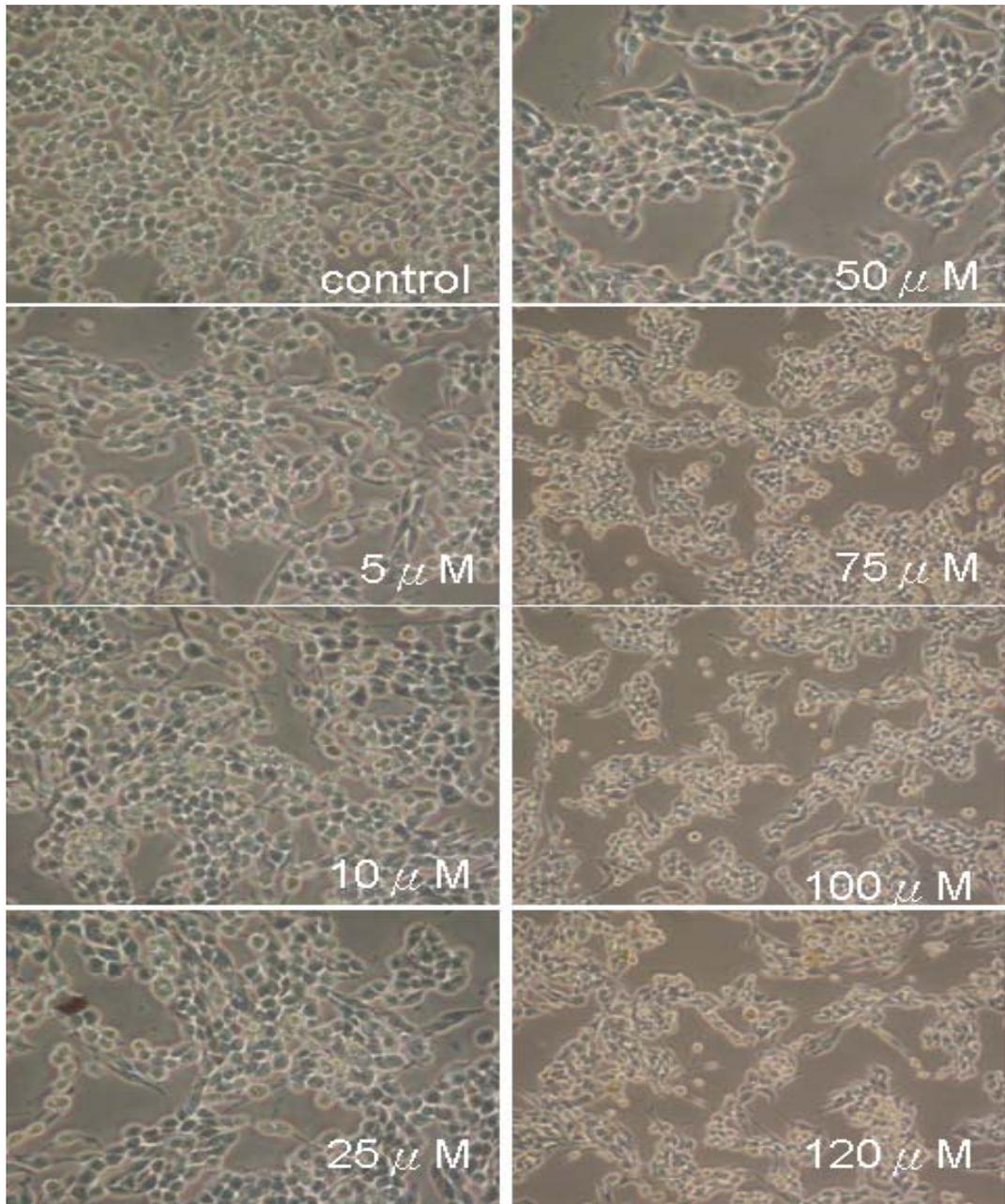


圖5-1-C. 用不同濃度 (5 ~ 120  $\mu$ M) 的大黃酚處理Hep3B細胞72小時後的形態變化 (200 X)。

(二) 大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 形態上的影響

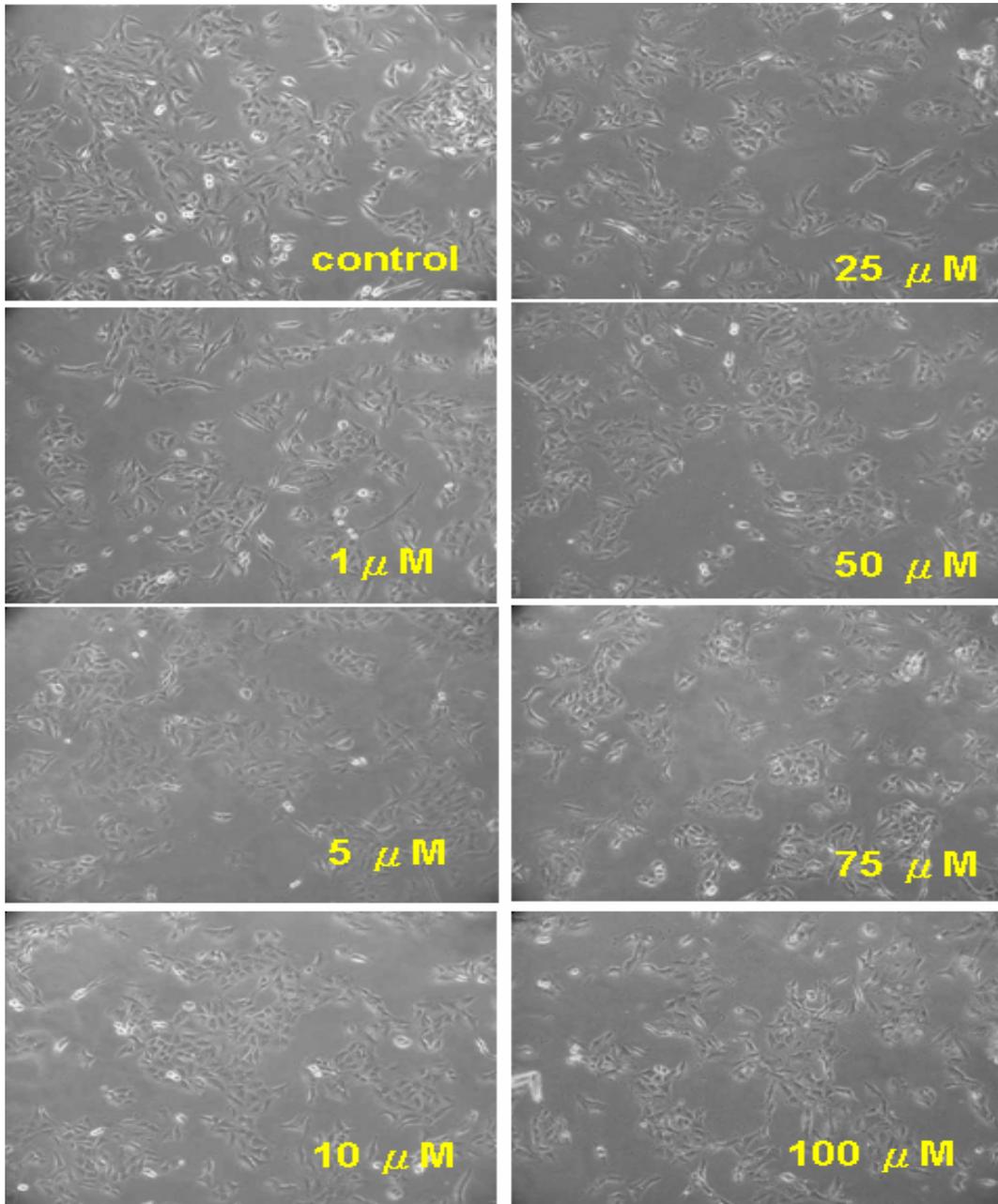


圖5-1-D. 用不同濃度 (1~100  $\mu\text{M}$ ) 的大黃酚處理A549細胞24小時之後的形態變化 (200 X)。

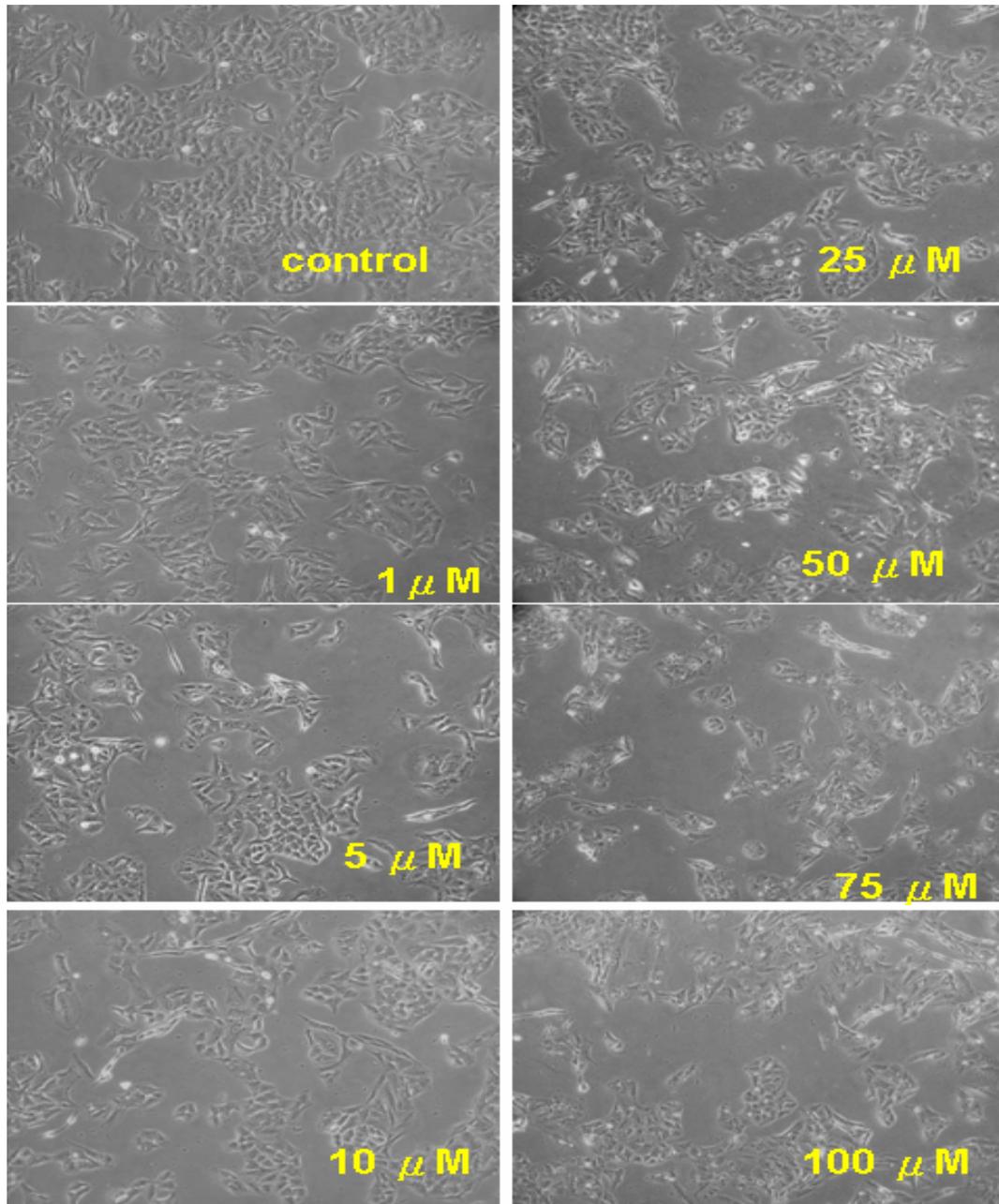


圖5-1-E. 用不同濃度 (1~100  $\mu\text{M}$ ) 的大黃酚處理A549細胞48小時之後的形態變化 (200 X)。

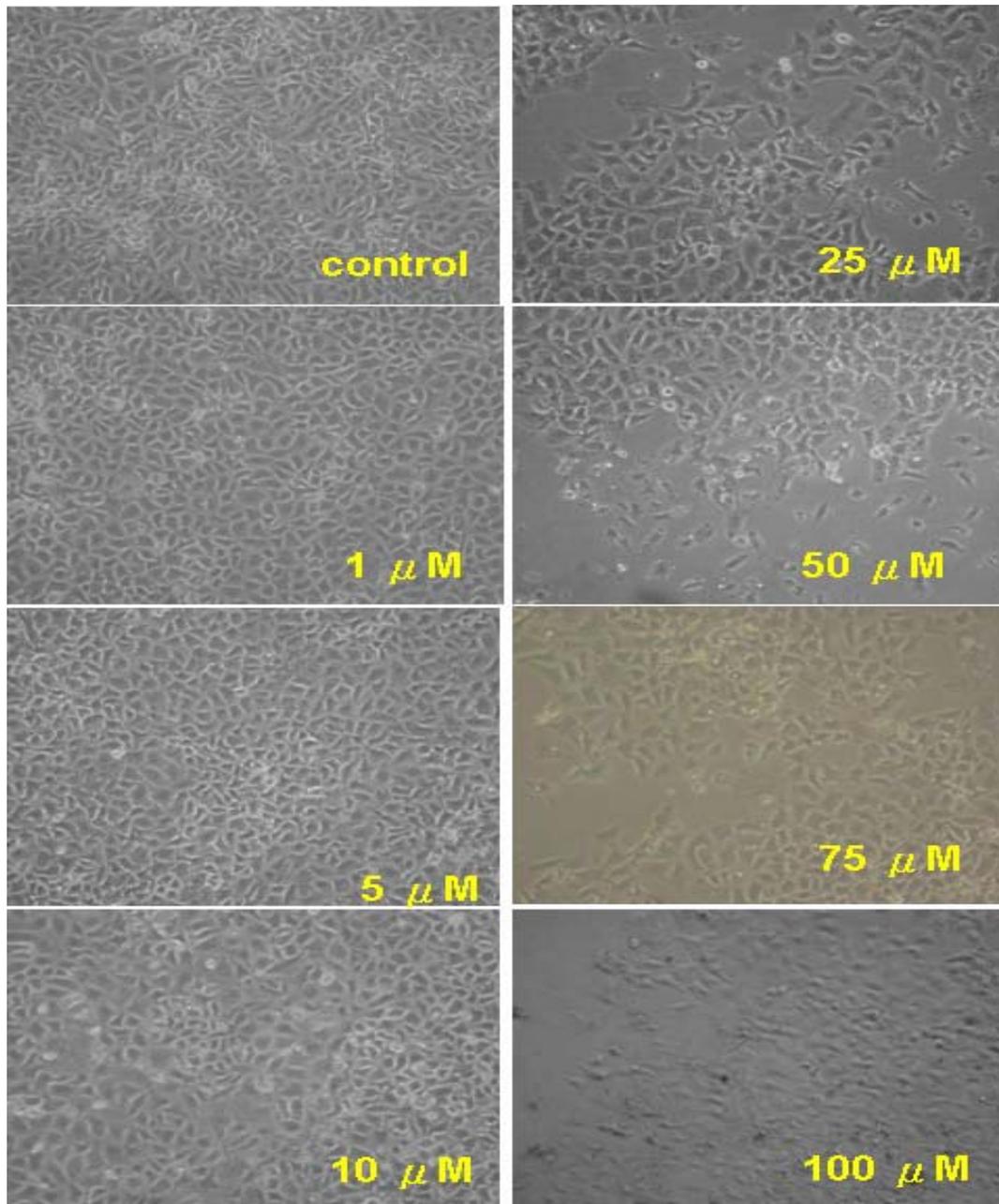


圖5-1-F. 用不同濃度 (1 ~ 100  $\mu\text{M}$ ) 的大黃酚處理A549細胞72小時後的形態變化 (200 X)。

## 第二節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 抑制增殖作用

由顯微鏡觀察細胞的外觀形態與細胞密集程度，可發現加藥組與控制組之間，有明顯的差異，可初步證明大黃酚對 Hep3B 及 A549 具有抑制生長及細胞毒殺作用，為了具體顯示藥物對此兩株細胞的影響是具有劑量依存性 (dose-dependent) 以及找出藥物的  $IC_{50}$  濃度，所以利用流式細胞儀以偵測細胞存活率。

癌細胞的存活率可依兩個方向來探討，分別為劑量依存性 (dose-dependent)，以及時間依存性 (time-dependent)。由流式細胞儀分析細胞後可得知細胞存活率及固定時間及流速下的存活細胞數以得知細胞生長抑制率，由圖 5-2-A 及圖 5-2-B 得知大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及人類肺癌細胞株 A549 在不同的時間點 (24、48、72 小時) 具有顯著的存活率降低的現象，並且隨著劑量的增加，大黃酚對 Hep3B 及 A549 細胞增生的抑制作用越強，呈現劑量依存效應。

(一) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 存活率的影響

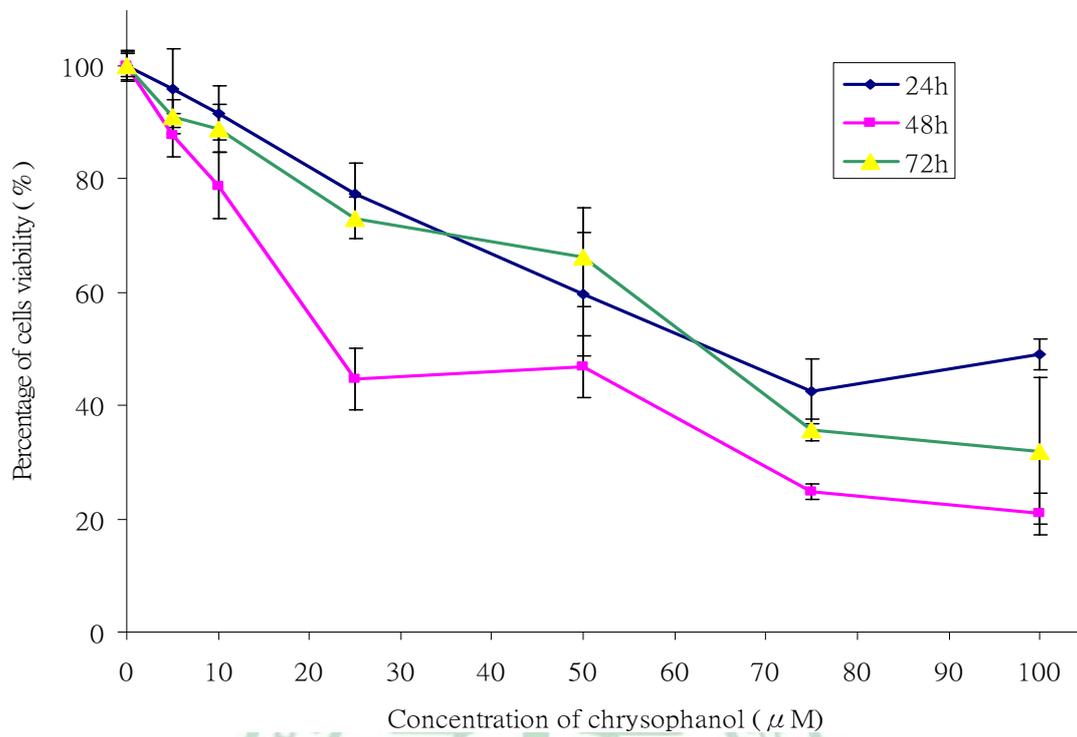


圖 5-2-A. 以不同濃度大黃酚 (control、5、10、25、50、75、100  $\mu$  M) 分別處理 Hep3B 細胞的 24、48 及 72 小時存活率結果曲線圖 (n=3)。

(二) 大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 存活率的影響

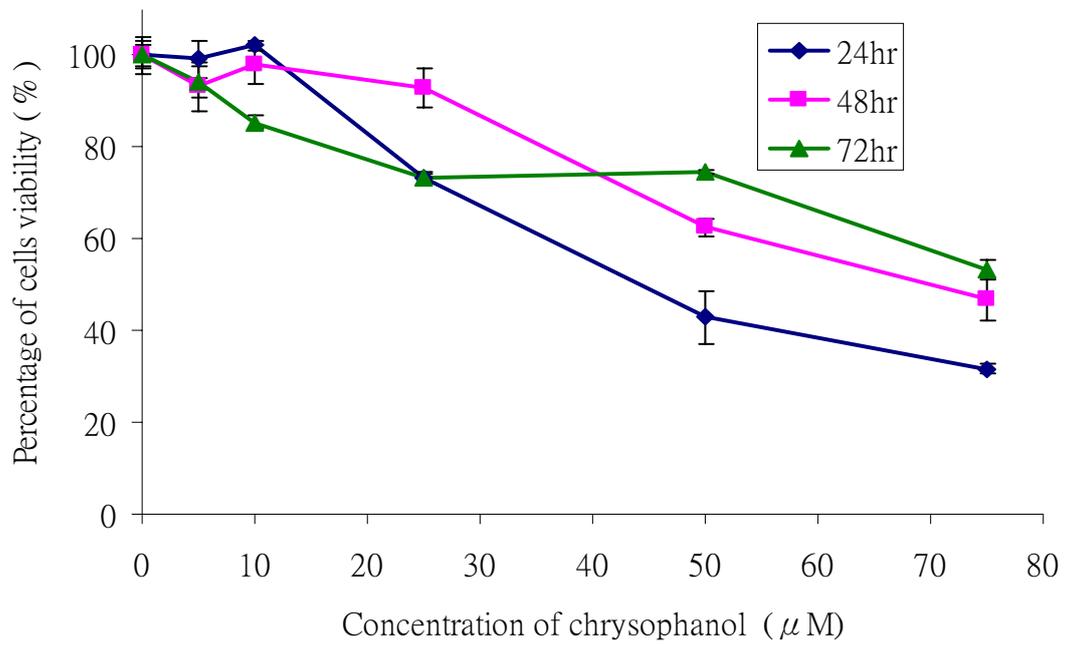


圖 5-2-B. 以不同濃度大黃酚 (control、5、10、25、50、75  $\mu\text{M}$ ) 處理 A549 細胞 24、48 及 72 小時存活率結果曲線圖 (n = 3)。

### 第三節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞週期的影響

在流式細胞儀檢測下，顯示在不同時間隨著藥物濃度增加，細胞週期  $G_0 / G_1$  期、S 期、 $G_2 / M$  期之間細胞數量相對比例關係。經由 Modfit LT® 軟體處理分析所得結果顯示，在不同的時間點，Hep3B 細胞加藥組的  $G_0 / G_1$  期的比例較控制組的比例少，而加藥組 S 期的比例則比較多；而 A549 細胞在藥物作用 24 小時後的時間點，其加藥組的  $G_0 / G_1$  期的比例較控制組的比例少，Hep3B 細胞與 A549 細胞的  $G_2 / M$  期的比例與控制組沒有明顯的增減，而每一組的細胞凋亡的數量都很少。

時間差的實驗結果顯示 Hep3B 細胞在藥物處理 72 小時後的  $G_0 / G_1$  期，細胞比例明顯減少，S 期的細胞比例明顯增加。

(一) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的細胞週期的影響

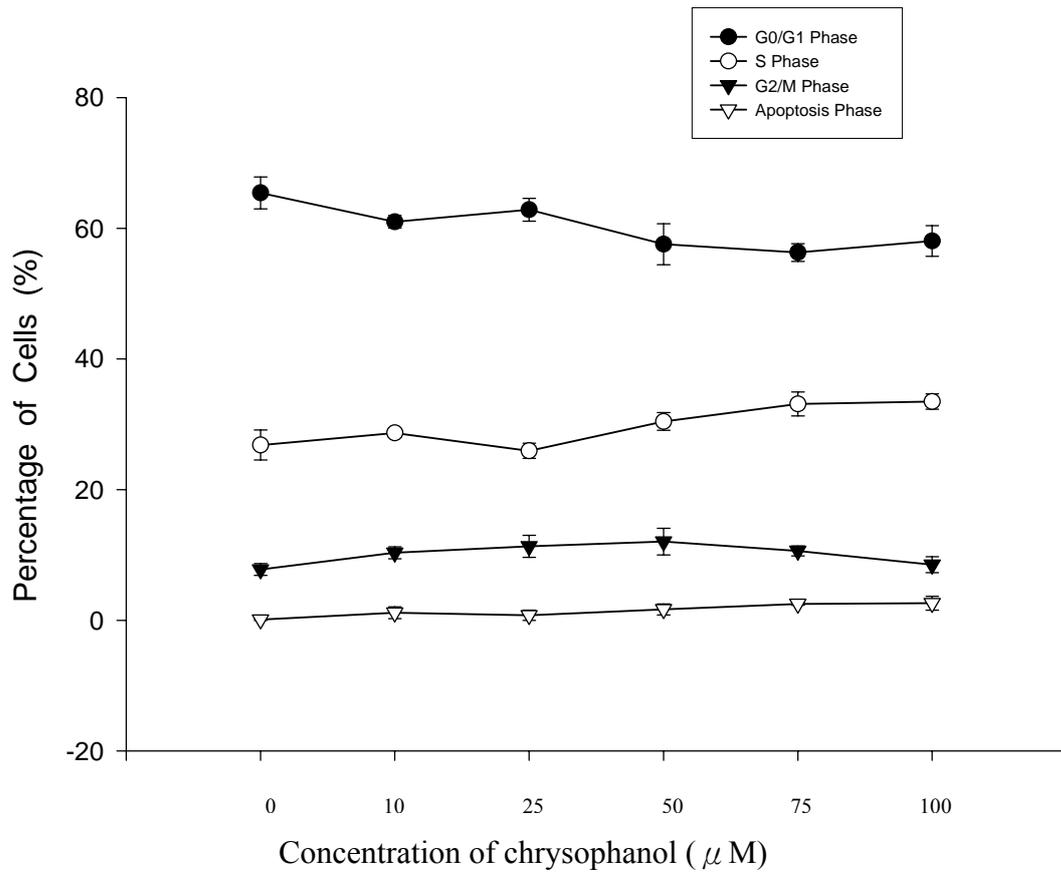


圖 5-3-A 大黃酚不同濃度對人類肝癌細胞株 Hep3B 作用 24 小時後，對細胞週期的影響 (n = 3)。

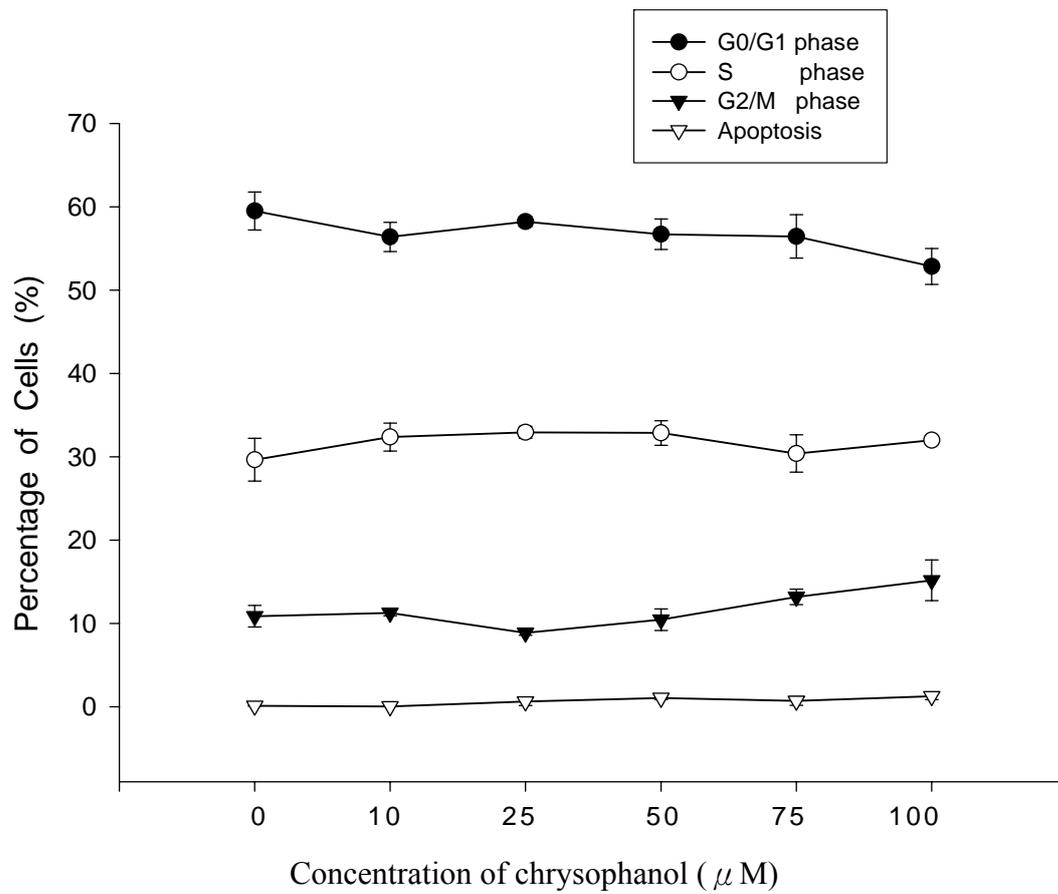


圖 5-3-B 大黃酚不同濃度對人類肝癌細胞株 Hep3B 作用 48 小時後，對細胞週期的影響 (n = 3)。

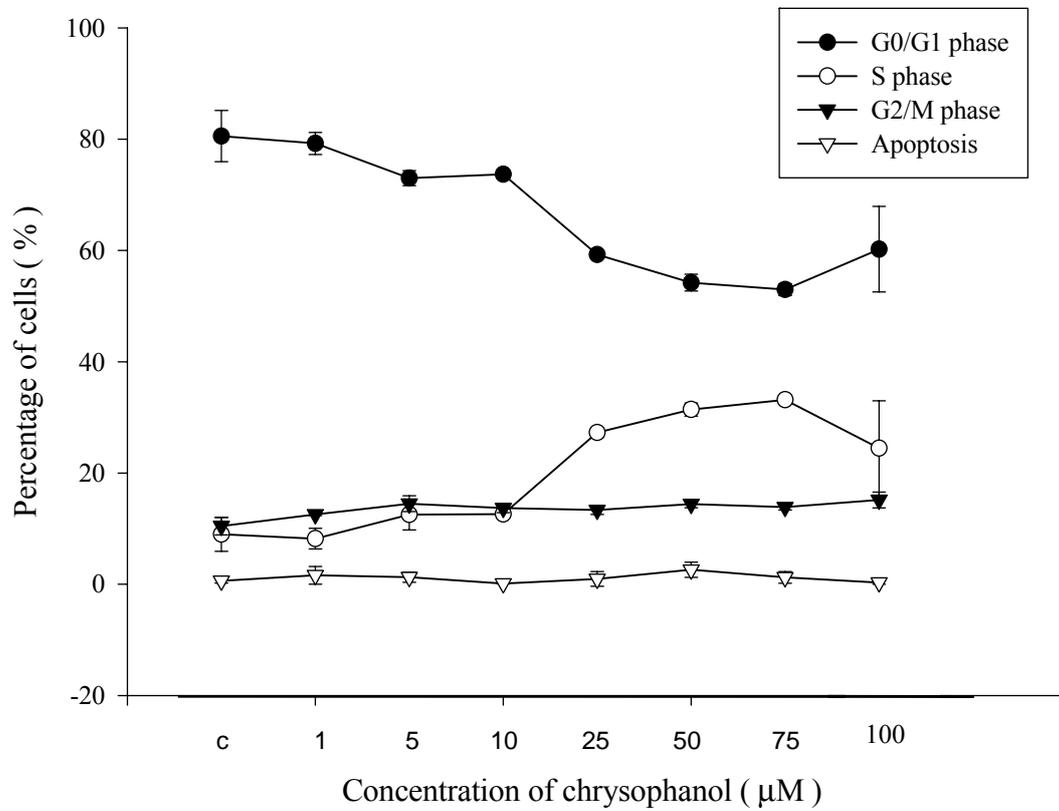


圖 5-3-C 大黃酚不同濃度對人類肝癌細胞株 Hep3B 作用 72 小時後，對細胞週期的影響 (n = 3)。

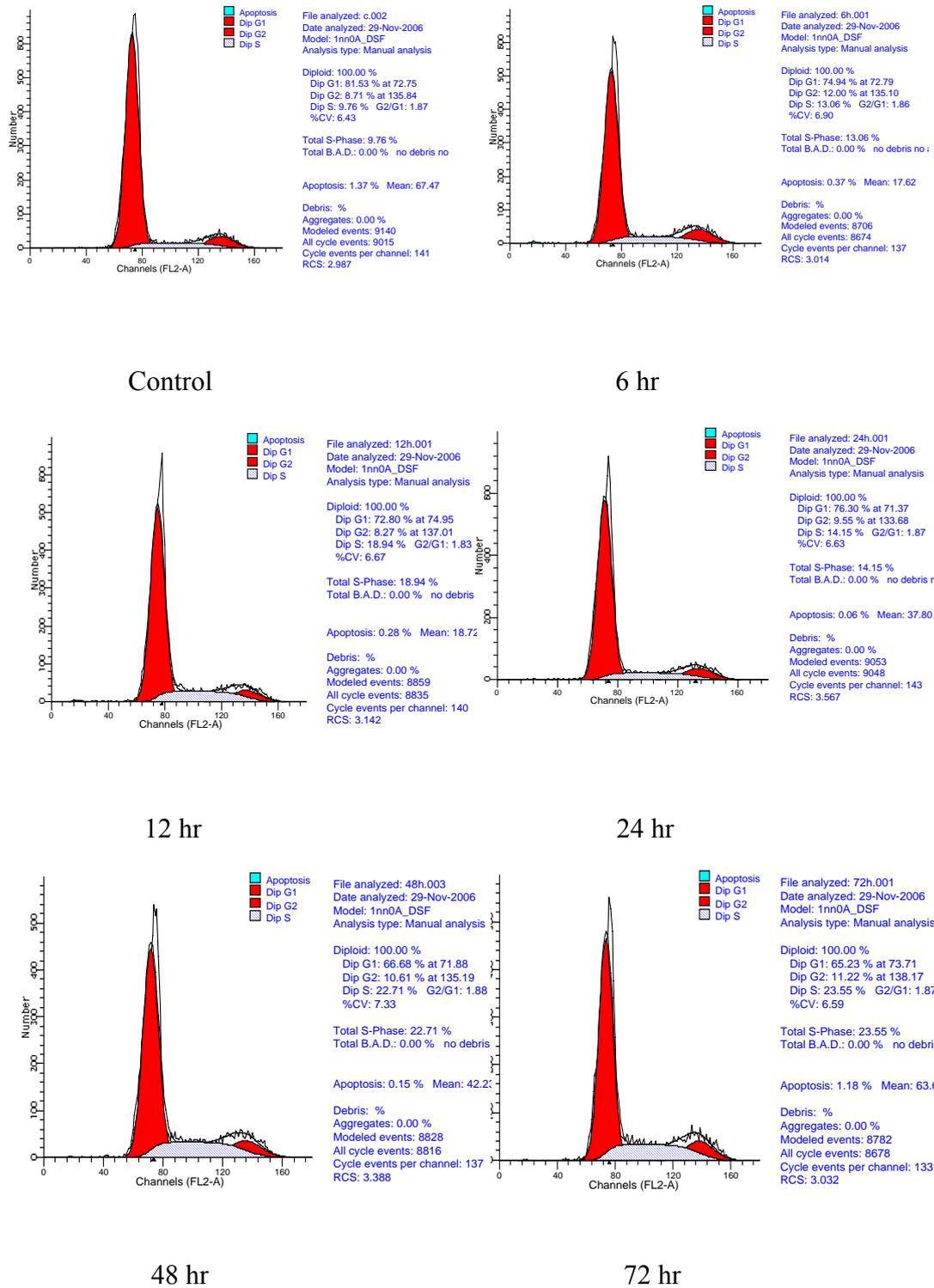


圖 5-3-D 流式細胞儀檢測濃度  $50 \mu\text{M}$  的大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 作用不同時間後，在不同細胞週期間細胞比例變化。

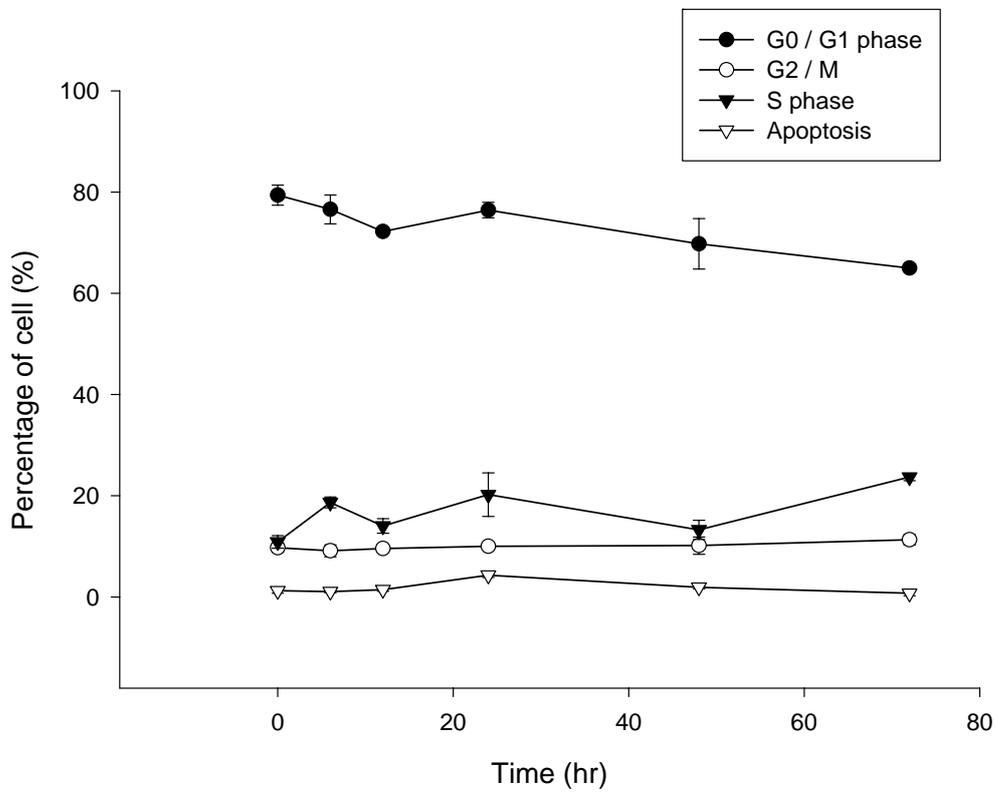


圖 5-3-E 大黃酚在  $50 \mu\text{M}$  的濃度對人類肝癌細胞株 Hep3B 作用不同時間後 (control、6、12、24、48、72 hr)，藉流式細胞儀分析細胞週期間細胞比例變化 ( $n = 3$ )。

(二) 大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 的細胞週期的影響

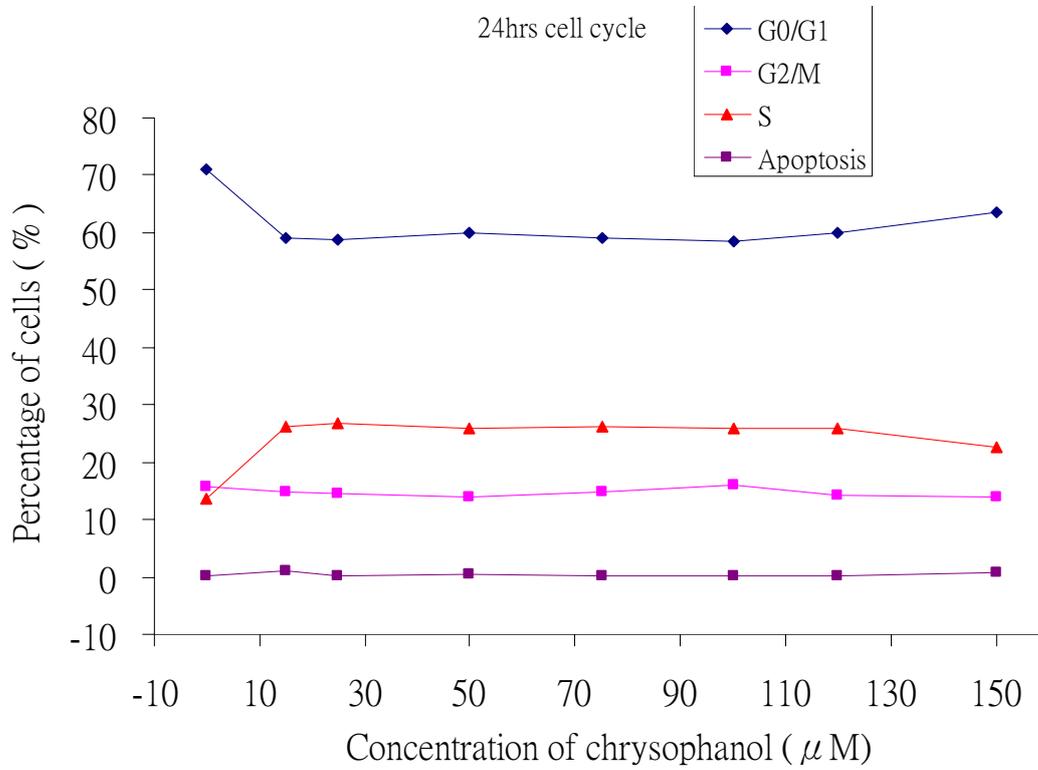


圖 5-3-F 大黃酚不同濃度對人類肺癌細胞株 A549 作用 24 小時後，對細胞週期的影響 (n = 3)。

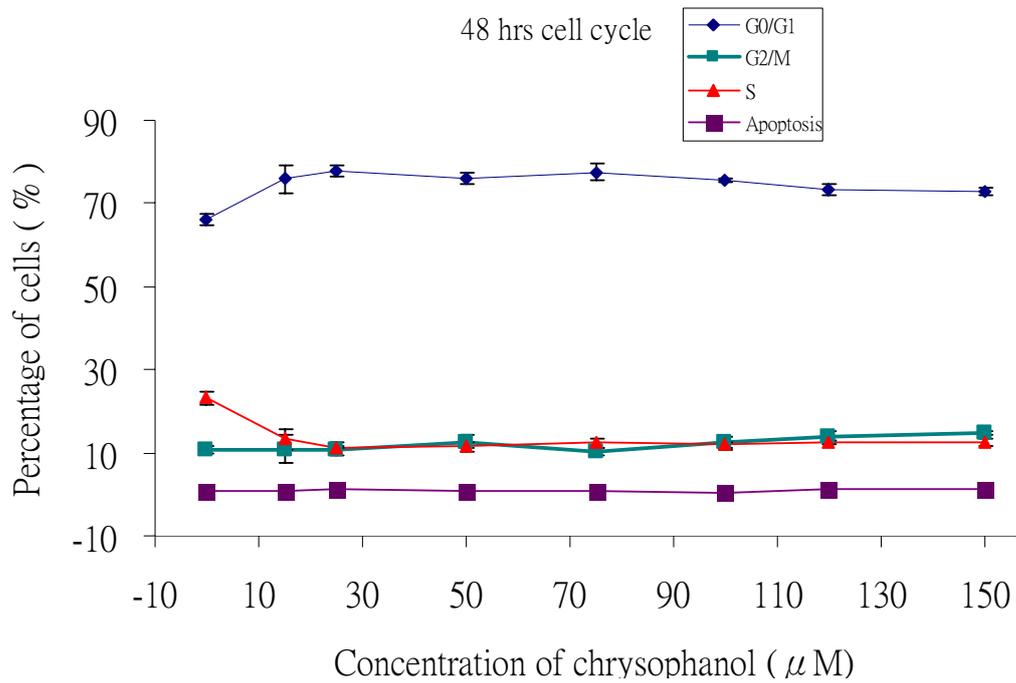
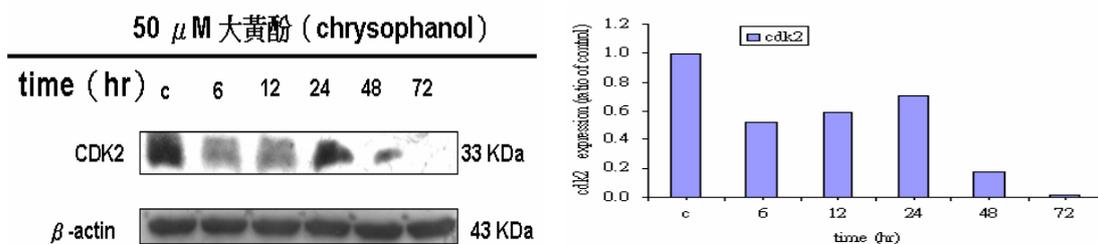


圖 5-3-G 大黃酚以不同濃度對人類肺癌細胞株 A549 作用 48 小時後，藉流式細胞儀分析細胞週期間細胞比例變化。圖中顯示  $G_0/G_1$  期增加，S 期減少， $G_2/M$  期與細胞凋亡的比例無明顯的增減。

(三) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的細胞週期相關調控蛋白表現量的影響

由西方墨點法檢測 Hep3B 細胞的細胞週期相關調控蛋白的表現，結果顯示具有 S 期停滯性的 CDK2、thymidylate synthase 及 cyclin D 蛋白加藥組的表現量比控制組的表現量低，對 cyclin 表現具有抑制性的 p21、p27、p53 等調控蛋白其加藥組的表現量比控制組的表現量高，但是 p53 的轉漬結果中，24 小時的表現量明顯偏低，可能因為轉漬的誤差所導致。

(A)



(B)

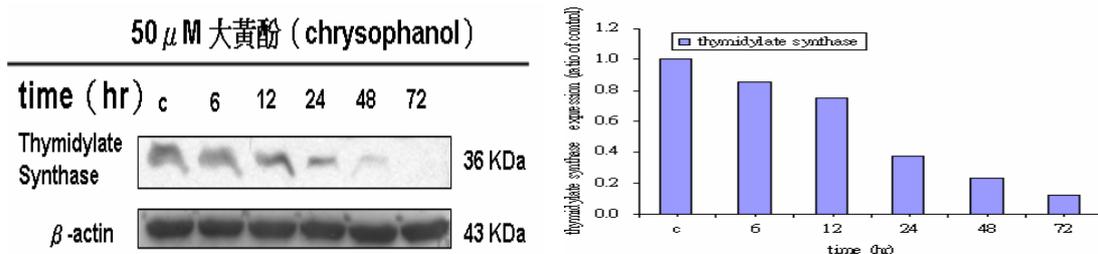
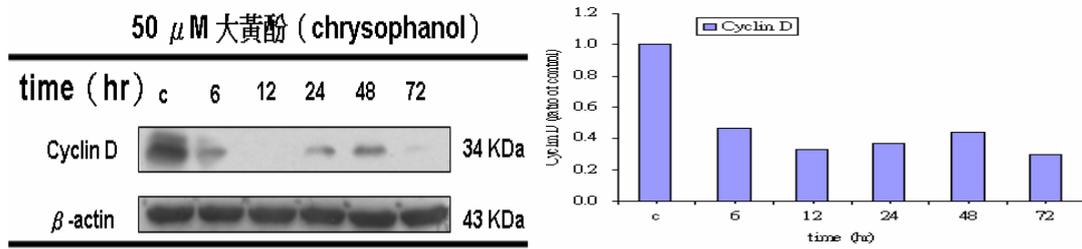


圖 5-3-H 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 CDK2 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 thymidylate synthase 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

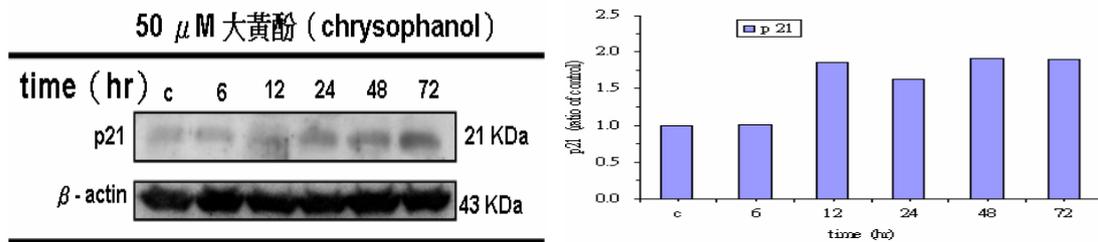
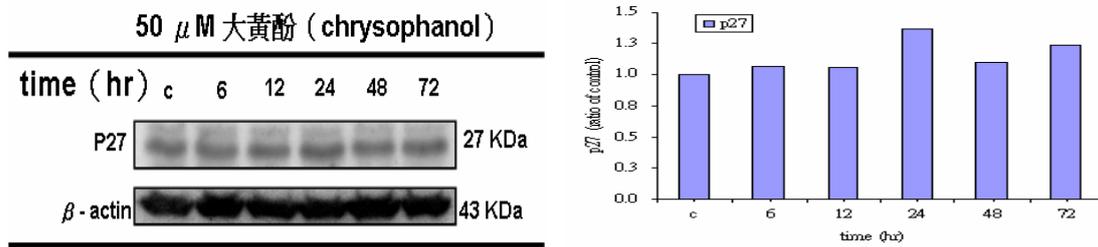


圖 5-3-I 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後,細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖;A 圖左為 cyclin D 蛋白的表現量, A 圖右為量化統計圖;B 圖左為 p21 蛋白的相對表現量, B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

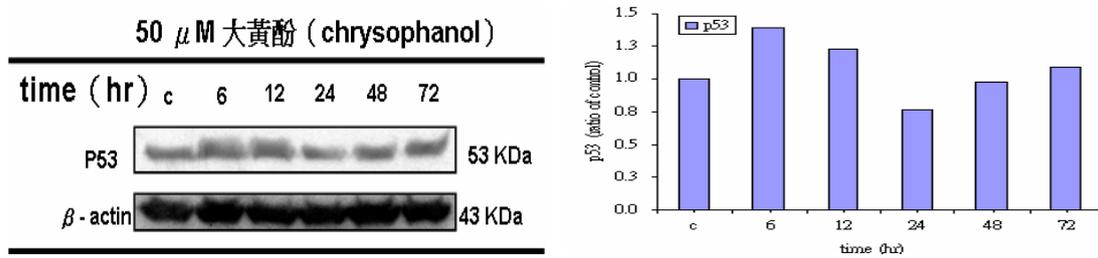
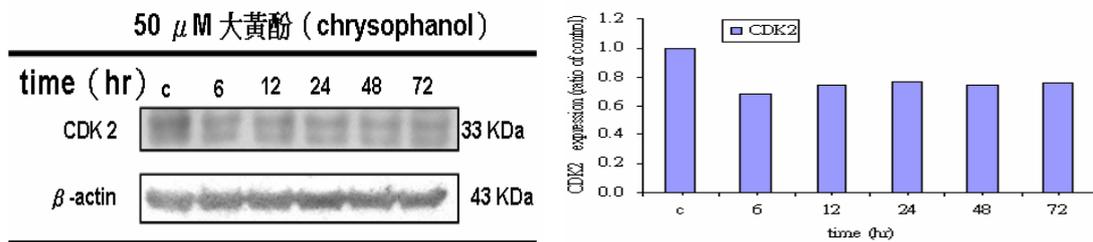


圖 5-3-J 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 p27 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 p53 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(四) 大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 的細胞週期相關調控蛋白表現量的影響

利用西方墨點法檢測 Hep3B 細胞的細胞週期相關調控蛋白的表現，結果顯示具有 S 期停滯性的 CDK2、thymidylate synthase 及 cyclin D 蛋白加藥組的表現量比控制組的表現量低。

(A)



(B)

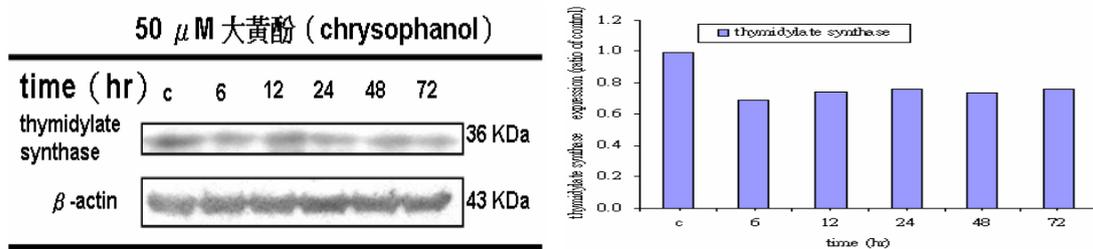


圖 5-3-K 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 CDK2 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 thymidylate synthase 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

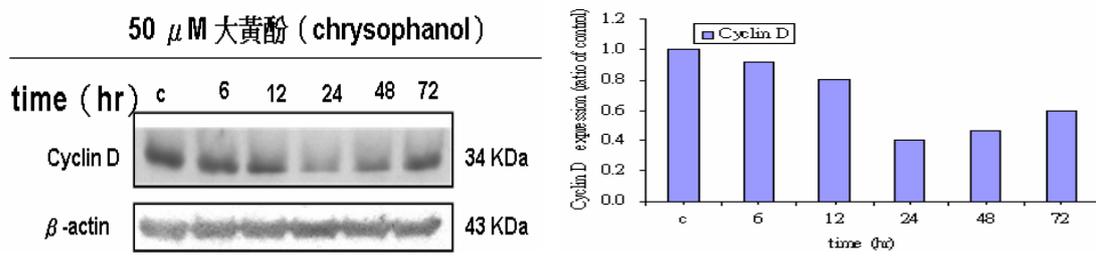


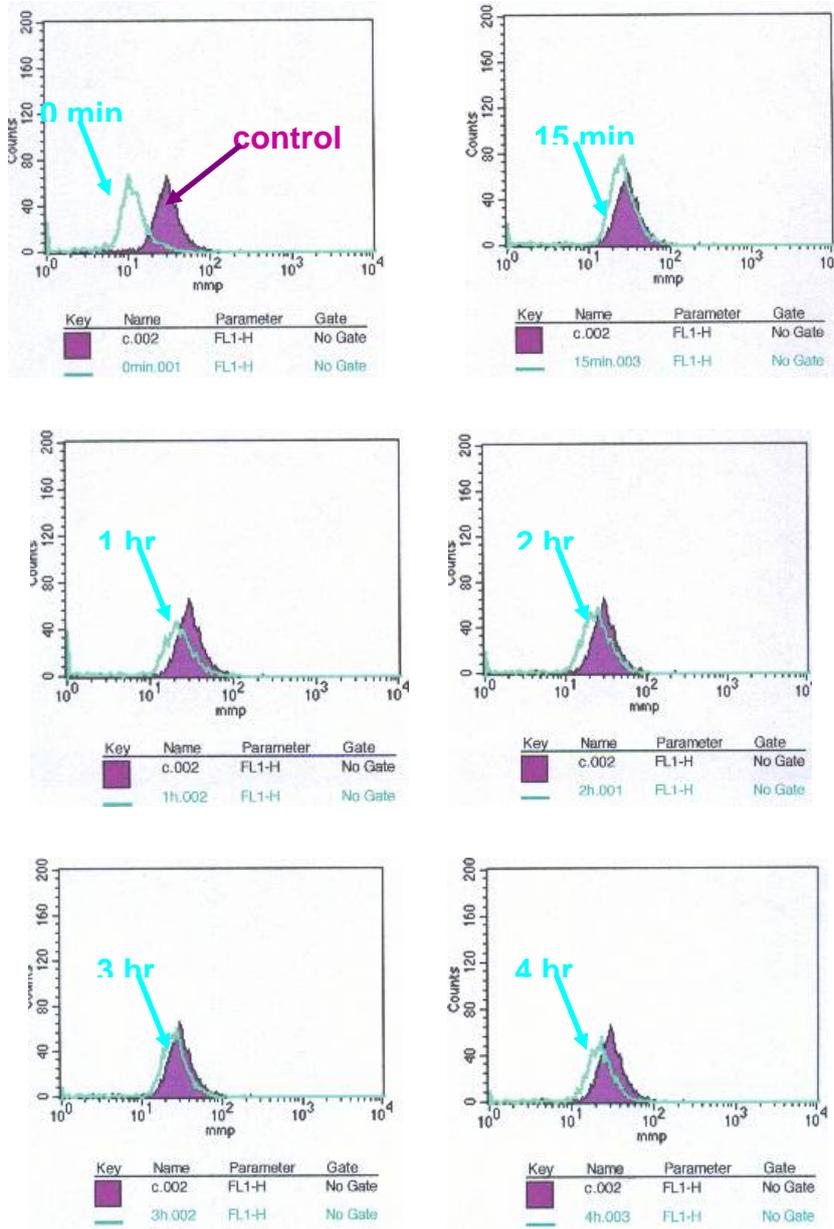
圖 5-3-L 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；圖左為 cyclin D 蛋白的表現量，圖右為量化統計圖。

#### 第四節大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內粒線體膜電位的影響

以大黃酚  $50 \mu\text{M}$  為最終濃度處理人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 以測細胞的粒線體膜電位，Hep3B 在加藥初期的粒線體膜電位即明顯減少，藥物處理組的電腦分析圖出現左移現象，但是隨時間漸增，細胞的粒線體膜電位逐漸增加，在 48 小時後的膜電位則回復到與控制組一樣程度（圖 5-4-A~B）。

而 A549 細胞在 12 小時的時間點就已出現粒線體膜電位下降的現象，並且一直持續到 48 小時仍未回復，72 小時的組別雖然膜電位上比起 12 小時的組別有回升的現象，但是仍比控制組低（圖 5-4-C）。

(一) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的細胞粒線體膜電位所造成的影響的測定



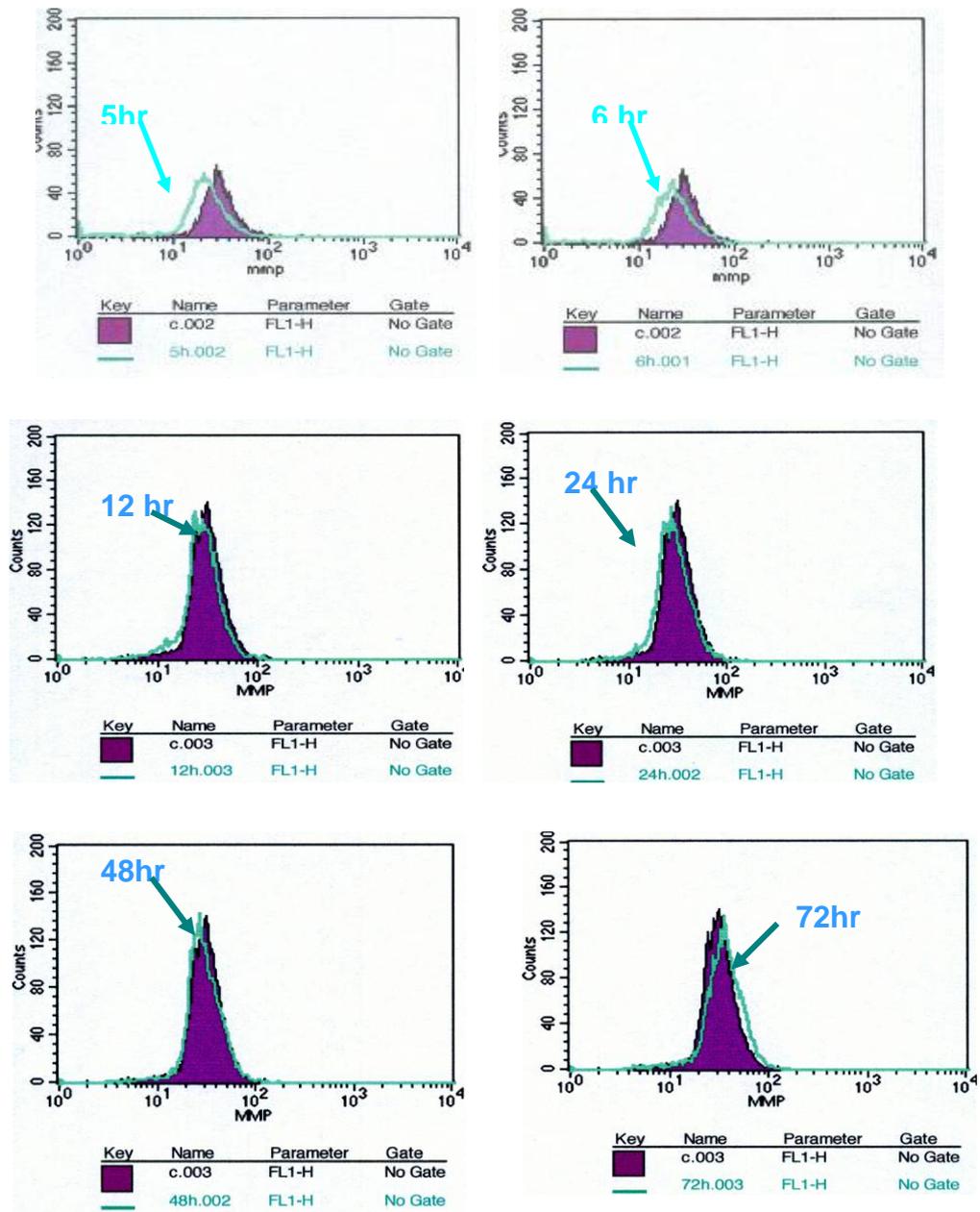


圖 5-4-A 濃度為  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 之粒腺體膜電位的分析圖。

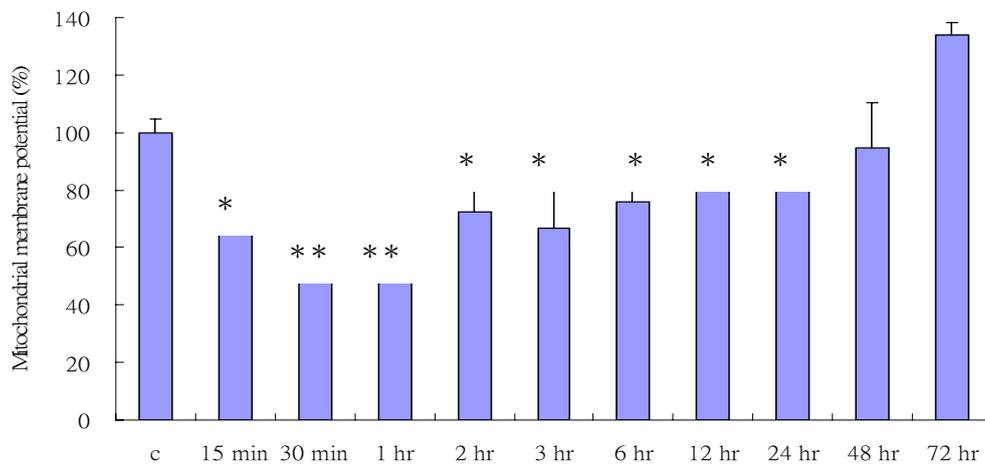
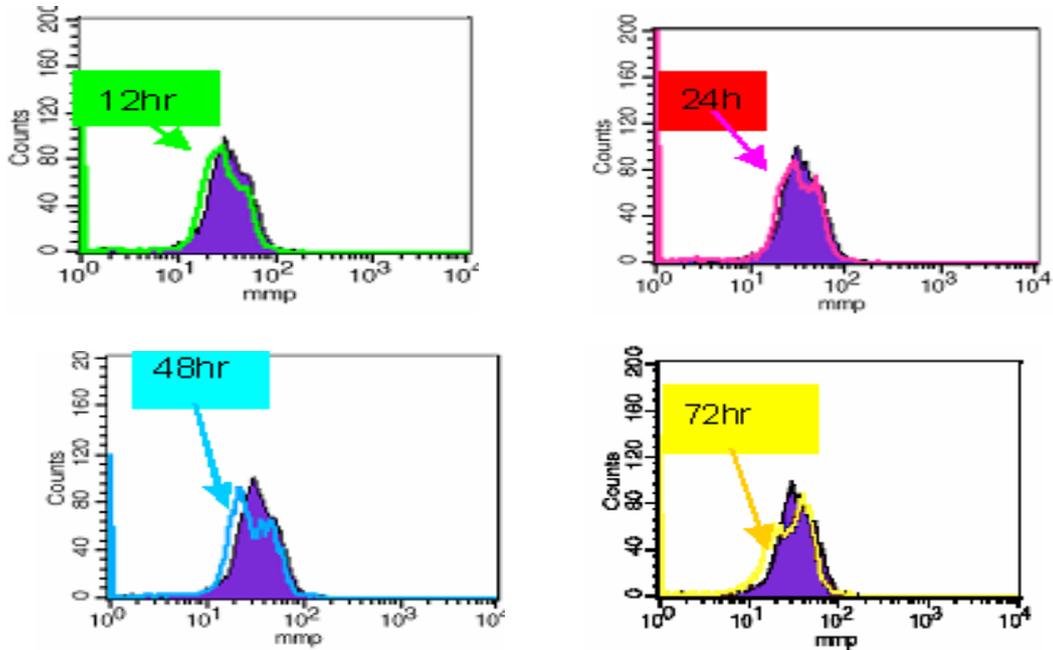


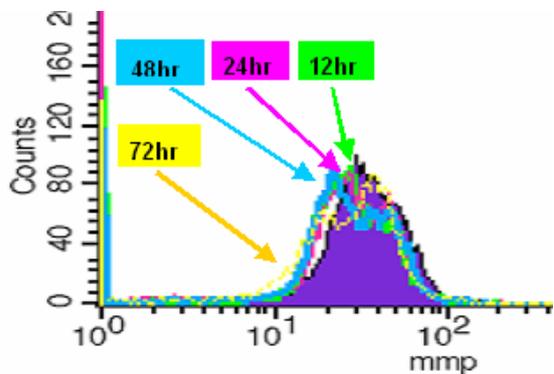
圖 5-4-B 濃度為  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 之粒腺體膜電位的相對量統計圖 (n=3; \*表示與 c 組比較  $p < 0.05$ ; \*\*表示與 c 組比較  $p < 0.01$ ; c 組為溶劑對照組)。

(二) 大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 的細胞粒線體膜電位之影響測定

A.



B.



C.

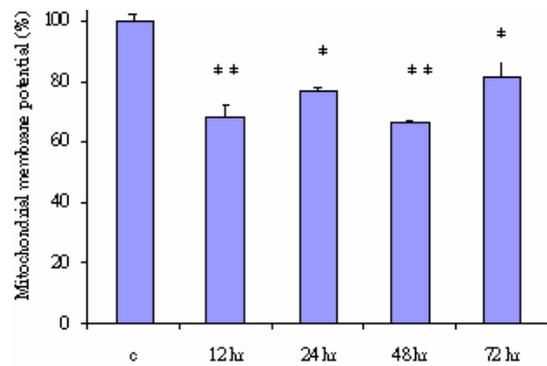


圖 5-4-C (A) 濃度為  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對人類肺癌細胞 A549 作時間差 (12~72 hr) 的粒腺體膜電位相對表現分析圖。(B) 為 A549 細胞作時間差的粒線體膜電位的電腦分析疊圖，(C) 為粒線體膜電位相對量之統計圖 ( $n=3$ ；\*表示與 c 組比較  $p < 0.05$ ；\*\*表示與 c 組比較  $p < 0.01$ ；c 組為溶劑對照組)。

## 第五節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內活性氧化物 (ROS) 產生的影響

有些藥物對於細胞的傷害是藉由產生大量的自由基所引發，最後造成細胞壞死或細胞凋亡，因為過量的自由基會攻擊細胞內的胞器及 DNA，並將細胞內的脂質過氧化，使得細胞膜、核膜、及胞器的膜被破壞，粒線體內部的 cytochrome *c* 也容易被釋放出來。

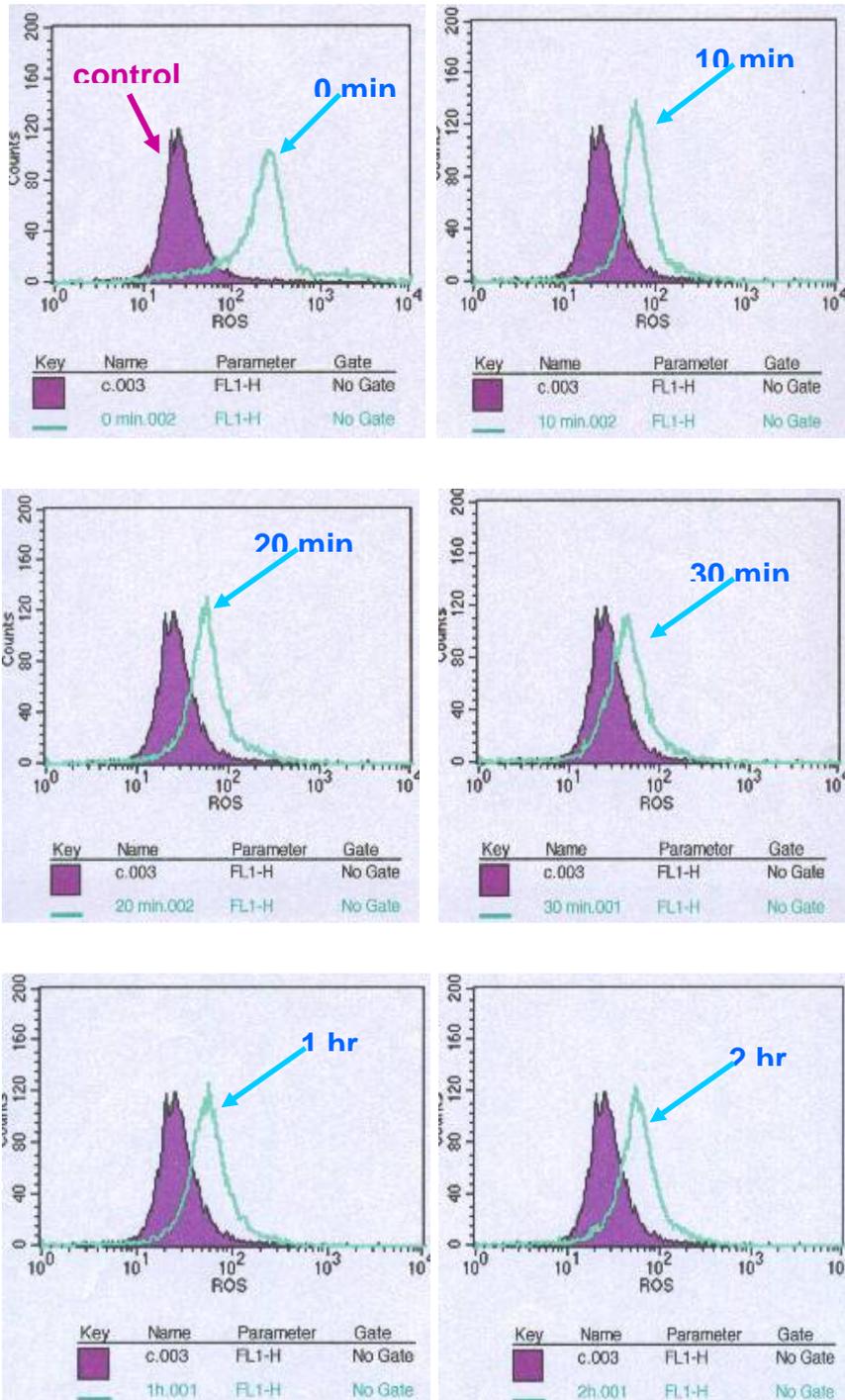
由實驗結果顯示細胞在大黃酚處理後，初期即大量釋放 ROS (圖 5-5-A)。

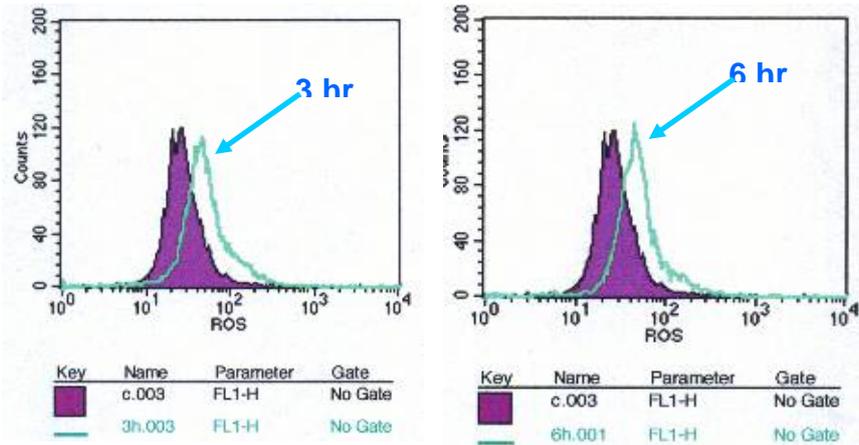
在 Hep3B 方面，ROS 在藥物處理初期，是 ROS 濃度的最高峰，電腦分析圖則顯現右移最多，隨著加藥後培養時間增加，ROS 逐漸降低，電腦分析圖的右移程度越來越少，72 小時的 ROS 濃度則與控制組區別不大 (圖 5-5-B ~ C)。

在 A549 方面，ROS 的濃度則沒有長時間恢復的現象，在電腦分析圖也一直維持右移的現象 (圖 5-5-D)。

(一) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的細胞 ROS 產生之影響測定

A.





B.

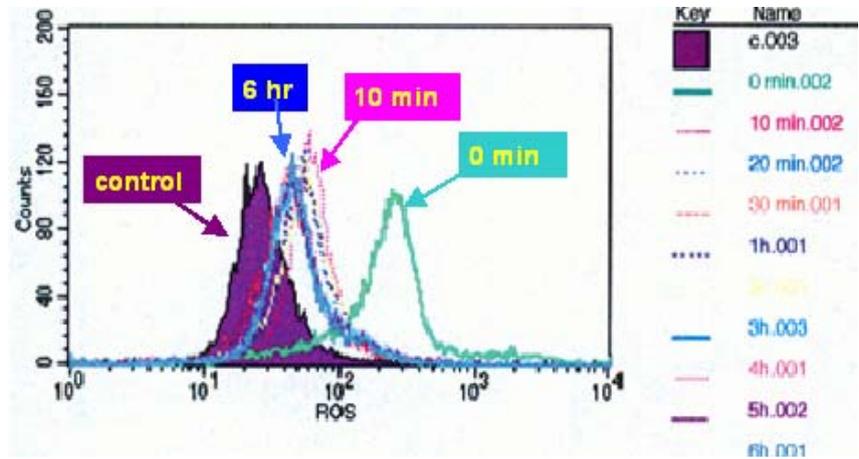


圖 5-5-A (A) 濃度  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對於 Hep3B 細胞之 ROS 在短時間 (0~6 小時) 所產生的影響之電腦分析圖。(B) 為濃度  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對於 Hep3B 細胞之 ROS 在短時間內 (0~6 小時) 所產生的影響之電腦分析疊圖。

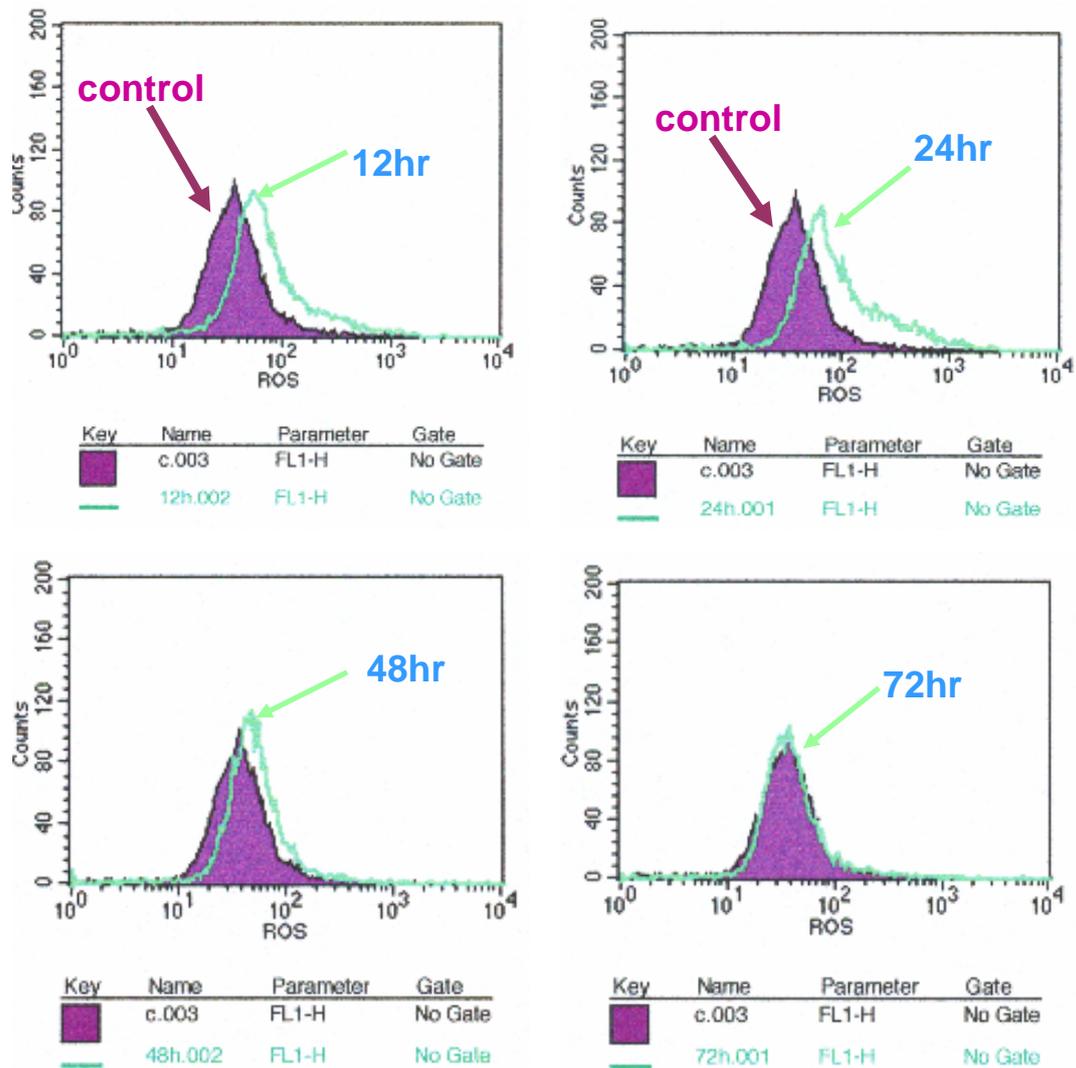


圖 5-5-B 濃度  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對 Hep3B 細胞之 ROS 在長時間 (12 ~ 72 hr) 的影響。

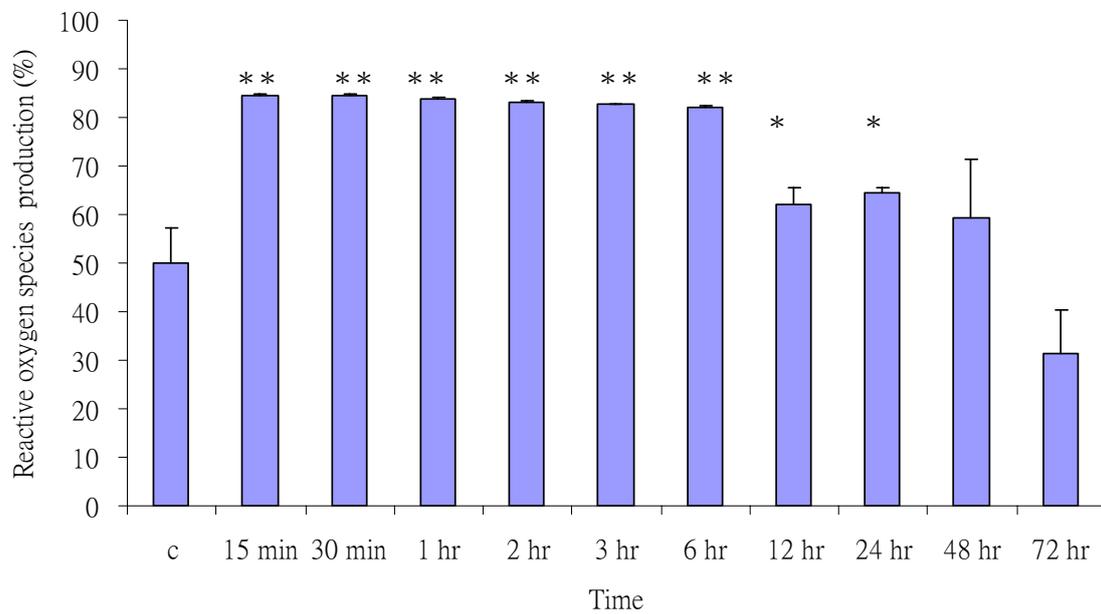
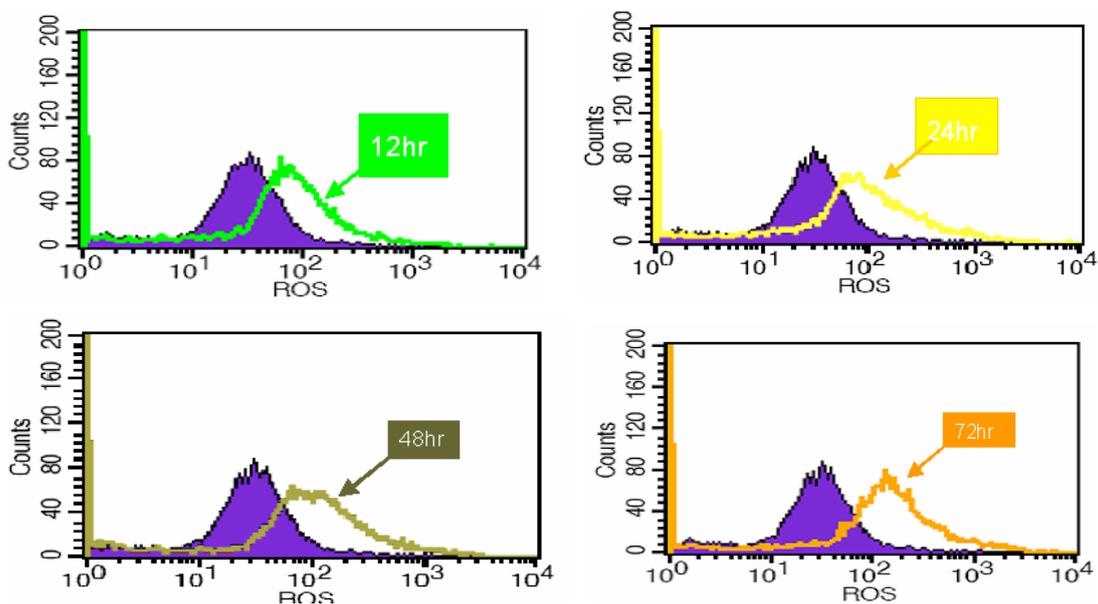


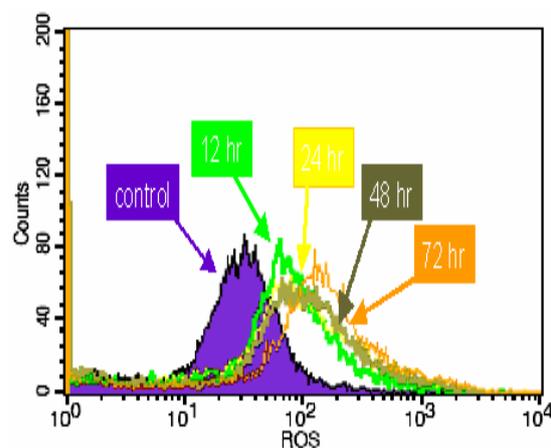
圖 5-5-C 濃度  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對於 Hep3B 細胞之 ROS 在不同時間 (15 min ~72hr) 的相對表現量統計圖 (n=3; \*表示與 c 組比較  $p < 0.05$ ; \*\*表示與 c 組比較  $p < 0.01$ ; c 組為溶劑對照組)。

(三) 大黃酚對人類肝癌細胞株 A549 的細胞 ROS 產生之影響測定

A.



B.



C.

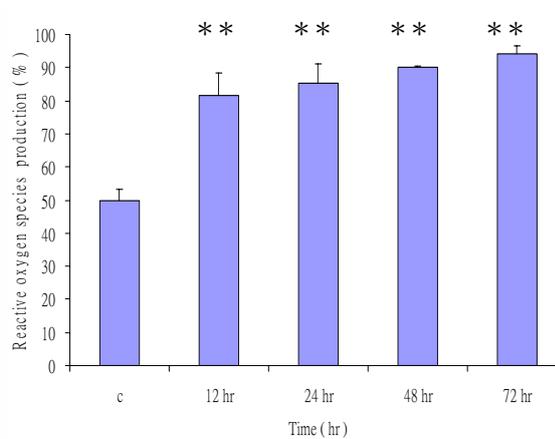


圖 5-5-D 濃度  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對於 A549 細胞之 ROS 在長時間 (12 hr ~ 72 hr) 所產生的影響。(A) 為電腦分圖 (B) 為電腦分析疊圖, (C) 為 ROS 濃度相對表現量之統計圖 ( $n=3$ ; \*表示與 c 組比較  $p < 0.05$ ; \*\*表示與 c 組比較  $p < 0.01$ ; c 組為溶劑對照組)。

## 第六節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內鈣離子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 產生之影響

細胞內的鈣離子通常與信號傳遞有關，主要儲存在細胞的內質網中，內質網的鈣離子大量釋放會使粒線體膜電位下降，因而使的粒線體內的 cytochrome *c* 容易被釋放，而可能引發一系列的反應，進而可能走向 caspase-dependent apoptosis pathway 的細胞凋亡路徑。

由實驗結果顯示，在以大黃酚處理短時間的 Hep3B 細胞，細胞內鈣離子濃度逐漸增加（圖 5-6-A~B）。

A549 細胞方面，實驗結果顯示，經由大黃酚處理後鈣離子的濃度也一直呈增加的現象，而且無下降的現象（圖 5-6-C）。

(一) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的  $\text{Ca}^{2+}$  影響之測定

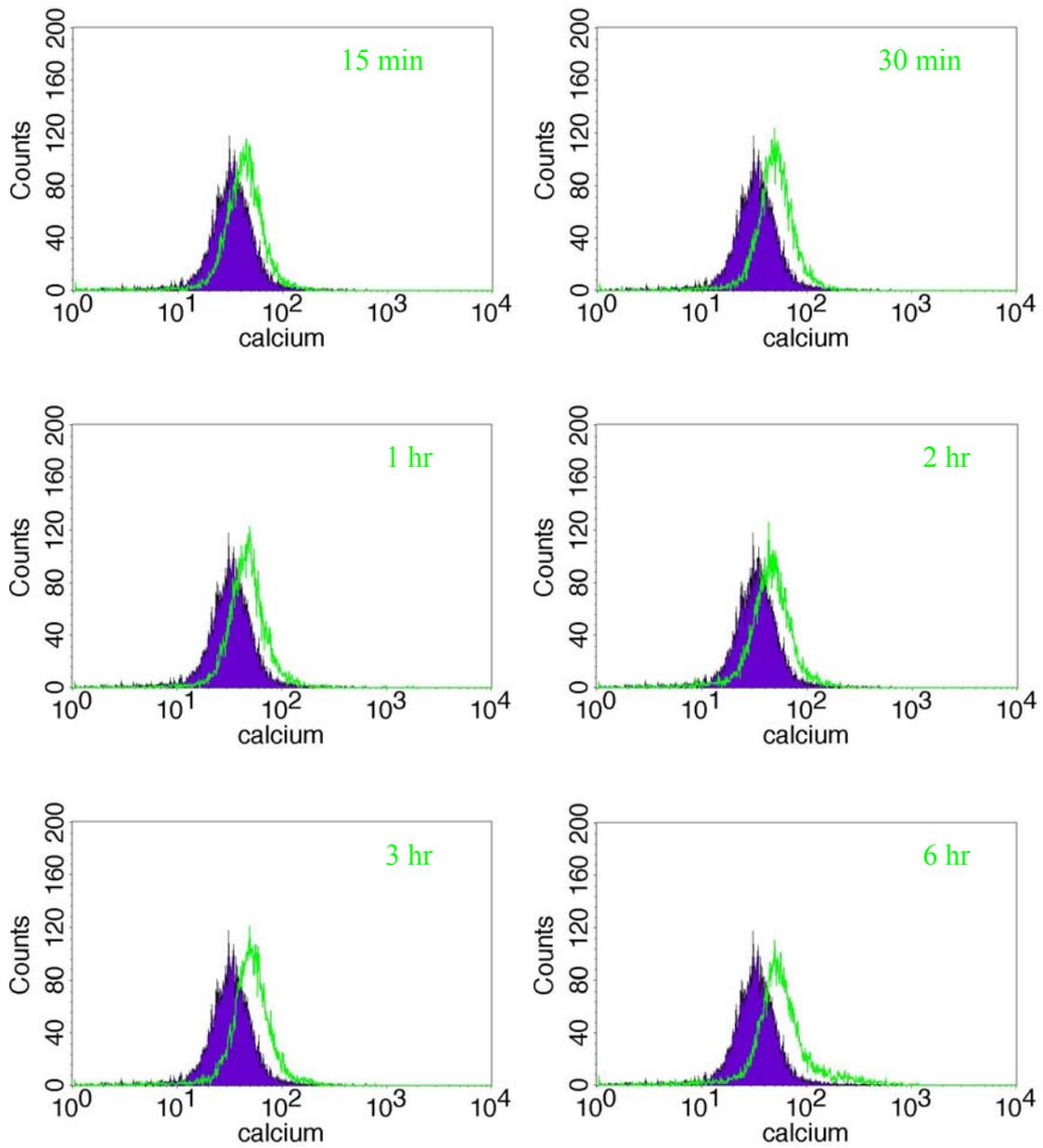
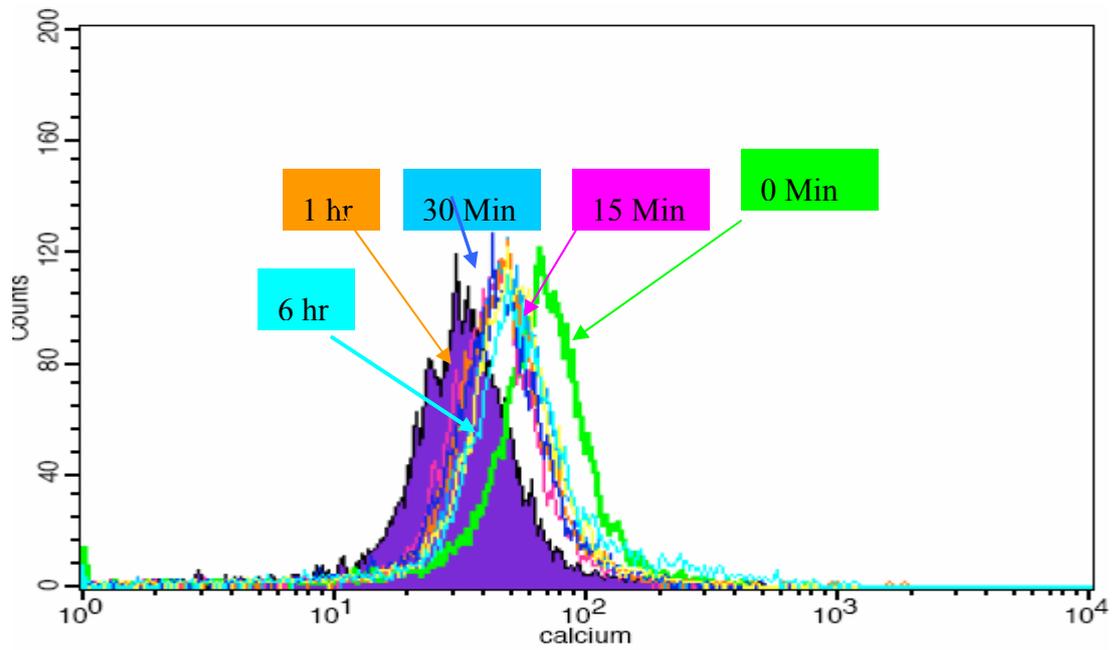


圖 5-6-A 濃度  $50 \mu\text{M}$  之大黃酚對於 Hep3B 細胞內之  $\text{Ca}^{2+}$  在藥物處理後 15 min ~ 6 hr 期間所產生的影響。

A.



B.

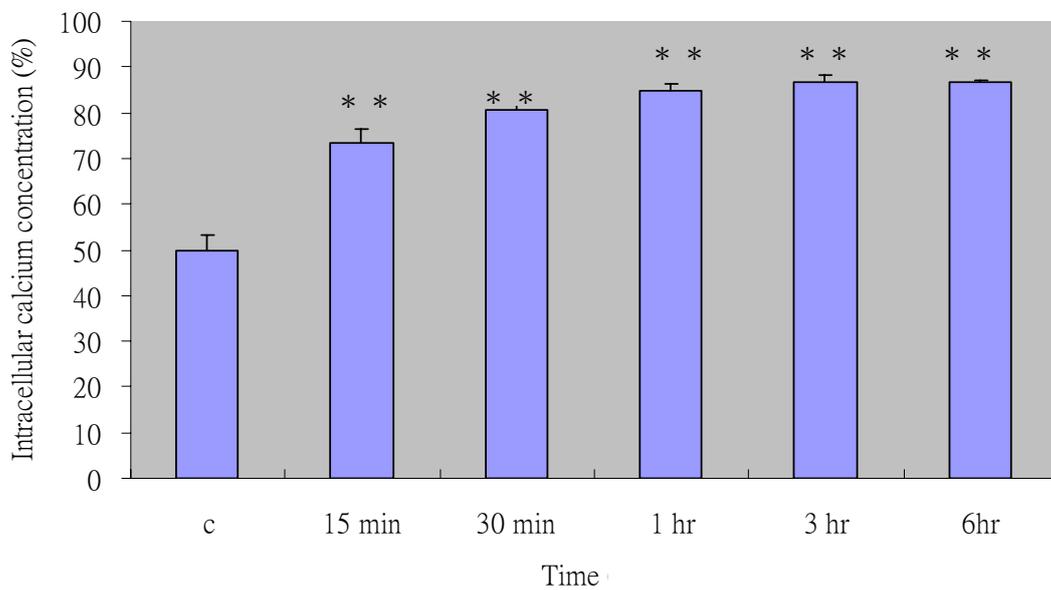


圖 5-6-B (A) 利用流式細胞儀偵測 Hep3B 細胞內不同時間  $\text{Ca}^{2+}$  釋放的分析圖, (B) Hep3B 細胞在加藥 15 min 至 6 小時後的  $\text{Ca}^{2+}$  相對表現量之統計圖 ( $n=3$ ; \* 表示與 c 組比較  $p < 0.05$ ; \*\* 表示與 c 組比較  $p < 0.01$ ; c 組為溶劑對照組)。

(二) 大黃酚對人類肝癌細胞株 A549 的細胞  $\text{Ca}^{2+}$  的影響測定

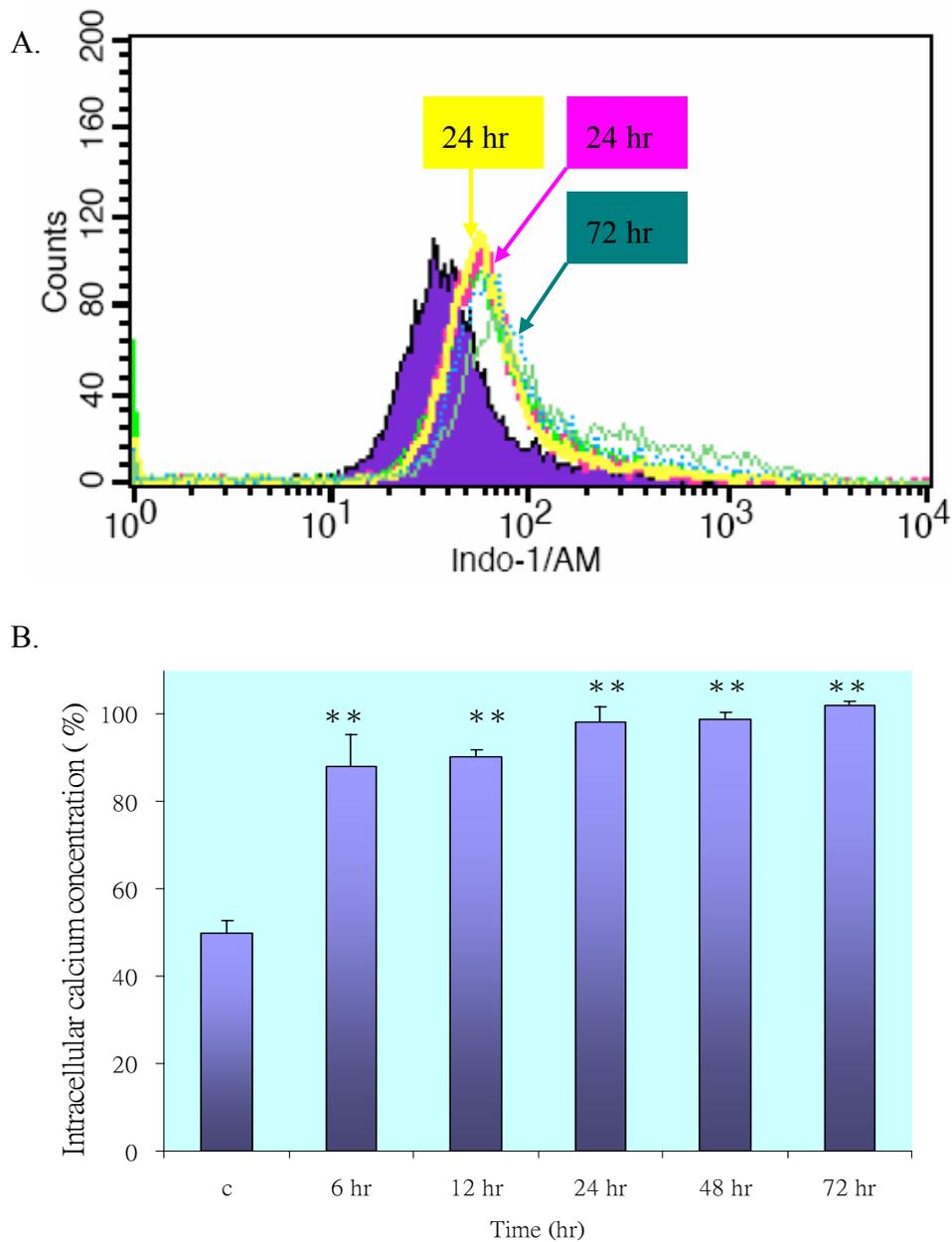


圖 5-6-C (A) 為利用流式細胞儀偵測 A549 細胞內不同時間的  $\text{Ca}^{2+}$  濃度的分析圖，(B) 為  $\text{Ca}^{2+}$  濃度相對表現量之統計圖 (n = 3; \*表示與 c 組比較 p < 0.05; \*\*表示與 c 組比較 p < 0.01; c 組為溶劑對照組)。

## 第七節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 細胞內 ATP 產生之影響

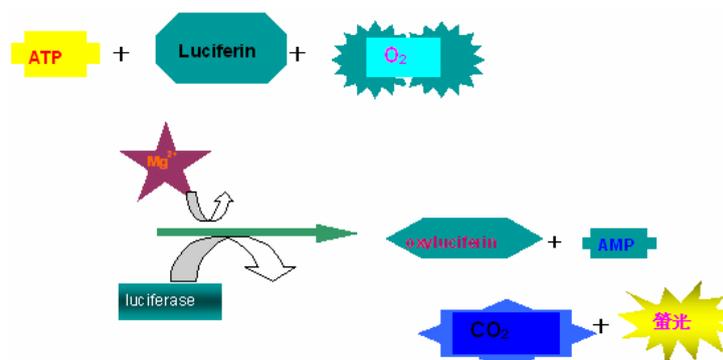


圖 5-7-A. 細胞內 ATP 濃度檢測原理

本實驗利用 luciferin 與 ATP 作用後會形成的螢光的特性以檢測在大黃酚的作用下，是否導致癌細胞內 ATP 濃度的下降，以此推測細胞是否走向細胞壞死的路徑。

實驗結果顯示，以大黃酚處理 6 小時之後的 Hep3B 細胞及 A549 細胞，經冷光螢光儀檢測細胞螢光的強度差異，顯示加藥組比控制組的螢光強度弱，表示細胞內 ATP 濃度降低而 100  $\mu$ M 大黃酚暴露的 A549 細胞，其 ATP 濃度上升。(圖 5-7-B ~ C)。

(一) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的細胞內 ATP 產生之影響測定

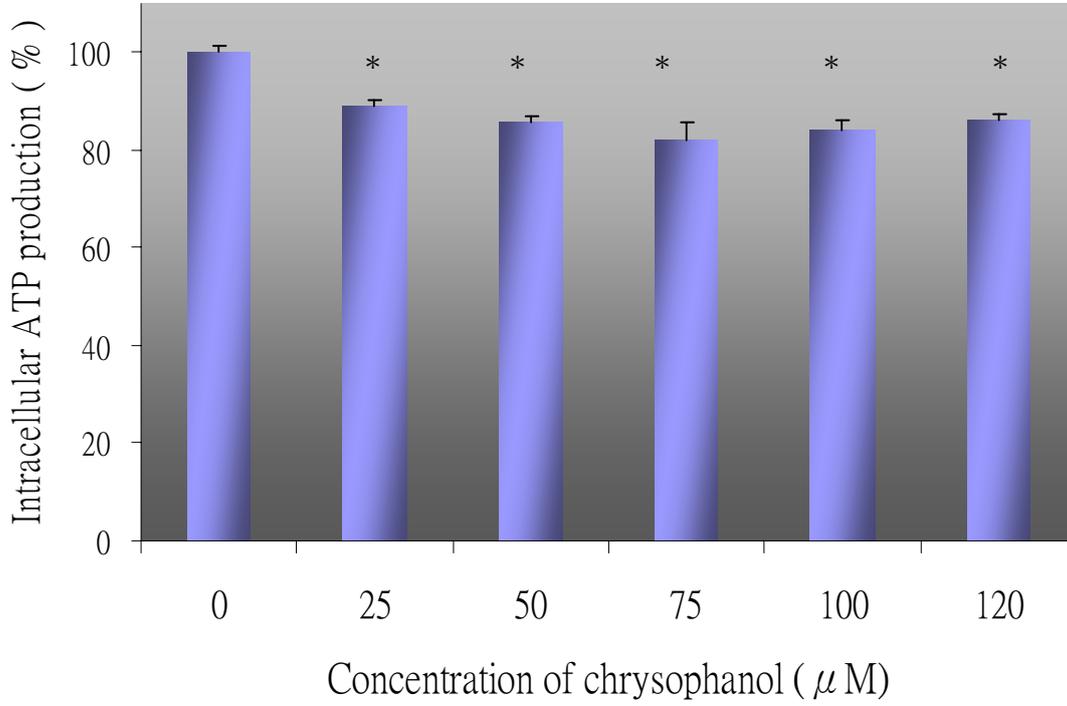


圖 5-7-B 大黃酚依不同濃度作用於人類肝癌細胞株 Hep3B 6 小時之後，利用冷光螢光儀檢驗不同濃度的細胞內 ATP 相對表現量之統計圖 (n = 3; \* 表示  $p < 0.05$ ; \*\* 表示  $p < 0.01$ )。

(二) 大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 的細胞內 ATP 產生之影響測定

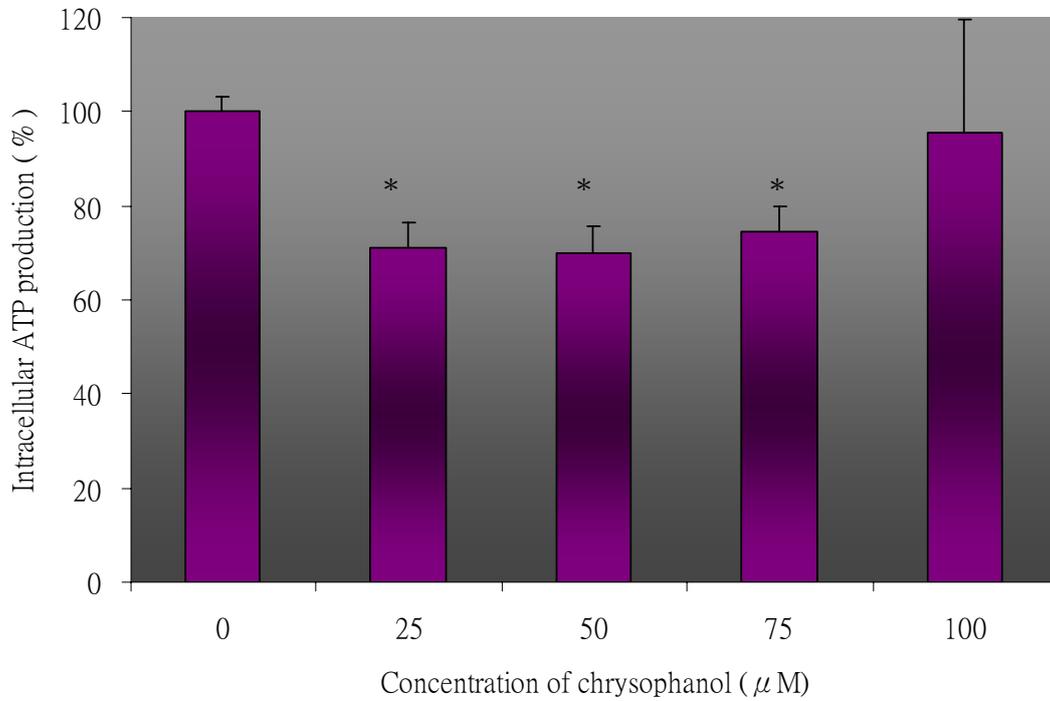


圖 5-7-C 大黃酚依不同濃度作用於人類肺癌細胞株 A549，在 6 個小時之後，利用冷光螢光儀檢驗在不同藥物濃度作用下，細胞內 ATP 相對表現量之統計圖 (n = 3；\* 表示  $p < 0.05$ ；\*\* 表示  $p < 0.01$ )。

## 第八節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株

### A549 細胞內 DNA 產生之影響

#### A. DAPI 染劑的測試

DAPI 會與 DNA 的雙股螺旋小溝的 A、T 區結合，當 DAPI 與 DNA 結合後會發出較強的藍色螢光，Hep3B 與 A549 在加藥處理並培養 48 小時之後，以 DAPI 染劑作用並觀察顯示隨著藥物濃度增加，細胞數目呈現減少的現象，而細胞內的螢光強度逐漸增強，細胞具明顯亮點的比例越來越明多。

#### B. 彗星試驗

彗星試驗是利用電泳原理，將受損斷裂的 DNA 片段分離出細胞外，經由 PI 染劑以觀察細胞外 DNA 的片段多寡，所以又稱為單細胞電泳實驗，若 DNA 受損的程度越嚴重，DNA 斷裂的片段就越多，電泳拖尾的現象就更明顯，可用以評估 DNA 受損的程度。由於先前的流式細胞儀檢測細胞存活率結果顯示，在大黃酚處理 Hep3B 與 A549 後的 24 小時，兩株細胞的存活率就已明顯的降低，所以彗星試驗僅僅在藥物處理 24 小時之後，就收取細胞進行電泳以觀察結果。結果顯示藥物在低濃度就已出現細胞拖尾的現象，而且隨著藥物濃度增加，拖尾的現象更明顯。

(一) 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 造成的 DNA 傷害的檢測

A. DAPI 染劑的測試

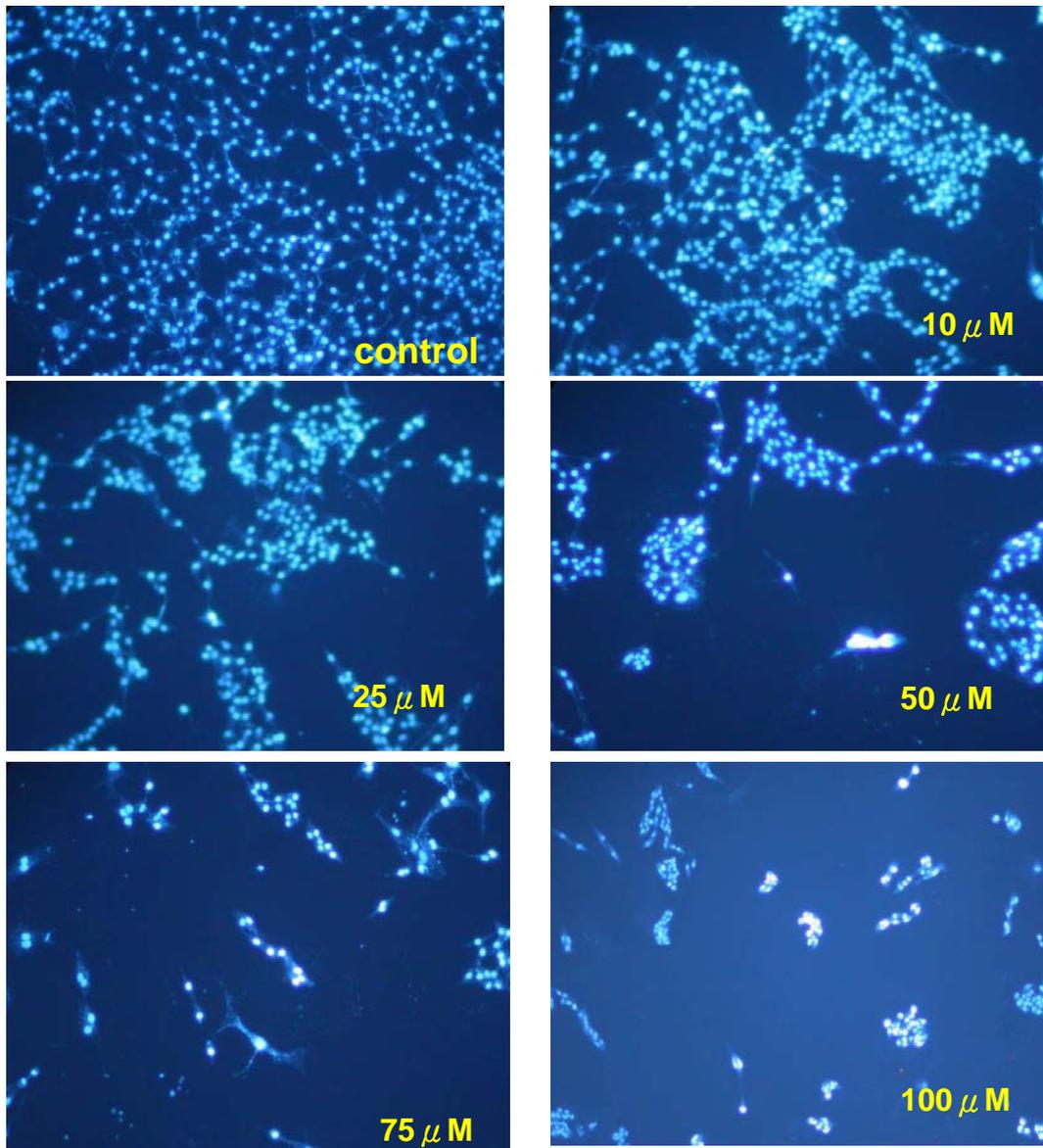


圖 5-8-A 不同濃度大黃酚作用在 Hep3B 細胞 48 小時後的 DAPI 試驗，用螢光光源的倒立式顯微鏡觀察細胞的螢光強度 (100 X)。

B. 大黃酚對人類肝癌細胞 Hep3B 作用後進行彗星試驗

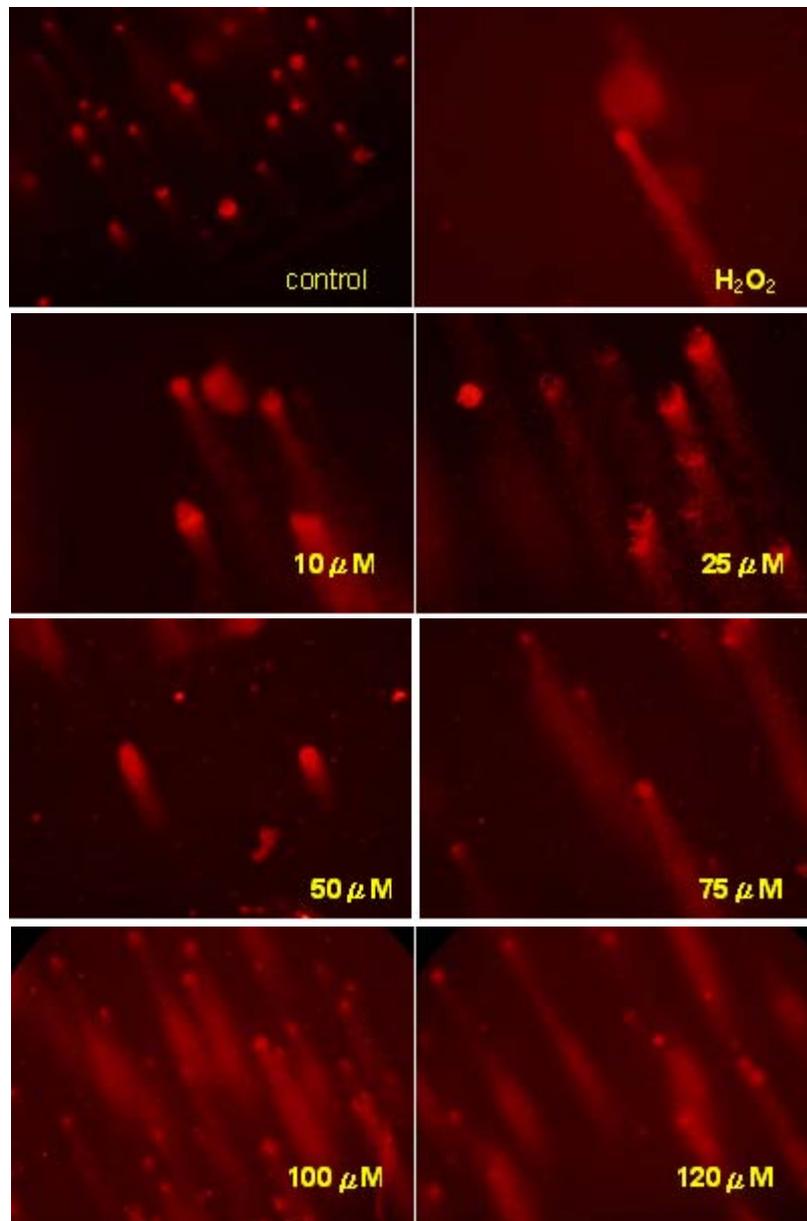


圖 5-8-B 利用彗星試驗檢測不同濃度大黃酚作用在人類肝癌細胞 Hep3B，在 48 小時之後，以螢光光源的倒立式顯微鏡觀察細胞的拖尾狀況 (200 X)。

(二) 大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 造成的 DNA 傷害的檢測

A. DAPI 染劑的測試

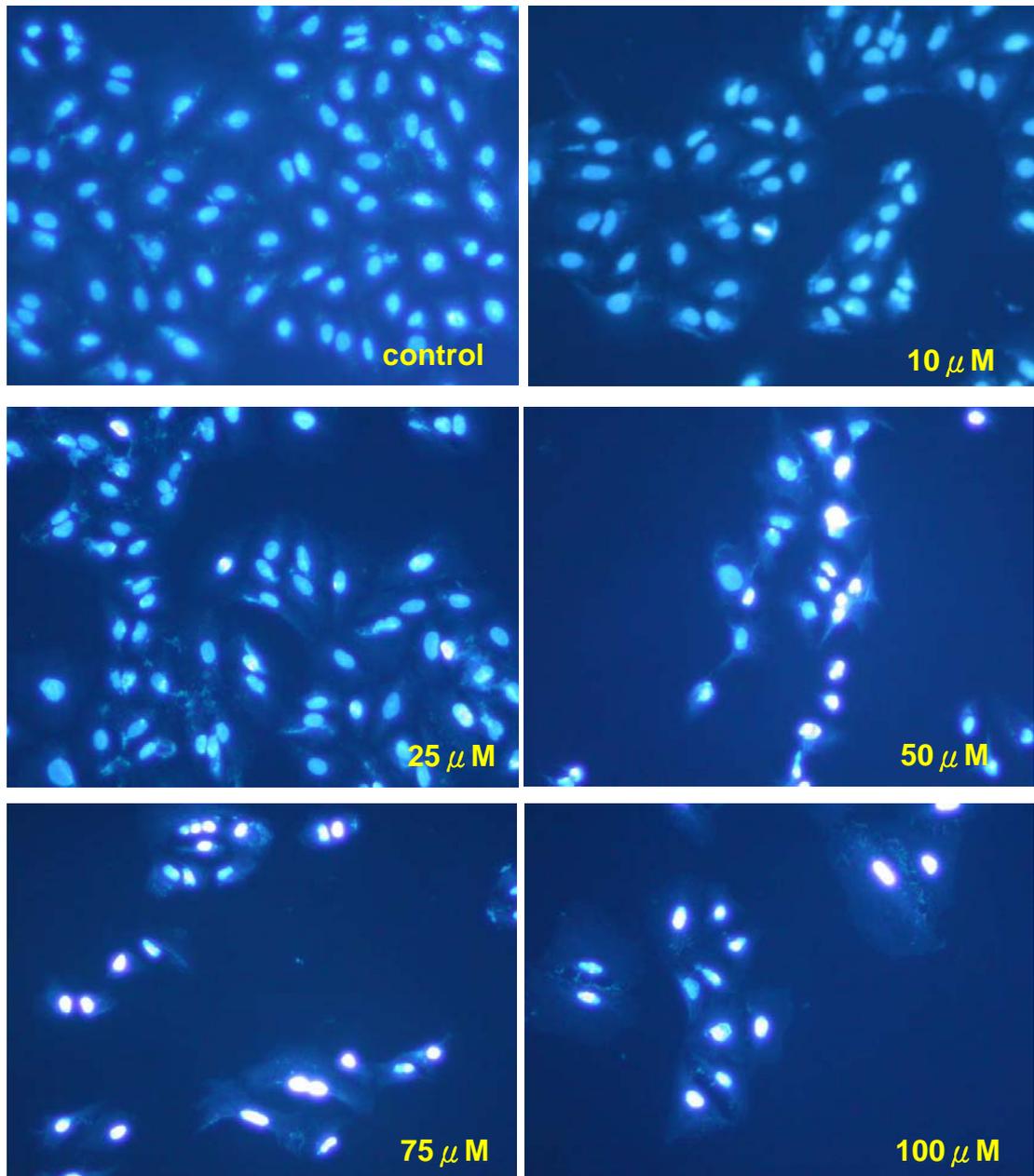


圖 5-8-C 不同濃度大黃酚作用在 A549 細胞，在 48 小時之後，利用螢光顯微鏡觀察細胞核的螢光狀況 (200 X)。

B. 大黃酚對人類肺癌細胞 A549 作用後進行彗星試驗

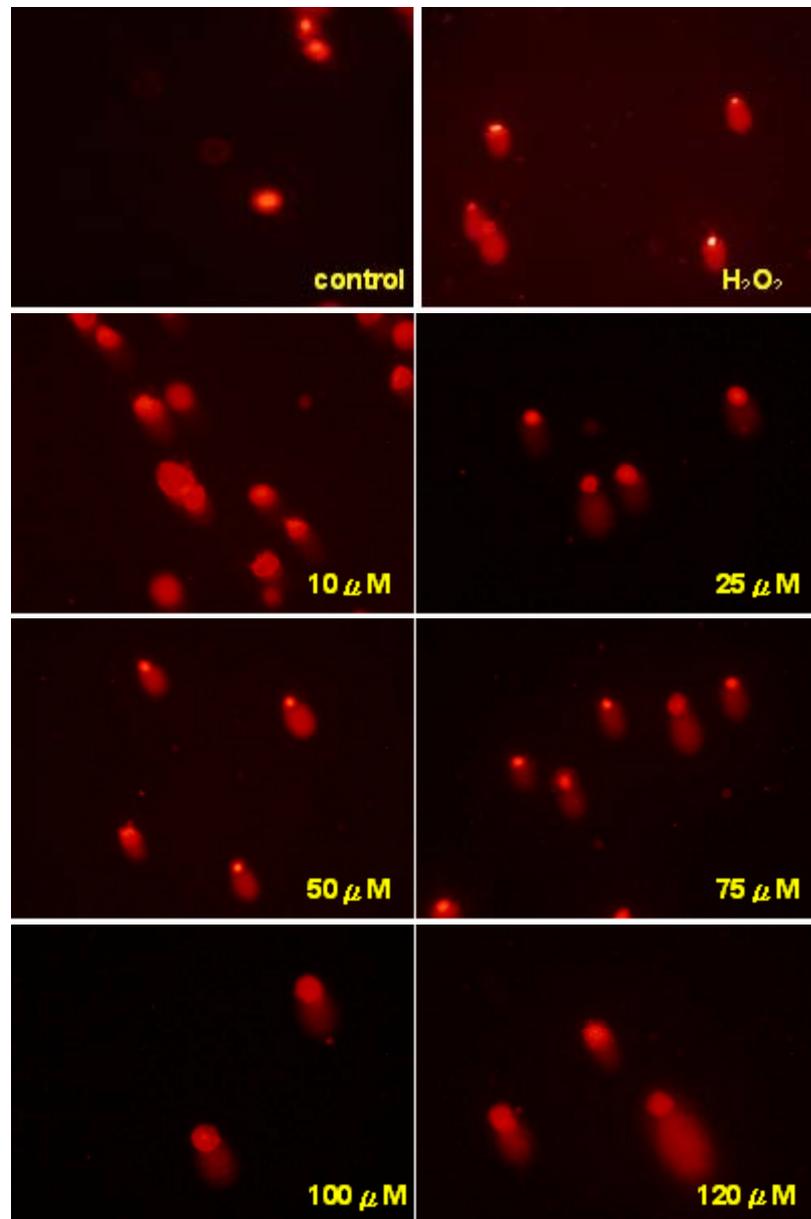


圖 5-8-D 利用彗星試驗檢測不同濃度大黃酚作用在人類肝癌細胞 A549，在 48 小時之後，在螢光光源的倒立式顯微鏡下觀察細胞的拖尾狀況 (200 X)。

## 第九節 西方墨點法檢測參與 Hep3B 與 A549 細胞壞死的調控蛋白表現量的差異

(一) 利用西方墨點法探討大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 細胞壞死的調控蛋白表現量的差異

以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 以  $50 \mu\text{M}$  的濃度作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後的蛋白相對表現量，結果顯示加藥組在影響細胞內 ROS 代謝的酵素包括 GST、SOD (Mn)、SOD (Cu) 及 catalase 蛋白皆比控制組的表現量低，但是 SOD (Mn)、SOD (Cu) 及 catalase 在 48 及 72 小時皆有回升的現象。加藥組的 PARP 在 12~72 小時的表現量皆比控制組高，與細胞凋亡中的死亡接受器相關的 caspase 8 蛋白，在加藥組的表現量比控制組低，細胞凋亡中與的粒線體路徑有關的 AIF、Apaf-1、caspase 9 蛋白，加藥組的表現量沒有比控制組高，其中 AIF 的表現量在 6~12 小時的表現量雖然高於控制組但是在 48 與 72 小時的表現量就控制組低。另外，可顯示粒線體電子傳遞鏈崩解程度的 cytochrome c 表現量則上升。

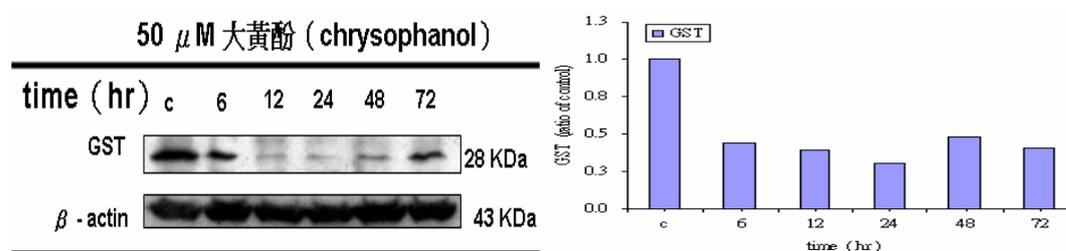
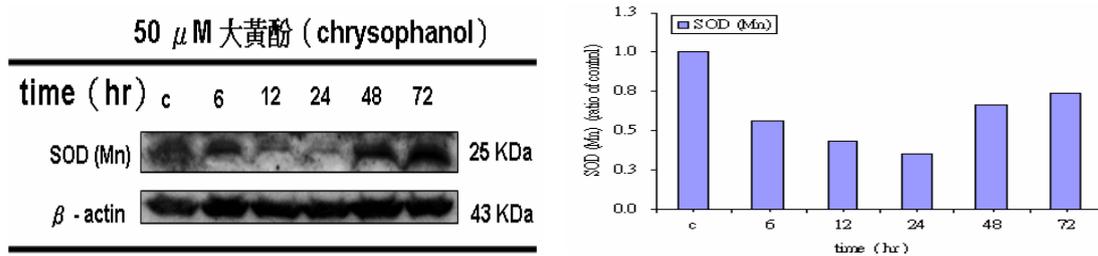


圖 5-9-A 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 ( $50 \mu\text{M}$ ) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；圖左為 GST 蛋白的表現量，圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

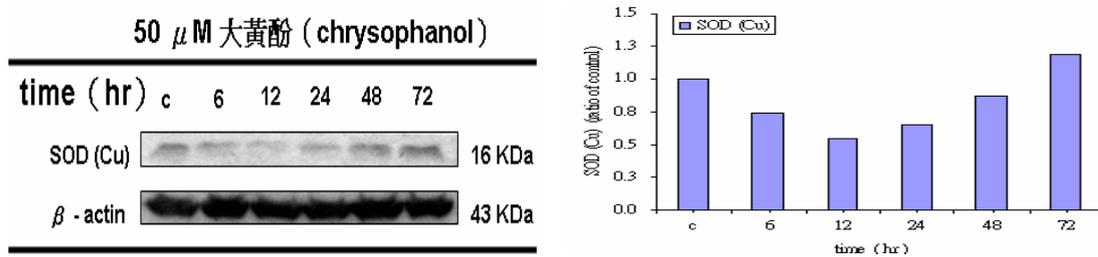
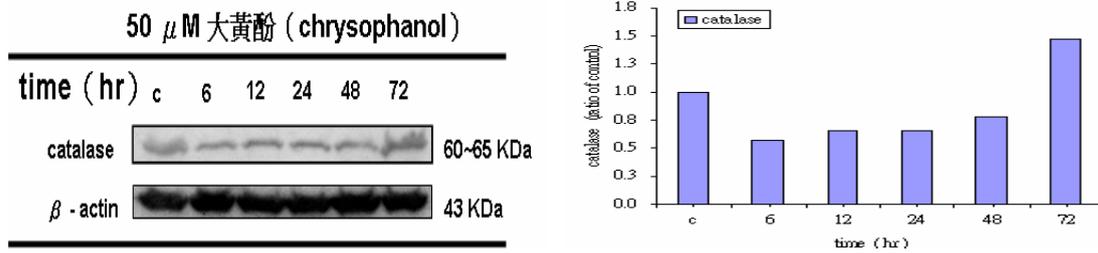


圖 5-9-B 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 SOD (Mn) 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 SOD (Cu) 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

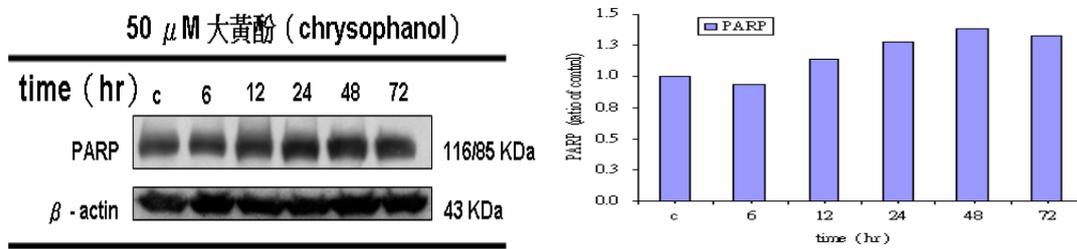
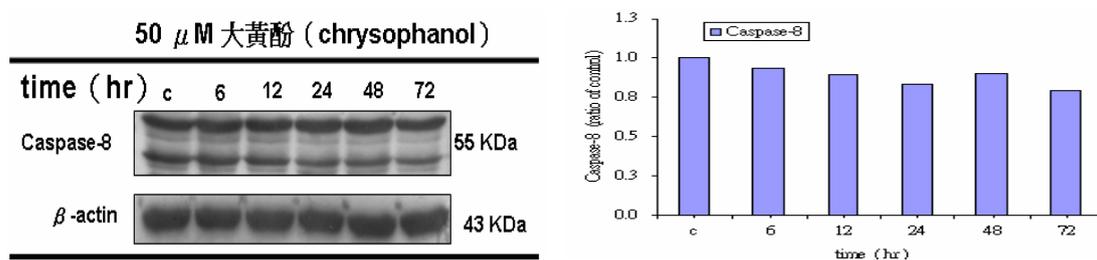


圖 5-9-C 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 catalase 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 PARP 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

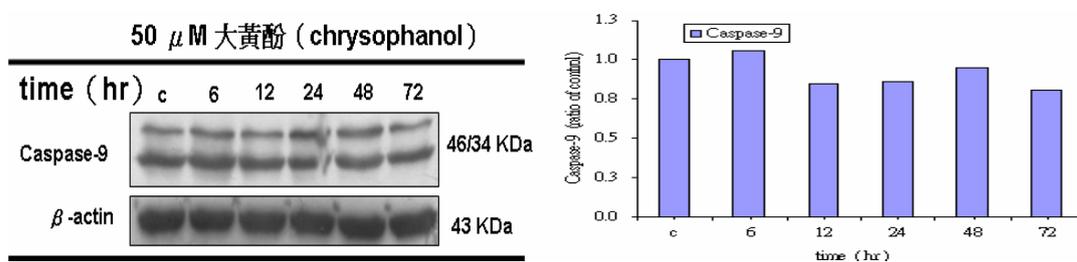
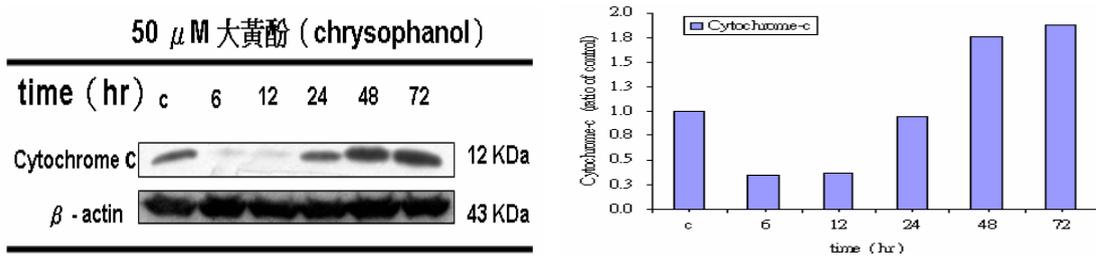


圖 5-9-D 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 caspase 8 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 caspase 9 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

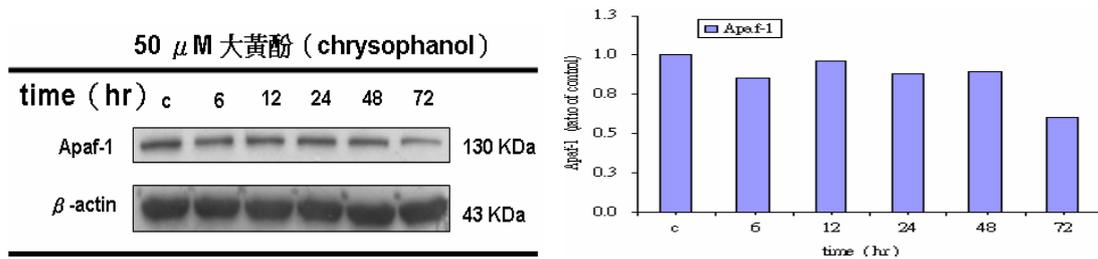


圖 5-9-E 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 cytochrome *c* 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 Apaf-1 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

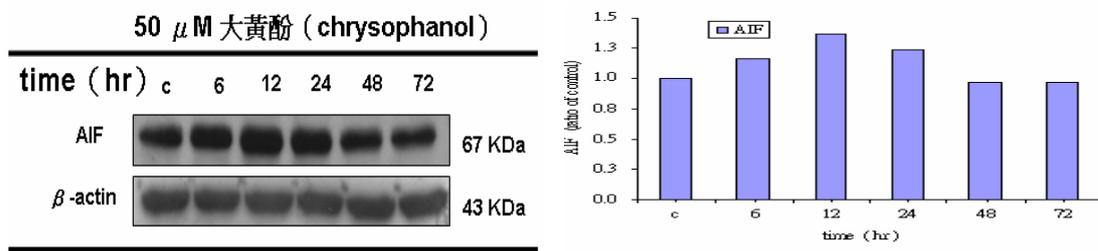
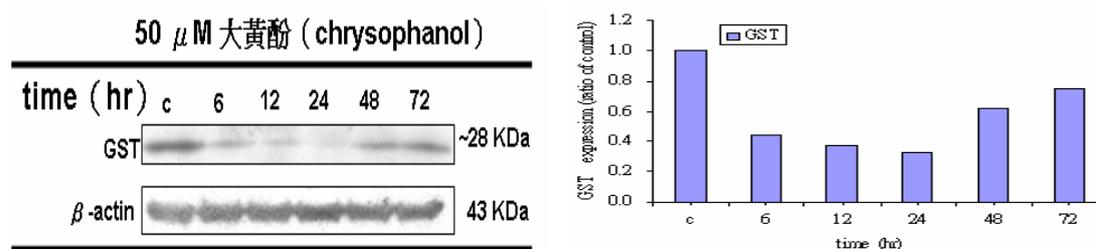


圖 5-9-F 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；圖左為 AIF 蛋白的表現量，圖右為 AIF 蛋白量化統計圖。

(二) 利用西方點墨法探討大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 細胞細胞壞死的調控蛋白表現量的差異

以西方墨點法分析 A549 細胞蛋白相對表現量的結果顯示加藥組在影響細胞內 ROS 代謝的酵素包括 GST、SOD (Cu) 及 catalase 蛋白皆比控制組的表現量低，但是在 24 ~ 72 小時皆有回升的現象。加藥組的 PARP 在 12 ~ 72 小時的表現量皆比控制組高，與死亡接受器路徑相關的 caspase 8 蛋白，在加藥組的表現量比控制組低；粒線體路徑有關的 AIF、Apaf-1、caspase 3 蛋白，加藥組的表現量比控制組低。另外，可顯示電子傳遞鏈崩解程度的 cytochrome c 表現量則上升。

(A)



(B)

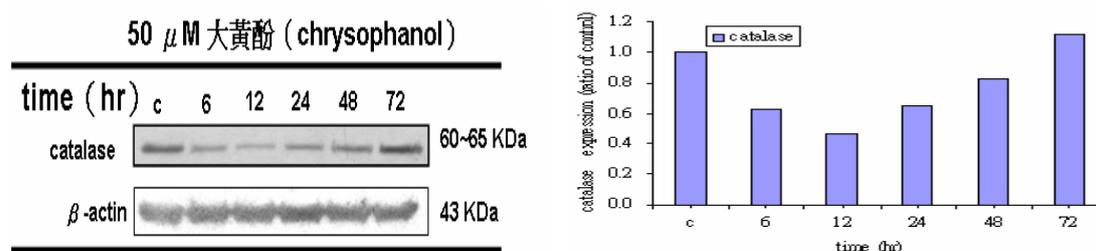
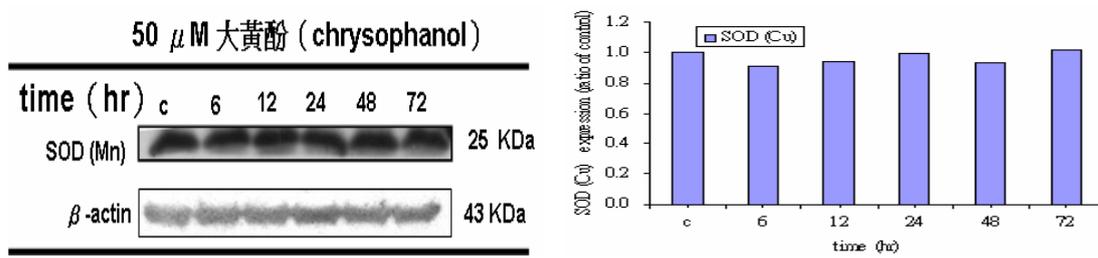


圖 5-9-G 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 GST 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 catalase 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

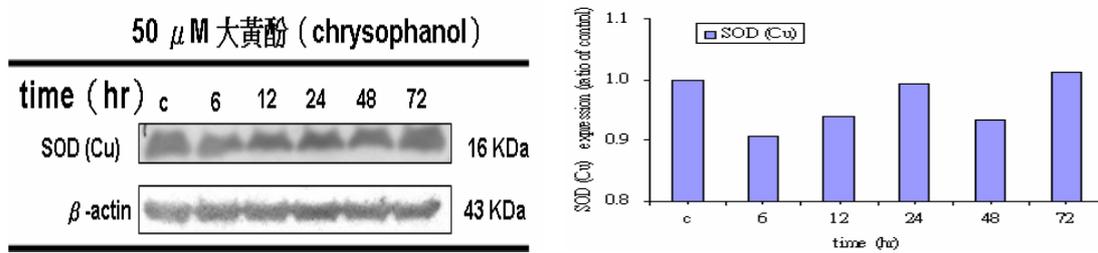
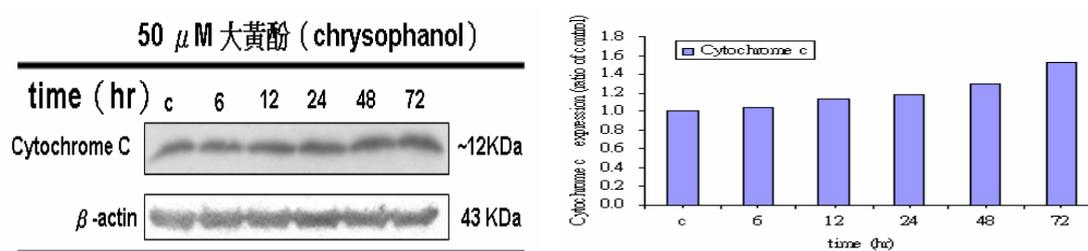


圖 5-9-H 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 SOD (Mn) 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 SOD (Cu) 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

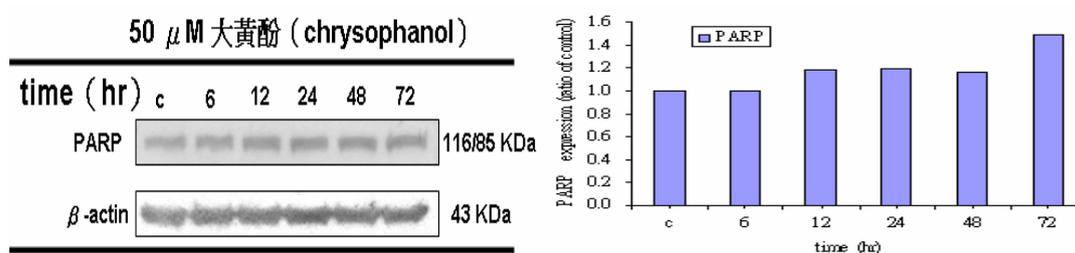
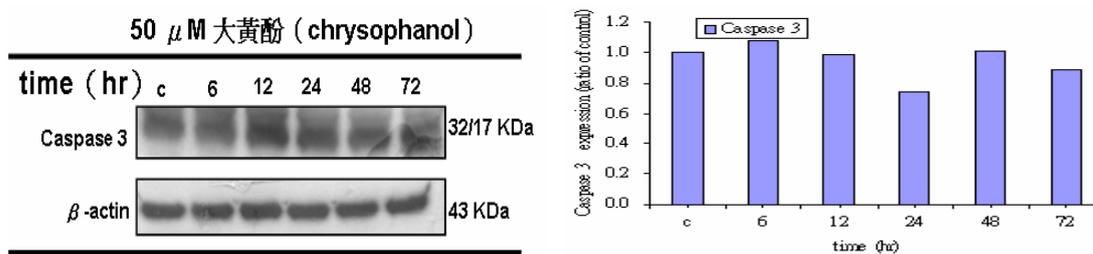


圖 5-9-I 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 cytochrome *c* 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 PARP 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

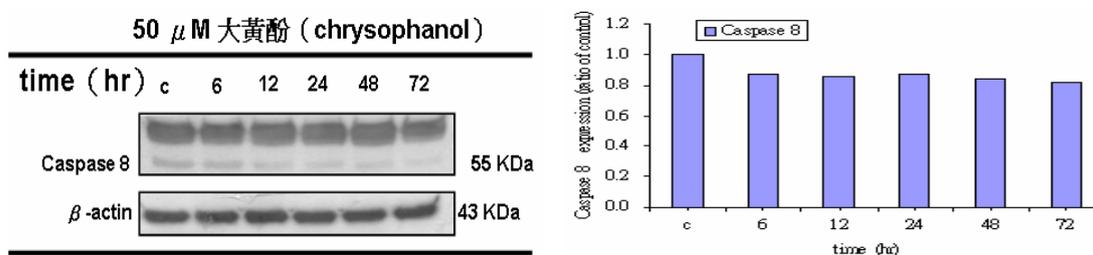
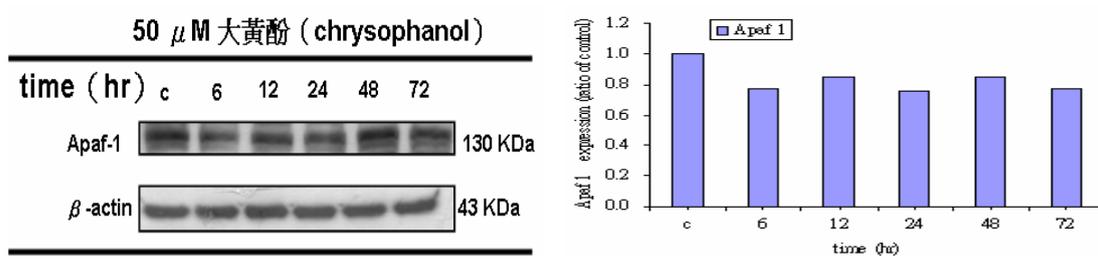


圖 5-9-J 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 caspase 3 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 caspase 8 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

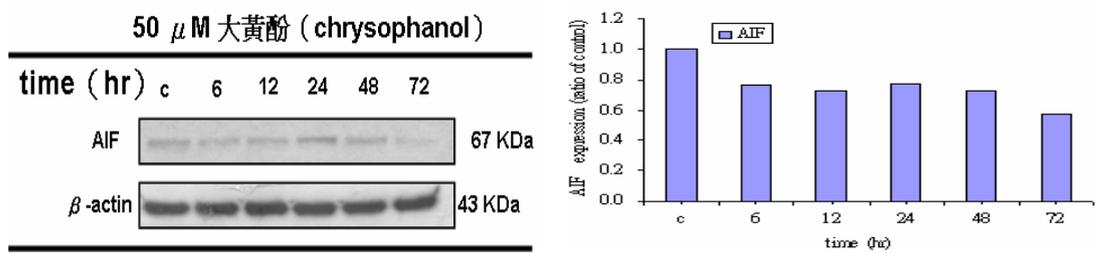


圖 5-9-K 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 Apaf-1 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 AIF 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

## 第十節 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549 在轉移相關步驟所造成的影響

細胞轉移的過程，包含很多複雜的步驟，其中牽涉到細胞移動，穿透基底膜，適應新環境等步驟。

在移動試驗的實驗結果顯示，Hep3 與 A549 若無藥物作用下（控制組），本身原就擁有轉移的能力，控制組的細胞聚集的邊緣線隨著時間增加而逐漸不規則，邊緣的細胞逐漸呈現不規則形態，原本沒有細胞生長的區域，逐漸有細胞貼附，經過藥物處理的細胞，細胞邊緣線較整齊，顯示細胞被大黃酚影響其移動能力（圖 5-10-A~E；圖 5-10-K~O）。

（一）以細胞移動試驗分析大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 之移動現象之影響

A.

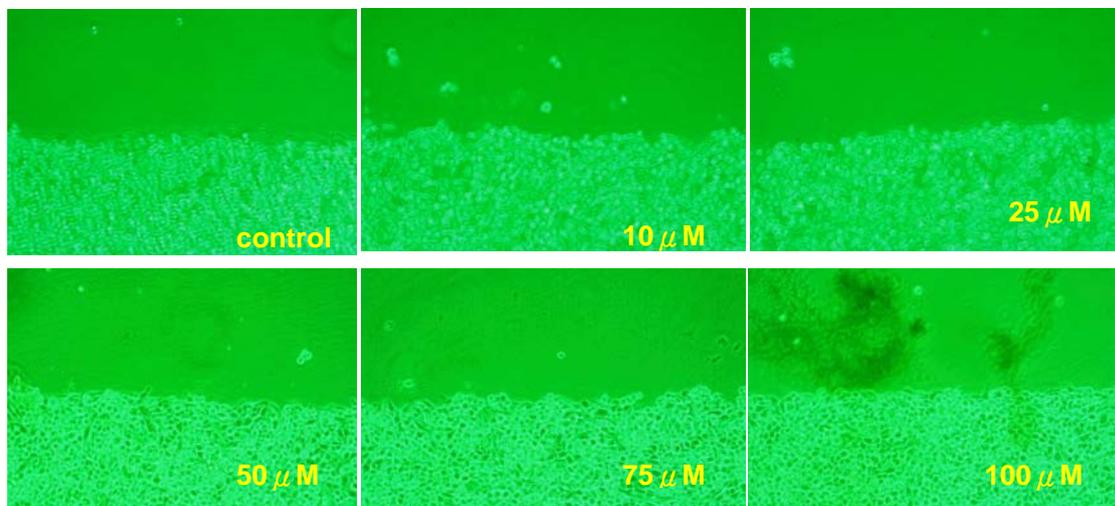


圖 5-10-A 以 50  $\mu$ M 濃度的大黃酚在 0 小時的時間點對 Hep3B 細胞移動現象之影響（200 X）。

B.

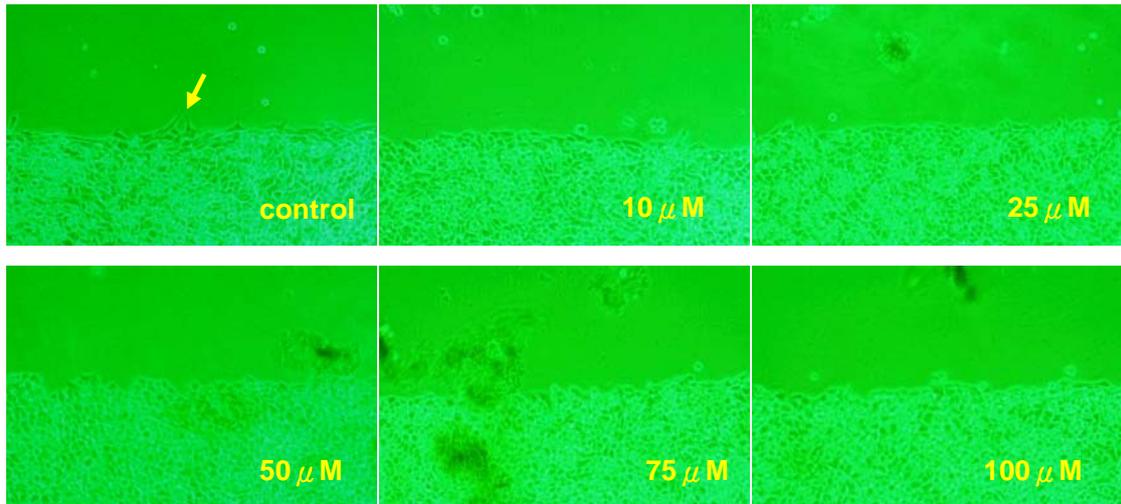


圖 5-10-B 以 50 μM 濃度大黃酚在 6 小時的時間點對 Hep3B 細胞移動現象之影響 (200 X)。

C.

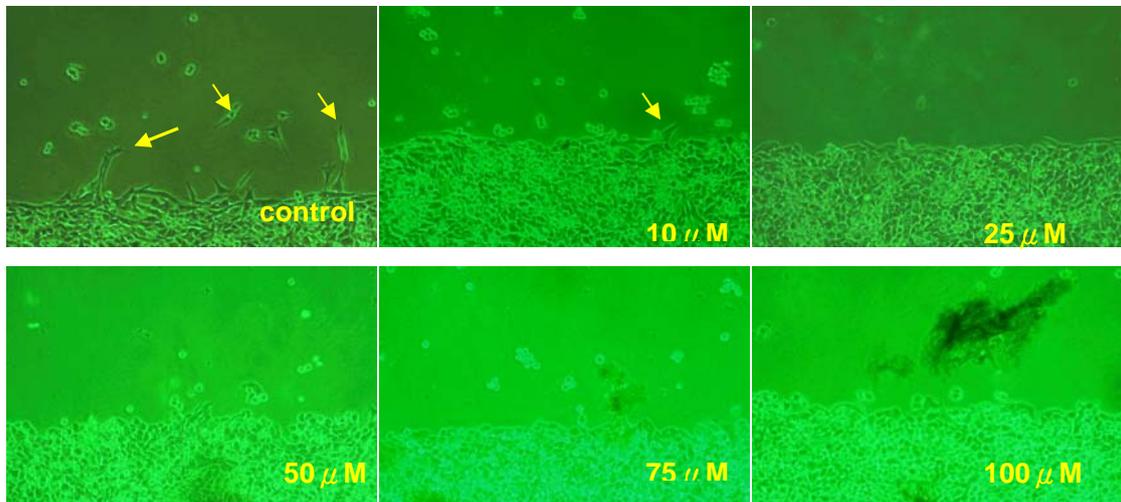


圖 5-10-C 以 50 μM 濃度大黃酚在 12 小時的時間點對 Hep3B 細胞移動現象之影響 (200 X)

D.

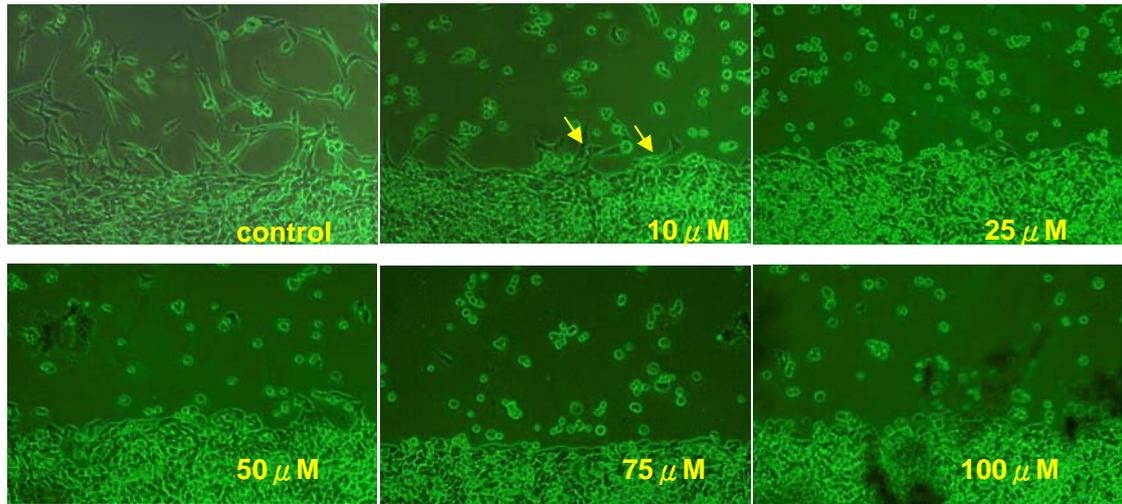


圖 5-10-D 50  $\mu\text{M}$  濃度大黃酚在 24 小時的時間點對 Hep3B 細胞移動現象之影響 (200 X)

E.

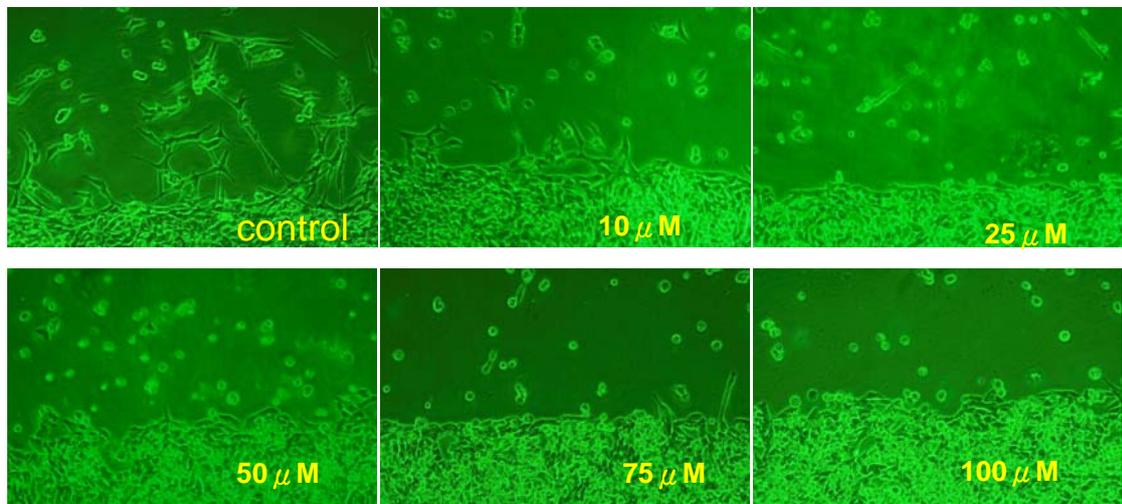


圖 5-10-E 50  $\mu\text{M}$  濃度大黃酚在 36 小時的時間點對 Hep3B 細胞移動現象之影響 (200 X)。

(二) 以細胞穿透試驗分析大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 的細胞穿透現象之影響

由穿透試驗的結果顯示，在顯微鏡的視野下，這 Hep3B 細胞的控制組從 Transwell 的內底部移動到另一面的數目最多，而 IC<sub>50</sub> 的藥物濃度 (50  $\mu$ M) 下，細胞穿越到另一面的數目最少，加藥組 25  $\mu$ M 的數量比較多些 (圖 5-10-F)，A549 細胞的控制組在顯微鏡的視野下，也明顯多於加藥組 (圖 5-10-P)，顯示大黃酚的抑制穿透能力隨著藥物濃度而增加。

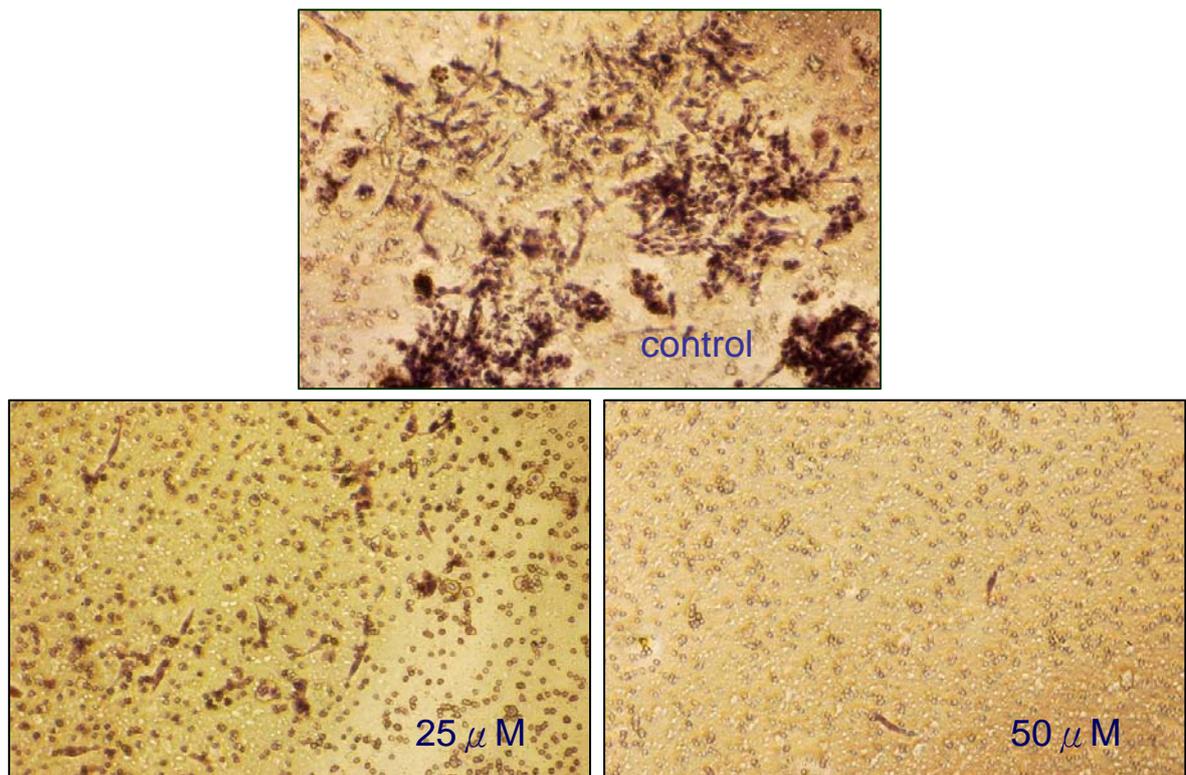
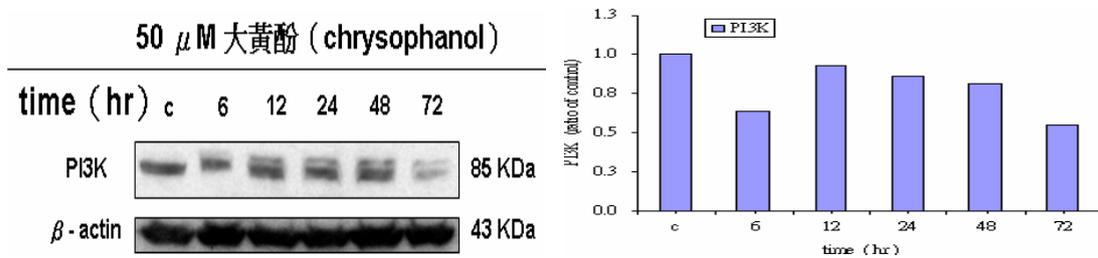


圖 5-10-F 50  $\mu$ M 濃度大黃酚在 24 小時的時間點對 Hep3B 細胞穿透現象之影響 (200 X)。

(三) 利用西方點墨法探討大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 細胞轉移相關調控蛋白表現量的差異

西方墨點法的結果顯示，大黃酚對於 Hep3B 細胞轉移相關的上游調控 PI3K 與 ERK 蛋白有降低表現的現象 (圖 5-10-G)，而對於下游調控蛋白 COX-2 及 MMPs 系列中的 MMP-1、MMP-2、MMP-7 蛋白，其加藥組表現量，比控制組的表現量低 (圖 5-10-H~I)，另外對於會促進微血管增生的刺激因子如 VEGF 與 EPO 的生合成都有降低的作用 (圖 5-10-J)。

(A)



(B)

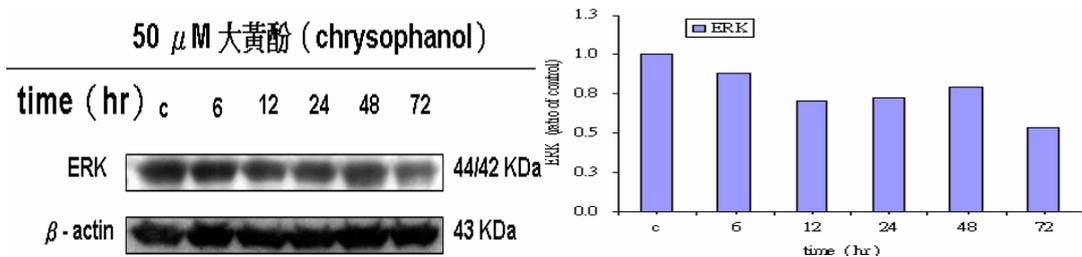
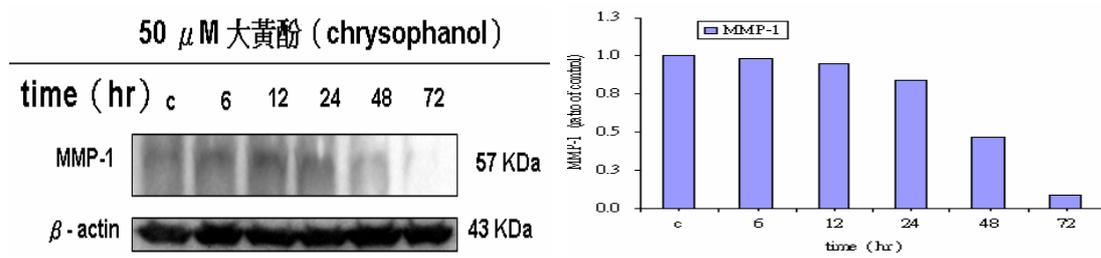


圖 5-10-G 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50 μM) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 PI3K 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 ERK 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

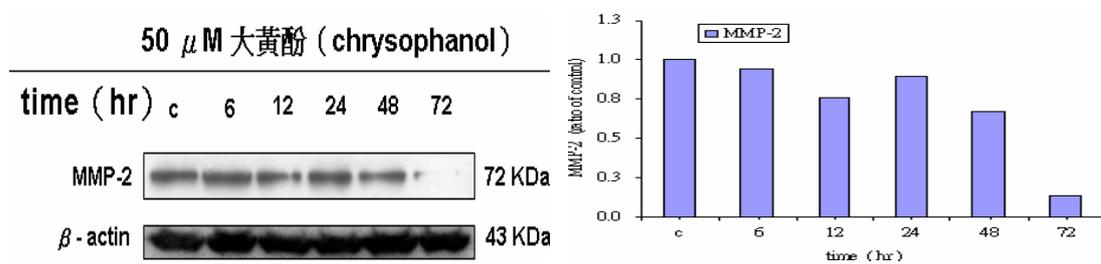
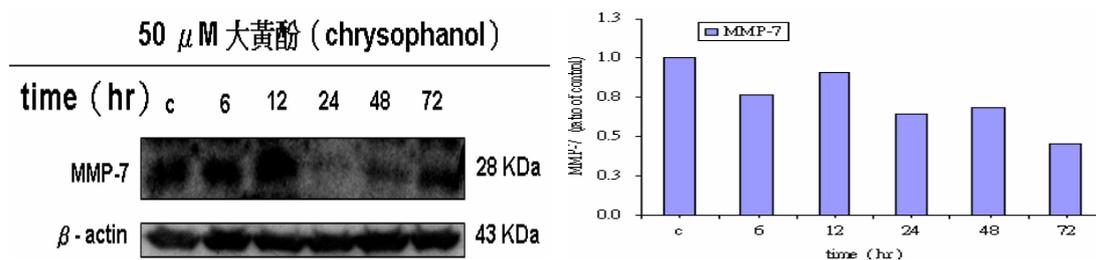


圖 5-10-H 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 MMP-1 蛋白的表現量，圖右為量化統計圖；B 圖左為 MMP-2 蛋白的相對表現量，圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

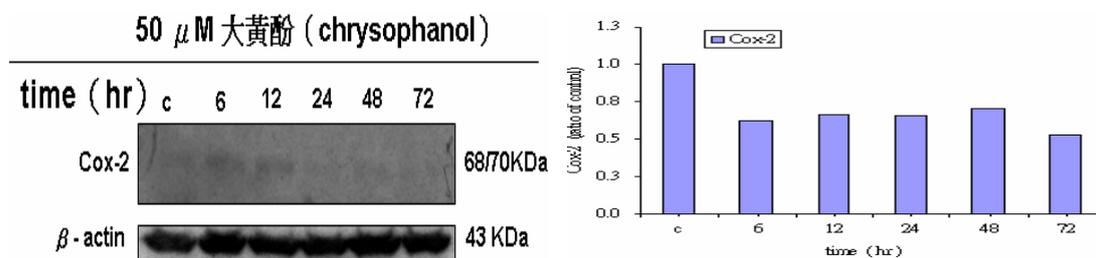
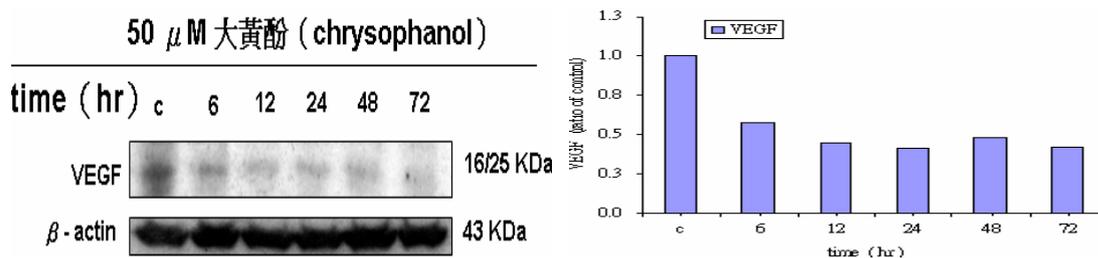


圖 5-10-I 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 MMP-7 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 COX-2 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

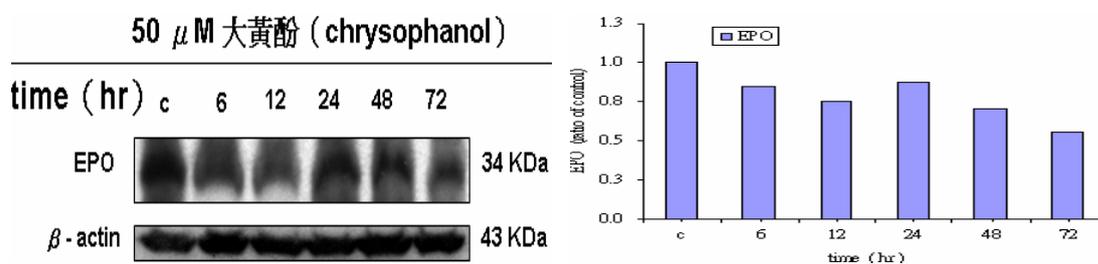


圖 5-10-J 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 Hep3B 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72h) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 VEGF 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 EPO 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(四) 以細胞移動試驗分析大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 的細胞移動現象之影響

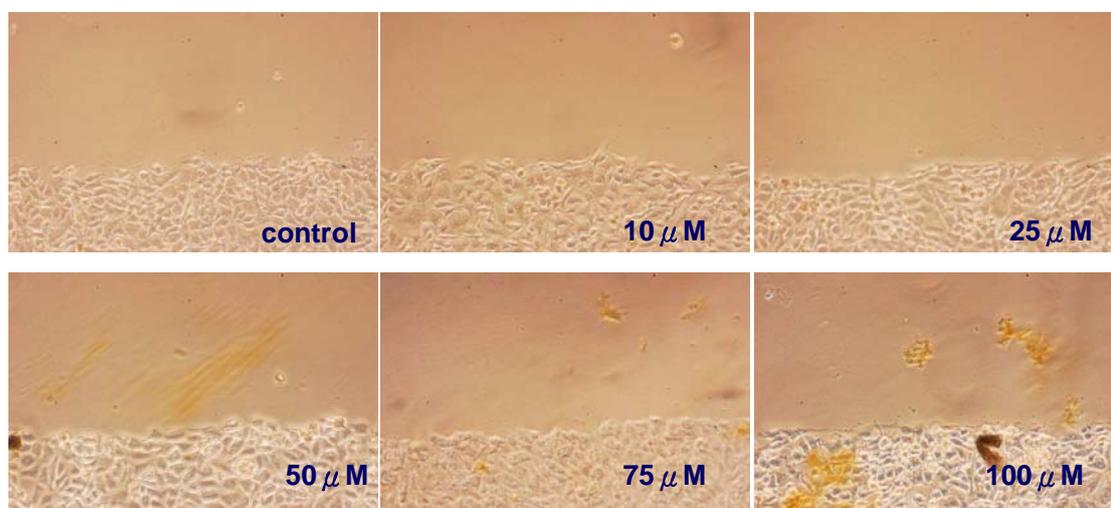


圖 5-10-K 以 50  $\mu$ M 濃度大黃酚在 0 小時的時間點對 A549 細胞移動現象之影響 (200 X)。

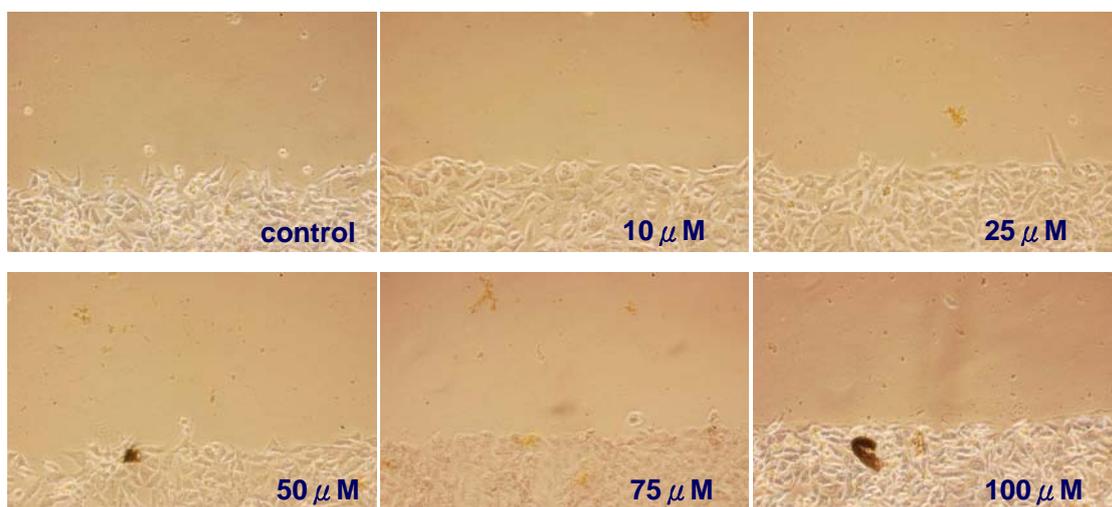


圖 5-10-L 以 50  $\mu$ M 濃度大黃酚在 6 小時的時間點對 A549 細胞移動現象之影響 (200 X)。

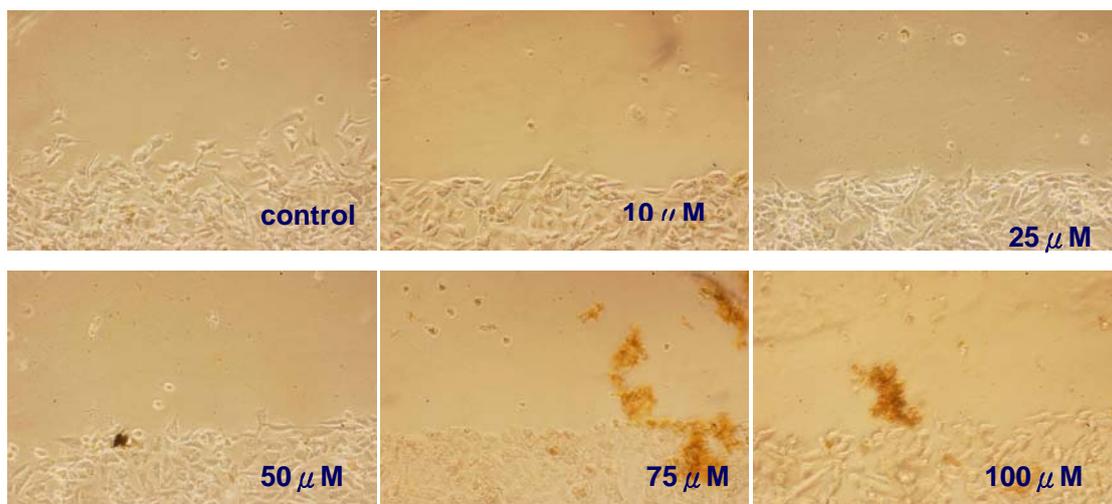


圖 5-10-M 以 50  $\mu$ M 濃度大黃酚在 12 小時的時間點對 A549 細胞移動現象之影響 (200 X)。

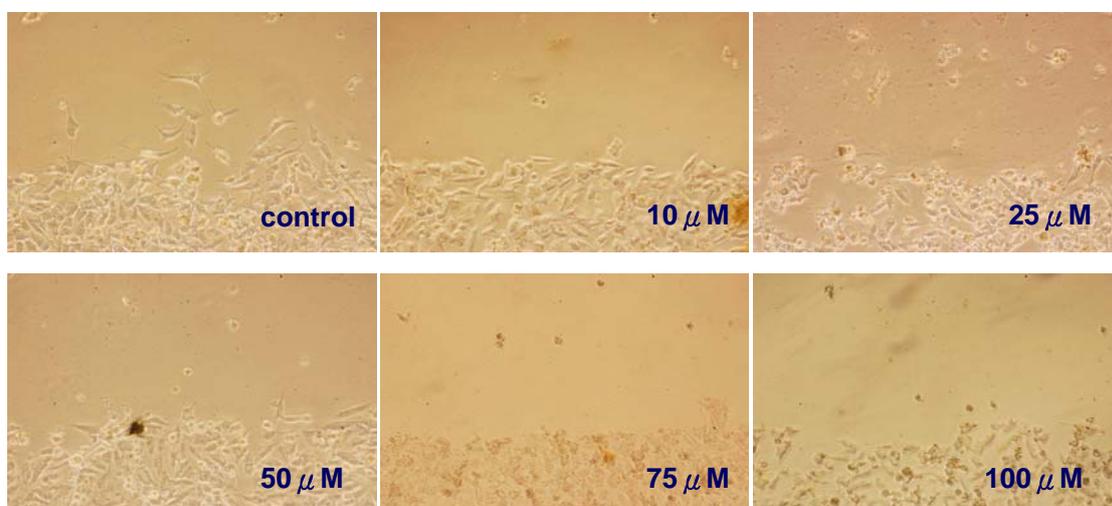


圖 5-10-N 以 50  $\mu$ M 濃度大黃酚在 24 小時的時間點對 A549 細胞移動現象之影響 (200 X)。

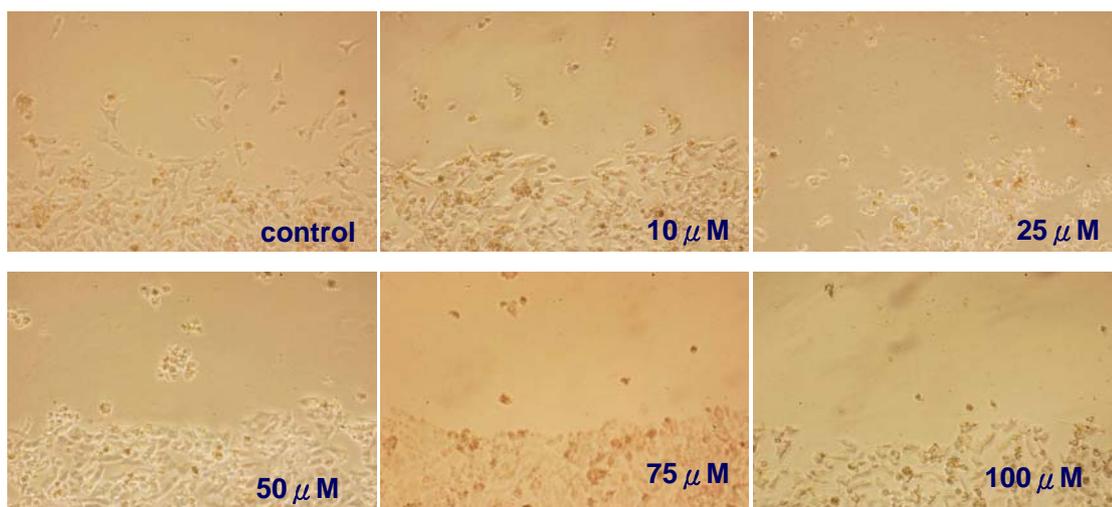


圖 5-10-O 以 50  $\mu$ M 濃度大黃酚在 48 小時的時間點對 A549 細胞移動現象之影響 (200 X)。

(五) 以細胞穿透試驗分析大黃酚對人類肺癌細胞株 A549 之細胞  
穿透現象之影響

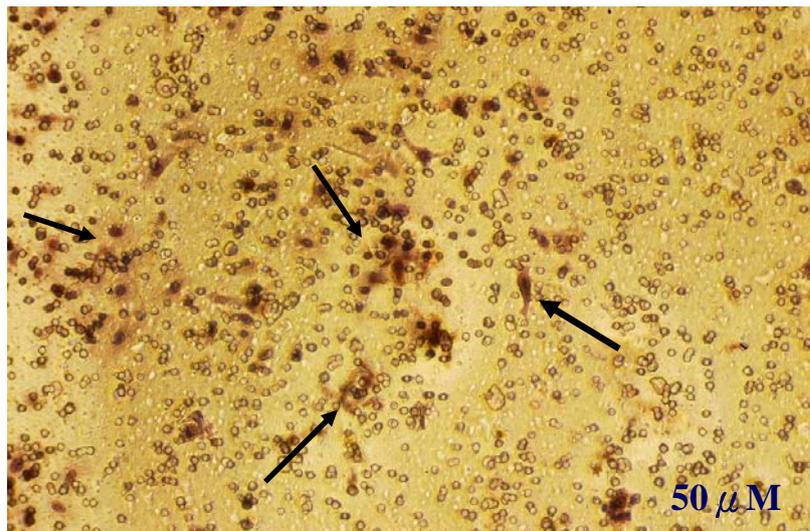
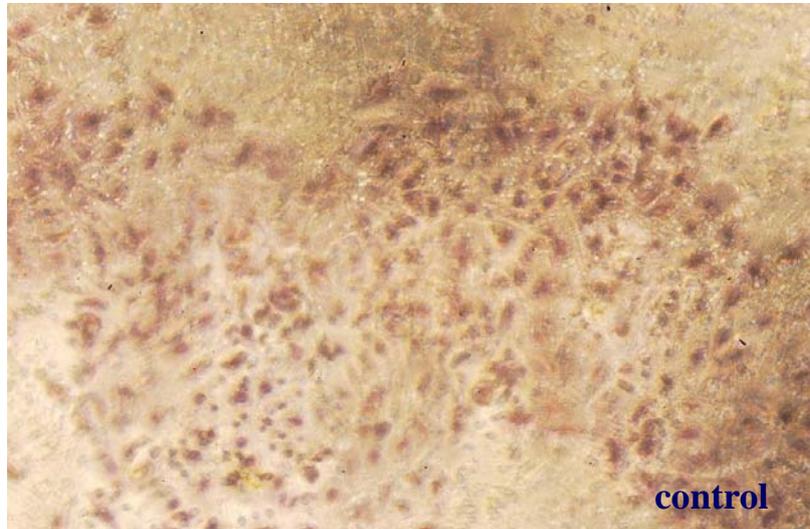
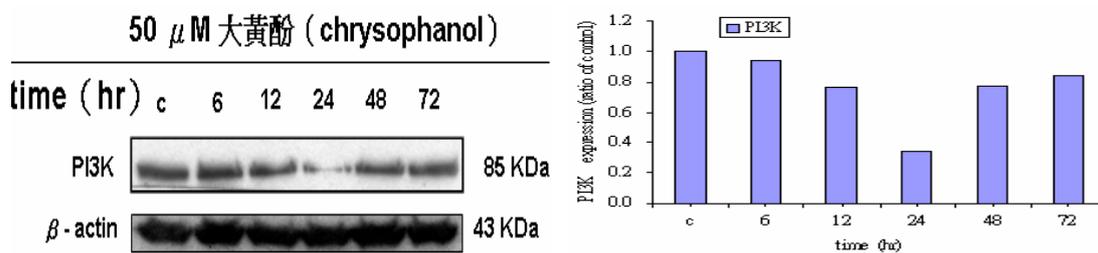


圖 5-10-P 以 50  $\mu$ M 濃度大黃酚在 36 小時的時間點對 A549 細胞穿  
透現象之影響 (200 X)

(六) 利用西方點墨法探討大黃酚對 A549 細胞轉移相關調控蛋白之表現量的差異

經大黃酚處理後的 A549 細胞，其上游調控蛋白 PI3K 及 ERK 比控制組的表現量低(圖 5-10-Q)，而下游調控蛋白 NF- $\kappa$ B、MMP-1、MMP-7、MMP-9 的表現量出現抑制現象(圖 5-10-Q~R)，會促進微血管增生的刺激因子 VEGF 與 EPO 的生合成也是抑制的現象(圖 5-10-T)，

(A)



(B)

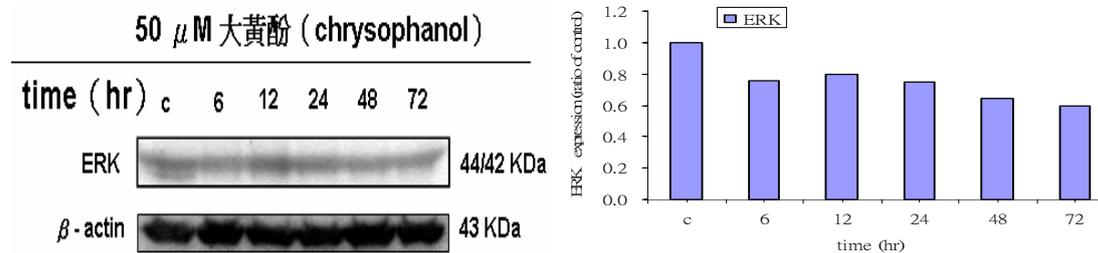
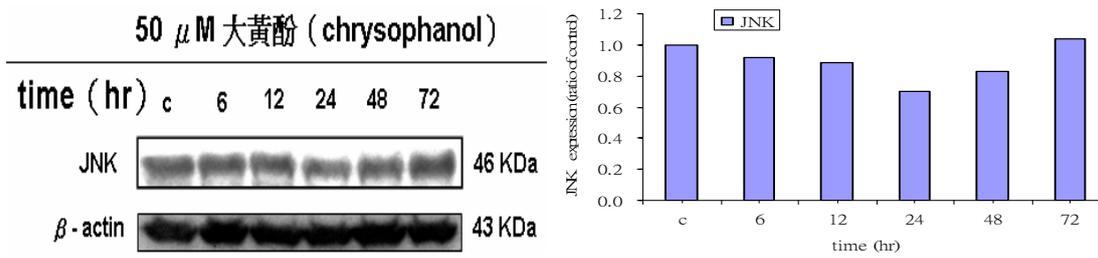


圖 5-10-Q 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 PI3K 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖，其中 PI3K 在 24 小時的蛋白質表現量的顯著降低，可能是因轉漬不佳所造成的假象；B 圖左為 ERK 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

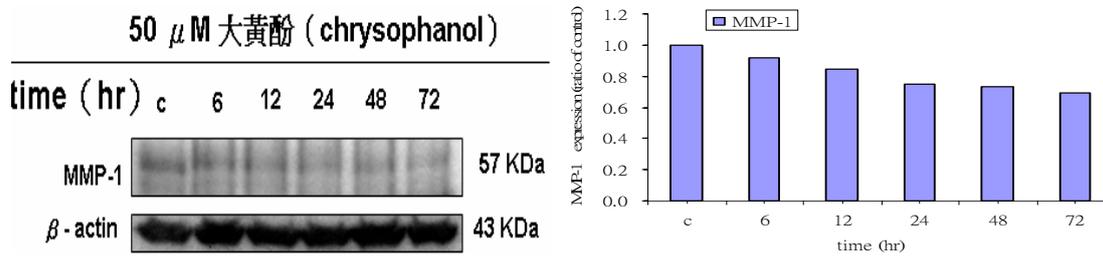
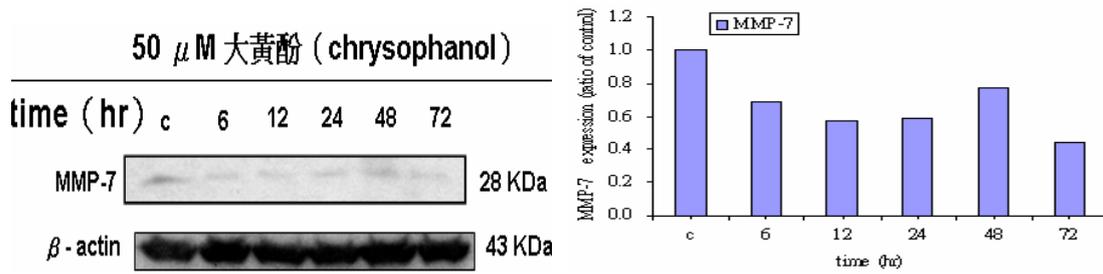
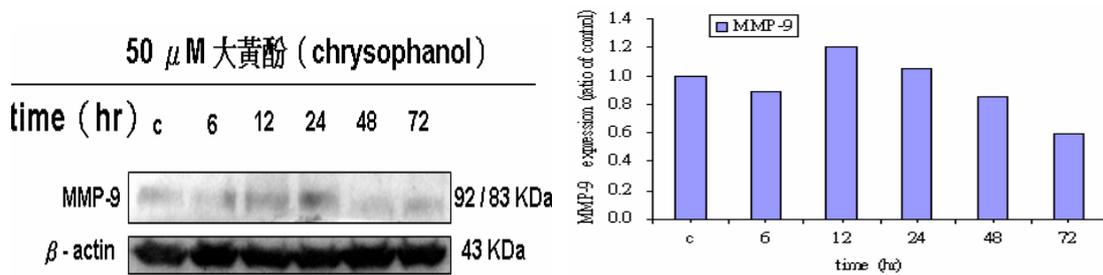


圖 5-10-R 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 JNK 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 MMP-1 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)



(C)

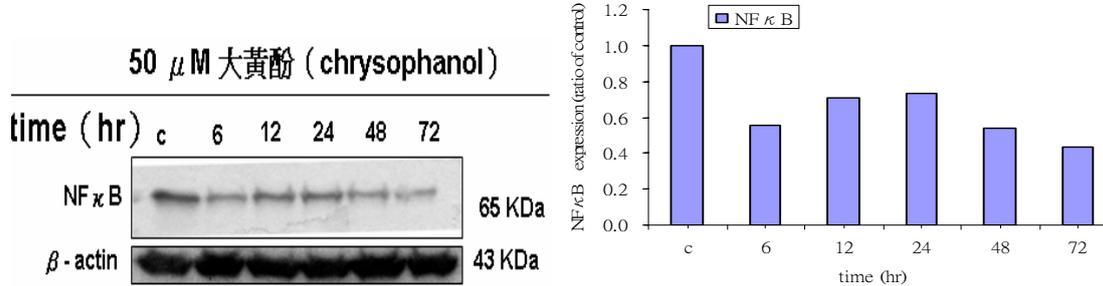
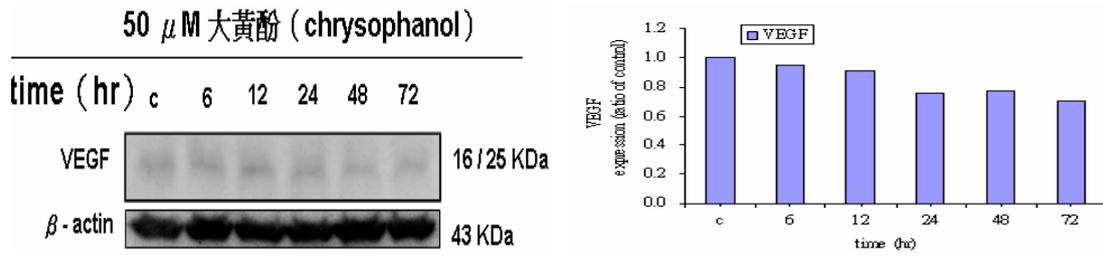


圖 5-10-S 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 MMP-7 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 MMP-9 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖，C 圖左為 NF- $\kappa$ B 蛋白的相對表現量，C 圖右為量化統計圖。

(A)



(B)

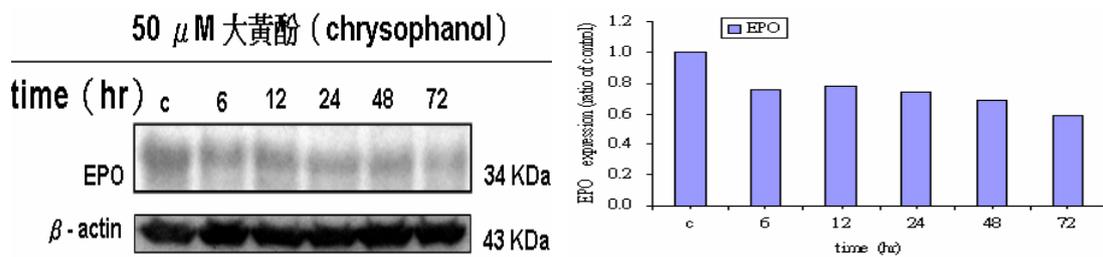


圖 5-10-T 以西方墨點法分析人類肝癌細胞株 A549 經相同濃度大黃酚 (50  $\mu$ M) 作用不同時間 (control、6、12、24、48、72 hr) 後，細胞中的蛋白相對表現量及量化統計圖；A 圖左為 VEGF 蛋白的表現量，A 圖右為量化統計圖；B 圖左為 EPO 蛋白的相對表現量，B 圖右為量化統計圖。

## 第六章 討論

肝癌與肺癌在台灣甚至在全世界在近年來是癌症的主要死因，兩者的治療方式主要是以手術切除為主，或輔以放射線療法及化學療法，然而在療效上一直不令人滿意，肺癌及肝癌的死亡率仍然逐年攀升，因此尋找其他方向的治療方法作為輔助已逐漸被醫界所重視。目前已陸續有中藥治療肝癌及肺癌的研究被報導，例如薑黃素

(curcumin) 能抑制 Hep3B 細胞內 ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) 的活性，導致 HIF-1 (transcription factor Hypoxia-Inducible Factor 1) 的表現降低，進一步使的癌細胞的 EPO、VEGF 的表現降低，達到抗癌的作用<sup>34</sup>；薑黃素對於 interferon-alpha 誘發 A549 細胞的 NF- $\kappa$ B 及 COX-2 表現的作用有抑制性，進而使 A549 細胞的細胞凋亡比例增加及轉移能力降低<sup>105</sup>。使用絞股藍皂苷處理 Hep3B 細胞後，在流式細胞儀檢測下出現 Sub-G<sub>1</sub> peak，顯示具有使 Hep3B 細胞走向細胞凋亡的能力<sup>123</sup>。在芍藥的萃取物處理下，也會產生 Sub-G<sub>1</sub> peak 與 DNA 碎裂而抑制 Hep3B 細胞增殖<sup>124</sup>。砒霜的主成分 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 於臨床相關劑量 (0.25 ~ 5  $\mu$ M)，可於 Hep3B 細胞抑制 CYP1A1 (可生物代謝活化多環芳香碳水化合物，成為具致突變性的代謝物) 的活性，也可降低多環芳香碳水化合物 3-methylcholanthrene (3-MC) 所誘發的 CYP1A1 的活性，進而抑制多藥物抗藥性相關轉運蛋白的表現，可以增強 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 對 PAH 誘發 CYP1A1 表現的抑制作用<sup>125,126</sup>；而 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與抗發炎藥 sulindac 併用則能加強 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 抑制 survivin 藉由抑制 survivin (凋亡蛋白家族的抑制劑) 所引發 A549 細胞的粒線體路徑細胞凋亡<sup>126,127</sup>。大黃素及蘆薈大黃素對於多種的癌細胞及 A549 細胞也有明顯的抗癌作用<sup>128,129</sup>，但是同為蒽醌類的大黃酚對於 Hep3B 細胞及 A549 細胞的抗癌效果則不清楚。因此本論文進行研究大黃酚對於人類肝癌細胞株 Hep3B 及人類肺癌細胞株 A549 增生的抑制作用及探討對於細胞週期的影響。另外也針對大黃酚對兩細胞株所具有的轉移能力的影響進行研究。

實驗結果顯示大黃酚處理人類肝癌細胞株 Hep3B 及人類肺癌細胞株 A549 的濃度同為 50  $\mu$ M，在 24 小時後細胞存活率降至 50% 以下，隨著藥物濃度增加，細胞存活率越低，在 48 小時後的存活率也比 24 小時的存活率低，因此大黃酚對於人類肝癌細胞株 Hep3B 及人

類肺癌細胞株 A549 都有生長抑制作用 (圖 5-2-A~B)。經由流式細胞儀檢測結果, 以大黃酚處理的 Hep3B 細胞的細胞週期在  $G_0/G_1$  期的比例比控制組少, S 期的比例則增加, 而在誘發凋亡的表現上, 數據顯示並無 Sub- $G_1$  出現 (圖 5-3-A~E); 另外從倒立式位相差顯微鏡觀察肝癌細胞株 Hep3B (圖 5-1-A~C) 及肺癌細胞株 A549 (圖 5-1-D~F) 有細胞形態膨脹的變化; 從 DAPI 實驗中 Hep3B 細胞及 A549 細胞隨著藥物濃度的增加, 可觀察到 DAPI 的螢光染色愈明顯, 顯示發生細胞核破壞 (圖 5-8-A; 圖 5-8-C); 彗星試驗中隨著藥物作用濃度增加, 細胞拖尾的現象愈明顯, 表示細胞核內部的 DNA 受藥物的作用而損害斷裂, 以至於在電泳後被拋出細胞外 (圖 5-8-B; 圖 5-8-D)。

由上述實驗結果可知, 大黃酚對人類肝癌細胞株 Hep3B 及肺癌細胞株 A549, 不僅能抑制細胞的增生, 對於細胞週期的進行也具有阻滯性。

如緒論所言, 細胞週期中有許多參與運作的蛋白, 可分為三大類, 分別為屬於正向調控蛋白的「細胞週期蛋白 (cyclin)」與「細胞週期蛋白激酶 (CDKs)」以及屬於負向調控蛋白的「細胞週期蛋白激酶抑制劑 (CKIs)」<sup>82</sup>。細胞進入 S 期時, cyclin A 與 CDK2 結合形成 complex, 會促使細胞進入  $G_2$  期, 若在 S 期時, cyclin A 與 CDK2 的結合被抑制或 cyclin A 與 CDK2 的生成被抑制, 則細胞會停滯在 S 期不往  $G_2$  期進行, 在此期的 thymidylate synthase 若被抑制, 也會造成 S 期停滯, 另外, 有文獻報導 Hep3B 的週期素 cyclin D<sub>3</sub> 被抑制下, 細胞也有 S 期停滯的現象<sup>130</sup>。

由實驗結果得知, 肝癌細胞 Hep3B 與肺癌細胞 A549 經大黃酚處理後, 以流式細胞儀的檢測結果, Hep3B 細胞在 72 小時濃度差實驗, 有明顯的  $G_0/G_1$  期的細胞比例下降; 相對的, S 期的比例增加 (圖 5-3-C)。肺癌細胞 A549 在僅在 24 小時的濃度差實驗, 出現 S 期的比例增加 (圖 5-3-F)。依西方墨點法結果, 兩株細胞的 cyclin D 蛋白表現量受抑制 (圖 5-3-I; 圖 5-3-L), thymidylate synthase 及 CDK2 的表現量也減少 (圖 5-3-H; 圖 5-3-K), Hep3B 細胞 P21、P27 與 P53 等

CKIs 的表現量增加 (圖 5-3-I; 圖 5-3-J), 顯示大黃酚對於細胞週期的影響比較傾向於使細胞停滯在 S 期。

相較於細胞凋亡是屬於無發炎性且有計畫性的死亡, 細胞壞死則是與發炎反應息息相關。

細胞凋亡可經由三個路徑: (1) 死亡接受器路徑: 經由細胞表面的三種受器 (TNF、FAS、TRAIL) 而影響 caspase 8, 使細胞走向凋亡的路徑, 例如 TRAIL 與 DR4、DR5 結合而活化 caspase 路徑, 使細胞凋亡<sup>131</sup>。(2) 粒線體路徑: 粒線體路徑可經由呼吸鏈釋放出的, 進行 ATP dependent 路徑, 使細胞凋亡; 亦可藉藉由 AIF (Apoptosis Inducing Factors) 活化而促使細胞凋亡<sup>132</sup>。(3) 氧化還原路徑: 粒線體經 TNF 受器刺激而導致 ROS 增加, caspase 路徑因 ROS 釋放增加而活化<sup>131,133</sup>。其中粒線體路徑及氧化還原路徑皆是影響到粒線體而使粒線體的電子傳遞鏈瓦解, 導致細胞質中的 ROS 與 cytochrome *c* 增加, 而 ATP 的產生則不受影響, 這是因為在細胞凋亡的情況下, cytochrome *c* 的釋放導致 caspase 路徑活化, 當 caspase 發揮它們的活性之下, 氧化物質的消耗及 ATP 的產生會一直進行, 此也是因為 cytochrome *c* 的氧化酶持續作用下, 支撐著電子傳遞鏈而不快速瓦解<sup>134</sup>。

cytochrome *c* 釋放的後果依細胞形態而定, 當 cytochrome *c* 可被利用的情況下, 細胞會因為 caspase 被活化而走向凋亡的路徑, 若 cytochrome *c* 不被利用下, caspase 沒有活化下, 出現電子傳遞鏈崩解, 而使得 ROS 快速上升, ATP 產量減少, ROS 若無法被有效的清除, 則會造成細胞核內 DNA 的損傷, 若無法有效的修復, 則會走向細胞壞死的路徑, 在這個過程中, PARP (poly (ADP-ribose) polymerases) 會因為 DNA 損傷而活化, 並伴隨著細胞內 ATP 濃度下降<sup>111</sup>。

由實驗結果, 在流式細胞儀檢測下, Hep3B 細胞經藥物作用, 短時間 (6 小時以內) 的 ROS 增加 (圖 5-5-A; 圖 5-5-C), 粒線體膜電位下降 (圖 5-4-A~B), 鈣離子濃度增加 (圖 5-6-A~B), 甚至在藥物處理後的最初 15 分鐘內, 上述的現象即出現, 且 ROS 的改變相當

大，而在長時間 ROS 及粒線體膜電位則逐漸恢復（圖 5-4-A~B；圖 5-5-B~C），顯示在短時間下藥物造成 ROS 大量增加，已經傷害到粒線體、胞器及 DNA，之後一部分的細胞啟動修復機制使得 ROS、粒線體膜電位能逐漸回復。在肺癌 A549 細胞方面也是一開始 ROS、鈣離子表現量增加（圖 5-5-D；圖 5-6-C），粒線體膜電位下降（圖 5-4-C），但是與 Hep3B 不同的是，並不隨著時間而回復，顯示 A549 在細胞修復的能力不如 Hep3B。在西方墨點法的實驗結果顯示，Hep3B 細胞的 caspase 8 與 caspase 9 沒有被活化（圖 5-9-D），cytochrome *c* 的表現量雖然增加而凋亡蛋白酶活化因子 Apaf-1 的表現量減少（圖 5-9-E），顯示由粒線體釋放出來的 cytochrome *c* 並沒有被利用去活化 caspase 路徑，也就沒有進行細胞凋亡的路徑，再加上 PARP 的表現量增加（圖 5-9-C），冷光螢光實驗中，ATP 在 6 小時的時間點是下降的（圖 5-7-B），由此推論大黃酚對 Hep3B 的抑制作用是使細胞走向壞死的路徑而非細胞凋亡。在肺癌細胞 A549 方面，西方墨點法顯示 caspase 3 及 caspase 8 並沒有被活化（圖 5-9-J），cytochrome *c* 與 PARP 的表現量增加（圖 5-9-I），Apaf-1 的表現比起控制組沒有明顯的增加（圖 5-9-K），冷光螢光實驗中，ATP 在 6 小時的時間點也是下降的（圖 5-7-C），由此推論大黃酚對 A549 的抑制作用也是使細胞走向細胞壞死的路徑而非細胞凋亡。

在細胞轉移的過程，包含很多複雜的步驟，其中牽涉到細胞移動，穿透基底膜，適應新環境，而整個過程都與血管新生息息相關，細胞在營養缺乏及缺氧的環境下，會促使轉移進行及血管增生。若能抑制癌細胞的血管新生作用將可增加抑制癌細胞轉移能力。

由實驗結果顯示，Hep3 與 A549 若無藥物作用下（控制組），本身原就擁有轉移的能力，在移動試驗中，控制組的細胞聚集的邊緣線隨著時間增加而逐漸不規則，邊緣的細胞逐漸呈現不規則形態，原本沒有細胞生長的區域出，逐漸得有細胞貼附，其貼附後的細胞會有形態出現，而非因擠壓呈圓圓的顆粒狀，另外，若死亡而漂浮的細胞也是圓形顆粒而飄浮著，經過藥物處理的細胞，細胞邊緣線較整齊，顯示細胞被大黃酚影響其移動能力（圖 5-10-A~E；圖 5-10-K~O）。

由穿透試驗的結果顯示，在顯微鏡的視野下，這 Hep3B 細胞的控制組從 Transwell 的內底部移動到另一面的數目最多，而  $IC_{50}$  的藥物濃度 ( $50 \mu M$ ) 下，細胞穿越到另一面的數目最少，加藥組  $25 \mu M$  的數量比較多些 (圖 5-10-F)，A549 細胞的控制組在顯微鏡的視野下，也明顯多於加藥組 (圖 5-10-P)，顯示大黃酚的抑制穿透能力隨著藥物濃度而增加。

由西方墨點法的結果顯示，大黃酚對於 Hep3B 細胞的轉移相關的上游調控 PI3K 與 ERK 蛋白有降低其表現的作用 (圖 5-10-G)，而對於下游調控蛋白 COX-2 及 MMPs 系列中的 MMP-1、MMP-2、MMP-7 等會分解細胞外基質 (ECM) 內的蛋白成分的酵素，其加藥組表現量，比控制組的表現量低 (圖 5-10-H~I)，另外對於會促進微血管增生的刺激因子如 VEGF 與 EPO 的生合成都有干擾的作用 (圖 5-10-J)。在 A549 方面，經大黃酚處理後的細胞，其 PI3K 及 ERK 也是比控制組的表現量低 (圖 5-10-Q)，NF- $\kappa$ B、MMP-1、MMP-7、MMP-9 的表現量出現抑制現象 (圖 5-10-Q~R)，VEGF 與 EPO 的生合成也是抑制的現象 (圖 5-10-T)，顯示大黃酚對於 Hep3B 細胞與 A549 細胞的轉移能力具有一定程度的干擾作用。

## 第七章 結論

本研究是經由探討細胞增生、細胞週期、細胞壞死或細胞凋亡等機轉，以評估大黃酚對於人類肝癌細胞 Hep3B 及肺癌細胞 A549 的生長抑制作用與其可能作用機轉。實驗發現大黃酚經由活化 *p21*、*p27* 及 *p53* 使細胞停滯在 S 期（圖 7-1），同時對 Hep3B 與 A549 細胞的增生有抑制作用；且 ROS 上升伴隨著細胞質鈣離子濃度上升，粒線體膜電位下降，ATP 濃度下降，造成染色體 DNA 裂解，最後使細胞走向壞死；大黃酚同時也能干擾 Hep3B 與 A549 細胞 PI3K 及 ERK 的活性，導致 NF- $\kappa$ B 及 COX-2 的生合成降低，進而降低 MMPs 的表現量，使的細胞的轉移能力受抑制。

綜合上面的論述，大黃酚的抗癌活性除了可以抑制人類肝癌細胞 Hep3B 及肺癌細胞 A549 轉移外，對於抑制人類肝癌細胞 Hep3B 及肺癌細胞 A549 的增生，是經由癌細胞的 ROS 增加，促使細胞壞死（圖 7-2）。

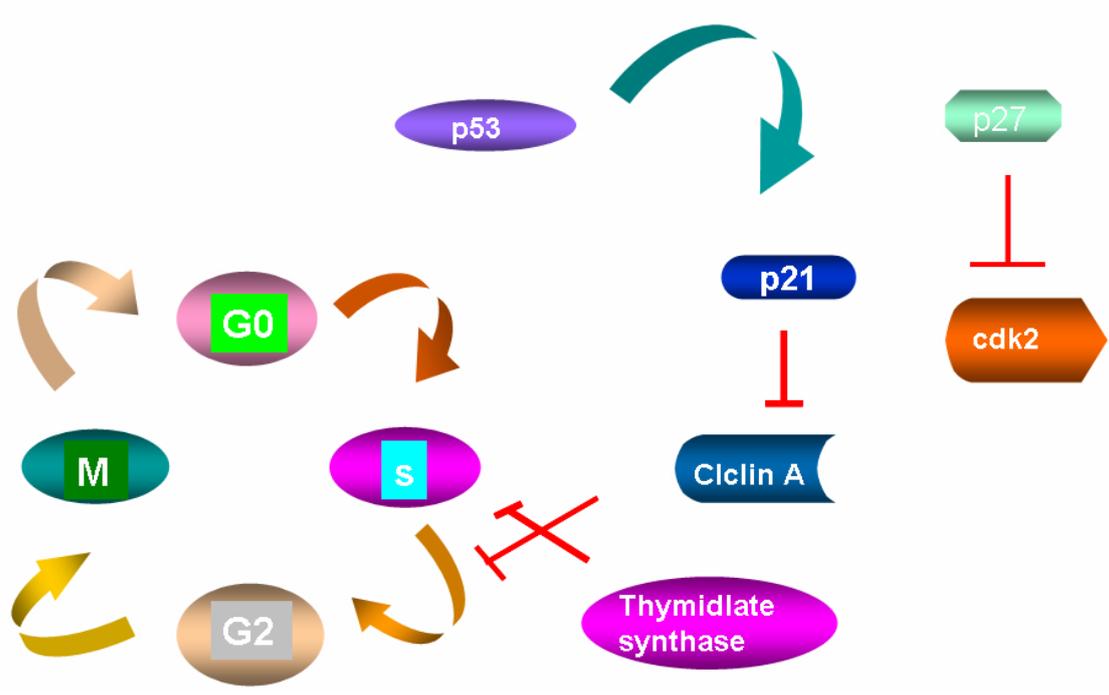


圖 7-1 大黃酚影響細胞週期的路徑圖

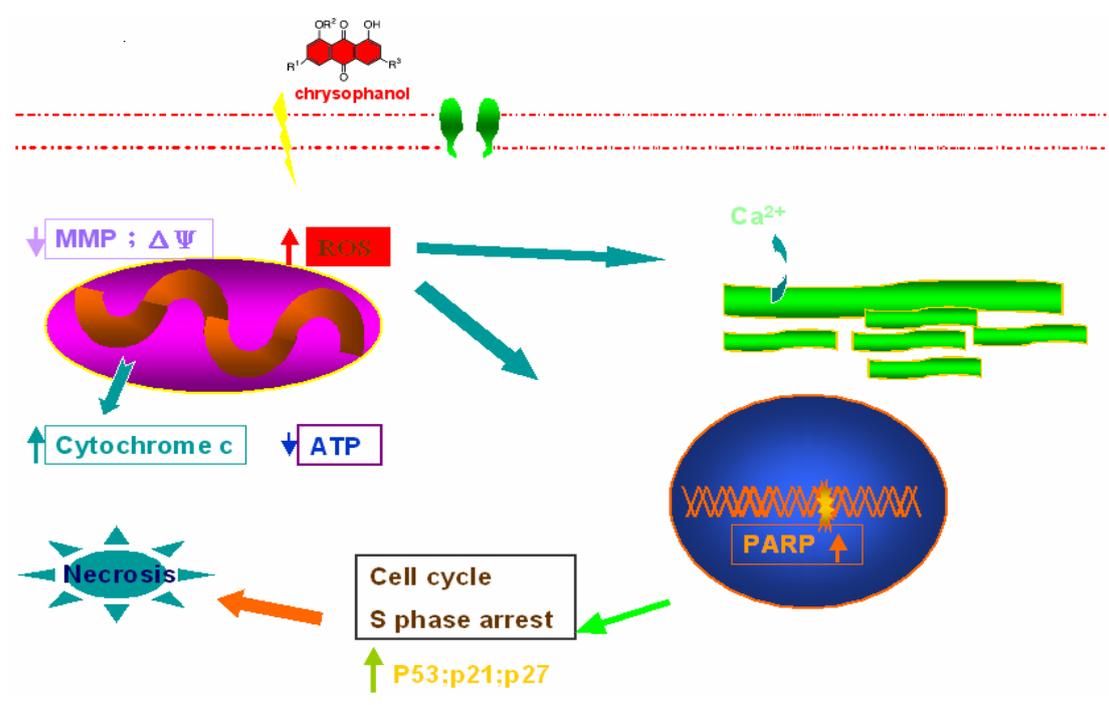


圖 7-2 大黃酚影響細胞壞死的路徑圖

## Reference

1. 行政院衛生署發布 95 年十大死因排行榜.  
<http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>. 2007.
2. Irminger-Finger I. Science of cancer and aging. *J Clin Oncol*. 2007 May 10;25(14):1844-51.
3. Akamine D, Filho MK, Peres CM. Drug-nutrient interactions in elderly people. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2007 May;10(3):304-10.
4. Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1999 Sep;32(1):31-43.
5. Ahuja N, Issa JP. Aging, methylation and cancer. *Histology and histopathology*. 2000 Jul;15(3):835-42.
6. Williams KJ, Telfer BA, Xenaki D, Sheridan MR, Desbaillets I, Peters HJ, Honess D, Harris AL, Dachs GU, van der Kogel A, Stratford IJ. Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother Oncol*. 2005 Apr;75(1):89-98.
7. Wong N, Chan KY, Macgregor PF, Lai PB, Squire JA, Beheshti B, Albert M, Leung TW. Transcriptional profiling identifies gene expression changes associated with IFN-alpha tolerance in hepatitis C-related hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1319-26.
8. Kudo T, Nakagawa H, Takahashi M, Hamaguchi J, Kamiyama N, Yokoo H, Nakanishi K, Nakagawa T, Kamiyama T, Deguchi K, Nishimura S, Todo S. N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer*. 2007;6:32.
9. Warmann SW, Fuchs J. Drug resistance in hepatoblastoma. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2007 Apr;8(2):93-7.

10. Giannelli G, Antonaci S. Novel concepts in hepatocellular carcinoma: from molecular research to clinical practice. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006 Oct;40(9):842-6.
11. Xu J, Xu HY, Zhang Q, Song F, Jiang JL, Yang XM, Mi L, Wen N, Tian R, Wang L, Yao H, Feng Q, Zhang Y, Xing JL, Zhu P, Chen ZN. HAb18G/CD147 Functions in Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2007 Jun;5(6):605-14.
12. Wu XZ, Xie GR, Chen D. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jun 7.
13. Cascone T, Troiani T, Morelli MP, Gridelli C, Ciardiello F. Antiangiogenic drugs in non-small cell lung cancer treatment. *Current opinion in oncology*. 2006 Mar;18(2):151-5.
14. Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. Herb-drug interactions in oncology: focus on mechanisms of induction. *The oncologist*. 2006 Jul-Aug;11(7):742-52.
15. Fan TP, Yeh JC, Leung KW, Yue PY, Wong RN. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends in pharmacological sciences*. 2006 Jun;27(6):297-309.
16. Melnick SJ. Developmental therapeutics: review of biologically based complementary and alternative medicine (CAM) therapies for potential application in children with cancer-part II. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006 May;28(5):271-85.
17. Melnick SJ. Developmental therapeutics: review of biologically based CAM therapies for potential application in children with cancer: part I. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006 Apr;28(4):221-30.
18. Monnier AM. The Breast International Group 1-98 trial: big results for women with hormone-sensitive early breast cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2007 May;7(5):627-34.
19. Rougier P, Mitry E, Barbare JC, Taieb J. Hepatocellular carcinoma

- (HCC): an update. *Seminars in oncology*. 2007 Apr;34(2 Suppl 1):S12-20.
20. Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, Matsuura T. The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol*. 2007 Feb 14;13(6):821-5.
  21. Rodgers MS, McCall JL. Surgery for colorectal liver metastases with hepatic lymph node involvement: a systematic review. *The British journal of surgery*. 2000 Sep;87(9):1142-55.
  22. Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2002 Apr;8(2):193-9.
  23. Fletcher A. Haematology. *Journal of the Royal Army Medical Corps*. 2006 Dec;152(4):250-65.
  24. Wysocki PJ, Zolnierek J, Szczylik C, Mackiewicz A. Recent developments in renal cell cancer immunotherapy. *Expert opinion on biological therapy*. 2007 May;7(5):727-37.
  25. 周彩存,任勝祥：肺癌非手術治療進展。中國實用內科雜誌 2007；27（1）：5-7.
  27. Semple SJ, Pyke SM, Reynolds GD, Flower RL. In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral research*. 2001 Mar;49(3):169-78.
  28. Howard BH, Raistrick H. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 81. The colouring matters of *Penicillium islandicum* Sopp. Part 2. Chrysophanic acid, 4:5-dihydroxy-2-methylanthraquinone. *The Biochemical journal*. 1950 Jan;46(1):49-53.
  29. Bick IR, Rhee C. Anthraquinone pigments from *Phoma foveata* Foister. *The Biochemical journal*. 1966 Jan;98(1):112-6.
  30. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hsu FL, Lin HY, Ko CH, Tseng SW. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60

- cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. *Biochemical pharmacology*. 2002 Dec 15;64(12):1713-24.
31. Zhang YZ, Lu YH, Wei DZ, Chou GX, Zhu EY. Preparative Isolation and Purification of Hydroxyanthraquinones from *Rheum tanguticum* Maxim. on Normal Phase Silica Gel: Using a Flash Master Personal System. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 2007;37(3):185-93.
  32. 虞金寶, 程怡, 宋友昕: 不同 pH 值及氮酮對大黃酚透皮吸收影響。 *中草藥* 1999; 5 (17) p358-359.
  33. 李淑娟, 張麗, 張丹參等: 大黃酚抗衰老作用的實驗研究。 *中國老年醫學* 2005; 25 (11): 1362-1364.
  34. Choi H, Chun YS, Kim SW, Kim MS, Park JW. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Molecular pharmacology*. 2006 Nov;70(5):1664-71.
  35. Moo-Puc RE, Mena-Rejon GJ, Quijano L, Cedillo-Rivera R. Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. *Journal of ethnopharmacology*. 2007 Jun 13;112(2):415-6.
  36. Acharya TK, Chatterjee IB. Isolation of chrysophanic acid-9-anthrone, the major antifungal principle of *Cassia tora*. *Lloydia*. 1975 May-Jun;38(3):218-20.
  37. Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Phonkerd N, Soyong K, Kongsaree P, Suksamrarn A. Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta medica*. 2002 Sep;68(9):834-6.
  38. Tai DI, Tsai SL, Chang YH, Huang SN, Chen TC, Chang KS, Liaw YF. Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2000 Dec 1;89(11):2274-81.

39. 沈映君：中藥藥理學。人民衛生出版社 2000；p329.
40. Jin W, Wang YF, Ge RL, Shi HM, Jia CQ, Tu PF. Simultaneous analysis of multiple bioactive constituents in *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007 Jun 26;21(14):2351-60.
41. Koyama M, Kelly TR, Watanabe KA. Novel type of potential anticancer agents derived from chrysophanol and emodin. Some structure-activity relationship studies. *Journal of medicinal chemistry.* 1988 Feb;31(2):283-4.
42. Ueno Y, Umemori K, Niimi E, Tanuma S, Nagata S, Sugamata M, Ihara T, Sekijima M, Kawai K, Ueno I. Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. *Natural toxins.* 1995;3(3):129-37.
43. Choi SG, Kim J, Sung ND, Son KH, Cheon HG, Kim KR, Kwon BM. Anthraquinones, Cdc25B phosphatase inhibitors, isolated from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. *Natural product research.* 2007 May;21(6):487-93.
44. Yang SM, Liu XK, Qing C, Wu DG, Zhu DY. Chemical constituents from the roots of *Homonoia riparia*. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica.* 2007 Mar;42(3):292-6.
45. Ferrell L. Liver pathology: cirrhosis, hepatitis, and primary liver tumors. Update and diagnostic problems. *Mod Pathol.* 2000 Jun;13(6):679-704.
46. Knox CD, Anderson CD, Lamps LW, Adkins RB, Pinson CW. Long-term survival after resection for primary hepatic carcinoid tumor. *Ann Surg Oncol.* 2003 Dec;10(10):1171-5.
47. Lopez-Terrada D. Integrating the diagnosis of childhood malignancies. *Advances in experimental medicine and biology.* 2006;587:121-37.

48. von Schweinitz D. Management of liver tumors in childhood. *Seminars in pediatric surgery*. 2006 Feb;15(1):17-24.
49. Liu CJ, Kao JH. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc*. 2007 Apr;70(4):141-5.
50. Sherman M. Chronic hepatitis C and screening for hepatocellular carcinoma. *Clinics in liver disease*. 2006 Nov;10(4):735-52.
51. Yip WW, Burt AD. Alcoholic liver disease. *Seminars in diagnostic pathology*. 2006 Aug-Nov;23(3-4):149-60.
52. O'Reilly KM, McLaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ. Asbestos-related lung disease. *American family physician*. 2007 Mar 1;75(5):683-8.
53. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Nov;80(5):1106-22.
54. 薛開先：肝癌發生的分子遺傳學和表遺傳學研究。癌癥 2005；24（4）：757-768
55. 黃源,徐優芬：特殊首發癥狀的肝癌。腫瘤防治研究 1998；25（4）：358-359.
56. 朱文鋒,朱正華：中醫常見癥狀鑒別診斷(15)——脅痛 黃疸。遼寧中醫雜誌 1999；26（3）：108-109.
57. American Joint Committee on Cancer：  
<http://www.cancerstaging.org/products/ajccproducts.html>
58. Van Deusen MA, Abdalla EK, Vauthey JN, Roh MS. Staging classifications for hepatocellular carcinoma. *Expert review of molecular diagnostics*. 2005 May;5(3):377-83.
59. Kramer H, Groen HJ. Current concepts in the mediastinal lymph node staging of nonsmall cell lung cancer. *Annals of surgery*. 2003

- Aug;238(2):180-8.
60. Pawlik TM, Esnaola NF, Vauthey JN. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: similar long-term results despite geographic variations. *Liver Transpl.* 2004 Feb;10(2 Suppl 1):S74-80.
  61. Butterfield LH. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. *Swiss Med Wkly.* 2007 Feb 10;137(5-6):83-90.
  62. Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006 Feb 28;12(8):1175-81.
  63. Kim SH, Lee JM, Kim YJ, Choi JY, Kim GH, Lee HY, Choi BI. Detection of hepatocellular carcinoma on CT in liver transplant candidates: comparison of PACS tile and multisynchronized stack modes. *Ajr.* 2007 May;188(5):1337-42.
  64. Matsui O. Imaging of multistep human hepatocarcinogenesis by CT during intra-arterial contrast injection. *Intervirology.* 2004;47(3-5):271-6.
  65. Kudo M. Early detection and curative treatment of early-stage hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005 Oct;3(10 Suppl 2):S144-8.
  66. Talwalkar JA, Gores GJ. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S126-32.
  67. Blum HE. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Best practice & research.* 2005 Feb;19(1):129-45.
  68. 官泳松,周翔平:肝癌的血液供應與介入治療。中華肝臟病雜誌 2003 ; 11 ( 12 ) : 765-766.
  69. Minagawa M, Makuuchi M. Treatment of hepatocellular carcinoma accompanied by portal vein tumor thrombus. *World J Gastroenterol.* 2006 Dec 21;12(47):7561-7.

70. Guan YS, Liu Y. Interventional treatments for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006 Nov;5(4):495-500.
71. Hawkins MA, Dawson LA. Radiation therapy for hepatocellular carcinoma: from palliation to cure. *Cancer.* 2006 Apr 15;106(8):1653-63.
72. Cormier JN, Thomas KT, Chari RS, Pinson CW. Management of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2006 May;10(5):761-80.
73. Târcoveanu E, Zugun F, Mehier H, Lupaşcu C, Epure O, Vasilescu A, Moldovanu R. [Palliative therapy for malignant hepatic tumors with hyperthermia]. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi.* 2005 Jul-Sep;109(3):516-27.
74. Bridevaux PO, Rochat T. [Passive smoking and respiratory health]. *Revue medicale suisse.* 2006 Nov 15;2(87):2611-5.
75. Gomez Raposo C, De Castro Carpeno J, Gonzalez Baron M. Causes of lung cancer: smoking, environmental tobacco smoke exposure, occupational and environmental exposures and genetic predisposition. *Medicina clinica.* 2007 Mar 17;128(10):390-6.
76. Pirozynski M. 100 years of lung cancer. *Respiratory medicine.* 2006 Dec;100(12):2073-84.
77. Murray N, Turrisi AT, 3rd. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006 Mar;1(3):270-8.
78. Burdett S, Stewart LA, Rydzewska L. A systematic review and meta-analysis of the literature: chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006 Sep;1(7):611-21.
79. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications

- for cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2007 Feb-Apr;10(1-2):13-29.
80. Cooper S. Checkpoints and restriction points in bacteria and eukaryotic cells. *Bioessays*. 2006 Oct;28(10):1035-9.
  81. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* (New York, NY. 1994 Dec 16;266(5192):1821-8.
  82. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei medical journal*. 2002 Dec;43(6):722-8.
  83. Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey lectures*. 2000;96:73-92.
  84. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*. 1995 Jun;17(6):471-80.
  85. Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular and cellular biology*. 1996 Mar;16(3):1047-57.
  86. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):573-82.
  87. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and cellular biology*. 1995 May;15(5):2612-24.
  88. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1169-79.
  89. Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes & development*. 1993 Aug;7(8):1572-83.
  90. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a

- function for each cell compartment? Trends in cell biology. 2003 Feb;13(2):65-70.
91. Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. Nature. 1995 Mar 23;374(6520):386-8.
  92. Tsuboi K, Moritake T, Tsuchida Y, Tokuyue K, Matsumura A, Ando K. Cell Cycle Checkpoint and Apoptosis Induction in Glioblastoma Cells and Fibroblasts Irradiated with Carbon Beam. J Radiat Res (Tokyo). 2007 Jun 5.
  93. Titus B, Schwartz MA, Theodorescu D. Rho proteins in cell migration and metastasis. Critical reviews in eukaryotic gene expression. 2005;15(2):103-14.
  94. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
  95. Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. Cancer research. 1986 Jan;46(1):1-7.
  96. Basini G, Bussolati S, Santini SE, Bianchi F, Careri M, Mangia A, Musci M, Grasselli F. Antiangiogenesis in swine ovarian follicle: A potential role for 2-methoxyestradiol. Steroids. 2007 May 18.
  97. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. Journal of biochemistry and molecular biology. 2006 Sep 30;39(5):469-78.
  98. Poon RT, Ng IO, Lau C, Zhu LX, Yu WC, Lo CM, Fan ST, Wong J. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study. Annals of surgery. 2001 Feb;233(2):227-35.
  99. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocrine reviews. 2004 Aug;25(4):581-611.
  100. Mann CD, Neal CP, Garcea G, Manson MM, Dennison AR, Berry

- DP. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2007 Apr;43(6):979-92.
101. Wang XM, Li J, Evers BM. Inhibition of proliferation, invasion and adhesion of liver cancer cells by 5-azacytidine and butyrate. *Anticancer research*. 1999 Jul-Aug;19(4B):2901-6.
102. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of cellular physiology*. 2007 Apr;211(1):19-26.
103. Diaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2005 Jul;5(7):619-30.
104. Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1997 Dec;29(12):1433-48.
105. Lee J, Im YH, Jung HH, Kim JH, Park JO, Kim K, Kim WS, Ahn JS, Jung CW, Park YS, Kang WK, Park K. Curcumin inhibits interferon-alpha induced NF-kappaB and COX-2 in human A549 non-small cell lung cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005 Aug 26;334(2):313-8.
106. Su JL, Shih JY, Yen ML, Jeng YM, Chang CC, Hsieh CY, Wei LH, Yang PC, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer research*. 2004 Jan 15;64(2):554-64.
107. 美國聖路易市華盛頓大學醫學院神經肌肉疾病中心網站：  
<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/apoptosis.htm>
108. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1998 Feb 15;252(1):1-15.
109. Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. Oxidative stress, activation of caspases, and cell survival are regulated by transaldolase. *The Journal of*

- biological chemistry. 1998 May 8;273(19):11944-53.
110. Le Bras M, Rouy I, Brenner C. The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. *Medicinal chemistry (Sharjah, United Arab Emirates)*. 2006 Jan;2(1):1-12.
  111. Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Nov 23;96(24):13978-82.
  112. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Experimental cell research*. 2002 Jul 1;277(1):1-14.
  113. Lacombe F, Belloc F. Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia. *Hematology and cell therapy*. 1996 Dec;38(6):495-504.
  114. Radcliff G, Jaroszeski MJ. Basics of flow cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 1998;91:1-24.
  115. De Castro LF, Zacharias M. DAPI binding to the DNA minor groove: a continuum solvent analysis. *J Mol Recognit*. 2002 Jul-Aug;15(4):209-20.
  116. Larsen TA, Goodsell DS, Cascio D, Grzeskowiak K, Dickerson RE. The structure of DAPI bound to DNA. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 1989 Dec;7(3):477-91.
  117. Olive PL. The comet assay. An overview of techniques. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2002;203:179-94.
  118. Breed WG, Sarafis V. The fluorescent dye 3, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide selectively stains the midpiece and apical region of the heads of murid rodent spermatozoa. *Biotech Histochem*. 1995 Nov;70(6):294-6.
  119. Trayner ID, Rayner AP, Freeman GE, Farzaneh F. Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using

- dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H2R123). *Journal of immunological methods*. 1995 Oct 26;186(2):275-84.
120. Blatter LA, Wier WG. Intracellular diffusion, binding, and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2. *Biophysical journal*. 1990 Dec;58(6):1491-9.
  121. Nakamura M, Mie M, Funabashi H, Kobatake E. Construction of streptavidin-luciferase fusion protein for ATP sensing with fixed form. *Biotechnology letters*. 2004 Jul;26(13):1061-6.
  122. Nakanishi K, Fujimoto J, Ueki T, Kishimoto K, Hashimoto-Tamaoki T, Furuyama J, Itoh T, Sasaki Y, Okamoto E. Hepatocyte growth factor promotes migration of human hepatocellular carcinoma via phosphatidylinositol 3-kinase. *Clinical & experimental metastasis*. 1999;17(6):507-14.
  123. Chen JC, Chung JG, Chen LD. Gypenoside induces apoptosis in human Hep3B and HA22T tumour cells. *Cytobios*. 1999;100(393):37-48.
  124. Lee SM, Li ML, Tse YC, Leung SC, Lee MM, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM. Paeoniae Radix, a Chinese herbal extract, inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway. *Life sciences*. 2002 Sep 27;71(19):2267-77.
  125. Vernhet L, Allain N, Le Vee M, Morel F, Guillouzo A, Fardel O. Blockage of multidrug resistance-associated proteins potentiates the inhibitory effects of arsenic trioxide on CYP1A1 induction by polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003 Jan;304(1):145-55.
  126. Leung J, Pang A, Yuen WH, Kwong YL, Tse EW. Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):740-6.
  127. Jin HO, Yoon SI, Seo SK, Lee HC, Woo SH, Yoo DH, Lee SJ,

- Choe TB, An S, Kwon TJ, Kim JI, Park MJ, Hong SI, Park IC, Rhee CH. Synergistic induction of apoptosis by sulindac and arsenic trioxide in human lung cancer A549 cells via reactive oxygen species-dependent down-regulation of survivin. *Biochemical pharmacology*. 2006 Nov 15;72(10):1228-36.
128. Lee NJ, Choi JH, Koo BS, Ryu SY, Han YH, Lee SI, Lee DU. Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2005 Nov;28(11):2158-61.
129. Su YT, Chang HL, Shyue SK, Hsu SL. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochemical pharmacology*. 2005 Jul 15;70(2):229-41.
130. Yeo EJ, Ryu JH, Chun YS, Cho YS, Jang IJ, Cho H, Kim J, Kim MS, Park JW. YC-1 induces S cell cycle arrest and apoptosis by activating checkpoint kinases. *Cancer research*. 2006 Jun 15;66(12):6345-52.
131. Blatt NB, Glick GD. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2001 Jun;9(6):1371-84.
132. Duchon MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. 2004 Feb;53 Suppl 1:S96-102.
133. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2007 Jan;9(1):49-89.
134. Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2004 Apr 12;1655(1-3):400-8.

## Abstract

Chrysophanol, an anthraquinone-derivative alkaloid, is extracted from *Rheum palmatum L.* It has been reported that chrysophanol may exhibit several regulatory functions including anti-inflammation, antiseptic, antioxidation, anti-aging, prevention of atherosclerosis, anti-dementia, and anti-tumor activity. However, the molecular mechanism of anti-tumor effects of chrysophanol has not been well defined. In this study, we used human hepatic carcinoma Hep3B cells and lung carcinoma A549 cells as two cell models to examine the inhibitory effects of chrysophanol on tumor cell growth and migration. Cell viability assay revealed that chrysophanol indeed prevented cell proliferation in these two cell lines. To further investigate the cellular mechanism of chrysophanol, we measured the changes of cellular physiological parameters in chrysophanol-treated cells. We found that the treatment of chrysophanol induced ROS production and increased  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, results in a significant change of mitochondrial membrane potential and the reduction of ATP concentration in mitochondria. There is no significant change in the expression of Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1), caspase-8 and caspas-9. Moreover, the chrysophanol-induced cell death in Hep3B cells and A549 cells was accompanied with several characteristics of necrosis, including the necrotic morphology, DNA fragmentation as well as the enhancement of DAPI positive cells. In addition, flow -cytometry analysis showed that the S phase of cell cycle was blocked in chrysophanol-treated cells. Western blotting results also revealed that the expression levels of cell cycle regulatory proteins, such as *p21*, *p27* and *p53*, were significantly changed in a time-dependent manner. The protein expression of *p21* was increased while CDK2 and thymidylate synthase were decreased. We hypothesized that, with the chrysophanol treatment, CDK2 and thymidylate synthase were phosphorylated in response to DNA damage and could not activate

cyclin A/CDK2 complex to facilitate the cell cycle progression. In terms of anti-metastasis effects of chrysophanol, our results showed that in chrysophanol-treated cells, the cell migration and invasion were lower than the controls. The expression of PI3K, ERK, and MKK, which are involved in metastasis of cancer cells, was also down-regulated under chrysophanol treatments. Our studies provided the evidence for the inhibitory effects of chrysophanol in cell proliferation and metastasis, and suggested the application of chrysophanol as a potential anticancer reagent in the future.