



中國醫學大學
生物科技系 碩士班
碩士學位論文

一個新穎藥物 Phenylbutyrate 衍生物 -
(S)-HDAC-42 於多發性骨髓瘤細胞之抗癌活性

Antitumor Effects of a Novel Phenylbutyrate
Derivative - (S)-HDAC-42 in Multiple Myeloma cells

指導教授：翁靖如 博士

研究生：紀振邦

中華民國九十八年六月

總目錄

總目錄	I
圖目錄	IV
表目錄	VI
致謝.....	VII
縮寫表.....	VIII
摘要	1
Abstract	2
第一章 前言	3
第二章 緒論	6
第一節 實驗藥物：(S)-HDAC-42	6
第二節 實驗癌症之探討	7
一 癌症	7
二 多發性骨髓癌	7
三 漿細胞	8
四 多發性骨髓癌成因	8
五 臨床症狀	9
六 多發性骨髓癌的治疗	9
七 研究動機	10

第三節 實驗目的與設計流程	12
一 實驗目的	12
二 實驗設計流程	12
第三章 材料與方法	13
第一節 實驗材料	13
一、 細胞株	13
二、 實驗藥物	13
三、 藥品試劑	13
四、 儀器設備	16
第二節 實驗方法	17
一、 實驗藥品配置	18
二、 細胞培養	18
(一) 配置細胞培養基	18
(二) 細胞株培養條件	18
(三) 冷凍細胞活化	18
(四) 冷凍細胞	19
三、 細胞存活率試驗 (MTS Assay)	19
四、 流式細胞儀分析 (Flow Cytometry)	21
五、 西方墨點法 (Western blotting)	22
(一) 細胞總蛋白的抽取	22

(二) 蛋白質濃度的測定	22
六、 DNA 裂解與電泳分析	30
(一) 彗星實驗 (Comet assay)	30
(二) TUNEL assay (PI / FITC staining)	31
第四章 實驗結果	33
第一節 (S)-HDAC-42 和 SAHA 對人類骨髓癌細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)的存活率及型態影響之探討.....	33
第二節 (S)-HDAC-42 對人類骨髓癌細胞株(IM-9)的細胞凋亡引發影響之探 討.....	34
第三節 (S)-HDAC-42 對人類骨髓癌細胞株(IM-9)的胞內蛋白質表現量變化 之影響.....	37
一 探討(S)-HDAC-42 對組蛋白乙酰酶家族蛋白質表現量影響.....	37
二 探討(S)-HDAC-42 對粒線體路徑 (Mitochondria-dependent apoptosis pathway) 引發細胞凋亡的相關蛋白質表現量影響.....	37
三 探討(S)-HDAC-42 對 Akt 及其下游 NF- κ B 路徑之相關蛋白質表現量影 響.....	38
第四節 實驗結果圖表	39
第五章 討論	50
第六章 結論	56
第七章 參考文獻	58

圖目錄

Figure 1.白血球成熟過程病變	10
Figure 2.實驗設計流程	12
Figure 3. The structure of (S)-HDAC-42	17
Figure 4. MTS 經代謝轉變為 Formazan	20
Figure 5.西方墨點法-轉漬夾的內部組成	27
Figure 6. Flow cytometry data analysis.	35
Figure 7. The decrease of IM-9 cell number treated with various concentration (S)-HDAC-42 for 48h.	39
Figure 8. Antiproliferative effect of (S)-HDAC-42 in multiple myeloma cell lines.	40
Figure 9. Effect of (S)-HDAC-42 on apoptosis by flow cytometry.	42
Figure 10. Evidence of apoptosis for (S)-HDAC-42 induced cell death by comet assay.	43
Figure 11. Evidence of apoptosis for (S)-HDAC-42 induced cell death by TUNEL assay.	44
Figure 12. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of HDAC related proteins (HDAC1, HDAC4, and acyl-histone 3) in multiple myeloma cells.....	45
Figure 13. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of mitochondria dependent apoptosis pathway related proteins (Caspase-3, Caspase-9,	

Bcl-2 and Bcl-xL) in multiple myeloma cells.	46
Figure 14. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of cytochrome c after mitochondria extraction in multiple myeloma cells.	47
Figure 15. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of Akt pathway related proteins (Akt, phospho-Akt and NFκB) in multiple myeloma cells.	47
Figure 16. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of NF-κ B pathway related proteins and caspase inhibitor proteins in multiple myeloma cells.	48
Figure 17. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of p38 phospho-p38, Cyclin B1, p16, Bax and Caspase-8 in multiple myeloma cells.	49
Figure 18. The cell apoptosis signal pathway.	53
Figure 19. The signal transduction effects of (S)-HDAC-42 in in multiple myeloma cells.	57

表目錄

表一、SDS-PAGE 下層膠(separation gel)之配製及組成	23
表二、SDS-PAGE 上層膠 (stacking gel) 之配製及組成	23
表三、電泳緩衝液 (running buffer ; 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) 之組成	24
表四、stacking buffer(0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)之組成	24
表五、轉印緩衝液 (transfer buffer) 之組成	27
表六、PBS-tween 20 之組成	28
表七、上下膠之組成	29
表八、Lysis buffer 之組成 (新鮮配置 pH=8~10)	29
表九、Alkaline buffer 之組成	29
表十、0.4 M Tris buffer 之組成	29
表十一、DNA-labeling solution 之組成	32
表十二、Anti-body staining solution 之組成	32
表十三、The IC ₅₀ values of (S)-HDAC-42 versus SAHA in MTS assay.	41

致謝

兩年的研究所生涯，終於告一段落。回想剛回到校園時的懵懂與期待，到現在收成的喜悅，這一切都要感謝許多人這一路上給予我許多的幫助與提攜。

這一篇論文能夠順利完成，首先當然要感謝的就是我的指導老師—翁靖如教授。在老師辛勞叮嚀論文的進度之下，論文才能夠如期的完成，除了實驗進度外，這段期間內邱昌芳也在論文的發展給予了許多方向，除此之外，鐘景光主任也時時關切我的生活與進度，提供許多的資源讓實驗進行順利，如今論文可以負梓，這都需感謝老師們對於我的指導跟協助。再來要感謝我的口試委員蔡婉琪教授與蕭永政教授，不辭辛勞地在百忙之中抽空參與我的口試，對於我論文的不足之處給予諫練，老師們在口試時對於我的指導，更讓我發現本論文主題可以更深入探討的地方，這在我的工作領域上有很大的幫助，能夠真正達到學以致用的目標。

而我的同學們在這段時間給予了很多的協助，尤其是在我工作繁忙時，幫我解決了很多事務上的問題，讓我可以專注在論文的題目上。我要特別感謝吳長霖同學、吳家君同學、吳佳真同學、李宜靜同學，以及所有碩班同學及學弟妹，由於大家的協助才得以順利完成兩年的學業。除此要特別感謝我們的實驗助理孫鵬凱先生，他幫助我習慣實驗室的环境與實驗操作，以及實驗助理林雅惠小姐實驗室的大小雜事皆經她手才得以順利運行，同時也時常與我討論實驗上的問題。特別感謝系辦助理謝秋鳳小姐，她不辭勞苦幫我們處理了很多行政事務上的問題。

最後要感謝我的爸媽，這段時間一直在忙工作與學業的問題，與家人相處的時間很少，因為爸媽的體諒，才能專心完成學業。女朋友安恬在背後的默默支持更是我前進的動力，沒有安恬的體諒、包容，相信這兩年的生活將是很不一樣的光景。因為有你們的支持才能順利的完成學業。

縮寫表

(S)-HDAC-42 : (S)-(+)-N-hydroxy-4-(3-methyl-2-phenylbutyrylamino)-
benzamide

SAHA : Suberoylanilide Hydroxamic Acid

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

P53 : protien 53

Akt : serine threonine kinase

NF- κ B : Nuclear factor- κ B

I κ B : Inhibitor of NF- κ B

IL-6 : Interleukin-6

HDAC : Histone deacetylase

HDACi : Histone deacetylase inhibitor

CML : Chronic myelogenous leukemia

AML : Acute myelogenous leukemia

CLL : Chronic lymphocytic leukemia

ALL : Acute lymphocytic leukemia

MM : Multiple myeloma

PS : phosphatidylserine

PI : Propidium iodide

FITC : Fluorescein isothiocyanate

Acetyl-H3 : Acetyl form histone 3

IKK : I κ B kinase

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

摘要

Histone (組蛋白)的乙醯化改變，已經成為在癌化過程中的重要指標之一。組蛋白去乙醯酶抑制劑中，如(S)-HDAC-42 以及 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)，可以使組蛋白乙醯化恢復而促使相關基因轉錄，在癌細胞中有許多因突變或外在因素影響而被造成沉默的基因，如 Bcl-2 或 p53 等 anti-apoptotic protein，可經由此機制回復表現，達到抗癌效果。有文獻指出，組蛋白去乙醯酶抑制劑，在前列腺及白血病等癌細胞中，已顯現引起細胞生長抑制、細胞週期停滯甚至凋亡等現象出現。然而對組蛋白去乙醯酶有同樣抑制效果的 (S)-HDAC-42 是否藉由其他非組蛋白去乙醯酶之促凋亡調控機制而使癌細胞生長受抑制，其細部機制仍有待釐清。

在此研究中，我們測試了(S)-HDAC-42 對多發性骨髓癌細胞中的細胞生長及凋亡因子的影響，並與臨床用藥 SAHA 比較。初步結果顯示(S)-HDAC-42 對於引發多發性骨髓癌細胞的生長抑制及細胞凋亡與 SAHA 相較下具有較佳的活性，並且是透過粒線體凋亡路徑來引發細胞凋亡，除此之外，(S)-HDAC-42 也具有抑制 Akt 和 NF- κ B 等細胞增生相關的蛋白質表現的功能。

關鍵字：組蛋白去乙醯酶抑制劑；多發性骨髓癌；細胞凋亡；粒線體凋亡路徑

Abstract

Alteration in histone acetylation have been implicated as a hallmarker of carcinogenesis. Histone deacetylase inhibitors, such as (*S*)-HDAC-42, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), have shown to restore histone acetylation and allow gene transcription. The histone acetylation induced by HDAC inhibitors can reactivate the expressions of silenced gene in cancer cells, such as Bcl-2 or p53. However, in addition to the mechanisms of cell growth, differentiation, and apoptosis mediated by (*S*)-HDAC-42 remain unclear, besides the inhibition of histone deacetylase.

Based on studies in the literature, SAHA has been shown to induce cell death, cell cycle arrest, and apoptosis in leukemia and prostate cancer cell lines. The differential tumorigenesis between leukemia and myeloma is originated from different stages during B-cell maturation. As a result, we rationally suggest that (*S*)-HDAC-42 may have a similar or even better therapeutic activity in multiple myeloma.

In this study, we assessed the effects of (*S*)-HDAC-42 in cell growth, apoptosis and molecular signal transduction in multiple myeloma cell lines compared to SAHA. The preliminary data revealed that (*S*)-HDAC-42 induced the cell grow inhibition and apoptosis which are better than those of SAHA in multiple myeloma cells.

Moreover, the induction of apoptosis mediated by (*S*)-HDAC-42 was through mitochondria dependent pathway and down regulation of Akt and NF- κ B pathways which are related to cell proliferation as well as survival pathway.

Key word : (*S*)-HDAC-42 ;SAHA; Histone deacetylase inhibitor; multiple myeloma; mitochondria dependent pathway

第一章 前言

近年來根據行政院衛生署統計，癌症一直是國人十大死因之首惡，每年約有三萬多人死於癌症，而每年新增加的癌症病例也將近六萬人(1)。癌症是一團過度增生的細胞群，不遵守正常細胞的生長規律，不間斷地生長而形成一個腫塊，並壓迫周邊組織而造成症狀(2)。雖然有些良性的腫瘤，也會長得很大，但是它不會發生轉移，因此癌症(惡性腫瘤)的另一個特徵，就是會到處轉移，而轉移往往在癌症或在臨床診斷之前就發生。轉移現象無法確切預測，所以難以根治，最後導致人體死亡，這就是癌症最可怕的地方(3)。

癌症起因目前還無法完全證實，可能是和外環境因素、先天遺傳因子有關，或者是兩者交互作用所形成，儘管醫療技術已隨著現代科技發展而進步，但癌症仍是一個難以對抗的棘手疾病，因此當今世界上許多的科學家們都致力於癌症方面的研究(1)。

多發性骨髓癌相當於類同白血病、惡性淋巴瘤及其他血液惡性腫瘤等由骨髓所產生的惡性血液重症，在我國台灣地區，雖排除在國人十大死因之外只占癌症死亡人數的 2.6%，但卻是孩童最常見的惡性疾病，漿細胞瘤與多發性骨髓癌都很難治癒(1)。雖然漿細胞癌患者可能在治療後很久都沒有症狀，但事實上最後卻發展成多發性骨髓癌。對於這類多發性骨髓癌，治療只能藉由症狀與合併症的控制，來改善患者的生活品質。

患者症狀開始時是背部或肋骨的骨頭痛，也可能有骨頭碎裂、無力、疲倦、體重減輕或反覆感染的現象。隨疾病進展，症狀可能加劇，包括：噁心、嘔吐、便秘、排尿問題或下肢無力或感覺異常(麻麻的)。這些症狀並非多發性骨髓瘤的典型症狀，因此時常被患者忽略其嚴重性，直到病發骨質受損，才發現病情已難以根治(4)。

骨髓癌細胞會阻止骨髓生成正常漿細胞或其他身體所需的白血球，這會讓患

者無法抵抗感染或疾病，該患者的腎臟也可能有嚴重的問題。過多的抗體蛋白質和血鈣阻礙了腎臟平常過濾和清潔血液的功能。以上這些症狀都會引起多種併發，嚴重就足以致命，因此找出確切治療、預防多發性骨癌的方式及藥物，是現代癌症醫學相當值得研究探討的一大環節。

多發性骨髓癌至 1840 年代首度被詳盡的描述，1958 年 Blokhin 等學者使用化學治療藥物 melphalan，多發性骨髓癌惡化才得以控制(5)。Maas 等人於 1962 年將類固醇應用於骨髓癌之治療，Alexanian 等學者於 1969 年指出合併 melphalan 及類固醇治療比單獨使用 melphalan 的病患存活期較長(6)。雖然各種化學治療組合陸續被提出，但統合分析顯示未有較高的反應率且未提升整體存活率。1990 年代由於分子生物學的蓬勃發展，治療藥物亦有新進展。Thalidomide 雖曾經因致畸胎性而禁用，但因具抑制血管新生作用被用於多發性骨髓癌的治療；lenalidomide 為 thalidomide 的胺基取代衍生物，亦被用於治療多發性骨髓癌(7)。Bortezomib 為全新的作用機轉藥物，近幾年已有許多用於多發性骨髓癌治療之臨床試驗發表，截至目前為止，美國國家綜合癌症網絡 (National comprehensive cancer network) 已陸續加入以 Bortezomib 為基礎的化學治療組合治療多發性骨髓癌(8)。

Bortezomib 核准用於曾接受過至少一種治療方式且已經接受或不適宜接受骨髓移植的進展性多發性骨髓癌、或曾接受過至少一種治療方式的被套細胞淋巴瘤 (Mantle Cell Lymphoma) 病人。Bortezomib 可藉由抑制蛋白酶體 (proteasome) 影響細胞內訊息傳遞使細胞生長受阻、透過影響 I κ B (inhibitor of NF- κ B) 的生成使細胞凋亡或影響 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 而減少白細胞介素-6 (interleukin-6) 合成，抑制漿細胞增生(8)。

漿細胞癌與多發性骨髓癌都很難治癒。雖然漿細胞癌患者可能在治療後很久都沒有症狀，但事實上最後卻發展成多發性骨髓癌。對於這類多發性骨髓癌，治療只能藉由症狀與合併症的控制，來改善患者的生活品質。其中一項相當值得注意的療法，是使用組蛋白去乙酰酶 Histone deacetylases (HDAC)

的抑制劑，與其他抗癌藥物的合併使用。例如：Bortezomib、Lenalidomide 以及同樣具有 epigenetic 活性的 DNA methyltransferase inhibitor—5-Azacytidine 等藥物都可有效抑制發性骨髓癌細胞的增殖(9-11)。組蛋白去乙酰酶抑制劑的合併使用也被用於乳癌治療上，都具有相當良好的抑癌活性(12)。

在抗腫瘤方面，已有許多文獻證實 SAHA 對於前列腺癌、白血病及等癌細胞的增生有明顯的抑制作用(13-16)。而本篇實驗所使用的藥物是 (S)-HDAC-42，它是由化學合成的一種 Phenylbutyrate 衍生物，比起同類臨床用藥 SAHA 較具抑癌活性，此二者在生理活性上，皆屬於組蛋白去乙酰酶 Histone deacetylases (HDAC)的抑制劑(13)。然而在目前研究當中，尚未有詳盡的說明關於 HDAC inhibitor 與多發性骨髓癌兩者之間的探討，因此在本篇實驗研究中，則是探討(S)-HDAC-42 導致多發性骨髓癌細胞凋亡的機制並且找出其可能抗癌相關路徑。



第二章 緒論

第一節 實驗藥物：(S)-HDAC-42

本實驗使用藥物為化學合成藥物(S)-HDAC-42，為一 Phenylbutyrate 的衍生物，同類藥物例如：Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)，目前已為臨床試驗用藥(17)。其主要功能為細胞中組蛋白去乙酰酶 Histone deacetylase (HDAC)的抑制劑，Histone (組蛋白)的乙酰化修飾，在細胞中基因轉錄機制中扮演重要角色，也是在癌化過程中的重要指標之一(18-19)。可以使組蛋白乙酰化恢復而促使相關基因轉錄，在癌細胞中有許多因突變或外在因素影響而被造成沉默的基因，如 Bcl-2 或 p53 等 anti-apoptotic protein，可經由此機回復表現，達到抗癌效果(20-22)。

然而除了對組蛋白乙酰酶抑制效果的認知以外，(S)-HDAC-42 對癌細胞生長、分化及凋亡的詳細機制尚未完全明瞭。但已有相關文獻指出，SAHA 能使人類白血病細胞株細胞走向 intrinsic and extrinsic apoptosis pathway (14)。SAHA 和(S)-HDAC-42 能抑制前列腺癌細胞生長，而(S)-HDAC-42 具有較佳活性。經由調節 Akt signaling、mitochondrial integrity 和 caspase activity 能促使細胞走向凋亡(13)。以上這些文獻都支持 SAHA 與 (S)-HDAC-42 在前列腺及白血病等癌細胞中，具有引起細胞生長抑制、細胞週期停滯甚至凋亡等現象出現(15-16)。

第二節 實驗癌症的探討

一、 癌症

就台灣地區而言，癌症，自民國七十一年來已連續二十幾年高居國人死因之首位(1)，且癌症的發生率及死亡率皆有逐年升高的趨勢，癌症的形成可能藉由各種環境因素、遺傳因子所衍生而來，例如 (a) 化學物質：亞硝酸胺、油煙、某些染料等等。(b) 輻射線：X 光射線、核爆炸等。(c) 其他：日光中的紫外線可能和皮膚癌的形成有關。以上種種都可能讓附近的細胞產生變化，而造成癌症(23)。

二、 多發性骨髓癌

多發性骨髓癌 (Multiple myeloma) 是一種惡性腫瘤。主要是一種被稱為『漿細胞』(Plasma cells)的白血球癌化病變而成。

當癌病變發生在漿細胞，身體會一直大量複製產生許多不需要的漿細胞，它們是一群不斷增生的不正常細胞，被稱為骨髓癌細胞。骨髓癌細胞傾向聚集在骨髓內或在骨頭外側兩端的堅硬部份，有時候只聚集在一根骨頭上，形成單一腫塊或腫瘤，被稱為漿細胞瘤(Plasmacytoma)。大部分的患者，不論骨髓癌細胞是否聚集在許多骨頭中，通常都會形成許多發性腫瘤而造成問題，因此這種情況被稱為多發性骨髓癌(24-25)。

三、 漿細胞

漿細胞和其他白血球一樣屬於免疫系統的部份，這個系統可以保護身體免於感染和疾病。所有的白血球都源生於骨髓內。骨髓是柔軟的海綿狀組織，充滿在大多數骨骼中央。形成後的白血球會離開骨髓，再到身體其他部位發展成熟。例如當免疫系統需要它們抵抗可能引起感染或疾病的外來物時，它們就會長成漿細胞。漿細胞可以產生抗體，抗體能從血流中移動出來對抗有害物質。但漿細胞的功能有其特異性，某一類的漿細胞能夠針對特定的外來物質大量產生那一類的抗體來對付它，也就是說這些特異性的抗體被產生出來後，它們會尋找出並對抗被標的的外來物質。也因此身體有許多種類的漿細胞好來應付許多不同的外來物質(26)。

四、 多發性骨髓瘤的成因

白血病的病因是多重的，包括：遺傳及基因突變、放射線污染的環境（如核爆）、病毒感染（如日本的 HTLV-I 病毒）、化學藥劑的刺激、免疫能力的缺陷，以及病人體質因素（癌基因的表現型）等。目前為止，研究專家尚未明確的證據顯示何種因素是增加罹患多發性骨髓瘤的危險因子。多數人發生多發性骨髓瘤並沒有明確的危險因子，這個疾病可能是由許多已知或未知的因素同時造成的(2)。

五、 臨床症狀

多發性骨髓癌的症狀要視疾病的嚴重度而定，通常在疾病初期是無症狀的。由於患有多發性骨髓癌的患者體內有大量不正常的漿細胞，這些骨髓癌細胞與抗體們會導致患者出現嚴重的臨床症狀，例如：

1. 當骨髓癌細胞大量增生時會破壞正常骨頭組織，使骨質脆弱，導致疼痛或容易骨折。這種骨頭疼痛會導致患者移動困難。
2. 當骨頭受損時，骨中的鈣質會釋放到血液中導致高血鈣症(Hypercalcemia)。高血鈣症可能造成患者失去食慾、噁心、口渴、疲倦、肌肉無力、靜坐不能和意識混淆等症狀。
3. 骨髓癌細胞會阻止骨髓生成正常漿細胞或其他身體所需的白血球，這會讓患者無法抵抗感染或疾病
4. 多發性骨髓癌患者的腎臟也可能有嚴重的問題。過多的抗體蛋白質和血鈣阻礙了腎臟平常過濾和清潔血液的功能(12, 27-28)。

六、 多發性骨髓癌的治療

1. 化學治療：雖然治療效果可達 70%，但疾病緩解之後，若不繼續接受治療，復發的機率相當高。
2. 骨髓移植：可分自體骨髓移植及異體骨髓移植，自體骨髓移植是輸入自己的骨髓；而異體骨髓移植則是輸入捐贈者的骨髓。
3. 放射線療法：一般對象為急性淋巴球性白血病病人，癌細胞容易侵犯病人的中樞神經系統，因此常會安排做預防性的放射線治療(29)。

七、研究動機

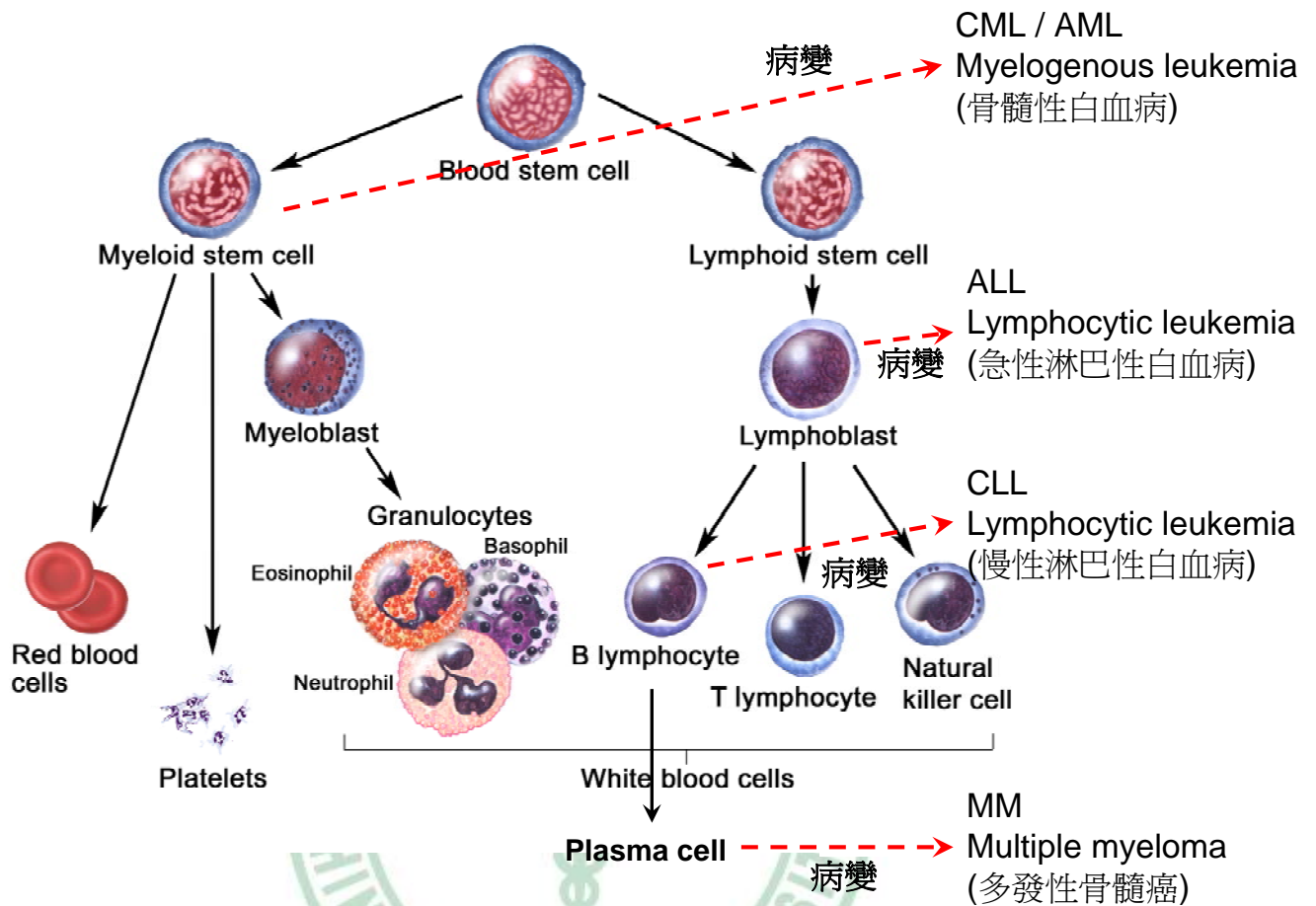


Figure 1. 白血球成熟過程病變

在血球成熟分化過程中，細胞常因受到外在因子的影響，或是基因層面的出錯，使原本具有正常功能的細胞，轉變為功能缺乏的細胞，或是病變為癌細胞。根據分化過程當中不同階段所發生的病變，所造成體內不同種細胞的病變，將其分為以下幾種疾病(31-32)(Figure 1)：

- AML (Acute myelogenous leukemia) 急性髓細胞性白血病
- AML (Chronic myelogenous leukemia) 慢性髓細胞性白血病
- ALL (Acute lymphocytic leukemia) 急性淋巴球性白血病
- CLL (Chronic lymphocytic leukemia) 慢性淋巴球性白血病

而多發性骨髓瘤 MM (Multiple myeloma)，則是 B 淋巴球因活化而成熟為漿細胞(Plasma cells)時發生病變所產生的癌細胞，其細胞種類皆類同。

在目前文獻已有指出 SAHA 對於多發性骨髓瘤能夠抑制其生長並引發細胞凋亡(33)，而在前列腺癌等研究指出，同樣身為組蛋白抑制劑 (HDACi)的藥物— (S)-HDAC-42，比起 SAHA 具有較好的抑制癌胞生長與引發凋亡的活性，再加上 HDACi 已在 CLL 細胞中顯現出有促進凋亡的作用。根據以上種種研究結果(34-35)，我們可以合理的推測 (S)-HDAC-42 也許對於多發性骨髓瘤具有類似的效用。其假設我們將由以下實驗證實。



第三節 實驗目的與設計流程

一、實驗目的：

本實驗目的主要探討(S)-HDAC-42 在三株人類多發性骨髓癌細胞 (U266, IM-9 and RPMI-8226)之藥理活性及對細胞凋亡路徑之影響及其分子機制。

二、實驗設計流程 (Figure 2)：

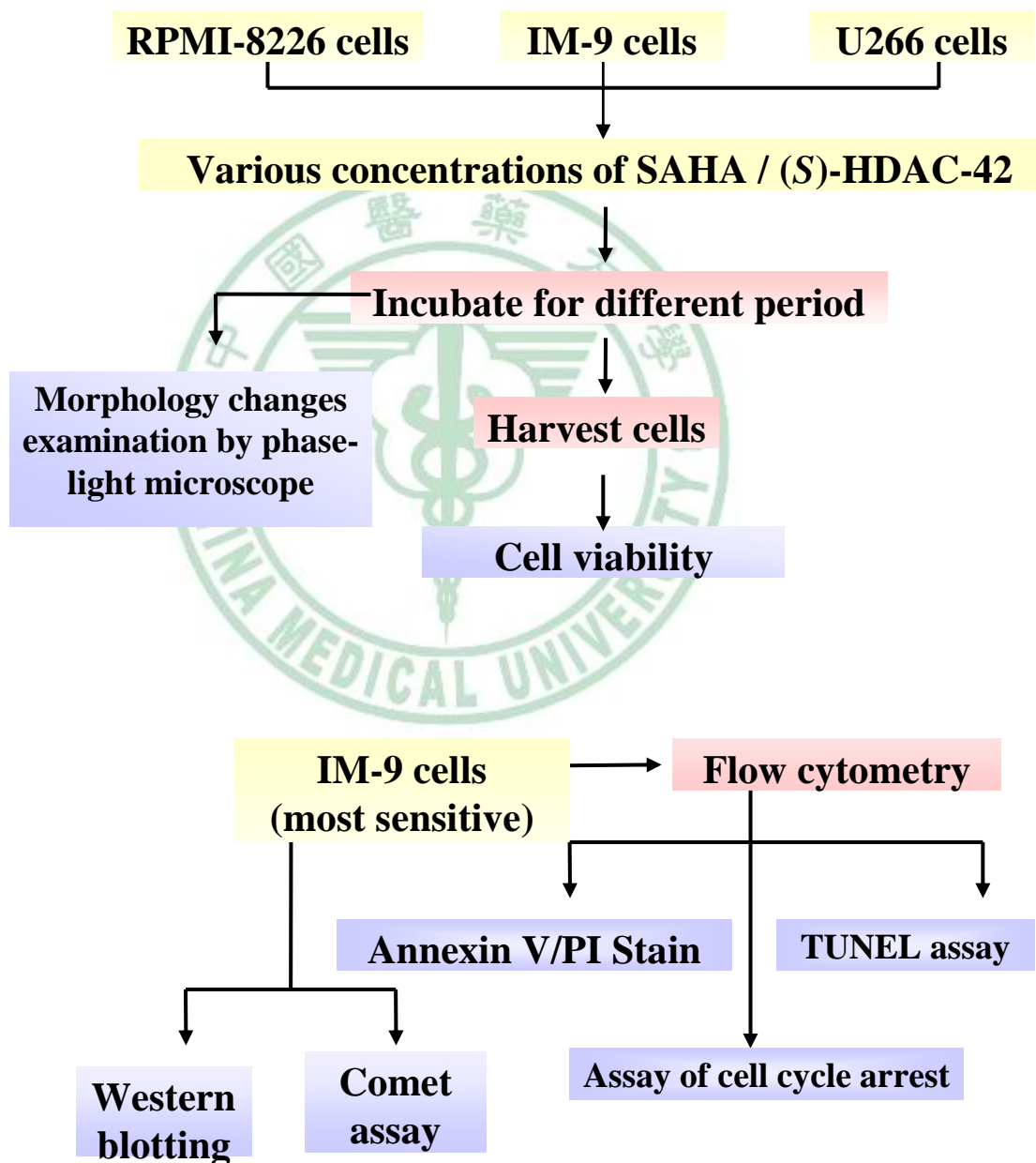


Figure 2. 實驗設計流程

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、細胞株

本研究之實驗細胞株為人類多發性骨髓癌細胞株(Human multiple myeloma cells ; U266, IM-9, RPMI-8226)三株，購自新竹食品發展工業研究所(Food Industry Research and Development Institute)。

二、實驗藥物

(S)-HDAC-42 [(S)-(+)-N-hydroxy-4-(3-methyl-2-phenylbutyrylamino)-benzamide]

三、藥品試劑

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 購自 Sigma
2. RPMI medium : 購自 Gibco
3. Fetal bovine serum (胎牛血清 ; FBS) : 購自 Gibco
4. L-Glutamine(麩胺酸 ; LG) : 購自 Gibco
5. Penicillium Streptomycin (PS) : 購自 Gibco
6. Trypan blue : 購自 Biological Industries
7. Trypsin-EDTA : 購自 Gibco
8. Ethanol : 購自 ECHO
9. Formaldehyde : 購自 Merck
10. Methanol : 購自 ECHO
11. Agarose I : 購自 UniRegion Bio-Tech
12. Agarose II : 購自 UniRegion Bio-Tech
13. 30% Acrylamide / Bis solution (ACRYL / BIS 37.5:1) : 購自 Sigma
14. Ammonium persulfate (APS) : 購自 Sigma

15. High performance chemiluminescence film : 購自 GE Healthcare
16. Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Sigma
17. Sodium dodecyl sulfate (SDS) : 購自 Sigma
18. Triton X-100 : 購自 Sigma
19. TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine) : 購自 Sigma
20. Tris : 購自 J.T.Baker
21. Tween 20 : 購自 J.T.Baker
22. Sodium chloride(NaCl) : 購自 Riedel-de Haen
23. ECL : 購自 GE Healthcare
24. Glycine : 購自 J.T.Baker
25. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) : 購自 J.T.Baker
26. Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4) : 購自 J.T.Baker
27. Potassium chloride (KCl) : 購自 J.T.Baker
28. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
29. Protein marker : 購自 Fermentas
30. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma
31. MTS reagent : 購自 Promega
32. PES reagent : 購自 Promega
33. 顯影劑 : 購自 Kodak
34. 定影劑 : 購自 Kodak
35. 粒線體萃取試劑 (Mitochondria extraction kit) : 購自 PIERCE
36. Primary antibody (1°抗體)
 - A. anti- β -actin : 購自 Sigma
 - B. anti-Akt : 購自 Cell Signaling
 - C. anti-Bad : 購自 Cell Signaling
 - D. anti-Bcl-2 : 購自 Cell Signaling

- E. anti-Bcl-xL : 購自 Cell Signaling
- F. anti-caspase 3 : 購自 Cell Signaling
- G. anti-caspase 9 : 購自 Cell Signaling
- H. anti-COX IV : 購自 Cell Signaling
- I. anti-cytochrome c : 購自 Cell Signaling
- J. anti-Cyclin B1 : 購自 Cell Signaling
- K. anti-Cyclin D : 購自 Cell Signaling
- L. anti-HDAC 1 : 購自 Cell Signaling
- M. anti-HDAC 2 : 購自 Upsatate
- N. anti-HDAC 3 : 購自 Upsatate
- O. anti-HDAC 4 : 購自 Cell Signaling
- P. anti-HDAC 5 : 購自 Cell Signaling
- Q. anti-HDAC 6 : 購自 Santa Cruz
- R. anti-HDAC 7 : 購自 Cell Signaling
- S. anti-HDAC 8 : 購自 Upsatate
- T. anti-NF-Kb : 購自 Cell Signaling
- U. anti-p16 : 購自 Cell Signaling
- V. anti-p21 : 購自 abcam
- W. anti-p38 : 購自 Cell Signaling
- X. anti-p53 : 購自 Cell Signaling
- Y. anti-p-Akt(308) : 購自 Santa Cruz
- Z. anti-p-Akt(473) : 購自 Santa Cruz
- AA. anti-p-Bad : 購自 Cell Signaling
- BB. anti-p-p38 : 購自 Cell Signaling
- CC. anti-PARP : 購自 Cell Signaling
- DD. anti-PTEN : 購自 Santa Cruz

37. Secondary antibody (2°抗體)

A. anti-mouse IgG (HRP) : 購自 Perkin Elmer

B. anti-ravit IgG (HRP) : 購自 Perkin Elmer

四、儀器設備

1. 細胞培養皿：購自 Greiner Bio-one
2. 細胞培養箱：購自 NUAIRE
3. 15 ml 離心管：購自 ExtraGene
4. 50 ml 離心管：購自 ExtraGene
5. 細胞計數器：購自 Beckman
6. 倒立式位像差顯微鏡(phase-contrast microscopy) : 購自 ZEISS
7. 微量天秤：購自 METTER TOLEDO
8. 去離子水製造機：購自 MILLIPORE
9. 電源供應器：購自 MILLIPORE
10. 酸檢測定儀：購自 EUTECH
11. PVDF membrane：購自 MILLIPORE
12. SDS-PAGE 電泳槽套組：購自 Bio-Rad
13. semi-dry transfer 套組：購自 Bio-Rad
14. 加熱板：購自 FIRSTEK
15. 流式細胞儀(Flow Cytometry) : 購自 BD
16. 高速離心機：購自 TOMY
17. 分光光度計：購自 BioTek
18. 光學顯微鏡：購自 NIKON
19. 冷凍管：購自 CRTO.S
20. 水浴槽：購自 GMB
21. 無菌操作台：購自造鑫企業有限公司
22. 微量離心管：購自 SSI

第二節 實驗方法

一、實驗藥物配置

(*S*)-HDAC-42 [(*S*)-(+)-*N*-hydroxy-4-(3-methyl-2-phenylbutyrylamino)-benzamide] 為一Phenylbutyrate衍生物，分子量313 (22)。以DMSO為溶劑，將配置成1 mg/ml 作為stock，實驗時的最終濃度為0.1、0.25、0.5、0.75、1 $\mu\text{g/ml}$ 。

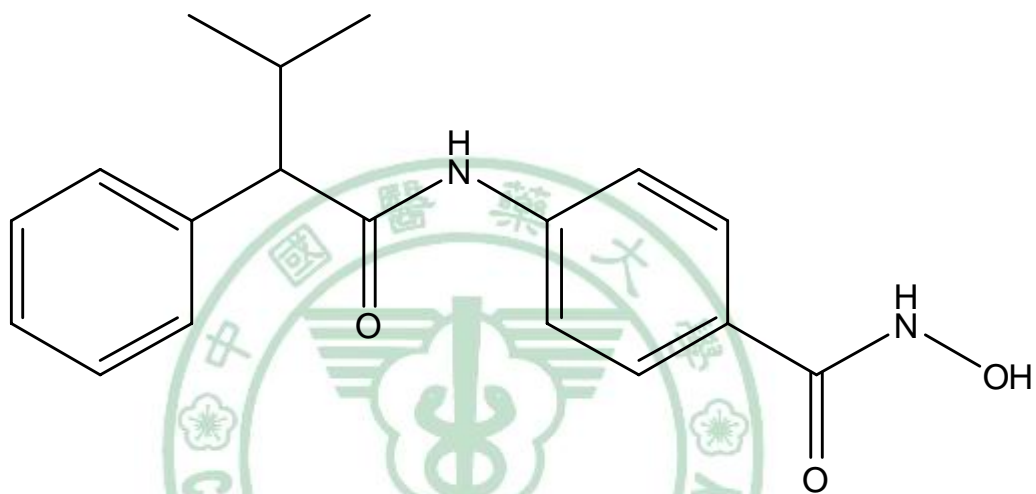


Figure 3. The structure of (*S*)-HDAC-42

二、細胞培養

(一) 配置細胞培養基(RPMI-1640 medium)

培養人類多發性骨髓癌細胞株 (U266, IM-9 and RPMI-8226) 均使用 RPMI-1640 medium。

(二) 細胞株培養條件

首先將新鮮的培養基回溫至 37 °C，使用 70%的酒精擦拭檯面。所有放入無菌操作檯的物品都要以 70%的酒精擦拭，並帶無菌手套進行以下的實驗。人類多發性骨髓癌細胞株 (IM-9、RPMI-8226) 培養在 RPMI medium 培養基中，其中含有 10% fetal bovine serum (U266 則是 15%)、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 與 2 mM L-glutamine，置於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養。定期更換新鮮的培養基，當其長到七八分滿時即繼代下來做實驗。

(三) 冷凍細胞活化

細胞解凍的過程必須快速為原則，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更換新的培養基。首先將新鮮的細胞培養基放入37 °C水浴鍋中，等待培養基回溫至37 °C，接著取回溫好的培養基10 mL 至滅菌的15 mL 離心管中，再從液態氮中取出冷凍管，迅速的將冷凍管移至37 °C水浴鍋中，使冷凍管裡的細胞液急速解凍，盡量使其在1-2分鐘內融化，融化之後將冷凍管裡的細胞液取至以含有回溫好的新鮮培養基中。使其混和均勻後，以1500 rpm的速度離心5分鐘後，去除上清液，再加入新鮮的培養基10 mL，接著移入37 °C、5% CO₂的培養箱中培養，隔日更換新鮮的培養基。

(四) 冷凍細胞

將人類多發性骨髓癌細胞株 (U266, IM-9 and RPMI-8226) 大量培養後可用液態氮冷凍保存細胞，欲保存冷凍的細胞盡量是採用細胞處於生長旺盛且存活率高的細胞情況來進行冷凍。先配製保存液，用 DMSO 加入新鮮培養基中，最後濃度為 5-10% (用 7%)，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞液來計數細胞。之後細胞離心後去上清液，加入事前配製好的保存液，使細胞數保持在 $1-5 \times 10^6$ cells/ml，混合均勻後分裝至冷凍保存管中 (1 ml/vial)，在管外標示名稱、數目、日期。冷凍順序冷凍管置於 4°C ，10 分鐘 $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ ，30 分鐘 $\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$ ，16-18 小時 \rightarrow 放入液態氮桶中 (-196°C) 長期儲存。另外取少量細胞懸浮液作污染檢測。

三、細胞存活率試驗 (MTS Assay)

原理：

MTS reagent 的組成包括：MTS，一種 Novel tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]，以及 PES，一種 Electron coupling reagent (Phenazine methosulfate)。MTS 經過細胞 Dehydrogenase enzymes 代謝過後會轉變成 formazan 產物 (Figure 4)，該產物可以溶於 medium 中，並可藉由 490 nm 測定其吸光值，因此若吸光值越高則表示細胞數量越多 (36)。

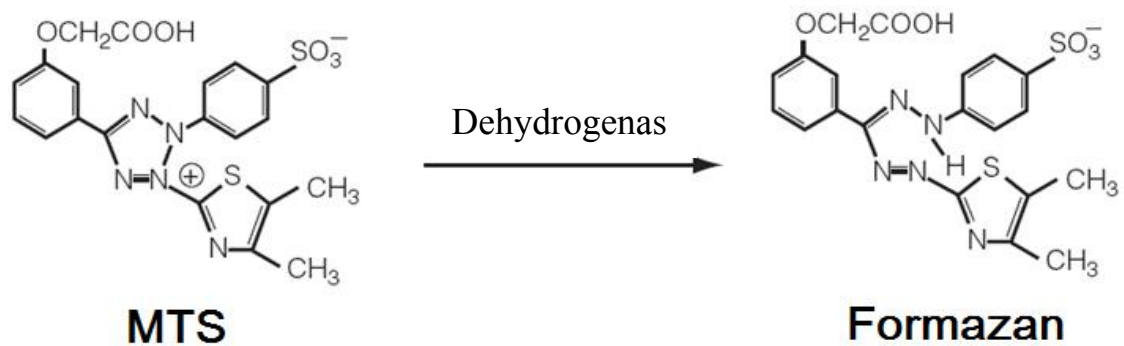


Figure 4. MTS 經代謝轉變為 Formazan

步驟：

將實驗細胞株人類多發性骨髓癌 (U266, IM-9 and RPMI-8226) ，分別以 5000 cells/well (50 μ l) 的密度種入 96 well 的培養盤，每株各三盤，以 DMSO 為溶劑，最後加入 50 μ l 不同濃度(S)-HDAC-42 (0.1 μ g/ml、0.25 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.75 μ g/ml、1 μ g/ml)，以最高濃度 DMSO 為 control 組。等待培養時間(24、48 和 72 小時)，加入配置好的 MTS reagent 20 μ l，37 $^{\circ}$ C 培養 3 小時後，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 以 490 nm 波長測其吸光值。每實驗增為三重覆已增加實驗準確度。

試劑：

1. PES reagent

2. MTS reagent 配置：

加入 21 ml DPBS 在 50 ml tube，將 42 mg MTS reagent powder 加入 DPBS，搖晃至粉末完全溶解，以 pH meter 測定期 pH 值維持在 6.0~6.5，以 0.2 μ m 的 filter 過濾，並分裝儲存於 1 ml 避光容器，置於 -20 $^{\circ}$ C 保存。

四、流式細胞儀分析 (Flow Cytometry)

細胞凋亡檢測 (Annexin V / PI staining)

原理：

細胞在早期程序性細胞死亡 (programmed cell death)時，也就是細胞凋亡(apoptosis)，磷脂絲氨酸 phospholipid phosphatidylserine (PS)從細胞膜內層轉移至外層，此時PS暴露在細胞外可與Annexin V結合。Annexin V大小約35~36 kDa，為一種具鈣離子依存性的磷脂質結合蛋白，且它與PS有高度的專一性。因此，藉著使Annexin V帶有螢光物質 (如FITC)可觀察到細胞PS外翻的程度，進而以流式細胞儀偵測螢光強度，再統計分析觀察細胞凋亡的程度。且配合它種螢光染劑 (Propidium Iodide, PI)更能區分出細胞凋亡的時期，如細胞存活 (Annexin V/ PI ; -/-)、早期細胞凋亡 (Annexin V/ PI ; +/-)、晚期細胞凋亡或細胞死亡 (Annexin V/ PI ; +/+) (37)。

步驟：

本實驗使用BD生化公司生產的Annexin V-FITC apoptosis detection kit。分別以 2×10^5 cells/1.5 ml的密度種入6 well的培養盤，以DMSO為溶劑，最後加入1.5 ml不同濃度(S)-HDAC-42 (0.1 μ g/ml、0.25 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.75 μ g/ml、1 μ g/ml)，以最高濃度DMSO為control組。等待培養時間48小時，以1500 rpm離心5分鐘收取細胞，去上清液，以PBS清洗後，加入100 μ L PBS轉至FACS管中，加入5 μ L Annexin V-FITC與5 μ L PI，震盪均勻後於室溫 (25°C) 避光反應，再加入400 μ L 1X binding buffer終止反應，再以流式細胞儀收集10000顆細胞分析螢光量，之後以CellQuest[®]軟體分析。

五、西方墨點法 (Western blotting)

(一) 細胞總蛋白的抽取

步驟：

培養細胞之細胞數約 2×10^6 /well，將人類多發性骨髓瘤細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)種於 10 cm^2 dish 培養盤中，給予(S)-HDAC-42 最後濃度 $0.1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.25 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.75 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 培養 48 小時後收集細胞，收細胞離心兩次後，將細胞收取下移至 1.5 ml 的 eppendorf tube，加入 lysis buffer (依細胞量來增添 lysis buffer 的量)，震盪 2 分鐘，置於 -20°C ，隔夜後，離心 14000 rpm、20 分鐘，取上清液此為總蛋白質，即可置於 -20°C 冰箱保存備用。

(二) 蛋白質濃度的測定

(1) 蛋白質定量

步驟：

取 $2 \text{ }\mu\text{l}$ 收下來蛋白質與 5 倍稀釋的 Bradford 染劑 $200 \text{ }\mu\text{l}$ 混合，作三重覆以增加準確度，測定吸光值，所得之吸光值平均，扣去背景值，將最小值設為最高 loading 量(如： $10 \text{ }\mu\text{l}$ 或 $15 \text{ }\mu\text{l}$)，依照比例方式推算出其他 loading 值。

(2) SDS-PAGE 電泳分析

A. 試劑材料 (表一至表六)

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 μ L	12 μ L


表一、SDS-PAGE 下層膠 (separation 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 μ L
10% APS	33.4 μ L
TEMED	12 μ L

表二、SDS-PAGE 上層膠 (stacking gel) 之配製及組成

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	

表三、電泳緩衝液（running buffer；1.5 M Tris-HCl, pH 8.8）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	

表四、stacking buffer（0.5 M Tris-HCl, pH 6.8）之組成

B. 電泳膠片製作

將配製好的下層膠（表一）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（表二）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。

C. 電泳 (Electrophoresis)

將製好的膠體放置於電泳槽中，加入電泳緩衝液（running buffer；表三），預先將萃取出蛋白質與 4X sample buffer 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 μ L 及各 sample 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。

D. 轉漬步驟 (Transfer)

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；表五），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 (Figure 5)。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 100 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 5% 的牛奶(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 3~5 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。

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	

表五、轉印緩衝液 (transfer buffer) 之組成

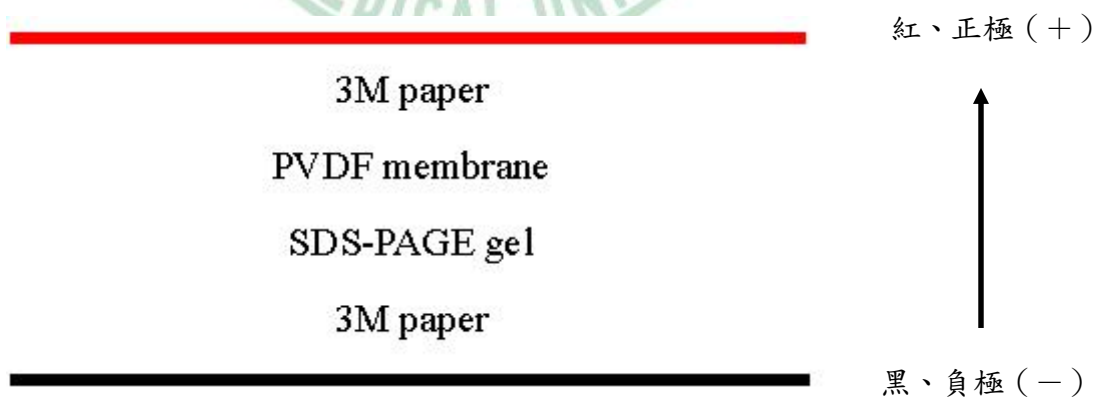


Figure 5. 西方墨點法-轉漬夾的內部組成

E. 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。

組成	重量
Tween 20	500 μ L
PBS	1000 mL

表六、PBS-tween 20 之組成

下膠	0.5% low melting agarose 0.5% normal agarose
上膠	0.5% low melting agarose

表七、上下膠之組成

組成	重量
5M NaCl	100 ml
1M Tris-HCl	2 ml
0.5M EDTA	40 ml
Triton	2 ml
DDW	56 ml

表八、Lysis buffer 之組成 (新鮮配置 pH=8~10)

組成	重量
NaOH	12 g
EDTA-Na ₂	0.3742 g
DDW	加至 1000 ml

表九、Alkaline buffer 之組成

組成	重量
Tris	48.456 g
DDW	加至 1000 ml

表十、0.4 M Tris buffer 之組成

六、DNA 裂解與電泳分析

(一)彗星實驗 (Comet assay)

原理：

PI是一種核酸螢光染劑，會專一性的結合在DNA雙股螺旋之小溝，當細胞產生凋亡時會有染色質皺縮、DNA斷裂現象。因此當凋亡的現象越嚴重，DNA斷裂越多。使用buffer使細胞膜不穩定，再經過電泳片段DNA的部分便會被電極拉出細胞外，所以經過PI後的細胞，在顯微鏡下觀察時，即可觀察到凋亡細胞所產生的拖尾現象，其形狀如彗星一般，故稱為彗星實驗。

步驟：

培養細胞之細胞數約 1×10^5 /well。將人類多發性骨髓瘤細胞株 (IM-9) 種於6 well培養盤中，給予(S)-HDAC-42最後濃度0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.75 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 培養48小時後收集細胞，收取細胞，以PBS將細胞清洗並打散，將下膠(表七)以微波爐加熱融化，於磨砂玻片上加70 μl 的下膠，蓋上蓋玻片，要注意不可有氣泡產生，凝固後小心將蓋玻片拿下，取10 μl 細胞液與70 μl 上膠(表七)混合均勻，將混合液取70 μl 加於下膠之上，再蓋上蓋玻片後至於冰上，凝固後拿下蓋玻片，再將整片膠浸於Lysis buffer (表八)中一個小時，再轉浸於Alkaline buffer (表九)中20分鐘，接下來置於電泳槽中以25 V 300 I的條件跑膠30分鐘，結束後再泡在0.4 M Tris buffer (表十)中數分鐘，再浸於methanol中5分鐘，最後加40 μl 的PI作染色於螢光顯微鏡下觀察。

(二) TUNEL assay (PI / FITC staining)

原理：

TUNEL assay, 為 Terminal transferase dUTP nick end labeling 的簡寫, nick 指的是 DNA 的缺口, 當細胞凋亡發生時會有 DNA 斷裂的特徵, terminal transferase 則是會去辨認 DNA 的缺口, 並且進行把 dUTP 補上 DNA 的反應, 我們會加入特殊的 dUTP, 也就是由溴染色以作為 marker 的 BrdUTP。所以看到 DNA 發出綠光, 就表示該細胞進行 apoptosis。

其中 PI 為一 DNA 染劑, 染色原理是利用其在細胞膜完好的狀態下, 不能穿透細胞膜, 但在細胞膜不完整的時候, 則可穿透細胞膜, 與 DNA 結合在一起, 這樣的特性。當 PI 與 DNA 結合時, 會發出紅色螢光。

步驟：

培養細胞之細胞數約 1×10^5 /well。將人類多發性骨髓瘤細胞株 (IM-9) 種於 6 well 培養盤中, 給予(S)-HDAC-42 最後濃度 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.75 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 培養 48 小時後收集細胞, 收取細胞, 以 PBS 將細胞清洗並打散, 加入 70% 的冰酒精, 將細胞液取 70 μl 置於玻片上, 再置於冰上或冰箱 15 分鐘~2 小時, 用 PBS 清洗兩次, 加入已配置好的 DNA-labeling solution (表十一) 室溫反應 1 小時, 而後再用 rinse buffer 清洗 5 分鐘, 加入 antibody staining solution (表十二) 避光反應 30 分鐘, 在加入 PI 試劑避光反應 30 分鐘, 最後用 PBS 清洗兩次, 即可於螢光顯微鏡下觀察。

組成	重量
Reaction buffer	10 μ l
TdT enzyme	0.75 μ l
BrdUTP	8 μ l
DDW	31.25 μ l

表十一、DNA-labeling solution 之組成

組成	重量
Alexa FluorR 488 dye-labeled anti-BrdU antibody	5 μ l
Rinse buffer	95 μ l

表十二、Anti-body staining solution 之組成

第三章 實驗結果

第一節 SAHA 和(S)-HDAC-42 對人類骨髓癌細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)的存活率及型態影響之探討

人類骨髓癌細胞株(IM-9)經過培養，並加入特定濃度實驗藥物((S)-HDAC-42)作用 48 小時後，用顯微鏡觀察其存活率及細胞型態。由觀察結果顯示，(S)-HDAC-42 並不會造成細胞型態的改變(Figure 7A)，但細胞的數目則有明顯的下降(Figure 7B)。

人類骨髓癌細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)經過培養，並加入特定濃度實驗((S)-HDAC-42 and SAHA)後，在不同的時間點(24h, 48h and 72h)，利用 MTS 試劑來測定藥物對細胞的毒殺作用。統計結果顯示，三株人類骨髓癌細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)皆有隨著藥物濃度及其作用時間的上升，存活率下降的趨勢(Figure 8)。

第二節 (S)-HDAC-42 對人類骨髓癌細胞株(IM-9)的細胞凋亡引發之影響

一、利用流式細胞儀(Annexin V/PI staining)探討(S)-HDAC-42對人類骨髓癌細胞株(IM-9)的引發細胞凋亡之影響

當細胞進行細胞凋亡(apoptosis)時,細胞膜的磷脂絲氨酸會外翻(原本只存在內膜)到外膜,(PS是一種帶負電荷的磷脂,正常主要存在於細胞膜的內面,在細胞發生凋亡時才外翻)而外翻的PS會被Annexin V辨識並結合,所以在偵測細胞有無凋亡時可用此種蛋白作為辨識的工具。以DNA染劑—PI檢測細胞膜是否完整,同時作為篩選過於碎裂而不足以作為探討對象的細胞。



在實驗結果分析方面可依照兩種染劑的反應狀況分為四個象限：(Figure 6)

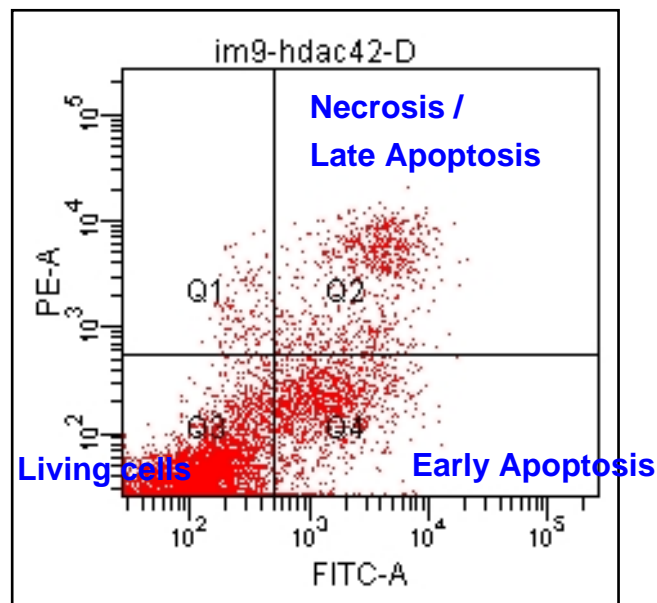


Figure 6. Flow cytometry data analysis

從X軸區分是否偵測到Annexin V的反應，也就是判別PS是否有外翻現象。從Y軸區分是否偵測到PI的反應，有就是細胞膜不完整而被PI結合於DNA之上。依照細胞的狀況不同區分的四大類細胞：

Q2 : Necrosis / late apoptosis cells

Q3 : Living cells

Q4 : Early apoptosis cells

在本實驗中，當人類骨髓癌細胞株 (IM-9) 經(S)-HDAC-42處理48小時過後，隨藥物濃度增加，其Q3的訊號比例降低，相對Q4的訊號比例則是隨之上升(Figure 9)。

二、利用 comet assay 探討(S)-HDAC-42 對人類骨髓癌細胞株(IM-9)的引發細胞凋亡之影響

在本實驗中，人類骨髓癌細胞株(IM-9)經過培養，並加入特定濃度實驗藥物((S)-HDAC-42)作用48小時後，最後經過PI染劑標定DNA。由結果顯示，隨藥物濃度增加，其拖尾現象及其出現的比例隨之上升(Figure 10)。(S)-HDAC-42對於人類多發性骨髓癌細胞株(IM-9)，是具有引發DNA斷裂，進而促進細胞凋亡能力的。

三、利用 TUNEL assay 探討(S)-HDAC-42 對人類骨髓癌細胞株(IM-9)的引發細胞凋亡之影響

在本實驗中，人類骨髓癌細胞株(IM-9)經過培養，並加入特定濃度實驗藥物((S)-HDAC-42)作用48小時後，最後經過PI/FITC染劑標定DNA。由結果顯示，隨藥物濃度增加，由FITC所標定的DNA斷裂處會發出綠色螢光，其出現的比例隨之上升(Figure 11)。(S)-HDAC-42對於人類多發性骨髓癌細胞株(IM-9)，是具有引發DNA斷裂，進而促進細胞凋亡能力的。

第三節 (S)-HDAC-42 對人類骨髓癌細胞株(IM-9)的胞內蛋白質表現量變化之影響

一、探討(S)-HDAC-42 對組蛋白乙醯酶家族蛋白質表現量影響

由於本研究藥物為一組蛋白乙醯酶抑制劑，故首先利用西方墨點法(Western blotting)檢測其抑制活性，同時觀察其對組蛋白乙醯酶的表現量是否有影響。

在本實驗中，人類骨髓癌細胞株(IM-9)經過培養，並加入特定濃度實驗藥物((S)-HDAC-42)作用 48 小時後，由實驗結果顯示，隨藥物濃度增加，HDAC1 與 HDAC4 的蛋白表現量減少。而由 Acetyl-H3 表現量上升可顯示其藥物的確具有蛋白乙醯酶抑制活性(Figure 12)。

二、探討(S)-HDAC-42 對粒線體路徑 (Mitochondria-dependent apoptosis pathway) 引發細胞凋亡的相關蛋白質表現量影響。

在先前的實驗中(S)-HDAC-42 皆顯示具有引發細胞凋亡的活性，故利用西方墨點法(Western blotting)檢測其是否會經由粒線體路徑(Mitochondria-dependent apoptosis pathway)來誘發凋亡。

在本實驗中，人類骨髓癌細胞株(IM-9)經過培養，並加入特定濃度實驗藥物((S)-HDAC-42)作用 48 小時後，由實驗結果顯示，隨藥物濃度增加，Anti-apoptotic protein—Bcl-2 和 Bcl-xL 的蛋白表現量下降；而 Pro-apoptotic protein—caspase-3 和 caspase-9 的 cleavage form 則上升(Figure 13)。

粒線體路徑凋亡的一大特色，就是粒線體膜的不穩定，同時釋放出細胞激素 cytochrome c，活化下游促凋亡蛋白。因此在同樣條件藥物作用下，我們萃取細胞的粒線體，在檢視其內在 cytochrome c 的表現量。由實驗結果顯示，隨藥物濃度增加，粒線體內 cytochrome c 表現量下降

(Figure 14)，故推測人類骨髓癌細胞株(IM-9)中，藥物會影響 cytochrome c 的釋放。

三、探討(S)-HDAC-42 對 Akt 與其下游 NF- κ B 路徑相關蛋白質表現量影響。

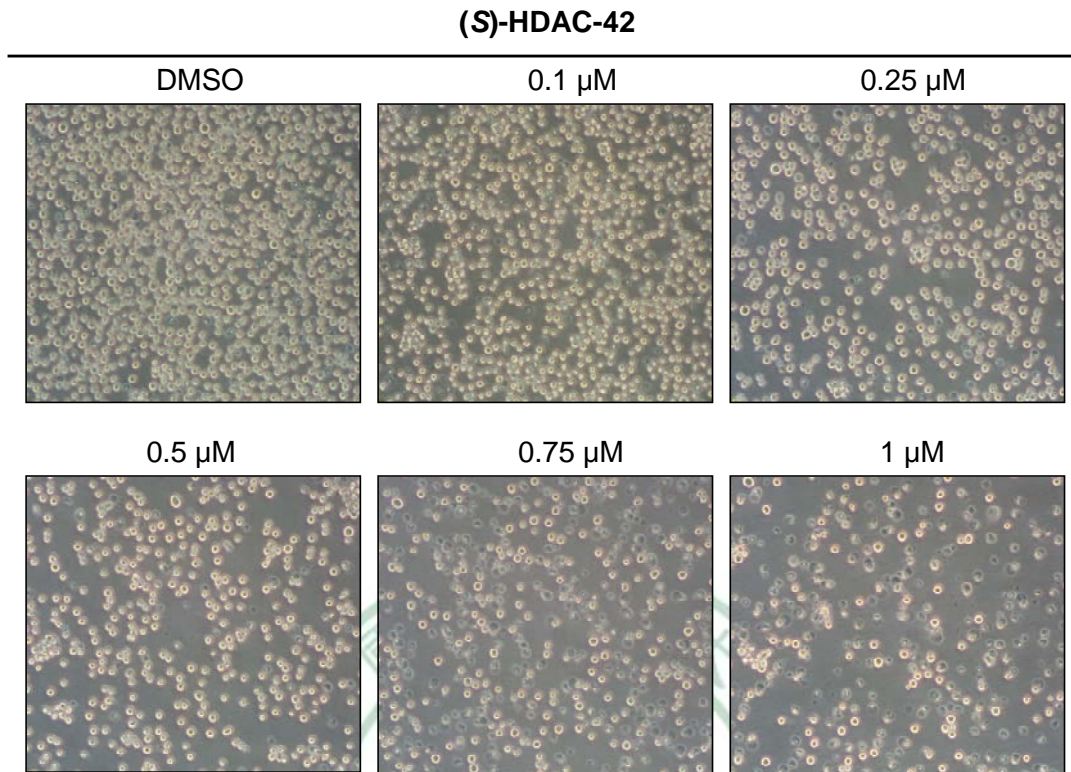
在先前文獻中有提出，(S)-HDAC-42 在前列腺癌中具有負面調控 Akt 的活性，此外在存活率試驗中也顯示其具有抑制生長的活性。故利用西方墨點法(Western blotting)檢測其是否在人類骨髓癌細胞株(IM-9)中也具有相同活性。

在本實驗中，人類骨髓癌細胞株(IM-9)經過培養，並加入特定濃度實驗藥物((S)-HDAC-42)作用 48 小時後，由實驗結果顯示，隨藥物濃度增加，Akt、NF- κ B、IKK 和 I κ B 以及 caspase 的抑制劑 survivin 和 XIAP 蛋白表現量下降。(Figure 16)。



第四節 實驗結果圖表

A.



B.

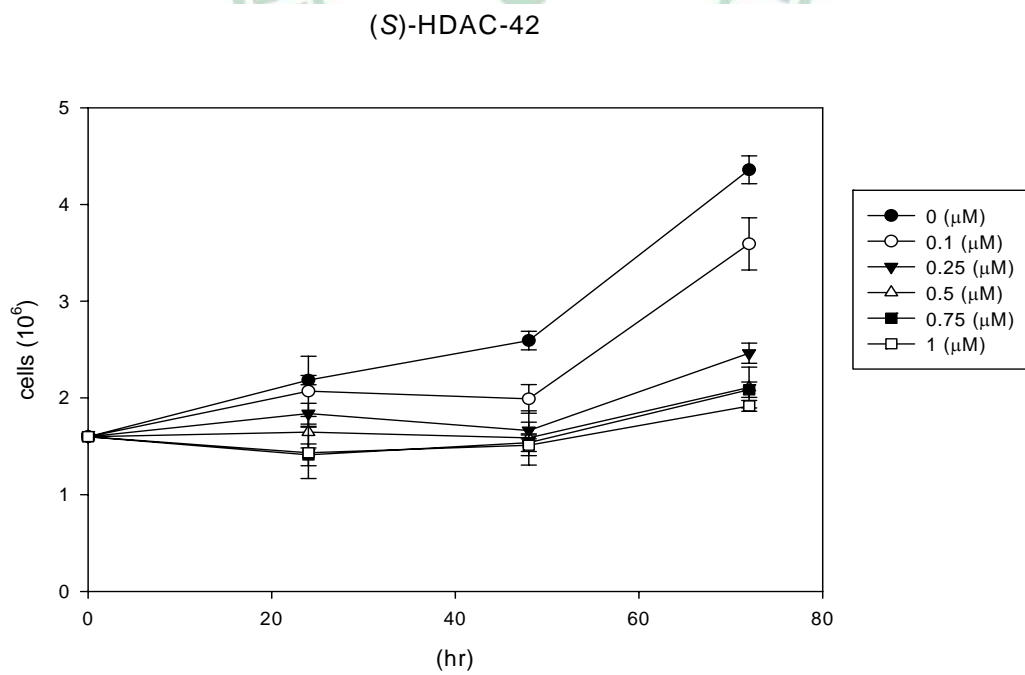
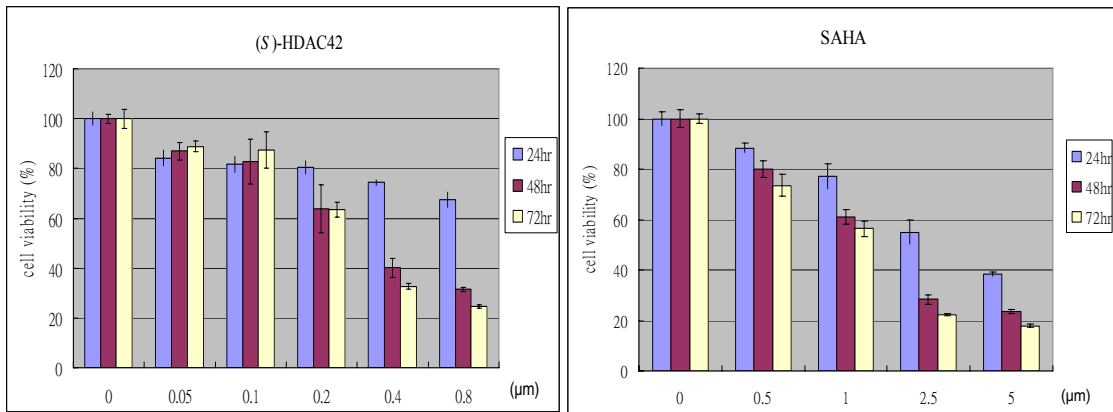
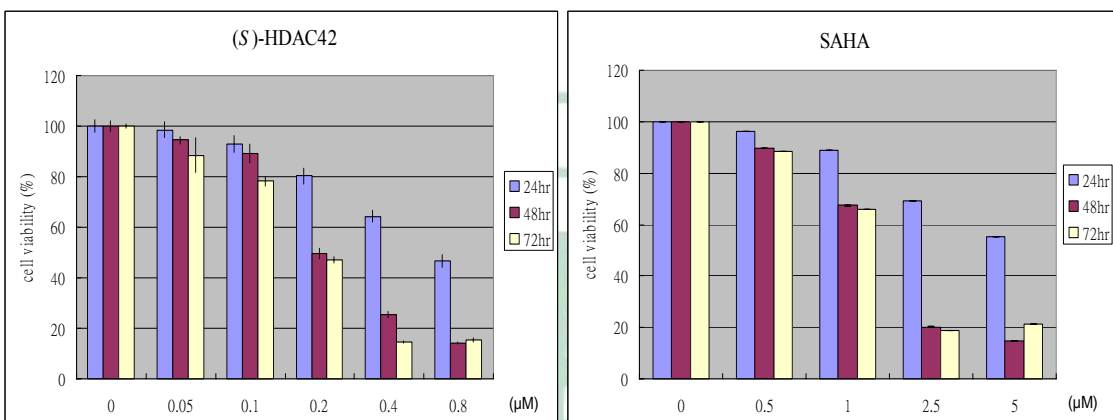


Figure 7. The decrease of IM-9 cell number treated with various concentration (S)-HDAC-42 for 48h.. ($n=3$) (A. morphology picture, B. cell counting)

A.



B.



C.

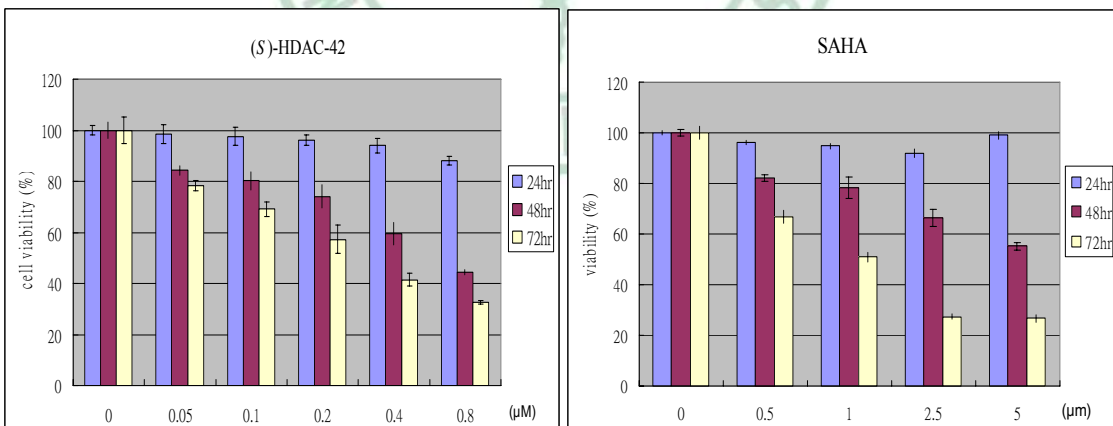


Figure 8. Antiproliferative effect of (S)-HDAC-42 in multiple myeloma cell lines. (A. IM-9, B. RPMI-8266, C. U266) ($n=3$)

(S)-HDAC-42 (μM)

Cell line \ Time (hr)	IM-9	U266	RPMI-8226
24	0.30	> 1.0	0.68
48	0.30	> 1.0	0.23
72	0.28	0.24	0.19

SAHA (μM)

Cell line \ Time (hr)	IM-9	U266	RPMI-8226
24	2.9	> 5.0	> 5.0
48	1.4	> 5.0	1.4
72	1.2	1.2	1.4

表十三、 The IC₅₀ values of (S)-HDAC-42 versus SAHA in MTS assay

(S)-HDAC-42 (μM)

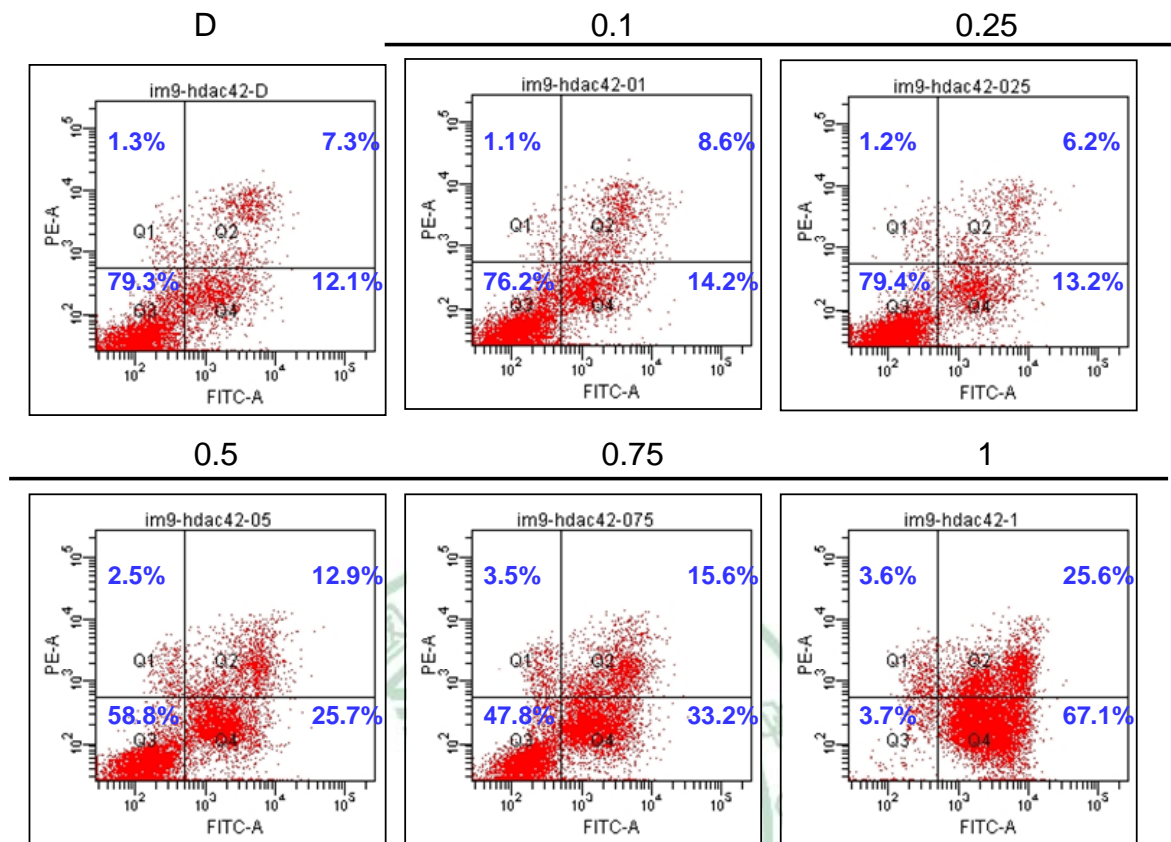


Figure 9. Effect of (S)-HDAC-42 on apoptosis by flow cytometry. ($n=3$)

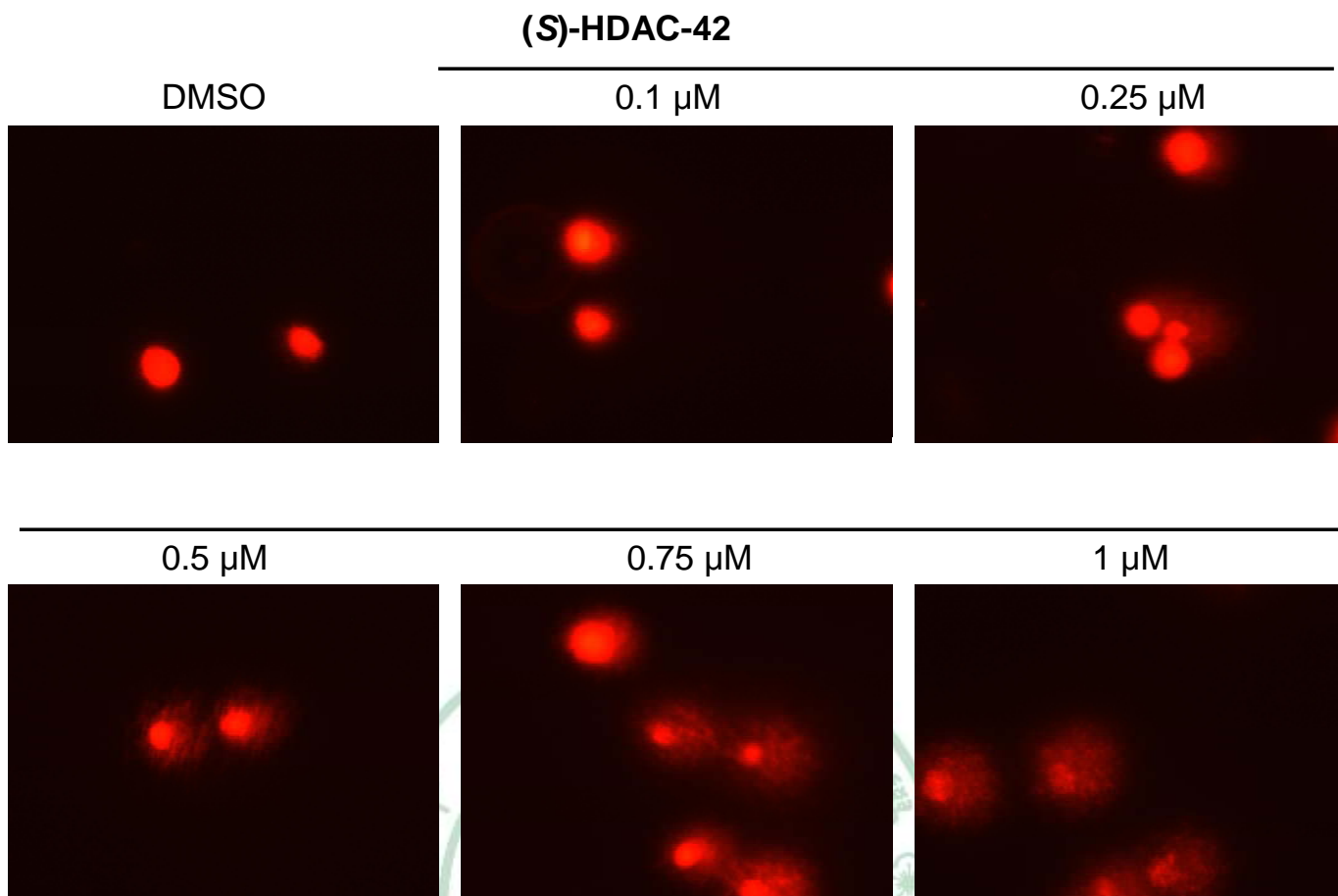


Figure 10. Evidence of apoptosis for (S)-HDAC-42 induced cell death by comet assay.

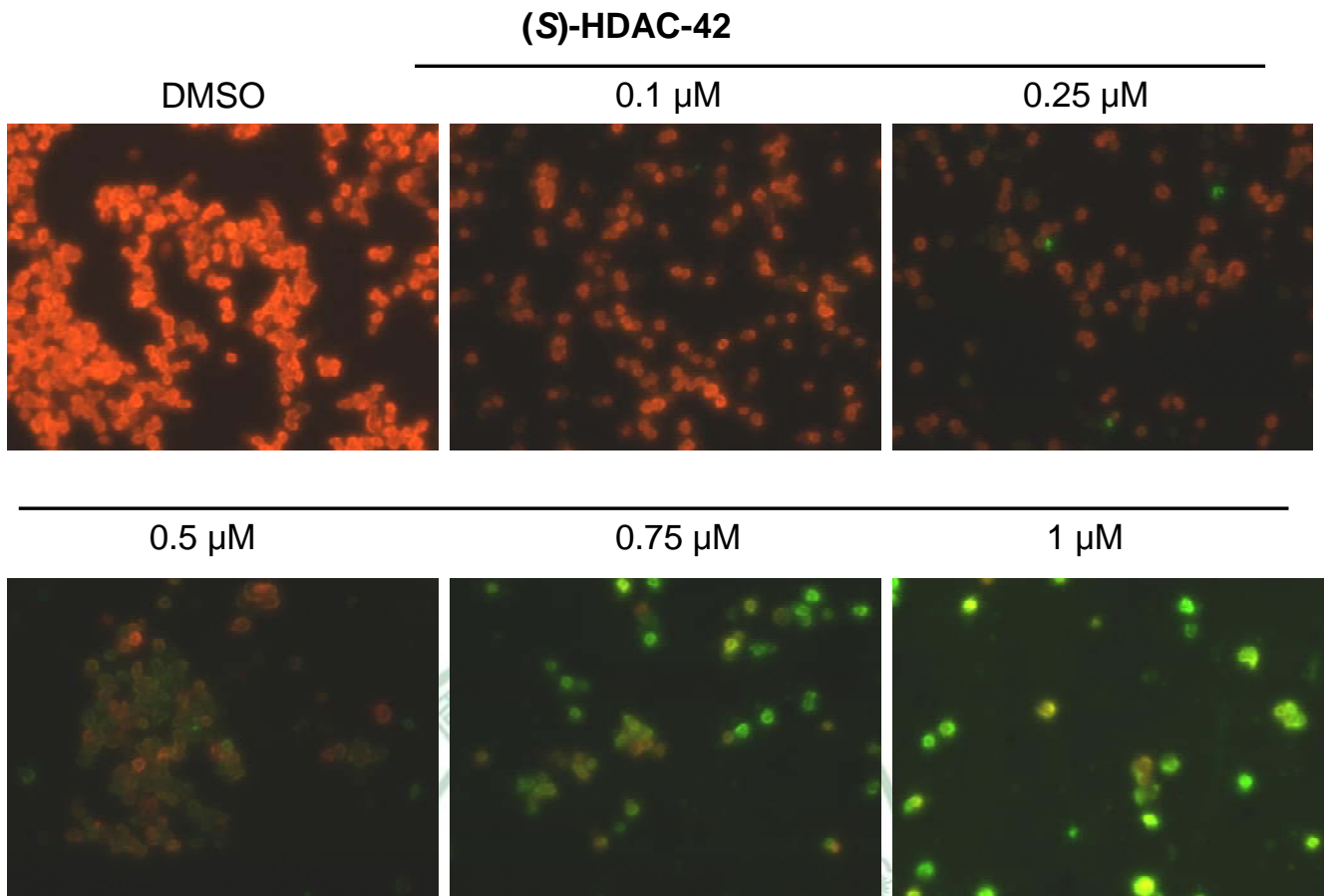


Figure 11. Evidence of apoptosis for (S)-HDAC-42 induced cell death by TUNEL assay.

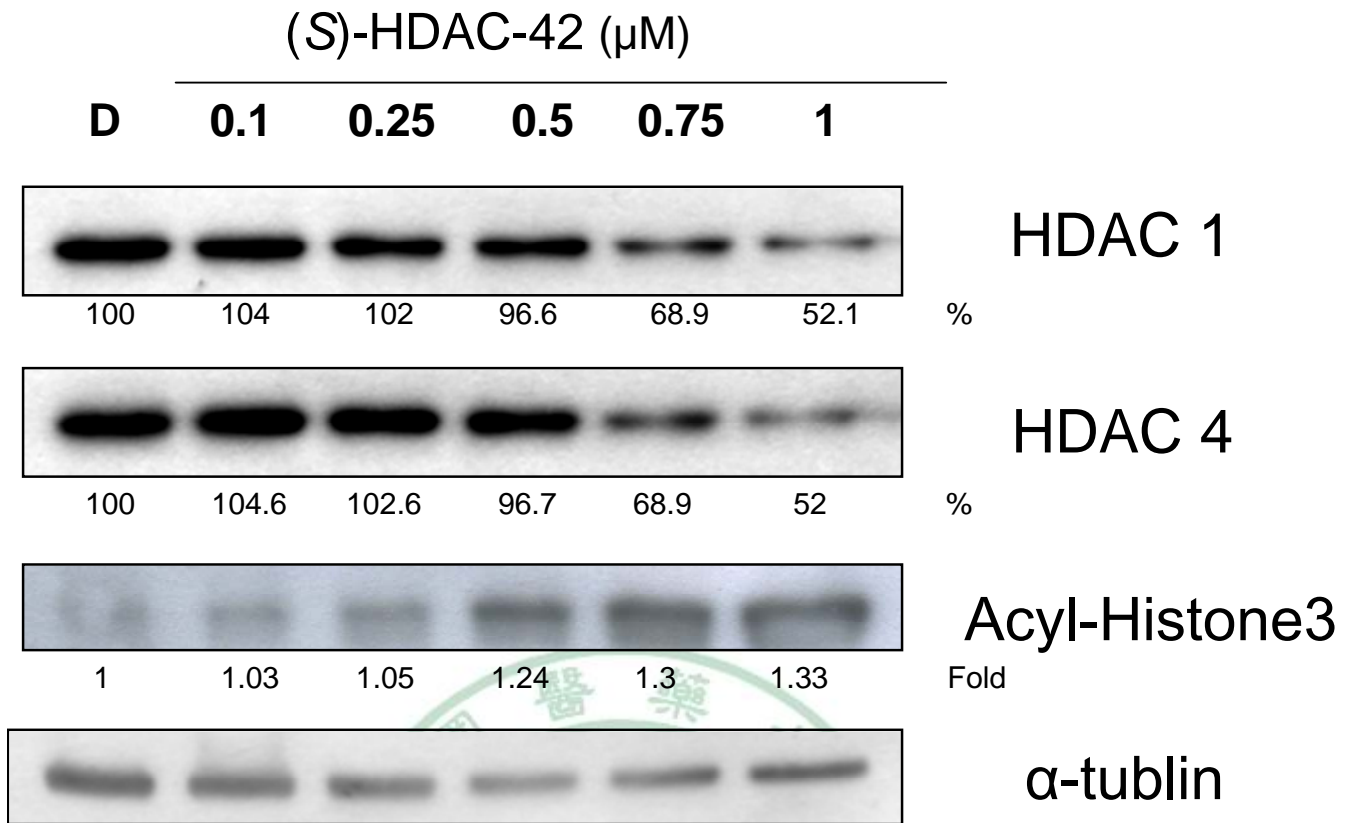


Figure 12. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of HDAC related proteins (HDAC1, HDAC4, and acyl-histone3) in multiple myeloma cells.

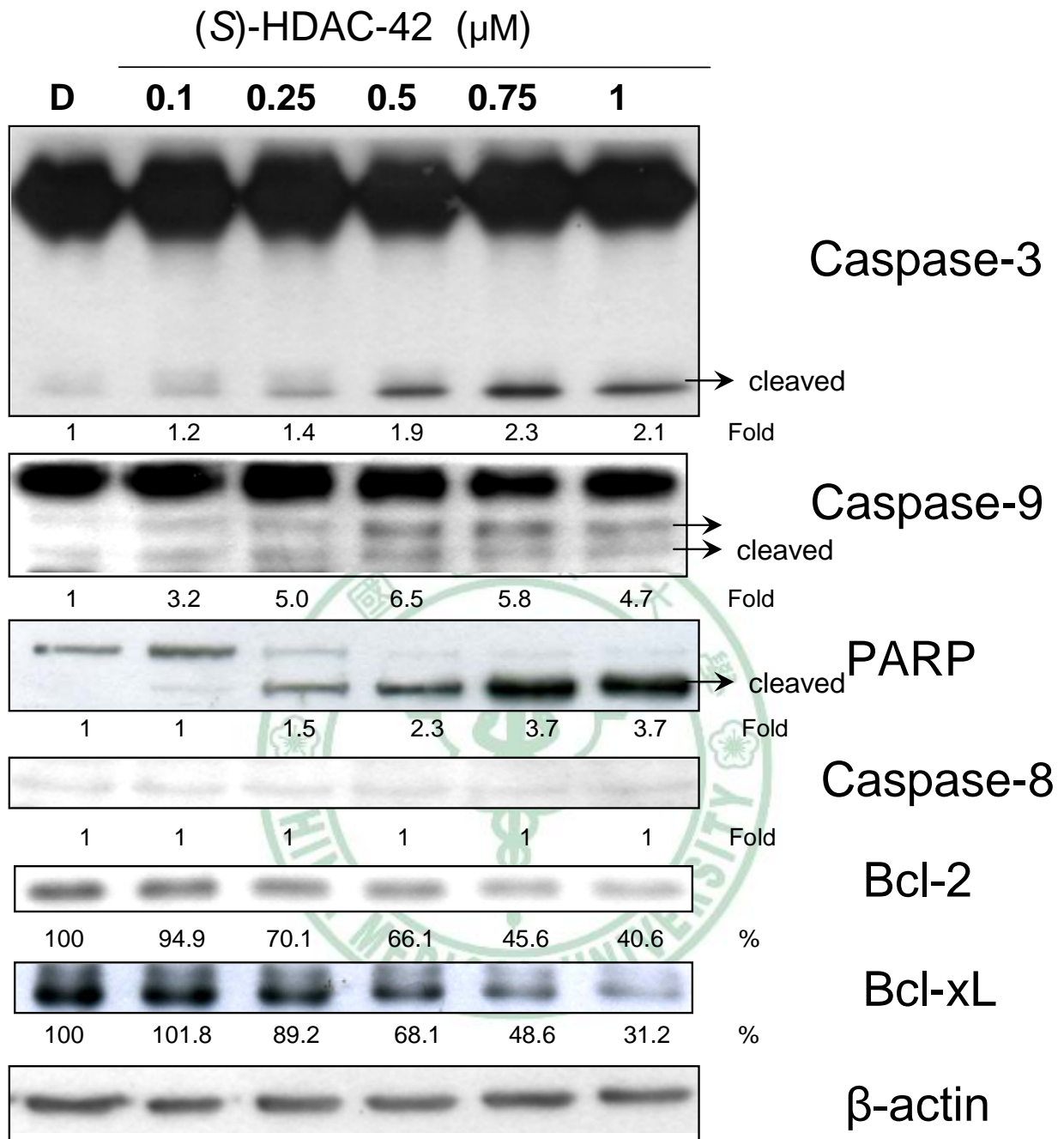


Figure 13. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of mitochondria dependent apoptotic pathway related proteins (Caspase-3, Caspase-9, Caspase-8, PARP, Bcl-2 and Bcl-xL) in multiple myeloma cells.

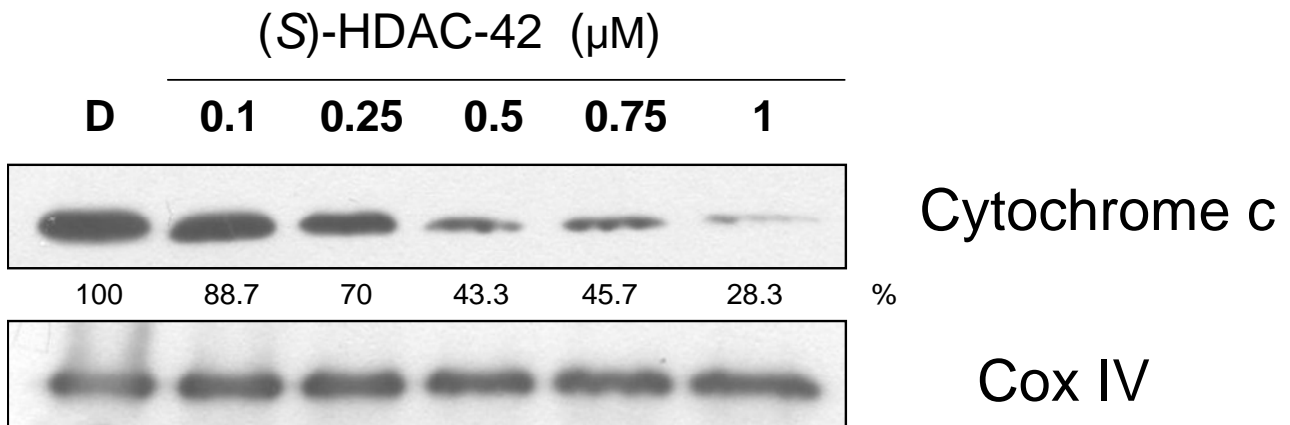


Figure 14. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of cytochrome c after mitochondria extraction in multiple myeloma cells.

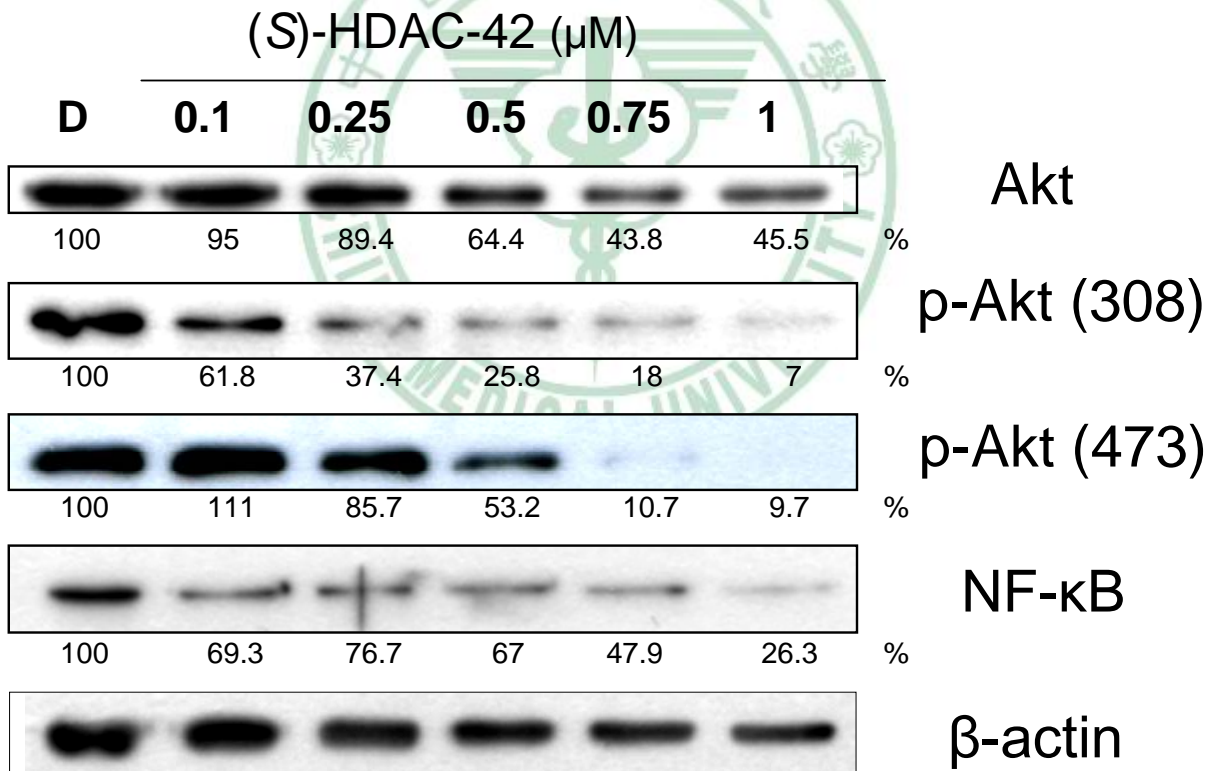


Figure 15. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of Akt pathway related proteins (Akt, phospho-Akt and NF κB) in multiple myeloma cells.

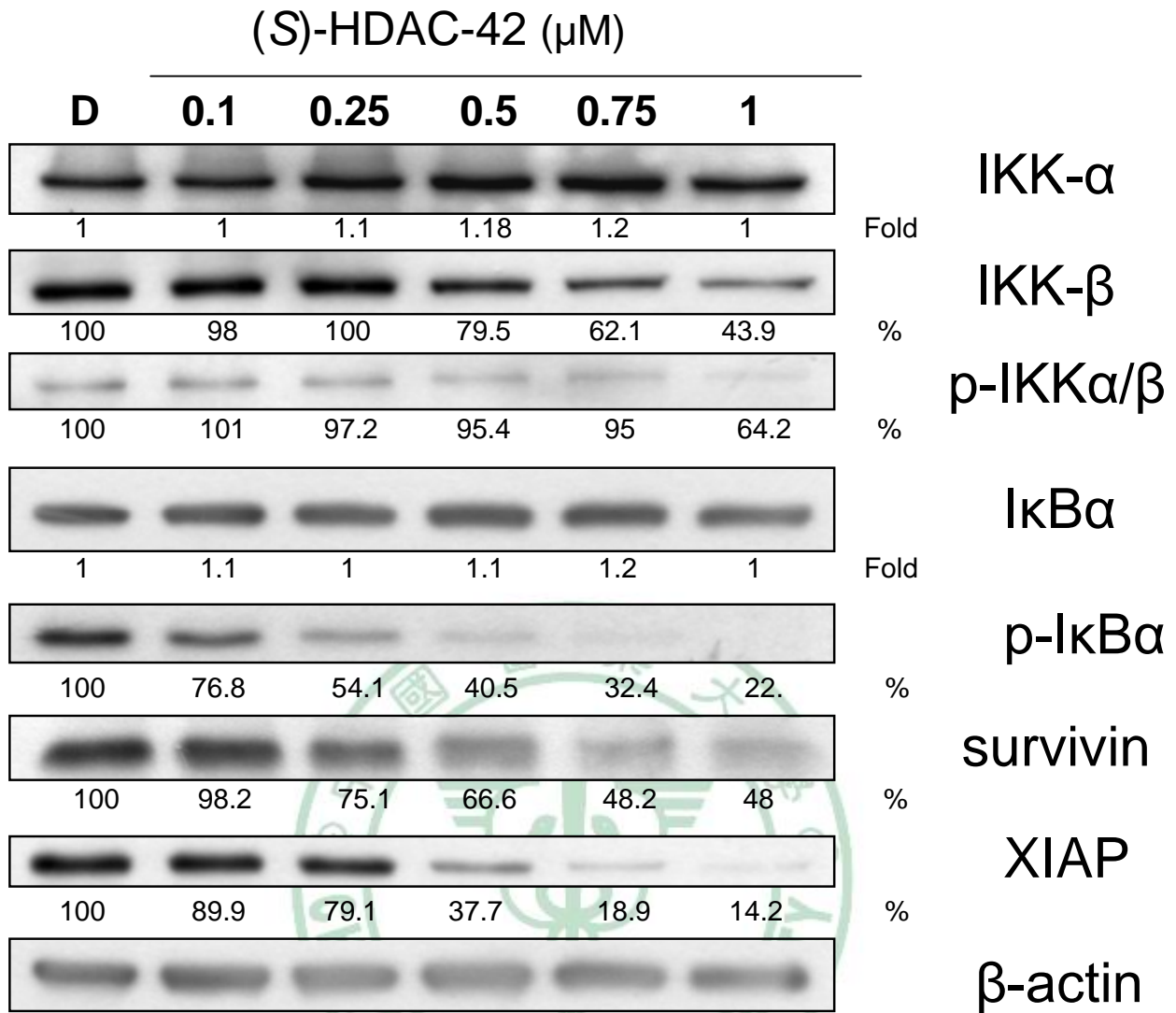


Figure 16. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of NF- κ B pathway related proteins and caspase inhibitor proteins in multiple myeloma cells.

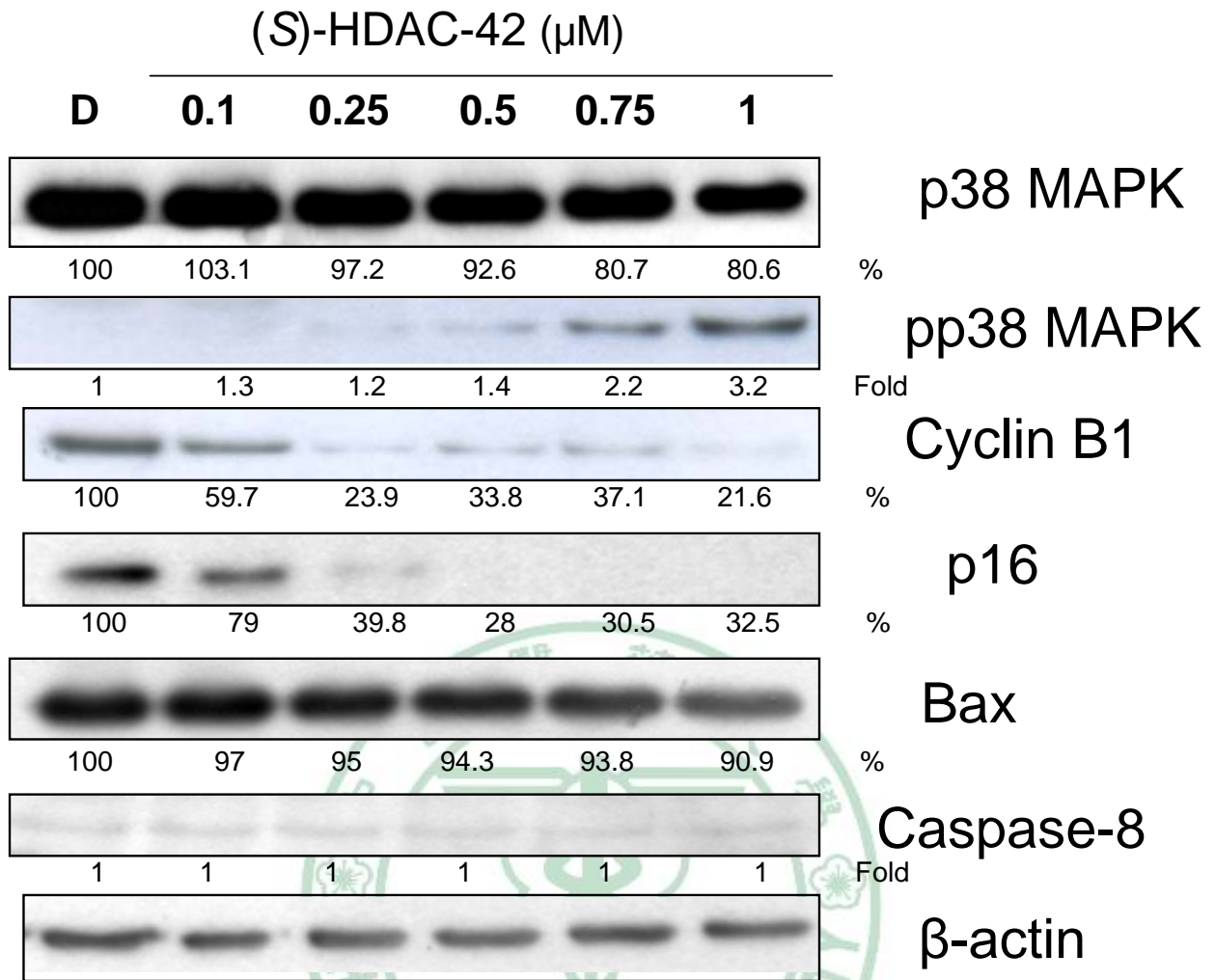


Figure 17. The effects of (S)-HDAC-42 on the expression level of p38, phospho-p38, Cyclin B1, p16, Bax and Caspase-8 in multiple myeloma cells.

第五章 討論

首先我們探討(S)-HDAC-42 和 SAHA 對於人類多發性骨髓癌細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)是否具有毒殺效果，由型態上的變化(Figure 7A)以及統計結果(Figure 7B-8)得知，SAHA 和(S)-HDAC-42 在 24 小時、48 小時以及 72 小時偵測其存活率時，發現其對於人類多發性骨髓癌細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)細胞的確有毒殺能力，且呈現隨劑量增加，毒殺活性更加明顯。

根據 MTS assay 結果統計，三株細胞中為 IM-9 對(S)-HDAC-42 具有最敏感影響，故選用該株癌細胞作為後續研究對象。此外，經過統計，找出 IC₅₀ 約為 0.30 μ M(表十三)，因此設定 0.1、0.25、0.5、0.75、1 μ M 作為之後實驗的濃度梯度，從 MTS assay 結果可觀察出細胞存活率在作用 48 小時有明顯變化，故為未來實驗的時間設定。

現代生物學將細胞死亡大致分為細胞凋亡和細胞壞死兩大類。當細胞壞死同時，往往會因為破裂而釋放出許多細胞激素，連帶影響周邊的細胞，因此在對於除去患處而不影響周邊正常組織的條件下，會希望癌細胞是以凋亡的方式死亡。細胞凋亡是以細胞核濃縮、染色體DNA被以核小體為單位切成梯狀片段(Ladder)、細胞縮小，最終形成細胞凋亡小體(Apoptotic bodies)等形態變化為特徵。而細胞壞死是以粒線體以及其他細胞器腫大、細胞膨脹、導致細胞膜破裂等形態變化為特徵，染色體DNA被切成不均等的片段。而目前檢測細胞凋亡的實驗原理，也是根據這些變化特徵作為判斷的依據。

在得知SAHA和(S)-HDAC-42對於人類多發性骨髓癌細胞株(U266, IM-9 and RPMI-8226)中，是具有引發細胞凋亡能力後。我們期望是透過細胞凋亡的方式來降低存活率。故以三種不同的方式檢測：Annexin V/PI staining (Flow Cytometry)、Comet assay、TUNEL assay。

在Annexin V/PI staining (Flow Cytometry)實驗結果中，代表活細胞的Q3訊號比例，隨著藥物作用濃度增加而下降，相對地，代表早期凋亡的Q4訊號比例則是上升(Figure 9)。代表藥物作用會引起人類多發性骨髓癌細胞(IM-9)膜外翻。

DNA 斷裂在研究上，已被視為細胞凋亡最具代表的細胞特徵，comet assay 中，利用試劑使細胞膜不完整，並將 DNA 變性，經過電泳，若是 DNA 完整會因分子太大而留在原地，相對的碎裂的小分子細胞則是會被拉出細胞外。經過 PI 染劑的結合，在螢光顯微鏡下會顯現紅色螢光。結果顯示，DNA 的拖尾程度隨著藥物濃度上升而有上升的趨勢(Figure 10)。

TUNEL assay 中，利用外加細胞酵素以及labeled dUTP將受損DNA修補，換句話說，若是DNA有受損，就會發具labeled的訊號。其訊號是在螢光顯微鏡下發出綠色螢光，而PI染劑會發出紅色螢光標的完整DNA的位置。結果顯示，DNA的斷裂程度隨著藥物濃度上升而有增加的趨勢(Figure 11)。

在我們的實驗Comet assay和TUNEL assay中，間接證實藥物作用會引起人類多發性骨髓癌細胞(IM-9)DNA斷裂。三個變化特徵都可以用於判斷(S)-HDAC-42對於人類多發性骨髓癌細胞株(IM-9)，是具有促進細胞凋亡能力的。

為了從蛋白質訊息傳遞的觀點來了解，(S)-HDAC-42 是如何在人類多發性骨髓癌細胞株(IM-9)中來引發細胞凋亡，我們利用西方墨點法來檢視各種蛋白質，來探討(S)-HDAC-42 對細胞中蛋白質表現量影響。

(S)-HDAC-42 最主要的生理活性即為組蛋白去乙酰酶(HDAC)的抑制劑。而組蛋白去乙酰酶(HDAC)家族成員有：HDAC1、2、3、4、5、6、7、8。在基因轉錄的開始，DNA 原本是以纏繞著組蛋白(Histone)的形式捲成染色體的形狀，這樣形式的 DNA 是無法進行轉錄的。當組蛋白(Histone)經過修飾(remodeling)後，例如：乙酰基化或去乙酰基化，可調節 DNA 的開關，達到調節基因轉錄的效果。

當組蛋白乙醯酶抑制劑(HDACi)於胞中發揮其抑制效果，會使組蛋白上乙醯基含量變多，此時DNA打開進行基因轉錄，同時許多因病變而沉默的抑癌因子，例如：p53，能恢復表現，對抗癌化(18)。

在本實驗中，當人類骨髓癌細胞株(IM-9)經(S)-HDAC-42處理48小時過後，隨藥物濃度增加，由western blotting得知HDAC1與HDAC4的蛋白表現量減少。表示(S)-HDAC-42的確具有減少HDAC表現量的能力(Figure 12)。

粒線體路徑(mitochondria dependent pathway)所誘發的細胞凋亡機制是最具代表意義的。細胞受到細胞外或細胞內的壓力及傷害時，例如：放射性輻射、氧氣不足、藥物、DNA damage等。會使細胞質的粒線體膜電位下降(35)，而Bcl-2蛋白位於粒線體膜的外層，調控細胞的存活(36)，另外會促使Cytochrome c從粒線體的intermembrane space釋放到細胞質中，與Apaf-1與Caspase-9結合刺激形成apoptosome，之後ATP進而活化Caspase-9的複合物，Caspase-9也促使下游的caspase-3活化，最後誘導走向細胞凋亡(Figure 18) (37-39)。



Mitochondrial Control of Apoptosis

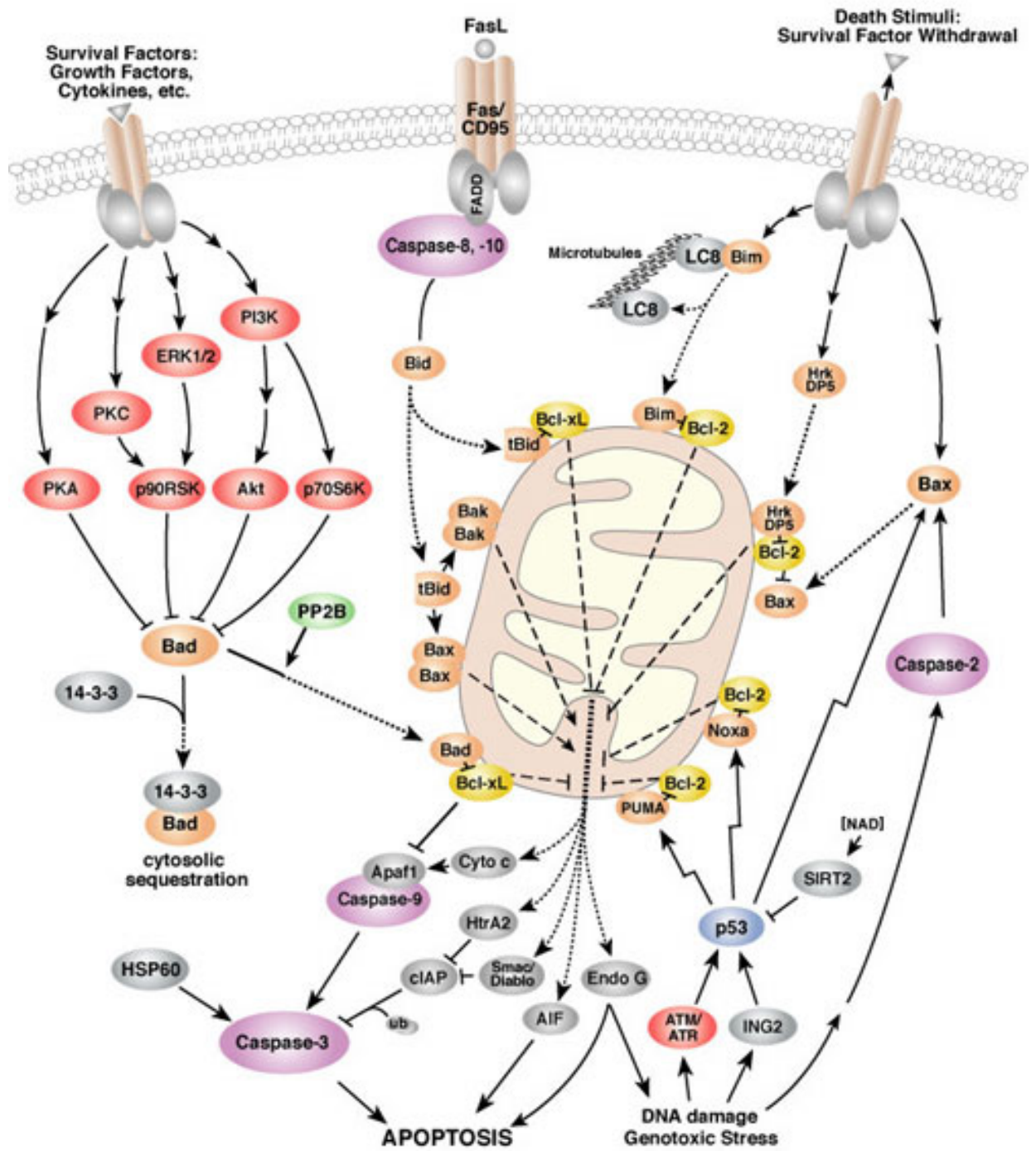


Figure 18. The cell apoptosis signal pathway

(1) Bcl-2 家族蛋白

Bcl-2 family在細胞凋亡中扮演著細胞存活調控的重要角色，可分為促使凋亡蛋白分子（pro-apoptotic protein）及抑制凋亡蛋白分子（anti-apoptotic protein）這兩類蛋白(42)。

類別	促使凋亡蛋白分子 (pro-apoptotic protein)	抑制凋亡蛋白分子 (anti-apoptotic protein)
分類	Bad、Bax、Bak、Bid、 Bik、Bim、Blk、Bok	Bcl-xL、Bcl-2、Bcl-w、 Boo、Mcl-1、Al/Bfl-1

(2) 凋亡蛋白酶(Caspase)

位於細胞凋亡路徑最下游也最必須的一群酵素。是主要開啟凋亡工作的蛋白-凋亡蛋白酶 cysteine aspartyl-specific protease (Caspase)，這類蛋白平常是以未活化形式存在細胞質中，一旦接受到專一性刺激，便行 cleavage 斷成活化態(active form)，接著進行一連串的酶解作用(proteolysis cascade)。凋亡蛋白可分為兩大類：

- a. Initiator caspases：主要功能是将未活化(pro-form)的 effector caspases 酶解使其活化（例如：Caspase-2, Caspase-8, Caspase-9 和 Caspase-10）
- b. Effector caspases：主要功能是将執行凋亡蛋白的酶受質酶解使其活化（例如：Caspase-3, Caspase-6 和 Caspase-7)(44-45)。

(3) 細胞色素 C (cytochrome c)

當粒線體凋亡機制被啟動之後，粒線體膜電位會下降，使的通透性提高，原本位於粒線體內的 cytochrome c 會被釋放到細胞質(43)與 Apaf-1(Apoptosis activating factor-1)作結合進而活化 caspase-3、caspase-9 等蛋白，而活化態的 caspase-3 又會酶解 PARP (Poly ADP-ribose

polymerase)，其為具有 DNA 修復功能的蛋白，使的 DNA 受損卻無法獲得修補，DNA fragmentation，最後走向細胞凋亡(40)。

在本實驗中，當人類骨髓癌細胞株(IM-9)經(S)-HDAC-42 處理 48 小時過後，隨著藥物濃度增加，由 western blotting 觀察到(S)-HDAC-42 負面調控 anti-apoptotic protein—Bcl-2 和 Bcl-xL 的蛋白表現量；而正面調控 pro-apoptotic protein—caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表現量(Figure 13)。同時促進 cytochrome c 從粒線體的釋放(Figure 14)。換言之，(S)-HDAC-42 對於人類多發性骨髓癌細胞株(IM-9)，是具有透過粒線體路徑 (mitochondria dependent pathway)來促進細胞凋亡能力的。

Akt pathway，主要在細胞當中負責增生、分化的訊息活化，由於在訊息傳遞路徑中占有較上游的位置，故與各種傳遞路徑都有關聯性，可說是細胞存活不可或缺的蛋白。以癌細胞而言，其中一條關聯路徑 NF- κ B 在癌症研究被視為重要的 target pathway (47)。

NF- κ B，為一種體內的生物誘導蛋白質分子(biological trigger)，是在體內許多疾病的生理作用上扮演了重要的角色，從癌症到骨質疏鬆症，再到細菌感染，皆與之脫離不了關係(47-48)。NF- κ B 發現於哺乳動物的細胞，平時結合於另一分子--I κ B，當上游蛋白活化訊號啟動後，身為激酶的 Ikk 會將 I κ B 磷酸化，使 I κ B 被 ubiquitination，而被 proteasome 標的降解。此時 I κ B 脫離 NF- κ B，NF- κ B 恢復活性，進入細胞核，啟動基因製造蛋白質(轉錄因子) (49-50)。

在本實驗中，當人類骨髓癌細胞株(IM-9)經(S)-HDAC-42 處理 48 小時過後，隨著藥物濃度增加，由 Western blotting 觀察到(S)-HDAC-42 負面調控 Akt、NF- κ B、Ikk 和 I κ B 以及 caspase 的抑制劑 survivin 和 XIAP 蛋白表現量(Figure 15-16)。從實驗結果可判斷，(S)-HDAC-42 對於人類多發性骨髓癌細胞株(IM-9)，是具有抑制 Akt 與 NF- κ B 活性能力的。

第六章 結論

從以上多種實驗結果統整，組蛋白抑制劑(S)-HDAC-42 與 SAHA 在多發性骨髓癌細胞(U266, IM-9 and RPMI-8226)中，的確具有抑制細胞生長進而引發細胞凋亡的能力，此外，(S)-HDAC-42 比起 SAHA 具有較好的活性。

在多發性骨髓癌細胞株(IM-9)，經過 (S)-HDAC-42 藥物加入 48 小時後，會使胞內 Akt 蛋白活化被抑制，同時抑制 IKK 激酶的活性，如此一來，NF- κ B 抑制劑 I κ B 就不會被磷酸化而被 ubiquitin 所標定而被 proteasome 降解，身為轉錄因子的 NF- κ B 就無法被釋放入核，以此方式來抑制 NF- κ B 的活性。同時 caspase 抑制劑(XIAP, survivin)的活性也被抑制，因此 caspase 活性上升，最後細胞就走向細胞凋亡(Figure 19)。其 Akt 的抑制和促進凋亡活性，與先前的文獻所提及實驗假設相符。

以上結果都可顯現出，(S)-HDAC-42 對於多發性骨髓癌的治療是有潛力的，甚至更優於目前傳統的治療方式及藥物，但其藥物活性機制，仍須更深入的探討。

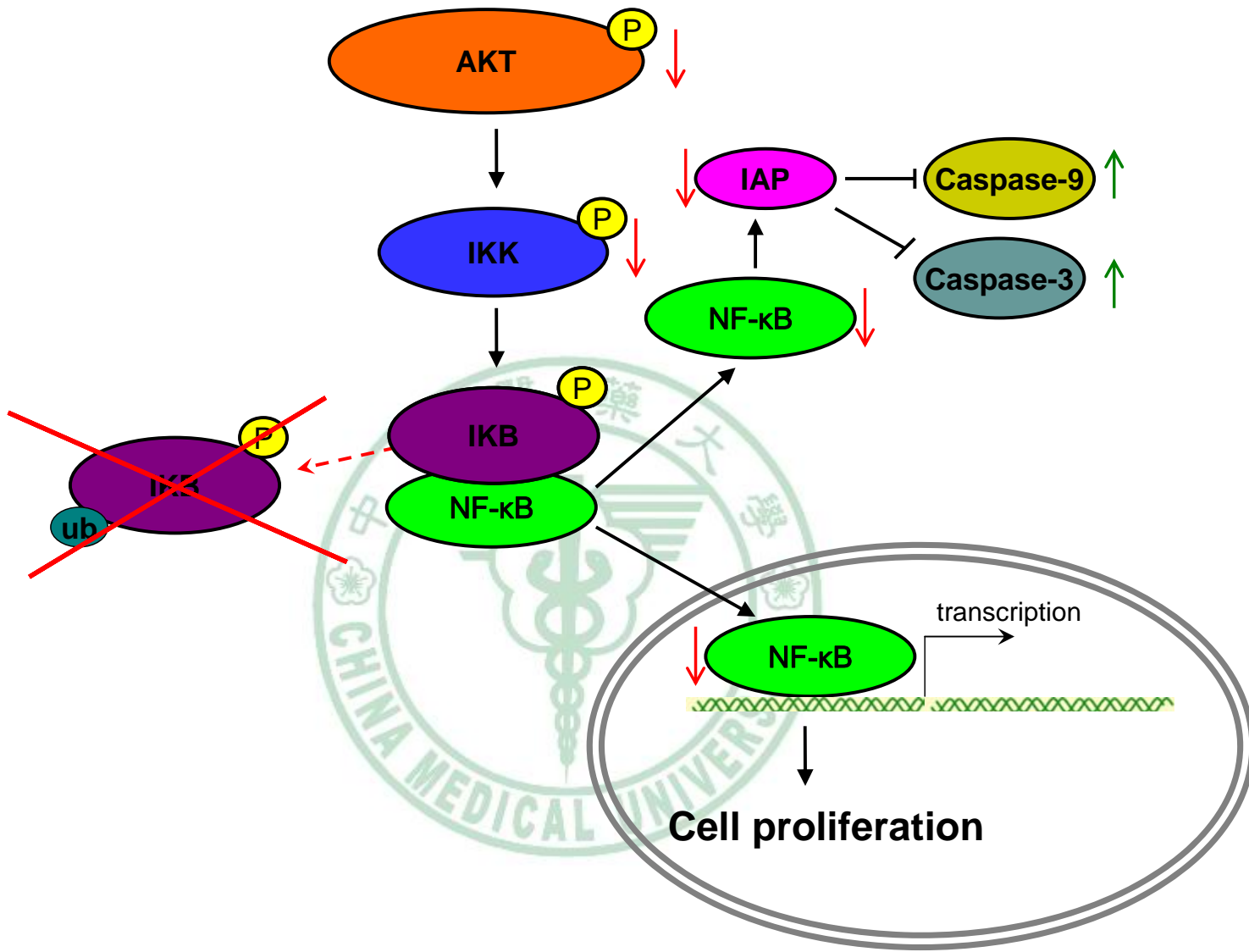


Figure 19. The signal transduction effects of (S)-HDAC-42 in multiple myeloma cells

第七章 參考文獻

- (1) 行政院衛生署發布 96 年十大死因
<http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DisplayStatisticFile.aspx?d=58880>
- (2) Garcia-Bates, T. M., S. H. Bernstein, et al. (2008). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Garcia-Bates, Bernstein et al.) Overexpression Suppresses Growth and Induces Apoptosis in Human Multiple Myeloma Cells." *Clin Cancer Res* 14(20): 6414-6425.
- (3) Weihrauch, M. R., D. Stippel, et al. (2008). Complete remission in a colon cancer patient with a large, irresectable liver metastasis after XELOX/cetuximab/bevacizumab treatment. *Onkologie* 31(8-9): 464-467.
- (4) Annahazi, A., I. Nemeth, et al. (2008). "[Amyloidosis induced colonic stricture. The first symptom of myeloma multiplex. A case report]." *Orv Hetil* 149(25): 1181-1185.
- (5) Brook, J., Bateman, J.R., and Steinfeld, J.L. (1964). Evaluation of Melphalan (Nsc-8806) in Treatment of Multiple Myeloma. *Cancer Chemother Rep* 36: 25-34.
- (6) Brook, J., Bateman, J.R., and Steinfeld, J.L. (1964). Evaluation of Melphalan (Nsc-8806) in Treatment of Multiple Myeloma. *Cancer Chemother Rep* 36:25-34.
- (7) Anderson, K.C., and Prince, H.M. (2005). Lenalidomide and thalidomide: an evolving paradigm for the management of multiple myeloma. *Semin Hematol* 42, S1-2.
- (8) Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Ghobrial, I., Hideshima, T., Munshi, N., and Anderson, K.C. (2008). Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 8: 1053-1072.
- (9) Stein, R., Smith, M.R., Chen, S., Zalath, M., and Goldenberg, D.M. (2009). Combining milatuzumab with bortezomib, doxorubicin, or dexamethasone improves responses in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res* 15:

2808-2817.

- (10) Hazarika, M., Rock, E., Williams, G., Dagher, R., Sridhara, R., Booth, B., Farrell, A., Justice, R., and Pazdur, R. (2008). Lenalidomide in combination with dexamethasone for the treatment of multiple myeloma after one prior therapy. *Oncologist* 13: 1120-1127.
- (11) Kiziltepe, T., Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Yasui, H., Shiraishi, N., Okawa, Y., Ikeda, H., Vallet, S., Pozzi, S., et al. (2007). 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 6: 1718-1727.
- (12) Billam, M., Sobolewski, M.D., and Davidson, N.E. (2009). Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*.
- (13) Kulp, S. K., C. S. Chen, et al. (2006). "Antitumor effects of a novel phenylbutyrate-based histone deacetylase inhibitor, (S)-HDAC-42, in prostate cancer." *Clin Cancer Res* 12(17): 5199-206.
- (14) Bjorkman, M., K. Iljin, et al. (2008). "Defining the molecular action of HDAC inhibitors and synergism with androgen deprivation in ERG-positive prostate cancer." *Int J Cancer* 123(12): 2774-2781.
- (15) Marrocco, D. L., W. D. Tilley, et al. (2007). "Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) represses androgen receptor expression and acts synergistically with an androgen receptor antagonist to inhibit prostate cancer cell proliferation." *Mol Cancer Ther* 6(1): 51-60.
- (16) Petrella, A., C. W. D'Acunto, et al. (2008). "Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1." *Eur J Cancer* 44(5): 740-749.
- (17) Richardson, P., C. Mitsiades, et al. (2008). "Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma." *Leuk Lymphoma* 49(3): 502-507.

- (18) Law, A. Y., K. P. Lai, et al. (2008). "Histone deacetylase inhibitor-induced cellular apoptosis involves stanniocalcin-1 activation." *Exp Cell Res* 314(16): 2975-2984.
- (19) Khan, O. and N. B. La Thangue (2008). "Drug Insight: histone deacetylase inhibitor-based therapies for cutaneous T-cell lymphomas." *Nat Clin Pract Onc*
- (20) Wang, L. G., X. M. Liu, et al. (2008). "De-repression of the p21 promoter in prostate cancer cells by an isothiocyanate via inhibition of HDACs and c-Myc." *Int J Oncol* 33(2): 375-380.
- (21) Nian, H., B. Delage, et al. (2008). "Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter." *Carcinogenesis* 29(9): 1816-1824.
- (22) Im, J. Y., H. Park, et al. (2008). "Modulation of cell cycles and apoptosis by apicidin in estrogen receptor (ER)-positive and-negative human breast cancer cells." *Chem Biol Interact* 172(3): 235-244.
- (23) Yao, K. S., S. Xanthoudakis, et al. (1994). "Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia." *Mol Cell Biol* 14(9): 5997-6003.
- (24) Masood, A., K. H. Hudhud, et al. (2008). "Mediastinal plasmacytoma with multiple myeloma presenting as a diagnostic dilemma." *Cases J* 1(1): 116.
- (25) Shaheen, S. P., S. S. Talwalkar, et al. (2008). "Multiple myeloma and immunosecretory disorders: an update." *Adv Anat Pathol* 15(4): 196-210.
- (26) Huesca, M., Q. Sun, et al. (2000). "Synthetic peptide immunogens elicit polyclonal and monoclonal antibodies specific for linear epitopes in the D motifs of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein, which are composed of amino acids that are essential for fibronectin binding." *Infect Immun* 68(3): 1156-11563.
- (27) Ross, M. D. and R. L. Elliott (2008). "Thoracic spine compression fracture in a patient with back pain." *J Orthop Sports Phys Ther* 38(4): 214.
- (28) Dvorak, C. (2006). "Common complaints, difficult diagnosis: multiple

- myeloma." *J Am Acad Nurse Pract* 18(5): 190-194.
- (29) Annahazi, A., I. Nemeth, et al. (2008). "[Amyloidosis induced colonic stricture. The first symptom of myeloma multiplex. A case report]." *Orv Hetil* 149(25): 1181-1185.
- (30) THE OHIO STATE Unersivity
http://www.pharmacy.ohio-state.edu/research/research_day/posters_2006/Cheng_Hao/HDAC-42-research_day.pdf
- (31) Munoz, L., Bellido, M., Sierra, J., and Nomdedeu, J.F. (2000). Flow cytometric detection of B cell abnormal maturation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 14: 339-340.
- (32) Neviani, P., Santhanam, R., Oaks, J.J., Eiring, A.M., Notari, M., Blaser, B.W., Liu, S., Trotta, R., Muthusamy, N., Gambacorti-Passerini, C., et al. (2007). FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 117: 2408-2421.
- (33) Richardson, P., Mitsiades, C., Colson, K., Reilly, E., McBride, L., Chiao, J., Sun, L., Ricker, J., Rizvi, S., Oerth, C., et al. (2008). Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 49: 502-507.
- (34) Kuendgen, A., Schmid, M., Schlenk, R., Knipp, S., Hildebrandt, B., Steidl, C., Germing, U., Haas, R., Dohner, H., and Gattermann, N. (2006). The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 106: 112-119.
- (35) Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Bresciani, F., et al. (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 11: 77-84.
- (36) Free Rnd. RPS(1997) , The Tetrazolium Dyes MTS and XTT Provide New Quantitative Assays for Superoxide and Superoxide Dismutase 27(3):

- (37) Richardson, P., Mitsiades, C., Colson, K., Reilly, E., McBride, L., Chiao, J., Sun, L., Ricker, J., Rizvi, S., Oerth, C., et al. (2008). Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 49: 502-507.
- (38) Haase, S. B. (2004). "Cell cycle analysis of budding yeast using SYTOX Green." *Curr Protoc Cytom Chapter 7: Unit 7 23*.
- (39) Lee, E. J., B. B. Lee, et al. (2008). "Histone deacetylase inhibitor scriptaid induces cell cycle arrest and epigenetic change in colon cancer cells." *Int J Oncol* 33(4): 767-776.
- (40) Hemmati, P. G., G. Normand, et al. (2008). "Cooperative effect of p21(Cip1/WAF-1) and 14-3-3sigma on cell cycle arrest and apoptosis induction by p14(ARF)." *Oncogene* 27(53): 6707-19.
- (41) Yoshimaru, T., Y. Suzuki, et al. (2008). "Extracellular superoxide released from mitochondria mediates mast cell death by advanced glycation end products." *Biochim Biophys Acta* 1783 (12): 2332-23343.
- (42) Plesca, D., S. Mazumder, et al. (2008). "DNA damage response and apoptosis." *Methods Enzymol* 446: 107-122.
- (43) Zou, H., Y. Li, et al. (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." *J Biol Chem* 274(17): 11549-11556.
- (44) Katoh, I., S. Sato, et al. (2008). "Apaf-1-deficient fog mouse cell apoptosis involves hypo-polarization of the mitochondrial inner membrane, ATP depletion and citrate accumulation." *Cell Res* 12: 1210-1219.
- (45) Shi, Y. (2008). "Apoptosome assembly." *Methods Enzymol* 442: 141-156.
- (46) Lee, H. J., H. J. Lee, et al. (2008). "Mitochondria-cytochrome C-caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis." *Cancer Lett* 270(2): 342-353.
- (47) Autieri, M.V., Yue, T.L., Ferstein, G.Z., and Ohlstein, E. (1995). Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kB inhibit human vascular smooth

- muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 827-836.
- (48) Wooten, M.W. (1999). Function for NF- κ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. *J Neurosci Res* 58: 607-611.
- (49) Chung, C.H., Lin, K.T., Chang, C.H., Peng, H.C., and Huang, T.F. (2009). The integrin α 2 β 1 agonist, aggretin, promotes proliferation and migration of VSMC through NF- κ B translocation and PDGF production. *Br J Pharmacol* 156, 846-856.
- (50) Tan, J.K., Ni, K., Le, F., and O'Neill, H.C. (2007). Hematopoiesis of immature myeloid dendritic cells in stroma-dependent spleen long-term cultures occurs independently of NF- κ B/RelB function. *Exp Hematol* 35, 1580-1593.

