

中國醫藥大學中醫學系博士班博士論文

指導教授：林昭庚 教授

共同指導教授：鍾景光 教授

論文題目

大黃粗萃物與其主成分大黃素對於人類大腸直腸癌
細胞株細胞凋亡之研究

The Study of Apoptosis Induction by Rheum Palmatum L and Emodin
on Human Colorectal Cancer Cell Line

研究生：馬易世

中華民國一〇二年四月八日

目錄

第一章 前言	1
1.1 研究背景及動機	1
1.2 研究目的及設計	2
第二章 文獻探討	3
2.1 大腸癌	3
2.2 大腸癌的治療	4
2.3 細胞凋亡在癌症治療的角色	4
2.4 細胞凋亡的外在路徑與內在路徑	5
2.5 Caspase 蛋白質家族	7
2.6 粒線體與細胞凋亡	7
2.7 內質網與細胞凋亡	9
2.8 其他細胞凋亡的相關機制	10
2.9 腫瘤轉移	11
2.10 腫瘤轉移與相關機轉	11
2.11 大腸癌的中醫觀點	13
2.12 大黃與大腸癌的中醫論治	14
2.13 大黃的毒性與安全性	16
2.14 大黃的重要成分	16
2.15 大黃素的現代研究	17
第三章 材料與方法	19
3.1 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉	19
3.1.1 大黃粗萃物之抽提製備	19
3.1.2 大黃粗萃物之 Emodin 定量	19
3.1.3 試劑	21
3.1.4 細胞培養	21
3.1.5 流式細胞儀測定細胞存活率	22
3.1.6 流式細胞儀測定細胞週期分布	22
3.1.7 彗星試驗與 DAPI 染色	22
3.1.8 測定流式細胞儀細胞內鈣離子濃度	23
3.1.9 流式細胞儀測定 Caspase-3、caspase-8 與 caspase-9 之活性	23
3.1.10 雷射共軛焦顯微鏡測定 LS1034 細胞株之蛋白質轉運	23
3.1.11 西方墨點法測定 LS1034 細胞株之細胞週期與凋亡相關蛋白質的表現	24
3.1.12 統計方法	24

3.2 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉.....	25
3.2.1 試劑.....	25
3.2.2 細胞培養.....	26
3.2.3 型態改變.....	26
3.2.4 流式細胞儀測定細胞存活率.....	26
3.2.5 DNA content 測定與 sub-G1(Apoptosis)測定.....	27
3.2.6 DAPI 染色.....	27
3.2.7 活性氧物質、粒線體膜電位與鈣離子濃度測定.....	27
3.2.8 流式細胞儀與特异性抑制劑測定 Caspase-3 和 Caspase-9 之活性....	28
3.2.9 西方墨點法測定 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質之表現.....	28
3.2.10 RNA 製備與 real-time PCR.....	29
3.2.11 統計分析.....	30
3.3 體內抗癌試驗.....	30
3.3.1 實驗動物.....	30
3.3.2 動物造模與試驗.....	30
3.4 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移與侵犯之作用與機轉.....	31
3.4.1 試劑.....	31
3.4.2 傷口癒合試驗.....	31
3.4.3 基底膜基質侵犯能力試驗.....	32
3.4.4 明膠酶譜分析試驗.....	32
3.4.5 西方墨點法測定 LS1034 細胞株轉移與侵犯相關蛋白質之表現.....	33
3.4.6 統計分析.....	33
第四章 結果.....	34
4.1 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉.....	34
4.1.1 大黃粗萃物含大黃素之測定.....	34
4.1.2 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株存活率之影響.....	34
4.1.3 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響.....	36
4.1.4 彗星試驗評估大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 DNA 損傷之影響.....	37
4.1.5 DAPI 染色評估大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 DNA 損傷之影響.....	40
4.1.6 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響.....	42
4.1.7 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質轉運之影響.....	43
4.1.8 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 caspase-3、caspase-8 與 caspase-9 活性之影響.....	45
4.1.9 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期與凋亡相關蛋白質表現之影響.....	47
4.2 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉.....	50
4.2.1 大黃素對 LS1034 細胞株型態學與存活率之影響.....	50
4.2.2 大黃素對 LS1034 細胞株細胞週期與凋亡之影響.....	51

4.2.3 DAPI 染色評估大黃素對 LS1034 細胞株 DNA 損傷之影響.....	53
4.2.4 大黃素對 LS1034 細胞株活性氧物質之影響.....	55
4.2.5 大黃素對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響.....	55
4.2.6 大黃素對 LS1034 細胞株粒線體膜電位之影響.....	55
4.2.7 大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-9 與 caspase-3 活性之影響.....	57
4.2.8 大黃素對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質表現之影響.....	57
4.2.9 大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-3 與 -9 mRNA 表現之影響.....	59
4.3 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖之作用.....	61
4.4 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移與侵犯之作用與機轉.....	63
4.4.1 傷痕癒合試驗.....	63
4.4.2 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移與侵犯之作用.....	64
4.4.3 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株腫瘤侵犯相關蛋白質轉運之影響.....	64
4.4.4 西方墨點法測定 LS1034 細胞株轉移與侵犯相關蛋白質之表現.....	69
第五章 討論.....	71
第六章 結論.....	78
跋.....	80
參考文獻.....	81
ABSTRACT.....	88
謝辭.....	90



圖目錄

圖 1.1	實驗研究設計流程圖	2
圖 2.1	細胞凋亡的外在路徑與內在路徑	6
圖 2.2	大黃素的結構式	16
圖 3.1	大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖腫瘤作用之流程圖	31
圖 4.1	大黃素標準品的 HPLC 測定	35
圖 4.2	大黃檢品的 HPLC 測定	35
圖 4.3	大黃粗萃物對 LS1034 細胞株存活率之影響	36
圖 4.4	不同濃度大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響	38
圖 4.5	量化不同濃度大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響	38
圖 4.6	不同培養時間大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響	39
圖 4.7	量化不同培養時間大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響	39
圖 4.8	彗星試驗觀察大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷	40
圖 4.9	量化彗星試驗量化大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷	40
圖 4.10	DAPI 染色觀察大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷	41
圖 4.11	量化 DAPI 染色量化大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷	42
圖 4.12	大黃粗萃物對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響	43
圖 4.13	大黃粗萃物對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質轉運之影響	44
圖 4.14	大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 caspase-3、-8 與 -9 活性之影響	46
圖 4.15	Caspase-3、-8 與 -9 抑制劑對大黃粗萃物抑制 LS1034 細胞株存活率之影響	47
圖 4.16	大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期與凋亡相關蛋白質表現之影響	48
圖 4.17	大黃素對 LS1034 細胞株型態學之影響	50
圖 4.18	大黃素對 LS1034 細胞株存活率之影響	51
圖 4.19	不同濃度大黃素對 LS1034 細胞株細胞週期之影響	52
圖 4.20	不同濃度大黃素對 LS1034 細胞株細胞週期之影響	52
圖 4.21	不同濃度大黃素對 LS1034 細胞株細胞 DNA 含量變化之影響	53
圖 4.22	DAPI 染色觀察大黃素誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷	54
圖 4.23	量化 DAPI 染色大黃素誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷	54
圖 4.24	大黃素對 LS1034 細胞株活性氧物質之影響	56
圖 4.25	大黃素對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響	56
圖 4.26	大黃素對 LS1034 細胞株粒線體膜電位之影響	57
圖 4.27	大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-3 與 -9 活性之影響	58
圖 4.28	Caspase-3 與 -9 抑制劑對大黃素抑制 LS1034 細胞株存活率之影響	58
圖 4.29	大黃素對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質表現之影響	59
圖 4.30	大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-3 與 -9 mRNA 表現之影響	60

圖 4.31	大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖之影響	61
圖 4.32	大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖腫瘤重量之影響	62
圖 4.33	大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖腫瘤體積之影響	62
圖 4.34	大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 之傷痕癒合試驗	63
圖 4.35	大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移之作用	65
圖 4.36	大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移作用之量化	65
圖 4.37	大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 侵犯之作用	66
圖 4.38	量化大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 侵犯作用	66
圖 4.39	大黃粗萃物對 LS1034 細胞株腫瘤侵犯相關蛋白質轉運之影響	67
圖 4.40	西方墨點法測定 LS1034 細胞株轉移與侵犯相關蛋白質之表現	70
圖 5.1	大黃粗萃物誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞細胞週期休止與凋亡可能之相關機轉	76
圖 5.2	大黃素誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞細胞週期休止與凋亡可能之相關機轉	76
圖 5.3	大黃粗萃物抑制 LS1034 人類大腸直腸癌侵犯與轉移可能之相關機轉	77



大黃粗萃物與其主成分大黃素對於人類大腸直腸癌細胞 株細胞凋亡之研究

研究生：馬易世

指導教授：林昭庚 教授

共同指導教授：鍾景光 教授

中國醫藥大學中醫學系博士班

根據統計，大腸直腸癌是臺灣的主要死亡癌症之一，而數千年來大黃一直是中醫用於治療消化系統疾病的常用藥物。本研究藉由流式細胞儀與 DAPI 染色法證實大黃粗萃物可誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株產生細胞凋亡與 G0/G1 期休止。大黃粗萃物可增加 LS1034 癌細胞株之細胞內鈣離子濃度，並刺激 caspase-9 與-3 之活性。其可增加 Bcl-X_S 促凋亡蛋白表現，增加 Bax/Bcl-2 比例，抑制 Bcl-2 與 Bcl-X_L 抗凋亡蛋白表現。其亦可促進 caspase-9 與-3、cytochrome c、AIF、Endo G 等蛋白之表現，進而誘導 LS1034 癌細胞株產生粒線體路徑之細胞凋亡。

大黃素為大黃主要之活性成分，具有抑制多種人類癌細胞株的作用。本研究證實大黃素可造成 LS1034 細胞株型態改變、存活率下降、DNA 損傷與產生 G0/G1 期休止等。其可誘導 LS1034 細胞產生活性氧物質、增加鈣離子濃度並降低粒線體膜電位。並可增加 caspase-3 和-9 之活性、促進 caspase-9、細胞質 cytochrome c 與 AIF 蛋白質表現、增加 Bax/Bcl-2 比例，促進 caspase-3 與-9 mRNA 表現。結果說明大黃素誘導 LS1034 癌細胞株之凋亡亦可能與粒線體路徑有關。

此外，LS1034 癌細胞株異體轉殖體內試驗亦證實大黃素在腫瘤重量或體積上都具有顯著之抑制作用。

最後，轉移侵犯是影響大腸直腸癌患者預後與存活的重要因素。本研究顯示大黃粗萃物可抑制 LS1034 細胞株之轉移與侵犯，可抑制核內與胞質中 MMP-2 與-9 蛋白轉位與表現，而大黃粗萃物抑制 LS1034 癌細胞株轉移侵犯的作用則可能經由抑制 ERK 與 PI3K/AKT 路徑。

關鍵詞：大黃素 大黃 人類大腸直腸癌 LS1034 細胞株 細胞凋亡
粒線體 異體轉殖 轉移



第一章 前言

1.1 研究背景及動機

癌症是全球的主要死因之一，其中大腸直腸癌 (colorectal carcinoma) 更是主要的死亡癌症之一^[1]。依臺灣衛生署之統計資料，西元 2010 年便有 41,046 人死於癌症，其中屬於結腸、直腸和肛門癌症更以死亡人數占率 11.4% 而名列第三順位^{[2][3]}。大腸癌的治療除了外科手術、化療、放射療法與標靶治療等治療方法外，中醫藥以獨特的醫學與哲學觀而運用天然藥物來治療疾病，因而不管是治療腫瘤或是維持患者生活品質等都有其不可忽視的地位。

細胞凋亡 (apoptosis) 是許多不同發展階段與正常生理機能中的重要環節。凋亡機制的缺陷不僅可使癌細胞避免被排除，也可能賦予其對化療藥物的抵抗能力。因此是否能調節細胞凋亡已被視為促進腫瘤死亡與增加化學、放射、標靶治療療效的有利手段，而中藥誘發癌細胞凋亡的作用也逐漸受到科學界所重視，

在傳統中醫之觀點，大黃無疑是治療消化道疾病的重要藥材之一。而綜觀相關研究亦發現，大黃素對於許多腫瘤細胞分別具有抑制增殖、促進凋亡、防止轉移或加強化療效果等作用^[46-62]。然而目前的研究成果對於中草藥大黃及其主成分大黃素對於大腸癌細胞的作用與機轉尚不清楚，因此本研究欲藉由體外試驗方式評估生藥大黃粗萃物以及大黃主成分大黃素對於 LS1034 人類大腸癌細胞株之影響、誘導細胞凋亡與相關機轉，並藉由異體轉殖動物造模來評估大黃素對於 LS1034 細胞株體內試驗之結果。

1.2 研究目的及設計

本研究欲藉由體外試驗方式評估生藥大黃粗萃物以及大黃主成分大黃素對於LS1034人類大腸癌細胞株存活率之影響、型態改變、誘導細胞凋亡與相關蛋白質或基因之表現，並藉由異體轉殖動物造模來評估大黃素對於LS1034細胞株體內試驗之結果。本實驗研究設計流程圖呈現於圖 1.1。

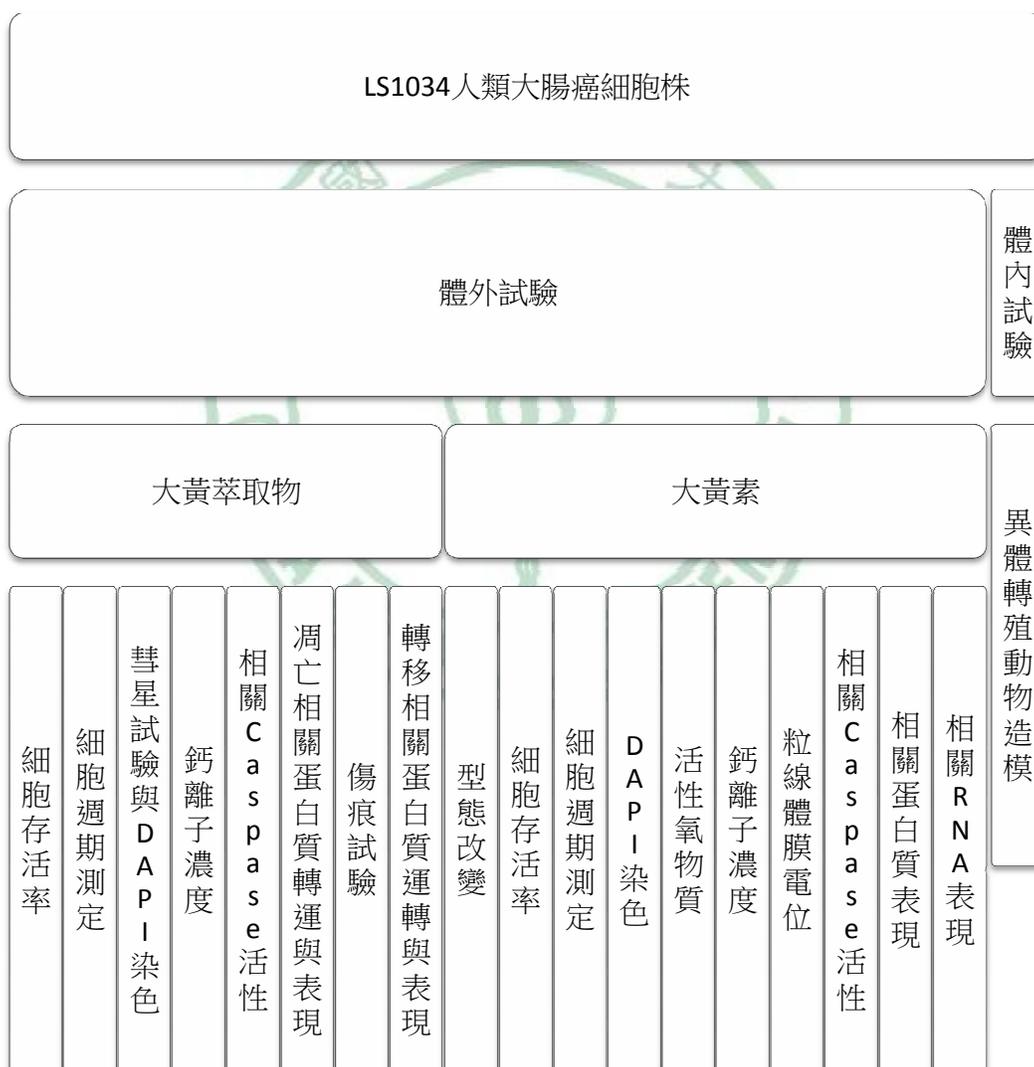


圖 1.1 實驗研究設計流程圖

第二章 文獻探討

2.1 大腸癌

癌症是全球的主要死因之一，僅西元 2008 年便奪走全球 760 萬人的性命，約佔所有死亡人數的 13%，其中大腸直腸癌(colorectal carcinoma)更以造成 60 萬 8000 人死亡而成為主要死亡癌症之一^[1]。依據臺灣國民健康局之資料，2009 年國人大腸癌的發生人數為十大常見癌症之第一位^[2]。另依臺灣衛生署之統計資料，惡性腫瘤自 1982 年起即為國人死因之首，2010 年便有 41,046 人死於癌症，而其中屬於結腸、直腸和肛門癌症更以死亡人數占率 11.4%而名列第三順位^[3]。此外，臺灣大腸癌之標準化發生率為美國的 1.4 倍，標準化死亡率則為美國的 1.7 倍^[2]。在鄰近之中國大陸地區，大腸直腸癌的發病率業已高居惡性腫瘤之第三位^[4]，而於 2004~2005 年間其死亡率則為惡性腫瘤死亡之第五順位^[5]。

另外根據流行病學的統計，全世界每隔 7 秒鐘就有一个人進入 50 歲；每隔 3.5 分鐘就有一个人被診斷出罹患大腸直腸癌；另每隔 9 分鐘便有一個人因大腸直腸癌而過世^[6]。

大腸直腸癌在出血或絞痛之症狀出現前大多有數年的潛伏期，伴隨的症狀可能有腹瀉、便秘、疲倦與不明原因貧血等臨床症狀。癌細胞可直接散佈或經血液、淋巴轉移，較常見的轉移部位有局部淋巴結、肝臟、肺臟與骨骼。而 CEA 升高則可作為大腸直腸癌之診斷與復發的指標^[6]。

根據美國的族群調查顯示，除了年齡、家族史、過去病史等不可抗拒的因素之外，高脂肪飲食、蔬果攝食量低、運動量不足、肥胖、抽菸與飲酒等亦是罹患大腸直腸癌的高危險因子^[6]。

2.2 大腸癌的治療

大腸癌的治療除了傳統之外科手術、全直腸繫膜切除術、微創手術等根治性手術治療外，術前化療、術中化療、術後化療、放射療法與標靶治療等也是臨床常用或合併使用之治療方法，另外尚屬試驗階段之基因治療與腫瘤疫苗等也逐漸被發展^[7]。

中醫藥藉由特有的醫學與哲學觀，並利用天然藥物來治療疾病。對於癌症的觀點雖然不同於現代西方醫療，然而不管是治療腫瘤或是維持患者生活品質都有其不可忽視的地位。

癌症的機轉相當複雜，但細胞凋亡是近來科學界所重視的環節，許多的研究證明，獲得逃脫細胞凋亡的機制是腫瘤細胞重要的特徵，所以是否能調節細胞凋亡被視為促進腫瘤死亡與增加化學、放射、標靶治療療效的有利手段^[8]。因此許多中藥也朝這個方向做研究。

2.3 細胞凋亡在癌症治療的角色

與發炎性之細胞壞死(necrosis)不同，細胞凋亡(apoptosis)為細胞進程序性死亡(programmed cell death, PCD)時廣泛且高度受調控的機制^[8]，也是許多不同發展階段與正常生理機能中的重要環節。如胎兒發展過程的神經系統、指趾頭形成、胃腸道形成、骨骼重塑、自體免疫抑制以及防止病毒感染等都與細胞凋亡有關^[8]。換句話說，細胞凋亡與細胞增殖是維持生物個體恆定時正常且必要的因素。

細胞凋亡呈現的特徵包含細胞質濃縮(cytoplasmic shrinkage)、細胞膜突起(membrane blebbing)、細胞核碎裂(nuclear fragmentation)、核小體內 DNA 碎裂(intranucleosomal DNA fragmentation)、膜磷脂質外翻(phosphatidylserine exposure)，最後形成凋亡小體(apoptotic bodies)而被巨噬細胞(macrophages)或其他吞噬細胞(engulfing cells)所吞噬^[9]。

目前認為細胞凋亡的誘發可歸為外在路徑(extrinsic pathway)與內在路徑(intrinsic pathway)兩大類。簡單的說，外在路徑經由配體

(ligand)媒介活化細胞表面之死亡受體(death receptor)進而誘導細胞死亡；內在路徑則因多種細胞內刺激，例如 DNA 損傷、缺氧、細胞毒性藥物(cytotoxic drug)等因素影響粒線體後誘導細胞死亡。外在路徑的傳遞與 caspase-8、caspase-3 等有關。內在路徑的傳遞則與 Bcl-2、Bax、粒線體膜電位、cytochrome c、caspase-9、caspase-3 等有關^[8]。另外如活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)、內質網壓力(ER stress)導致 Ca^{2+} 由內質網釋出等也可經由活化死亡受體或粒線體路徑而誘導細胞凋亡^{[10][11]}。有關凋亡的詳細內容將在隨後各節中敘述。

然而在人類的癌細胞中，抗凋亡的機制經常不正常的增加致使癌細胞得以逃脫凋亡性之細胞死亡^[12]。研究亦指出，凋亡機制的缺陷不僅可使癌細胞避免被排除，也可能賦予其對化療藥物的抵抗能力，因而調控凋亡路徑可能可以誘導癌細胞死亡，進而在臨床上增加化療藥物的治療效果^[8]。

中草藥誘發癌細胞凋亡的作用已逐漸受到重視，包括大黃、青蒿、黃連、黃芩、雷公藤、吳茱萸與樹蘭(Aglaia)等多種傳統生藥材，而其誘發癌細胞凋亡的相關機制業已逐漸被闡明^[13]。

2.4 細胞凋亡的外在路徑與內在路徑

外在路徑(extrinsic pathway)是免疫細胞經由配體媒介活化細胞表面之 death-mediating 受體而誘發不健康(unhealthy)細胞產生細胞凋亡的機制^[8]。細胞表面之 death-mediating 受體包括 CD95/Fas/Apo1、TNF Receptor 1(TNFR1)、TNF Receptor 2(TNFR2)以及 Death Receptors 3-6(DR3-6)等。配體受體的結合可誘導受體的群集作用(multimerization)，繼而有 FADD 銜接蛋白(adapter protein)的結合，形成 death-induced signaling complex(DISC)並招募 initiator caspase-8 和-9，接著活化 effector caspase-3 和-7，最後在多種細胞質和細胞核基質(substrate)遭到不可逆的切割而達到細胞破壞過程的高潮^[8](圖 2.1)。

另外包括 DNA 損傷、缺氧、細胞剝離(cell detachment)、cellular distress 與具細胞毒性之藥物都可能引起細胞凋亡的內在路徑 (intrinsic pathway) [8]。這些來自不同刺激的訊息會匯集到細胞之線粒體上，而凋亡訊息的傳遞在此處則是受到 Bcl-2 家族成員的嚴密調控。一部分的 Bcl-2 家族成員，如 Bcl-2 與 Bcl-X_L 具有抗凋亡 (anti-apoptotic) 的作用；而另一部分的 Bcl-2 家族成員，如 Bid、Bad 與 Bim 則具有促凋亡 (pro-apoptotic) 的作用。當促凋亡訊息勝過抗凋亡訊息時則將誘發粒腺體外膜滲透性 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)，導致粒線體雙層膜間隙的蛋白質，如 cytochrome c 和 Smac/Diablo 等釋出至胞液 (cytosol) 中 [8]。

釋出的 cytochrome c 會和 Apaf-1 相互作用導致凋亡小體 (apoptosome) 的形成以及 caspase-9 的活化。而 Smac/Diablo 中和細胞凋亡抑制蛋白質 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族則可進一步促進 caspase 的活化。Caspase-9 切割和活化 effector caspases-3 與 -7 而導致細胞死亡 [8]。然而外在路徑與內在路徑並非完全獨立的，例如外在路徑過程中之 caspase-8 便可活化粒線體上的 Bid 蛋白 [8] (圖 2.1)。

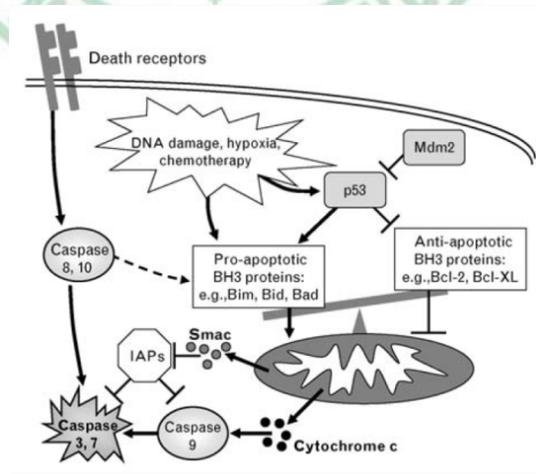


圖 2.1 細胞凋亡的外在路徑與內在路徑。摘錄自 Ziegler DS, Kung AL. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(1):97-103

2.5 Caspase 蛋白質家族

Caspase (cysteine aspartate specific proteases 半胱胺酸天門冬胺酸特異性蛋白酶，又稱凋亡蛋白酶)是一群 cysteine protease 蛋白質家族，其為扮演調節細胞凋亡的重要角色。其中 caspase-8 為活化死亡受體媒介之凋亡路徑的關鍵，caspase-9 為壓力及基因毒性藥物造成的細胞凋亡之關鍵，而 caspase-3 則為凋亡過程中 DNA 及核碎裂過程之關鍵分子^[9]。

目前已有 11 個人類 caspase 被確認，雖然有許多方式被用來為 caspase 家族分類，但無論如何分類都指出 caspase 家族內其結構與其功能間具有緊密的關聯性。在凋亡的過程中，連貫的執行機制是由許多胞外與胞內的訊息所誘發。因此若從功能性的分類來說，一些 caspase 可連結不同的上游的信息路徑與下游的執行步驟^[9]。

這些在上游的家族成員被稱為啟動(initiator) caspases，啟動 caspases 具有長的前體結構域(prodomains，前域)，據此又可以兩種蛋白質-蛋白質交互作用(protein-protein interaction)結構單位(motifs)之特徵區分為：具死亡效應區域(death effector domain, DED)，如 caspase-8 和-10；以及具 caspase 活化與募集區域(caspase activation and recruitment domain, CARD)，如 caspase-1、-2、-4、-5、-9、-11 和-12 等。而這結構單位可作為與上游轉接分子(adaptor molecules)交互作用的基本單位。在啟動 caspases 中，caspase-1、-11 與-5 又可歸屬為可調控細胞凋亡與某些炎症反應的亞綱^[9]。

另一方面，藉由切斷多種細胞內基質以執行細胞凋亡下游步驟的 caspases 通常需要上游 caspases 的加工與活化。這些下游 caspases 被稱為執行(executioner) caspase，如 caspase-3、-6 與-7，這類 caspase 並以擁有短的 prodomain 為特色^[9]。

2.6 粒線體與細胞凋亡

粒線體不僅負擔著細胞能量轉化的重責大任，另如同前面所述，

粒線體亦在細胞凋亡的過程中扮演相當重要的角色。細胞內的調控權藉由許多促凋亡與抗凋亡信息的存在而又彼此競爭。在細胞凋亡內在路徑的過程中，有"pro-life"與"pro-death"的訊息會整合並匯聚在粒線體的外膜上，而粒線體外膜的通透性(permeabilization)則成為不可逆地決定細胞經由內在路徑走向凋亡的關鍵步驟。

粒線體外膜通透性(mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)可導致 cytochrome c 與 SMAC/Diablo、AIF 等凋亡性蛋白(apoptogenic proteins)自粒線體雙層膜間隙釋出至胞液。雖然 cytochrome c 是電子傳遞鏈的關鍵因子，且其作用對於氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)是不可或缺的，然而 cytochrome c 一旦釋出至胞液，其將藉由不可逆地活化一連串 caspase 媒介之細胞破壞進而導致細胞凋亡。Cytochrome c 的大量釋出也終將導致粒線體功能的喪失以及產生生物能量的危機(bioenergetic crisis)。一旦當足量的粒線體外膜如此被破壞，則細胞的死亡終將不可避免，因此粒線體外膜通透性經常被稱之為“踏上了不歸路(the point of no return)”^[14]。

在粒線體的過程中，Bcl-2 蛋白質家族則是調節(regulation)和誘導(induction)粒線體外膜通透性的關鍵角色。Bcl-2 蛋白質家族以具有 Bcl-2 homology (BH) domains 為特徵的蛋白，並可區分為促凋亡與抗凋亡兩大類。而促凋亡 Bcl-2 家族之蛋白質又可再分為兩類：一、effector proteins，如 BAK 與 BAX 可直接地(actively)誘導粒線體外膜通透性。二、如 BAD、BID 與 BIM 等則經由抑制抗凋亡蛋白或活化 effector Bcl-2 proteins 而間接地促進粒線體外膜通透性。而抗凋亡(或稱 pro-life)Bcl-2 家族蛋白質，如 Bcl-2、Bcl-xL、MCL-1 等則可結合並抑制促凋亡蛋白家族之作用。所以藉由一系列 Bcl-2 家族間複雜的相互作用便可調節粒線體外膜通透性與進行細胞凋亡的誘導^[14]。

促凋亡分子 BAK 位於粒線體外膜，而另一種促凋亡分子 BAX 在未受刺激的細胞位於胞液中，一旦接受到凋亡信號時 BAX 則會轉移到粒線體之外膜。隨著被活化，BAK 與 BAX 則會插入粒線體外

膜而促成孔洞的形成。經由此孔洞，cytochrome c 與其他粒線體蛋白將被釋出。被釋放至胞液中之 cytochrome c 會與 Apaf-1 的結合而形成凋亡小體(apoptosome)，而凋亡小體可活化 caspase-9 後繼而造成一連串 caspase 的活化，最終並將邁向細胞死亡。除此之外，因粒線体外膜通透性而釋出的其他蛋白質亦將有助於細胞的死亡^[14]。

另外，線粒體功能障礙(dysfunction)參與細胞凋亡之誘導，並且被視為凋亡路徑中的重要角色。事實上，線粒體通透性轉變孔(mitochondrial permeability transition pore)的打開被證明與粒線體膜電位(transmembrane potential ($\Delta\psi_m$))之去極化(depolarization)、凋亡因子之釋放和氧化磷酸化之損失有關。儘管對於粒線體膜電位下降(loss)是否為細胞凋亡過程中的早期事件，進而促使凋亡因子釋出的先後關係有些爭議，但粒線體膜電位下降無疑仍與細胞凋亡有密切之關係^[15]。

2.7 內質網與細胞凋亡

內質網(endoplasmic reticulum, ER)是細胞內進行蛋白質合成、摺疊，以及儲存鈣離子的重要胞器。然而當與內質網摺疊能力有關的內質網受質蛋白(ER client protein)負荷過重時，將可能造成內質網中堆積摺疊錯誤的(misfolded)蛋白質，這便導致了內質網壓力(ER stress)。為了克服內質網壓力，便須活化許多可協調受質蛋白量與內質網摺疊機制的路徑，例如未折疊蛋白質反應(unfolded protein response, UPR)便能促進對內質網壓力的適應性反應(apaptative response)以及重新達到內質網的衡定狀態。然而雖然 UPR 可緩解摺疊錯誤蛋白質的堆積以及內質網壓力，但當 UPR 仍不足對抗內質網壓力時，內質網內摺疊錯誤蛋白質的堆積將導致毒性反應而最終造成細胞之死亡。其中，細胞凋亡是內質網壓力的情況下誘導細胞死亡的重要機制^[10]。

目前所知內質網壓力誘導細胞凋亡的機制有四：一、由依賴 Ca^{2+}

之鈣蛋白酶(calpain)直接活化的 caspase-12 可活化 caspase-9 與 caspase-3。二、由內質網釋出之 Ca^{2+} 使得粒線體的 Ca^{2+} 過量將導致粒線體中的 cytochrome c 等促凋亡分子的釋出。三、藉 PERK/eIF2 α /ATF4 活化之 CHOP 將導致促凋亡蛋白的表現增加、抗凋亡蛋白質 Bcl-2 家族成員的表現降低。四、由 IRE1/Traf2/ASK2 活化的 JNK 訊息可誘發凋亡路徑^[10]。

2.8 其他細胞凋亡的相關機制

研究指出，鈣離子因凋亡刺激湧入細胞中，而當細胞內鈣離子濃度長時間的增加時，將活化粒線體雙層膜間隙的鈣蛋白酶(calpain)，並進而導致 AIF 的形成。AIF 的切割片段可經由 Bax/Bak 媒介的孔洞釋出至胞液後再進入細胞核中參與染色質濃縮及大規模的 DNA 碎裂^[16]。

粒線體是細胞活性氧物質(O_2^- , H_2O_2 等)最主要的來源。其中 H_2O_2 誘導細胞凋亡的機制被認為是增加 Fas-FasL 系統的表現，進而導致 caspase-8 及其下游 caspases 的活化。此外，活性氧物質造成的 DNA 損傷可導致 p53 的活化與 p53 媒介之細胞凋亡。活性氧物質亦可活化 ASK1/JNK 激酶(kinase)信息路徑而誘導外在與內在之凋亡路徑。活性氧物質也能參與並打開與粒線體膜通透性有關之粒線體過渡性通透孔(mitochondria permeability transition pore, MPTP)複合體，繼而可能有助於細胞之凋亡與壞死。活性氧物質可藉由氧化粒線體內膜脂質 cardiolipin 而促進 cytochrome c 釋出^[14]。在胞液中 cytochrome c 與 Apaf-1 的結合是形成凋亡小體的關鍵步驟。凋亡小體複合體可繼而活化 caspase-8 與 caspase-3。 H_2O_2 也可以活化 NF κ B、AP-1 和 p53 等轉錄因子(nuclear transcription factors)，它們可促進 death proteins 的表現或產生 survival proteins 的抑制分子。細胞對抗活性氧物質的重要分子則包括 GSH 以及 SOD^[17]。

如同前面所述，促凋亡蛋白的釋放也是凋亡訊息的重要步驟，例如 cytochrome c、細胞凋亡誘導因子(apoptosis-inducing factor, AIF)、

Smac/DIABLO 以及 Omi/HtrA2 等自粒線體雙層膜間隙釋出。而這些釋出的蛋白將經由活化 caspase 依賴與非 caspase 依賴之路徑而促進細胞凋亡。其一，caspase 依賴路徑由 cytochrome c 與 Apaf-1、dATP、procaspase-9 等於胞液中形成 apoptosome complex 開始，進一步自我活化 procaspase-9 並引發下游的 caspase cascade。而相對的，AIF 與內核酸酵素 G(endonuclease G, Endo G)等則為非 caspase 依賴路徑之 death effector，當其釋出後可進入細胞核中參與染色質濃縮與大規模的 DNA 碎裂^{[16][18]}。

2.9 腫瘤轉移

倘若腫瘤的位置侷限且體積不大，則其對宿主而言威脅性並不大，因此此類腫瘤被稱為良性(benign)腫瘤。但相反地，惡性(malignant)腫瘤，或稱為癌症(cancer)者，通常在生長與分裂方面都較正常細胞為快，並隨著腫瘤演進更會侵入周圍組織、進入循環系統，甚至建立第二個增生的區域，此過程便稱之為轉移(metastasis)。大部分的惡性腫瘤細胞最終會有轉移的能力，因此要區分惡性或良性腫瘤的主要特徵便是其侵入(invasiveness)和散布(spread)的能力^[19]。

正常的細胞是以其附著之基板(basal lamina)來限制它們得侷限於原本的位置，然而癌細胞與細胞外基質與基板間卻擁有複雜的關聯性。癌細胞可降解基板後得以穿透並進性轉移。而轉移的過程除了自原始腫瘤脫離並進入血流之外，散播出的腫瘤細胞亦須附著到血管內壁的內皮細胞上，穿透它而進入下層的組織之中^[19]。

根據統計，大約有 20%的大腸直腸癌患者被診斷出伴隨有癌細胞轉移。另外早期(early stage)大腸直腸癌患者亦高達有 50%最終會發生癌細胞轉移，而發生轉移的患者其五年存活率僅約 10%^[20]。

2.10 腫瘤轉移與相關機轉

轉移的過程(metastatic cascade)是一系列分子步驟所精心策劃，它

策劃發展中細胞通過進行侵犯 (facilitate invasion) 與隨後轉移 (subsequent metastases) 的一連串轉變而由原位腫瘤取得進展。步驟包括上皮細胞轉型成間質細胞 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)，伴隨基底膜 (BM) 與細胞外基質 (ECM) 的蛋白質水解；藉由改變黏附特性 (adhesive properties) 與抑制失巢凋亡 (anoikis, 即因不當失去細胞黏附而造成的細胞凋亡)，腫瘤細胞可自大腫塊 (bulk tumor) 處分離；局部浸潤 (local invasion) 與細胞遷移 (migration)；血管新生與內滲 (intravasation)；可行的血管傳播伴隨免疫逃避 (immune evasion)；自血管外滲 (extravasation)；建立遠處栓塊 (embolization) 的並在第二位置生存下來；最終完成一個微觀 (micro) 與宏觀 (macro) 的轉移結果^[21]。

惡性腫瘤細胞為了達成成功的轉移，上述每個步驟都有許多必須被克服的障礙^[21]，其中 MMPs 便是一個相當重要且被受重視的環節。科學界對於 MMP 家族的認識始於對蝌蚪脫去牠的尾巴之研究，接著因膠原蛋白 (collagens) 被視為阻礙腫瘤細胞轉移的主要結構蛋白後，MMPs 也被認定為在促進癌細胞散播 (dissemination) 的過程中扮演膠原蛋白分解酵素 (collagenolytic enzymes) 之重要角色^[22]。

MMP 家族是由一群超過 25 個具有相同功能區域之鋅依賴酵素 (zinc-dependent enzymes) 所組成。它們可依據其對應之受質所命名，也可以其被發現之順序來命名。整體而言，MMPs 幾乎可降解所有的 ECM 物質，例如 collagens、laminin、fibronectin、vitronectin、enactin 與 proteoglycans 等。在癌症方面特別重視可被 MMP-2 與 MMP-9 降解的 type IV collagen，因為其為基底膜的主要蛋白成分。有些研究指出，被 MMP-2 與 MMP-9 降解的 type IV collagen 可能會增強血管新生 (angiogenesis) 作用^[22]。

MMPs 在大腸直腸癌方面被廣泛研究，並被認為對於轉移過程 (metastatic process) 中的侵犯環節 (invasive aspects) 是相當重要的。其中 ProMMP-2 在正常細胞中廣泛地被表現；相對地，活性的 MMP-2 則在腫瘤細胞中顯著增加，卻在大部分正常組織中缺乏。研究指出，在大腸癌檢體中活性 MMP-2/proMMP-2 的比例高於非腫瘤組織

達 20 倍。另有研究指出，增高的 MMP-2 與大腸癌發生肝轉移有關^[22]。而臨床統計方面，MMP-2 之表現的確與大腸直腸癌患者有較差之整體存活期(overall survival)與無惡化存活期(progression-free survival)有關^[23]。而 MMP-9 的過度表達亦與大腸癌細胞的同時發生轉移(synchronous metastasis)有關，與疾病的進展有關，也可能與較短的存活率有關^{[22][24]}。

有關癌細胞轉移與侵犯的機轉相當複雜，除 MMPs 之外，許多訊息路徑如 Rho/ROCK、Ras/MAPK 與 PI3K/AKT 等都與其有關。例如 PI3K 訊息路徑在癌細胞增殖、生存、代謝、移動與侵犯中扮演一個重要的角色^[25]。近來的研究認為 MMPs 與大腸直腸的致腫瘤性(tumorigenicity)和 metastagenicity 有關，而 PI3K/Akt 媒介的侵犯行為便可能與增加 MMP-2 與 MMP-9 的表現有關^[25]。另外，腫瘤細胞的遷移(migration)是轉移的重要步驟，而肌動蛋白細胞骨架(actin cytoskeleton)的重排(rearrangement)便牽涉其中。研究發現 Rho 的過度表達與人類癌症的進展有關，其原因可能便是 Rho/ROCK 路徑的活化藉由調節肌動蛋白細胞骨架的重組(reorganization)而介入腫瘤的進展，且特異性的 ROCK 抑制劑也確實可以抑制腫瘤的生長與轉移^[26]。其它研究發現如 NF- κ B 路徑等也是媒介癌細胞增殖、侵犯、血管增生與轉移的主要過程(cascade)^[27]。而前列腺癌的研究指出，Raf/MEK/ERK 訊息路徑活性的增強被認為與轉移的增加有關^[28]。

2.11 大腸癌的中醫觀點

大腸癌是個恆久的疾病，早在《靈樞》水脹篇中便有「寒氣客于腸外，與衛氣相搏，氣不得營，因有所繫癖而內著，惡氣乃起，瘕肉乃生，其始生也大如雞卵，稍以益大^[29]」的描述，另於《外科達成》亦記載「鎖肛痔，肛門內外猶如竹節鎖緊，形如海蛇，裡急後重，便糞細而帶扁，時流臭水」^[30]等與大腸直腸癌有關之敘述。但因文化背景的不同，傳統中醫不同於現代西方醫學對大腸癌的認知與描述，其對大腸直腸癌的認識應分屬於不同之病名、症狀與證型

。例如有些學者以病名"腸覃"、"積聚"、"臟毒"、"鎖肛痔"、"腸風"、"下痢"與"腸癖"等為傳統中醫對大腸癌之認識^[4]。另有學者認為《金匱要略》對與大腸癌有關的論述分別散見於“臟腑經絡先後病篇”、“血痹虛勞病篇”、“腹滿寒疝宿食病篇”、“五臟風寒積聚病篇”、“驚悸吐衄下血胸滿瘀血病篇”及“嘔吐噦下利病篇”等篇。其描述之大腸癌相關症狀包括下血、下利便膿血、腹滿、腹痛等，而可運用之治療方劑則可有大柴胡湯、大承氣湯、下瘀血湯、抵當湯等^[31]。另有些學者從臨床症狀表現頻率經統計分析出腹痛(48.8%)、納呆(41.0%)、腹瀉(36.4%)、腹滿(34.9%)、大便膿血(33.3%)、嘔吐(31.0%)、噁心(30.2%)、大便下血(27.9%)、大便秘結(25.6%)、裡急後重(19.4%)、局部腫塊(17.1%)、腹部脹墜(14.7%)、大便艱難(4.6%)等為大腸癌患者常見之中醫臨床徵候^[32]。

如同前面所述，由於中西醫學觀點不同，因此中醫治療大腸直腸癌並不能以單一病因病機來考慮，使用之治療方劑當然也不盡相同。許多醫師臨床上將大腸癌區分為濕熱蘊結、瘀毒內阻、脾腎虧虛、肝腎陰虛等中醫證型^[33]。其病因多屬本虛標實、虛實夾雜，而治法則多以扶正及祛邪為基本的治療原則^{[34][35]}。雖然臨床醫師對於各證型的治療思路與方劑不盡相同，然而大腸直腸癌的主要臨床症狀仍為便秘、大便秘結、腹痛、腹滿、嘔吐、下膿血等腸道症狀，因而在中醫相對應的治療處方中便多有大黃之運用。例如治療陽明腑實便秘與腹痛的大承氣湯；治療太陰病腹滿大實痛之桂枝加大黃湯；治療腹滿發熱的厚朴七物湯；治療食已即吐之大黃甘草湯；治療腸癰腹腫痛的大黃牡丹湯等，都可能運用在大腸直腸癌的病例上。

2.12 大黃與大腸癌的中醫論治

大黃為傳統中醫藥治療腸道疾患之重要藥物，除了做為緩解便秘的瀉下劑外，亦可用於治療黃膽、消化道出血、潰瘍等病症^[13]。消化道症狀為大腸癌之主要臨床表現，很多病人在被診斷出大腸癌前已有大便習慣改變、或溏或秘、便下不暢、粘滯難解或肛門墜脹不

適與出血等症狀^[29]。因此許多運用方劑組成便含有大黃，經統計，大黃也是中醫臨床治療大腸癌的常用藥物之一^[36]，甚至在臨床上也有大黃相關製劑灌腸治療而改善大腸癌相關症狀的作法^[34]。因此大黃於傳統中醫藥治療大腸癌與其相關症狀上可說佔有相當重要的角色。

傳統中醫藥之大黃來源植物為蓼科多年生草本植物掌葉大黃(北大黃)*Rheum palmatum* L.、唐古特大黃 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf.、藥用大黃(南大黃)*R. officinale* Baill.或同屬別種植物的乾燥根和根莖^{[37][38]}。

《神農本草經》曰：「大黃味苦寒有毒。主下瘀血，血閉，寒熱，破癥瘕積聚，留飲宿食，蕩滌腸胃，推陳致新，通利水穀，調中化食，安和五臟。生山谷」^[39]。《本草綱目》曰：「大黃苦，寒，無毒。下痢赤白，裡急腹痛，小便淋瀝，實熱燥結，潮熱譫語，黃膽諸火瘡」^[40]。《本草備要》曰：「大苦大寒，治傷寒時疾，發熱譫語，溫熱瘴癘，下痢赤白，腹痛裏急。黃膽水腫，癥瘕積聚，留飲宿食，心腹痞滿，二便不通。吐血衄血，血閉血枯，損傷積血，一切實熱，血中伏火」^[41]。《本草正義》謂其：「迅速善走，直達下焦，深入血分，無堅不破，蕩滌積垢，有犁庭掃穴之功」^[29]。

含大黃之方劑雖然作用不一，但仍與蕩滌腸胃、推陳致新有關。例如可下瘀血者，桃仁承氣湯、抵當湯丸、下瘀血湯；可推宿食者，厚朴三物湯、厚朴大黃湯；除血閉寒熱者，柴胡加龍骨牡蠣湯、鱉甲煎丸；破癥堅積聚者，大黃蟪蟲丸、大黃牡丹皮湯；主去留飲者，大陷胸湯丸、已椒蘆黃丸、大黃甘遂湯、桂苓五味甘草加薑辛半夏大黃湯。由此可知，大黃藥性迅速，且在中醫藥中相當重要且運用範圍十分廣泛，故宿有「將軍」之美稱，但其啟脾滯、通閉塞、盪積聚、行火用^[42]，故治療腸道疾患仍是大黃主要之運用範疇，故多被歷代醫家歸入為脾、胃、肝、大腸經。

2.13 大黃的毒性與安全性

雖然有過一些爭論，但動物研究顯示，連續三週口服相當於藥典建議人體劑量最高劑量之 6 倍與 40 倍的大黃(大鼠劑量每天每公斤體重 3、20g 大黃)後，雖然可能發生以劑量相關之關係最小(minimal)至輕微(mild)的肝組織變化(hepatic hyaline droplets)，但服藥大鼠之存活率與腎組織切片仍與不服藥對照組相同。相反地研究亦發現，口服與前述相同的劑量卻可明顯增加以 adenine 誘發慢性腎病變造模大鼠的存活率，並改善其腎臟組織之病變^[43]。

類似的研究也指出，就算口服劑量每天每公斤體重高達 40g 之大黃亦不會影響年幼(immature)大鼠的存活率，僅在相同高劑量下降低年老大鼠之存活率^[44]。這些研究資料為大黃臨床使用的安全性提供了一部份依據。

2.14 大黃的重要成分

現代研究多認為大黃的活性成分主要為蒽醌(anthraquinone)類化合物，包括大黃素(Emodin)(圖 2.2)、蘆薈大黃素(Aloe-emodin)、大黃酸(Rhein)、大黃酚(Chrysophanol)與丹蒽醌(Danthron)等^{[13][45]}。此外亦含有聯蒽醌類(dianthraquinones)、番瀉葉苷類(sennosides)、萘類(naphthalins)、二苯乙烯類(stilbenes)、單寧類(tannins)、類黃酮類(flavonoids)和多酚類(polyphenols)等衍生物^[45]。

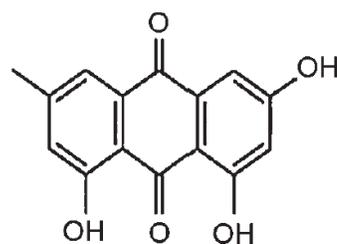


圖 2.2 大黃素的結構式

2.15 大黃素的現代研究

大黃素(Emodine, 1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone)是大黃的重要成分,相關研究指出其作用包括有瀉下、抗菌(antibacterial)、免疫抑制(immunosuppressive)、血管舒張(vasorelaxent)、強心(cardiotonic)、保肝與抗癌等作用^[45]。

關於大黃素之抗癌作用逐漸受到研究人員所重視,一般認為大黃素因其醌型結構(quinoid structure)而具有產生活性氧物質(ROS)的能力,也因而與活性氧物質誘導之細胞凋亡有關^[13]。例如在體外試驗中大黃素可增加活性氧物質產生、降低細胞內 pH 值,進而促進 EC-109 人類食道癌細胞株之凋亡^[46]。亦可經由內在路徑促使 HepG2 人類肝癌細胞株粒線體釋放 cytochrome c、活化 caspase-8 和-9,也能造成活性氧物質堆積、增加 p53 表現、降低 NF- κ B/p65 與 Bcl-2 表現,進而誘導 HepG2 細胞株凋亡^[47]。大黃素可經由降低 NF- κ B/p65 與 Bcl-2 表現,增加 Bax、caspase-8 和-9、p53 表現,增加細胞質 cytochrome c,進而促進 SW1990/Gem 胰臟癌細胞株凋亡,並可能因降低 MDR-1(P-gp)表現而改變 SW1990/Gem 癌細胞株對抗癌藥物 gemcitabine 的抗藥性^[48]。大黃素亦可經由抑制 CXCR4 的表現而抑制前列腺癌與肺癌細胞的侵犯(invasion)與轉移(migration)^[49]。

體內試驗方面,大黃素可經由減少 Survivin 與 XIAP 之蛋白質及 mRNA 表現,進而減少 PANC-1 人類胰臟癌細胞株異體移植之腫瘤體積與重量^[50]。大黃素也可能經由抑制 Akt 與 NF- κ B 的活化、降低 Bcl-2/Bax 比率、促進粒線體釋放 cytochrome c 等,進而增強 gemcitabine 抑制異體移植 SW1990 胰臟癌細胞株生長的作用^{[51][52]}。也可能經由降低 MMP-9 等表現進而抑制 SW1990 胰臟癌細胞株異體移植後的轉移能力^[53]。大黃素也可能經由降低 survivin 表現、產生 ROS 等而加強 cisplatin 對異體移植 SGC996 人類膽囊癌細胞株的抑制作用^[54]。

綜觀相關研究發現,大黃素對於舌癌細胞^[55]、食道癌細胞^[46]、胰

臟癌細胞^{[48][51][52][53]}、膽囊癌細胞^{[54][56]}、肝癌細胞^{[47][57]}、慢性骨髓性白血病^[58]、非小細胞肺癌細胞^[59]、肺腺癌細胞^[60]、神經膠質瘤細胞^[61]與前列腺癌細胞^{[49][62]}等許多腫瘤細胞分別具有抑制增殖、促進凋亡、防止轉移或加強化療效果等作用。

然而目前的研究成果對於中草藥大黃及其主成分大黃素對於大腸癌細胞的作用與機轉尚不清楚，因此本研究藉由生藥萃取、細胞型態觀察、流式細胞儀、DAPI 染色、西方墨點染色、real-time PCR、傷痕癒合試驗等技術，以體外試驗方式評估與探討生藥大黃粗萃物 (Crude extract of *Rheum palmatum* L, CERP) 對於 LS1034 人類大腸癌細胞株之影響，以及大黃主成分大黃素對於 LS1034 細胞株之作用與相關機轉。並藉由異體轉殖動物造模來評估大黃素對於 LS1034 細胞株體內試驗之結果。



第三章 材料與方法

3.1 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉

3.1.1 大黃粗萃物之抽提製備

取生藥材 100 克置於三角瓶中，加入 500 mL 去離子水。時時震搖同時抽氣過濾，並於靜置 24 小時後收集萃取液。將藥材再置於三角瓶中，加入 500 mL 去離子水，時時震搖與靜置 24 小時後合併兩次濾液，以減壓濃縮至乾為止。

3.1.2 大黃粗萃物之 Emodin 定量

3.1.2.1 儀器：

高效液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)：
(1)幫浦：Waters 2695 Separations Module；(2)自動注入器：Autosampler 717+；(3)檢測器：Waters 2996 Photodiode Array Detector；
(4)分析軟體：Waters Empower software；(5)層析柱：MERCK 公司 LiChroCART®254-4 HPLC- Cartridge Lichrospher 100 RP-18 (5 μm)。
前端加上管柱(MERCK 公司 LiChroCART®4-4 Lichrospher 100 RP-18 (5 μm)，以濾除雜質。

3.1.2.2 試驗方法：

1. 標準品之製備

稱取 1 mg emodin 之標準品，分別溶於 1 mL 甲醇中，以 0.45 μ m (Nalgene®, New York, USA) 濾膜過濾，為含量 1 mg/mL 之母液，供 HPLC 偵測 emodin 定性定量之用。

2. 檢品之製備

材料稱取 100 mg 以 1 mL 甲醇經溶解後，並以 0.45 μ m 濾膜過濾，供 HPLC 檢測 emodin 之含量。

3. 高效液相層析法

(1) 分析條件

在以乙腈(acetonitrile)：0.1% 醋酸(acetic acid) = 60：40 固定比例為流動相，柱溫 25°C 流速為 1 mL/min，檢測時間為 30 min，檢測波長為 254 nm。

(2) 檢量線之繪製

取 emodin 之標準品，以濃度 1 mg/mL 作為稀釋母液，再分別稀釋成母液的 1、1/2、1/4、1/8、1/16 及 1/32 倍等 6 個濃度之標準品溶液，各以 0.45 μ m 之微孔膜過濾，濾液用 autosampler 每次自動定量注射 10 μ L 注入 HPLC 分析，每個濃度處理重複 3 次注射，將 3 次總和平均。以濃度及積分面積各為橫座標和縱座標，利用線性迴歸分析獲得方程式，製成標準檢量線。

其迴歸方程式如下：

$$\text{emodin} : Y = 44876868X + 380788 \quad R^2 = 0.99944$$

3.1.3 試劑

試劑品名與廠商

品名	廠商
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Chemical Co
potassium phosphates	Sigma Chemical Co
propidium iodide (PI)	Sigma Chemical Co
ribonuclease-A (RNase A)	Sigma Chemical Co
trypan blue	Sigma Chemical Co
Tris-HCl	Sigma Chemical Co
RPMI 1640 medium	Gibco BRL
fetal bovine serum	Gibco BRL
L-glutamine	Gibco BRL
penicillin-streptomycin	Gibco BRL
trypsin-EDTA	Gibco BRL
CaspaLux-L1D2	OncoImmunit, Inc.
CaspaLux-M1D2	OncoImmunit
PhiPhiLux-G1D1	OncoImmunit

3.1.4 細胞培養

人類大腸腺癌(human colon adenocarcinoma)細胞株 LS1034 購自臺灣新竹財團法人食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute)。其培養基為添加 2 mM L-glutamine、10% FBS、100 Units/ml penicillin 與 100 Img/ml streptomycin 之 RPMI 1640 培養基。將細胞置於 75 cm² 細胞培養瓶(tissue culture flasks)中，並於 37°C、5% CO₂、濕度 95% 的培養箱中培養^[63]。

3.1.5 流式細胞儀測定細胞存活率

將 LS1034 細胞株以每 well 2×10^5 cells 種植於 12-well plate 培養 24 小時，隨後分別加入不同濃度(0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 與 2500 $\mu\text{g/ml}$) 之大黃粗萃物與 1%DMSO(溶劑)的對照組，接著將細胞置於 37°C 、5% CO_2 與 95% 空氣的環境下 48 小時。以 phosphate-buffered saline (PBS) 清洗二次，再使懸浮於含 PI (5 $\mu\text{g/ml}$) 之 PBS。接著細胞以 PI exclusion method 和流式細胞儀 (Becton-Dickinson, FACSCalibur, San Jose, CA, USA) 測定存活率^[64]。

3.1.6 流式細胞儀測定細胞週期分布

將 LS1034 細胞株以 2×10^5 cells/well 密度種植於 12-well plate，加入不同濃度(0, 250, 500, 750, 1000, 1500 與 2000 $\mu\text{g/ml}$) 之大黃萃取液後培養 24 小時。隨後細胞以冷的 phosphate-buffered saline (PBS) 清洗、70% ethanol 固定，並於 4°C 靜置隔夜。細胞以 PBS 清洗後加入 RNase A (200 $\mu\text{g/mL}$) 後於 4°C 下靜置 15 分鐘，接著以 PI (20 $\mu\text{g/mL}$) 和 0.1% Triton X-100 染色並遮光 30 分鐘。最後利用 FACScan 流式細胞儀將待測細胞以 sub-G1、G0/G1、S 與 G2/ M 週期狀態來區分^[65]。

3.1.7 彗星試驗與 DAPI 染色

將 LS1034 細胞株以 2×10^5 cells/well 密度種植於 12-well plate，加入不同濃度(0, 500, 750, 1000 與 2000 $\mu\text{g/ml}$) 之大黃萃取液後培養 24 小時。以 4 μM hydrogen peroxide (H_2O_2) 作為對照組(positive control)。接下來待測細胞以 PI 染色進行彗星試驗(Comet assay)，而以 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 進行 DAPI 染色，最後皆以螢光顯微鏡技術(fluorescence microscopy)拍攝^[65]。彗星試驗可用來測定

待測細胞 DNA 之損傷程度，而 DAPI 染色則可做為細胞核濃縮 (nuclear condensation) 與斷裂 (fragmentation) 的依據。

3.1.8 測定流式細胞儀細胞內鈣離子濃度

將 LS1034 細胞株以 2×10^5 cells/well 密度種植於 12-well plate，12 小時後投與 0 或 750 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃萃取液後分別培養不同時間週期。待測細胞 trypsinized 後經離心收集並以 PBS 清洗兩次，分別再懸浮於 500 μl 500 μl Fluo-3/AM (2.5 $\mu\text{g/ml}$) 中以進行細胞內鈣離子濃度之測定，懸浮 30 分鐘後再以細胞流式儀進行分析測定^[66]。

3.1.9 流式細胞儀測定 Caspase-3、caspase-8 與 caspase-9 之活性

將 LS1034 細胞株以 2×10^5 cells/well 之密度種植於 12-well plate 中 24 小時，預先給與 caspase-3, caspase-8 和 caspase-9 之抑制劑後，投與 0 和 750 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃萃取液分別培養 0、24 與 48 小時。收集待測細胞後以 PBS 清洗兩次，接著將待測細胞再懸浮於以 50 μl 、濃度 10 μM 之 PhiPhiLux-G1D1、Caspalux-L1D2 與 Caspalux-M1D2 分別作為 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 之 substrate solution 中，於 37°C 環境下培養 60 分鐘。隨後以 PBS 清洗待測細胞樣品後，再以流式細胞儀分別測定其 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 之活性^[66]。

3.1.10 雷射共軛焦顯微鏡測定 LS1034 細胞株之蛋白質轉運

將 LS1034 細胞株以 2×10^5 cells/well 之密度種植於 4-well 之細胞培養玻片 (Chamber slides) 中，並分別給與 0 或 10 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃萃取液後培養。24 小時後以溶於 PBS 中、濃度 4 % 之甲醛 (Formaldehyde) 固定 15 分鐘，再以溶於 PBS 中、濃度 0.3 % 之 Triton-X 100 滲透 (permeabilized) 1 小時。接著以 2 % 之 BSA 阻斷非特異性結合部位

(non-specific binding sites), 最後給與具有綠色螢光之 AIF、Endo G、cytochrome c 或 GADD153 等初級抗體後靜置隔夜。隔夜後以 PBS 清洗待測細胞兩次, 隨後再給與次級抗體(FITC-conjugated goat anti-mouse IgG)、具紅色螢光之粒線體專一性辨認染劑(Mito Tracker) 以進行 nuclein examination。最後利用 Leica TCS SP2 Confocal Spectral Microscope 對待測細胞檢體進行檢測與顯微攝影(photomicrograph), 以測定 LS1034 細胞株之蛋白質轉運(protein translocation)。

3.1.11 西方墨點法測定 LS1034 細胞株之細胞週期與凋亡相關蛋白質的表現

將 LS1034 細胞株以 5×10^6 cells/well 之密度種植於 6-well plate 中, 給與 750 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃萃取液後分別培養不同之時間(0, 6, 12, 24 與 48 小時)。接著再分別將待測細胞置於含有 40mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM EDTA、120mM NaCl、1 mM dithiothreitol、0.1% Nonide P-40 A 30 μg 之溶解液(lysis buffer)中。將待測細胞檢體之蛋白質置於 10% Tris-glycine-SDS-polyacrylamide 的膠體上進行西方墨點法, 並以電泳點漬法(electro-blotting)將蛋白質轉移至硝化纖維膜(nitrocellulose membrane)上。接著分別給予各種蛋白質之初級抗體, 隨後再給與次級抗體結合以進行增強行化學發光法(enhanced chemiluminescence)(NEN Life Science Products, Inc, Boston, MA, USA)。本測定以 Anti- β -actin 作為 loading control。

3.1.12 統計方法

所有研究皆進行三重複試驗, 試驗結果以平均值 \pm 標準差呈現。統計方式以 Student's t-test 進行統計分析, 統計結果並以 $p < 0.05$ 設為具統計意義。

3.2 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉

3.2.1 試劑

試劑品名與廠商

品名	廠商
Emodin、propidium iodide (PI)	Sigma-Aldrich Corp
Triton X-100、dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Corp
N-acetylcysteine (NAC)和 trypan blue	Sigma-Aldrich Corp
RPMI 1640 medium	Gibco/Life Technologies
fetal bovine serum (FBS)	Gibco/Life Technologies
L-glutamine penicillin-streptomycin	Gibco/Life Technologies
Trypsin-EDTA	Gibco/Life Technologies
Caspase-3 activity assay kits	OncoImmunit, Inc.
Caspase-8 activity assay kits	OncoImmunit, Inc.
Caspase-9 activity assay kits	OncoImmunit, Inc.
Caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-FMK)	R&D systems
caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK)	R&D systems
Caspase-9 antibodies	Cell Signaling Technology
cytochrome c antibodies	Cell Signaling Technology
Bax	Santa Cruz, CA, USA
Bcl-2	Santa Cruz, CA, USA
AIF	Santa Cruz, CA, USA
b-actin	Santa Cruz, CA, USA
complex IV antibodies	Santa Cruz, CA, USA
Secondary antibodies conjugated with HRP	GE Healthcare

3.2.2 細胞培養

人類大腸腺癌細胞株 LS1034 購自臺灣新竹財團法人食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute)。並於 37 °C、潮濕、5% CO₂ 的環境下，將細胞置於 75 cm² 細胞培養瓶(tissue culture flasks)中，以添加 2 mM L-glutamine、10% FBS、100 Units/ml penicillin 與 100 µg/ml streptomycin 之 RPMI 1640 培養基培養。

3.2.3 型態改變

將 LS1034 細胞株以每 well 2*10⁵ cells 種植於 12-well plate 培養 24 小時，隨後分別加入不同濃度(0, 5, 10, 20, 30 和 50 µM)之大黃素與 1% DMSO(溶劑)的對照組，接著將細胞置於 37°C、5% CO₂ 與 95% 空氣的環境下 24 或 48 小時，最後以位相差顯微鏡(phase contrast microscope)於 200 倍視野下觀察細胞並拍攝之。

3.2.4 流式細胞儀測定細胞存活率

將 LS1034 細胞株以 2*10⁵ cells/well 之密度種植於 12-well plate 培養 24 小時，隨後分別加入不同濃度(0, 5, 10, 20, 30 和 50 µM)之大黃素與 1%DMSO(溶劑)的對照組，接著將細胞置於 37 °C、5% CO₂ 與 95% 空氣的環境下 24 或 48 小時。以 phosphate-buffered saline(PBS) 清洗二次，再使懸浮於含 PI(5 µg/ml)之 PBS。接著細胞以 PI exclusion method 和流式細胞儀測(Becton-Dickinson, FACSCalibur, San Jose, CA, USA) 定存活率。另外細胞先以活性氧化清除劑(ROS scavenger)(NAC, 10 mM)處置 2 小時後再給予大黃素 24 小時，接下來再依上述方法收集細胞並測量其存活率。

3.2.5 DNA content 測定與 sub-G1(Apoptosis)測定

每 well 2×10^5 cells LS1034 細胞株種植於 12-well plate 不同濃度(0, 5, 10, 20, 30 和 50 μM)之大黃素培養 24 小時與 48 小時，細胞 trypanized 後離心收集、PBS 清洗、以 70%之乙醇固定，並於 -20°C 下放置隔夜。細胞再懸浮於含 40 $\mu\text{g/ml}$ PBS、0.1 mg/ml RNase A 和 0.1% Triton X-100 之 PBS 中，並於 37°C 的暗房中靜置 30 分鐘後再以流式細胞儀測定分析。cell cycle distribution 與 sub-G1 group(凋亡)的測定方法如同先前所敘述^[67]。

3.2.6 DAPI 染色

每 well 1×10^5 cells LS1034 細胞株種植於 6-well plate，24 小時後分別加入不同濃度(0, 5, 10, 20, 30 和 50 μM)之大黃素培養 24 小時。依不同濃度收取細胞，加 3% Formaldehyde (PBS)於 4°C 冰箱固定 10~15 分鐘，加入 PBS 洗二次，加入 0.1 % Triton X-100 / in 1 ml PBS 15 分鐘，再用 PBS 洗二次，加入 DAPI 染液 (1 $\mu\text{g/ml}$)在 37°C incubator 避光 30 分鐘，再用 PBS 洗三次後再以螢光顯微鏡於 F 200X 倍率下觀察與拍攝。

3.2.7 活性氧物質、粒線體膜電位與鈣離子濃度測定

將 LS1034 細胞株以每 well 2×10^5 cells 種植於 12-well plate 後，加入 0 或 30 μM 大黃素後分別等待不同時間(1, 3, 6, 12 和 24 小時)以測定其 ROS、粒線體膜電位與鈣離子濃度。細胞收集後於 500 μl DCFH-DA (Molecular Probes/Life Technologies, Eugene, OR, USA) (10 μM)再懸浮以測定 ROS，和於 500 μl rhodamine 123 (1 $\mu\text{g/ml}$) (Molecular Probes)以測定粒線體膜電位，以及 500 μl Fluo-3/AM (2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, Molecular Probes)以測定鈣離子濃度。細胞於 37°C 培育 30 分鐘，並以流式細胞儀測定分析。

3.2.8 流式細胞儀與特異性抑制劑測定 Caspase-3 和 Caspase-9 之活性

預先以 caspase-3 抑制劑 Z-DEVD-FMK 和 caspase-9 抑制劑 Z-LEHD-FMK 處理 2 小時後，將處理或未處理過之 LS1034 細胞株以每 well 2×10^5 cells 之密度種植於 12-well plate。投與 30 $\mu\text{g/ml}$ 大黃素後分別等待不同時間(0, 24 和 48 小時)，最後經不同處治之所有待測細胞經 trypsinized 與離心後收集並以 PBS 清洗兩次。接著將待測細胞再懸浮於以 50 μl 、濃度 10 μM 之 PhiPhiLux- G_1D_1 與 CaspaLux9- M_1D_2 分別作為 caspase-3 和 caspase-9 之 substrate solution (OncoImmunitin, Inc.) 中。接著於 37°C 環境下培養 60 分鐘，隨後以 PBS 清洗待測細胞樣品後，再以流式細胞儀分別測定其 caspase-3 和 caspase-9 之活性。

3.2.9 西方墨點法測定 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質之表現

將 LS1034 細胞株以 5×10^5 cells/well 之密度種植於 12-well plate 中，給與 30 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃素後分別培養不同之時間(0, 6, 12, 18 與 24 小時)。隨後待測細胞經 trypsinized 與收集後溶解(lysed)於 PRO-PREP™ protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Gyeonggi-Do, Korea) 中。細胞裂解液(lysates)(40 μg of each) 以 polyacrylamide gel 之 SDS-PAGE 分離，並電轉移(electrotransfer)至 PVDF membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA) 上。分別給予各種蛋白質之初級抗體(1:1000 dilutions in blocking buffer)後於 4°C 環境下靜置隔夜。清洗後給與以 1:20,000 比例稀釋於 blocking buffer 中、標定 horseradish peroxidase (HRP) 之次級抗體，並於室溫中靜置 1 小時。HRP-conjugated goat anti-rabbit 或 anti-mouse IgG (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 作為次級抗體以進行增強行化學發光法(enhanced chemiluminescence) (ECL Kit, Millipore, Billerica, MA, USA)^[67]。細胞質與粒線體之 cytochrome c 的測定方法乃依據製造商的操作手冊(Mitochondria/Cytosol

Fractionation Kit, BioVision, Inc., Mountain View, CA, USA)進行。大黃素影響 LS1034 細胞株體外試驗之蛋白質(Bax, Bcl-2, AIF, caspase-9, cytochrome c, b-actin 和 Complex IV)表現藉由西方墨點法測定^[65]，而每條 band 之 relative abundance 則藉由 NIH ImageJ software 來計算。

3.2.10 RNA 製備與 real-time PCR

將 LS1034 細胞株以 1×10^6 cells/well 之密度種植於 6-well plate 中，給與 30 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃素後分別培養不同之時 24 或 48 小時。培養後待測細胞經 trypsinized、收集，並以 PBS 清洗兩次。使用 Qiagen Neasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA)萃取待測細胞之 total RNA^[65]。使用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 在 42°C 環境下作用 30 分鐘進行反轉錄(reverse transcription)。加入 SYBR Green PCR Master Mix，最後以 Biosystems 7300 Real-Time PCR system 以 C_T method 分析待測檢品^[68]。Primers 的 DNA 序列藉 Primer Express Software 評估並列於下。

Primers

Primer name	Primer sequence
Homo caspase-3-F	CAGTGGAGGCCGACTTCTTG
Homo caspase-3-R	TGGCACAAAGCGACTGGAT
Homo caspase-9-F	TGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTT
Homo caspase-9-R	GTGAGCCCACTGCTCAAAGAT
Homo GAPDH-F	ACACCCACTCCTCCACCTTT
Homo GAPDH-R	TAGCCAAATTCGTTGTCATACC

3.2.11 統計分析

以 Student's t-test 統計分析大黃素與對照組間的差異，並以 $p < 0.05$ 為達統計意義。體內試驗部分藉 Dunnett's test 與 oneway ANOVA 分析各試驗組間之差異，並以 $p < 0.05$ 為達到顯著差異。

3.3 體內抗癌試驗

3.3.1 實驗動物

30 隻年齡為 6~8 週之 BALB/c nu/nu 裸鼠購自國研院動物中心 (National Laboratory Animal Center)。實驗動物飼養於中國醫藥大學實驗動物中心 (Laboratory Animal Center) 內，並遵守中國醫藥大學實驗動物照護及使用委員會 (IACUC) 所制定的指導方針 (Affidavit of Approval of Animal Use Protocol, No. 97-25-N)。

3.3.2 動物造模與試驗

由 BALB/c nu/nu 裸鼠之側腹經皮注射 LS1034 細胞 (6×10^6 cells/mouse)。注射後每隔三天利用 calipers 與公式 $V = L \times W^2/2$ (V 體積、 L 長度、 W 寬度) 測量計算每隻實驗動物之腫瘤大小直到第 39 天，期間當個別實驗動物之腫瘤體積達到約為 200 mm^3 時便開始大黃素治療。實驗動物被隨機區分為三組，每組共 10 隻。第一組實驗動物給與基劑 (1 % DMSO)，第二組給與 5-FU (fluorouracil) (33 mg/kg)，而第三組則給與大黃素 (40 mg/kg)。接種第 39 天時將所有實驗動物以 CO_2 麻醉、犧牲後取出腫瘤並測量其重量^[69] (圖 3.1)。計算相對腫瘤重量 (g) 與抑制率 (%) 時以平均值 \pm 標準差 ($n=10$) 來表示。

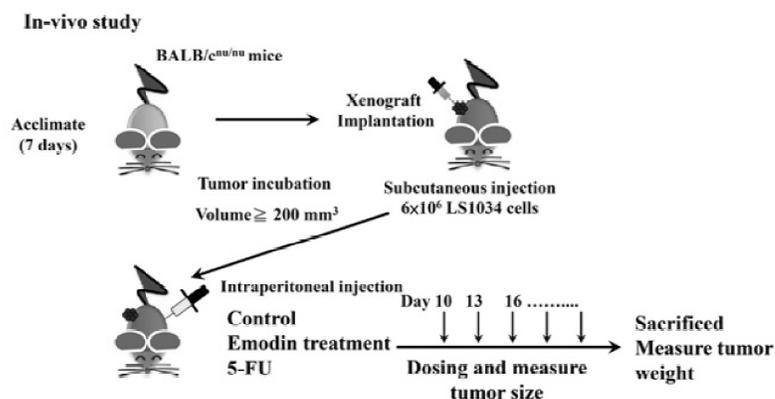


圖 3.1 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖腫瘤作用之流程圖

3.4 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移與侵犯之作用與機轉

3.4.1 試劑

試劑品名與廠商	
品名	廠商
RPMI 1640 medium	Gibco BRL
fetal bovine serum	Gibco BRL
L-glutamine	Gibco BRL
penicillin-streptomycin	Gibco BRL
trypsin-EDTA	Gibco BRL
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Chemical Co.
propidium iodide (PI)	Sigma Chemical Co.
trypan blue	Sigma Chemical Co.
Tris-HCl	Sigma Chemical Co.

3.4.2 傷口癒合試驗

傷口癒合試驗(Wound healing Assay)可用於測量癌細胞的轉移

(migration)能力。將 LS1034 細胞株以 1×10^6 cells/well 之密度種植於 10 cm 培養皿(petri dish)中直到培養細胞形成接合之全面細胞層(confluent)，使用滅菌的 yellow micropipette tip 刮除單細胞層並以 PBS 清洗三次。細胞分別以不同濃度(0, 100 或 250 $\mu\text{g/ml}$)之大黃粗萃物培養 24 或 48 小時，最後以倒立顯微鏡(inverted microscope)拍攝與量測傷口癒合試驗之結果^{[64][70]}。

3.4.3 基底膜基質侵犯能力試驗

基底膜基質侵犯能力試驗(Matrigel invasion assay)利用以 matrigel 塗覆孔徑 8 μm 之穿膜小室(transwell cell culture chambers)進行 matrigel invasion assay。將 LS1034 細胞株分別以不同濃度(0, 100 或 250 $\mu\text{g/ml}$)之大黃粗萃物培養 24 小時後，以棉籤(cotton swab)移除膜上層面未侵犯之細胞，而膜下層面已侵犯之癌細胞則以 H&E 固定、染色與記數。與侵犯試驗相同，但以未塗覆 matrigel 之 transwell cell culture chambers 則可測試癌細胞之轉移(migration)能力^{[70][71]}。

3.4.4 明膠酶譜分析試驗

利用明膠酶譜分析試驗(Gelatin zymography assay)測定 MMP-2 及 MMP-9 之活性。將 LS1034 細胞株以 1×10^6 cells/well 之密度種植於 6-well plate 中，以 serum-free RPMI 1640 medium 培養並分別給與不同濃度(0, 250 或 500 $\mu\text{g/ml}$)之大黃粗萃物培養 24 或 48 小時。培養後分別收集個組之 conditioned medium，共 50 μg 之全蛋白質再藉由含有 0.2% gelatin 之 10% SDS-PAGE 電泳分離。電泳後，將電泳膠浸泡於 2.5% Triton X-100 兩次共 60 分鐘，接著再將其置於 substrate buffer (50 mM Tris HCl, 5 mM CaCl_2 , 0.02% NaN_3 與 1% triton X-100, pH 8.0)中，並於 37°C 下靜置 18 小時。最後與 MMP-2 與 MMP-9 活性相關之電泳帶(bands)利用 0.2% Coomassie blue 進行負染色法(negative staining)顯示^[72]。

3.4.5 西方墨點法測定 LS1034 細胞株轉移與侵犯相關蛋白質之表現

將 LS1034 細胞株以 5×10^5 cells/well 之密度種植於 12-well plate 中，給與 250 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃粗萃物後分別培養不同之時間(0, 6, 12, 24 與 48 小時)。收集各組細胞後以含有 40 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM EDTA、120 mM NaCl、1mM dithiothreitol 與 0.1% Nonide P-40 之裂解緩衝液溶解。以 10% sodium dodecyl sulphate (SDS)/polyacrylamide 電泳膠電泳 30 μg 之全蛋白質以進行西方墨點法，並續將分離之蛋白質電轉移至硝化纖維膜(nitrocellulose membrane)之上。給予各種蛋白質之初級抗體 24 小時後清洗，接著再給予次級抗體以進行化學發光法 (enhanced chemiluminescence)(NEN Life Science Products, Inc, Boston, MA, USA)。試驗以 Anti- β -actin 作為 loading control^[73]。

3.4.6 統計分析

三次獨立、重複試驗所獲得的結果以平均值 \pm 標準差所呈現。大黃粗萃物與對照組之差異以 student's t-test 進行統計，並以 $p < 0.05$ 為具統計差異。

第四章 結果

4.1 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉

4.1.1 大黃粗萃物含大黃素之測定

高效液相層析儀(HPLC)可將混合物中的成分分離，並與標準品比較以進行待測成分之定性及定量分析。

生藥材置去離子水，經震搖、抽氣過濾、靜置 24 小時後收集萃液。過濾後藥材經上述方法再收集萃液，合併兩次濾液並經減壓濃縮至乾為本次實驗製備之大黃檢品。經由 HPLC 對大黃素標準品(圖 4.1)與大黃檢品(圖 4.2)的測定，並利用 3.1.2.2 描述之公式計算可計算出本次研究製備之大黃粗萃物中大黃素之平均含量約 0.77 mg/g。

4.1.2 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株存活率之影響

觀察細胞存活率，可得知大黃粗萃物對 LS1034 細胞株是否具有存活抑制的作用。利用死亡細胞細胞膜之不完整性，以及 Propidium iodide (PI)可通過受損細胞膜與 DNA 結合的特點，便可使用雷射光激發 PI 產生螢光再藉由流式細胞儀偵測出待測細胞的存活率。

因此將 LS1034 細胞株分別投以不同濃度(0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 和 2500 $\mu\text{g/ml}$)之大黃粗萃物，經 48 小時培養後再以 PI exclusion method 和流式細胞儀測定待測細胞之存活率。

研究結果指出，大黃粗萃物可以濃度依賴關係造成 LS1034 細胞株死亡(圖 4.3)，並於濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上皆達統計意義，其 IC_{50} 約為 750 $\mu\text{g/ml}$ 。

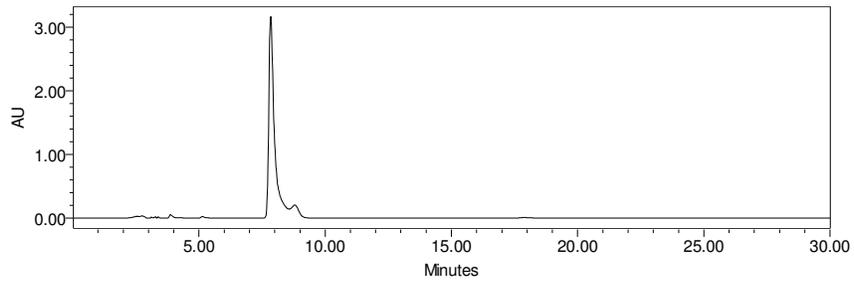
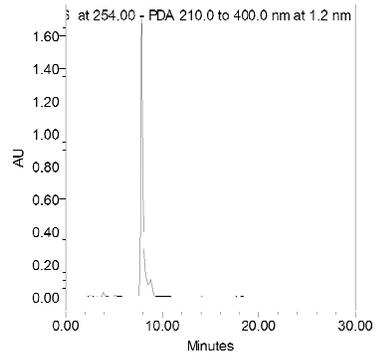


圖 4.1 大黃素標準品的 HPLC 測定。

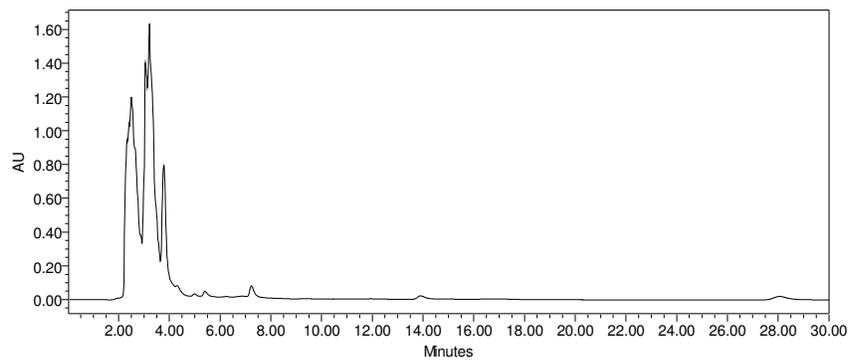
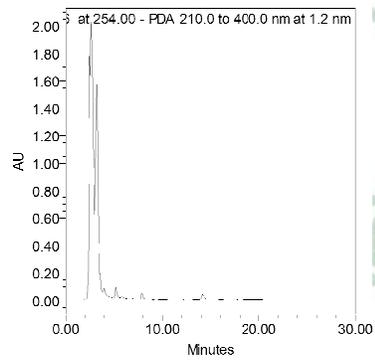


圖 4.2 大黃檢品的 HPLC 測定。

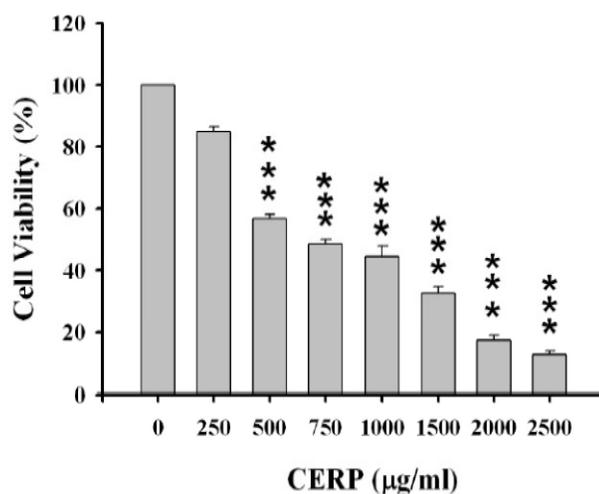


圖 4.3 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株存活率之影響。將 LS1034 細胞株分別投以不同濃度(0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 和 2500 µg/ml)之大黃粗萃物，培養 48 小時後以流式細胞儀測定各組之細胞存活率。大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

4.1.3 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響

不同細胞週期有不同的 DNA 含量，因此利用 PI 可與 DNA 結合的特點，使用流式細胞儀偵測結合至 DNA 的 PI 染劑螢光強度，便可測得待測細胞之 DNA 含量，並藉此得知待測細胞於不同細胞週期之分布狀況。

為了解大黃粗萃物對於細胞株細胞週期之影響，將 LS1034 細胞株分別投以不同濃度(0, 250, 500, 750, 1000, 1500 和 2000 µg/ml)之大黃粗萃物培養 24 小時後，再利用 FACScan 流式細胞儀與計算軟體將待測細胞以 sub-G1、G0/G1、S 與 G2/ M 週期狀態來區分。

經由各細胞週期比例之結果指出，G1 期細胞數隨大黃粗萃物濃度增加而增加，因此大黃粗萃物可誘導 LS1034 細胞株於 G0/G1 期休止(圖 4.4)。且代表凋亡細胞之 sub-G1 期細胞數亦隨大黃粗萃物濃度增加而增加，則指出大黃粗萃物可誘導 LS1034 細胞株之凋亡(圖 4.5)。

另將 LS1034 細胞株投以濃度 750 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃粗萃物後分別培養不同時間(0, 6, 12, 24, 48, 和 72 小時)，接著再利用流式細胞儀與計算軟體將待測細胞以不同細胞週期來區分與量化。研究結果經由各細胞週期比例顯示可看出，細胞休止週期的差異與投予大黃粗萃物產生時間依賴的關係並不明顯(圖 4.6)，但凋亡細胞(sub- G_1 期)數量仍隨投予大黃粗萃物的時間變長而增加(圖 4.7)。

4.1.4 彗星試驗評估大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 DNA 損傷之影響

DNA 損傷是細胞凋亡的特徵之一，利用電泳與染色，觀察 DNA 片段被拉扯之彗星試驗(Comet assay)可用來測定待測細胞之 DNA 損傷，而損傷程度愈嚴重、片段分子量越小則彗星的尾巴會被拉得愈長。

將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 500, 750, 1000 與 2000 $\mu\text{g/ml}$)之大黃萃取液後培養 24 小時，經收集、破壞雙層磷脂與電泳後，以 PI 染色並以螢光顯微鏡拍攝進行彗星試驗。

以螢光顯微鏡拍攝之研究結果顯示，大黃粗萃物濃度愈高則彗星尾巴便愈長(圖 4.8)，因此大黃粗萃物可以劑量依賴(dose-response manner)關係造成 LS1034 細胞株之 DNA 損傷，經量化與統計後其彗星長度於 750 $\mu\text{g/ml}$ 開始達統計之意義(圖 4.9)。

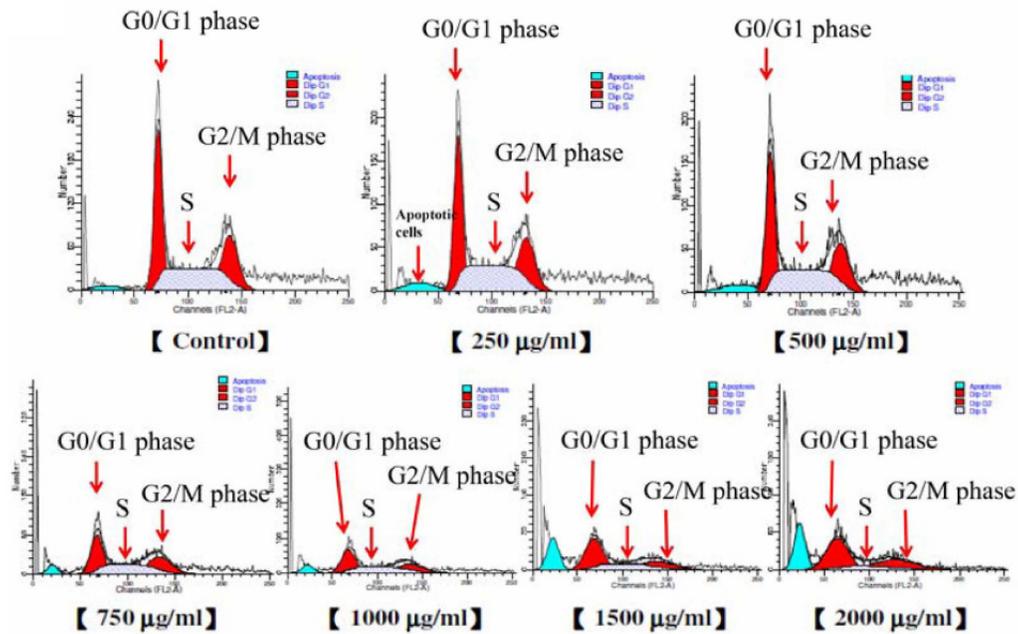


圖 4.4 不同濃度大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響。將 LS1034 細胞株分別投以不同濃度(0, 250, 500, 750, 1000, 1500 和 2000 $\mu\text{g/ml}$)之大黃粗萃物培養 24 小時後，再利用流式細胞儀與計算軟體將待測細胞以不同細胞週期來區分。

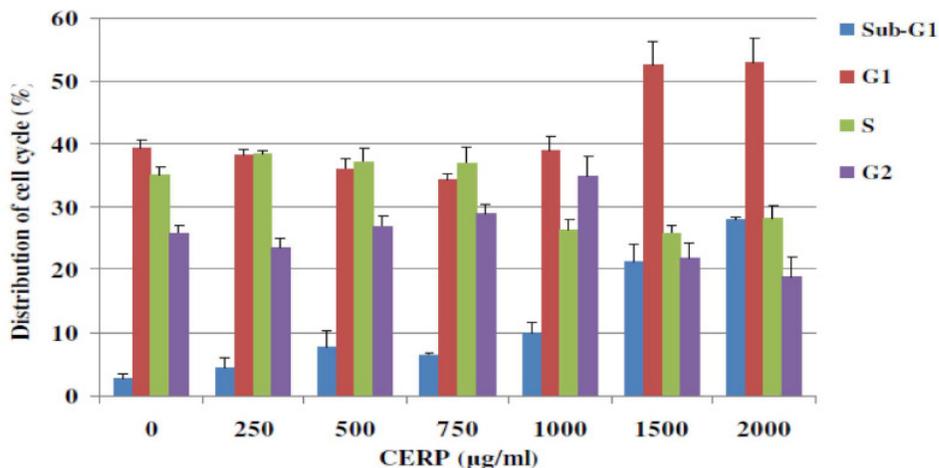


圖 4.5 量化不同濃度大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響。將不同濃度培養之各組細胞以不同細胞週期之比例量化呈現，大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

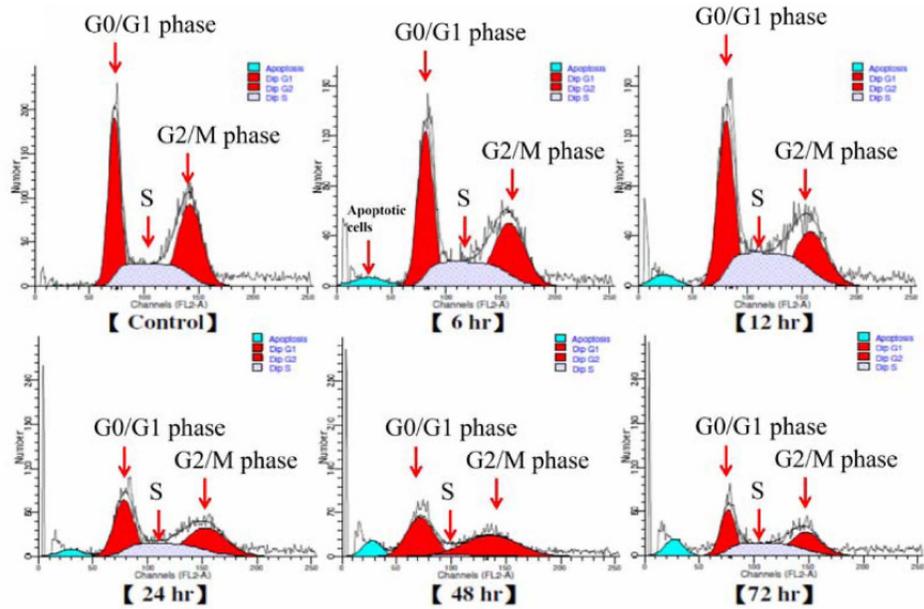


圖 4.6 不同培養時間大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響。將 LS1034 細胞株投以濃度 750 µg/ml 之大黃粗萃物後分別培養不同時間(0, 6, 12, 24, 48, 和 72 小時)，再利用流式細胞儀與計算軟體將待測細胞以不同細胞週期來區分。

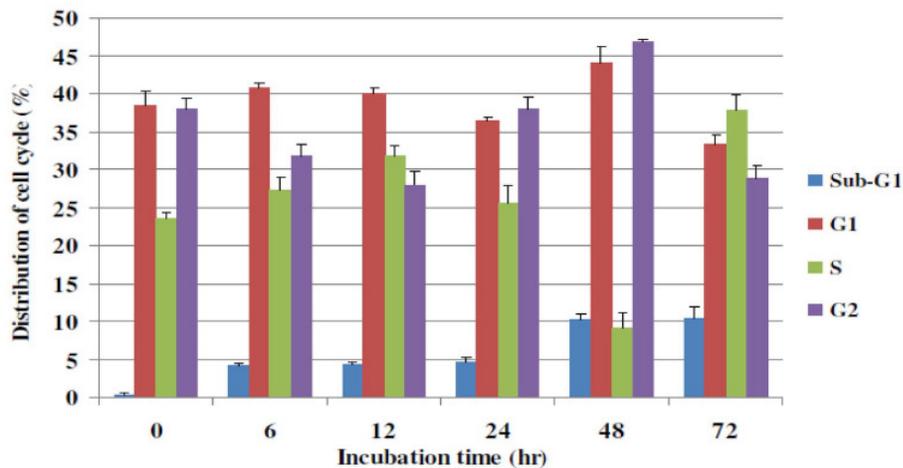


圖 4.7 量化不同培養時間大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期之影響。將培養不同時間點之各組細胞以不同細胞週期之比例量化呈現。大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

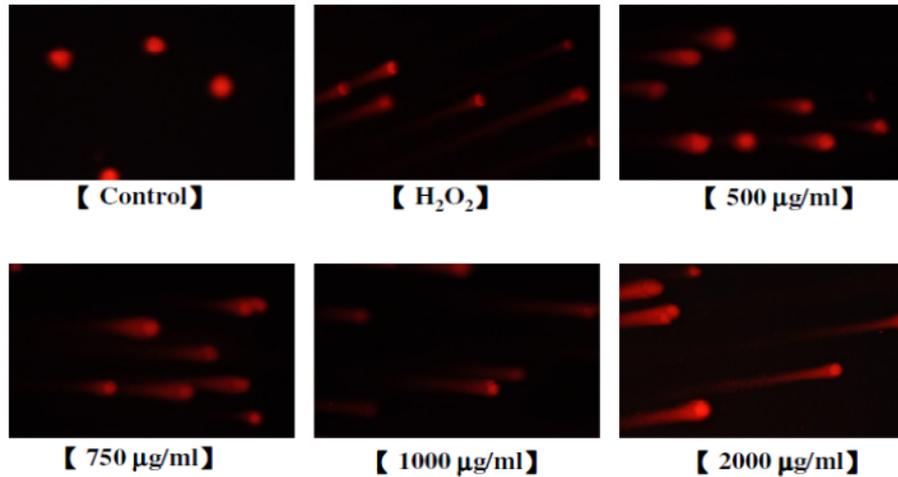


圖 4.8 彗星試驗觀察大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 500, 750, 1000 與 2000 $\mu\text{g/ml}$)之大黃萃取液後培養 24 小時後進行彗星試驗以觀察 DNA 損傷之結果。

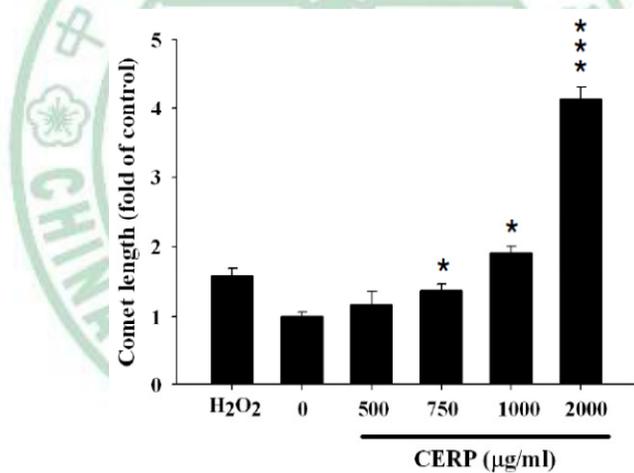


圖 4.9 量化彗星試驗量化大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 500, 750, 1000 與 2000 $\mu\text{g/ml}$)之大黃萃取液後培養 24 小時後，量化彗星長度後比較各組間 DNA 損傷之差異。大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

4.1.5 DAPI 染色評估大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 DNA 損傷之影響

由於細胞凋亡時會導致 DNA 之斷裂，因此利用螢光染料 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)可結合至 DNA minor groove AT

鍵結之特性，便可利用螢光顯微鏡觀察出凋亡細胞染色質凝結與 DNA 斷裂的程度。而待測細胞損傷程度愈嚴重，被螢光染劑結合而顯示的螢光強度便愈強。

將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 500, 750, 1000 與 2000 $\mu\text{g/ml}$)之大黃粗萃物後培養 24 小時，經收集、染色後，以螢光顯微鏡拍攝進行 DAPI 染色試驗(圖 4.10)。

由於隨著大黃粗萃物劑量愈高而量化後 LS1034 細胞株的螢光強度便愈強，因此研究結果支持大黃粗萃物可以劑量依賴關係導致 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之 DNA 損傷，而其平均螢光強度於 250 $\mu\text{g/ml}$ 開始即達統計之意義(圖 4.11)。

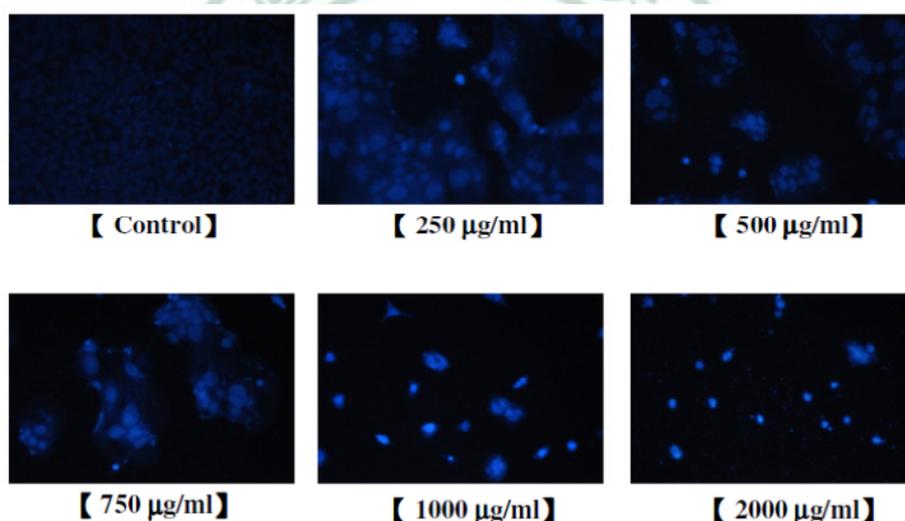


圖 4.10 DAPI 染色觀察大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 500, 750, 1000 與 2000 $\mu\text{g/ml}$)之大黃萃取液後培養 24 小時後進行 DAPI 染色以觀察 DNA 損傷之結果。

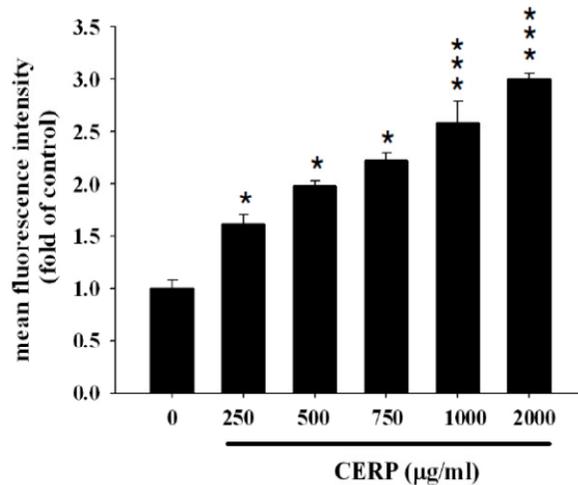


圖 4.11 量化 DAPI 染色量化大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 500, 750, 1000 與 2000 µg/ml)之大黃萃取液後培養 24 小時後，量化 DAPI 染色螢光強度後比較各組間 DNA 損傷之差異。大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

4.1.6 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響

研究指出，內質網壓力可能導致 Ca^{2+} 由內質網釋出或細胞外 Ca^{2+} 大量進入細胞中可影響凋亡訊息傳導、粒線體雙層膜、AIF 形成與釋出等進而誘導癌細胞凋亡。

將 LS1034 細胞株以 750 µg/ml 之大黃粗萃物處理後，再利用鈣離子指示劑 Fluo-3/AM 與流式細胞儀，測量細胞株在不同時間點(0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 與 6.0 小時)的鈣離子濃度變化。

研究結果顯示，大黃粗萃物可以時間依賴(time-dependent)方式增加 LS1034 細胞株之鈣離子濃度(圖 4.12)，並於 2 小時後達到統計意義。因此大黃粗萃物造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株凋亡可能與增加細胞株之鈣離子濃度有關。

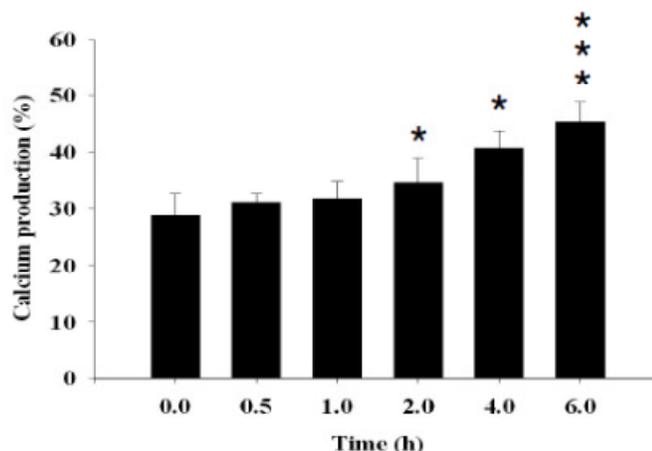


圖 4.12 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響。將 LS1034 細胞株投以濃度 750 µg/ml 之大黃粗萃物後，利用鈣離子指示劑與流式細胞儀測量細胞株在不同時間點(0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 與 6.0 小時)之細胞內鈣離子濃度變化。圖表以平均值±標準差呈現(n=3)，大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 p<0.05。

4.1.7 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質轉運之影響

研究指出，因外膜形成孔洞而由粒線體雙層隙膜中釋出之 cytochrome c 會參與凋亡小體的形成，繼而造成一連串 caspase 的活化並促使細胞邁向死亡。而 AIF 與 Endo G 等則經非 caspase 依賴路徑造成細胞死亡。另外內質網壓力則可藉由 GADD153 (CHOP) 之活化導致促凋亡蛋白表現增加、抗凋亡蛋白質表現降低而誘導細胞凋亡。

為了瞭解 AIF、Endo G (endonuclease G)、cytochrome c 與 GADD153 等蛋白在大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株凋亡作用中的影響，利用雷射共軛焦顯微鏡測定經大黃粗萃物孵育 24 小時後，並經初級抗體、二級抗體染色之 LS1034 細胞株，以觀察上述蛋白質在 LS1034 細胞株中的轉位作用。

研究結果發現，與對照組相較，大黃粗萃物應可促進 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之 AIF 在細胞質與細胞核內的濃度增加(圖

4.13(A))。大黃粗萃物似可使得 LS1034 細胞株之 Endo G 在細胞質的濃度減少(圖 4.13(B))。另外大黃粗萃物可促進 LS1034 細胞株之 GADD153 在細胞質中增加(圖 4.13(C))。最後，大黃粗萃物則可導致 LS1034 細胞株之 cytochrome c 在細胞質與粒線體內的濃度皆增加(圖 4.13(D))。

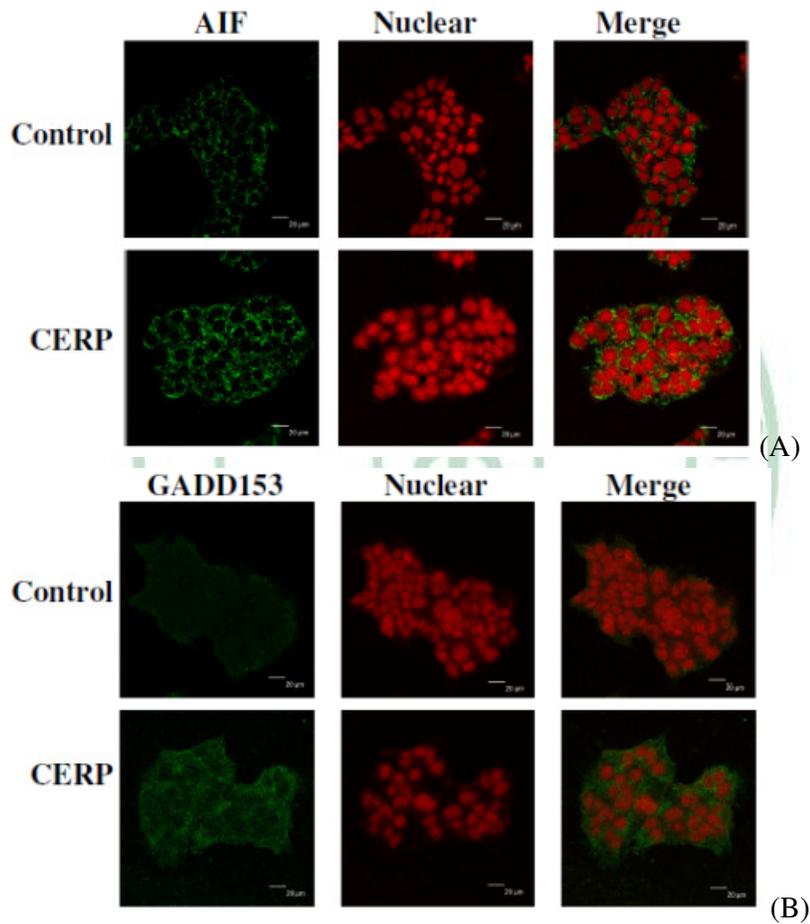


圖 4.13 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質轉運之影響。利用雷射共軛焦顯微鏡與染色法測定經大黃粗萃物孵育 24 小時後(A) AIF、(B) Endo G、(C) GADD153 與(D) cytochrome c 蛋白質在 LS1034 細胞株中的轉位作用。Scale Bar=40 μm 。

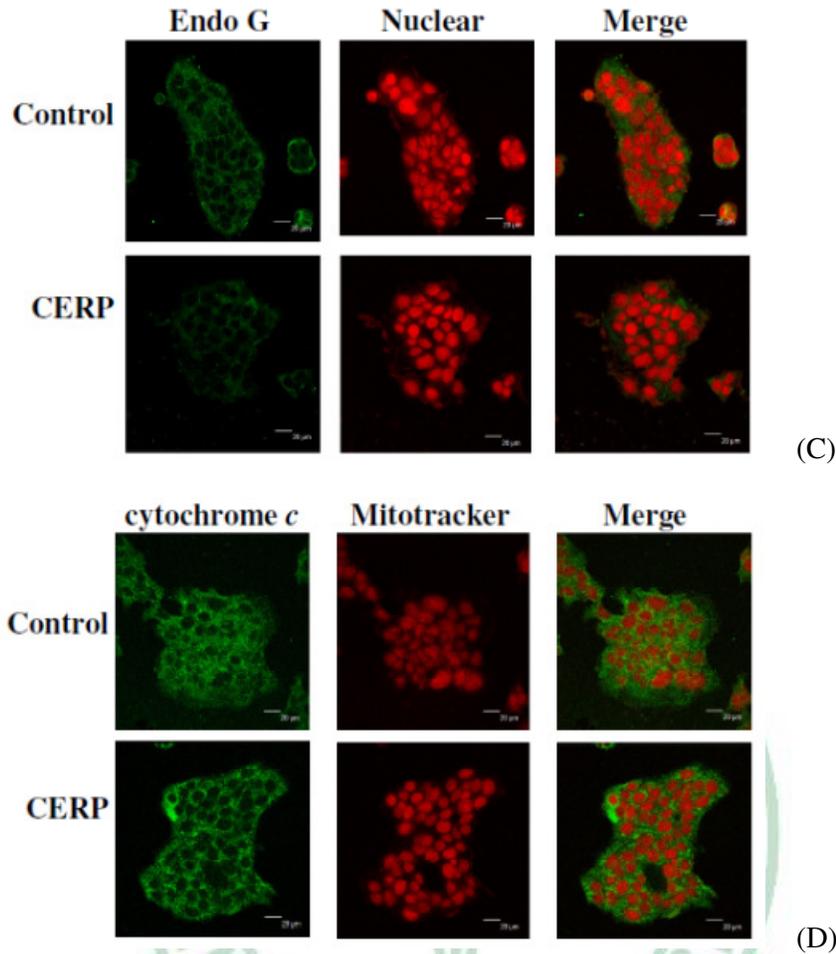


圖 4.13 (續)

4.1.8 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 caspase-3、caspase-8 與 caspase-9 活性之影響

Caspase 為扮演調節細胞凋亡的重要角色，其中 caspase-8 為活化死亡受體媒介之凋亡路徑的關鍵，caspase-9 為壓力及基因毒性藥物等內在路徑造成的細胞凋亡之關鍵，而 caspase-3 則為凋亡過程中 DNA 及核碎裂過程之關鍵分子。

為了瞭解大黃粗萃物對於 LS1034 細胞株 caspase-3、-8 與 -9 活性之影響，PhiPhiLux-G1D1、Caspalux-L1D2 與 Caspalux-M1D2 為具有螢光物質的胺基酸序列，可分別被 caspase-3、-8 和 -9 所分解而釋出螢光物質，再藉由流式細胞儀偵測並計算出其蛋白質活性。另

外 Z-DEVD-FMK、Z-IETD-FMK 與 Z-LEHD-FMK 分別為 caspase-3、-8 和 -9 之特異性抑制劑，Z-VAD-FMK 則為泛 caspase 抑制劑，給與大黃粗萃物與 caspase 抑制劑並偵測其細胞存活率亦有助於探討大黃粗萃物誘導 LS1034 細胞株凋亡之可能路徑。

研究結果指出，不管是 24 或 48 小時，大黃粗萃物皆可刺激 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株 caspase-3 (圖 4.14(A))、caspase-8 (圖 4.14(B)) 與 caspase-9 (圖 4.14(C)) 之活性，並且達統計之意義。

另外分別投與 caspase-3 (圖 4.15(A))、caspase-8 (圖 4.15(B))、caspase-9 (圖 4.15(C)) 與 pan-caspase inhibitor (圖 4.15(D)) 之抑制劑則皆可以顯著增加 LS1034 細胞株的存活率、降低大黃粗萃物對細胞株的抑制作用。因此說明大黃粗萃物誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株細胞凋亡之作用可能與其促進 caspase-3、caspase-8 與 caspase-9 之活性有關。

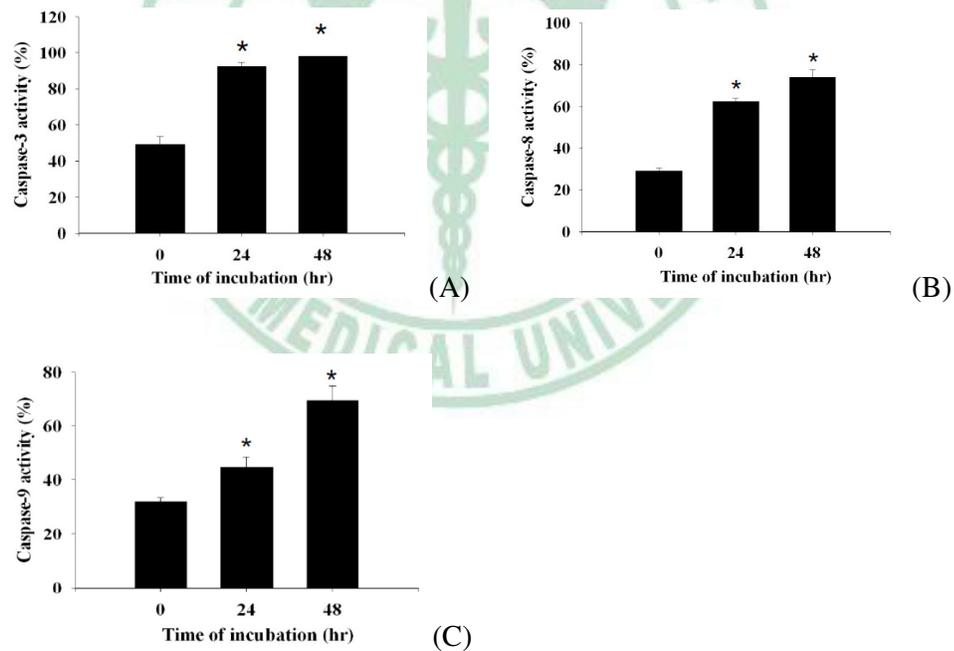


圖 4.14 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株 caspase-3、-8 與 -9 活性之影響。將 LS1034 細胞株給以濃度 750 µg/ml 之大黃粗萃物後分別孵育不同時間點(0, 24 與 48 小時)，進行個別染色(A) caspase-3、(B) caspase-8 與(C) caspase-9 後以流式細胞儀偵測並計算出其活性。結果以平均值±標準差呈現(n=3)，大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 p<0.05。

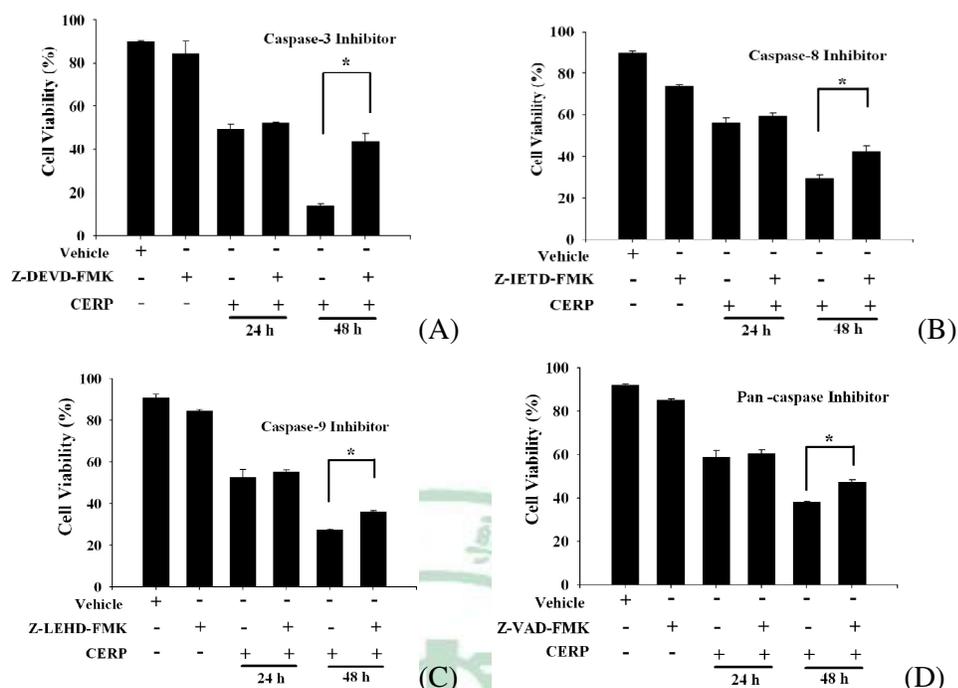


圖 4.15 Caspase-3、-8 與-9 抑制劑對大黃粗萃物抑制 LS1034 細胞株存活率之影響。在 LS1034 細胞株給予濃度 750 $\mu\text{g/ml}$ 大黃粗萃物之前分別預先處以(A) caspase-3、(B) caspase -8 (C) caspase -9 之特異性抑制劑和(D)泛 caspase 型抑制劑，孵育 24 小時後再以流式細胞儀偵測各組細胞存活率之改變。結果以平均值 \pm 標準差呈現(n=3)，實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

4.1.9 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期與凋亡相關蛋白質表現之影響

真核細胞的細胞週期可分為合成 RNA 與蛋白質的 G1 期、準備 DNA 合成與染色體複製的 S 期、G2 期以及有絲分裂的 M 期，而當中又需藉由細胞週期蛋白(cyclins)與細胞週期蛋白依賴性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)形成的複合體促進細胞週期的進行。實際上細胞週期的調控機制相當複雜，不僅調控蛋白如 cyclin A、cyclin B、cyclin D、cyclin E 與 CDK1、CDK2、CDK4 及 CDK6 等都有參與脊椎動物細胞週期之調控^[74]。其它如 P53 及 P27、P21 等細胞週期激酶抑制分子(Cdk inhibitors, CDKIs)分子的表現增加亦與

細胞週期之休止有關^[75]，而 DNA 損傷或 DNA 複製不完全則可經由 Wee1 的活化以及 cdc25 的去活化等協調以抑制 cdc2/cyclin B 複合物活化而防止細胞週期的進行^[76]等。

前述研究結果指出大黃粗萃物可導致 LS1034 細胞株產生 G0/G1 週期休止(參考 4.3.1)，為了進一步瞭解大黃粗萃物對 LS1034 細胞株與細胞週期和細胞凋亡相關蛋白質表現之影響，給與 750 $\mu\text{g/ml}$ 大黃粗萃物分別培養不同時間(0, 6, 12, 24 與 48 小時)後，以西方墨點法測定 LS1034 細胞株相關蛋白質之表現。

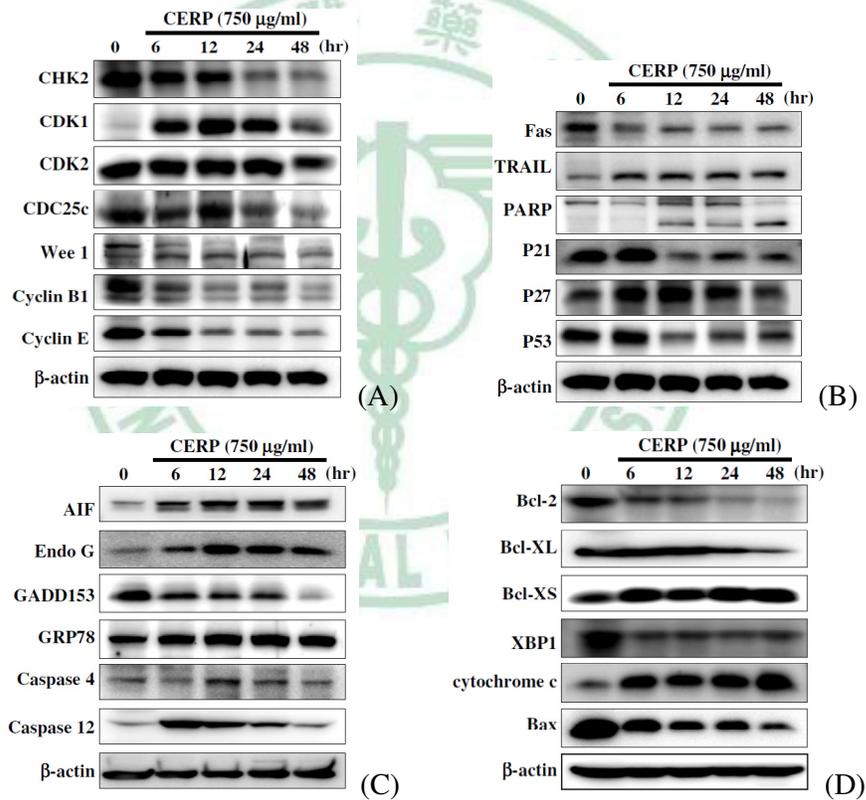


圖 4.16 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株細胞週期與凋亡相關蛋白質表現之影響。將 LS1034 細胞株給以濃度 750 $\mu\text{g/ml}$ 之大黃粗萃物後分別孵育不同時間點(0, 6, 12, 24 與 48 小時)，隨後以西方墨點法進行蛋白質表現之分析。

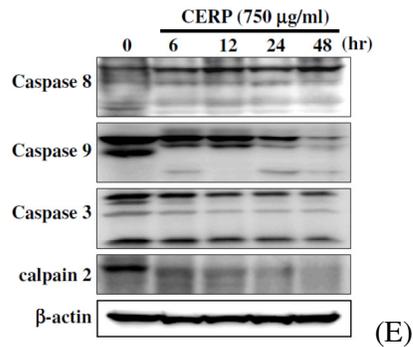


圖 4.16 (續)

研究結果發現，大黃粗萃物可促進 P53、P27、P21 和 Wee1 之表現(圖 4.16(B))，而抑制 CDK1、CDK2、cyclin B1、cyclin E 與 Cdc25c 之表現(圖 4.16(A))。這些證據支持大黃粗萃物可經由影響細胞週期檢查點酵素(check point enzymes)而造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株產生 G0/G1 期細胞週期休止。

另外 Bcl-X_S 是位於粒線體上的 Bcl-2 家族蛋白質，其可經由 Bak、ctochrome c 等促進細胞進行凋亡^[77]。研究結果顯示，大黃粗萃物可增加 Bcl-X_S 促凋亡蛋白質之表現，抑制 Bcl-2 與 Bcl-X_L 抗凋亡蛋白質之表現以及減少 Bcl-2/Bax 之比例(圖 4.16(D))。結果亦顯示大黃粗萃物可促進 LS1034 細胞株 caspase-8、caspase-9、caspase-3(圖 4.16 (E))、GRP78、caspase-4、caspase -12、AIF、Endo G (圖 4.16(C))、cytochrome c (圖 4.16(D))與 PARP cleavage (圖 4.16(B))等的表現。這些證據支持大黃粗萃物可能經由包含粒線體之內在路徑誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株進行細胞凋亡。

4.2 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 體外試驗之作用與機轉

4.2.1 大黃素對 LS1034 細胞株型態學與存活率之影響

利用位相差顯微鏡於 200 倍視野下觀察發現，隨著大黃素濃度的增加，可發現 LS1034 細胞株細胞型態改變之數量增加，其型態改變包括細胞質濃縮(cytoplasmic shrinkage)與細胞膜突起(membrane blebbing)等細胞凋亡之特徵(圖 4.17)。

另利用流式細胞儀測定細胞存活率發現，隨著大黃素濃度的增加，可分別導致大黃素培養 24 小時、48 小時組之 LS1034 大腸癌細胞株細胞存活率減少(圖 4.18)，呈現濃度依賴關係，並皆達顯著差異。在培養 48 小時組顯示，50 μM 濃度大黃素則可顯著地減少 LS1034 大腸癌細胞株數量約 60%。而 IC_{50} 大約發生於 30 μM (圖 4.18)。

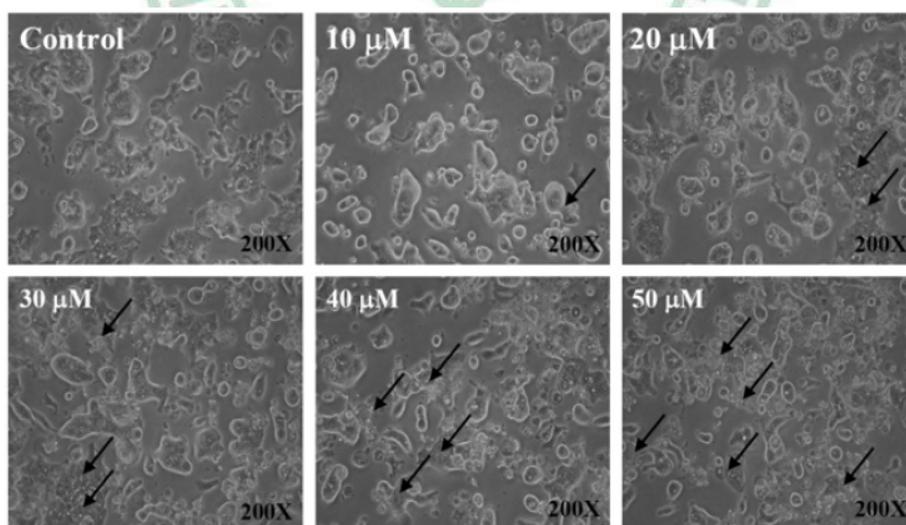


圖 4.17 大黃素對 LS1034 細胞株型態學之影響。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 $\mu\text{g/ml}$)之大黃素後培養 24 小時後，以位相差顯微鏡於 200 倍視野下觀察並拍攝 LS1034 細胞株數量及型態學之改變。

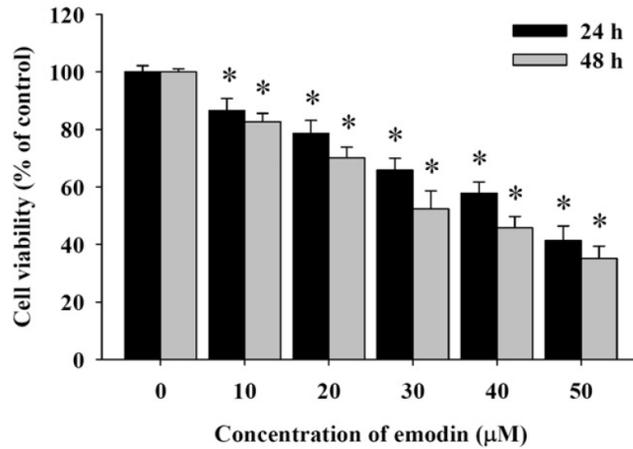


圖 4.18 大黃素對 LS1034 細胞株存活率之影響。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 µg/ml)之大黃素後培養 24 與 48 小時後，以流式細胞儀測定各組之細胞存活率。結果以平均值±標準差呈現，大黃素實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

4.2.2 大黃素對 LS1034 細胞株細胞週期與凋亡之影響

為了解大黃素對於 LS1034 細胞株細胞週期與凋亡之影響，經由流式細胞儀測定去氧核糖核酸含量顯示，分別加入不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 µM)之大黃素，經過 24 小時後呈現出濃度依賴方式增加 G0/G1 細胞之比例(圖 4.19)，說明大黃素可誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株產生 G0/G1 細胞週期休止。

此外，不管 24 或 48 小時組，代表凋亡細胞之 sub-G1 group 的比例亦隨大黃素濃度增加而增加並皆達顯著之差異(圖 4.20)。說明大黃素可誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株細胞凋亡。而 sub-G1 group 即凋亡細胞的變化亦顯示於 DNA 含量圖中(圖 4.21)。

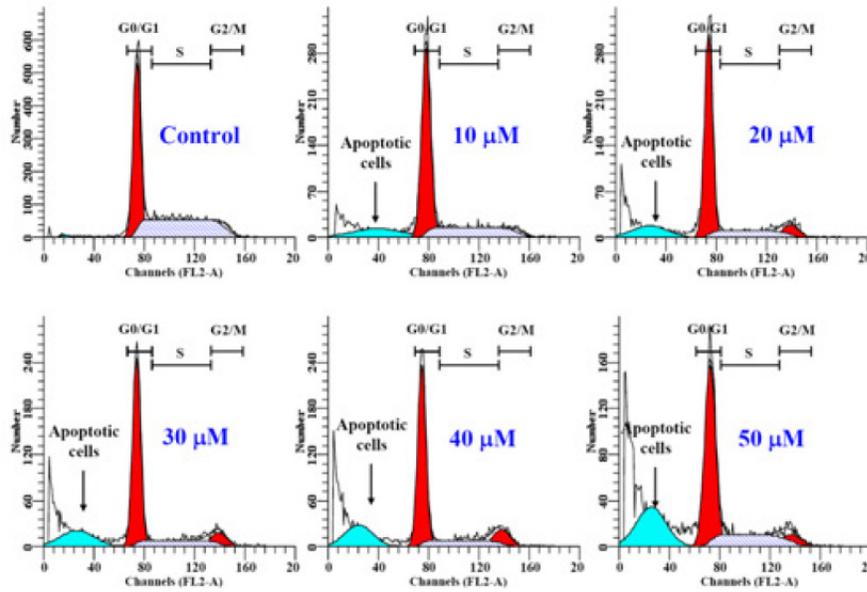


圖 4.19 不同濃度大黃素對 LS1034 細胞株細胞週期之影響。將 LS1034 細胞株分別投以不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 μM)之大黃素培養 24 小時後，再利用流式細胞儀與計算軟體將待測細胞以不同細胞週期來區分。

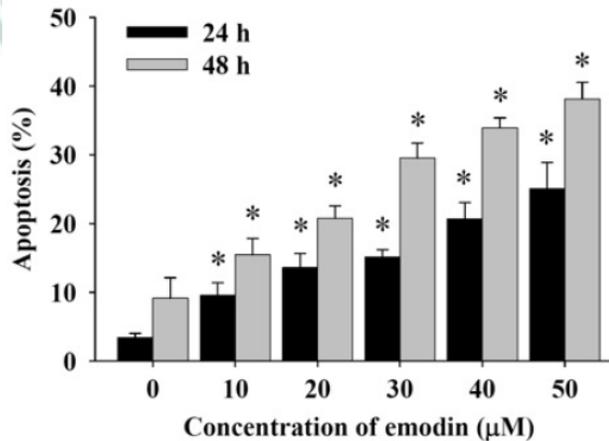


圖 4.20 不同濃度大黃素對 LS1034 細胞株細胞凋亡之影響。將 LS1034 細胞株分別投以不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 μM)之大黃素培養 24 與 48 小時後，利用流式細胞儀偵測凋亡細胞(sub-G1 期)之數目。大黃素實驗組與對照組間之統計以*代表 $p < 0.05$ 。

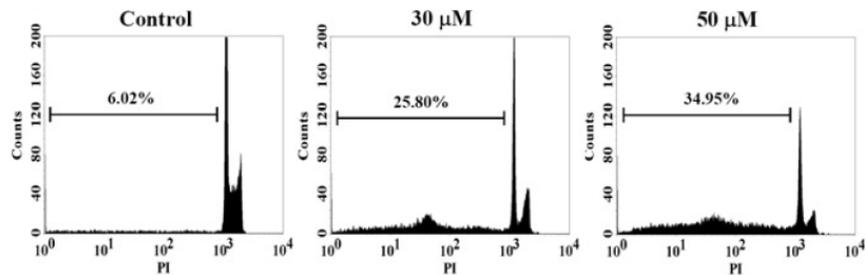


圖 4.21 不同濃度大黃素對 LS1034 細胞株細胞 DNA 含量變化之影響。將 LS1034 細胞株分別投以不同濃度(0, 30 與 50 μM)之大黃素培養與 48 小時後，利用流式細胞儀偵測凋亡細胞之 DNA 含量變化。

4.2.3 DAPI 染色評估大黃素對 LS1034 細胞株 DNA 損傷之影響

為評估大黃素對 LS1034 細胞株 DNA 損傷之影響，經由 DAPI 染色顯示，經過 24 小時後，在不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 μM)大黃素的處理下，隨著大黃素濃度愈高，被染色的細胞核螢光強度增強、細胞核數量則減少(圖 4.22)。

經量化後的數值亦呈現劑量依賴關係，且於大黃素濃度 20 μM 後皆達統計上之顯著差異(圖 4.23)。DAPI 染色的研究結果顯示，大黃素可以造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之 DNA 損傷，且隨著大黃素濃度愈高，LS1034 細胞株 DNA 受損之程度也愈嚴重。

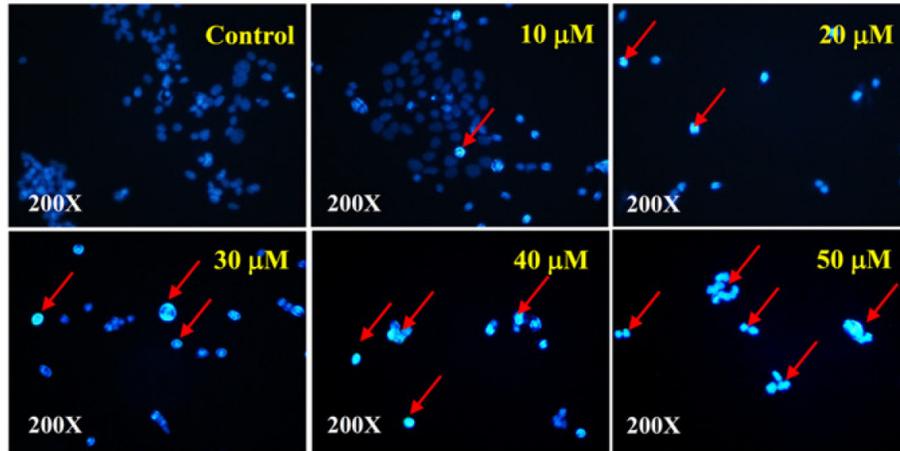


圖 4.22 DAPI 染色觀察大黃素誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 μM)之大黃素後培養 24 小時後進行 DAPI 染色以觀察 DNA 損傷之結果。

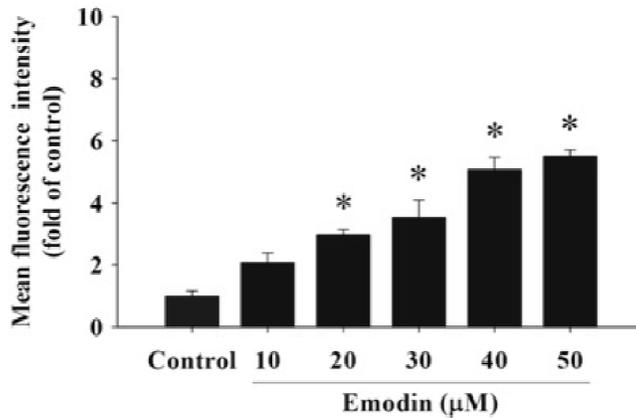


圖 4.23 量化 DAPI 染色大黃素誘導 LS1034 細胞株之 DNA 損傷。將 LS1034 細胞株以不同濃度(0, 10, 20, 30, 40 與 50 μM)之大黃素後培養 24 小時後，量化 DAPI 染色螢光強度後比較各組間 DNA 損傷之差異。結果以平均值 \pm 標準差呈現，大黃素實驗組與對照組間之統計以*代表 $p < 0.05$ 。

4.2.4 大黃素對 LS1034 細胞株活性氧物質之影響

胞內活性氧物質與誘導細胞凋亡有關，為了解大黃素對 LS1034 細胞株活性氧物質之影響，利用探針 H₂DCF-DA 可通過細胞膜且具有特異性，可藉以評估細胞內活性氧物質之多寡。研究結果顯示，投與 30 μM 大黃素 1 小時後即可顯著地誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株產生活性氧物質，並於 24 小時內皆達顯著差異(圖 4.24)。

4.2.5 大黃素對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響

鈣離子濃度升高與細胞內質網壓力有關，亦為誘導細胞凋亡的重要過程。為了解大黃素對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響，Fluo-3/AM 是一種可以穿透細胞膜的螢光染料，可作為細胞內鈣離子濃度檢測之螢光探針。研究結果顯示，投與 30 μM 大黃素 1 小時後即可顯著地提高 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之鈣離子濃度，並於 24 小時內皆達顯著差異(圖 4.25)。

4.2.6 大黃素對 LS1034 細胞株粒線體膜電位之影響

粒線體膜電位降低與粒線體膜通透性有關，而增加粒線體膜通透性即與凋亡分子之釋放有關。為了解大黃素所誘導之細胞凋亡是否與 LS1034 細胞株粒線體膜電位有關，rhodamine 123 在細胞內外的分布可反應出細胞膜內外的電位差，利用流式細胞儀偵測其螢光強度的改變就可顯示粒線體膜電位改變的情形^[78]。研究結果顯示，投與 30 μM 大黃素 3 小時後即可顯著地降低 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之粒線體膜電位，並於 24 小時內皆達顯著差異(圖 4.26)。

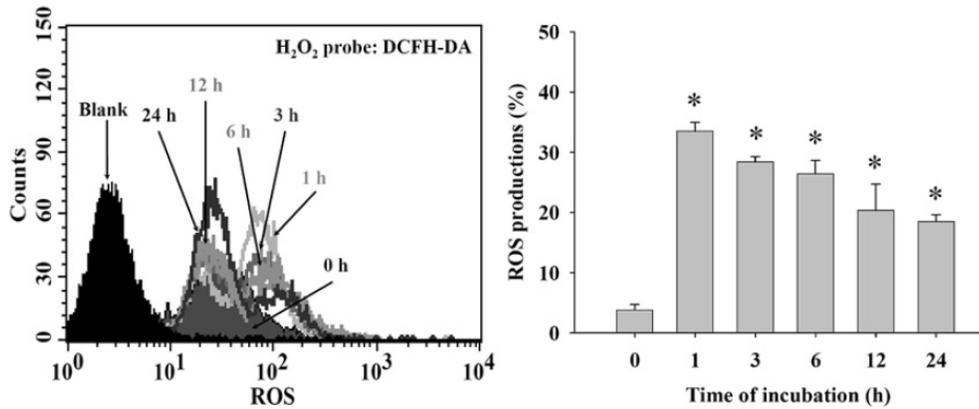


圖 4.24 大黃素對 LS1034 細胞株活性氧物質之影響。將 LS1034 細胞株以濃度 30 μM 之大黃素後培養不同時間點(1, 3, 6, 12 與 24 小時)後，以 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 染色並以流式細胞儀進行活性氧物質的偵測。結果以平均值 \pm 標準差呈現，大黃素實驗組與對照組間之統計以*代表 $p < 0.05$ 。

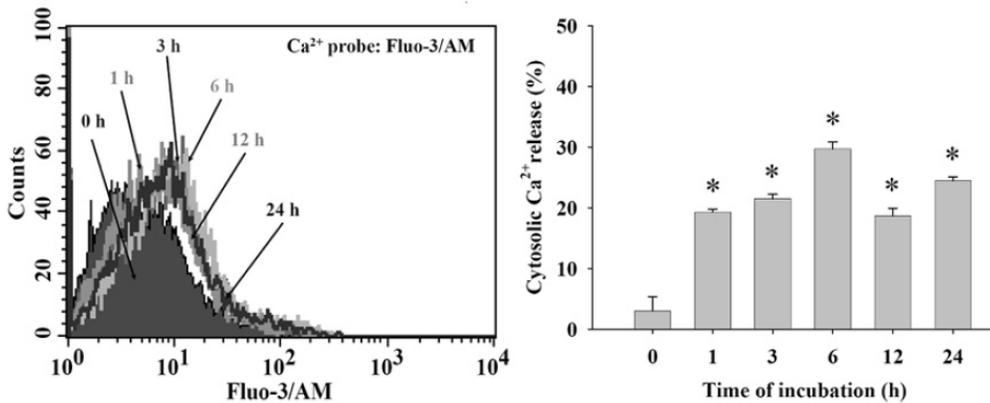


圖 4.25 大黃素對 LS1034 細胞株鈣離子濃度之影響。將 LS1034 細胞株以濃度 30 μM 之大黃素後培養不同時間點(1, 3, 6, 12 與 24 小時)後，以 Fluo-3/AM 染色並以流式細胞儀進行鈣離子濃度的偵測。結果以平均值 \pm 標準差呈現，大黃素實驗組與對照組間之統計以*代表 $p < 0.05$ 。

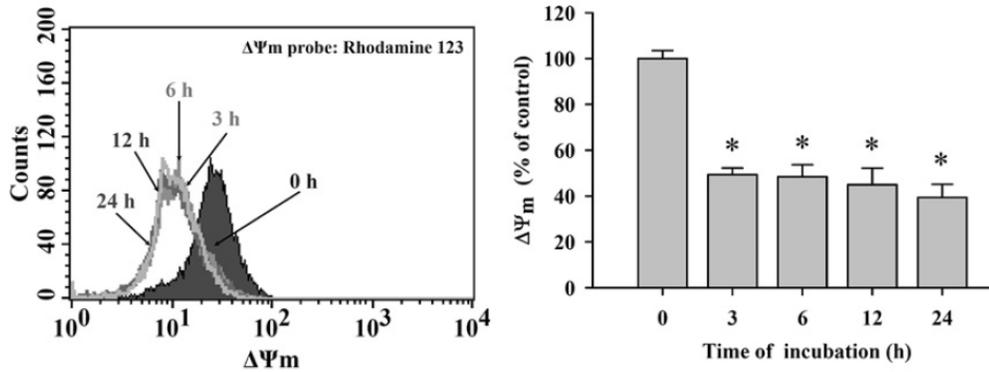


圖 4.26 大黃素對 LS1034 細胞株粒線體膜電位之影響。將 LS1034 細胞株以濃度 30 μM 之大黃素後培養不同時間點(1, 3, 6, 12 與 24 小時)後，以 rhodamine 123 染色並以流式細胞儀進行粒線體膜電位的偵測。結果以平均值 \pm 標準差呈現，大黃素實驗組與對照組間之統計以*代表 $p < 0.05$ 。

4.2.7 大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-9 與 caspase-3 活性之影響

粒線體膜電位下降與細胞凋亡的內在路徑有關，而 Caspase-3 和 -9 則為凋亡內在路徑之重要因子。利用特異性結合分子的研究結果顯示，投與 30 μM 之大黃素 24 小時或 48 小時皆可顯著地增加 LS1034 細胞株 caspase-3 和 -9 活性，呈現時間依賴的關係，並皆達統計之顯著意義(圖 4.27)。

另外分別給與 caspase-9 與 -3 的抑制劑後再投與 30 μM 之大黃素，經培養 24 小時後顯示，caspase-9 抑制劑 Z-LEHD-FMK 與 caspase-3 抑制劑 Z-DEVD-FMK 皆能減緩大黃素對 LS1034 細胞株的抑制作用，並皆達統計之顯著意義(圖 4.28)。

4.2.8 大黃素對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質表現之影響

先前之研究指出，大黃素可能經由包含粒線體在內在路徑誘導 LS1034 細胞株之凋亡。因此接下來將 LS1034 細胞株給予濃度 30 μM 之大黃素，並分別培養不同的時間長度(0, 6, 12, 24 與 48 小時)後再以西方墨點法測定觀察相關蛋白質的表現。

研究結果顯示，大黃素可促進 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之 Bax、caspase-9、細胞質 cytochrome c 與 AIF 蛋白質之表現，而抑制 Bcl-2 與粒線體 cytochrome c 蛋白質之表現(圖 4.29)。

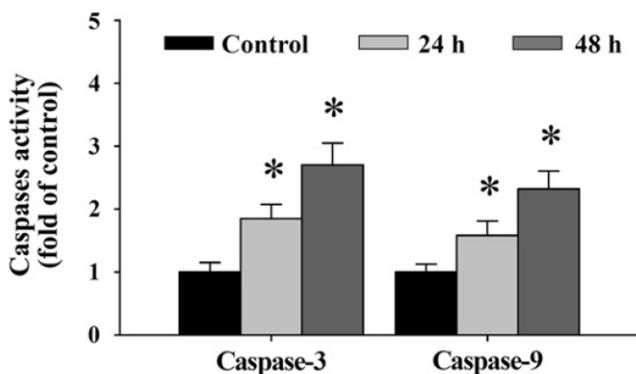


圖 4.27 大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-3 與-9 活性之影響。將 LS1034 細胞株給以濃度 30 μM 之大黃素後分別孵育不同時間點 24 或 48 小時，分別使用 PhiPhiLux™-G₁D₂ 或 CaspaLux™9-M₁D₂ Kits 進行染色後以流式細胞儀偵測並計算出其活性。結果以平均值 \pm 標準差呈現(n=3)，大黃素實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 p<0.05。

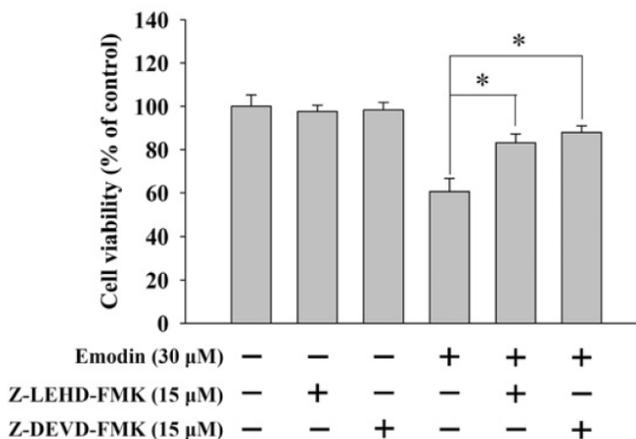


圖 4.28 Caspase-3 與-9 抑制劑對大黃素抑制 LS1034 細胞株存活率之影響。在 LS1034 細胞株給予濃度 30 μM 之大黃素前預先給予 caspase-3、caspase-9 之特异性抑制劑，孵育 24 小時後再以流式細胞儀偵測各組細胞存活率之改變。結果以平均值 \pm 標準差呈現(n=3)，實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 p<0.05。

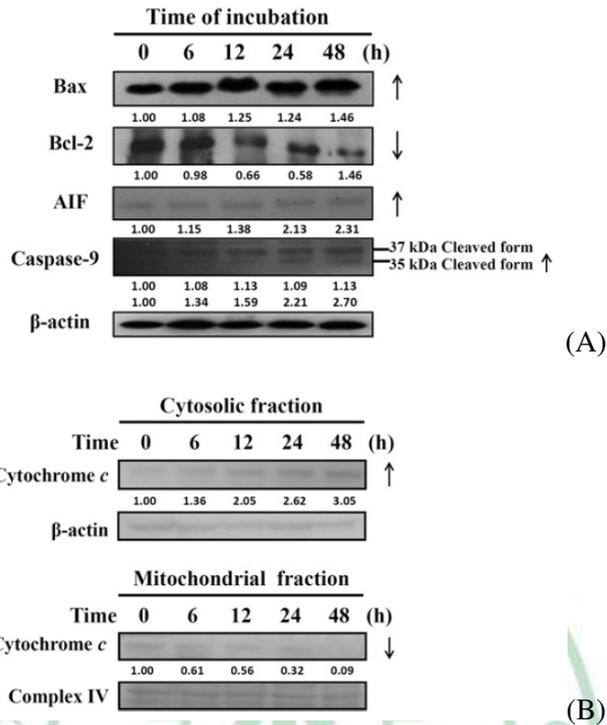


圖 4.29 大黃素對 LS1034 細胞株凋亡相關蛋白質表現之影響。將 LS1034 細胞株給予濃度 30 μM 之大黃素，並分別培養不同的時間長度(0, 6, 12, 24 與 48 小時)後再以西方墨點法測定相關蛋白質的表現。其中(A)為 Bax, Bcl-2, AIF 與 caspase-9 的蛋白質表現，(B)為 cytochrome c 分別於細胞質與粒線體中的表現。而以 b-actin 與 complex IV 作為 internal control。

4.2.9 大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-3 與-9 mRNA 表現之影響

Caspase-3 與-9 參與細胞凋亡的內在路徑，先前的研究結果指出大黃素可增加 LS1034 細胞株 caspase-3 與-9 的活性，也能增加其 caspase-9 的蛋白質表現。因此再利用 real-time PCR 觀察 LS1034 大腸癌細胞株給予濃度 30 μM 大黃素 0, 24 與 48 小時後 caspase-3 與-9 mRNA 之表現。研究結果顯示，大黃素投與 24 與 48 小時後 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之 caspase-3 與-9 mRNA 表現皆上升，並達統計之顯著差異(圖 4.30)。

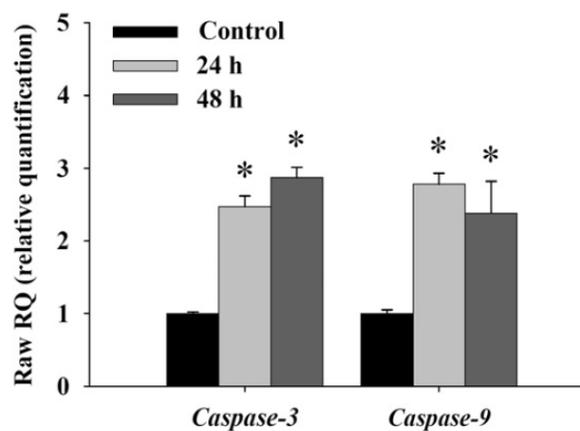


圖 4.30 大黃素對 LS1034 細胞株 caspase-3 與-9 mRNA 表現之影響。將 LS1034 細胞株給予濃度 30 μM 之大黃素，並分別培養 24 或 48 小時後再以 real-time PCR 測定相關 RNA 的表現。結果以平均值 \pm 標準差呈現(n=3)，實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。



4.3 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖之作用

前述之體外試驗顯示，大黃素可能經由內在路徑誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株凋亡，因此再藉由小鼠異體轉植(xenografts)造模觀察大黃素對於 LS1034 細胞株體內試驗之作用。其中除了實驗組、對照組外，再給予 5-FU(33 mg/kg)作為陽性對照組(positive control)。

研究結果顯示，接種 LS1034 細胞株 39 天後(圖 4.31)，大黃素實驗組(每三天給予一劑)、5-FU 組與溶媒對照組(vehicle control group)相較，不管在腫瘤重量(圖 4.32)或體積(圖 4.33)上都有顯著地減少，但僅大黃素實驗組達統計之意義。

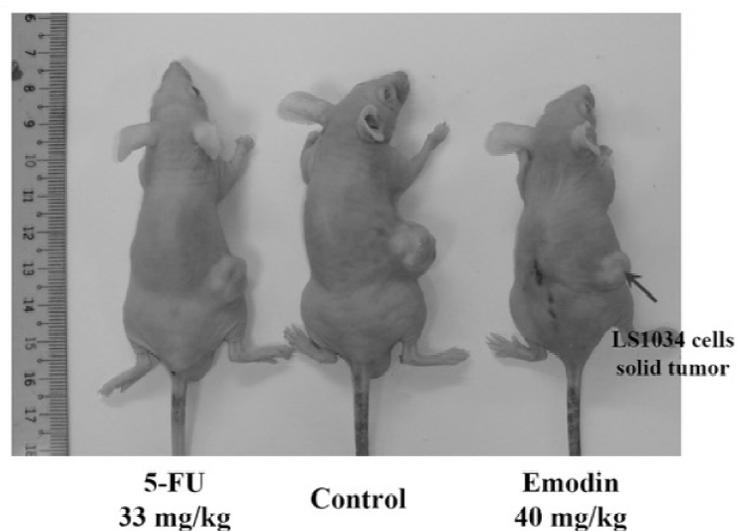


圖 4.31 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖之影響。

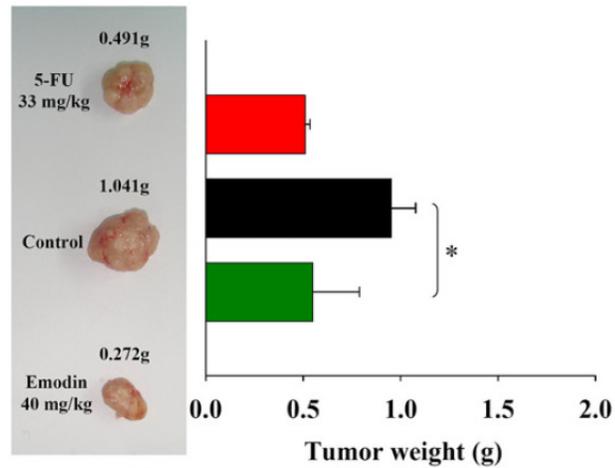


圖 4.32 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖腫瘤重量之影響。結果以平均值±標準差呈現(n=10)，統計方法為 one-way ANOVA，統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

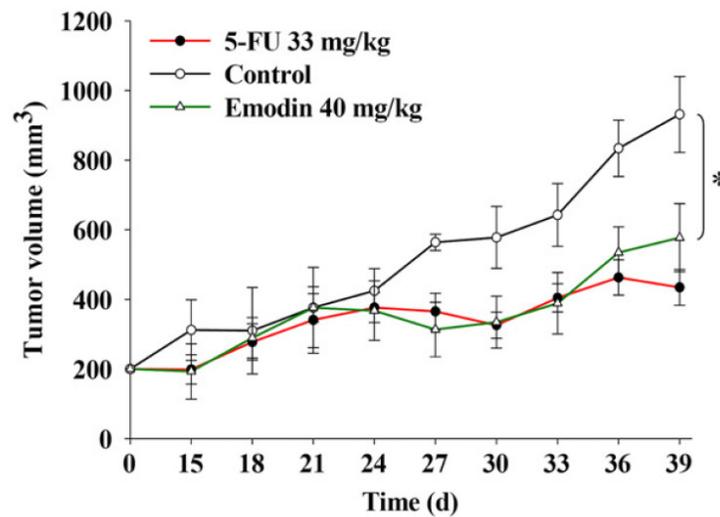


圖 4.33 大黃素對大腸癌細胞株 LS1034 異體轉殖腫瘤體積之影響。結果以平均值±標準差呈現(n=10)，統計方法為 one-way ANOVA，統計之顯著差異以*代表 $p < 0.05$ 。

4.4 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移與侵犯之作用與機轉

4.4.1 傷痕癒合試驗

腫瘤細胞的侵犯與轉移和疾病的進展息息相關，因此藉由傷痕癒合試驗可測定癌細胞株侵襲、轉移的能力，進而評估大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移之作用。

實驗結果顯示，大黃粗萃物實驗組之癌細胞其損傷癒合(wound closure)時間明顯多於對照組(圖 4.34)，因此大黃粗萃物確實可以抑制 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之轉移現象。

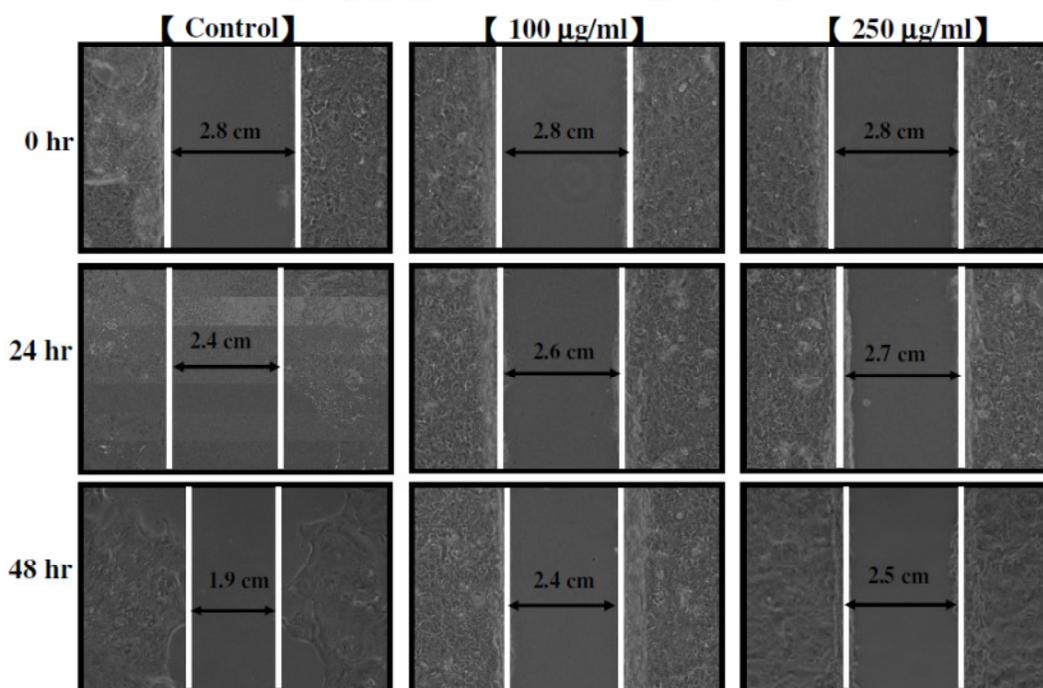


圖 4.34 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 之傷痕癒合試驗。將 LS1034 細胞株種植於培養皿後，刮除單細胞層並以以不同濃度(0, 100 或 250 µg/ml)之大黃粗萃物培養 24 或 48 小時，最後以倒立顯微鏡拍攝與量測傷口癒合試驗之結果。

4.4.2 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移與侵犯之作用

如前述腫瘤細胞的侵犯轉移和疾病的進展息息相關，利用癌細胞通過以 matrigel 未覆蓋或覆蓋之薄膜，可分別評估大黃粗萃物對 LS1034 人類大腸直腸癌細胞轉移或侵犯能力之影響。

轉移部分之研究結果顯示(圖 4.35)，不管是 100 $\mu\text{g/ml}$ 或 250 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之大黃粗萃物皆可抑制 LS1034 大腸癌細胞轉移之數目，且呈劑量依賴關係(圖 4.36)。因此大黃粗萃物確實可以抑制大腸癌細胞株 LS1034 之轉移能力。

而侵犯部分之研究結果顯示(圖 4.37)，不管是 100 $\mu\text{g/ml}$ 或 250 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之大黃粗萃物皆可抑制 LS1034 大腸癌細胞侵犯之數目，且呈劑量依賴關係(圖 4.38)。因此大黃粗萃物亦可以抑制大腸癌細胞株 LS1034 之侵犯能力。

4.4.3 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株腫瘤侵犯相關蛋白質轉運之影響

對於腫瘤細胞的侵犯能力而言，蛋白質 MMP-2、MMP-9、NF- κ B p65、RHO A 與 ROCK 1 扮演相當重要的角色。利用免疫染色法與利用雷射共軛焦顯微鏡測定經不同濃度之大黃粗萃物處理後，上述蛋白質在 LS1034 細胞株中的轉位作用。

研究結果顯示，大黃粗萃物可明顯抑制 LS1034 大腸癌細胞株核內與胞質中的 MMP-2 與 MMP-9 之蛋白質表現，並可抑制胞質中 NF- κ B p65 與 ROCK 1 的蛋白質表現(圖 4.39)。

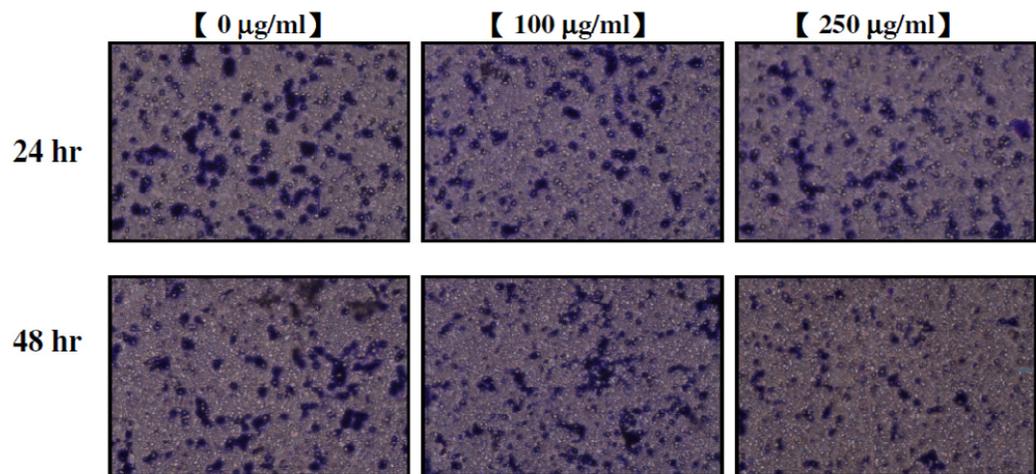


圖 4.35 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移之作用。將 LS1034 細胞株植於穿膜小室中並分別以不同濃度(0, 100 或 250 µg/ml)之大黃粗萃物培養，24 小時後已轉移至膜下層之癌細胞以 crystal violet 染色並於 200 倍視野下觀察與拍攝。

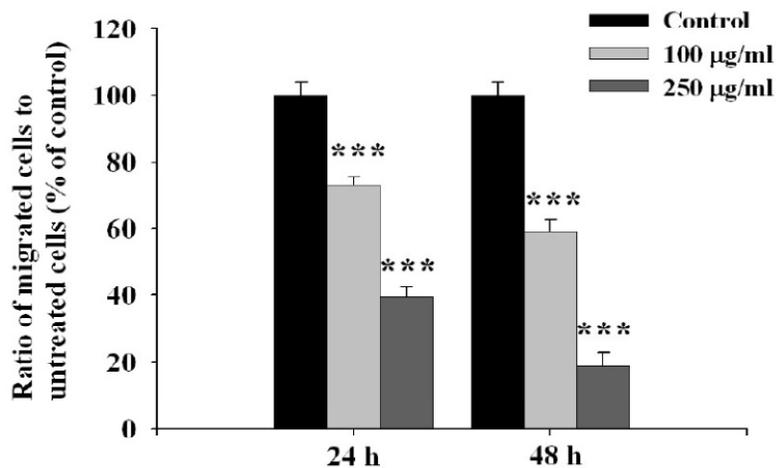


圖 4.36 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 轉移作用之量化。計數器量化之結果以平均值±標準差呈現(n=3)，大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 p<0.05。

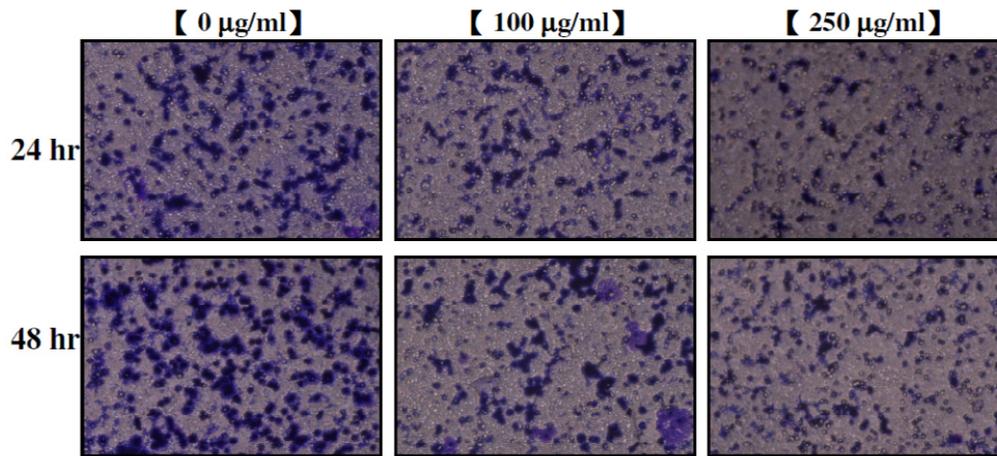


圖 4.37 大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 侵犯之作用。將 LS1034 細胞株植於 matrigel 塗覆之穿膜小室中並分別以不同濃度(0, 100 或 250 µg/ml)之大黃粗萃物培養，24 小時後已侵犯至膜下層面之癌細胞以 crystal violet 染色並於 200 倍視野下觀察與拍攝。

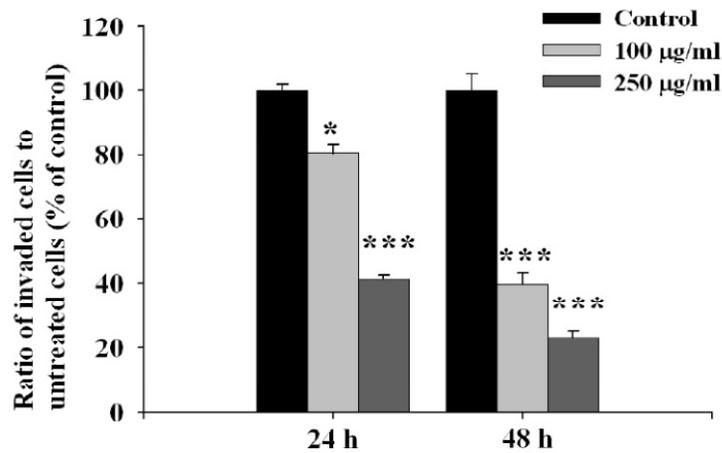


圖 4.38 量化大黃粗萃物對大腸癌細胞株 LS1034 侵犯作用。計數器量化之結果以平均值±標準差呈現(n=3)，大黃粗萃物實驗組與對照組間統計之顯著差異以*代表 p<0.05。

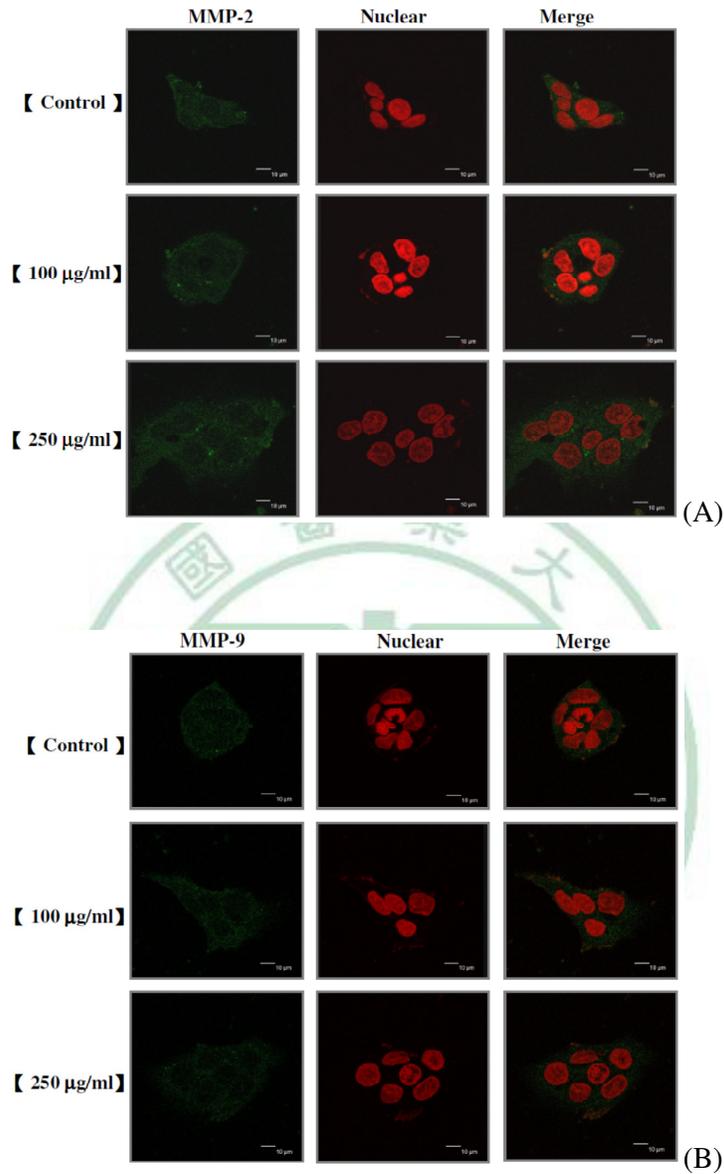


圖 4.39 大黃粗萃物對 LS1034 細胞株腫瘤侵犯相關蛋白質轉運之影響。將 LS1034 細胞株種植於之細胞培養玻片，利用雷射共軛焦顯微鏡與染色法測定經 100 或 250 µg/ml 大黃粗萃物孵育 24 小時後(A) MMP-2、(B) MMP-9、(C) NF-κB p65、(D) RHO A 與(E) ROCK 1 蛋白質在 LS1034 細胞株中的轉位作用。Scale Bar=10 µm。

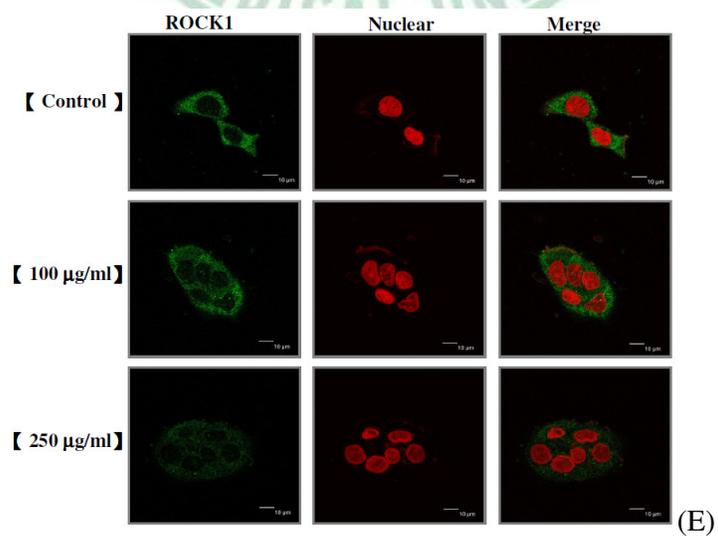
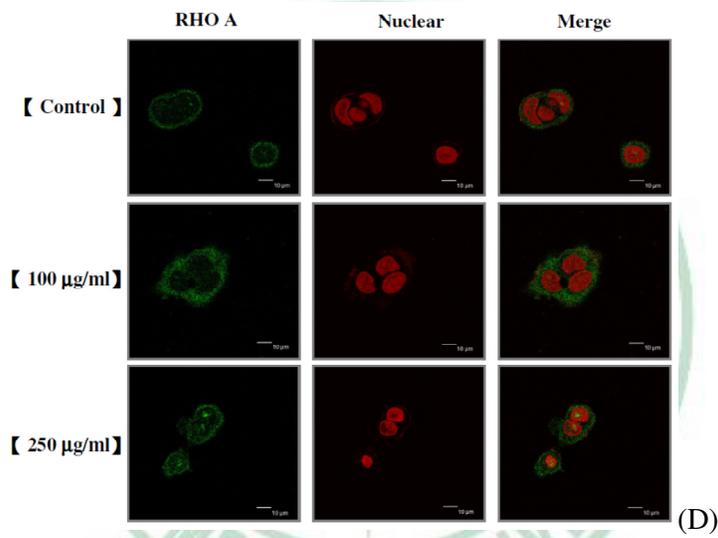
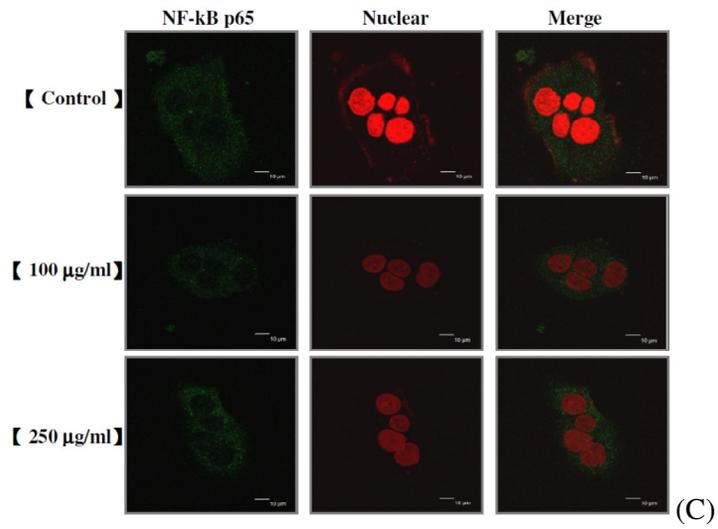


圖 4.39 (續)

4.4.4 西方墨點法測定 LS1034 細胞株轉移與侵犯相關蛋白質之表現

為了瞭解大黃粗萃物抑制 LS1034 細胞株轉移與侵犯能力可能通過之信息路徑，藉由西方墨點法分析投予大黃粗萃物後 LS1034 細胞株轉移與侵犯相關蛋白質之表現。

研究結果顯示，大黃粗萃物可抑制 LS1034 細胞株 GRB2、SOS1、MKK7、FAK、Rho A、ROCK 1、VEGF、PKC、AKT、phosphor-AKT (Thr308)、Cyclin D、iNOS、COX2、NF- κ B p65、p-ERK1/2、p-JNK1/2、p-p38、p-c-jun、MMP-2、MMP-9、MMP-1、MMP-7、MMP-10 與 uPA 等蛋白質之表現，而增加 Ras 的蛋白質表現(圖 4.40)。因此大黃粗萃物抑制 LS1034 細胞株轉移與侵犯的作用可能是經由抑制 LS1034 細胞株 ERK 與 PI3K/AKT 之信息路徑。



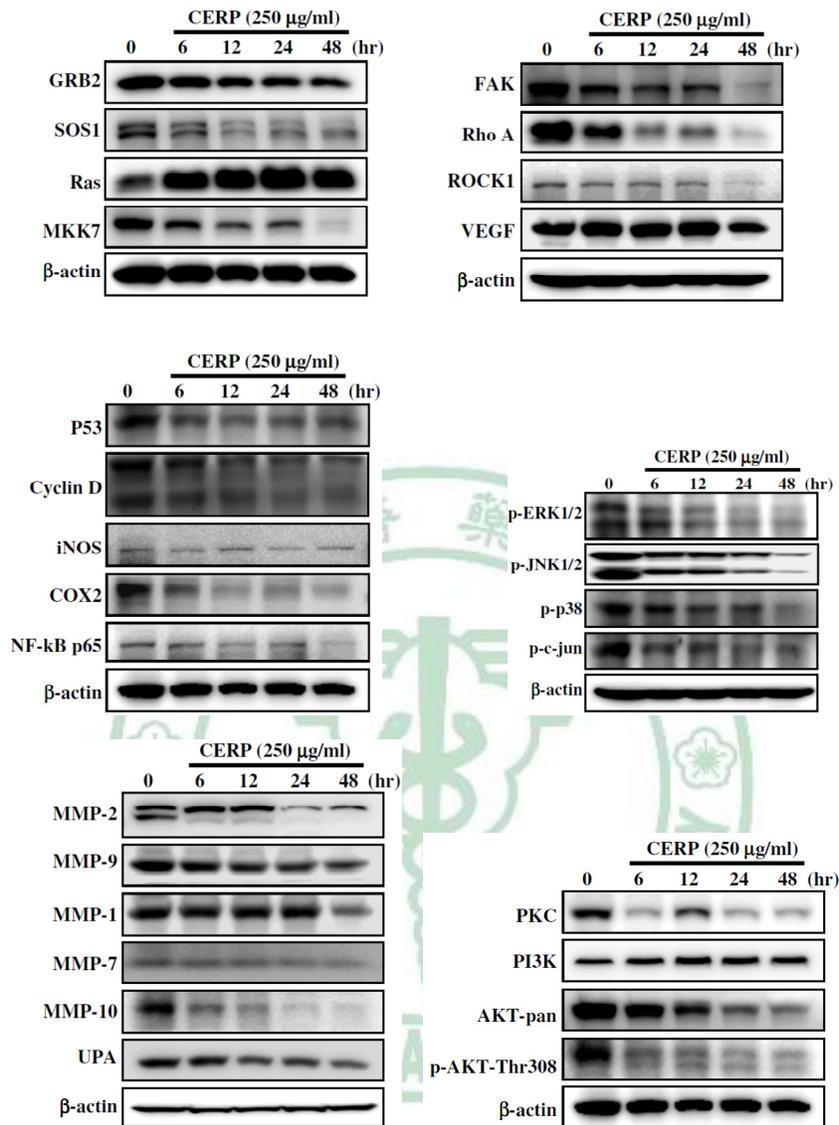


圖 4.40 西方墨點法測定 LS1034 細胞株轉移與侵犯相關蛋白質之表現。將 LS1034 細胞株給與 250 µg/ml 之大黃粗萃物後分別培養不同之時間(0, 6, 12, 24 與 48 小時)，後再以西方墨點法測定相關蛋白質的表現。

第五章 討論

癌症是全球的主要死因之一，僅 2008 年便奪走全球 760 萬人的性命，約佔所有死亡人數的 13%，其中大腸直腸癌更以造成 60 萬 8000 人死亡而成為主要死亡癌症之一^[1]。依據臺灣國民健康局之資料，民國 98 年國人大腸癌的發生人數為十大常見癌症之第一位^[2]。另依臺灣衛生署之統計，惡性腫瘤自 71 年起即為國人死因之首，民國 99 年便有 41,046 人死於癌症，而其中屬於結腸、直腸和肛門癌症更以死亡人數占率 11.4% 而名列第三順位^[3]。另外，大約有 20% 的大腸直腸癌患者被診斷出伴隨有癌細胞轉移。而早期(early stage)大腸直腸癌患者亦有高達 50% 最終會發生癌細胞轉移，且發生轉移的患者其五年存活率僅約 10%^[20]。

大黃為傳統中醫藥治療腸道疾患之重要藥物，除了做為緩解便秘的瀉下劑之外，亦可用於治療黃膽、消化道出血、潰瘍等^[13]。消化道症狀為大腸癌之主要臨床表現^[32]，而許多可運用之中醫方劑組成中便含有大黃。經統計，大黃是中醫臨床治療大腸癌的常用藥物之一^[36]，因此大黃於傳統中醫藥治療大腸癌與其相關症狀上可說佔有相當重要的角色。近來的研究發現，大黃素對於舌癌細胞^[55]、食道癌細胞^[46]、胰臟癌細胞^{[48][51][52][53]}、膽囊癌細胞^{[54][56]}、肝癌細胞^{[47][57]}、慢性骨髓性白血病^[58]、非小細胞肺癌細胞^[59]、肺腺癌細胞^[60]、神經膠質瘤細胞^[61]與前列腺癌細胞^{[49][62]}等許多腫瘤細胞分別具有抑制增殖、促進凋亡、防止轉移或加強化療效果等作用。

然而目前的研究成果對於中藥大黃及其主成分大黃素對大腸癌細胞的作用與機轉尚不清楚，因此本研究藉由生藥萃取、細胞型態觀察、流式細胞儀、DAPI 染色、雷射共軛焦顯微鏡測定、西方墨點染色、real-time PCR、癒合試驗等技術，以體外試驗方式評估與探討生藥大黃粗萃物 (CERP) 對於 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之影響，以及大黃主成分大黃素 (Emodin) 對於 LS1034 細胞株之作用與相關機轉。並藉由異體轉殖

動物造模來評估大黃素對於 LS1034 細胞株體內試驗之結果，最後再探討大黃粗萃物於體外抑制 LS1034 細胞株轉移與侵犯的作用。

首先，在大黃粗萃物方面，經由 HPLC 檢測後確認本研究之大黃粗萃物檢品中含有 0.77 mg/g 之大黃素。利用該大黃粗萃物所作的細胞存活率發現，大黃粗萃物可以濃度依賴關係顯著促進 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株死亡，其 IC₅₀ 約為 750 µg/ml。在細胞週期方面，大黃粗萃物可誘導 LS1034 細胞株產生 G0/G1 期休止，且其 sub-G1 期細胞數(即凋亡細胞數)隨濃度增加，說明大黃粗萃物確實可誘導 LS1034 細胞株凋亡而造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株死亡。由於 DNA 損傷與濃縮是細胞凋亡的特色之一，因此再藉由彗星試驗與 DAPI 染色之結果佐證，大黃粗萃物的確可以劑量依賴關係造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株產生與凋亡相關之 DNA 損傷與濃縮。

在導致 LS1034 細胞株凋亡機轉方面，近來的研究已闡明凋亡的誘導可分為外在路徑與內在路徑兩種，外在路徑經由配體媒介活化細胞表面之死亡受體進而誘導細胞死亡，而內在路徑則與多種細胞內刺激，如活性氧物質與細胞內鈣離子等刺激影響粒線體促凋亡分子與抗凋亡分子的平衡有關。一旦當促凋亡分子打開粒線體膜上之通透性轉變孔後則可繼而導致粒線體膜電位降低、cytochrome c、AIF 等凋亡因子釋放，這些因子會活化 caspase-9，進而活化 caspases-3 最終導致細胞死亡^{[8][16][14]}。而本研究藉流式細胞儀的研究結果指出，大黃粗萃物可以時間依賴關係增加 LS1034 細胞株之細胞內鈣離子濃度，並能刺激 caspase-9 與-3 之活性，且抑制 caspase-9 與-3 後可降低大黃粗萃物抑制癌細胞的能力。因此，大黃粗萃物誘導之細胞凋亡可能與細胞凋亡之內在路徑有關。另外，非 caspase 依賴路徑之 AIF 與 Endo G 等可進入細胞核中參與染色質濃縮與大規模的 DNA 碎裂^{[16][18]}。本研究以蛋白質轉位測定發現，大黃粗萃物確實可促進 LS1034 癌細胞株之 AIF 在細胞質與細胞核內的濃度增加、Endo G 在細胞質的濃度減少與細胞核內的濃度增加、而 cytochrome c 則在細胞質與細胞核內的濃度皆有增加。

此外 p53 作為一種核轉錄因子，其於面對包括 DNA 損傷以及致癌基因(oncogene)活化等細胞壓力時會增加，並將誘發如 p21、GADD45、Bax、

Puma 與 Noxa 等 p53 目標基因的轉活化作用(transcriptional transactivation)，進而導致細胞週期休止^[79]。而 CDKI 如 p27 與 p21 等分子的增加則可以經由抑制 CDK 作用而與腫瘤細胞產生之細胞週期休止有關^{[80][81]}。因此以西方墨點法測試 LS1034 癌細胞株蛋白質表現之結果發現，大黃粗萃物可明顯促進 p53、p27 與 p21 之表現。另外大黃粗萃物也可促進 Wee1，抑制 CDK1、CDK2、cyclin B1、cyclin E 與 Cdc25c 之表現。這些證據支持大黃粗萃物可經由影響細胞週期檢查點酵素(check point enzymes)而造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株產生 G0/G1 期細胞週期休止，不過確切的機制仍需進一步的研究來闡明。另外大黃粗萃物可抑制 Bcl-2 與 Bcl-X_L 抗凋亡蛋白質之表現，增加 Bcl-X_S 促凋亡蛋白質之表現，並且減少 Bcl-2/Bax 之比例，一般認為此兩種蛋白之比例改變為粒線體誘發之內在路徑之關鍵。而本研究亦證實大黃粗萃物可促進 LS1034 細胞株與粒線體通透性改變有關之 caspase-9 與 caspase-3、cytochrome c、AIF、endo G 與 PARP cleavage 等相關蛋白質之表現，此亦支持大黃粗萃物誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株凋亡應與細胞凋亡之內在路徑有關(圖 5.1)。除此之外，大黃粗萃物亦能使 LS1034 癌細胞株與內質網壓力有關的 GRP78、caspase-4 與-12 等蛋白質表現增加，此亦與之前的研究結果相呼應。

由於大黃素為大黃之主要活性成分^[13]，因此本研究進一步探討大黃素對於 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之影響。經由體外試驗研究顯示，隨著濃度與時間的增加，大黃素可導致 LS1034 細胞株發生細胞質濃縮與細胞膜突起等凋亡相關之型態改變，且型態改變之數量亦隨濃度與時間而增加。經由流式細胞儀測定細胞存活率亦證實，隨著大黃素濃度增加，不管是 24 或 48 小時組之 LS1034 細胞株存活率皆減少，其 IC₅₀ 約為 30 μM。因此與大黃粗萃物的作用相似，大黃之主要活性成分大黃素對於 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株的存活率亦有顯著之抑制作用。

在調控細胞週期方面，大黃素可誘導 LS1034 細胞株產生 G0/G1 期休止，此結果亦與大黃粗萃物之作用相似。而相關的研究也發現，大黃素可引起 HepG2 人類肝癌細胞株大量停滯在 G1 期^[47]，或導致 K562 人類慢性骨髓性白血病細胞株產生 G0/G1 期休止^[58]。再經流式細胞儀之測定

，不管 24 或 48 小時組，LS1034 人類大腸直腸癌細胞株凋亡之比例亦皆隨著大黃素的濃度增加而增加。而 DAPI 染色證實，隨著大黃素濃度愈高，其造成 LS1034 細胞株之 DNA 損傷與核濃縮的程度也愈高。因此前後研究表明，大黃素與大黃粗萃物皆可以劑量依賴之關係造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株產生細胞凋亡以及 DNA 之損傷。

大黃粗萃物可以時間依賴關係增加 LS1034 細胞株之細胞內鈣離子濃度，研究亦證實大黃素會迅速增加 LS1034 細胞株鈣離子濃度，此與大黃粗萃物的作用相似。進一步研究發現大黃素亦可以時間依賴關係顯著地誘導 LS1034 細胞株產生與細胞凋亡相關之活性氧物質，且相似的結果在 HepG2 人類肝癌細胞株^[47]、SGC996 人類膽囊癌細胞株^[54]、EC-109 人類食道癌細胞株^[46]、A549 肺腺癌細胞株與 SCC-4 人類舌癌細胞株^[82]的研究中亦獲得支持。大黃素並可降低 LS1034 細胞株之粒線體膜電位，而類似的證據在 Panc-1 胰臟癌細胞株^[83]與 SCC-4 人類舌癌細胞株^[82]之研究中亦能發現。因此，大黃素誘導之 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株細胞凋亡亦可能與粒線體相關之內在路徑有關。

凋亡之機轉方面，大黃素可呈現時間依賴關係而顯著地增加 LS1034 細胞株 caspase-3 和-9 之活性，分別給與 caspase-3 與-9 抑制劑後亦能減緩大黃素對細胞株的抑制作用，這說明參與內在路徑 caspase-9 和凋亡路徑之 caspase-3 在大黃素抑制與誘導 LS1034 細胞株凋亡的重要性。另外，西方墨點法結果顯示大黃素可促進 LS1034 細胞株之 Bax、caspase-9、細胞質 cytochrome c 與 AIF 蛋白質表現，而抑制 Bcl-2 與粒線體 cytochrome c 蛋白質表現。除了蛋白質活性與表現之外，利用 PCR 之基因表現研究證實，投與 24 與 48 小時後，大黃素確實能促進 LS1034 細胞株之 caspase-3 與-9 mRNA 的表現。其他相關研究亦指出，大黃素可促進 HepG2 人類肝癌細胞株的 cytochrome c 釋放至細胞質、caspase-9 的活性增加、抑制 Bcl-2 的表現^[47]。大黃素也可經由降低 Bcl-2/Bax 比例、增加 cytochrome-9 與-3 的活化進而加強 Gemcitabine 抑制胰臟癌細胞株的作用^[51]、促進 K562 人類慢性骨髓性白血病細胞株凋亡^[58]。因此，基於上述粒線體通透性、蛋白質與基因等證據說明大黃素可能經由粒線體路徑誘導 LS1034 細胞株之凋亡(圖 5.2)，而相似的結論在大黃素對

於 BCap-37 人類乳癌細胞株^[84]等研究中亦能獲得佐證。

另外，大黃素除了在體外試驗方面具有抑制 LS1034 細胞株之存活率並誘導其凋亡，在 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株異體轉殖之體內試驗方面，大黃素不管在腫瘤之重量或體積上都有顯著的抑制作用。類似的結果在 K562 人類慢性骨髓性白血病細胞株異體轉殖試驗中亦獲得證實^[58]。

最後，腫瘤轉移與侵犯是影響大腸直腸癌患者預後與存活率的重要因素之一，且研究顯示有相當複雜之信息路徑參與並調控這個過程。而經由傷痕癒合試驗的結果顯示，大黃粗萃物確實可以抑制 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之轉移。機轉方面，目前之研究認為 MMP-2 與 MMP-9 在腫瘤的轉移、侵犯與較差的愈後上扮演重要之角色^{[22][23]}，而本研究經由免疫染色法與雷射共軛焦顯微鏡測定蛋白質轉位之研究證實，大黃粗萃物可明顯抑制 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株核內與胞質中的 MMP-2 與 MMP-9 之蛋白質表現，並可抑制胞質中 NF- κ B p65 與 ROCK 1 的蛋白質表現。

進一步經由西方墨點試驗法探討轉移相關蛋白質之表現，研究發現大黃粗萃物可抑制 LS1034 細胞株 GRB2、SOS1、MKK7、FAK、Rho A、ROCK 1、VEGF、PKC、AKT、phosphor-AKT (Thr308)、Cyclin D、iNOS、COX2、NF- κ B p65、p-ERK1/2、p-JNK1/2、p-p38、p-c-jun、MMP-2、MMP-9、MMP-1、MMP-7、MMP-10 與 uPA 等蛋白質之表現，而增加 Ras 的蛋白質表現。因此推測大黃粗萃物抑制 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株轉移與侵犯的作用可能是經由抑制 LS1034 細胞株 ERK 與 PI3K/AKT 之信息路徑(圖 5.3)。雖然本試驗以大黃粗萃物進行研究，但其他相關研究亦指出大黃主成分之大黃素可能經由抑制 NF- κ B、MMP-9 等蛋白質表現進而抑制異體轉殖 SW1990 胰臟癌細胞^[53]之增殖與轉移能力，也可能經由抑制 MMP-9 之基因表現進而抑制 SCC-4 人類舌癌細胞株^[85]之增殖與轉移能力。

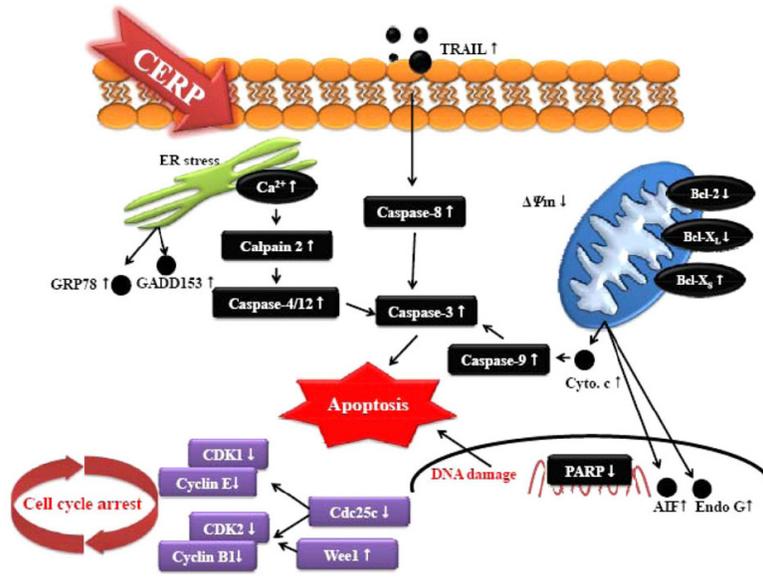


圖 5.1 大黃粗萃物誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞細胞週期休止與凋亡可能之相關機轉

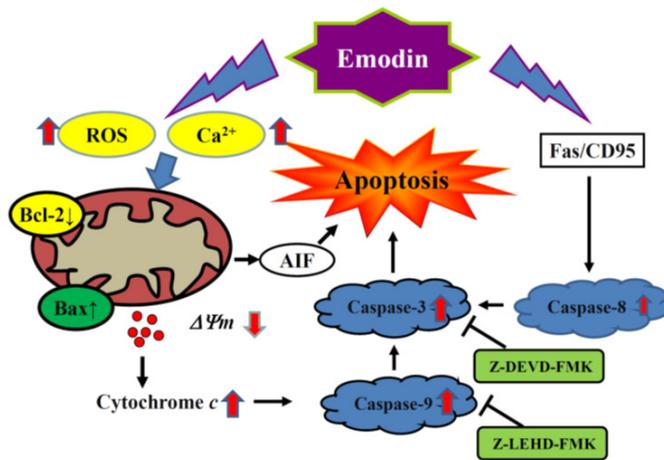


圖 5.2 大黃素誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞細胞週期休止與凋亡可能之相關機轉

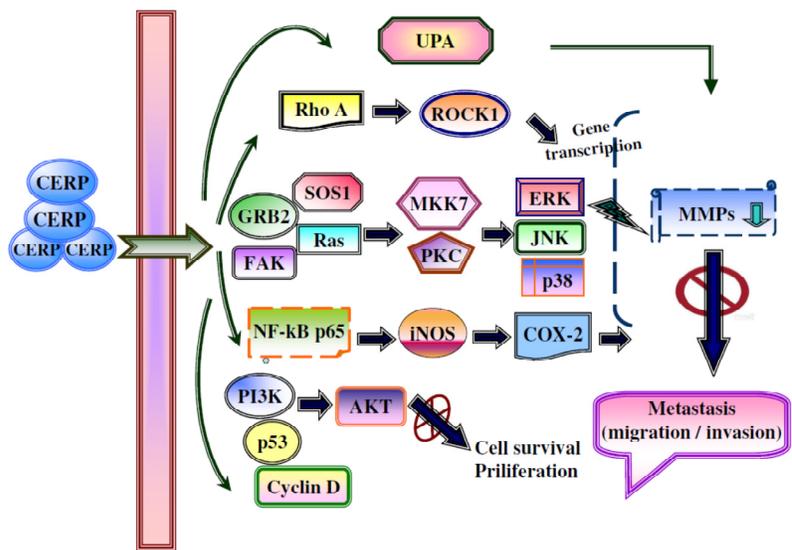


圖 5.3 大黃粗萃物抑制 LS1034 人類大腸直腸癌侵犯與轉移可能之相關機轉



第六章 結論

大腸直腸癌是全球主要死亡癌症之一，在臺灣更為癌症死亡人數之第三順位。大黃是中醫臨床治療大腸直腸癌的常用藥物之一，而本研究發現大黃粗萃物確實可造成 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株死亡。進一步研究發現大黃粗萃物可誘導 LS1034 癌細胞株產生 G0/G1 期休止、導致與凋亡相關之 DNA 損傷與濃縮，並誘導 LS1034 癌細胞株凋亡。這樣的觀察於其可促進 p53、p27 與 p21 之表現、抑制 CDK1、CDK2、cyclin B1、cyclin E 與 Cdc25c 等細胞週期相關酵素的結果中獲得支持。機轉方面，大黃粗萃物可增加 LS1034 癌細胞株之細胞內鈣離子濃度，並能刺激 LS1034 癌細胞株 caspase-9 與 caspase-3 之活性，與增加細胞核內 AIF、Endo G 與 cytochrome c 的濃度。大黃粗萃物可抑制 Bcl-2 與 Bcl-X_L 抗凋亡蛋白質之表現，增加 Bcl-X_S 促凋亡蛋白質之表現，並且減少 Bcl-2/Bax 之比例。其亦促進 caspase-9 與 caspase-3、cytochrome c、AIF、endo G 與 PARP cleavage 等相關蛋白質之表現。研究結果證實，大黃粗萃物誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之細胞凋亡應與凋亡之內在路徑有關。

大黃素為大黃重要之活性成分，本研究證實大黃素對於 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株的存活率亦有顯著之抑制作用。大黃素亦可造成 LS1034 細胞株產生 G0/G1 期休止、促進癌細胞株凋亡與造成 DNA 損傷。進一步發現大黃素可誘導 LS1034 細胞株產生活性氧物質、增加細胞內鈣離子濃度，並降低細胞之粒線體膜電位。機轉方面，大黃素可顯著增加 LS1034 癌細胞株 caspase-3 和-9 之活性、促進 Bax、caspase-9、細胞質 cytochrome c 與 AIF 蛋白質之表現，亦可促進癌細胞株 caspase-3 與-9 mRNA 的表現。這些證據說明如同大黃粗萃物般，大黃素誘導 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株之細胞凋亡亦可能與粒線體相關之內在路徑有關。

除了體外試驗，在 LS1034 人類大腸直腸癌細胞株異體轉殖之體內試驗方面，本研究亦證實大黃素不管在腫瘤之重量或體積上都具有顯著的抑制作用。

最後，腫瘤轉移與侵犯是影響大腸直腸癌患者預後與存活率的重要因素之一。本研究顯示大黃粗萃物確實可以抑制 LS1034 大腸直腸癌細胞株之轉移。而機轉方面，研究證實大黃粗萃物可明顯抑制 LS1034 癌細胞株核內與胞質中與腫瘤轉移習習相關之 MMP-2 與 MMP-9 蛋白質轉位與蛋白質之表現，而大黃粗萃物抑制 LS1034 癌細胞株轉移與侵犯的作用則可能經由抑制 ERK 與 PI3K/AKT 之信息路徑。



跋

西元 1873 年科學家 W. Haarmann 發現香蘭素(vanillin)是天然香草中最芳香的成分之一，隨後另一位科學家 Reimer 發現利用 guaiacol 合成 vanillin 的化學方法。發展至今，香料業利用亞硫酸廢液便能輕易合成出僅天然提取 vanillin 價格六分之一的人造 vanillin。便因如此，在我們生活周遭相當多的香草口味食品都不可避免地添加了人造 vanillin。長久下來絕大部分的人幾乎不知道 vanillin 與真正香草間的區別，甚至對於散發香郁甜奶味之單一 vanillin 分子的喜好程度更勝於由數百種天然成分相互協調之香草豆莢所散發的真實滋味^[86]。

醫學也是如此，藉由科學進步的包裝似乎使得傳統中醫學相形見拙，長久下來，習慣於單一化合物簡潔明瞭的科學家們也如同大眾味覺般早已不熟悉混合千百種化合物之生藥材天然的價值。於是先進的醫學趨勢與現代時裝大師的品味相同，“簡單就是美”。個人不敢詆毀先賢大師們的諄諄教誨，本篇論文之進行也亦步亦趨於前人穩健的步伐。然而接近完成之際，叛逆的心難免悸動，最後摘錄一小段引文只想表達一點點低微的吶喊。

參考文獻

1. WHO 網站
2. 民國 98 年癌症登記報告，國民健康局網站
3. 99 年主要死因分析，行政院衛生署網站
4. 庾慶麗：大腸癌中醫治療現狀。中醫學報 2010; 25(146): 31-33.
5. 2009 中國衛生統計年鑒，中國衛生部網站
6. Benson AB 3rd. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm.* 2007;13:S5-S18.
7. 江陳：大腸癌的治療方法研究進展。安徽醫藥 2012; 16(2): 247-249.
8. Ziegler DS, Kung AL. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(1):97-103.
9. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22(53):8543-8567.
10. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* 2009;14(8):996-1007.
11. Jing G, Wang JJ, Zhang SX. ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:589589.
12. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009;124(3):511-515.
13. Li-Weber M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett.* 2010. [Epub ahead of print]
14. Fogg VC, Lanning NJ, Mackeigan JP. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer.* 2011;30(8):526-539.
15. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis.* 2003;8(2):115-128.
16. Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlén P, Orrenius S, Zhivotovsky B. An increase in intracellular Ca^{2+} is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ.* 2008;15(12):1857-1864.
17. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):323-333.
18. Matsudaira, Lodish, Berk, Zipursky, Lawrence, Darnell: *Molecular Cell Biology* 5th Edition. W. H. Freeman 2004: pp. 298.
19. Matsudaira, Lodish, Berk, Zipursky, Lawrence, Darnell: *Molecular Cell Biology* 5th Edition. W. H. Freeman 2004: pp. 936-937.
20. Song X, Long SR, Barber B, Kassed CA, Healey M, Jones C, Zhao Z. Systematic review on infusion reactions associated with chemotherapies and monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer. *Curr Clin*

- Pharmacol. 2012;7(1):56-65.
21. Wanebo HJ, LeGolvan M, Paty PB, Saha S, Zuber M, D'Angelica MI, Kemeny NE. Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(7):821-839.
 22. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23(1-2):101-117.
 23. Shi M, Yu B, Gao H, Mu J, Ji C. Matrix metalloproteinase 2 overexpression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(1):617-623.
 24. Li CY, Yuan P, Lin SS, Song CF, Guan WY, Yuan L, Lai RB, Gao Y, Wang Y. Matrix metalloproteinase 9 expression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2012. [Epub ahead of print]
 25. Wang G, Wang F, Ding W, Wang J, Jing R, Li H, Wang X, Wang Y, Ju S, Wang H. APRIL Induces Tumorigenesis and Metastasis of Colorectal Cancer Cells via Activation of the PI3K/Akt Pathway. *PLoS One*. 2013;8(1):e55298. [Epub 2013 Jan 29.]
 26. Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(7):2632-2641.
 27. Kang MH, Oh SC, Lee HJ, Kang HN, Kim JL, Kim JS, Yoo YA. Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells: the role of PI3K/AKT, MAPK, the NF- κ B pathway, and MMP-9 expression. *Exp Cell Res*. 2011;317(12):1746-1762.
 28. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1263-1284.
 29. 孟景春等：黃帝內經靈樞譯釋，文光圖書有限公司 2011:pp.324.
 30. 劉沈林：大腸癌中醫辨治特點與認識。江蘇中醫藥 2012; 44(8): 1-3.
 31. 關彤：金匱要略理論在大腸癌防治中的運用。中華中醫藥學刊 2007; 25(2): 371-372.
 32. 谷建鐘等：大腸癌患者中醫徵狀的現代文獻研究。中華中醫藥學刊 2008; 26(8): 1774-1775.
 33. 王小甯、霍介格：中醫治療大腸癌的思路與方法探討。中國中醫基礎醫學雜誌 2007; 13(9): 681-682.
 34. 庾慶麗：大腸癌中醫治療現狀。中醫學報 2010; 146(25): 31-33.
 35. 趙文碩等：大腸癌的中醫診療現狀。中國中醫藥資訊雜誌 2008; 15(11): 103-105.
 36. 司富春等：近 30 年大腸癌中醫證型和用藥規律分析。中華中醫藥雜誌 2012; 27(7): 1929-1931.

37. 索風梅等：AFLP 分析唐古特大黃、掌葉大黃和藥用大黃的親緣關係研究。中草藥 2010; 41: 292-296.
38. 行政院衛生署：中華中藥典，行政院衛生署 2004:pp. 7.
39. 清·徐靈胎：神農本草經百種錄，武陵出版社 1999:pp. 110.
40. 明·李時珍：本草綱目
41. 清·汪訥庵：增補本草備要，大孚書局 2001:pp. 18-19.
42. 清·鄒澍：本經疏證，志遠書局 2002:pp. 301.
43. Wang J, Zhao Y, Xiao X, Li H, Zhao H, Zhang P, Jin C. Assessment of the renal protection and hepatotoxicity of rhubarb extract in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009;124(1):18-25.
44. Wang JB, Kong WJ, Wang HJ, Zhao HP, Xiao HY, Dai CM, Xiao XH, Zhao YL, Jin C, Zhang L, Fang F, Li RS. Toxic effects caused by rhubarb (*Rheum palmatum* L.) are reversed on immature and aged rats. *J Ethnopharmacol.* 2011;134(2):216-220.
45. Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP, Srinivas P. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev.* 2007;27(5):591-608.
46. Wang QJ, Cai XB, Liu MH, Hu H, Tan XJ, Jing XB. Apoptosis induced by emodin is associated with alterations of intracellular acidification and reactive oxygen species in EC-109 cells. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(4):767-774.
47. Yu JQ, Bao W, Lei JC. Emodin Regulates Apoptotic Pathway in Human Liver Cancer Cells. *Phytother Res.* 2012. [Epub ahead of print]
48. Liu DL, Bu H, Li H, Chen H, Guo HC, Wang ZH, Tong HF, Ni ZL, Liu HB, Lin SZ. Emodin reverses gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells via the mitochondrial apoptosis pathway in vitro. *Int J Oncol.* 2012;40(4):1049-1057.
49. Ok S, Kim SM, Kim C, Nam D, Shim BS, Kim SH, Ahn KS, Choi SH, Ahn KS. Emodin inhibits invasion and migration of prostate and lung cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2012. [Epub ahead of print]
50. Guo HC, Bu HQ, Luo J, Wei WT, Liu DL, Chen H, Tong HF, Wang ZH, Wu HY, Li HH, Zuo MM, Li W, Lin SZ. Emodin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in PANC-1 pancreatic cancer xenograft model in vivo via inhibition of inhibitors of apoptosis. *Int J Oncol.* 2012;40(6):1849-1857.
51. Wei WT, Chen H, Ni ZL, Liu HB, Tong HF, Fan L, Liu A, Qiu MX, Liu DL, Guo HC, Wang ZH, Lin SZ. Antitumor and apoptosis-promoting properties of emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, against pancreatic cancer in mice via inhibition of Akt activation. *Int J Oncol.* 2011 ;39(6):1381-1390.
52. Chen H, Wei W, Guo Y, Liu A, Tong H, Wang Z, Tan W, Liu J, Lin S.

- Enhanced effect of gemcitabine by emodin against pancreatic cancer in vivo via cytochrome C-regulated apoptosis. *Oncol Rep.* 2011;25(5):1253-1261.
53. Liu A, Chen H, Wei W, Ye S, Liao W, Gong J, Jiang Z, Wang L, Lin S. Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 2011;26(1):81-89.
 54. Wang W, Sun Y, Li X, Li H, Chen Y, Tian Y, Yi J, Wang J. Emodin potentiates the anticancer effect of cisplatin on gallbladder cancer cells through the generation of reactive oxygen species and the inhibition of survivin expression. *Oncol Rep.* 2011;26(5):1143-1148.
 55. Chen YY, Chiang SY, Lin JG, Yang JS, Ma YS, Liao CL, Lai TY, Tang NY, Chung JG. Emodin, aloe-emodin and rhein induced DNA damage and inhibited DNA repair gene expression in SCC-4 human tongue cancer cells. *Anticancer Res.* 2010;30(3):945-951.
 56. Wang W, Sun YP, Huang XZ, He M, Chen YY, Shi GY, Li H, Yi J, Wang J. Emodin enhances sensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs via glutathione depletion and MRP1 downregulation. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(8):1134-1140.
 57. Hsu CM, Hsu YA, Tsai Y, Shieh FK, Huang SH, Wan L, Tsai FJ. Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392(4):473-478.
 58. Chun-Guang W, Jun-Qing Y, Bei-Zhong L, Dan-Ting J, Chong W, Liang Z, Dan Z, Yan W. Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2010;627(1-3):33-41.
 59. Ko JC, Su YJ, Lin ST, Jhan JY, Ciou SC, Cheng CM, Chiu YF, Kuo YH, Tsai MS, Lin YW. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2. *Lung Cancer.* 2010;69(2):155-164.
 60. Lai JM, Chang JT, Wen CL, Hsu SL. Emodin induces a reactive oxygen species-dependent and ATM-p53-Bax mediated cytotoxicity in lung cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2009;623(1-3):1-9.
 61. Kuo TC, Yang JS, Lin MW, Hsu SC, Lin JJ, Lin HJ, Hsia TC, Liao CL, Yang MD, Fan MJ, Wood WG, Chung JG. Emodin has cytotoxic and protective effects in rat C6 glioma cells: roles of Mdr1a and nuclear factor kappaB in cell survival. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;330(3):736-744.
 62. Yu CX, Zhang XQ, Kang LD, Zhang PJ, Chen WW, Liu WW, Liu QW, Zhang JY. Emodin induces apoptosis in human prostate cancer cell LNCaP. *Asian J Androl.* 2008;10(4):625-634.
 63. Lu CC, Yang JS, Huang AC, Hsia TC, Chou ST, Kuo CL, Lu HF, Lee TH, Wood WG, Chung JG. Chrysophanol induces necrosis through the

- production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(7):967-976.
64. Lu CC, Yang JS, Chiang JH, Hour MJ, Amagaya S, Lu KW, Lin JP, Tang NY, Lee TH, Chung JG. Inhibition of Invasion and Migration by Newly Synthesized Quinazolinone MJ-29 in Human Oral Cancer CAL 27 Cells through Suppression of MMP-2/9 Expression and Combined Down-regulation of MAPK and AKT Signaling. *Anticancer Res*. 2012;32(7):2895-2903.
65. Chiang JH, Yang JS, Ma CY, Yang MD, Huang HY, Hsia TC, Kuo HM, Wu PP, Lee TH, Chung JG. Danthron, an anthraquinone derivative, induces DNA damage and caspase cascades-mediated apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells through mitochondrial permeability transition pores and Bax-triggered pathways. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(1):20-29.
66. Wu SH, Hang LW, Yang JS, Chen HY, Lin HY, Chiang JH, Lu CC, Yang JL, Lai TY, Ko YC, Chung JG. Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through ER stress and caspase cascade- and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res*. 2010;30(6):2125-33.
67. Huang SP, Chen JC, Wu CC, Chen CT, Tang NY, Ho YT, Lo C, Lin JP, Chung JG, Lin JG. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res*. 2009;29(1):165-174.
68. Ji, B.C., Hsu, W.H., Yang, J.S., Hsia, T.C., Lu, C.C., Chiang, J.H., Yang, J.L., Lin, C.H., Lin, J.J., Suen, L.J., Gibson Wood, W., Chung, J.G. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *J. Agric. Food Chem*. 2009;57:7596-7604.
69. Ho, Y.T., Yang, J.S., Lu, C.C., Chiang, J.H., Li, T.C., Lin, J.J., Lai, K.C., Liao, C.L., Lin, J.G., Chung, J.G. Berberine inhibits human tongue squamous carcinoma cancer tumor growth in a murine xenograft model. *Phytomedicine*. , 2009;16:887-890.
70. Chen KT, Hour MJ, Tsai SC, Chung JG, Kuo SC, Lu CC, Chiu YJ, Chuang YH, Yang JS. The novel synthesized 6-fluoro-(3-fluorophenyl)-4-(3-methoxyanilino)quinazoline (LJJ-10) compound exhibits anti-metastatic effects in human osteosarcoma U-2 OS cells through targeting insulin-like growth factor-I receptor. *Int J Oncol*. 2011;39(3):611-619.
71. Lin SS, Lai KC, Hsu SC, Yang JS, Kuo CL, Lin JP, Ma YS, Wu CC, Chung JG. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Cancer Lett*. 2009;285(2):127-133.

72. Ho CC, Lai KC, Hsu SC, Kuo CL, Ma CY, Lin ML, Yang JS, Chung JG. Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells via suppressing ERK signal pathways. *Hum Exp Toxicol*. 2011;30(4):296-306.
73. Hsu SC, Yang JS, Kuo CL, Lo C, Lin JP, Hsia TC, Lin JJ, Lai KC, Kuo HM, Huang LJ, Kuo SC, Wood WG, Chung JG. Novel quinolone CHM-1 induces apoptosis and inhibits metastasis in a human osteogenic sarcoma cell line. *J Orthop Res*. 2009;27(12):1637-1644.
74. Matsudaira, Lodish, Berk, Zipursky, Lawrence, Darnell: *Molecular Cell Biology* 5th Edition. W. H. Freeman 2004: pp. 855-858.
75. Roy S, Kaur M, Agarwal C, Tecklenburg M, Sclafani RA, Agarwal R. p21 and p27 induction by silibinin is essential for its cell cycle arrest effect in prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(10):2696-2707.
76. Perry JA, Kornbluth S. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div*. 2007;2:12.
77. Lindenboim L, Kringel S, Braun T, Borner C, Stein R. Bak but not Bax is essential for Bcl-xS-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2005;12(7):713-723.
78. 謝世良：流式細胞技術
79. Farnebo M, Bykov VJ, Wiman KG. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1):85-89.
80. Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(8):1051-1059.
81. Yadav V, Sultana S, Yadav J, Saini N. Gatifloxacin induces S and G2-phase cell cycle arrest in pancreatic cancer cells via p21/p27/p53. *PLoS One*. 2012;7(10):e47796. [Epub 2012 Oct 25]
82. Lin SY, Lai WW, Ho CC, Yu FS, Chen GW, Yang JS, Liu KC, Lin ML, Wu PP, Fan MJ, Chung JG. Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res*. 2009;29(1):327-335.
83. Liu JX, Zhang JH, Li HH, Lai FJ, Chen KJ, Chen H, Luo J, Guo HC, Wang ZH, Lin SZ. Emodin induces Panc-1 cell apoptosis via declining the mitochondrial membrane potential. *Oncol Rep*. 2012;28(6):1991-1996.
84. Huang Z, Chen G, Shi P. Emodin-induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway. *Arch Pharm Res*. 2008;31(6):742-748.
85. Chen YY, Chiang SY, Lin JG, Ma YS, Liao CL, Weng SW, Lai TY, Chung JG. Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through the inhibition of

gene expression of matrix metalloproteinase-9. *Int J Oncol.* 2010;36(5):1113-1120.

86. 碧·威爾森：美味詐欺，八旗文化 2012: pp.273-274.



ABSTRACT

The Study of Apoptosis Induction by Rheum Palmatum L and Emodin on Human Colorectal Cancer Cell Line

Ma, Yi-Shih

Professor: Lin, Jaung-Geng and Chung, Jing-Gung

Graduate Institute of Chinese Medicine, China Medical University

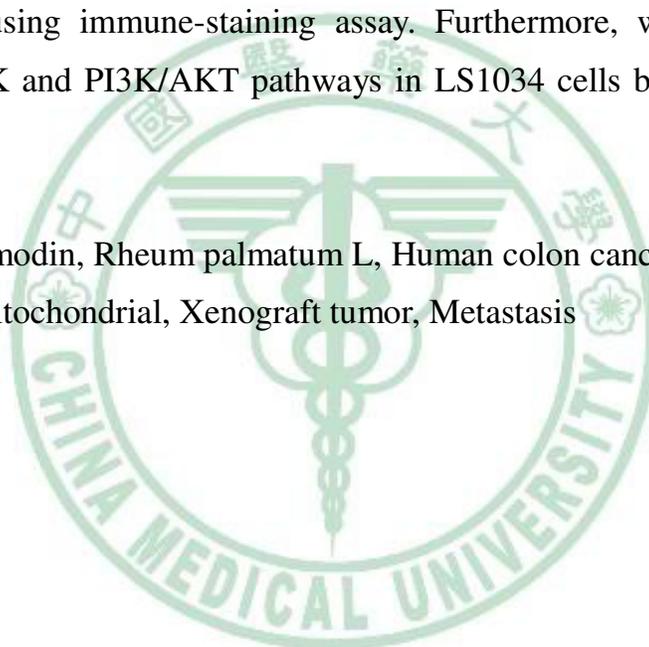
Colorectal cancer is one of the major cancer causes death each year in Taiwan. The crude extract of Rheum palmatum L (CERP) has been used to treat digestive diseases in the Chinese population for thousand years. In this study, we found that CERP induced apoptosis and G0/G1 phase arrest that were seen by DAPI staining and flowcytometric assay on LS1034 human colorectal cancer cells. The Ca^{2+} level was increased by CERP which also promoted the activities of caspase-9 and -3 in LS1034 cells. CERP treatment also indicated that an increase in the Bcl-X_S level and Bax/Bcl-2 protein ratio but decrease in the levels of Bcl-2 and Bcl-X_L. Data also confirmed that CERP promoted the expressions of caspase-9, caspase-3, cytochrome c, AIF, and Endo G that led to induce apoptosis in LS1034 cells through mitochondrial-dependent pathway.

Emodin, an active natural anthraquinone derivative of Rheum palmatum L and exhibits anticancer effects on many types of human cancer cell lines. In vitro study, emodin induced cell morphological changes, decreased the percentage of viability, promoted the DNA damage, induced G0/G1 phase arrest and increased ROS and Ca^{2+} productions as well as loss of $\Delta\psi_m$ in LS1034 cells. Emodin also promoted the activities of caspase-9 and -3 in LS1034 cells. Western blot analysis indicated that the protein levels of

cytochrome c, caspase-9, AIF and the ratio of Bax/Bcl-2 were increased in LS1034 cells after emodin exposure. In conclusion, emodin induced mitochondrial dysfunction for causing LS1034 cell apoptosis. In in vivo study, emodin effectively suppressed tumor growth in xenografts tumor nude mice bearing by LS1034 cells.

Finally, we investigated the anti-metastasis effects of CERP on LS1034 cells in vitro and also examined possible mechanisms. Data suggested that the CERP significant inhibit the cell migration and invasion of LS1034 cells. We also found that CERP inhibited the protein of matrix MMP-2 and MMP-9 by using immune-staining assay. Furthermore, we found CERP inhibited ERK and PI3K/AKT pathways in LS1034 cells by using Western blotting assay.

Keywords: Emodin, Rheum palmatum L, Human colon cancer LS1034 cells, Apoptosis, Mitochondrial, Xenograft tumor, Metastasis



謝辭

感謝 林昭庚教授一路的提攜與協助

感謝 鍾景光教授在研究進行與論文編纂方面的悉心指導

感謝 蔡金川教授從本人碩士學程至今的栽培與關懷

感謝無緣參與此刻卻又付出最多的我的父親

感謝內人這幾年來無怨無悔的支持與包容

感謝所有參與過本研究的人員

謝謝大家

