

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩 士 論 文

台灣薑科普來氏月桃及其主要成分
對抗腫瘤功效評估及其機制之探討

**The antitumor effects of *Alpinia pricei* on
human squamous carcinoma cells**

研 究 生：陳智聖 (Chih-Sheng Chen)

指 導 教 授：楊新玲 (Hsin-Ling Yang) 博士

共 同 指 導 教 授：許游章 (You-Cheng Hseu) 博士

2008 年 7 月

目 錄

摘要

Abstract

縮寫表

壹、前言.....	1
第一節、台灣薑科月桃屬(<i>Alpinia</i>)之介紹.....	4
第二節、口腔癌.....	13
第三節、細胞週期(Cell cycle)與癌症.....	24
第四節、細胞凋亡(Apoptosis)與癌症.....	32
第五節、腫瘤轉移(Metastasis)與侵襲.....	41
第六節、腫瘤異種移植動物模式(nude mice xenograft tumor model).....	45
第七節、實驗動機.....	46
貳、材料與方法.....	47
第一節、實驗儀器.....	48
第二節、實驗材料.....	49
第三節、普來氏月桃(<i>Alpinia pricei</i> Hayata)之配製.....	53
第四節、細胞培養(Cell culture).....	54
第五節、細胞生長率(Growth)、存活率(Viability)測定分析.....	59
第六節、細胞週期(Cell cycle)分析測定.....	61
第七節、細胞膜電位($\Delta\Psi$)測定分析.....	64
第八節、活性氧化物(Reactive oxygen species)測定.....	66
第九節、蛋白質定量分析與西方墨點法(Western blotting).....	67
第十節、酵素活性分析(Zymography).....	77
第十一節、動物腫瘤異種移植與組織染色.....	80

第十二節、DNA 片段偵測(DNA fragmentation detection) ……	83
第十三節、統計分析……	87
參、實驗設計流程……	88
肆、實驗結果與圖表……	91
第一部分：探討月桃萃取物(APE)對人類口腔鱗狀細胞癌細胞株 (KB cells)細胞之影響	
一、細胞實驗(<i>In Vitro</i>)……	93
(一) KB cells 之細胞生長情形……	94
(二) APE 對人類正常牙齦纖維母細胞(Human gingival fibroblast cells)細胞毒性分析……	99
(三) APE 對 KB cells 產生 DNA fragmentation 分析……	102
(四) 粒線體膜電位 $\Delta\Psi_m$ 的分析……	103
(五) 活性氧化物(Reactive oxygen species)測定……	105
(六) KB cells 細胞週期之影響……	106
(七) 西方墨點法分析細胞蛋白的表現……	108
1、細胞週期蛋白表現	
2、細胞凋亡蛋白表現	
3、細胞轉移蛋白表現	
(八) KB cells 之轉移酵素活性測定……	132
二、動物實驗(<i>In Vivo</i>) ……	133
(一) 裸鼠體重情形變化……	135
(二) 裸鼠之腫瘤生成體積變化……	137
(三) H&E stain分析……	138
(四) DNA片段偵測分析……	140

三、討論.....	141
四、結論.....	148
第二部分：探討月桃主成分(Flavokawain B)對人類口腔鱗狀上皮	
細胞癌細胞株(KB cells)細胞之影響	
一、細胞實驗(<i>In Vitro</i>).....	152
(一) KB cells 之細胞生長情形.....	153
(二) Flavokawain B 對人類正常牙齦纖維母細胞 (Human gingival fibroblast cells)細胞毒性分析.....	158
(三) Flavokawain B 對 KB cells 產生 DNA fragmentation 分 析.....	160
(四) 粒線體膜電位 $\Delta\Psi_m$ 的分析.....	161
(五) 活性氧化物(Reactive oxygen species)測定.....	163
(六) KB cells 細胞週期之影響.....	164
(七) 西方墨點法分析細胞蛋白的表現.....	166
1、細胞週期蛋白表現	
2、細胞凋亡蛋白表現	
3、細胞轉移蛋白表現	
(八) KB cells 之轉移酵素活性測定.....	179
二、動物實驗(<i>In Vivo</i>)	180
(一) 裸鼠體重情形變化.....	182
(二) 裸鼠之腫瘤生成體積變化.....	184
(三) H&E stain分析.....	185
(四) DNA 片段偵測分析.....	187
三、討論.....	188
四、結論.....	195

伍、綜合討論.....198

陸、參考文獻.....202



圖目錄

圖一、 台灣薑科普來氏月桃根部乙醇萃取物主要成分.....	12
圖二、 西元 1791~2004 年台灣地區口腔癌死亡率趨勢圖.....	14
圖三、 細胞週期各 Cyclins 蛋白表現圖.....	26
圖四、 G2/M phase 調控圖示.....	31
圖五、 細胞凋亡與細胞壞死的型態區別.....	33
圖六、 細胞凋亡調控因子圖示.....	38
圖七、 細胞凋亡路徑圖.....	40
圖八、 TIMPs 結構圖.....	43
圖九、 腫瘤轉移侵襲機制圖.....	44
圖十、 以月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時細胞型態變化.....	94
圖十一、 以月桃萃取物處理 KB 細胞 48 小時細胞型態變化.....	95
圖十二、 以月桃萃取物處理 KB 細胞 72 小時細胞型態變化.....	95
圖十三、 以月桃萃取物處理 KB 細胞 24、48、72 小時細胞存活數據 圖.....	96
圖十四、 利用流式細胞儀觀測月桃萃取物處理 KB 細胞 24、48、72 小時 sub-G1 表現.....	97
圖十五、 以月桃萃取物處理 KB 細胞 24、48、72 小時細胞生長數據 圖.....	98

圖十六、	以月桃萃取物處理 HGF 細胞 24 小時細胞型態變化.....	99
圖十七、	以月桃萃取物處理 HGF 細胞 48 小時細胞型態變化.....	100
圖十八、	以月桃萃取物處理 HGF 細胞 72 小時細胞型態變化.....	100
圖十九、	以月桃萃取物處理 HGF 細胞 24、48、72 小時細胞存活數據 圖.....	101
圖二十、	以月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時 DNA fragmentation 表 現.....	102
圖二十一、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 2、4、8 小時膜電位 變動情形.....	103
圖二十二、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 2、4、8 小時膜電位 變動量化圖.....	104
圖二十三、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、30、60、90、180 分鐘其活性氧化物生成情形.....	105
圖二十四、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、30、60、90、180 分鐘其活性氧化物生成量化圖.....	106
圖二十五、	利用流式細胞儀觀測月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時細胞 週期停滯情形.....	106
圖二十六、	以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時其細胞週期蛋白表現.....	110

圖二十七、	以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時其細胞週期蛋白量化圖.....	112
圖二十八、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、4、8、12、18、24 小時其細胞週期蛋白表現.....	113
圖二十九、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、4、8、12、18、24 小時其細胞週期蛋白量化圖.....	115
圖三十、	以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時其細胞凋亡蛋白表現.....	118
圖三十一、	以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時其細胞凋亡蛋白量化圖.....	120
圖三十二、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、4、8、12、18、24 小時其細胞凋亡蛋白表現.....	121
圖三十三、	以 150 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、4、8、12、18、24 小時其細胞凋亡蛋白量化圖.....	123
圖三十四、	以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時其細胞轉移蛋白表現.....	126
圖三十五、	以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時其細胞轉移蛋白量化圖.....	128

圖三十六、	以 150 μ g/ml 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、4、8、12、18、24 小時其細胞轉移蛋白表現.....	129
圖三十七、	以 150 μ g/ml 月桃萃取物處理 KB 細胞 0、4、8、12、18、24 小時其細胞轉移蛋白量化圖.....	131
圖三十八、	以 0、25、50、100、150、200 μ g/ml 月桃萃取物處理 KB 細胞株 24 小時,觀察細胞轉移中的 MMP-9 活性.....	132
圖三十九、	月桃萃取物對裸鼠 KB 腫瘤(A) 生成期間體重測量 (B) 實驗前後裸鼠體重差異.....	135
圖四十、	月桃萃取物對裸鼠 KB 腫瘤(A) 腫瘤外觀比較 (B) 裸鼠腫瘤體積測量變化.....	137
圖四十一、	控制組裸鼠腫瘤組織病理切片(H&E stain).....	138
圖四十二、	月桃萃取物組裸鼠腫瘤組織病理切片(H&E stain)	139
圖四十三、	控制組與月桃萃取物組裸鼠腫瘤內部 DNA fragmentation 表現.....	140
圖四十四、	以月桃主成分(FKB)處理 KB 細胞 24 小時細胞型態變化.....	153
圖四十五、	以 FKB 處理 KB 細胞 48 小時細胞型態變化.....	154
圖四十六、	以 FKB 處理 KB 細胞 72 小時細胞型態變化.....	154
圖四十七、	以 FKB 處理 KB 細胞 24、48、72 小時細胞存活數據圖.....	155

圖四十八、	利用流式細胞儀觀測 FKB 處理 KB 細胞 24、48、72 小時 sub-G1 表現.....	156
圖四十九、	以 FKB 處理 KB 細胞 24、48、72 小時細胞生長數據圖.....	157
圖五十、	以 FKB 處理 HGF 細胞 24 小時細胞型態變化.....	158
圖五十一、	以 FKB 處理 HGF 細胞 24 小時細胞存活數據圖.....	159
圖五十二、	以 FKB 處理 KB 細胞 24 小時 DNA fragmentation 表現.....	160
圖五十三、	以 10 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 1、2、6、12 小時膜電位變動情形.....	161
圖五十四、	以 10 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 1、2、6、12 小時膜電位變動量化圖.....	162
圖五十五、	以 10 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 0、60、120、180、240 分鐘其活性氧化物生成情形.....	163
圖五十六、	以 10 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 0、60、120、180、240 分鐘其活性氧化物生成量化圖.....	164
圖五十七、	利用流式細胞儀觀測 FKB 處理 KB 細胞 24 小時細胞週期停滯情形.....	165
圖五十八、	以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 24 小時其細胞週期蛋白表現.....	167

圖五十九、	以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 24 小時其細胞週期蛋白量化圖.....	169
圖六十、	以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 24 小時其細胞凋亡蛋白表現.....	172
圖六十一、	以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 24 小時其細胞凋亡蛋白量化圖.....	174
圖六十二、	以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 24 小時其細胞轉移蛋白表現.....	176
圖六十三、	以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞 24 小時其細胞轉移蛋白量化圖.....	178
圖六十四、	以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 24 小時，觀察細胞轉移中的 MMP-9 活性.....	179
圖六十五、	FKB 對裸鼠 KB 腫瘤(A) 生成期間體重測量 (B) 實驗前後裸鼠體重差異.....	182
圖六十六、	FKB 對裸鼠 KB 腫瘤(A) 腫瘤外觀比較 (B) 裸鼠腫瘤體積測量變化.....	184
圖六十七、	控制組裸鼠腫瘤組織病理切片(H&E stain).....	185
圖六十八、	FKB 組裸鼠腫瘤組織病理切片(H&E stain)	186
圖六十九、	控制組與 FKB 組裸鼠腫瘤內部 DNA fragmentation 表現.....	187

表目錄

表一、 台灣薑科月桃屬植物分類說明.....	4
表二、 歷年男性口腔癌死亡率排名.....	14
表三、 西元 2001 年全國 25~44 歲男性癌症發生率比較.....	15
表四、 罹患口腔癌之致癌物質風險評估.....	17
表五、 口腔癌分期系統.....	19
表六、 PI stain 染劑配製表.....	62
表七、 利用流式細胞儀觀測月桃萃取物處理 KB 細胞 24、48、72 小時 sub-G1 細胞比例.....	97
表八、 利用流式細胞儀觀測月桃萃取物處理 KB 細胞 24 小時細胞各週 期表現比例.....	107
表九、 月桃萃取物對裸鼠腫瘤生成期間之體重變化差異.....	136
表十、 利用流式細胞儀觀測 FKB 處理 KB 細胞 24、48、72 小時 sub-G1 細胞比例.....	156
表十一、 利用流式細胞儀觀測 FKB 處理 KB 細胞 24 小時細胞各週期 表現比例.....	165
表十二、 FKB 對裸鼠腫瘤生成期間之體重變化差異.....	183
表十三、 月桃萃取物與月桃主成分結果比較表.....	200

誌謝

時間過的很快，轉眼間又要邁向人生的另一個階段，回想起升大二剛進實驗室到現在的點點滴滴，真的很感謝與大家共同擁有這段美好且充實的時光。在此，我最要感謝指導老師 楊新玲教授以及師丈 許游章教授耐心的指導與鼓勵，在學術研究上給予我很大的思考空間，使我在不同的實驗過程中學習問題核心之所在。更在撰寫論文期間，對於我的論文結構、格式及內容加以指正，使論文得以順利完成。特別感謝呂鋒洲老師、廖俊旺老師、王升陽老師及柯俊良老師在百忙中審閱我的論文，並提供許多日後研究的方向等寶貴意見，使我獲益良多。也感謝營養所全體老師平日的教導與解惑

感謝實驗室的學長姐們：鈺菁、靜儀、靖容、美玲、佩娟、政憲、維榮、皇琦、美存、雅婷等學長姐悉心教導實驗的技術與方法。感謝夥伴們：依儒、永昌、康妮、依婷、彬鈞、佩伶等同學及、艾婷、鈴懿、國彰、奎銘、玉琳、寶儀、可欣、惠茹、思妤、雅雯、韻如、書緯等學弟妹於實驗上諸多的協助與切磋討論，使我成長許多。特別感謝中興大學獸醫病理所的廖俊旺老師與全體同學在動物實驗上給予我諸多的幫助，使我得以順利完成論文。

最後，感謝我的父親、母親、大哥與二哥給予我無盡的鼓勵與建議，在求學過程中給我最大的支持與鼓勵，使得我在大學、研究所的生活充實愉悅。謝謝大家！

陳智聖 謹誌

摘要

普來氏月桃(*Alpinia pricei* Hayata)是屬於台灣特有的薑科月桃屬植物。先前的研究發現月桃屬植物具有鎮靜、抗高血壓、抗氧化、抗菌及抗癌功能，但是對於抗口腔癌的研究卻很少探討，因此本研究將探討普來氏月桃萃取物(*Alpinia pricei* Hayata extract; APE)和其重要成分(Flavokawain B)對人類口腔鱗狀細胞癌細胞(Human oral squamous carcinoma cells; KB cells)及裸鼠異位移植腫瘤(nude mice xenograft tumor model)之治療模式，來探討細胞週期、細胞凋亡與轉移作用之機制。

在細胞實驗結果得知 APE 及 flavokawain B 皆隨著劑量及反應時間的增加，會抑制口腔癌細胞的 Cyclin A、Cyclin B、Cdc 2 與 Cdc25c 細胞週期的蛋白表現；增加 Wee 1、p53、p-p53、p21 的蛋白表現，使細胞週期停滯在 G2/M 期。兩種均會促進 KB 細胞內 ROS 釋放，導致粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)下降；APE 會活化 caspase-9、pro-caspase-3 與 poly(ADP)-ribosylpolymerase(PARP)表現，但 flavokawain B 則會活化 procaspase-8、procaspase-9、procaspase-3 及 PARP，再利用 TUNEL assay 確認普來氏月桃及 flavokawain B 對 KB 細胞均會造成細胞凋亡的情形。本研究同時發現 APE 和 flavokawain B 也會調控 MMP-9、uPA、PAI-1、PAI-2 與 TIMP-1 等癌細胞之轉移相關蛋白表現，並同時降低癌細胞轉移活性，因此普來氏月桃具有抑制腫瘤細胞轉移擴散的功能。在活體動物抗腫瘤試驗方面，給予注射 APE 及 flavokawain B 之實驗組其腫瘤生長顯著小於控制組，並利用 TUNEL assay 來確認腫瘤內部細胞凋亡有增加的現象。

總合上述細胞實驗與動物實驗之結果，發現 APE 及 flavokawain B 藉由調控細胞週期之蛋白表現，促使細胞停滯在 G2/M 期；並同時促使 ROS 釋放、粒線體膜電位下降、PARP 裂解，進而造成細胞凋亡。在抗

轉移方面，則會影響相關蛋白表現及活性來達到抑制癌細胞轉移的效果。因此普來氏月桃具有抗腫瘤之功效，在未來醫藥應用上可望成為有潛力的預防抗口腔癌、抗轉移藥物。

Keyword：普來氏月桃(*Alpinia pricei* Hayata)、人類口腔鱗狀細胞癌細胞(Human oral squamous carcinoma cells；KB cells)、細胞週期(Cell cycle)、細胞凋亡(Apoptosis)、轉移(Metastasis)、活體動物抗癌試驗(Xenograft tumor model)



Abstract

Alpinia pricei Hayata (*A. pricei*) is well known in Taiwan as a traditional Chinese medicine. It has been reported that *Alpinia* plants (family Zingiberaceae) possess antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, immunostimulating, hepatoprotective and antinociceptive activities. In this study, the ability of extracts of *A. pricei* rhizome (AP extracts) and flavokawain B (*A. pricei* major compound) to induce cell cycle arrest, apoptosis, and metastasis inhibition in cultured human carcinoma KB cells was investigated through nude mice xenograft tumor model *in vitro* and *in vivo*.

Treatment of KB cells with various concentrations of AP extracts (25-200 $\mu\text{g/ml}$) and flavokawain B (5-20 $\mu\text{g/ml}$) resulted in sequences of events marked by apoptosis, such as loss of cell viability, morphology change, and internucleosomal DNA fragmentation. AP extracts and flavokawain B induced apoptotic cell death was associated with loss of mitochondrial membrane potential, cytochrome c translocation, caspase-3 and -9 activation, and poly ADP-ribose polymerase (PARP) degradation. Moreover flavokawain B was also associated with caspase 8 activation. This increase in AP extract-induced apoptosis was also associated with dysregulation of Bcl-2 and Bax. Furthermore, AP extracts induced a dose-dependent elevation of reactive oxygen species (ROS) in KB cells.

Flow cytometry analysis demonstrated that AP extracts and flavokawain B blocked cell cycle progress in the G2/M phase in KB cells.

This cell cycle blockade was associated with reductions in cyclin A, cyclin B, Cdc 2, and cdc25c, and increased CDK inhibitor p53, p21 and Wee 1 in the AP extracts and flavokawain B-treated group in a dose and time-dependent manner relative to the untreated controls as evaluated using western blot analysis for cell cycle proteins, which corroborated the G2/M block.

The AP extracts and flavokawain B resulted in sequences of events marked by metastasis inhibition as shown by reductions in MMP-9 activation, down-regulation of uPA, and up-regulation of PAI-1, PAI-2, and TIMP-1 in KB cells. Our results revealed that treatment of AP extracts and flavokawain B inhibited KB tumor growth in experiment. Whereas, AP extracts and flavokawain B did not show any side effects in *vivo* studies. Therefore, *A. pricei* might have antitumor properties valuable for application in drug products.

Keyword : *Alpinia pricei* Hayata 、 KB cells 、 Cell cycle 、 Apoptosis 、 Metastasis 、 Xenograft tumor model

縮寫表

APE : *Alpinia Pricei Hayata* extracts

BSA : Bovine serum albumin

Caspase : Cysteiny l aspartate-specific protease

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DiOC6 : 3,3,- Dihexyloxacarbocyanine iodide

DCFH₂-DA : 2,7- dichlorofluorescein diacetate

ELISA : Enzyme-lonked immunosorbent assay

ECL : Enhancer chemiluminesence

FACS : Flow cytometry

FBS : Fetal bovine serum

FKB : Flavokawain B

PARP : Ppoly (ADP-ribose) polymerase

PI : Propidium iodide

PS : Penicillin-streptomycin

PBS : Phosphate-buffered saline

PBST : Phosphate-buffered saline-Tween-20

ROS : Reactive oxygen species

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TEMED : N,N,N,N"-Tetramethylene diamine

Tris : Tris (hydroxymethyl)-aminomethane

TUNEL : Terminal deoxynucleotidy transferase (TdT)-mediated dUTP nick
end labeling



全球薑科(Zingiberaceae Lindl.)植物有 53 屬(genus)，超過 1200 種(species)，是薑目(Zingiberales)中種類最多的一科。薑科植物外部形態特徵主要具有葉舌(ligule)、雄蕊(fertile anther)且植物體內含有芳香精油(essential oil)。薑科主要分佈於墨西哥中部以南的中南美洲及整個南美洲；其餘各屬分佈在亞洲或往南延伸到澳洲【Kress et al., 2002】。

月桃屬(*Alpinia* Roxb.)是薑科中種類最多且分布最廣的一屬，從斯里蘭卡、印度的高止山脈以西到中國、日本、整個東南亞，越過太平洋遠至斐濟、薩摩亞(西南太平洋一群島)、卡洛林群島(Caroline Islands，位於西太平洋，新幾內亞東北方)，南至澳洲的新南威爾斯北方，共有230種左右【楊, 1998】。台灣產薑科月桃屬植物有14種之多，一般常見的月桃多廣泛分布於全島低海拔山區；其中又主要以島田氏月桃(*A. shimadai*)、阿里山月桃(*A. sessiliflora*)、川上氏月桃(*A. kawakamii*)及普來氏月桃(*A. pricei*)等四種最為常見。

在台灣，常見成簇的月桃除了作為觀賞植物，也有被利用在日常生活中，如使用月桃葉來包粿、包粽；取其地下莖當作烹煮食物的辛香料。月桃(*Alpinia zerumbet*)是薑科月桃屬的多年生草本植物；月桃之根莖部位具有芳香氣味，常被利用來作為生薑的代替品。民間相傳，將月桃根莖部位煮湯服用後，具有排汗、利尿及減緩消化性潰瘍、

感冒症狀的功能。原住民常見的使用方式是將其根莖搗碎後敷在腫傷部位或煎煮服用。月桃的果實為蒴果，球形，熟時紅，鋸開裂性；種子多數且成黑色，外被白色膜質的假種皮，略帶芳香味，為製造仁丹之主要原料，亦可供做芳香健胃劑【郭, 2006】。

因此本研究選擇台灣特有種普來氏月桃(*A. pricei*)其萃取物與主成分對人類口腔鱗狀細胞癌(KB cells)的抗腫瘤功效之機制探討。







第一節、台灣薑科月桃屬(*Alpinia*)之介紹

月桃(*Alpinia*)在分類上屬於薑科植物，*Alpinia*是屬名，中文稱之為月桃屬。花序由莖軸生出，頂生（台灣），穗狀、總狀或圓錐狀，有時具苞片或小苞片。花小或大；花萼筒狀或漏斗狀，3齒裂，常1側深裂；花冠筒與萼近等長；側生退化雄蕊小或缺；唇瓣形狀各異，前端常2淺裂；花絲存或缺。果球形或橢圓形，不裂。而目前台灣有14種月桃屬植物(表一)【郭, 1997；郭, 2006】。

表一、台灣月桃屬植物分類說明

	月桃種類	圖片
一	中文名稱	普來氏月桃
	學名	<i>Alpinia pricei</i> Hayata
	分部區域	全島分佈
	外觀描述	植株高約 1m。葉邊緣及下表面中肋全部被毛，長於上表面疏被毛或上表面中肋上疏被毛(恆春半島)。總狀花序，密被毛，每朵花具短梗；小苞片生於花梗上方，三角狀卵形，短於 3mm，有時缺。果疏鬆排列，蒴果狀，球形，紅色。
二	中文名稱	阿里山月桃
	學名	<i>Alpinia sessiliflora</i> Kitamura
	分部區域	北、中、南部均分佈
	外觀描述	葉下表面中肋上全被毛(至少中肋上之縱溝被毛)。穗狀花序，密被毛；小苞片具殼狀；包被 1 朵花，長約 2.2cm；花密生。果極緊密排列，果間常見乾枯小苞片。

	月桃種類		圖片
三	中文名稱	島田氏月桃(新竹山薑)	
	學名	<i>Alpinia shimadai</i> Hayata	
	分部區域	全島分佈	
	外觀描述	葉下表面中肋上全被毛(至少中肋上之縱溝被毛)。穗狀花序，密被毛；小苞片具殼狀；包被1朵花，長約 1.5cm；唇瓣直徑約 1.6cm。果疏鬆排列，蒴果狀，球形。	
四	中文名稱	川上氏月桃	
	學名	<i>Alpinia kawakamii</i> Hayata	
	分部區域	全島分佈，高可達海拔 1500m	
	外觀描述	葉下表面密被絨毛，上表面偶疏被毛或僅於中肋處疏被毛。穗狀花序，軸密被毛；小苞片貝殼狀，包被1朵花。蒴果狀，緊密排列。	
五	中文名稱	呂宋月桃	
	學名	<i>Alpinia flabellate</i> Ridley	
	分部區域	蘭嶼與綠島	
	外觀描述	葉光滑無毛，先端漸尖，基部圓或鈍，或具突尖。圓錐花序，下方具 2 至 3 支長分枝，光滑無毛；花無小苞片。果球形，漿果狀。	
六	中文名稱	高良薑(南薑)	
	學名	<i>Alpinia galangal</i> (L.) Sw.	
	分部區域	本種為引進栽培種	
	外觀描述	葉僅具緣毛，葉緣乾時褐色。先端鈍圓狀，具小突尖。圓錐花序，每一分枝具 3-6 朵花；小苞片披針形，長約 7mm。	

	月桃種類		圖片
七	中文名稱	台灣月桃	
	學名	<i>Alpinia formosana</i> K. Schum	
	分部區域	臺灣全島	
	外觀描述	葉僅葉緣下表面被毛，其餘無毛。圓錐花序，光滑、疏被毛或僅花序軸於分枝處被毛，下方分枝常具 2 朵花(由其中下方無柄花枝小苞片包被)，上方分枝具 1 朵花。蒴果球形，具縱稜。	
八	中文名稱	山月桃	
	學名	<i>Alpinia intermedia</i> Gagnep.	
	分部區域	臺灣全島與蘭嶼	
	外觀描述	葉光滑無毛，長橢圓形或披針形。圓錐花序，下方分枝較上方分枝略長，每分枝具 3-7 朵花；小苞片長橢圓形，長約 8mm。漿果狀，球形。	
九	中文名稱	山薑	
	學名	<i>Alpinia japonica</i> (Thunb) Miq.	
	分部區域	新竹以北及宜蘭山區常見	
	外觀描述	植株高不及 1m，被毛。葉兩面被短柔毛，偶上表面被短糙伏毛。圓錐花序，每分枝具 1-3 朵花；小苞片長橢圓形，長約 5mm。果序呈總狀；果漿果狀，橢圓形。	
十	中文名稱	屈尺月桃	
	學名	<i>Alpinia kusshakuensis</i> Hayata	
	分部區域	北部及東部之低海拔山區	
	外觀描述	葉僅葉緣被毛。穗狀花序，密被毛；小苞片貝殼狀，長約 3cm，包被 1 朵花；花萼長約 2.5cm；唇瓣喉部被粗毛。蒴果狀，扁球形【吳, 2006】。	

	月桃種類		圖片
十一	中文名稱	角板山月桃	
	學名	<i>Alpinia mesanthera</i> Hayata	
	分部區域	北、中及東部山區	
	外觀描述	葉除葉緣下表面被毛外，下表面中肋兩側下半部亦被毛。圓錐花序，密被毛，分枝疏鬆排列，下方分枝上每 1 小苞片包被 2 朵花；小苞片長約 2.2cm。蒴果狀；球形至近三角形，具縱稜。	
十二	中文名稱	屯鹿月桃	
	學名	<i>Alpinia tonrokuensis</i> Hayata	
	分部區域	北部山區	
	外觀描述	葉僅葉緣下表面被毛。圓錐花序，下方分枝具兩朵花(被無梗花朵的小苞片包被)，密被毛；小苞片具殼狀，長約 3.5cm；唇瓣深黃色，具紅色斑點及條紋。蒴果狀，扁球形。	
十三	中文名稱	烏來月桃(大輪月桃)	
	學名	<i>Alpinia uraiensis</i> Hayata	
	分部區域	北部及宜蘭山區	
	外觀描述	葉僅葉緣被毛。穗狀花序(偶下方分枝具兩朵花)，密被毛；小苞片長 3-3.5cm；花萼長約 3-3.5cm。蒴果狀，近球形，直徑 2.5-3cm	
十四	中文名稱	月桃(玉桃)	
	學名	<i>Alpinia zerumbet</i>	
	分部區域	全島低海拔山區	
	外觀描述	葉下表面邊緣及中肋與下表面交界處被毛。圓錐花序，常下垂，密被毛；下方分枝具 2 朵花(由其中無梗花朵之小苞片包被)。	

月桃的葉子形狀為長橢圓狀披針形，早期的西拉雅及馬卡道族人常用月桃葉包裹粽子食用，一直流傳至今。由於月桃亦具有堅韌的纖維性，因此也可編製成涼蓆或各式的籃、盤等器物，甚至可編織成大索來綁漁家專用的鐵錨；其種子帶芳香味，為日本業者製造仁丹(口味兒)及芳香健胃劑的原料。

一、月桃之相關研究

月桃為多用途之作物，對人體具有不同的保健功能療效。據「本草綱目」記載：「縮砂薷主治虛勞冷瀉，腹中虛痛，可溫暖肝腎，和中行氣，治脾胃氣結滯不散，以補肺醒脾，養胃益腎，理元氣」。近年來，陸續發現月桃屬植物中的 *Alpinia zerumbet*(玉桃)及 *Alpinia galangal*(高良薑)亦有不同的效用，分述如下：

(一) *Alpinia zerumbet*(玉桃)

1、麻醉功能：

玉桃精油對於 Swiss 公鼠有明顯隨著劑量的提升，而呈現 antinociceptive effect，顯示與 opiate receptor(嗎啡受體)有一定的關連性【De Araújo et al., 2006】。

2、抗高血壓功能：

以 deoxycorticosterone acetate-salt (DOCA-salt)高血壓大鼠的動物模式來探討玉桃降血壓之機轉。結果發現玉桃葉萃取物不但能有效降低大鼠的血壓值，亦同時具有促進老鼠血管擴張的效果，因此其降血壓的機轉可能藉由血管擴張作用來達到降低血壓的功能【De Moura et al., 2005】。

(二) *Alpinia galangal*(高良薑)

1、抗氧化功能：

高良薑具有良好的抗氧化能力，能有效抑制 methyl linoleate 氧化【Ly et al., 2004】。

2、抗菌功能：

高良薑能有效抑制 *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus cereus* 及 *Listeria monocytogenes* 四種菌株繁殖生長【Norajit et al., 2007】。

3、抑制酪胺酸酶作用：

高良薑內的類黃酮成分在低濃度(29 µg/ml)作用下能有效抑制 B16 老鼠黑色素瘤細胞的酪胺酸酶作用，顯示對於美白有相當的幫助【Lu et al.,2007】。

4、抗癌功能：

高良薑萃取成分對於肝癌(Hep G2)、乳癌(MCF-7)、中樞神經細胞瘤(SF-268)能有效抑制其生長【An et al., 2008】。

但是到目前為止，雖然月桃的種類眾多，也有其他月桃屬植物陸續被研究出來，但是研究台灣薑科普來氏月桃報告相當少，甚至沒有任何一篇關於普來氏月桃之抗癌報告發表，因此本篇將進行普來氏月桃萃取物及其主要成分對於口腔癌細胞(KB cells)抑制生長之機制探討。

二、普來氏月桃成分純化及結構分析

(一) 普來氏月桃萃取物製備

本論文所使用之普來氏月桃採集自屏東縣潮州大漢林道，試材經由國立中興大學森林學系森林植物分類暨生態研究所曾彥學教授鑑定並製作標本保存。之後再經由國立中興大學森林學系王升陽教授實驗室將已清洗過之 80 kg 月桃根部以 70%乙醇溶液進行萃取，萃取物經減壓蒸餾濃縮後得到乙醇萃取物。

(二) 普來氏月桃萃取物成分鑑定

普來氏月桃根部乙醇萃取物其成分分析是經由管柱層

析及高效能液相層析(HPLC)分離純化，最後經由鑑定結果

確定 12 個化合物及結構(圖一)，分別為：

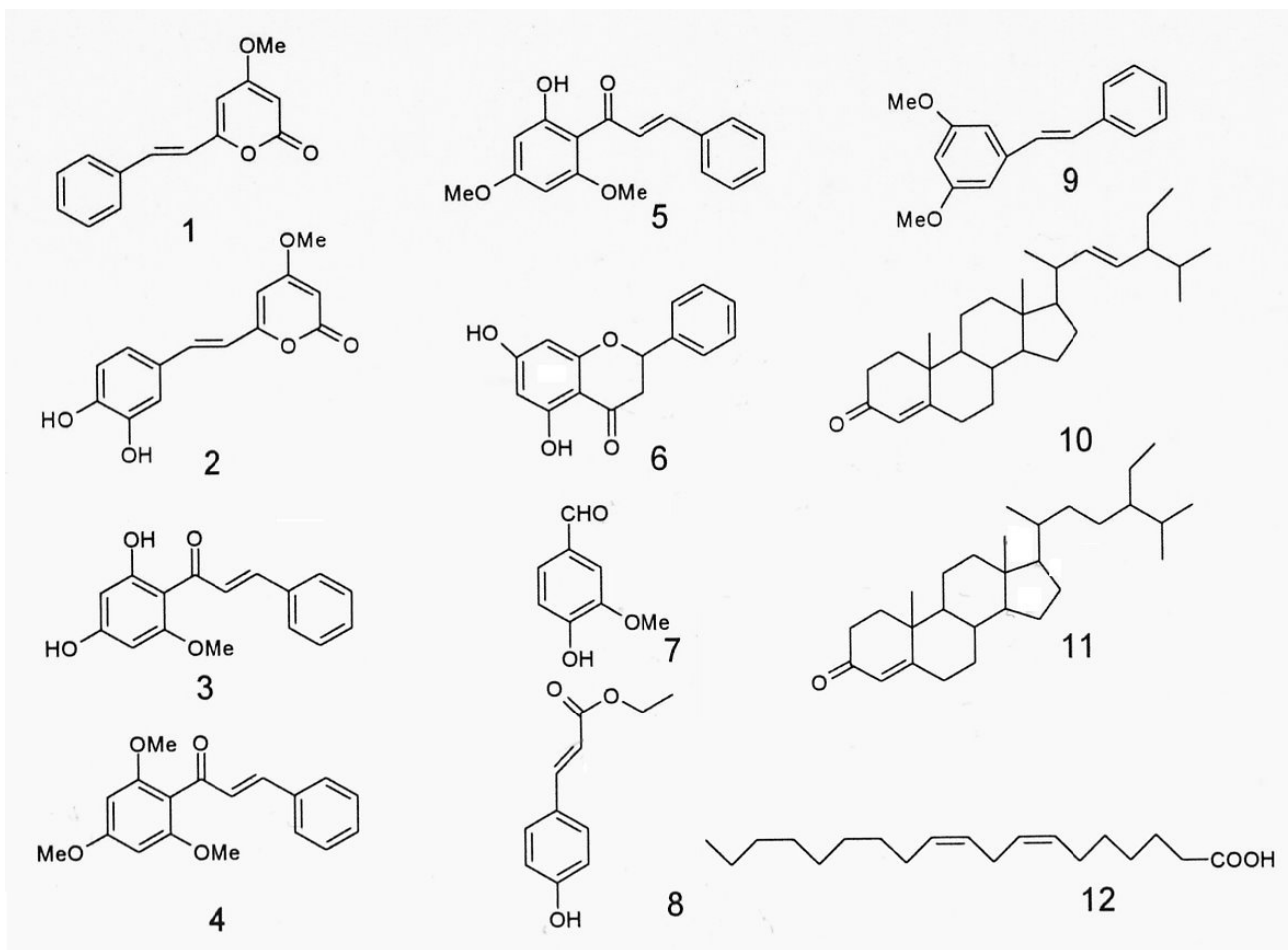
- (1) Desmethoxyyangonin
- (2) 6-(3,4-Dihydroxy-styryl)-4-methoxy-pyran
- (3) Cardamonin
- (4) 4'-Hydroxy-4'2'6'-trimethoxychalcone
- (5) Flavokawain B
- (6) Pinocembrin
- (7) Vanillin
- (8) 4-Hydroxy-*trans*-cinnamic acid ethyl ester
- (9) Di-*o*-methylpinosylvin
- (10) Stigmast-4,22-dien-3-one
- (11) β -Sitosterone
- (12) Linoleic acid

其中 Desmethoxyyangonin (1)、Cardamonin(3)、Flavokawain B(5)

更是經由王升陽教授實驗室將化合物為標準品製作檢量線，定量出

Cardamonin (3)於乙醇萃取物之重量百分率為 8.9%；Flavokawain B (5)

則為 5.7%；Desmethoxyyangonin (1)為 1.06%。



圖一、普來氏月桃根部乙醇萃取物主要成分

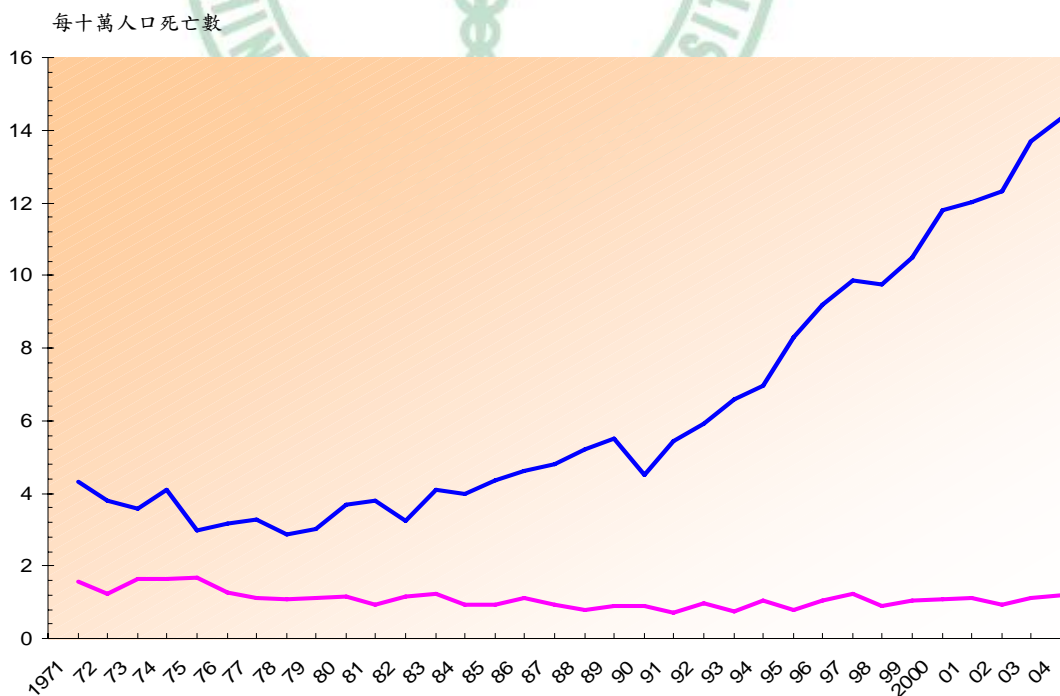
第二節、口腔癌

自民國七十一年起，癌症即躍居國人十大死因首位，其發生率與死亡率逐年增加，過去二十年間，男性主要癌症死因（肝、肺、胃、結腸直腸、口腔）持續增加，尤以口腔癌為最增加幅度最高(表二)；口腔癌的發生大多伴隨在口腔癌前病變之後。由於嚼食檳榔的文化與習慣的差異，主要發生於印度、巴基斯坦、東南亞各國、台灣，以及南非、歐洲、澳洲等地的亞洲移民及其後裔。在臺灣它好發於 20-40 歲的男性。可侵犯口腔內任何部位的黏膜，有時甚至擴張至咽喉及食道，最終導致病人口腔黏膜僵硬、張口困難及吞嚥困難，嚴重影響病人的進食、說話，大大地降低其生活品質【台灣衛誌, 2001】。

口腔癌一般界定發生範圍為口唇到扁桃腺之前，包括口唇、頰黏膜、牙齦、舌、口底部及硬、軟顎部分發生的癌症，常常容易造成病患在飲食、語言困難及顏面畸形等情形發生。目前癌症已成為台灣國人十大死因的首位，而口腔癌的盛行率也有逐年攀升的趨勢。根據民國九十五年衛生署公佈口腔癌之罹患率，男性部分竄升至所有惡性腫瘤的第四位，其中 2002~2003 年成長了 17%(圖二)，而 25-44 歲年齡層的男性癌症中，口腔癌發生率為第一位(表三)，這顯示口腔癌的發生率已呈現增加的現象。

表二、歷年男性口腔癌死亡率排名

Year	Mortality (Case Number)	Rank
1991	5.0 (494)	7
1992	5.5 (527)	6
1993	6.1 (631)	5
1994	6.3 (689)	5
1995	7.6 (830)	5
1996	8.5 (941)	5
1997	9.4 (1,041)	5
1998	9.6 (1,076)	5
1999	10.5 (1,186)	5
2000	12.1 (1,375)	5
2001	12.6 (1,436)	5
2002	13.1 (1,501)	5
2003	15.0 (1,723)	4
2004	15.0 (1,838)	4
2005	16.2 (1,874)	4
2006	17.7(2,044)	4



圖二、1971-2004 年台灣地區口腔癌死亡率趨勢圖

【中華民國行政院衛生署, 2004】

表三、民國 92 年全國男性與 25-44 歲男性癌症發生率之比較

【中華民國行政院衛生署, 2003】

順位	全國男性			25-44 歲男性		
	原發部位	個案數	粗發生率	原發部位	個案數	粗發生率
1	肝及肝內膽管	6,753	58.64	口腔、口咽及下咽	1,050	27.48
2	肺、支氣管及氣管	5,025	43.64	肝及肝內膽管	841	22.01
3	結腸及直腸	4,677	40.62	鼻咽	406	10.63
4	口腔、口咽及下咽	4,040	35.08	結腸及直腸	350	9.16
5	胃	2,308	20.04	肺、支氣管及氣管	175	4.58
6	攝護腺	2,237	19.43	食道	166	4.34
7	膀胱	1,318	11.45	胃	141	3.69
8	食道	1,258	10.92	白血病	126	3.3
9	鼻咽	1,157	10.05	皮膚	108	2.83
10	皮膚	960	8.34	甲狀腺	97	2.54

一、口腔癌的成因：

一般而言，對於口腔的慢性刺激是造成口腔癌最重要的原因，而造成口腔刺激的因素，分別為：

(一) 嚼食檳榔

長久以來，檳榔和口腔癌便被認為有密切的關係，早期研究顯示 232 位口腔癌病人，發現其中有 153 位病人有嚼食檳榔的習慣【Chang et al., 2002】，更進一步分析兩組在口腔症狀（如產生白斑症、口腔粘膜粗糙）有明顯的差

異。但另有研究指出檳榔不是完全的致癌物質，它無法單獨在倉鼠的頰黏膜囊袋產生口腔癌，亦即顯示檳榔鹼本身並不會引起癌化，必須在 $\text{pH} > 9$ 時，才會進行 mixal addition reaction 而產生口腔癌【Lin et al., 1986；Yan et al., 1989】。

(二) 吸菸

抽菸也是口腔癌發生的重要因素，因為其中包括煙草(尼古丁、焦油等)的化學作用，還加上熱的刺激作用。另外有嚼煙草習慣者，會習慣於把煙草放在口腔某一處咀嚼，很容易逐漸發展出白斑症，進而衍生成癌症。研究指出若是同時有吸菸及嚼食檳榔的習慣，則有很高的機率罹患口腔癌【Proia et al., 2006；Chen et al., 2002】。

(三) 喝酒

根據高雄醫學大學葛應欽教授 1995 年發表口腔病理學及口腔內科學雜誌中指出，酗酒較一般人(不抽煙、不喝酒、不嚼食檳榔)罹患口腔癌的比率高出 10 倍【Ko et al., 1995】，顯示酒精也是造成口腔癌的致癌物質之一(表四)。

(四) 長期溫度或化學物質的刺激

(五) 尖銳的蛀牙、殘根及製作不當或破損的補綴物(如各式假牙)

表四、罹患口腔癌之致癌物質風險評估

Alcohol drinking	Betel quid chewing	Cigarette smoking	related risk (fold)
+	+	+	123
	+	+	89
+	+		54
	+		28
+		+	22
		+	18
+			10
—	—	—	1

二、口腔癌種類及分期

口腔癌主要是以 Epidermoid carcinoma 居多，佔 80% 以上，會依發生的原因不同而有所差異【王, 1984；李, 1987】：

(一) 鱗狀細胞癌(Squamous cell carcinoma)

是口內最常見的惡性腫瘤，其癌細胞呈現出所有角化不良的特徵—多形性、不正常分裂、失去極性，同時也侵犯下方組織，而其侵犯程度則取決於腫瘤分化的期間(表五)和程度【Snehal et al., 2005】。本篇所使用的 KB cells 亦屬於口腔鱗狀細胞癌，但目前仍有人指出 KB cells 是屬於 HeLa derivative 型態的細胞癌。

(二) 梭狀細胞癌(Spindle cell carcinoma)

為鱗狀細胞癌變異，常發生在唇部。臨床上具有與鱗狀

細胞癌相同外觀，但腫瘤若受到照射或物理性傷害，則預後很惡劣。

(三) 腺樣鱗狀細胞癌(Adenoid squamous cell carcinoma)

這種極少的鱗狀細胞癌變異通常發生在老年白人男性，臨床上呈現出潰瘍、疣、角化病灶，直徑大約 1 公分。

(四) 疣狀癌(Verrucous carcinoma)

由黏膜表面向外生長，病灶幾乎都是口內，其中以齒槽嵴最好犯。具有乳頭外觀以及或寬或窄的梗，可以手術切除病灶治療之。

(五) 移行上皮細胞癌(Transitional cell carcinoma)

通常發生在舌底及口咽部。外觀呈現小的紅色暗紅莓樣或是天鵝絨樣病灶，可能出現糜爛但不會很深的潰瘍，且可觸到頸部淋巴結。對放射敏感，所以手術切除或照射法都可以治療。

(六) 淋巴上皮瘤(Lymphoepithelioma)

在鼻咽區或是扁桃區有小而不明顯的潰瘍，其病灶主要由界限不明的多邊形細胞小島所構成。

(七) 黑色素瘤(Melanoma)

在口中最發生在硬顎和上頷齒槽嵴，有兩種不同表現形

式，分別是在黏膜表淺擴張和垂直延伸進入深部組織。

表五、口腔癌分期系統

Stage Group	T (腫瘤部位) Stage	N (局部淋巴結) Stage	M (遠方轉移) Stage
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0

※ Tis—原位性癌 Carcinoma in situ

T1—腫瘤最大直徑 ≤ 2 公分

T2—腫瘤最大直徑 ≥ 2 公分，但 ≤ 4 公分

T3—腫瘤最大直徑 ≥ 4 公分

N0—臨床上摸不到頸部淋巴結；且無轉移之慮

N1—臨床上摸得到頸部淋巴結，與腫瘤同測，但無顯著現

象，有轉移之慮

M0—無遠方轉移

三、口腔癌發生部位及臨床表徵：

口腔的鱗狀細胞癌可能有多種臨床表徵，包括潰瘍、白斑及外生性病灶等症狀。可侵患口唇、頰黏膜等口腔任何部位，但是會因為發生的部位不同，其臨床表現亦不相同。

(一) 唇癌：

腫瘍多發自唇緣，先是表面形成小塊肥厚、硬結，繼而產生潰瘍，形成火山口樣或外翻式增生。

(二) 舌癌：

臨床大多是無痛腫塊或潰瘍、邊緣微隆起，或深入浸潤舌頭深部組織而固著，繼而使舌部運動困難、吞嚥及飲食不便。

(三) 口底癌：

起始時在口底部形成硬結性潰瘍，很快蔓延到舌部及下顎骨舌側黏膜，亦可侵襲深部組織、舌下腺、頷下腺。

(四) 頰黏膜癌：

多為疼痛性表面潰瘍，被認為和嚼食檳榔有密切關係。

【江, 1991；陳, 1991】

(五) 齒齦癌：

開始時為潰瘍或外生性突起於固著性牙齦。侵入顎骨，

造成齒槽骨破壞、牙齒鬆動。

(六) 顎癌：

多為表面潰瘍，邊緣突起。可向下侵入鼻腔或鼻咽部。

四、口腔癌診斷方法：

目前有三種技術用來診斷口腔癌：

(一) 活體組織檢查

是目前全國各醫院主要的診斷依據，具有絕對性及準確性。

【Montes and Schmidt, 2008】

(二) 細胞抹片【賴, 1986】

(三) 甲苯氨藍(Toluidine blue)染色【邱, 1985; Driemel et al., 2007】

五、口腔癌的治療方式：

目前口腔癌的治療方式包括：

(一) 外科手術切除(Surgical treatment) 【Oliver et al., 2007】：

主要是用於摘除原發性腫瘤及受腫瘤侵犯之骨骼及淋巴結並留下適當的正常組織邊緣。對腫瘤具有專一性(指破壞腫瘤而不破壞正常組織)是本方法的優點，但卻會造成手術後的傷殘。通常會加上顎顏面的整形重建，來彌補美觀及功能上的缺陷。

手術摘除可以使用傳統刀片、冷凍手術或雷射手術。冷凍手術是以液態氮冷凍一支探針，在將此探針放入腫瘤，使腫瘤死亡。其優點在於減少組織被移除的量，但會引起術後腫脹並結疤。雷射手術則是使腫瘤受高熱而溶解，但日後無法做病理檢查來評估切除是否成功。

(二) 放射線治療(Irradiation therapy)：

放射線可分為遠方照射、放射劑植入腫瘤床、以及兩者合併使用。遠方照射一般則用 X-ray 及放射性鈷(cobalt)從口腔外照入，而正常組織須用防護板(銅鋁製)保護。鐳、氡氣(radon gas)或活化的銥(iridium)等放射線物質可直接種植於腫瘤中，但其中鐳與氡氣必須以金或鉑包埋以減少與它接觸的組織壞死並使射線均勻分布【Grier et al., 2007；Terhaard et al., 2007】。

(三) 化學治療(Chemotherapy)：

是用化學藥物注射到腫瘤的主要供應血管內來達到治療目的。通常藥物是殺死某些退化性發育不良的細胞或阻止血管新生而達到摧毀癌細胞【Selim et al., 2007】，其中如臨床抗代謝製劑(antimetabolites)中的 methotrexate 及 5-fluorouracil (5-FU)以一定壓力注入動脈，但須配合血球計

數及全身性檢查來增減劑量。但會有輕度消化道症狀 (如：噁心、嘔吐、食慾降低等)等副作用，於停藥後即可慢慢恢復。

(四) 光動力療法(Photodynamic Therapy)：

光動力療法是以低能量雷射長時間照射激化藥物使其能量提高至不穩定的高能階狀態。當此不穩定狀態還原至基礎能階時會釋放出能量，產生自由基及單原子氧，造成細胞之氧化傷害，進而破壞細胞。藥物可選擇性的聚集在不正常的新生血管壁上，經雷射激化後，選擇性的破壞新生血管的內皮細胞，使血小板附著於裸露的基底膜上形成血栓而進一步阻塞新生血管【Biel et al., 2007；Kvaal et al., 2007】。

(五) 化學預防(cancer chemoprevention)

於 1976 年所提出，因對其癌症發生的機轉更為了解，可藉由阻斷癌症生成的某一步驟來阻止多階段癌化 (multistep carcinogenesis) 的形成。目前中草藥致力發展抗癌、抗腫瘤的化學預防功能，因此本論文將對台灣薑科普來氏月桃及其主要成分對於癌細胞(KB cells)在細胞週期停滯、細胞凋亡、細胞轉移抑制三方面來進行探討。

第三節、細胞週期與癌症

一、細胞週期(Cell cycle)

細胞週期是指細胞藉由染色體的複製及傳遞遺傳訊息賦予細胞生長、分裂的能力。當子代細胞形成後，又開始準備下一輪的細胞分裂，如此週而復始，細胞的數量不斷增加。細胞週期一開始主要可分為兩大部分，分別是interphase及mitotic phase。其中interphase又包含了G1 phase、S phase、G2 phase三個階段時期。但是當暫時停止或者是永久性停止週期，則細胞會進入休眠期(G0 phase)。

(一) Interphase

1、G1 phase

此階段會進行檢查染色體(chromosome)是否異常以及修復已受損之DNA，使細胞維持正常代謝並且繼續生長。

2、Synthesis phase

進行DNA 的合成、複製，使含量增加一倍

3、G2 phase

本期負責檢查經過G1/S phase時，其染色體DNA的複製是否完整並持續生長和合成蛋白質以準備進入下一階段-有絲分裂(mitosis)。

(二) Mitosis phase

主要是由有絲分裂 (nuclear division) 及胞質分裂 (cytoplasmic division) 所組成，目的是使細胞由一個母細胞 (mother cell) 變成兩個子細胞 (daughter cells)，並使子細胞內的染色體與母細胞一樣，之後再開始進入下一個細胞週期。

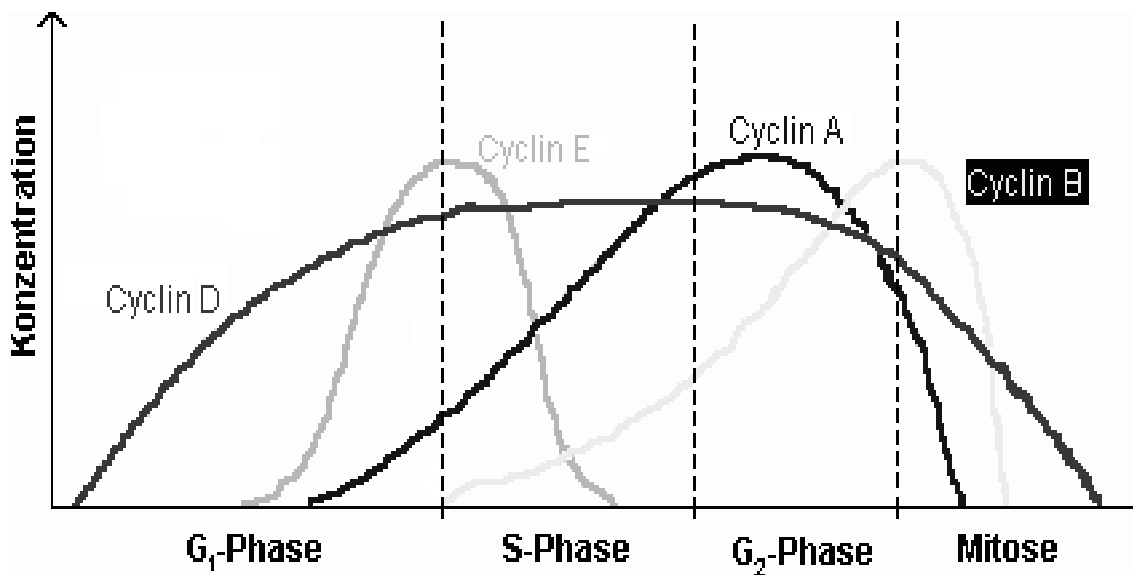
二、細胞週期檢查點 (Cell cycle check points)

當細胞受到外來的壓力時，會開始進行活化某些機制來促使細胞週期停滯，趁停滯期間進行細胞修補工作，而這些機制稱之為『檢查點』 (checkpoint) 【Singh and Agarwal, 2006】，亦即是對於細胞本身的品質控制，若是遇到無法彌補的錯誤時，細胞則會走向凋亡路徑 (apoptosis) 【Smith et al., 1996】。在整個細胞週期中存在著三個重要的 checkpoints。分別是 G1/S Checkpoint、G2 Checkpoint 和 Mitotic spindle checkpoint，分述如下：

(一) G1/S Checkpoint

通過 G1/S 及 G2 檢查點需要 Cyclin protein 及 Cyclin-dependent kinases (CDKs) 同時結合形成複合體【Long, 1995】，才能進入到下一期。目前 Cyclin protein 家族已知有 8 種 Cyclin 的存在，分別是：Cyclin A、B1,2,3、C、D1,2,3、

E、F、G及H，每種cyclin蛋白在每一時期的表現亦不同。



圖三、細胞週期Cyclin蛋白表現

(摘自 <http://www.answers.com/topic/cyclin>)

Cyclin-dependent kinases(CDKs)家族也會因為依照發現的先後順序而在後面添加數字作為命名，不同的Cyclin蛋白會對應不同的CDK的蛋白。造成本時期停滯則主要由CDK inhibitors(CDKIs)來達到停滯目的。目前CDKI可以分為兩個族群【Sherr and Roberts, 1999】：

1、Cip/Kip 家族

本家族包含了p21^{Waf1/Cip1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}，

會與Cyclin蛋白進行結合，進而抑制與CDK protein形成複合體。並且會受到p53腫瘤抑制蛋白

(tumor suppressor protein)的調控。【Muşat et al., 2004】

2、INK4 家族

本家族包含了p16^{INK4A}、p15^{INK4B}、p18^{INK4C}、p19^{INK4D}，會與CDK protein(如CDK4、CDK6)進行結合，進而引發不經由p53路徑的停滯作用。而不管Cip/Kip家族或INK4家族，最後都經由抑制CDK對Rb的磷酸化，達到G1/S期的停滯【Stewart and Pietsenpol, 2001】。

(二) G2 Checkpoint

本期的停滯原因來自於當細胞本身受到外來壓力時，會開始啟動ATM (ataxia telangiectasia mutated) / ATR (ATM and Rad3-related)路徑【Abraham and Macnicol, 2001】，使Chk2 (checkpoint kinase 2) / Chk1 (checkpoint kinase 1)磷酸化而形成活化狀態；進而在將cdc25c上的14-3-3結合位：Serine 216磷酸化【Sanchez et al., 1997】。之後吸引14-3-3與cdc25c結合，促使cdc25c停留在細胞質中，最後cdc2 (亦稱之為CDK1)活化被抑制而形成G2期停滯【Hermeking et al., 1997】。

ATM/ATR路徑會促使p53活化，之後造成14-3-3和p21的表現增加，最後cdc2被停留在細胞質中而中斷G2期。此外p21也會抑制Cyclin B/cdc2複合體結合和阻斷cdc25c的作用【Kawabe et al., 2002】，以達到阻止G2時期運行。

(三) Mitotic spindle checkpoint

當染色體呈現錯誤排列時，本檢測點會使掌控分裂動作的微小管無法與染色體上的動粒(kinetochores)結合，造成細胞分裂中斷。本期作用蛋白有：MAD2、BUBR1、BUB1、BUB3，前面兩者會直接與APC結合而抑制其作用；後兩者則是中斷微小管動作，造成分裂期停滯【Musacchio and Hardwick, 2002】。

三、細胞週期調控蛋白質

(一) G1/S phase :

G1/S期主要由Cyclin D-CDK4、Cyclin D-CDK6、Cyclin E-CDK2、Cyclin A-CDK2所調控，其中Cyclin D和Cyclin E主要存在於G1 phase，並在G1-S phase時被分解。Cyclin D-CDK4、Cyclin D-CDK6、Cyclin E-CDK2一連串複合體會促使視網膜母細胞瘤蛋白Retinoblastoma protein(pRb)逐漸完全磷酸化，造成

與先前未磷酸化的Rb結合的轉錄因子E2F釋放出來，使細胞開始進行製造S期所需蛋白【Stewart and Pietsenpol, 2001】。但是倘若cyclin D過度表現時，容易導致癌症和腫瘤因子的形成和轉移。故cyclin D在G1期的調控扮演重要角色【Fu et al., 2004】。進入S期之後，cyclin E逐漸減少，CDK2會與cyclin A結合。當要進入G2/M時期，cyclin A與cyclin B會與Cdc2 (CDK1) 結合，調節有絲分裂的進行。

(二) G2/M phase :

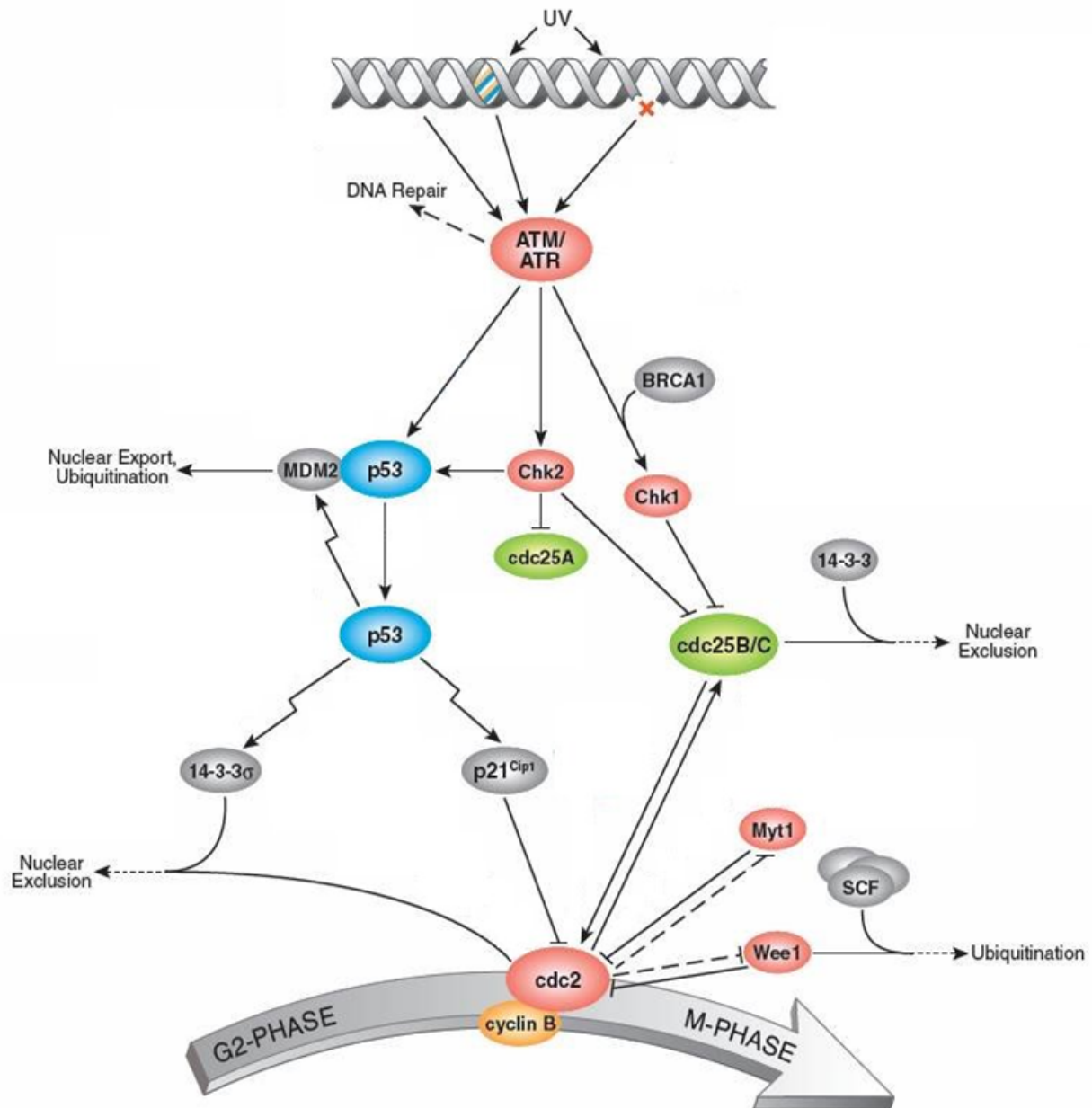
在G2/M時期cdc2 (CDK1)會與Cyclin B結合形成一個稱為M-phase promoting factor(MPF)的複合體，之後再經由CAK (CDK-activating kinase)使之磷酸化而具有活性，使得細胞進入分裂期。但是若細胞受到外來壓力時，Wee1與Myt Kinase會在cdc2的Tyr-14與Tyr-15位置產生磷酸化使其失去活性；cdc25c被磷酸化而滯留在細胞質中，最後形成G2/M phase停滯【Brooks et al. 1998】。

在INK4 family中，其功能為抑制Cyclin D/CDK4 與Cyclin D/CDK6 來控制G1期表現。另外KIP/CIP family，所調控的蛋白包括Cyclin E/CDK2、Cyclin D/CDK1、Cyclin D/CDK6、Cyclin A/CDK2及Cyclin B/CDK1等。p21幾乎在所有細胞都會表現，不

論對G1或G2期都很重要，若是p21過度表現會促使細胞週期停滯【Kawabe et al., 2002】。

四、細胞週期與癌症之關係

研究指出腫瘤細胞使負責調節細胞週期蛋白及參與細胞週期檢查點調控失去正常功能，而造成細胞癌化不斷地進行。細胞週期的檢查點上有幾種蛋白質決定細胞週期是否該停滯，例如p53會在受到外來壓力造成內部DNA受損時會表現增加，受到活化的p53因此促使p21表現增加，p21結合至Cyclin與CDK的複合體上使之無法修補錯誤的DNA序列；Wee1與Myt Kinase也會在G2/M期結合CyclinB-cdc2複合體而使其失去活性。在正常情況下，cdc25c會促進及Cyclin B與cdc2的複合物磷酸化推動細胞週期走向mitosis時期，所以當cdc25c受到影響時，細胞週期便無法正常走向下一期，結果使得細胞停止地增生。



KEY

	Kinase		Direct Stimulatory Modification		Transcriptional Stimulation
	Phosphatase		Direct Inhibitory Modification		Transcriptional Inhibition
	Transcription Factor		Multistep Stimulatory Modification		Translocation
			Multistep Inhibitory Modification		Separation of Subunits or Cleavage Products
			Tentative Stimulatory Modification		Joining of Subunits
			Tentative Inhibitory Modification		

© 2002 - 2007 Cell Signaling Technology, Inc.

Cell_Cycle_G2M_DNA .eps • created November 2002 • revised January 2007

圖四、G2/M phase 調控之蛋白質

摘自 <http://www.cellsignal.com/pathways/cell-cycle.jsp>

第四節、細胞凋亡(Apoptosis)與癌症

一、細胞凋亡(Apoptosis)

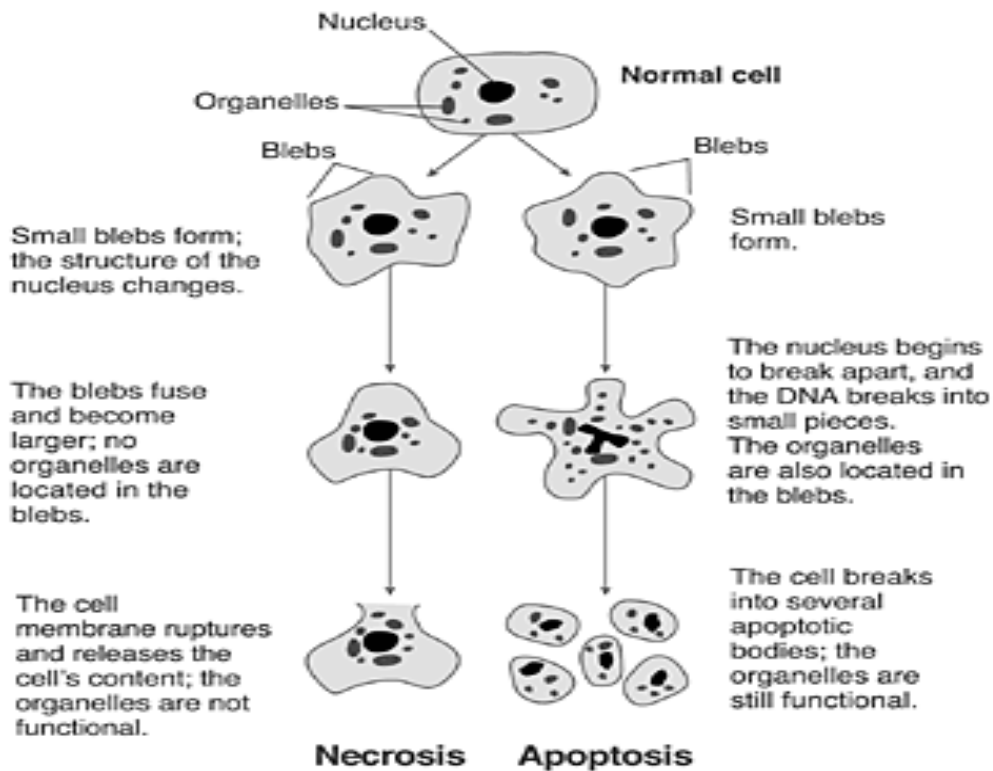
細胞死亡(cell death)的方式可分為兩種：

(一) 細胞壞死(Necrosis)

主要是細胞通透性發生改變而膨脹或破裂，並造成溶體(lysosome)釋放出各種分解酵素和細胞激素(cytokines)等物質，而使週遭組織受傷引起發炎反應。

(二) 細胞凋亡(Apoptosis)

藉由遺傳基因的控制來移除多餘或功能不全的細胞，故又稱程式性死亡(programmed cell death)。目的是保護生物個體，避免細胞脫離控制，造成突長。細胞凋亡發生時，將會造成細胞核消失、DNA片段化、細胞膜上的phosphatidylserine (PS)外翻，最後細胞分解成許多凋亡小體(cell bodies)，但是這些凋亡小體很快會被週遭的吞噬細胞(phagocytes)吸收。



圖五、細胞凋亡與細胞壞死的型態區別(Bredensen 1996 a, b)

二、參與細胞凋亡相關因素

(一) Reactive oxygen species(ROS；活性氧化物)

ROS 主要包含超氧陰離子($O_2^{\cdot -}$)、過氧化氫(H_2O_2)、和氫氧基($OH\cdot$)等一或多個不成對電子。有研究指出 ROS 會將細胞質、蛋白質與核酸進行氧化破壞，並降低粒線體上電子傳遞鏈的複合體活性，造成粒線體膜電位去極化，釋放大量的 ROS，最後造成細胞內脂質過氧化、酵素活性改變等【Xia et al., 1999】。活性氧化物在高濃度時直接造成細胞損傷；低濃度時會間接促進蛋白質激酶和

磷酸酶、轉錄因子和分子中基因表現而走向細胞凋亡

【Curtin et al.,2002；Chevrollier et al., 2005】。

(二) p53 基因調節

p53 基因是一種腫瘤抑制基因，其所轉錄的蛋白 p53 具有 393 胺基酸，分成四個功能區域，包含轉錄活化區域(1-42 胺基酸)、專一 DNA 序列結合區(102-292 胺基酸)、四聚合化區域(323-356 胺基酸)及調控區域(360-393 胺基酸)，是一種能夠調控細胞反應的蛋白。其調控的範圍包括了 DNA 修補、細胞週期調控【Schwartz and Rotter, 1998】、細胞凋亡【Yokozaki and Tahara, 1997】、細胞分化、基因重組和中心體複製【Schwartzman and Cidlowski, 1993; Thompson, 1995】。當細胞受到外來的壓力時，p53 會被誘發表達參與 G1 phase 監控關卡系統，p53 藉由活化下游基因 p21 而抑制 cyclins-cdks 複合體，造成細胞在 G1 時期停滯【Kerr et al., 1994; Salvesen and Dixit, 1999】。同時 p53 也會進行參與 G2/M 細胞週期監控關卡系統，而使 G2 期延滯(Knudsen et al., 1998)。p53 蛋白質主要藉由磷酸化及乙酰化等轉譯後修飾作用來增加 p53 蛋白質的穩定性【Susin et al., 1998】。許多逆境因子會誘發 p53 蛋白質活化，包括

核酸缺失、微小管瓦解、缺氧、一氧化氮、紫外光及化學物質等【Susin et al., 1998】。

(三) APO-1/FAS

FAS 基因存在於一般正常細胞或者是腫瘤細胞中，若是細胞受到刺激時，會促使 APO-1/FAS 與一些細胞激素或是抗體結合而引發 apoptosis【Robertson et al., 1995】。

(四) Bcl 家族

Bcl 家族是一個調控細胞凋亡有關的基因家族，包括 Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bak、Bcl-Xs 等，前面兩個具有抑制細胞凋亡能力【Reed, 1995】；後三者則具有促進細胞凋亡的功能【Reed, 1997】。在一般的情況下，此兩類的蛋白會維持一定的比率來調節細胞狀態，當 Bax 表現量高於 Bcl-2 時，細胞就會走入凋亡；換言之，Bcl-2 表現量大於 Bax 時，則會抑制細胞凋亡的情況發生。

(五) IAP 家族(Inhibitors of apoptosis protein；抗細胞凋亡蛋白)

IAP 家族會經由 caspase 家族成員的交互作用而抑制細胞凋亡【Birnbaum et al., 1994】，其內包含了 survivin、cIAPs(cIAP1 及 cIAP2)和 XIAP 等成員【Deveraux and Reed, 1999】。而這些蛋白質幾乎在不同的癌細胞如肺癌【Ekedahl

et al., 2002; Hirokawa, 1994】、骨髓性白血病細胞【Zhang et al., 2002】和前列腺癌【McEleny et al., 2002】中過度表達。

(六) Cytochrome c

Cytochrome 是粒線體呼吸鏈的必要成分，目前可分成四類：cytochrome a、b、c、d，其中 cytochrome c 是粒線體周圍膜上水溶性的蛋白。在細胞凋亡過程中，被 proapoptotic factors 而開啟滲透性轉移孔洞 (permeabilization transition pore；PTP)，造成粒線體內膜滲透性 (mitochondrial membrane permeabilization) 不穩定而導致粒線體膜電位下降，過程中會釋放出 cytochrome c 到細胞質中，而活化 caspase 3 (CPP32) 【Zou et al., 1997】。

(七) Caspases 家族(蛋白水解酶)

原本為單一無活性的 precursor proenzyme，活化後被切割形成大、小次單位，而形成四聚體模式，具有自身催化或相互激活的能力。在細胞發生凋亡情形時，caspases 會被上游基因調控活化，之後造成細胞形態之改變。目前 caspases 家族至少有 14 種，大致分為三類：

1、The ICE subfamily of cytokine processors：

其主要是細胞激素的前驅物質，因此與發炎反應

很大的相關。成員有 caspase-1、-4、-5、-11、-12、-13 與-14【Hisahara et al., 2000】。

2、The ICH-1/Nedd-2 subfamily of apoptotic initiators：

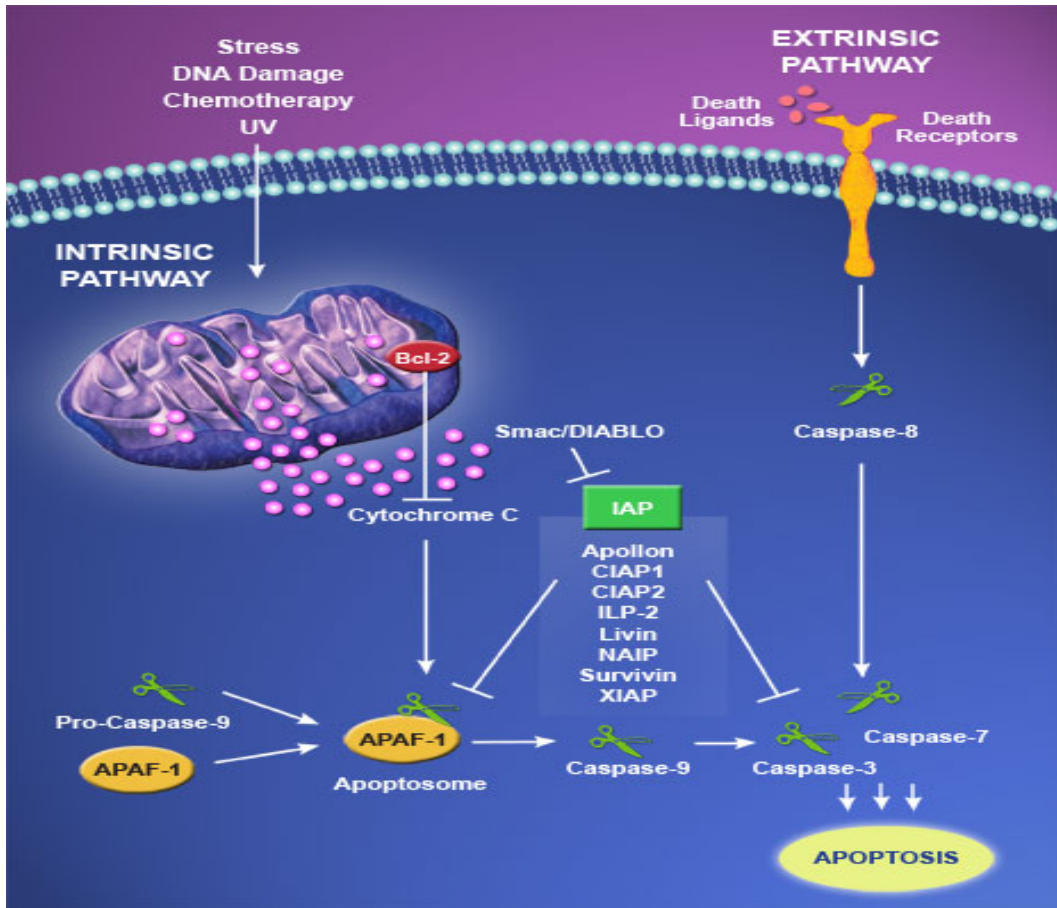
主要負責活化 apoptotic executioners 以執行細胞凋亡【Ho and Hawkins, 2005】。成員有 caspase-2、-8、-9 與-10。其中 caspase-8、caspase-10 具有兩個 death effector domain(DED)，若進行 death receptor pathway 的 death signals 傳遞時，會和下游的 DD domain 聯結而促使凋亡；caspase-9 上的 CARD(caspase recruitment domain) prodomain，會在有 mitochondria pathway 的 death signals 傳遞時，和 Apaf-1 上 N 端的 CARD 結合，引發細胞凋亡【Cain, 2003】。

3、Ced-3/ CPP32 家族 (the Ced-3/ CPP32 subfamily of apoptotic executioners)：

成員有 caspase-3、-6、-7。主要負責執行細胞凋亡，裂解其下游的蛋白質，如 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)、DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)等。PARP 的功能是修復受損的 DNA、調控細胞增殖與死亡的平衡，和維持基因體的穩定性。

當 PARP 受 caspase-3 裂解時會失去原本的功能

【Bellosillo et al., 1997】。



圖六、細胞凋亡調控因子【Wright and Duckett, 2005】

三、細胞凋亡訊息調控路徑

細胞凋亡調控路徑可大致分為三類：

(一) 粒線體傳遞路徑(Mitochondrial pathway)

粒線體接收到細胞凋亡的訊息傳遞，會開始進行活化 Bcl-2 家族蛋白，並同時造成粒線體膜電位下降的狀況發生。之後便開始釋放凋亡因子，如 Apaf-1(apoptosis protease-activating factor-1)、cytochrome c、procaspase-9 等蛋白。當 Apaf-1、cytochrome c 及 procaspase-9 結合形成凋亡複合體(apoptosome)後，便促使 procaspase-9 形成活化態的 caspase-9，接著開始活化下游的 caspase-3，最後造成 poly (ADP-ribose) polymerase 【Li et al., 1997】分解斷裂，使細胞走向細胞凋亡。

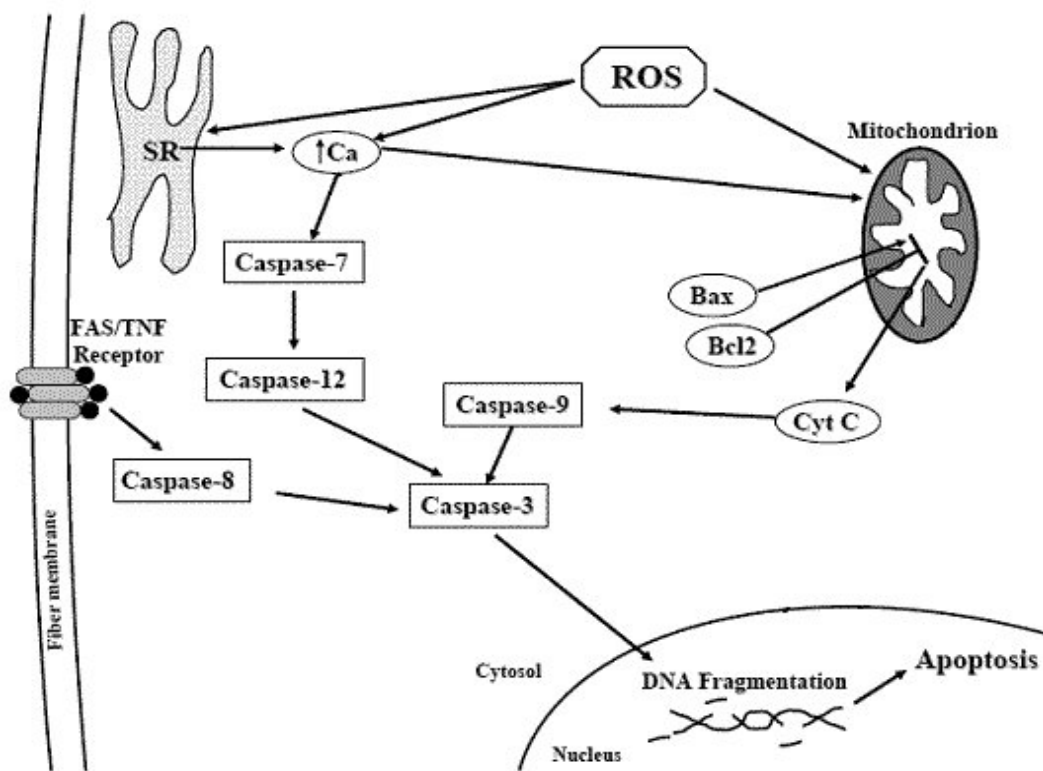
(二) 死亡受器傳遞路徑(Death receptor pathway)

當 Fas ligand(Fas-L)與細胞膜表面蛋白質 Fas(CD95) 結合後，促使下游的受體傳導蛋白質 FADD(Fas-associated death domain protein)與 procaspase-8 結合進而活化 procaspase-8，活化的 caspase-8 也同時活化下游的 caspase-3，最後走向細胞凋亡【Kluck et al., 1997】。此外，

死亡受器傳遞路徑同時也會藉由活化 Bcl-2 家族蛋白，進一步促使 cytochrome c 的釋放【Eskes et al., 2000】。

(三) 內質網路徑(Endoplasmic reticulum pathway)

在內質網路徑中發現 caspase-12 專一性地存在於內質網中。當內質網受到壓力刺激會造成鈣離子釋出，進而活化 caspase-12，最後形成細胞凋亡【Nakagawa et al., 2000】。



圖七、細胞凋亡路徑圖【Primeau et al., 2002】

第五節、癌症轉移(Metastasis)與侵襲(Invasion)

當癌症病灶發展到一定程度時，便會開始侵襲周圍組織，並轉移至遠處到其他組織以獲得更多養分。一般在正常狀態下細胞與細胞之間有基底膜與ECM(extracellular matrix)間隔，基底膜是一種特化結構；ECM則是用來提供正常表皮細胞附著。所以癌細胞要進行侵襲與轉移時，就必須分泌蛋白酵素來破壞分解基底膜與ECM【Wang, 2001】。目前主要影響癌細胞侵襲轉移的因素有【Thomas et al., 1996】：

一、基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinase)

MMPs 是一組鋅離子依賴性內肽酶，也就是需要鋅的存在才能執行功能。一開始皆是以未活化的狀態分泌到細胞外，但是當與其他蛋白酶進行作用時，則會打斷原本與鋅離子鍵結的 cysteine，使其成為活化狀態，目前可分成四型：

(一) 膠原蛋白酶(Collagenases)

間質性膠原酶、嗜中性膠原蛋白酶、膠原酶均屬於本類，他們會將纖維狀膠原質(fibrillar collagens)進行降解成片段，其成員有 MMP-1、MMP-8、MMP-14、MMP-18。

(二) 明膠酶(Gelatinases)

本類包含了 72kDa 的 gelatinase A (MMP-2)以及 92 kDa 的 gelatinase B (MMP-9)，主要可以分解 gelatin、fibronectin、elastin 等，因此在 MMPs 中被認為最與 cancer 相關性的一型。

(三) 基質溶素(Stromelysin)

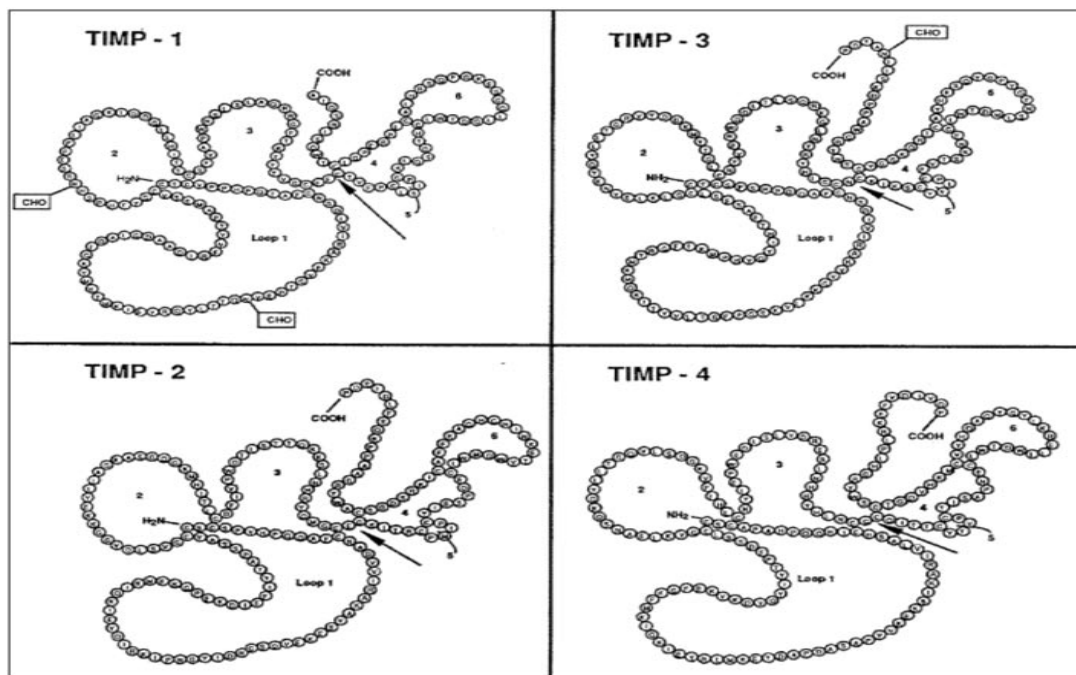
基質溶素在此扮演著分解細胞外基質的蛋白質，但是它並不能分解具有 triple-helical 結構的 fibrillar collagens，成員有 MMP-3、MMP-10、MMP-11。

(四) 膜型基質金屬蛋白酶(Membrane-type metalloproteinases)

被發現結合於細胞膜上，可與 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)結合，維持 MMPs 與 TIMP 之間的平衡，目前被認為的有 MMP-14 (MT1-MMP)、MMP-15 (MT2-MMP)、MMP-16(MT3-MMP)、MMP-17 (MT4-MMP)、MMP-24(MT5-MMP)、MMP-25 (MT6-MMP)。

二、基質金屬蛋白質酶組織抑制因子(Tissue inhibitor of metalloproteinase；TIMP)

TIMP 本身具有環狀結構及雙硫鍵結，可與 MMPs 形成非共價鍵結，藉此達到抑制或活化 MMPs、細胞凋亡、免疫反應等作用產生，目前主要有 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4 共四型，其結構如圖八。



圖八、TIMP 結構圖【Verstappen et al, 2006】

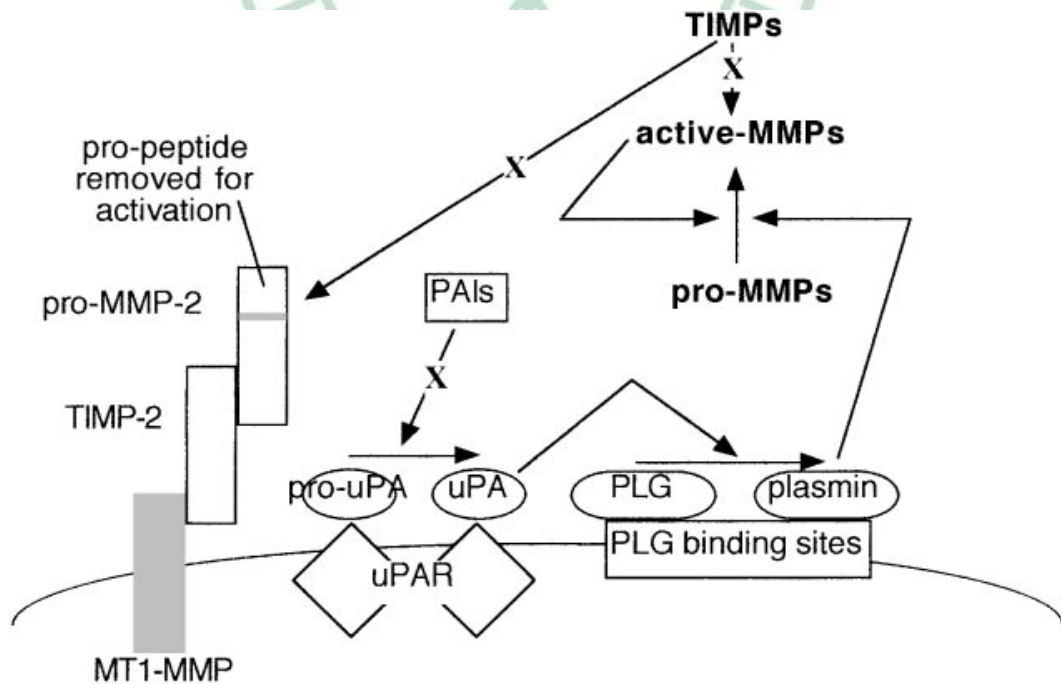
三、尿激酶型纖維溶酶原激活物 (Urokinase-type plasminogen activator ; uPA)

uPA 首先在人的尿液中被發現，是負責將不具有活性的 plasminogen 轉變成 plasmin，促使血栓溶解、細胞基質降解情形發生，因此常被認為與血管疾病、癌症有關【Baker et al., 2007】。

四、血漿纖溶酶原激活物抑制物 (Plasminogen activator inhibitor)

主要分成 PAI-1 以及 PAI-2 兩型。PAI-1 是一種 serine protease inhibitor protein (SERPINE1)；PAI-2 則存在於懷孕期間胎盤所分泌出的物質，均可以抑制 urokinase (uPA)，但是主要是以 PAI-1 作為 plasminogen activators 抑制劑【Baker et al., 2007】。

一般在正常的情况下 TIMPs 的表現是大於 MMPs，但是在惡性腫瘤當中發現，腫瘤為了擷取更多的養分而促使血管新生，而造成轉移生長的現象。當血管內生長因子受到活化時，便會分泌 gelatinase 等分解血管基底膜的物質，此時的 MMPs 的表現便大過於 TIMPs。



圖九、腫瘤轉移侵襲機制圖 【Thomas et al.,1999】

第六節、裸鼠異種移植腫瘤(nude mice xenograft tumor)模式

無胸腺裸鼠自 1937 年被發現是一種獨特的純系動物。其基因型帶有等位基因的 nu/nu；其表現型則為全身無毛，先天性無胸腺，僅只有胸腺上皮，但這並不能促使 T 細胞分化成熟，因為表現在脾臟細胞表面的 θ 抗原失去反應能力。 θ 抗原是 T 細胞活化前的一種分化抗原。

也由於裸鼠 T 淋巴細胞受損，同時造成許多免疫反應無法進行：

- (1) 抗體生成反應(CD4+ helper T cells)
- (2) 細胞引起的免疫反應(CD4+ or CD8+ T cells)
- (3) 延遲性過敏反應(require CD4+ T cells)
- (4) 殺死受到病毒感染或毒性物質傷害的細胞
- (5) 移植物排斥(require both CD4+ and CD8+ T cells)

其中在實驗腫瘤研究(如前列腺癌【van Weerden and Romijn, 2000】、肺癌【Melnikova and Bar-Eli, 2007】、乳癌【Monteiro et al., 2008】、口腔癌【Wang et al., 2007】)中已被廣為應用的原因來自對於外來移植

物不會產生排斥。因此可以進行中草藥萃取物或主成分在本模式下探討是否可以抑制腫瘤大小，進而研究其動物實驗之抗癌療效。

第七節、實驗動機

近年來有研究發現隨著嚼食檳榔、香菸、酒精等因子會增加口腔癌罹患機率，且罹患人數有逐漸上升與罹患年齡層下降之趨勢。目前醫界對於原位性腫瘤已逐漸能用外科手術及化學治療等方法去除，但對於腫瘤轉移侵襲仍是無法預防，大部分的病人均死於轉移其他部位的癌症而死亡。普來氏月桃(*A. pricei*)是台灣全島低海拔山區特有常見的薑科月桃屬植物，在民間廣被使用。本實驗室已從國立中興大學森林學系王升陽教授實驗室分離出月桃萃取物與月桃主成分(Flavokawain B)，但是對於月桃萃取物及其主成分是否對於正常口腔細胞有細胞毒性、誘導人類口腔鱗狀癌細胞(KB cells)之細胞凋亡的可能機制及路徑仍不太清楚。

因此，本研究分為兩個部分進行：

第一部分：探討月桃萃取物在人類口腔鱗狀癌細胞(KB cells)中體內與體外試驗的抑癌影響。

第二部分：探討月桃主成分對人類口腔鱗狀癌細胞(KB cells)中體內與體外試驗的抑癌影響。



貳、研究材料

第一節、實驗儀器

- 一、天秤：Sartorius
- 二、迷你離心機：KUBOTA 2010
- 三、桌上型微量離心機：Sigma 1K15
- 四、超高速離心機：Beckman
- 五、高壓殺菌釜：TOMIN TM32
- 六、純水製造機：Millipore milli-Q Plus
- 七、pH meter：Denver Basic
- 八、ELISA Reader：Dynatech MR7000 & Dynex MRX
- 九、流式細胞計數儀(flow cytometry：FACS)：Becton Dickinson
- 十、數位影像分析儀：Alphar Imager 2000
- 十一、無菌操作台：NUAIRE™ class II TYPE A/B3
- 十二、細胞培養箱：NUAIRE™ US AUTO flow
- 十三、倒立式顯微鏡：Nikon Diaphot 300
- 十四、幫浦：HETO SUE 30Q
- 十五、加熱攪拌器：Barustead thermolyne SP18425
- 十六、震盪器：KS ORBITAL Shaker
- 十七、超音波震盪器：Branson PC 620
- 十八、水平式搖晃器：Oribital shaker OS 701

十九、水浴槽：FIRSTER™ SIENTIFIC

二十、直立式電泳槽：Hofer

二十一、電泳轉印槽：BIO-RAD

二十二、電源供應器：BIO-RAD computer power supply model 3000Xi

二十三、感光夾：Hypercassette™ rpn111649

第二節、實驗材料

一、本實驗所使用之人類口腔癌細胞株(KB)及人類正常牙齦纖維母細胞(Human gingival fibroblast cells；HGF)購自財團法人食品

工業發展研究所

二、購自 Aldrich 公司：

3,3,- Dihexyloxacarboyanine iodide(DiOC6)

三、購自 Amersham Life Science 公司：

Recombinant protein molecular weight marker、ECL Western blotting detection reagent、Tween 20、BioMax light film

四、購自 CalBiochem 公司：

Terminal deoxynucleotidy transferase (TdT) –mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

五、購自 BD 公司：

Caspase-3 rabbit polyclonal antibody、FACS tube

六、購自 BioChemike 公司：

2,7- dichlorofluorescein diacetate(H₂DCF-DA)

七、購自 BIO-RAD 公司：

Protein assay dye reagent、30% Acrylamide/Bis solution(29:1)、

Ammonium persulfate、N,N,N,N-Tetramethyl ethylenediamide

(TEMED)、Tris-HCl、Coomassie[®] blue R250、β-mercaptoethanol

八、購自 Cell Signaling公司, USA：

β-actin mouse monoclonal antibody、Caspase 9 mouse monoclonal

antibody、Caspase 8 rabbit polyclonal antibody、Cyclin A mouse

monoclonal antibody

九、購自 Corning公司：

25 cm Flask、75 cm Flask、6 Well、12 Well、10 cm dish

十、購自 GIBCO 公司：

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)、Penicillin-

streptomycin (PS)、2 mM L-Glutamine

十一、購自 Hyclone 公司：

Fetal bovine serum (FBS)

十二、購自 Merck

Methanol、Acetic acid、Xylene、顯影劑、定影劑

十三、購自 Millipore 公司：

Millipore 過濾杯

十四、購自 Pierce 公司：

SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate

十五、購自 Santa Cruz 公司：

(一) 一級抗體

β -actin mouse monoclonal antibody、Bax rabbit polyclonal antibody、Bcl-2 rabbit polyclonal antibody、Cytochrome c rabbit polyclonal antibody、Cyclin B1 rabbit polyclonal antibody、CDC2 rabbit polyclonal antibody、CDC25c rabbit polyclonal antibody、FAS rabbit polyclonal antibody、FAS-L rabbit polyclonal antibody、MMP-2 goat polyclonal antibody、MMP-9 goat polyclonal antibody、p21^{Waf1/Cip1} rabbit polyclonal antibody、p53 rabbit polyclonal antibody、p-p53 goat polyclonal antibody、PAI-1 rabbit polyclonal antibody、PAI-2 goat polyclonal antibody、TIMP-1 rabbit polyclonal antibody、TIMP-2 rabbit polyclonal antibody、uPA rabbit polyclonal antibody、uPAR rabbit polyclonal antibody、Wee1 rabbit polyclonal antibody、

(二) 二級抗體

HRP-conjugated Goat Anti-mouse IgG、HRP-conjugated Goat

Anti-rabbit IgG、HRP-conjugated Donkey Anti-goat IgG

十六、購自 Sigma Chemical 公司：

Boric acid、Ponceau S solution、Brij[®] 35、Casein、Glucose、Glycerol、Gelatin、Trypan blue、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、Sodium bicarbonate (NaHCO₃)、propidium iodide (PI)、Triton-X 100、RNase A、Sodium chloride (NaCl)、Potassium chloride (KCl)、Sodium phosphate (NaHPO₄)、Potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄)、Tris-base、Ethylenediamide-tetraacetic acid (EDTA)、sodium Ethylenediamide-tetraacetic acid (Na₂EDTA)、sodium pyruvate、Sodium dodecyl sulfate (SDS)、N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPEs)、Bovine serum albumin (BSA)、Dithiothreitol (DTT)、Phenylmethyl sulfonyl fluoride、3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6)

十七、購自 Upstate 公司：

PARP rabbit polyclonal antibody

十八、其他

脫脂奶粉(安佳)、95% Ethanol(景明化工)、Bromophenol blue
(東西化成株式會社；東京都北區)

第三節、普來氏月桃之配製

一、普來氏月桃萃取物配製流程

經由國立中興大學森林學系將30 kg月桃經過乾燥後剩下9 kg，再把乾燥的月桃以70%乙醇進行萃取，得到240 g萃取物(含水率30.7%)，-20°C避光保存。將所得月桃萃取物配成所需濃度以利實驗之進行。

二、普來氏月桃主成分

經由國立中興大學森林學系王升陽教授實驗室將已清洗過之80 kg月桃根部以70%乙醇溶液進行萃取，萃取物經減壓蒸餾濃縮後得到乙醇萃取物。之後再經由管柱層析及高效能液相層析(HPLC)分離純化出Flavokawain B。所得Flavokawain B利用DMSO將其配成所需濃度以利實驗之進行。

第四節、細胞培養(Cell Culture)

一、人類口腔鱗狀上皮細胞癌細胞株(KB)培養【Ko et al., 2008】

(一) 試劑配製

1、DMEM

Dulbecco's modified eagle media(DMEM) 取一包 DMEM 粉末溶於 800 ml 的二次水中，加入 3.7 g NaHCO_3 、5.9 g HEPES、110 mg sodium pyruvate。溶解後調 pH 值至 7.4，再加入 1% 青黴素(penicillin)/鏈黴菌(streptomycin)，混合後並將體積定量至 1000 ml。以 0.22 μm 血清瓶專用無菌過濾膜(bottle top filter)過濾，保存於 4°C。

2、1X 磷酸緩衝液(Phosphate-buffer saline；PBS)

8 g NaCl 、0.2 g KH_2PO_4 、0.2 g KCl 、1.15 g Na_2HPO_4 溶在 800 ml 二次水中，以 1 N NaOH 調整到 pH=7.2-7.4，並將體積定量至 1000 ml，再經由 121°C、30 分鐘高壓滅菌後使用並存放於室溫備用。

3、0.4% Trypan blue

取 0.4 g trypan blue 溶於 100 ml 1X PBS 中，通過孔徑

0.45 μ M 的濾膜，濾除雜質，室溫保存。

(二) 細胞培養條件

將人類口腔癌細胞株(KB)培養於 DMEM 培養液，其中加入含 10% 在 57°C 加熱 30 分鐘而去補體之胎牛血清 (heat-inactivated foetal bovineserum ; FBS)、2 mM L-glutamine、1 % penicillin/streptomycin，最後置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養。

(三) 繼代培養(Subculture)

將細胞培養在 75T flask 中，等到細胞生長至八、九分滿時，去除培養液並用 PBS 清洗 2 次。加入 trypsin-EDTA 反應 5 分鐘，將細胞於 75T flask 中分離出來收集至離心管中。在室溫下 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入新鮮培養液混勻細胞。取 100 μ l 細胞懸浮液與等量之 0.4% trypan blue 溶液混合均勻，用細胞計數器(hemocytometer)計數細胞數，依實驗需要之細胞密度均勻的分至培養盤(culture plates)。剩餘細胞再加入新鮮 DMEM，重新種回 75T flask 中。當代數已超過 20 代時，則重新再解凍細胞使用。

(四) 冷凍細胞：

將生長狀態良好的細胞用 Trypsin-EDTA 打下後，收集離

心(1500 rpm, 5分鐘), 吸掉上清液, 加入1 ml 新鮮medium 並打散底部細胞, 另外配製freezing medium(內含7% DMSO 和10%FBS的DMEM)充分混合後, 置入於2 ml冷凍小管內, 此時每個冷凍小管的細胞密度必須至少含有 5×10^6 cells/ml 以上。先將內含有細胞freezing medium的冷凍小管放在4°C 冰箱中15分鐘, 再移至-20°C 冰箱中15分鐘, 之後移到-80 °C 冰箱中overnight, 最後放入液態氮中保存。

(五) 解凍細胞：

自液態氮桶將KB細胞取出後, 立即移置於37°C 水浴槽中, 使內部呈現部份融解的狀態, 再用無菌dropper將細胞冷凍保存液(cell culture freezing medium-DMSO)吸到已有20 ml新鮮DMEM的無菌離心管內, 之後移到75T Flask中, 於含5% CO₂的37°C 培養箱中生長。隔天更換新鮮培養液以去除DMSO, 之後每隔2~3天更換培養液。

二、人類正常牙齦纖維母細胞(HGF)培養【Hwang et al., 2008】

(一) 試劑配製

1、DMEM

Dulbecco's modified eagle media(DMEM) 取一包

DMEM 粉末溶於 800 ml 的二次水中，加入 3.7 g NaHCO_3 、5.9 g HEPES、110 mg sodium pyruvate。溶解後調 pH 值至 7.4，再加入 1% 青黴素(penicillin)/鏈黴菌(streptomycin)，混合後並將體積定量至 1000 ml。以 0.22 μm 血清瓶專用無菌過濾膜(bottle top filter)過濾，保存於 4°C。

2、1X 磷酸緩衝液(Phosphate-buffer saline ; PBS)

8 g NaCl 、0.2 g KH_2PO_4 、0.2 g KCl 、1.15 g Na_2HPO_4 溶在 800 ml 二次水中，以 1 N NaOH 調整到 pH=7.2-7.4，並將體積定量至 1000 ml，再經由 121°C、30 分鐘高壓滅菌後使用並存放於室溫備用。

3、0.4% Trypan blue :

取 0.4 g trypan blue 溶於 100 ml 1X PBS 中，通過孔径 0.45 μm 的濾膜，濾除雜質，室溫保存。

(二) 細胞培養條件：

將人類正常口腔纖維母細胞株(HGF)培養於 DMEM 培養液，其中加入含 10% 在 57°C 加熱 30 分鐘而去補體之胎牛血清(heat-inactivated foetal bovineserum ; FBS)、2 mM L-glutamine、1% penicillin/streptomycin，最後置於 37°C、5% CO_2 培養箱中培養。

(三) 繼代培養(Subculture)：

將細胞培養在 10 cm dish 中，等到細胞生長至 7~8 分滿時，去除培養液並用 PBS 清洗 2 次。加入 trypsin-EDTA 反應 3 分鐘，將細胞於 10 cm dish 中分離出來收集至離心管中。在室溫下 1500 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，加入新鮮培養液混勻細胞。取 100 μ l 細胞懸浮液與等量之 0.4% trypan blue 溶液混合均勻，用細胞計數器(hemocytometer)計數細胞數，依實驗需要之細胞密度均勻的分至培養盤(culture plates)。剩餘細胞再加入新鮮 DMEM，重新種回 10 cm dish 中。當代數已超過 10 代時，需重新再解凍細胞使用。

(四) 冷凍細胞：

將生長狀態良好的細胞用 trypsin-EDTA 打下後，收集離心(1500 rpm，5分鐘)，吸掉上清液，加入 1 ml 新鮮 medium 並打散底部細胞，另外配製 freezing medium(內含 7% DMSO 和 10% FBS 的 DMEM) 充分混合後，置入於 2 ml 冷凍小管內(原則上 1 個 10 cm dish 冷凍 1 管)。先將內含有細胞 freezing medium 的冷凍小管放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 15 分鐘，再移至 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中 15 分鐘，之後移到 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中 overnight，最後放入液態氮中保存。

(五) 解凍細胞：

自液態氮桶將HGF細胞取出後，立即移置於37°C水浴槽中，使內部呈現部份融解的狀態，再用無菌dropper將細胞冷凍保存液(cell culture freezing medium-DMSO)吸到已有10 ml新鮮DMEM的無菌離心管內，之後移到10 cm dish中，於含5% CO₂的37°C培養箱中生長。隔天更換新鮮培養液以去除DMSO，之後每隔2~3天更換培養液。

第五節、細胞生長率(Growth)與存活率(Viability)測定分析

一、原理

正常細胞由於細胞膜完整，遇到加入 trypan blue 染劑時，則不會被染色；反之，死細胞或是受損的細胞則因細胞膜通透性已被破壞，染劑可進入細胞內加以染色。經 trypan blue 染後成為藍色細胞則為死細胞；細胞呈現亮點則為活細胞。細胞成長率(cell growth)亦稱之為 subconflent，也就是將細胞種到未全滿的階段，加入藥物試劑反應，確認是否會抑制細胞成長；細胞存活率(cell viability)亦稱之為 conflent，也就是將細胞種到全滿的階段，加入藥物試劑反應，確認藥物是否對於細胞具有毒性的分析方法。

二、細胞型態(Morphology)觀察

在 12 well 中種 3×10^5 cells/ml (共 1 ml) 的 HGF cells 及 KB cells，等至細胞貼附後，加入不同濃度的月桃萃取物及月桃主成分後培養 24、48、72 小時。以倒立式顯微鏡(phase microscope) 觀察細胞型態並照相。

三、生長率測定步驟【Xiao et al., 2005】

在 6 well 中種 1×10^5 cells/ml (共 3 ml) 的 KB cells，等至細胞貼附後，加入不同濃度的月桃萃取物及月桃主成分後培養 24、48、72 小時。等反應時間到了之後，從中取出 100 μ l 再加上 100 μ l 的 0.4% trypan blue，混合均勻後，以血球計數器來計算 KB cells 的數目。

四、存活率測定步驟【Lee et al., 2005】

在 12 well 中種 3×10^5 cells/ml (共 1 ml) 的 HGF cells 及 KB cells，等至細胞貼附後，加入不同濃度的月桃萃取物及月桃主成分後培養 24、48、72 小時。等反應時間到了之後，從中取出 100 μ l 再加上 100 μ l 的 0.4% trypan blue，混合均勻後，以血球計數器來計算 HGF cells 及 KB cells 的數目。

五、細胞計數

將細胞懸浮液與 trypan blue 等體積混合，取出 100 μl 混合液注入血球計數盤凹槽中，於倒立式顯微鏡下觀察計數。計算盤中上下共八大方格中細胞總數後除以八，乘以稀釋倍數，最後再乘以 10^4 (血球計數盤每一方格的體積為 10^{-1} mm^3)，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。

第六節、細胞週期(Cell cycle)分析測定【Chang et al., 2007】

一、原理

細胞週期大致可分為四個不同時期，G1 phase、G2 phase、S phase、M phase。每一個時期的 DNA 含量會因為功能作用不同而有所差異，原則上 G2 期 DNA 含量為 G1 期的兩倍，而 S 期的 DNA 含量則居於兩者之間。因此可以利用細胞中 DNA 的含量來決定週期，利用螢光物質來標示 DNA，之後再利用 FACS (fluorescence-activator cell sorter) 進行 DNA 含量分析。

二、試劑配製

(一) Propidium iodide (PI) 染劑

表六、PI stain 染劑配製表

組成內容	Stock solution	Final solution	體積(1 ml)
Propidium iodide	100 µg/ml	4 µg/ml	40 µl
TritonX-100	10%	1 %	100 µl
RNase A	100 mg/ml	0.5 mg/ml	5 µl
PBS	+	+	855 µl

(二) 70%酒精

取出 99.8%分生專用酒精，用二次水稀釋至 70%

(三) 1X 磷酸緩衝液(Phosphate-buffer saline ; PBS)

8 g NaCl、0.2 g KH₂PO₄、0.2 g KCl、1.15 g Na₂HPO₄ 溶
在 800 ml 二次水中，以 1 N NaOH 調整到 pH=7.2-7.4，並
將體積定量至 1000 ml，再以 0.22 µm 血清瓶專用無菌過濾
膜(bottle top filter)過濾，最後再經由 121°C、30 分鐘高壓
滅菌後使用並存放於室溫備用。

三、固定細胞步驟

在 6 cm dish 中種 1×10^6 cells/ml (共 5 ml) 的 KB cells，等至

隔日細胞貼附後用 PBS 洗一次，加入不同濃度的月桃萃取物及月桃主成分後培養 24、48、72 小時。將不同組別各自收集上清液，加入 2 ml 的 PBS 清洗後再經 trypsin-EDTA 處理，使細胞分離並收集至 15 ml 離心管中離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，再將細胞完全打散後加入 10 ml 的 PBS 清洗離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，將細胞完全打散後，以 -20°C 冰的 70% 酒精進行細胞固定步驟(以 "SHAKE 3" 速度震盪，緩慢將 3 ml 酒精滴入)，隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於 -20°C 冰箱。

四、流式細胞儀上機步驟

固定結束後隔天，將樣品從 -20°C 冰箱取出後離心 (1500 rpm、5 分鐘) 去除酒精。將細胞完全打散，加入 10 ml 的 PBS 清洗 1 次後將細胞完全打散。最後在每個試管中加入 500 μ l (視細胞數目增減) 的 PI stain 染劑，用 1 ml pipette 在 15 ml 離心管中抽吸數次後，將細胞移於絹布製的篩子過濾到 FACS 專用管，避光並置於冰上反應 30 分鐘。最後以流式細胞儀(flow cytometry; FACS) 進行樣品分析，每一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每個數據收集 10000 顆細胞，數據以 Modfit LT[®] 軟體進行處理分析，每個實驗組皆三重複。

第七節、細胞膜電位($\Delta\Psi$)測定分析【Ding et al., 2005】

一、原理

當細胞呈現 apoptosis 時會造成粒線體內容物的釋放，這與粒線體膜上一種稱為 mitochondrial permeability transition pore (PT pore) 的通道有關，主要包含了兩大部分：一是在粒線體內膜與 adenine nucleotide translocator (ANT) 相關之蛋白質；另一是在外膜的蛋白質(包括了 porin, voltage-dependent anion channel, VDAC)，打開此一通道會造成粒線體內膜兩側 H^+ gradient 消失，此時原本以電化學位能儲存於粒線體內膜(約 250 mV/5~10 nm)，稱之為 mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) 開始下降，最後 matrix 滲透壓增高，造成粒線體漲大，外膜漲破之後使 caspase-inducing factors (cytochrome c 和 AIF) 釋放到細胞質中。許多親脂性的陽離子化合物(如 DiOC6 (3,3-Dihexyloxacarbocyanine iodide)) 會結合到粒線體內膜，在雷射激發光下放出螢光，可以非常方便地使用螢光顯微鏡或流式細胞儀來觀察粒線體的形態和移動的變化情形。

二、試劑配製

(一) 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6) 染劑

分子量為 572.53，將其配成 stock solution 為 10 mM，

實驗前用已滅菌磷酸緩衝溶液稀釋成 20 μ M。

三、實驗步驟

將 3×10^5 KB 細胞種於 12 well，以濃度 150 μ g/ml 的月桃萃取物及 10 μ g/ml 的 flavokawain B，分別培養 0、2、4、8 小時後，將不同組別各自收集上清液，加入 2 ml 的 PBS 清洗後再經 trypsin-EDTA 處理，使細胞分離並收集至 15 ml 離心管中離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，再將細胞完全打散後加入 10 ml 的 PBS 清洗離心 (1500 rpm、5 分鐘)。最後在每個試管中加入 500 μ L 的 20 μ M DiOC6 於試管中，用 1 ml pipette 在 15 ml 離心管中抽吸數次後，將細胞移於絹布製的篩子過濾到 FACS 專用管，全程避光並置於室溫下 30 分鐘，最後以流式細胞儀 (Flow cytometry; FACS) 進行樣品分析。

第八節、活性氧化物(Reactive oxygen species)測定分析

【Ding et al., 2005】

一、原理

2,7- dichlorofluorescein diacetate(H₂DCF-DA)是一種脂溶性染劑，本身具有螢光且可以通透細胞膜，進入細胞可與細胞內的乙醯脂酶(esterases)結合形成非螢光性的 DCFH，之後被 H₂O₂ 氧化成具螢光性的 DCF。藉此使用流式細胞儀來評估細胞內 H₂O₂ 的濃度變化，以分析細胞內 ROS 的生成量。

二、試劑配製

(一) 2,7- dichlorofluorescein diacetate(H₂DCF-DA)染劑

分子量為 487.3，將其配成 stock solution 為 10 mM，

實驗前用已滅菌磷酸緩衝溶液稀釋成 10 μM。

三、實驗步驟

將 5×10^5 KB 細胞種於 6 well，以濃度 150 μg/ml 的月桃萃取物及 10 μg/ml 的 flavokawain B，分別培養 0、60、120、180、240 分鐘後，將不同組別各自收集上清液，加入 2 ml 的 PBS 清洗後再經 trypsin-EDTA 處理，使細胞分離並收集至 15ml 離心

管中離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，再將細胞完全打散後加入 10 ml 的 PBS 清洗離心 (1500 rpm、5 分鐘)。最後在每個試管中加入 500 μ L 的 10 μ M H₂DCF-DA 於試管中，用 1 ml pipette 在 15 ml 離心管中抽吸數次後，將細胞移於絹布製的篩子過濾到 FACS 專用管，全程避光並置於室溫下 30 分鐘，最後以流式細胞儀(flow cytometry; FACS)進行樣品分析。

第九節、蛋白質定量分析與西方墨點法(Western blotting)

【Pan et al., 2008】

一、蛋白質定量原理

蛋白質定量分析是根據 Bradford 原理所設計，其蛋白質染劑可與蛋白質結合形成藍色複合物，並可於 595 nm 測得此複合物之吸光值。藉由比對 BSA 標準品所形成的定量標準曲線，即可換算出待測樣品的蛋白質濃度。

二、蛋白質定量實驗步驟

以二次水將牛血清白蛋白 (bovine serum albumin ; BSA , 0.1 mg/ml)分別配製成 0、2、4、6、8、10 μ g /ml 之標準溶液。再加入 200 μ l protein assay dye (BIO-RAD)，振盪均勻靜置 5 分

鐘。放入分光光度計讀取波長 595 nm 的吸光值，由在 595 nm 的吸光值，作成標準線，分析最佳標準迴歸直線，求出此線的方程式(當此直線的迴歸分析結果之 $R^2 > 0.998$ 時，此直線方程式的值始可信)。

將樣品取 1 μ l 的待測蛋白質溶液加入 799 μ l 二次蒸餾水，再加入 200 μ l protein assay dye，均勻混合後，室溫下反應 5 分鐘後，測吸光值再以樣品所測得 OD 值之結果，帶入方程式即可求得蛋白質濃度。

三、西方墨點法原理

Western Blot 採用的是聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)，被檢測物是蛋白質，「探針」是一級抗體(Primary antibody)，「顯色」用標記的二級抗體(Secondary antibody)。SDS 是界面活性劑，可使蛋白質變性，並在分子表面均勻佈上一層負電荷。因此在系統中，樣本分子的泳動率，僅取決於其分子量，而與原來分子所帶的電荷無關；梯度電泳使用由稀到濃的梯度膠體，膠體中的孔徑由上到下逐漸變小，樣本中分子量越小的分子，就可跑得越下面，因此它可說是依分子量大小來分離的。經過 PAGE 分離的蛋白質樣品，轉移到固相載體（例如硝酸纖維素

薄膜) 上，固相載體以非共價鍵形式吸附蛋白質，且能保持電泳分離的多肽類型及其生物學活性不變。以固相載體上的蛋白質或多肽作為抗原，與對應的一級抗體發生免疫反應，再與酶或同位素標記的二級抗體反應，最後經過顯色或顯影來檢測電泳分離的蛋白成分表現。

四、試劑配製

(一) Lysis Buffer :

1、材料：

- (1) 10 mM tris-HCl (pH=8)
- (2) 0.32 M sucrose
- (3) 5 mM EDTA
- (4) 1% triton X-100
- (5) 2 mM dithiothreitol (DTT)
- (6) 1 mM phenylmethyl sulfony fluoride

2、步驟：

- (1) 秤取 0.121 g tris-HCl、10.95 g sucrose 溶於 60 ml 後，之後調整 pH 值為 12，加入 0.15 g EDTA，於全部溶解之後調回 pH 值為 8。
- (2) 秤取 0.0308 g DTT、0.0174 g phenylmethyl sulfony fluoride 加入。

(3) 最後加入 10 ml triton X-100 混合，分裝後放置-20°C

冰箱保存。

(二) 1.5 M Tris (pH=8.8)

取 91 g tris base 溶在 300 ml 二次水，以 1N HCl 調至 pH=8.8，後用二次水量定量至 500 ml 用 0.45 μm filter 過濾，4 °C 儲存 1 個月。

(三) 1 M Tris (pH=6.8)

取 12.1 g tris base 溶在 40 ml 二次水，以 1 N HCl 調至 pH=6.8，最後用二次水定量到 100 ml，用 0.45 μm filter 過濾，4 °C 儲存 1 個月。

(四) 10% SDS

取 10 g SDS，最後用二次水定量到 100 ml。

(五) Ammonium persulfate

取 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶於 1 ml 二次水。

(六) 6× Protein loading dye

1、材料：

(1) 350 mM tris-HCl (pH=6.8)

(2) 12% SDS

(3) 35% glycerol

(4) 0.02% bromophenol blue

(5) 30% β -meanptoethanol

2、步驟：

(1) 秤取 1.379 g tris-HCl 並加入 5 ml 二次水混合，調整 pH 值為 6.8。

(2) 加入 3 g SDS、8.75 ml glycerol(原液)、0.005 g bromophenol blue、7.5 ml β -meanptoethanol 混合，最後定量到 25 ml。

(七) 5 \times electrode buffer (pH=8.4)

取 54.5 g tris base、24.8 g boric acid、4.7 g Na₂EDTA、5 g SDS，最後用二次水定量至 1000 ml。使用前再用二次水稀釋成 1 \times 。

(八) Transfer buffer

取 18.2 g tris base、86.5 g glycine、1200 ml methanol 最後用二次水定量至 3 L。

(九) PBST

取水 800 ml 二次水，加入 8 g NaCl、0.2 g KCl、0.2 g KH₂PO₄、2.9 g Na₂HPO₄.12H₂O，調 pH 7.4，並定量至 1000 ml，最後加入 1000 μ l Tween-20。

(十) Block buffer

取 5% 脫脂奶粉溶於 PBST。

(十一) 顯影劑

取 103 ml developer 加入 370 ml 二次水，稀釋成 4.59 倍，
放入避光的瓶子。

(十二) 定影劑

取 103 ml fixter 加入 370 ml 二次水，稀釋成 4.59 倍，
放入避光的盒子。

(十三) SuperSignal substrate solution

將 SuperSignal I : SuperSignal II = 1 : 1 混合 (每次使用
皆現配)。

五、西方墨點法實驗步驟

(一) 細胞溶解萃取(Cell lysis extraction)

將經過月桃萃取物及月桃主成分反應的 KB 細胞，收集培養液於離心管中，離心 1500 rpm，5 分鐘，去上清液。
用 PBS 清洗一次，離心 1200 rpm，5 分鐘，再次去掉上清液。
用 1 ml pipette 抽吸至 1.5 ml micro tube，以 3000 rpm 離心 10 分鐘；4°C，抽掉上清液，加入適量 lysis buffer 並強烈振盪以充分混合。

將樣品放在冰上反應 20 分鐘或放入冰箱 overnight，
然後以離心機，使用 12,000 rpm 離心 30 分鐘，收集上清液
即為細胞萃取物(cell lysis extracts；total protein)。最後以
Bio-rad 定量其蛋白濃度，保存在-80°C 冰箱備用。

(二) 蛋白質膠體電泳(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis；SDS-PAGE)

1、鑄膠

膠體的配製依蛋白質分子量的大小而決定配製成

8、10、12、15%的 SDS-PAGE。

2、分離膠體溶液(Running gel；總體積 10 ml)

(1) 8% SDS-PAGE

加 4.6 ml H₂O，2.5 ml 1.5M Tris (pH=8.8)，2.7 ml
30% acrylamide mix，0.1 ml 10% SDS，0.1 ml 10%
ammonium persulfate 及 0.005 ml TEMED。

(2) 10% SDS-PAGE

加 4 ml H₂O，2.5 ml 1.5 M tris base(pH=8.8)，
3.3 ml 30% acrylamide mix，0.1 ml 10% SDS，0.1 ml
10% ammonium persulfate 及 0.005 ml TEMED。

(3) 12% SDS-PAGE

加 3.3 ml H₂O，2.5 ml 1.5M tris base (pH=8.8)，

4.0 ml 之 30% acrylamide mix , 0.1 ml 之 10% SDS , 0.1 ml 之 10% ammonium persulfate 及 0.005 ml TEMED 。

(4) 15% SDS-PAGE

加 2.3 ml H₂O , 2.5 ml 1.5M tris base (pH=8.8) , 5 ml 30% acrylamide mix , 0.1 ml 10% SDS , 0.1 ml 10% ammonium persulfate 及 0.005 ml TEMED 。

3、集離膠體溶液(5% Stacking gel ; 總體積 6 ml)

加入 4.2 ml H₂O , 0.78 ml 之 1.5 M tris base (pH=6.8) , 1 ml 之 30% acrylamide mix , 0.06 ml 之 10% SDS , 0.06 ml 之 10% ammonium persulfate 及 0.006 ml 之 TEMED 。

4、樣品前處理

取 50 µg 之蛋白質量於離心管 , 以 sample buffer 補齊不足量的體積 , 使每個反應管的體積皆為相同 , 同時加入 6 倍 protein loading buffer (此為樣品 1/6 倍的體積) , 混合均勻後 , 以 97 °C 加熱 6 分鐘後 , 將蛋白質樣本變性(denature)後 , 立即放回冰靜置 5 分鐘 , speed down 後 , 再用含有 SDS 之 8%、10%、12%或 15%

acrylamide gel (視蛋白質分子量大小而定)，以電泳方式將蛋白質分離。

5、電泳

將鑄好的 SDS-PAGE 組合放入電泳槽內，注入 1×electrode buffer 至槽內，此時槽內都充滿 1×electrode buffer，分別將標準品以確定蛋白質之分子量及 sample 小心加入，以固定於垂直電泳槽內的 stacking gel 的 well 內，以避免 sample 溢出，先以 80 伏特電壓跑 5% stacking gel，20 分鐘，再慢慢調整電壓至 100 伏特，約跑 5-6 小時，再進行蛋白質轉移。

6、蛋白質轉移(Transfer protein to PVDF membrane)

先將 PVDF membrane 及 3M paper 裁剪與膠片大小相同。於 PVDF membrane 標記上膠片之蛋白質 marker 的位置，方便偵測蛋白質訊號時比對分子量大小位置。將轉漬夾打開後黑色面朝下放，取出一片海綿墊片浸泡 transfer buffer 後放於其上面，並依序在海綿片上放上 3 mm paper、SDS-PAGE gel、PVDF membrane (先用 100% 甲醇濕潤 5 秒、再放於 transfer buffer 中浸潤)、3 MM paper，最後再放上一片海棉墊

片後夾上轉漬夾，並使用玻棒壓一壓以去除氣泡(夾層中間切勿有氣泡)，放入濕式 transfer machine 中並將 transfer buffer 倒入電泳槽中，以 20 伏特的電流轉印 15 小時(由負極到正極)，使蛋白質轉印到 PVDF 上。

7、免疫點墨法 (Immunoblotting)

轉印好蛋白質之 PVDF memberane 用 blocking solution 振盪 30 min，以 blocking solution 作為溶劑分別將欲測之一次抗體稀釋至適的濃度，加入 PVDF membrane 使其均勻的覆蓋於 membrane 上，並置於水平式旋轉器上室溫振盪 3 小時，用 washer buffer 洗三次，轉速為 100 rpm 每次 10 分鐘。依不同的一次抗體，加入特異作用的二次抗體，置於水平式旋轉器上室溫振盪 3 小時，用 washer buffer 洗三次，轉速為 100 rpm 每次 10 分鐘，藉此清洗未接合二次抗體，同時也可以降低背景值。將 PVDF membrane 加入 superSignal WestPico chemiluminescent substrate 溶液，振盪 1 分鐘，將轉印膜用保鮮膜完整包裹，使用 Amersham BioMax light film 壓片(依訊息的強弱調整壓片時間的長短)，將底片依序放入顯影劑、水、定影劑，最後再至入水中

清洗並停止顯色。以此方法檢視細胞內各個預測蛋白的變化量。

第十節、酵素活性分析(Zymography)【Tsai et al., 2003】

一、原理

酶譜分析(zymography)是一種利用聚丙烯醯胺凝膠電泳，檢測酶活性的方法。在 MMP 研究中，它具有以下特點：能測量 MMP 活性，可區分酶原和活化酶兩種形式，能同時檢測具有相同底物的一組 MMP，但不能組織定位。在酶譜分析的基礎上，又發現了原位酶譜分析 (in situ zymography)和反向酶譜分析 (reverse zymography)等方法，前者可組織定位，後者能檢測 MMP 的抑制劑 TIMP【Kleiner et al., 1994】。

二、試劑配製

(一) Sample buffer

1、材料：

- (1) 1.5 M tris-HCl (pH=6.8)
- (2) 30% SDS
- (3) glycerol
- (4) 0.3% bromophenol blue

2、步驟：

秤取 2.5 ml 1.5 M tris-HCl (pH=6.8)並加入 2 ml glycerol、4 ml 30% SDS、0.5 ml 0.3% bromophenol blue，最後加入 1 ml 二次水混合即可

(二) 10× Running buffer

取 29 g tris base、144 g glycine、10 g SDS，最後用二次水定量至 1000 ml。使用前再稀釋成 1×。

(三) 10× Developing buffer

取 12.1 g tris base、63 g tris-HCl、117 g NaCl、7.4 g CaCl₂、2 g brij 35，最後用二次水定量至 1000 ml。使用前再稀釋成 1×。

(四) 10× Renaturing buffer

取 25ml triton X-100，最後用二次水定量至 100 ml。使用前再稀釋成 1×。

(五) Coomassies Brilliant Blue R250 (染色液)

取 1 g Coomassie Brilliant Blue 加入 70 ml acetic acid 及 250 ml methanol 用水定量至 500 ml。

(六) Gel Destain Solution

取 210 ml acetic acid、300 ml methanol 用水定量至 3 L。

三、實驗步驟

(一) Matrix Metalloproteinase zymography

將 3×10^5 /well 細胞數種入 12 well，使細胞貼附後，以 PBS 清洗二次，換成無血清培養液，添加不同濃度月桃萃取物及月桃主成分，並於 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培養 24 小時，收集細胞培養液，於 1000 rpm、 4°C 下離心 5 分鐘，取等體積上清液加入 6x dye (sample buffer) 充分混合靜置 10 分鐘後進行電泳分離，以 8% SDS-PAGE、50V 進行電泳，其 running gel 含 gelatin ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)，當蛋白質標記 (protein marker) 到達膠體底部即停止電泳。之後將 running gel 以 renaturing buffer 室溫作用 30 分鐘，以去除 SDS，再用清水清洗二次後，以 zymogen developing buffer 於室溫下先作用 30 分鐘後，再換成新的 zymogen developing buffer，於 37°C 環境下繼續作用 18 小時後移除，以清水洗一次，並利用 0.5% coomassie blue R-250 染色 30 分鐘，再以 gel destain solution 脫色，若樣本含有 MMP-9，則在膠體分子量 92 kDa 位置會因 gelatin 被酵素分解而呈現的透明 band。

第十一節、動物腫瘤異種移植與組織染色【Deng et al., 2008】

一、實驗動物：

本研究將用BALB/c-nu nude mice (6~8 weeks old) 裸鼠，購自台灣醴聯生技醫藥股份有限公司，將它們飼養之溫度維持在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相對濕度在 $65\pm 5\%$ ，為一無塵自動控制室。並以自動定時器控制光照週期，06:00~18:00屬於光照期(light period)，18:00~06:00屬於黑暗期(dark period)。飼養於乾淨之鼠籠中並以乾淨的鼠糧與水餵食。實驗進行之前動物先經7天之適應期。

二、裸鼠皮下腫瘤移植之動物模式建立

KB 細胞($1\times 10^6/200\ \mu\text{l}$)以皮下注射的方式將其植入裸鼠背部右下側，將處理過的裸鼠養育於平常的環境下，每天觀察腫瘤生長情形，一週後隨機分組。在實驗期間每週測量腫瘤體積大小變化並紀錄。腫瘤體積以長徑 x 短徑²/2 求得【Osborne et al., 1987】。

三、給藥途徑

採用腹腔注射且每隻裸鼠同一時段處理。給予期間:每隔1 天固定時間給予月桃萃取物及月桃主成分，採取腹腔注射給

予，為期 5 週，之後犧牲動物解剖取出腫瘤，測量其重量與體積，同時也搜集體內其它器官(包括：肝臟、腎臟、脾臟等)。試驗組別：(1)控制組(PBS)；(2)月桃萃取物組(10 mg/kg)；(3)flavokawain B 組(0.75 mg/kg)，實驗試劑以 PBS 溶解之。

四、組織包埋與切片

(一) 材料

Maxwell's Embedding Wax (邁克斯威爾氏包埋石臘)

Paraffin 100 g + Hance's Rubber 母液 4 g + Bayberry Wax 7 g

+ 蜂臘 1 g

(二) 實驗步驟

將犧牲後的裸鼠取下腫瘤組織(去除表面皮膚)，之後組織放入 10% 的福馬林固定後，利用石臘包埋。選取適當的金屬製底模，注入石臘，夾取組織埋入石臘。以包埋匣底部壓蓋組織片，再注入石臘。放在室溫下，使它冷卻數分鐘，石臘組織塊可輕易自底模剝離。

剝除組織塊周圍多餘的蠟(粗切)。將蠟塊置於切片機上固定，調整切片厚度(5 μ m)。之後進行切片，邊以針頭協助調整切片，切完後將組織片放入溫水中伸展，數分鐘後用

載玻片將組織片撈起，並放置 37 °C 烘箱 1 天備用。

五、病理 H&E 染色法

(一) 材料

1、Hematoxylin solution 之配製

銨礬或鉀礬(Ammonium or potassium aluminum sulfate)	50 g
hematoxylin crystals	1 g
碘酸鈉(sodium iodate)	0.2 g
檸檬酸(citric acid)	1 g
水化氯醛(chloral hydrate)	50 g
蒸餾水	1000 ml

2、Eosin solution 之配製

Eosin Y	1 g
95%酒精	300 ml
蒸餾水	1000 ml

(二) 實驗步驟

將玻片放於Xylene中脫蠟3次、每次2分鐘，再依序置放在100% 酒精中2次，每次作用10秒、 95% 酒精中10秒、80% 酒精中10秒、70%酒精中10秒的水化流程，再用蒸餾水洗20秒，之後用Hematoxylin solution染30至50

秒，再浸在0.1% 醋酸水中作用20秒，用流水洗7分鐘，再用Eosin染1分40秒，然後進行脫水的流程，依序置放在80%酒精中30秒、95% 酒精中30秒、95% 酒精中20秒、100%酒精中20 秒、100%酒精中30 秒，最後再用Xylene共澄清3次，前2次每次20 秒，然後1次1分鐘，並以Histoclad封片。

第十二節、DNA 片段偵測(DNA fragmentation detection)

【Kim et al., 2008】

一、原理

細胞凋亡中染色體 DNA 的斷裂是個漸進的分階段的過程，染色體 DNA 首先在內源性的核酸水解酶的作用下降解為50-300 kb 的大片段。然後大約 30 % 的染色體 DNA 在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依賴的核酸內切酶作用下，在核小體單位之間被隨機切斷，形成 180~200 bp 核小體 DNA 多聚體。DNA 雙鏈斷裂或只要一鏈上出現缺口而產生的一系列 DNA 的 3'-OH 末端可在去氧核糖核苷酸末端轉移酶 (TdT) 的作用下，將去氧核糖核苷酸和螢光素、過氧化物酶、鹼性磷酸化酶或生物素形成的

衍生物標記到 DNA 的 3' 末端，從而可進行凋亡細胞的檢測(褐色)，這類方法一般稱為 TUNEL。由於正常的或正在增殖的細胞幾乎沒有 DNA 的斷裂，因而沒有 3'-OH 形成，很少能夠被染色(藍色)，然後就可以分析凋亡細胞。

二、實驗步驟

(一) 動物切片(脫蠟、回水步驟)

腫瘤組織切片取出後，浸泡二甲苯(xylene) 50°C~60°C 的烘箱 30~50 分鐘(進行脫蠟)，之後再移入第二缸(含二甲苯，蓋上包覆錫箔的蓋子) 50°C~60°C 的烘箱 10 分鐘。脫蠟結束後依序放置於 99.8%酒精中 5 分鐘、99.8 %酒精中 5 分鐘、95 %酒精(含有無水硫酸銅)5 分鐘、70 %酒精中 5 分鐘，置於 citrate buffer 加熱 90°C、20 分鐘。之後利用蒸餾水冷卻 30 分鐘，以 TBS 進行清洗。

(二) 細胞固定(固定、回水步驟)

抽掉上清液後，加入 1% paraformaldehyde 在室溫下反應 10 分鐘。用 TBS 清洗兩次，每次五分鐘，之後再加入酒精與醋酸(2:1)的溶液在-20°C 下後固定 5 分鐘，最後用 TBS 清洗兩次，每次五分鐘。

(三) 復性步驟(10 片量)

復性方法主要分成兩大系統：

1、Heat induce epitope retrieval (HIER)加熱法-免疫組織

染色法(IHC)適用

2、37°C下使用 protease，主要應用在“不適合加熱”、“病

毒實驗”

首先從 kit 中取出 10 μ l proteinase K 加入 990 μ l 的 10 mM Tris 後混合，之後每片加入 100 μ l，在室溫下反應 20 分鐘(不要超過時間)，最後用 TBS 進行清洗，並保持玻片上濕潤。

(四) 去除內生性的 H₂O₂(10 片量)

首先從 kit 中取出取出 100 μ l 的 30% H₂O₂ 加入 900 μ l 的甲醇後混合，之後每片加入 100 μ l，在室溫下反應 5 分鐘(不要超過時間)，用 TBS 進行清洗，並保持玻片上濕潤。

(五) DNA 片段標定(10 片量)

取出 200 μ l 的 5X TdT equilibration buffer 加入 800 μ l 的二次水後混合，每片加入 100 μ l，在室溫下反應 20 分鐘(最多到 30 分)，結束吸掉液體。反應快結束前，取出 TdT Labeling Reaction Mixture 震盪混合離心，取出 570 μ l

TdT Labeling Reaction Mixture 加入 30 μl 的 TdT enzyme

混合每片加入 60 μl ，在 37°C 下反應 90 分鐘。

(六) 終止反應(10 片量)

反應快結束前，取出 stop buffer 至 37°C 回溫 5 分鐘，之後用 TBS 進行清洗，並保持玻片上濕潤。加入 30 μl Stop buffer 在室溫下反應 5 分鐘。用 TBS 進行清洗，並保持玻片上濕潤

(七) 偵測反應(10 片量)

加入 100 μl blocking buffer 在室溫下反應 10 分鐘，結束時吸掉液體。反應期間，取出 20 μl 50X conjugate 加入 980 μl 的 blocking buffer 甲醇後混合。每片加入 100 μl ，在室溫下反應 30 分鐘，反應結束前五分鐘，取出 DAB、 H_2O_2 /Urea 各一片加入 1 cc 的二次水後混合。用 TBS 進行清洗，並保持玻片上濕潤加入 DAB 溶液反應 10-15 分鐘，用二次水進行清洗 3 次，並保持玻片上濕潤。

※ 注意加入 DAB 後，可以在顯微鏡下看其顏色產生

(八) 複染(10 片量)

夾出玻片，放在蓋玻片上。加入 100 μl methyl green counterstain solution 在室溫下反應 10 分鐘，浸入含 100%

乙醇玻璃缸來回 3~4 次。重新浸入含新 100%乙醇玻璃缸
來回 3~4 次，再浸入含二甲苯玻璃缸 2 分鐘，擦乾周圍。
加入 100 μ l 阿拉伯膠，覆蓋在玻片上

第十三節、統計分析

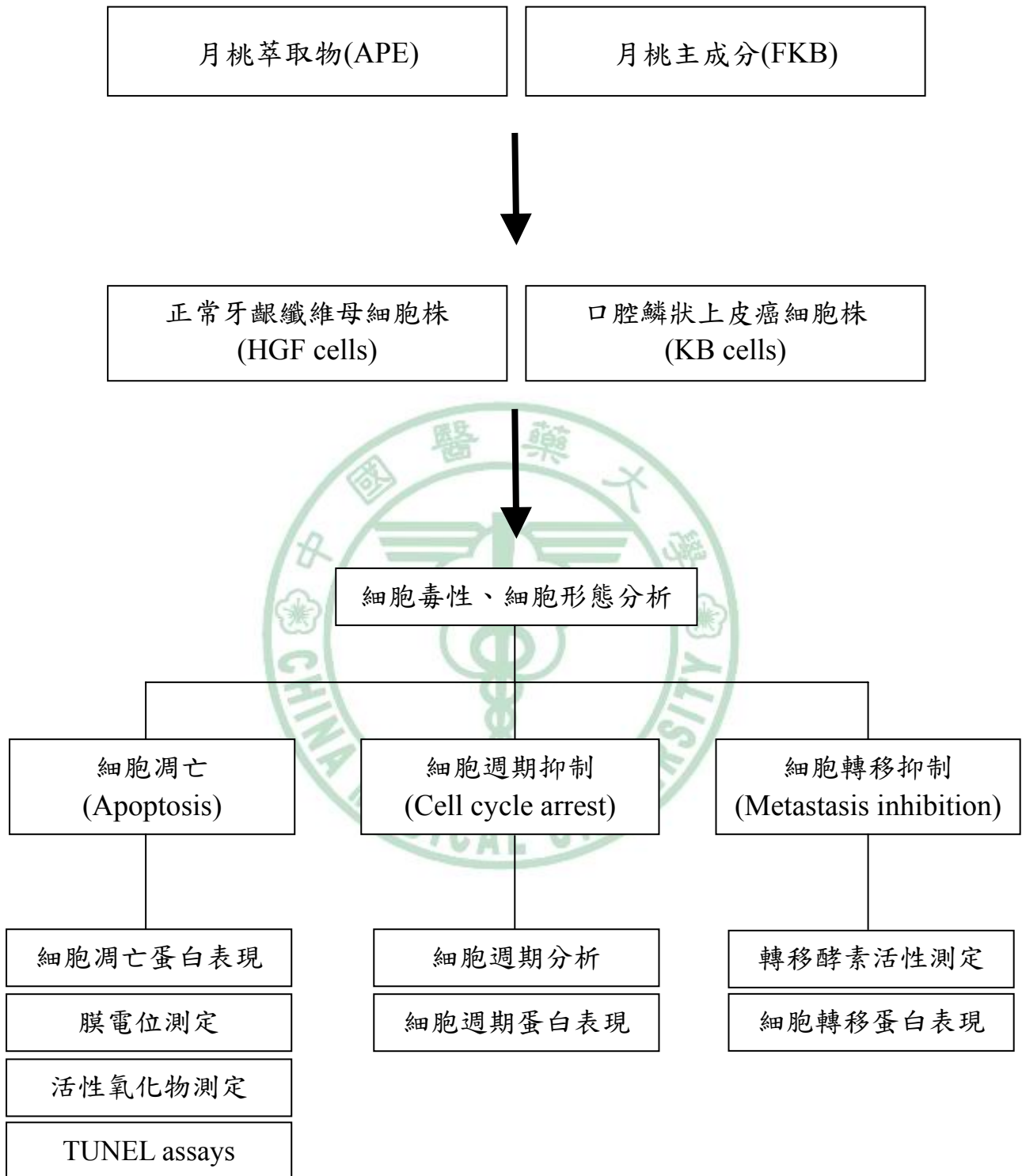
實驗結果數據皆以平均值 \pm 標準差(Mean \pm SD)表示。SPSS 系統進行變異性分析(ANOVA)，並以 Duncan's multiple range test 做組間差異比較。P < 0.05 代表有顯著性差異。



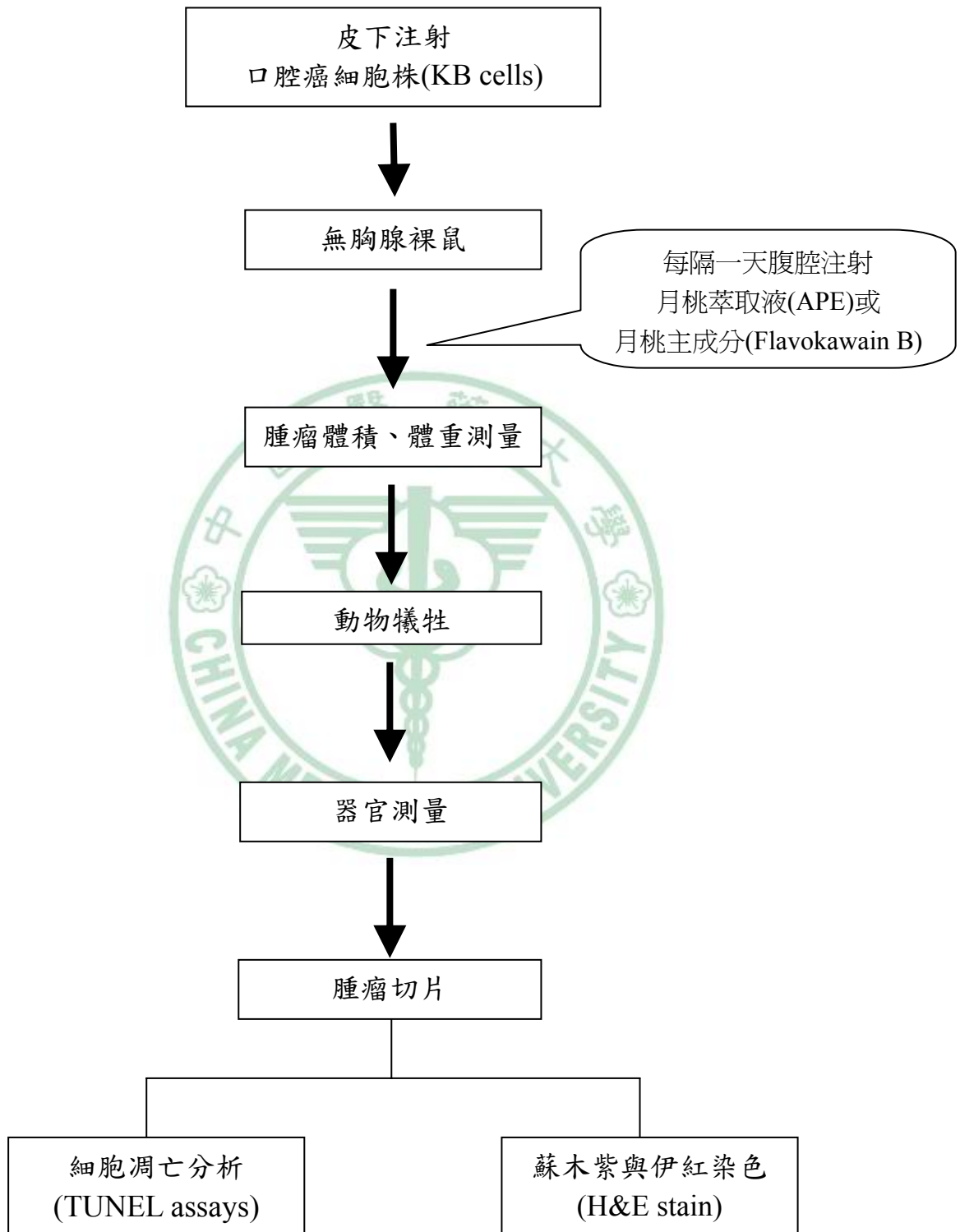


參、實驗設計流程

細胞實驗設計流程(*In Vitro*)



動物實驗設計流程(In Vivo)



肆、實驗結果與圖表



第一部份

探討月桃萃取物(APE)對人類口腔
鱗狀上皮癌細胞株(KB)之影響



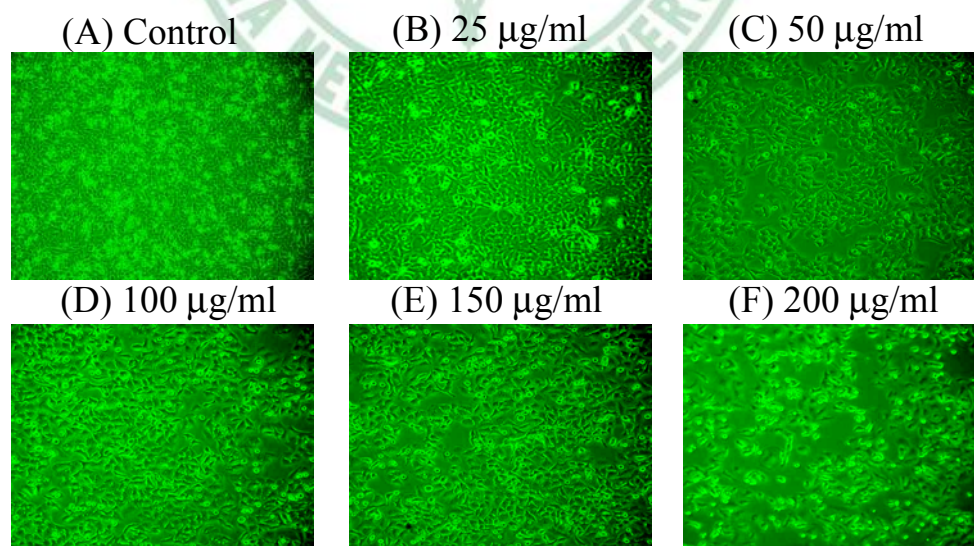
一、細胞實驗(*In Vitro*)

一、月桃萃取物(APE)對人類口腔鱗狀上皮癌細胞株(KB)之細胞毒性與細胞型態的影響

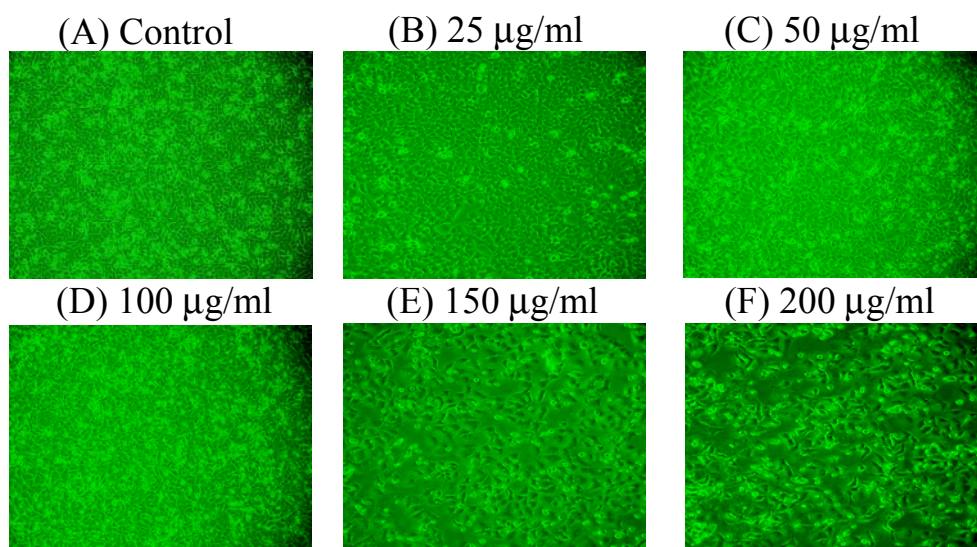
(一) 月桃萃取物(APE)對 KB 細胞存活率(Cell viability)

加入不同濃度的月桃萃取物(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)作用於KB (3×10^5 cells/12 well)中，分別於24、48、72小時後觀察KB細胞存活的情形。結果發現隨著月桃萃取物劑量的增加，在濃度100-200 $\mu\text{g/ml}$ 時細胞型態就有不完整的現象(圖十、十一、十二)。在反應24、48、72小時部分在濃度50-200 $\mu\text{g/ml}$ 對KB細胞存活率就有明顯的下降($p < 0.05$)(圖十三)。

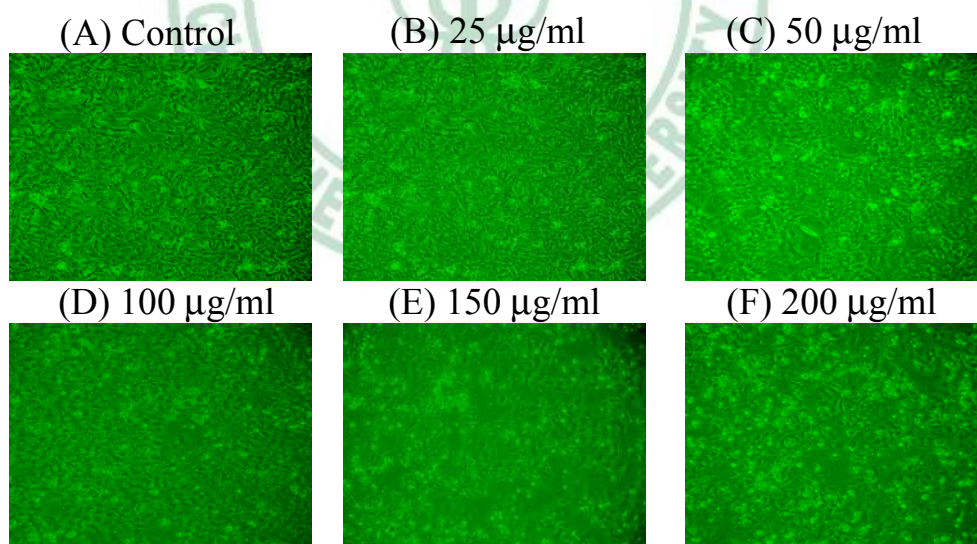
利用流式細胞儀(flow cytometry)評估細胞凋亡情形，結果發現隨著APE作用時間及濃度愈高則sub-G1(細胞凋亡指標)則愈高，而且在月桃萃取物劑量150 $\mu\text{g/ml}$ 時，sub-G1的百分比隨著時間(24、48、72小時)的上升而增加了5.0%、8.5%、31.8%(圖十四、表七)。



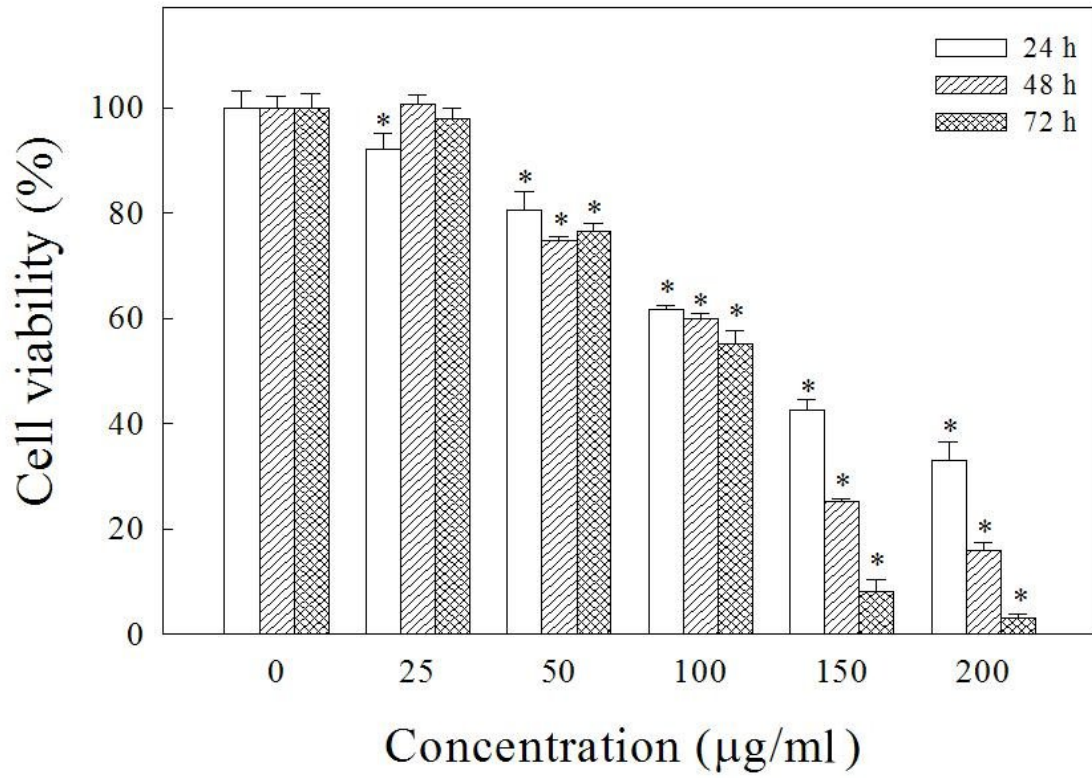
圖十、以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞株 24 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



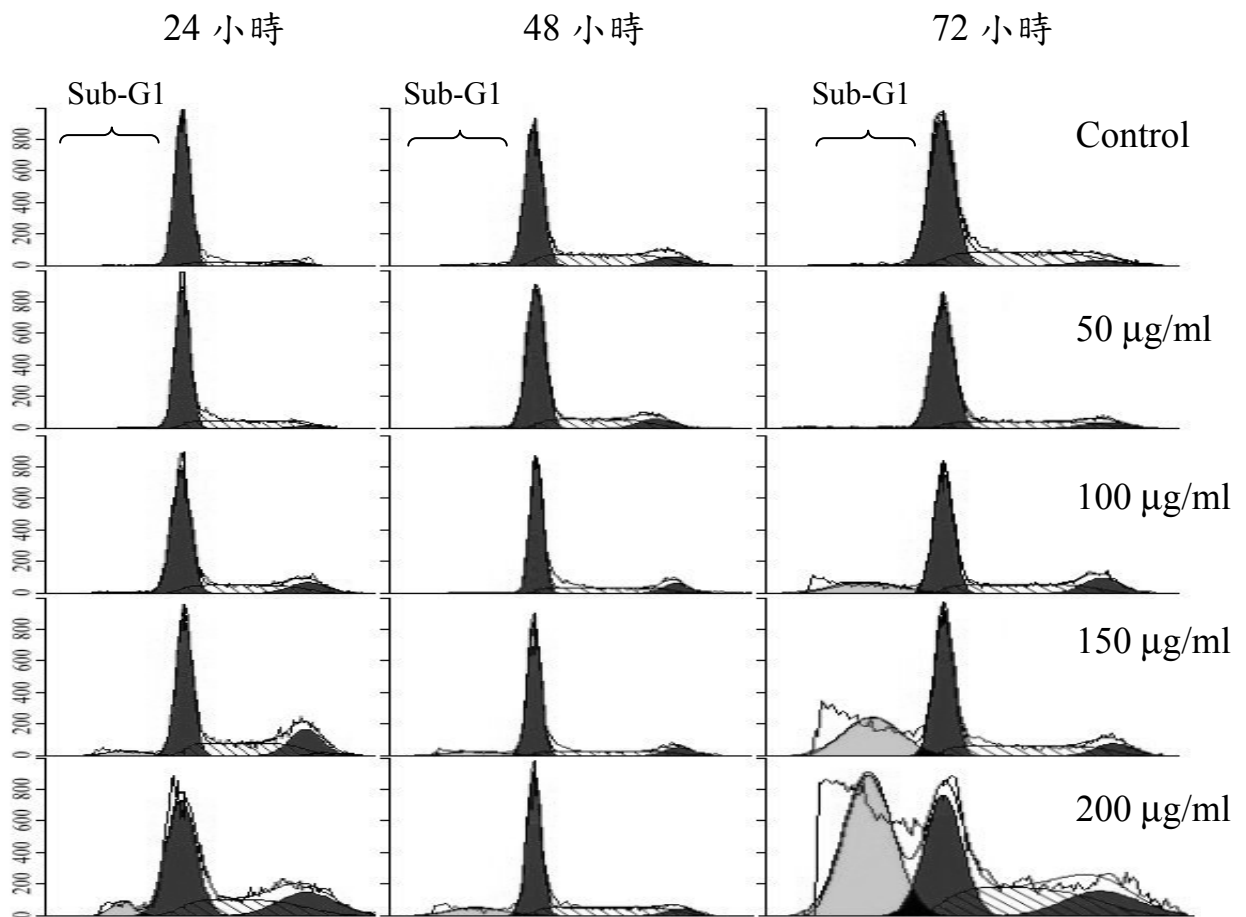
圖十一、以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞株 48 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



圖十二、以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞株 72 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



圖十三、以 0、25、50、100、150、200 µg/ml 月桃萃取物處理 KB 細胞株 24、48、72 小時後細胞的存活率。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。



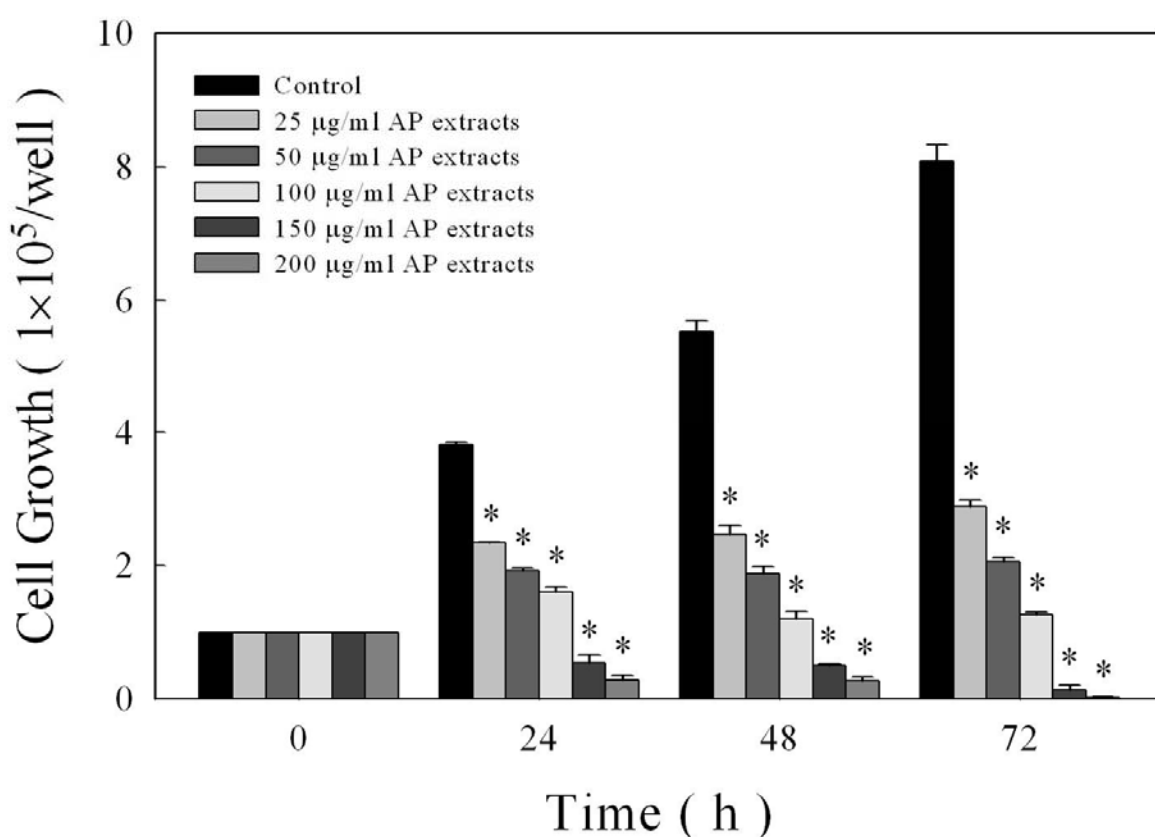
圖十四、利用流式細胞儀偵測以 0、50、100、150、200 µg/ml 的月桃萃
 取物處理 KB 細胞株 24、48、72 小時後 sub-G1 的情形。

表七、利用流式細胞儀計算以 0、50、100、150、200 µg/ml 月桃萃取物
 處理 KB 細胞株 24、48、72 小時後 sub-G1 細胞比例。數據結果
 以 mean ± SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。

(µg/ml)	Sub-G1 Cell population (%)		
	24 h	48 h	72 h
0	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.8	1.0 ± 0.6
50	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.8	0.7 ± 0.1
100	1.4 ± 0.6*	0.4 ± 1.0	19.0 ± 1.6*
150	5.0 ± 0.6*	8.5 ± 0.7*	31.8 ± 1.8*
200	5.4 ± 0.2*	14.0 ± 1.5*	41.2 ± 5.4*

(二) 月桃萃取物(APE)對 KB 細胞生長率(Cell growth)

加入不同濃度的月桃萃取物(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)作用於 KB (1×10^5 cells/6 well)中，分別於 24、48、72 小時後觀察 KB 細胞的生長情形。結果發現隨著月桃萃取物劑量增加，在反應 24、48、72 小時下所有濃度對 KB 細胞生長率有明顯的抑制($p < 0.05$)，呈現劑量效應關係(圖十五)

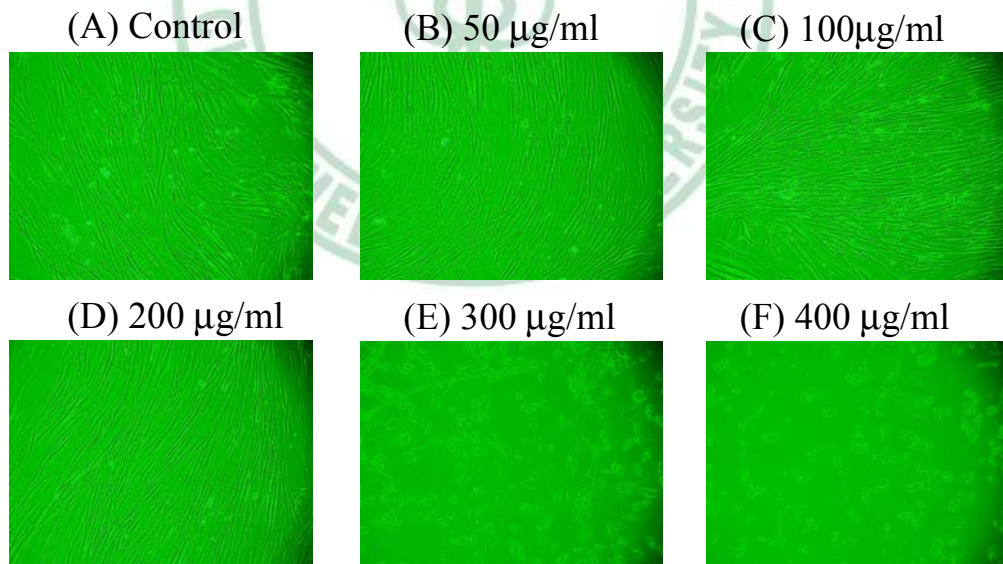


圖十五、以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 KB 細胞株 24、48、72 小時後細胞的生長率。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* $p < 0.05$ v.s. control。

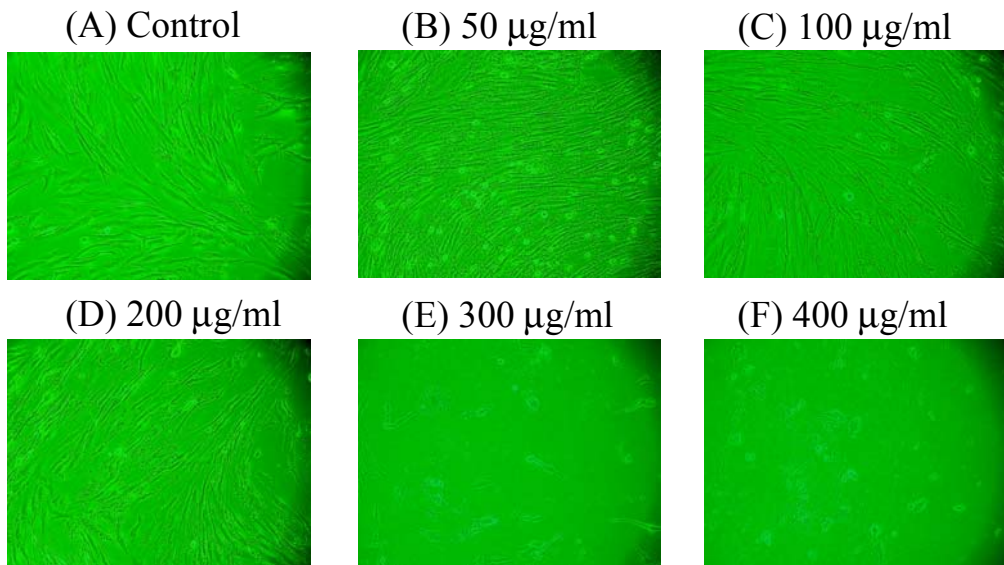
二、月桃萃取物(APE)對人類正常牙齦纖維母細胞(Human gingival fibroblast cells)之細胞毒性與細胞型態的影響

(一) 月桃萃取物(APE)對 HGF 細胞存活率(Cell viability)

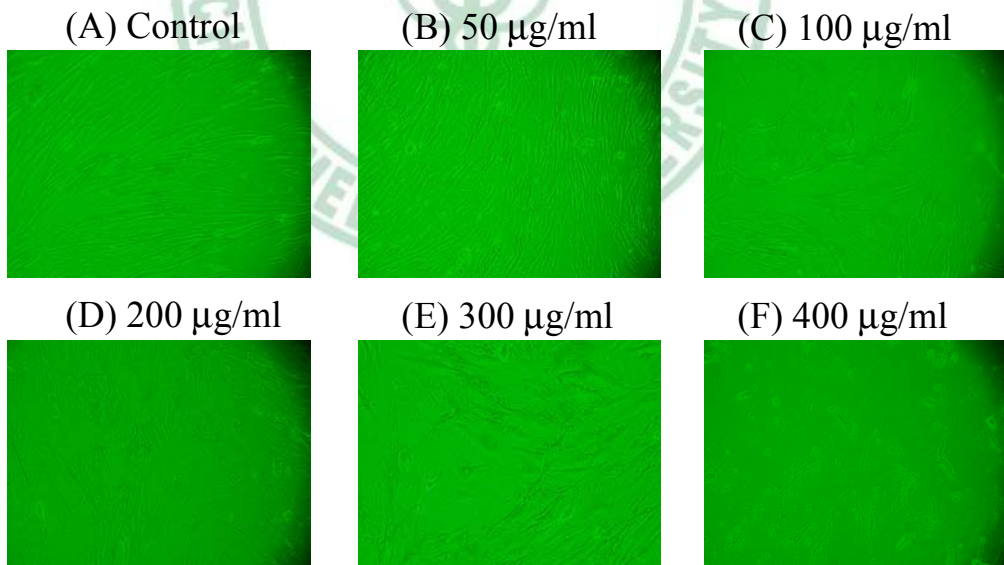
加入不同濃度的月桃萃取物(50、100、200、300、400 $\mu\text{g/ml}$)作用於HGF (3×10^5 cells/ml)中，分別於24、48、72小時後觀察HGF細胞生長的情形(圖十六、十七、十八)。結果發現隨著月桃萃取物濃度在300及400 $\mu\text{g/ml}$ 對HGF細胞存活率有明顯細胞毒殺現象且細胞型態呈現不完整的現象，在72小時則在每個濃度下均有顯著的細胞毒性(圖十九)。由於月桃萃取物對HGF細胞在24小時下並不具有很明顯的細胞毒性，因此選取24小時作為今後實驗劑量反應時間。



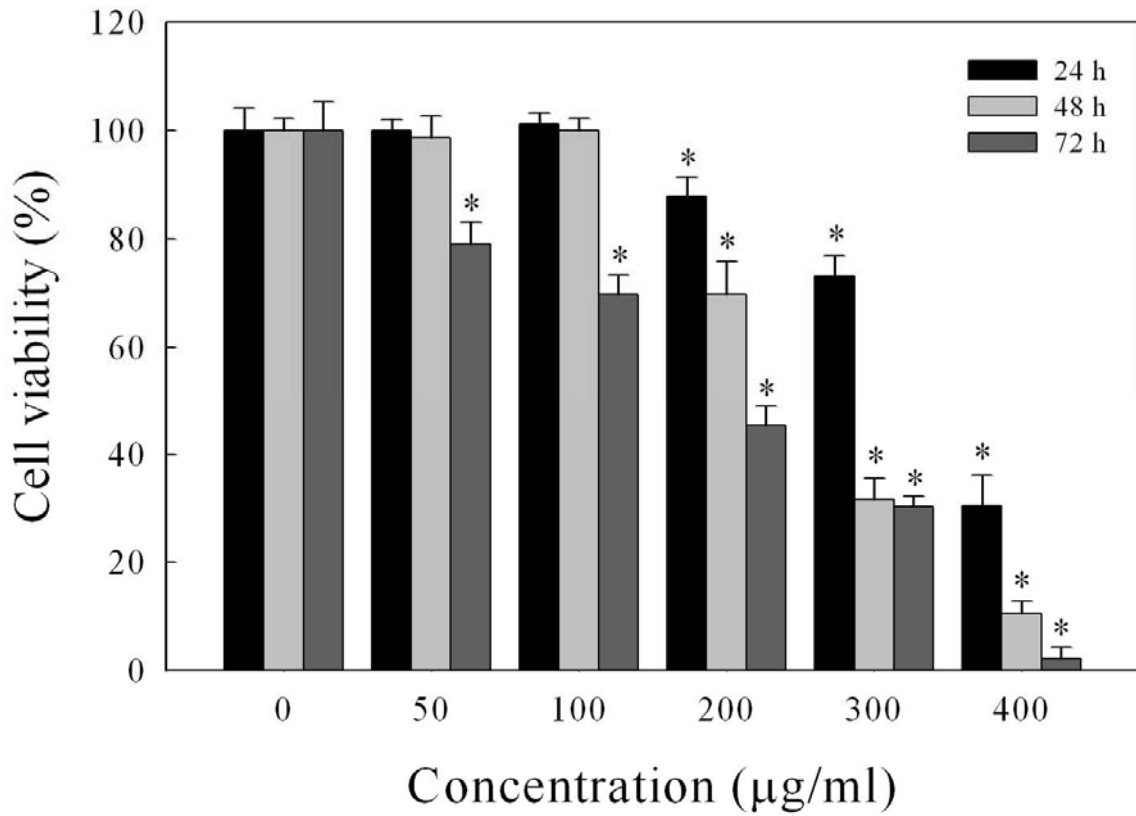
圖十六、以 0、50、100、200、300、400 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物處理 HGF 細胞株 24 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



圖十七、以 0、50、100、200、300、400 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物處理 HGF 細胞株 48 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



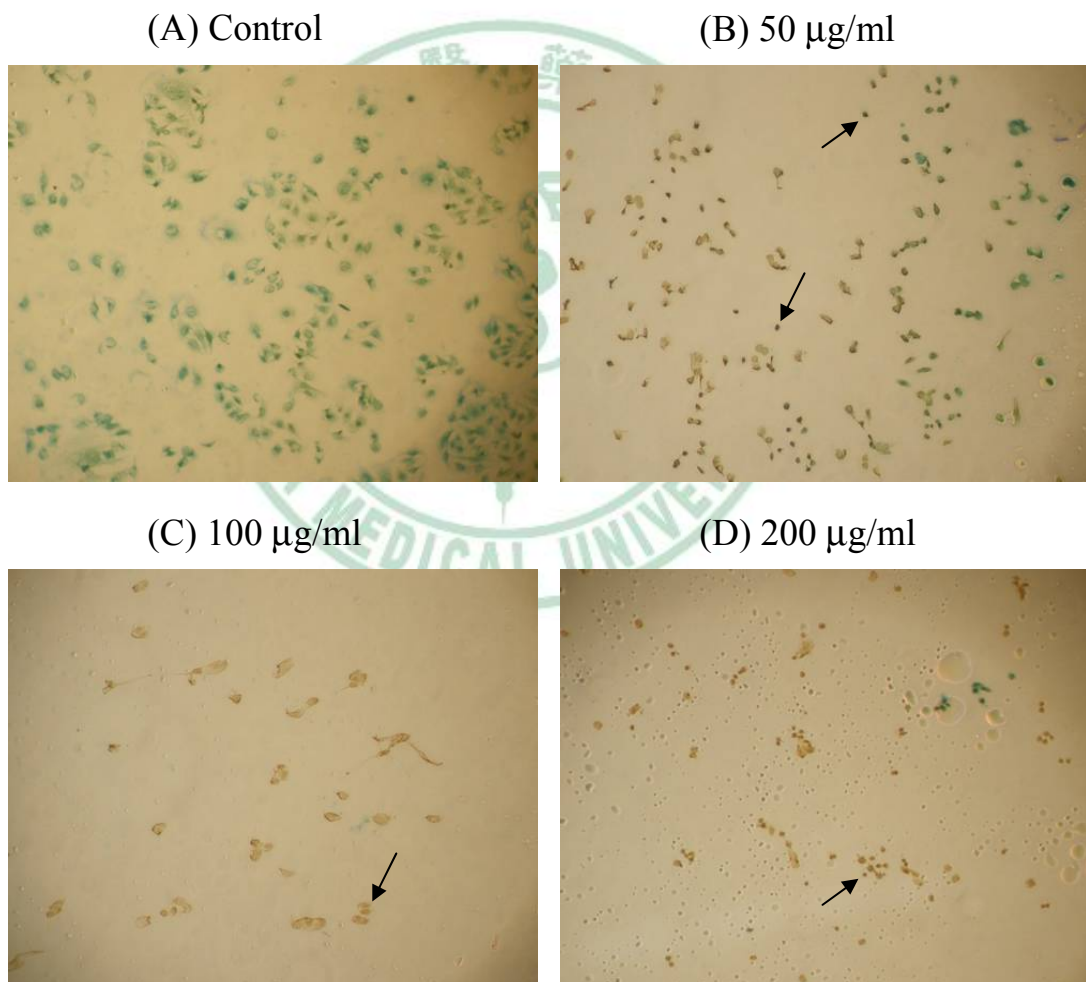
圖十八、以 0、50、100、200、300、400 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物處理 HGF 細胞株 72 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



圖十九、以 0、50、100、200、300、400 µg/ml 的月桃萃取物處理 HGF 細胞株 24、48、72 小時後細胞的存活率。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

三、APE 對 KB cells 產生 DNA fragmentation 分析

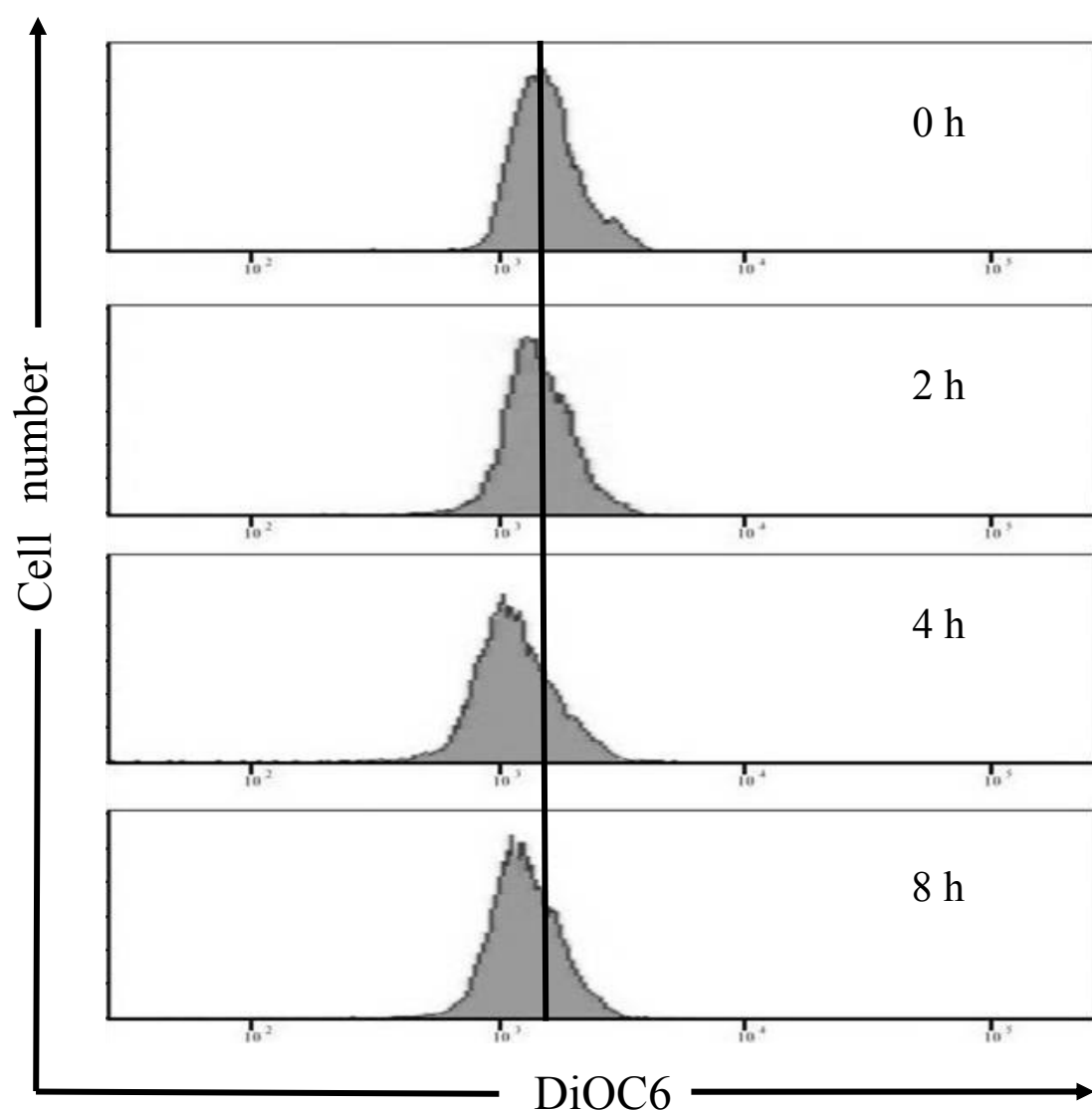
加入不同濃度的月桃萃取物(50、100、200 $\mu\text{g/ml}$)作用於 KB (3×10^5 cells/6 well)中，分別於 24 小時後利用 TUNEL assay kit 分析。控制組的 KB 細胞幾乎都呈現 TUNEL⁻細胞(藍色)，而經過 50 $\mu\text{g/ml}$ APE 反應下的 KB，有部份表現出 TUNEL⁻細胞而有部分呈現出 TUNEL⁺(棕色)，而在 100、200 $\mu\text{g/ml}$ 下就明顯發現細胞全部有細胞凋亡的棕色細胞之現象(圖二十)。



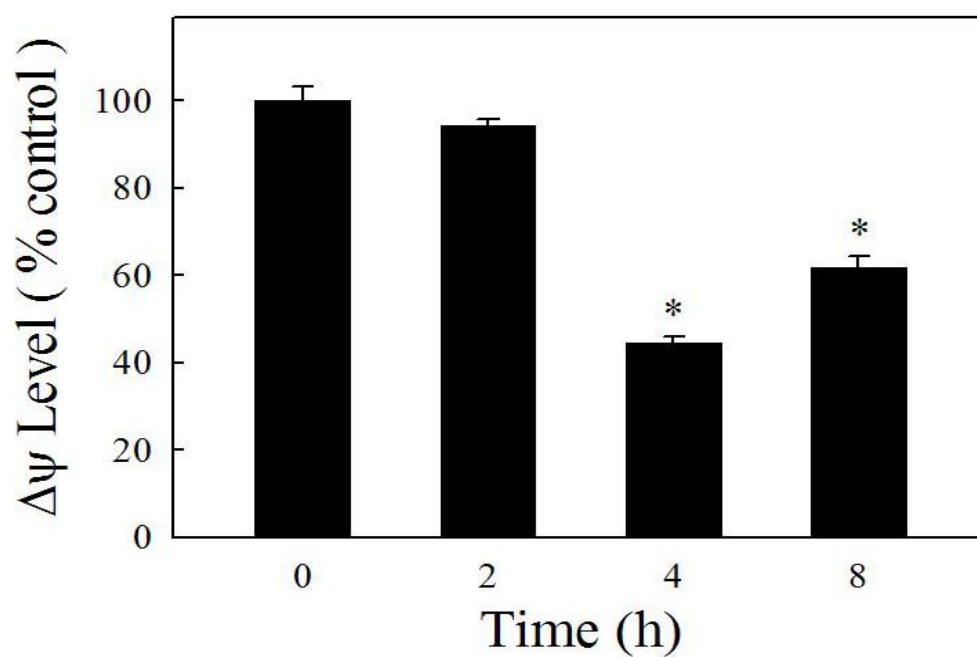
圖二十、以 0、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物處理 KB 細胞株 24 小時後細胞產生 DNA fragmentation 的表現。箭頭所指即表示凋亡細胞。

四、細胞膜電位($\Delta\Psi$)測定分析

利用流式細胞儀檢測加入 150 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物(APE)作用於 KB 細胞中，分別於 2、4、8 小時的反應時間來檢測細胞產生膜電位後變動的情形(圖二十一)。結果發現在反應 4、8 小時就有明顯的左移的現象且在 4 小時達到高峰，表示有膜電位下降的情況發生($p < 0.05$)(圖二十二)，顯示細胞可能藉由粒線體路徑而造成膜電位下降。



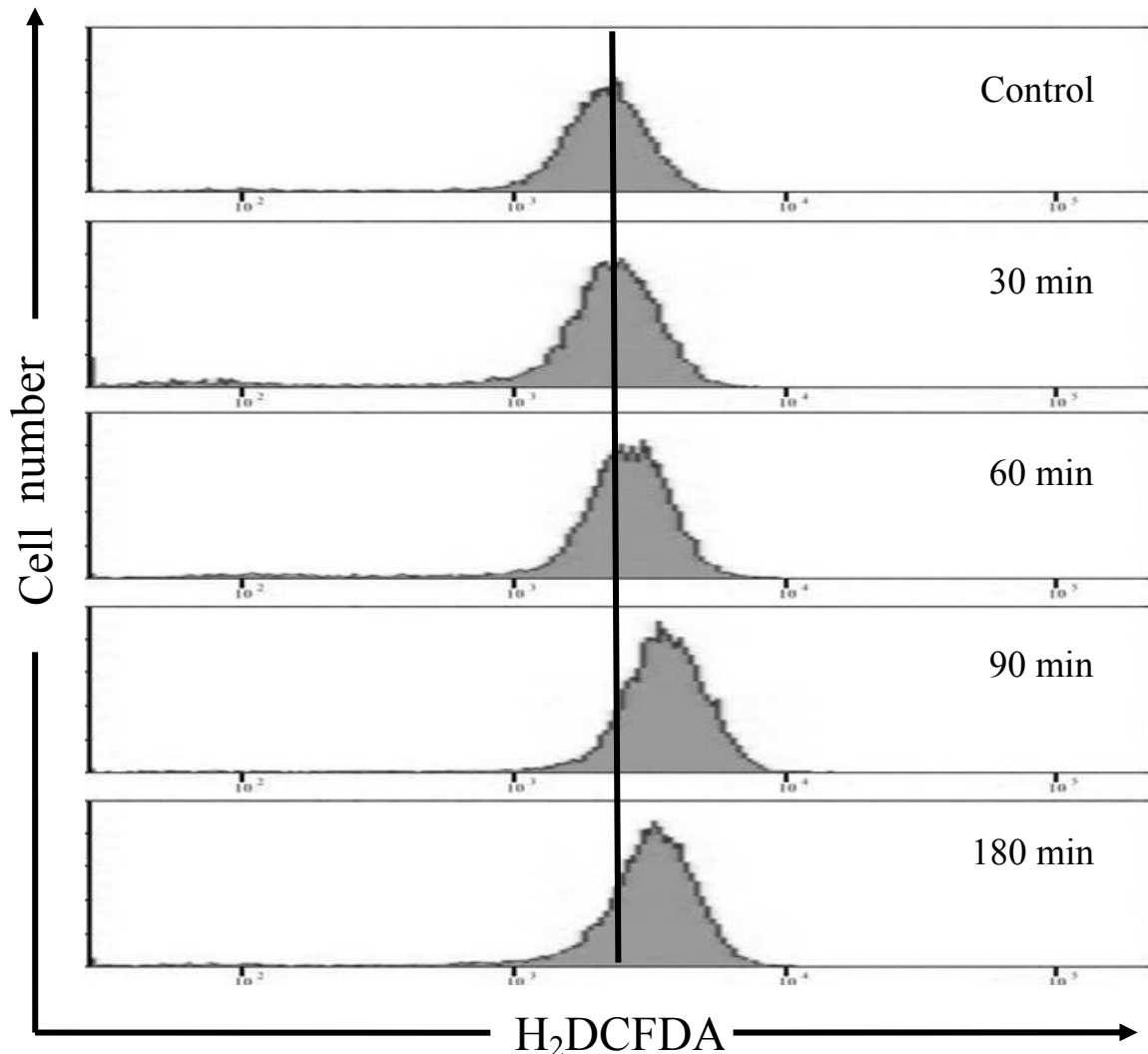
圖二十一、以 150 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物(APE)處理 KB 細胞株 2、4、8 小時後膜電位變動的情形。



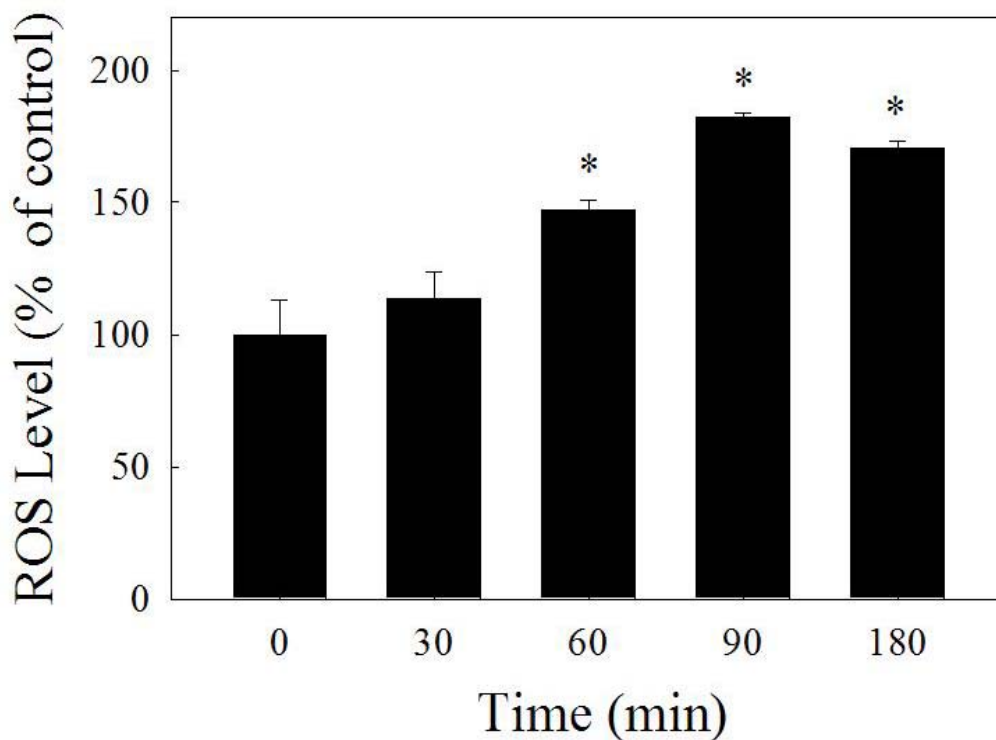
圖二十二、KB 細胞株經過 150 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物(APE)處理 2、4、8 小時後膜電位變動量化圖。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* $p < 0.05$ v.s. control。

五、活性氧化物(Reactive oxygen species)測定

利用流式細胞計數儀評估150 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的月桃萃取物(APE)處理不同時間0、30、60、90、180分鐘，再加入 H_2DCFDA ，並觀察其產生活性氧化物的情形。結果發現在60分鐘就有明顯的右移，且隨著時間的延長，曲線右移情形更明顯(圖二十三)，由量化圖得知在90分鐘達到高峰，表示細胞有產生活性氧化物的情形(圖二十四)，可能因此而造成細胞的DNA 傷害。



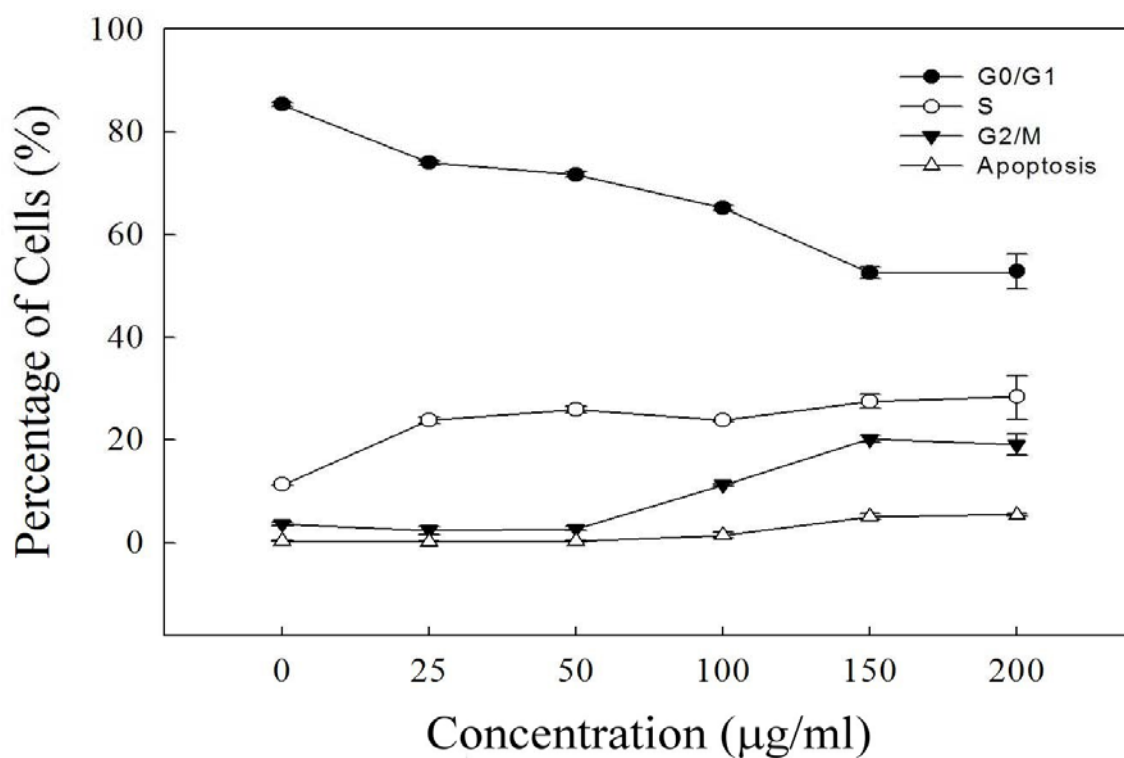
圖二十三、以 150 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物(APE)處理 KB 細胞株 0、30、60、90、180 分鐘後活性氧化物生成的情形。



圖二十四、KB 細胞株以 150 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物(APE)處理 0、30、60、90、180 分鐘後活性氧化物生成量化圖。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

六、KB cells 細胞週期之影響

利用流式細胞儀評估以 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物(APE)處理 24 小時後，觀察其細胞週期的表現。發現隨著 25-200 $\mu\text{g/ml}$ ，G0/G1 期之細胞比例有逐漸降低，且相對地 G2/M 期細胞比例增加。由此可知，月桃萃取物(APE)可以使 KB 細胞株引起細胞週期停在 G2/M 期 (圖二十五、表八)。



圖二十五、利用流式細胞儀偵測以 0、25、50、100、150、200µg/ml 月桃萃取物處理 KB 細胞株 24 小時後細胞週期停滯情形。

表八、利用流式細胞儀計算不同濃度的月桃萃取物處理 KB 細胞株 24 小時之細胞各週期表現。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3
* p< 0.05 v.s. control。

(µg/ml)	Cell population (%)			
	Sub-G1	G1	S	G2/M
0	0.3 ± 0.03	85.2 ± 0.38	3.6 ± 0.36	11.2 ± 0.01
25	0.1 ± 0.03	74.0 ± 0.39*	2.4 ± 0.77	23.7 ± 0.63*
50	0.3 ± 0.13	71.7 ± 0.53*	2.6 ± 0.39	25.7 ± 0.63*
100	1.4 ± 0.60*	65.2 ± 0.39*	11.2 ± 0.23*	23.6 ± 0.25*
150	5.0 ± 0.60*	52.5 ± 1.12*	20.1 ± 0.58*	27.4 ± 1.33*
200	5.4 ± 0.23*	52.8 ± 3.42*	19.0 ± 2.01*	28.2 ± 4.28*

七、西方墨點法分析細胞蛋白的表現

(一) 細胞週期蛋白表現(Cell cycle protein expression)

先前的實驗結果顯示月桃萃取物(APE)造成細胞停滯在G2/M期，為探究其機制，以西方墨點法(Western blotting)分析月桃萃取物(APE)對細胞週期蛋白質表現量影響。偵測參與調控細胞週期相關的G2/M期的蛋白有：

1. CDKs：Cdc 2
2. Cyclins：Cyclin A、Cyclin B
3. CDKIs：p53、p-p53、p21
4. 其他：Cdc 25c、Wee 1

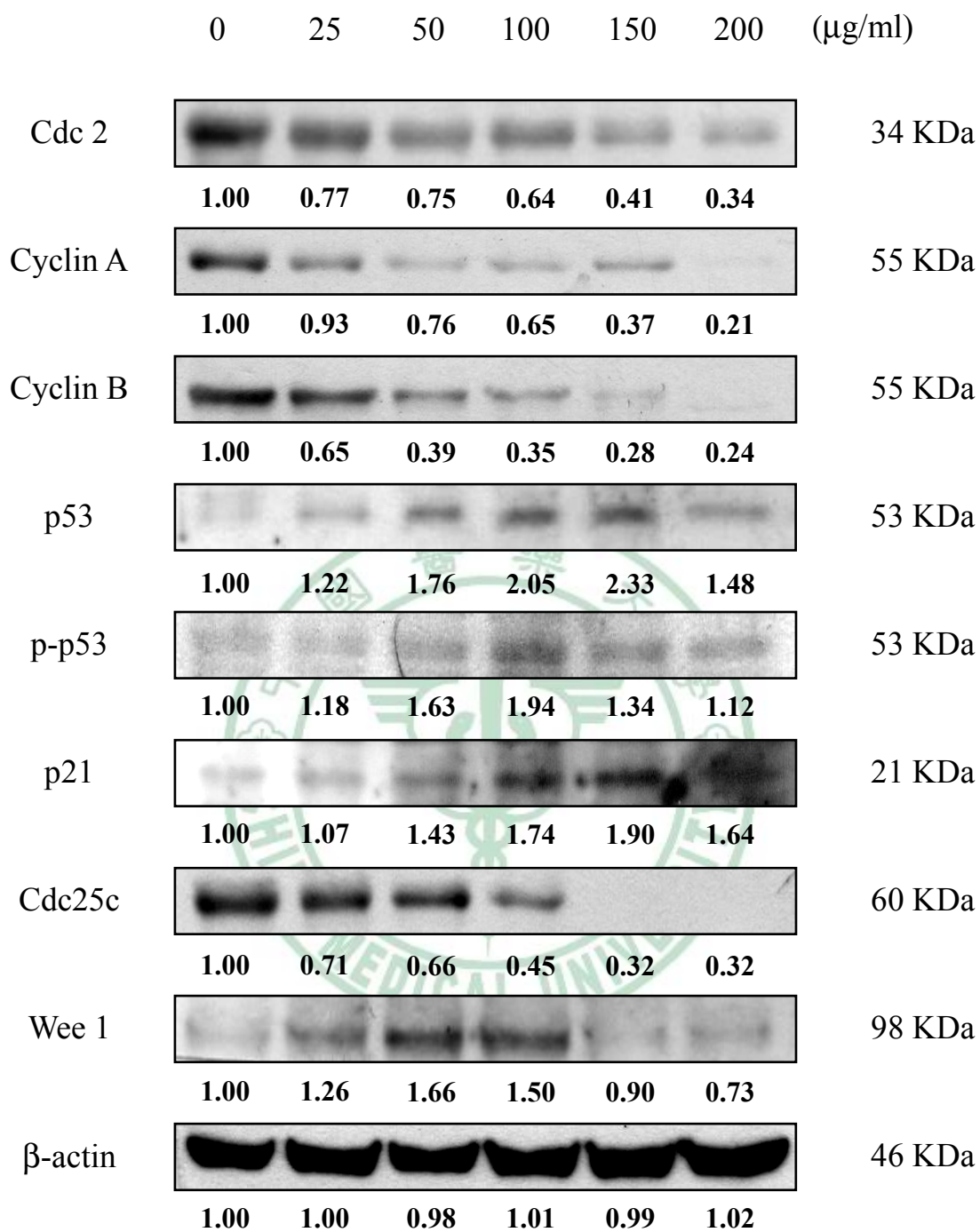
分別以0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物(APE)處理KB細胞24小時後觀察蛋白表現量變化，結果發現Cdc 2、Cyclin A、Cyclin B、Cdc 25c在25-200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白表現下降，p53、p-p53在50-200 $\mu\text{g/ml}$ APE反應，隨著濃度增加而蛋白表現增加的情形，而p21、Wee 1也是在加入25-200 $\mu\text{g/ml}$ APE時，隨著濃度增加而蛋白表現增加(圖二十六、圖二十七)。

之後再以150 $\mu\text{g/ml}$ APE反應不同時間(0、4、8、12、18、24小時後，觀察蛋白表現量變化，結果發現，Cdc 2、Cyclin A、Cyclin B、Cdc 25c在反應4-24hr時，隨著時間增加而蛋白表現下降；p53、Wee 1隨著時間增加而蛋白表現增加的情形，而 p-p53、p21 分別在反應8hr、18hr時才有隨著時間增加而蛋白表現增加的情形(圖二十八、圖二十九)。

所以KB細胞可能在APE不同濃度及不同時間的作用下，首先活化p53，繼而活化下游的p21，之後活化Wee 1；抑制Cdc 25c等抑制複

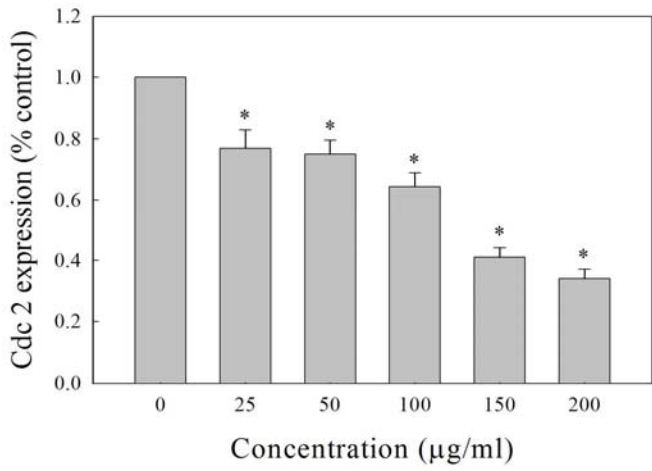
合體結合因子，最後抑制Cdc 2、Cyclin A、Cyclin B所形成
Cyclin-CDK複合體結合，而使細胞停滯於G2/M期。



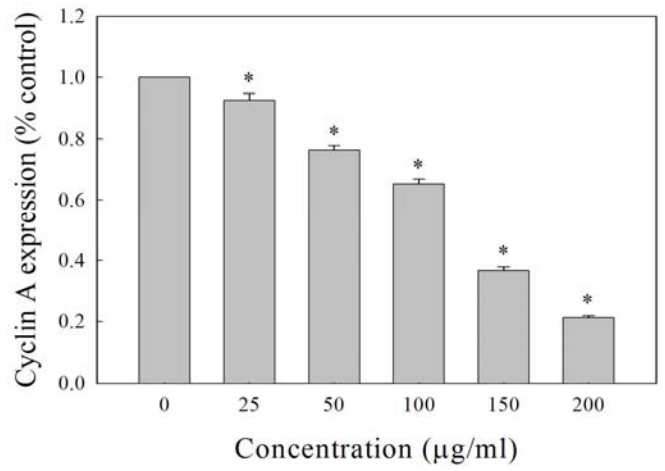


圖二十六、利用西方點墨法觀察在不同濃度(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)月桃萃取物處理KB細胞株24小時，G2/M期中的cdc 2、cyclin A、cyclin B、p53、p-p53、p21、cdc25c、Wee 1表現。以 β -actin作為internal control。

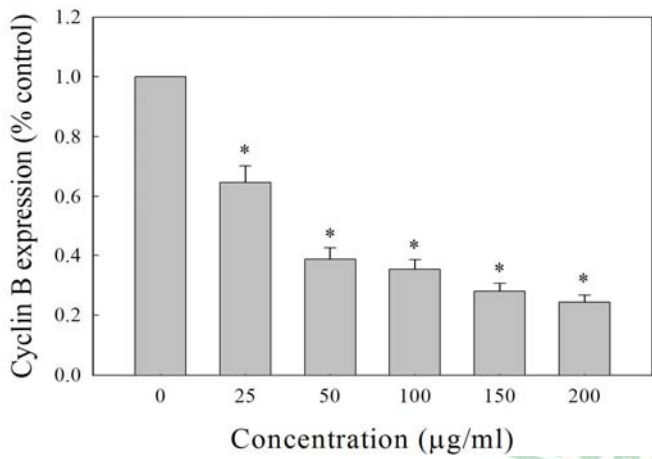
Cdc 2



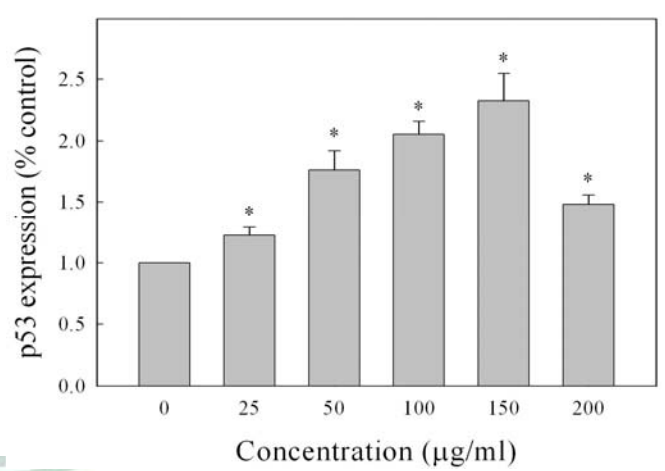
Cyclin A



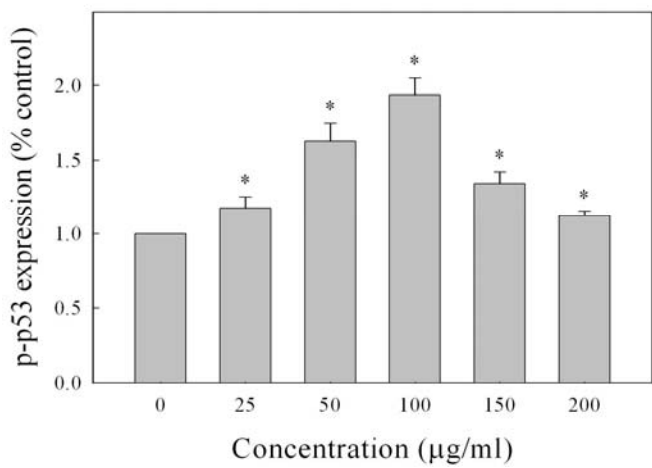
Cyclin B



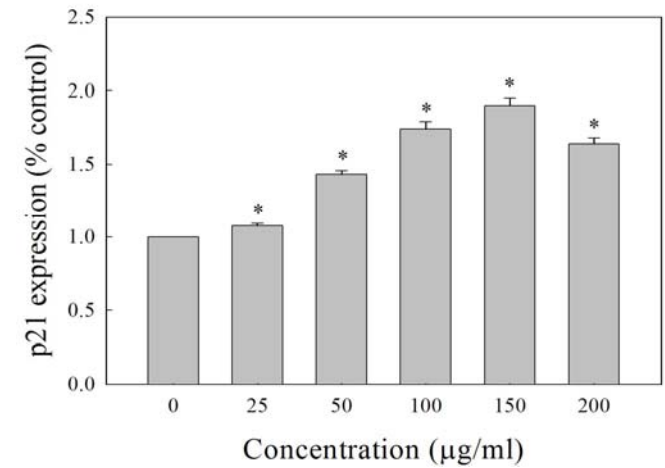
p53

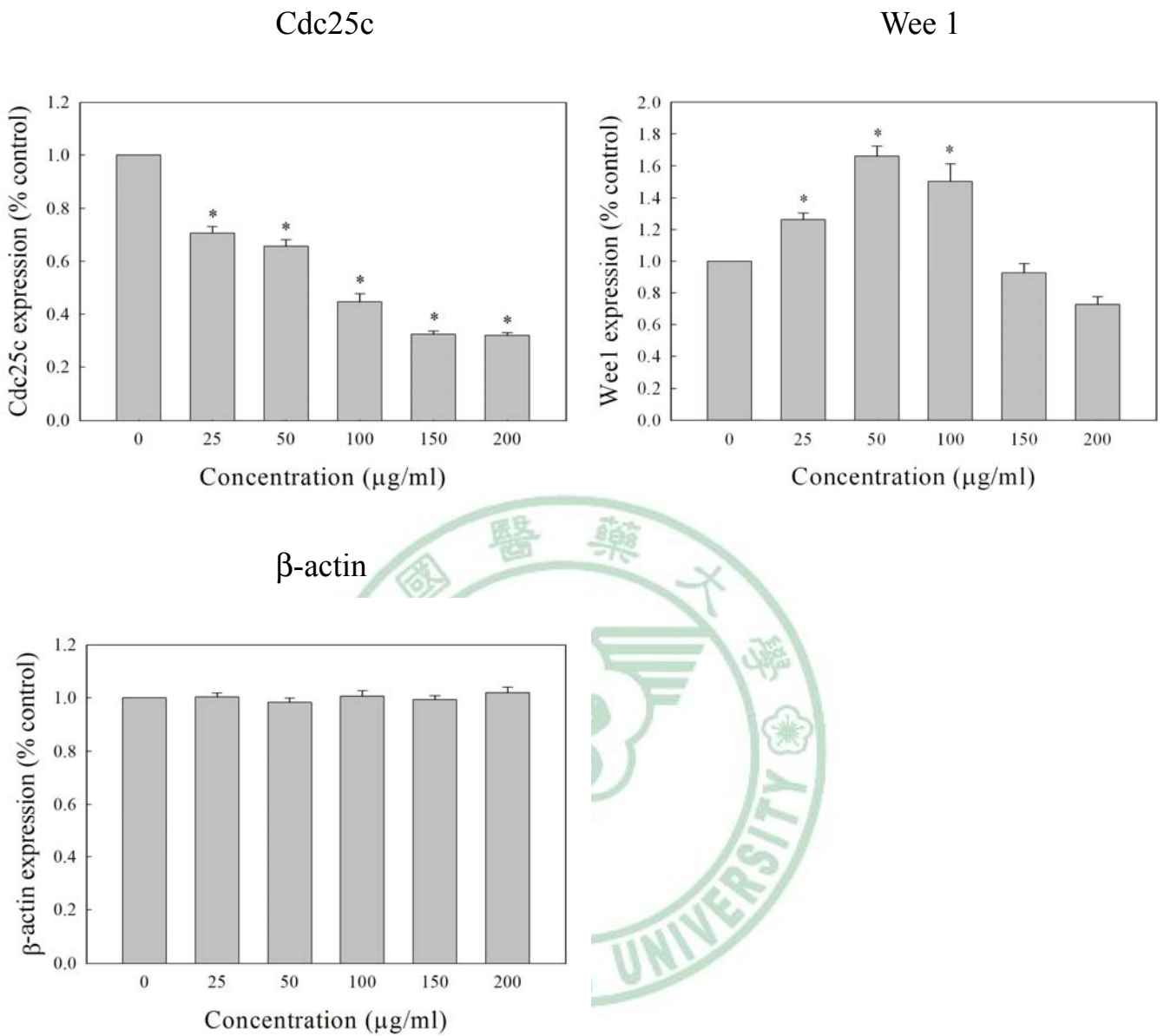


p-p53

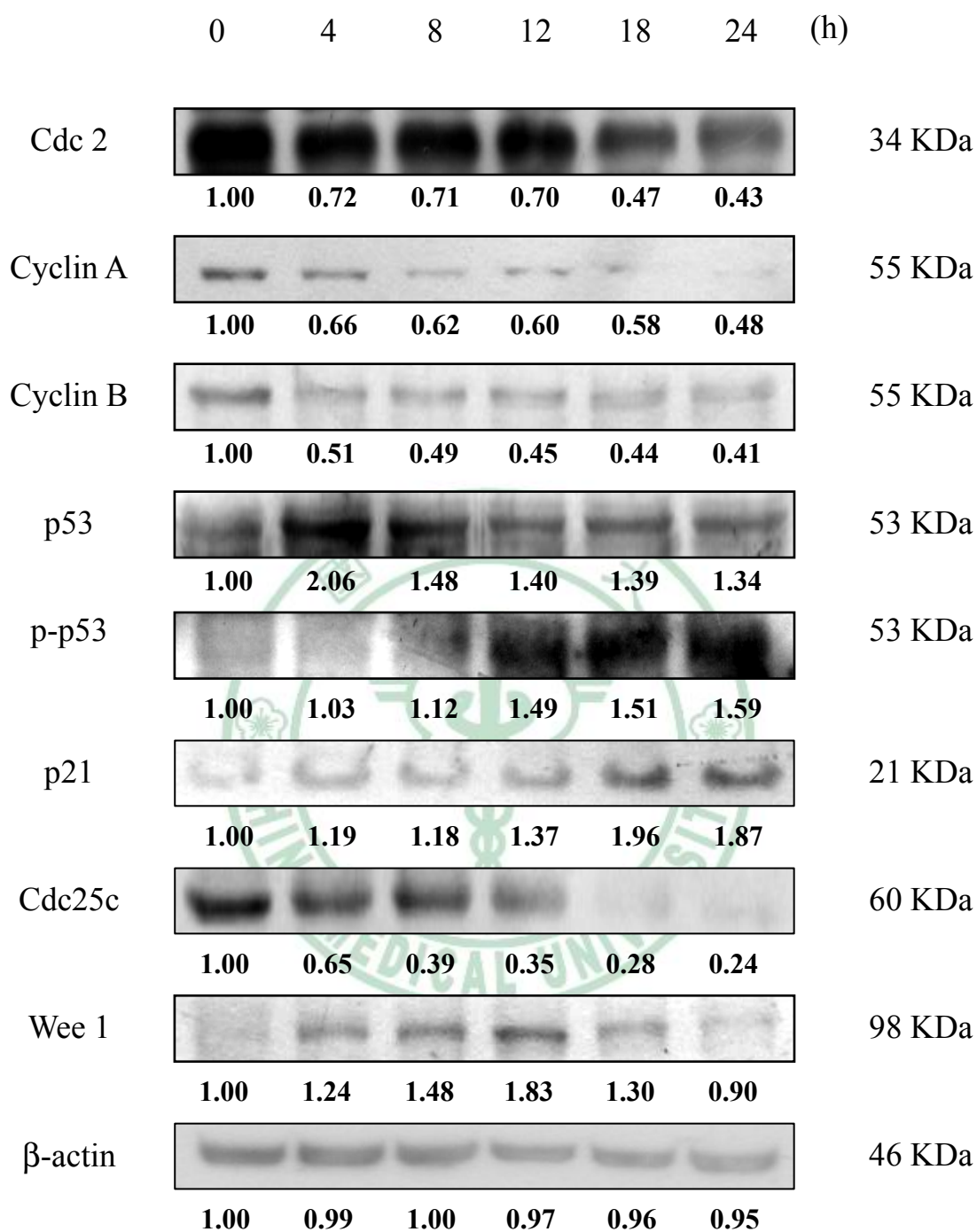


p21



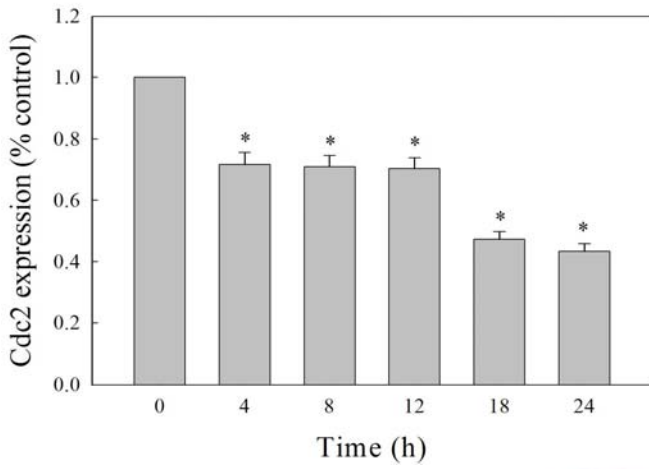


圖二十七、利用西方點墨法觀察在不同濃度(0、25、50、100、150、200 µg/ml)月桃萃取物處理KB細胞株24小時，G2/M期中的cdc 2、cyclin A、cyclin B、p53、p-p53、p21、cdc25c、Wee 1 量化表現。以β-actin作為internal control。數據結果以mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

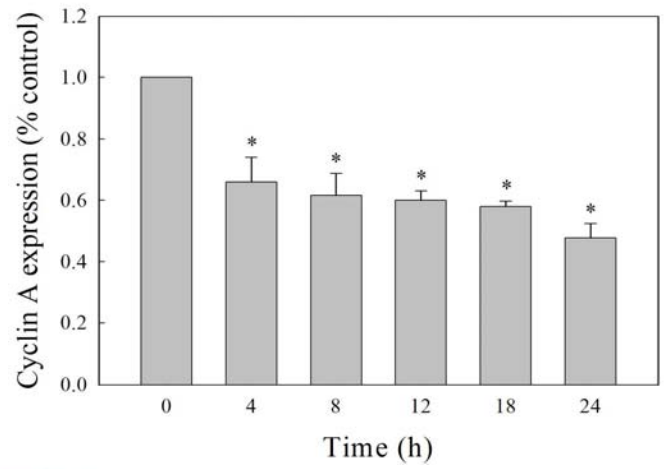


圖二十八、利用西方點墨法觀察在月桃萃取物濃度150 $\mu\text{g/ml}$ 反應下處理KB細胞株0、4、8、12、18、24小時，G2/M期中的cdc 2、cyclin A、cyclin B、p53、p-p53、p21、cdc25c、Wee 1表現。以 β -actin作為internal control。

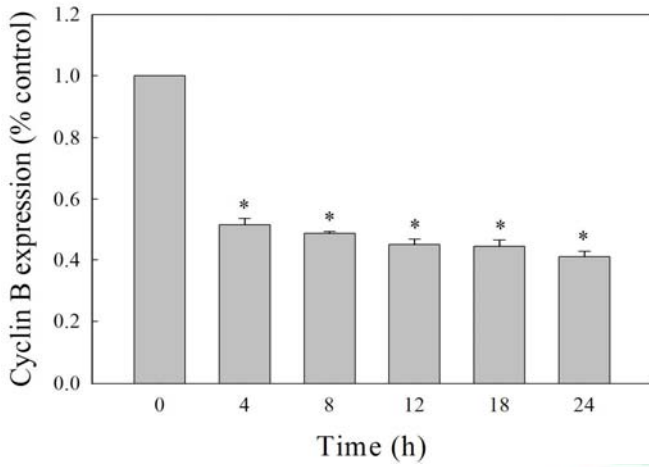
Cdc 2



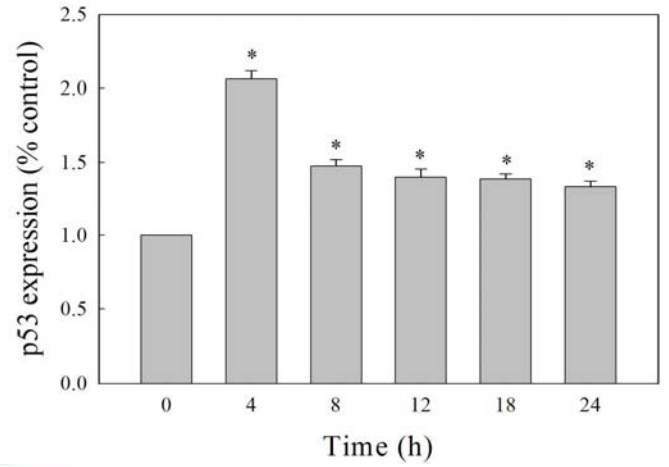
Cyclin A



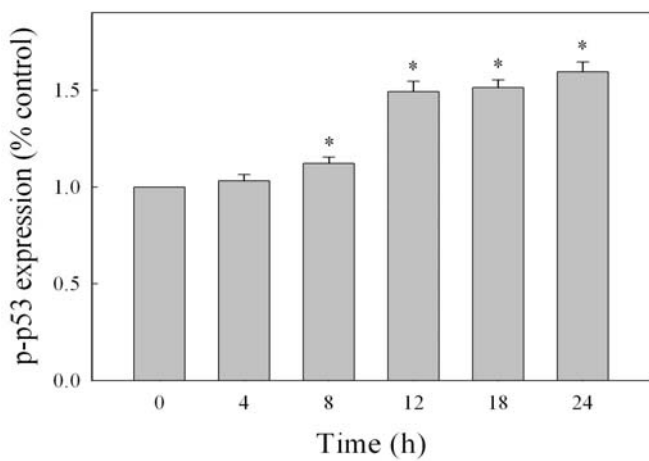
Cyclin B



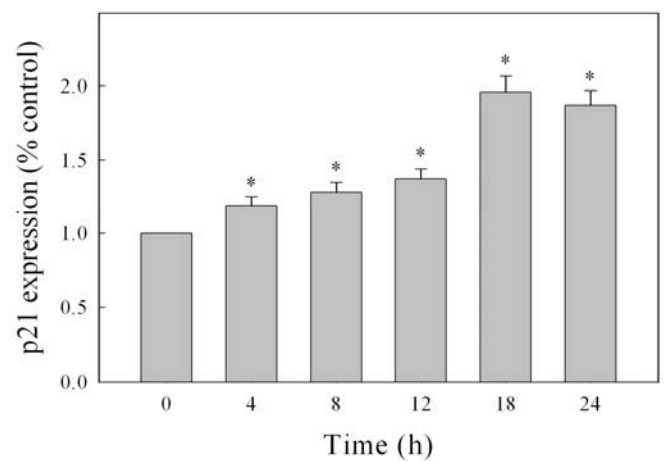
p53

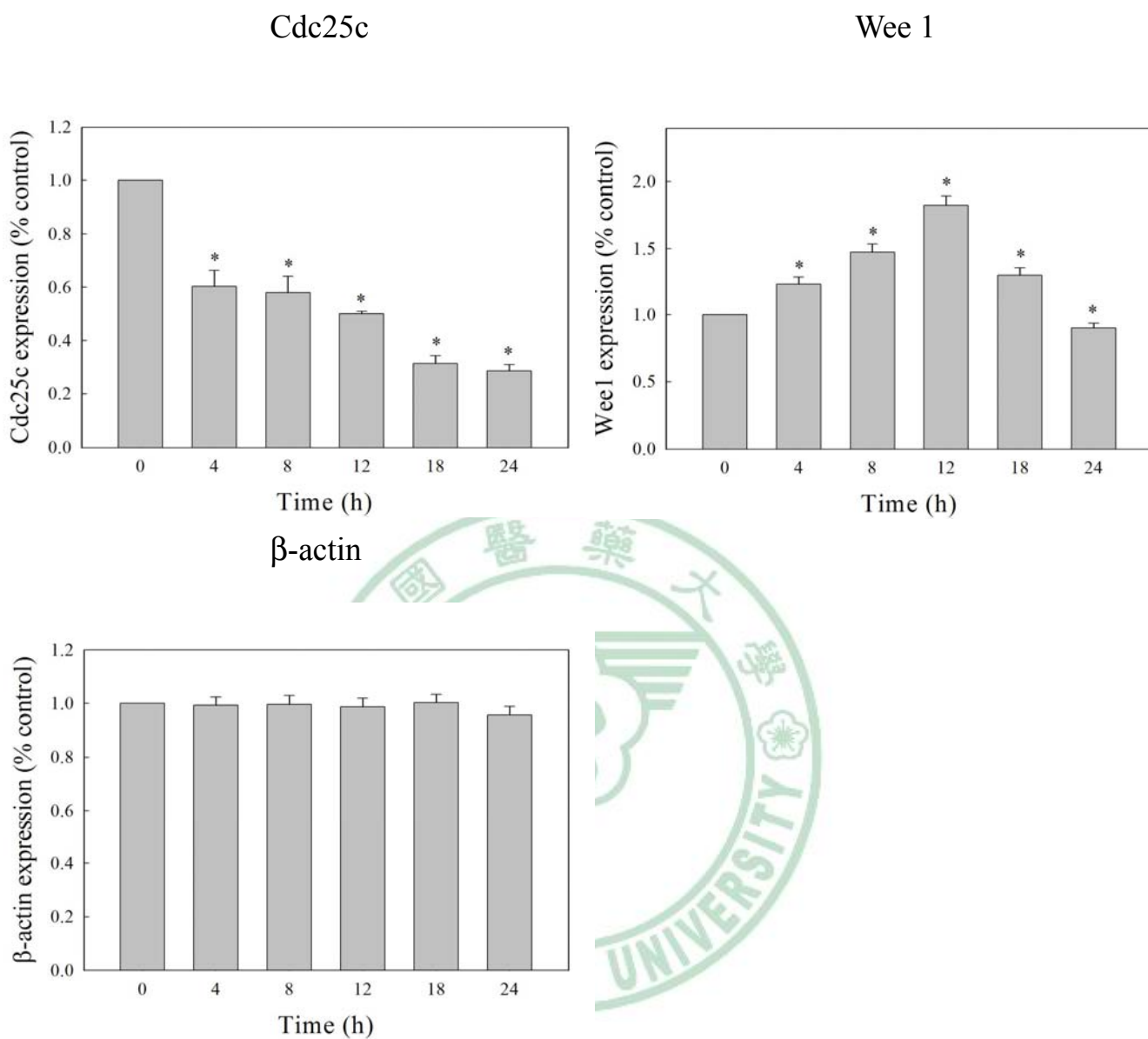


p-p53



p21





圖二十九、利用西方點墨法觀察在月桃萃取物濃度150 $\mu\text{g/ml}$ 反應下處理KB細胞株0、4、8、12、18、24小時，G2/M期中的cdc 2、cyclin A、cyclin B、p53、p-p53、p21、cdc25c、Wee 1量化表現。以 β -actin作為internal control。數據結果以mean \pm SD值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

(二) 細胞凋亡蛋白表現(Apoptosis protein expression)

先前的實驗結果顯示APE造成細胞呈現凋亡的現象發生，為探究其機制，以西方墨點法(Western blotting)分析月桃萃取物(APE)對細胞凋亡蛋白質表現量影響。偵測參與調控細胞凋亡相關的蛋白有：

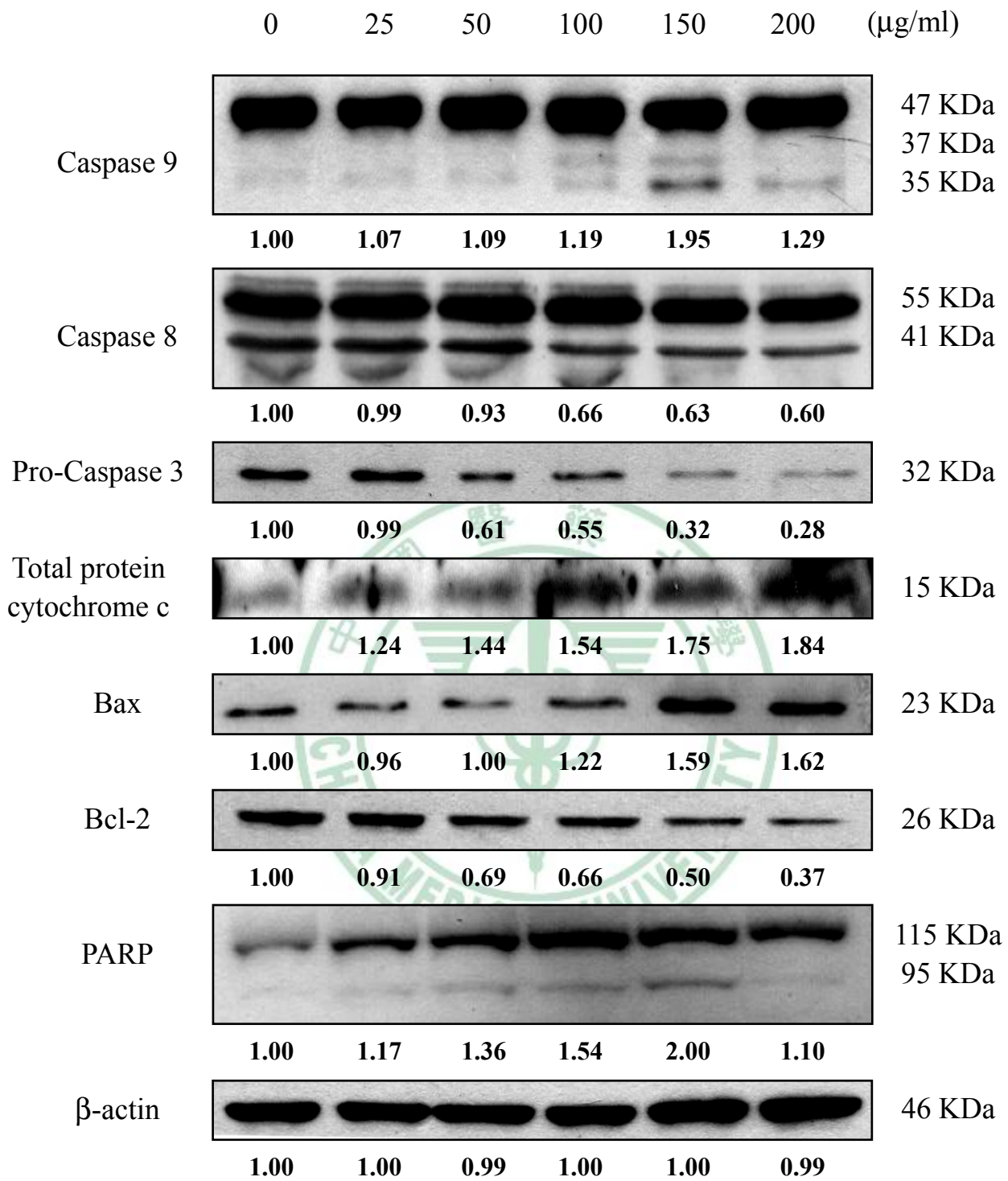
1. Caspase 9
2. Caspase 8
3. Caspase 3
4. Cytochrome c
5. Bax
6. Bcl-2
7. PARP

分別以0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物(APE)處理KB細胞24小時後觀察蛋白表現量變化，結果發現bax、cytochrome c在100-200 $\mu\text{g/ml}$ APE時，隨著濃度增加而蛋白表現增加，而bcl-2、pro-caspase 3也是在加入25-200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白表現下降。此外caspase 9、PARP在100-200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白呈現裂解現象；caspase 8則在任何濃度APE反應下沒有任何變化(圖三十、圖三十一)。

之後再以150 $\mu\text{g/ml}$ 的APE反應不同時間後，觀察蛋白表現量變化，結果發現bax、cytochrome c在反應8-24 hr時，隨著時間增加而蛋白表現增加；bcl-2、pro-caspase 3在反應4-24 hr時，隨著時間增加而蛋白表現下降。caspase 9、PARP蛋白則分別在反應4、18 hr時才有隨著時間增加而呈現裂解現象；caspase 8則在任何時間反應下沒有任何變化(圖三十二、圖三十三)。

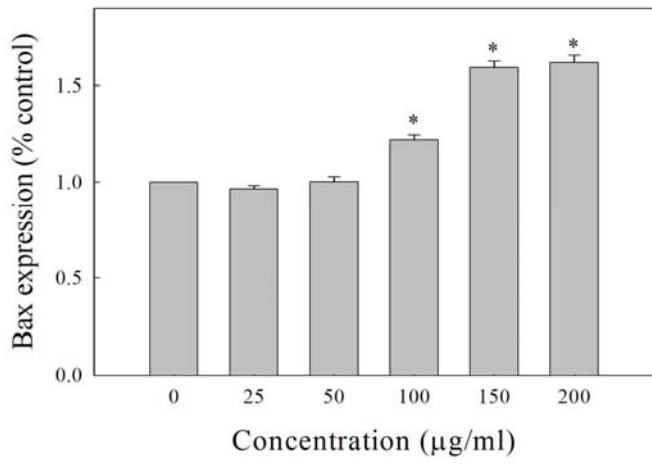
所以KB細胞可能在APE不同濃度與不同時間的作用下，首先反應4 hr時逐漸造成粒線體上的cytochrome c釋放、bax與bcl-2的平衡失調、進而活化下游caspase 9、pro-caspase 3、PARP裂解，最後使細胞走向細胞凋亡。而APE對於死亡接受器路徑可能不活化，因而任何反應時間下不造成 caspase 8活化裂解。



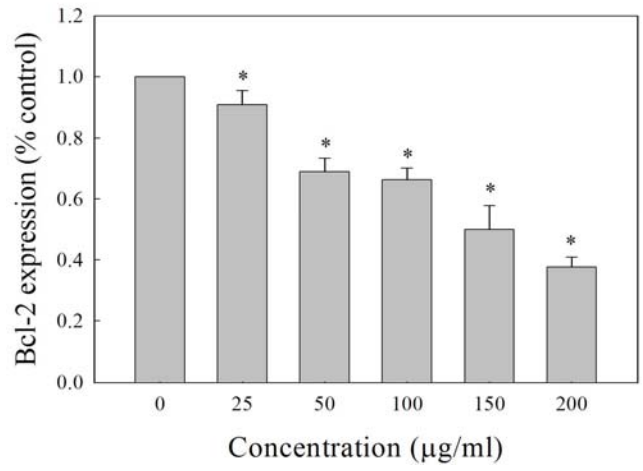


圖三十、利用西方點墨法觀察在不同濃度(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)月桃萃取物處理KB細胞株24小時，細胞凋亡表現蛋白中的caspase 9、caspase 8、pro-caspase 3、cytochrome c、bax、bcl-2、PARP表現。以 β -actin作為internal control。

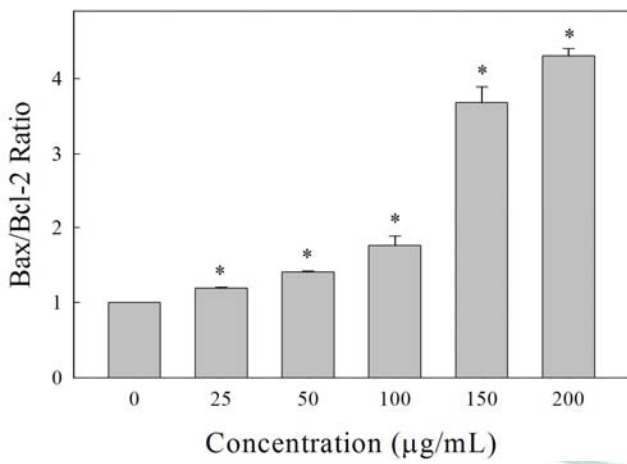
Bax



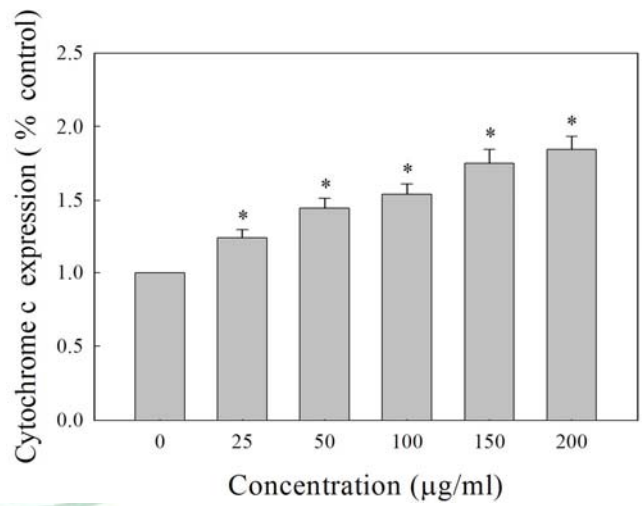
Bcl-2



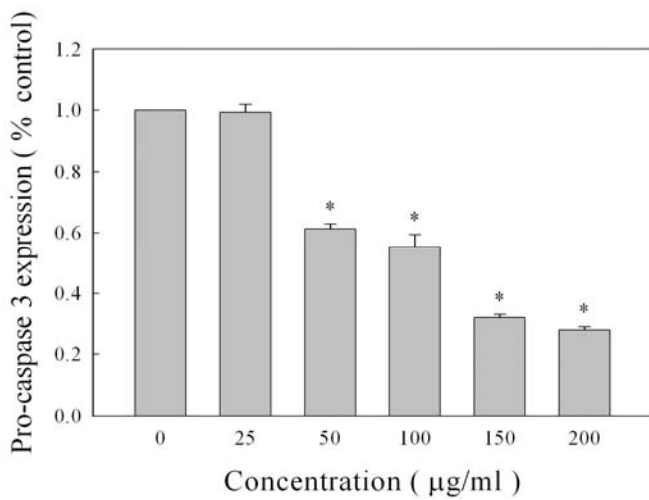
Bax/Bcl-2 ratio



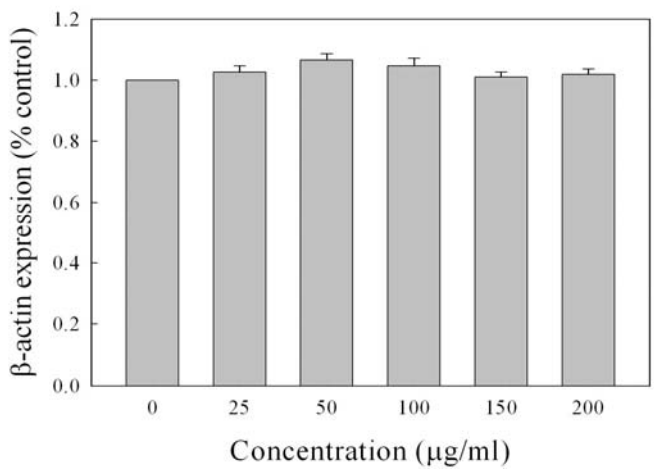
Cytochrome c



Pro-caspase 3

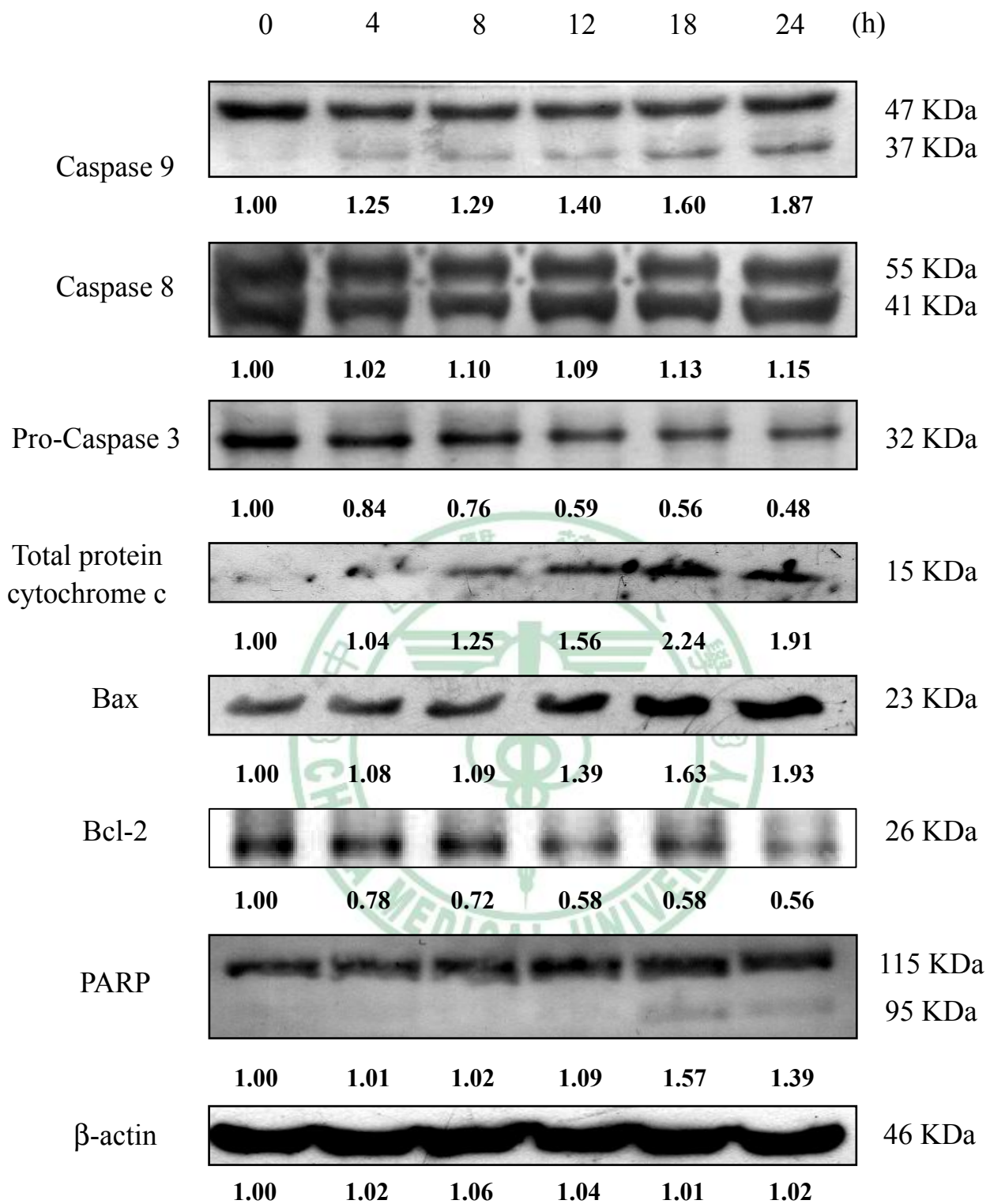


β-actin



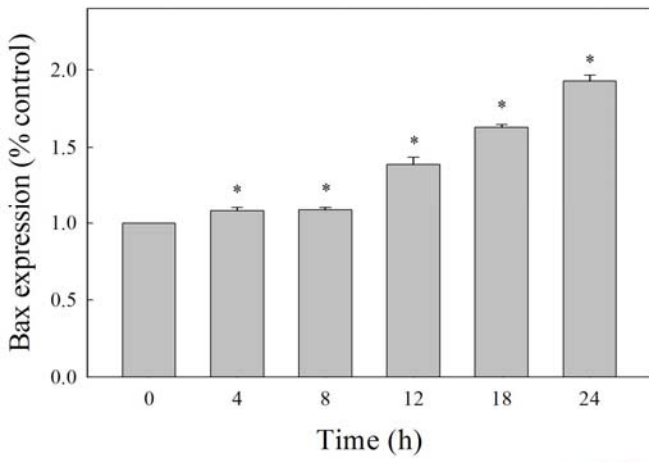
圖三十一、利用西方點墨法觀察在不同(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)
月桃萃取物處理KB細胞株24小時，細胞凋亡表現蛋白中的
bax、bcl-2、cytochrome c、bax/bcl-2 ratio、pro-caspase 3
量化表現。數據結果以mean \pm SD 值表示，n=3。* $p < 0.05$
v.s. control。



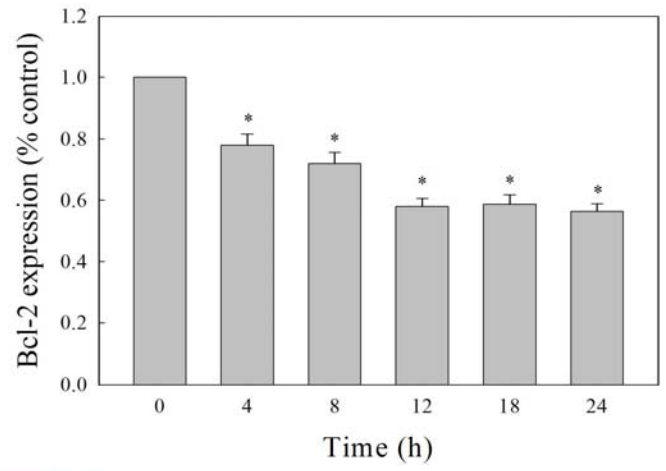


圖三十二、利用西方點墨法觀察在月桃萃取物濃度150 µg/ml反應下處理KB細胞株0、4、8、12、18、24小時，細胞凋亡表現蛋白中的caspase 9、caspase 8、pro-caspase 3、cytochrome c、bax、bcl-2、PARP表現。以β-actin作為internal control。

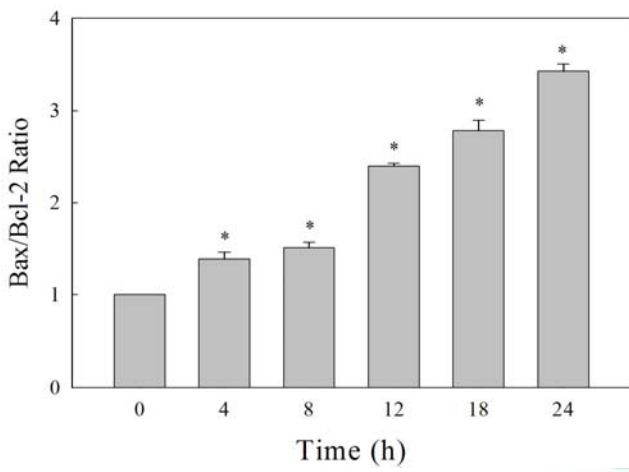
Bax



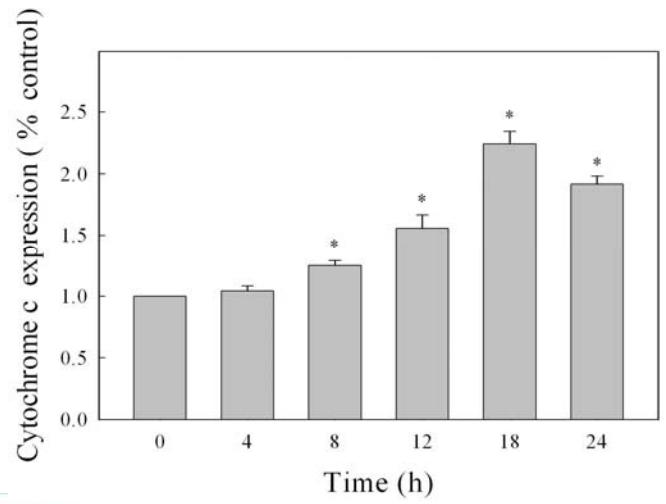
Bcl-2



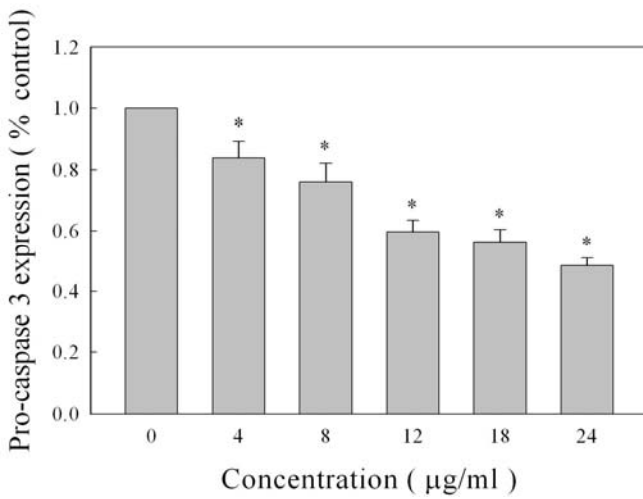
Bax/Bcl-2 ratio



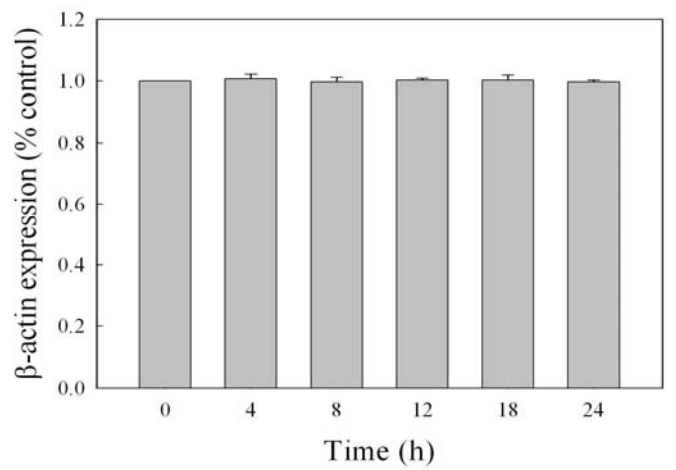
Cytochrome c



Pro-caspase 3



β -actin



圖三十三、利用西方點墨法觀察在月桃萃取物濃度150 µg/ml反應下處理KB細胞株0、4、8、12、18、24小時，細胞凋亡表現蛋白中的Bax、Bcl-2、Cytochrome c、Bax/Bcl-2 ratio、pro-caspase 3量化表現。數據結果以mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。



(三) 細胞轉移蛋白表現(Metastasis protein expression)

以西方墨點法(Western blotting)分析月桃萃取物(APE)對細胞轉移蛋白質表現量影響。先前的實驗結果顯示月桃萃取物(APE)均會造成細胞呈現細胞週期停滯與細胞凋亡的現象發生，因此進一步探究月桃萃取物(APE)是否具有抑制細胞轉移的表現，因此偵測參與調控細胞轉移相關的蛋白有：

1. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)
2. Urokinase-type plasminogen activator (uPA)
3. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)
4. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)
5. Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2)
6. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)

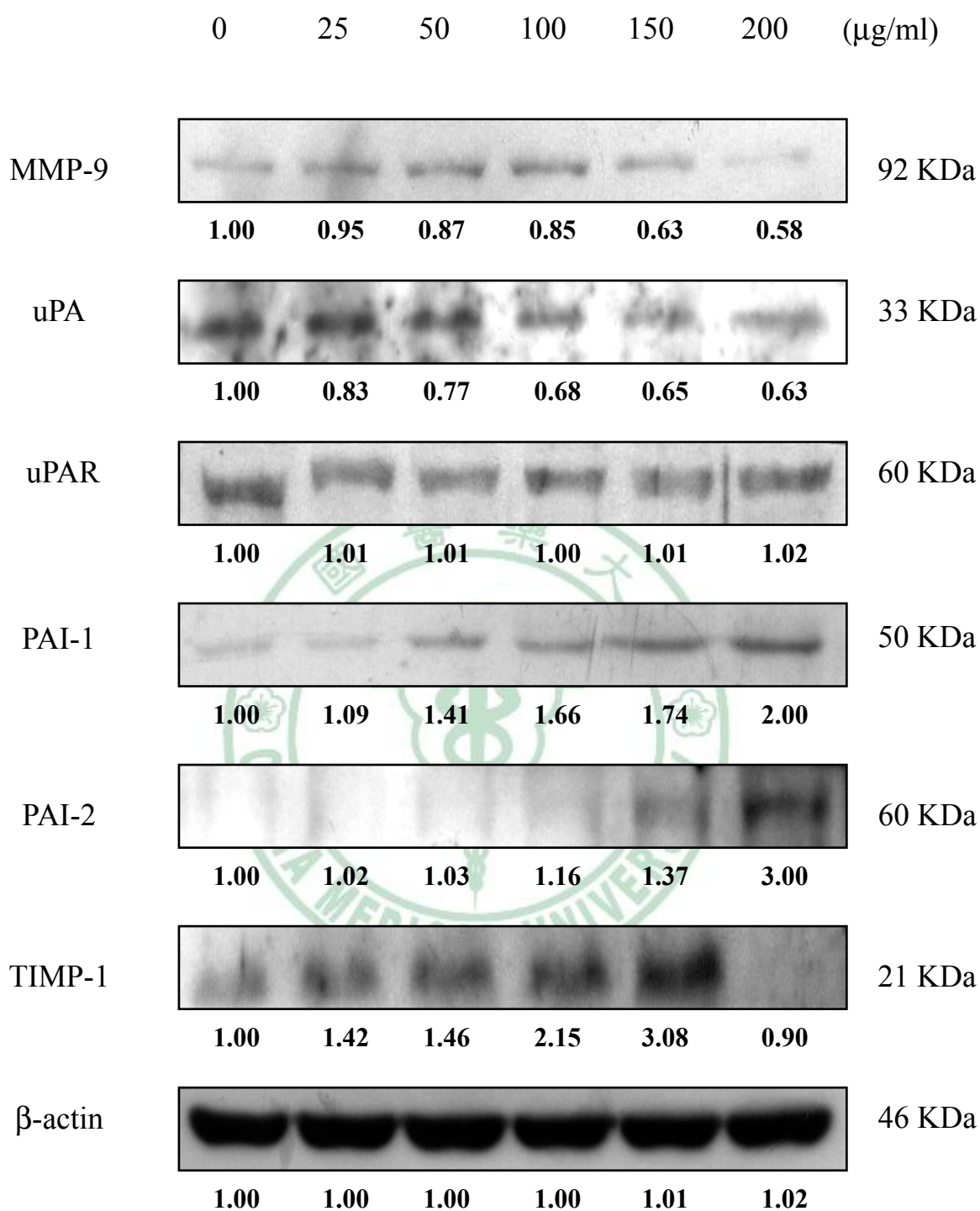
分別以0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物(APE)處理KB細胞24小時，結果發現MMP-9、uPA在50-200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下蛋白表現量均明顯降低，而PAI-1、PAI-2、TIMP-1是在加入100-200 $\mu\text{g/ml}$ APE時其蛋白表現就有逐漸增加的情形。但uPAR則在任何濃度APE作用下沒有任何變化(圖三十四、圖三十五)。

之後再以150 $\mu\text{g/ml}$ 的月桃萃取物(APE)反應不同時間後，觀察蛋白表現量變化，結果發現在反應8 hr時MMP-9、uPA蛋白表現量均下降；PAI-1、PAI-2、TIMP-1蛋白表現量上升；uPAR則在任何時間點下沒有任何變化(圖三十六、圖三十七)。

所以KB細胞可能在APE不同濃度與不同時間的作用下，首先在反應4 hr時活化了uPA，之後再活化PAI-1、PAI-2、TIMP-1，最後使

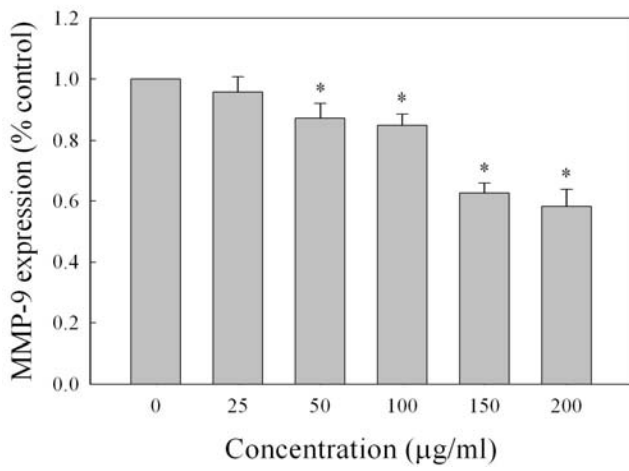
MMP-9的表現受到抑制。而APE對於uPA receptor可能不造成影響，因為任何反應時間下均不會對uPA receptor有任何變化。



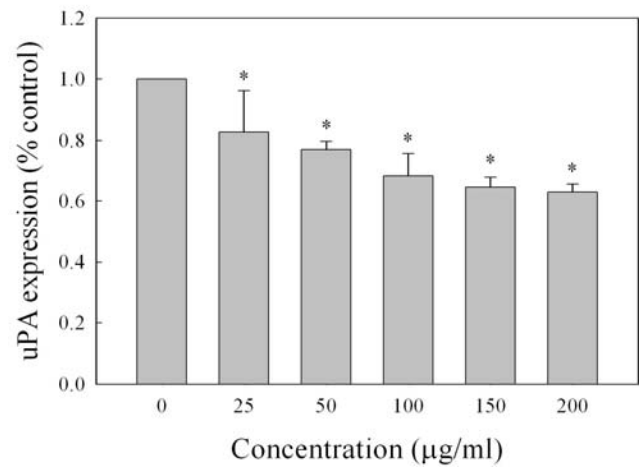


圖三十四、利用西方點墨法觀察在不同濃度(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)月桃萃取物處理 KB 細胞株 24 小時，調控細胞轉移中的 MMP-9、uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2、TIMP-1 表現。以 β -actin 作為 internal control。

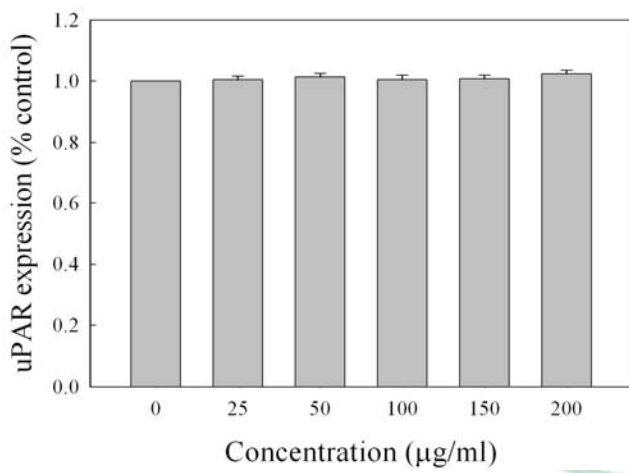
MMP-9



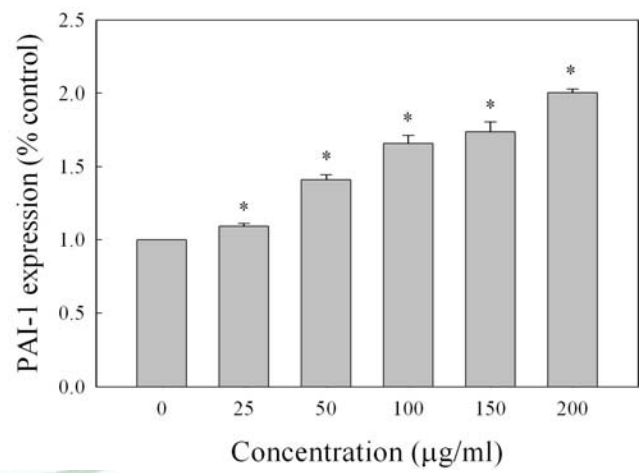
uPA



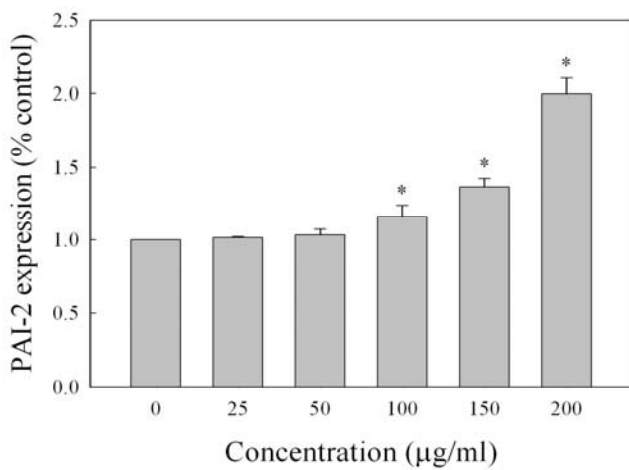
uPAR



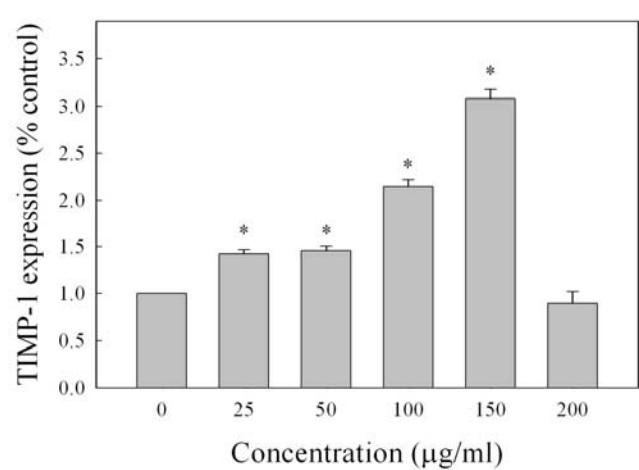
PAI-1



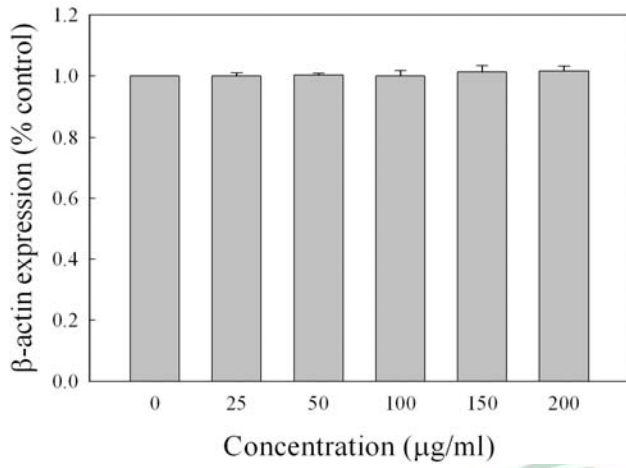
PAI-2



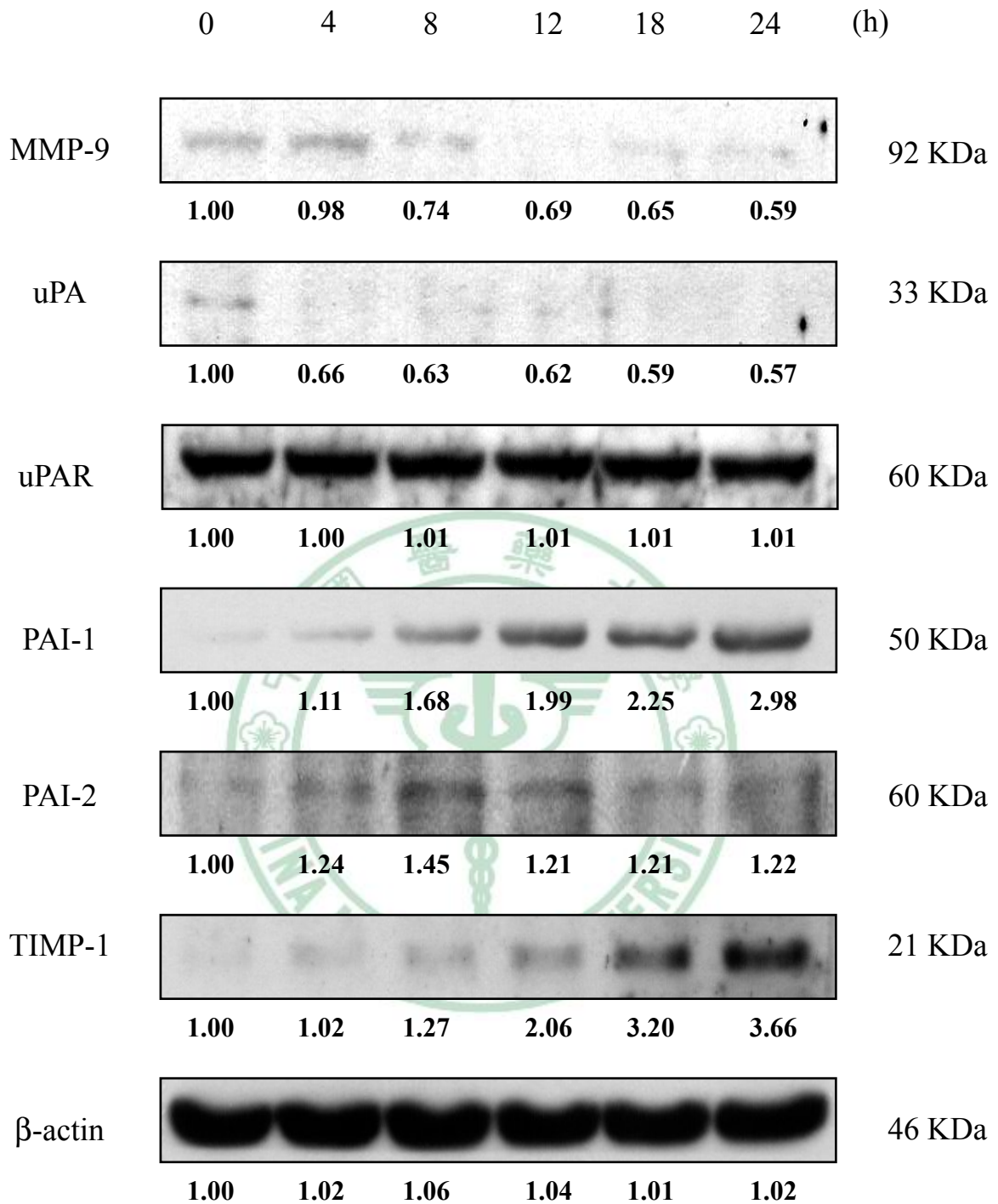
TIMP-1



β -actin

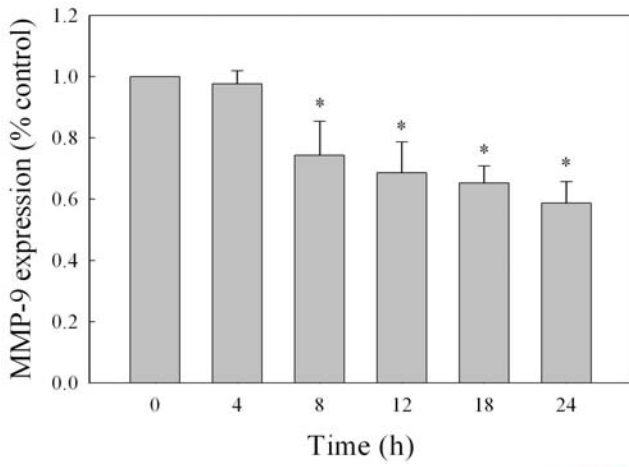


圖三十五、利用西方點墨法觀察在不同濃度(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)月桃萃取物處理KB細胞株24小時，調控細胞轉移中的MMP-9、uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2、TIMP-1表現。以 β -actin作為internal control。數據結果以mean \pm SD值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

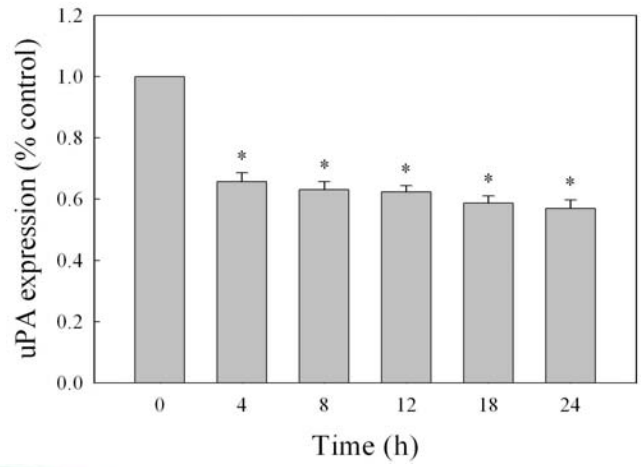


圖三十六、利用西方點墨法觀察在月桃萃取物濃度 150 $\mu\text{g/ml}$ 反應下處理 KB 細胞株 0、4、8、12、18、24 小時，調控細胞轉移中的 MMP-9、uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2、TIMP-1 表現。以 β -actin 作為 internal control。

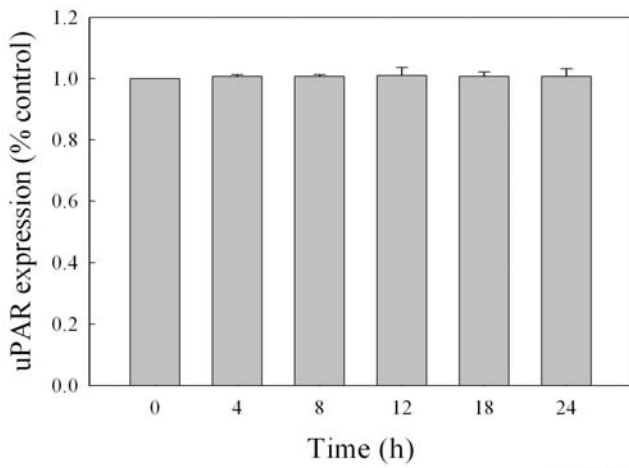
MMP-9



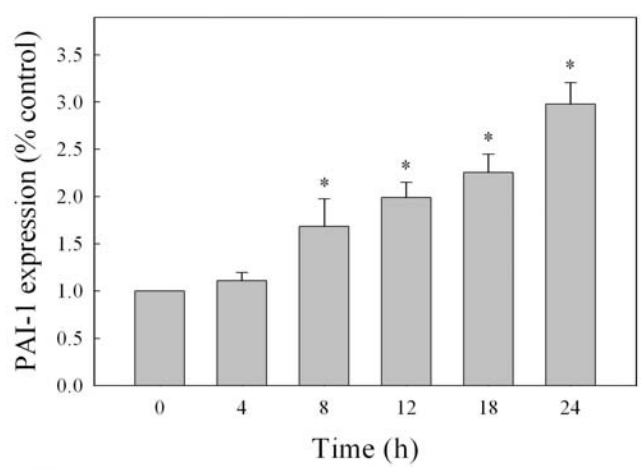
uPA



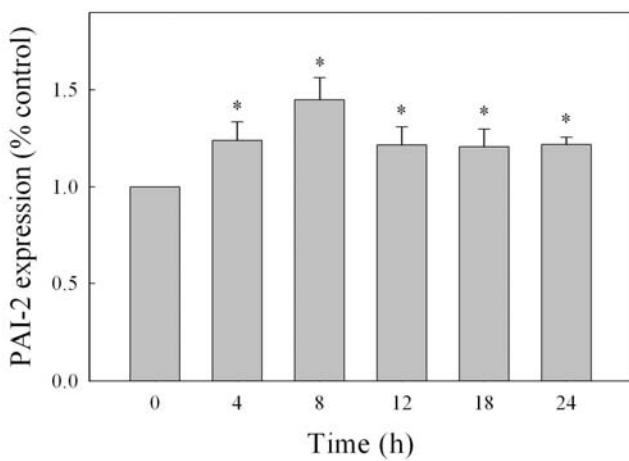
uPAR



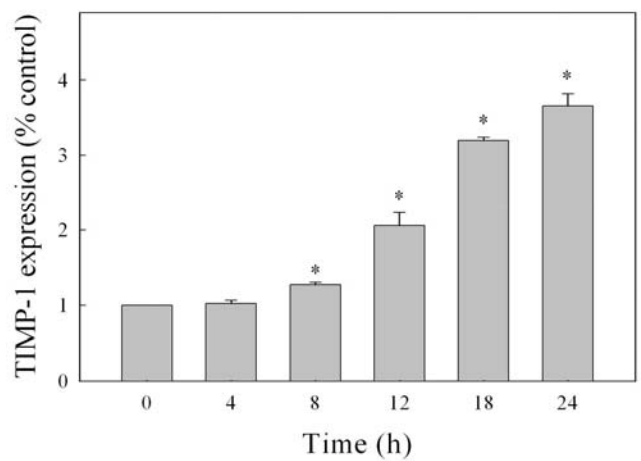
PAI-1



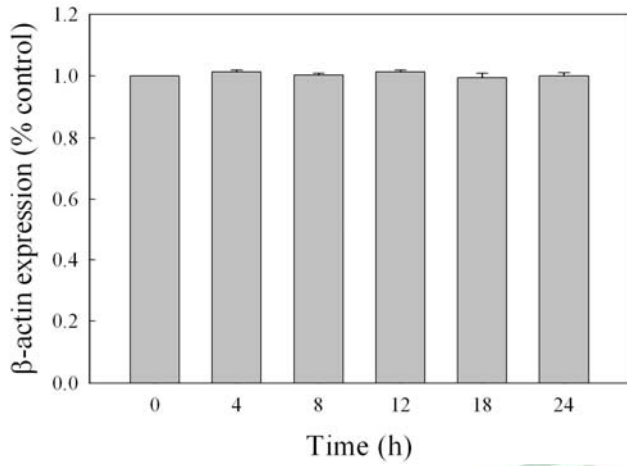
PAI-2



TIMP-1



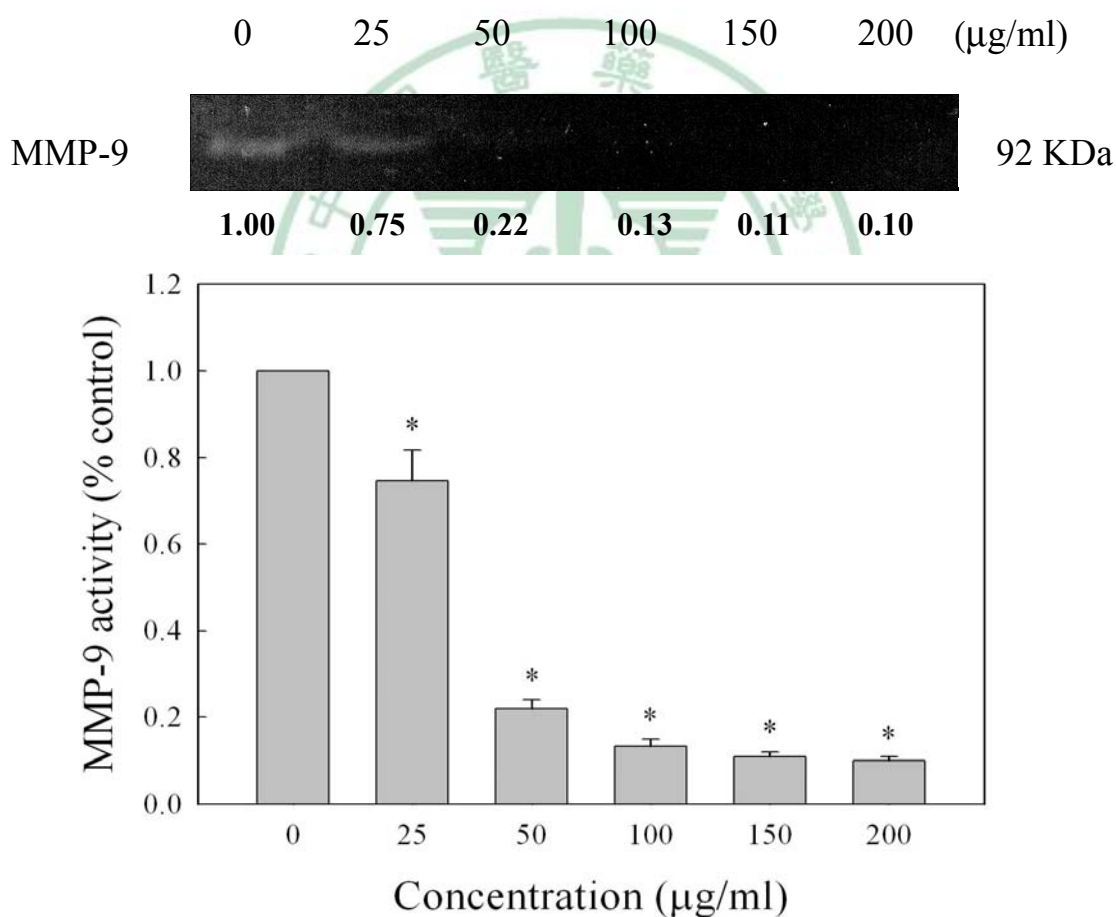
β -actin



圖三十七、利用西方點墨法觀察在月桃萃提取物濃度150 $\mu\text{g/ml}$ 反應下處理KB細胞株0、4、8、12、18、24小時，調控細胞轉移中的MMP-9、uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2、TIMP-1表現。以 β -actin作為internal control。數據結果以mean \pm SD 值表示，n=3。* $p < 0.05$ v.s. control。

八、酵素活性分析(Zymography)測定 MMP-9 活性

先前的實驗結果顯示月桃萃取物(APE)會抑制細胞轉移相關的蛋白的表現，因此再以酵素活性分析來測定 APE 是否會抑制 MMP-9 本身的活性，而達到抑制腫瘤轉移的效果。由圖三十九得知 25-200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下蛋白表現量均明顯降低，顯示 KB 細胞可能在 APE 的作用下，藉由抑制 MMP-9 活性的表現，進而達到抑制腫瘤轉移的效果。



圖三十八、利用酵素活性分析法觀察在不同濃度(0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$)月桃萃取物處理 KB 細胞株 24 小時，調控細胞轉移中的 MMP-9 活性。* $p < 0.05$ v.s. control。

二、動物實驗(*In Vivo*)

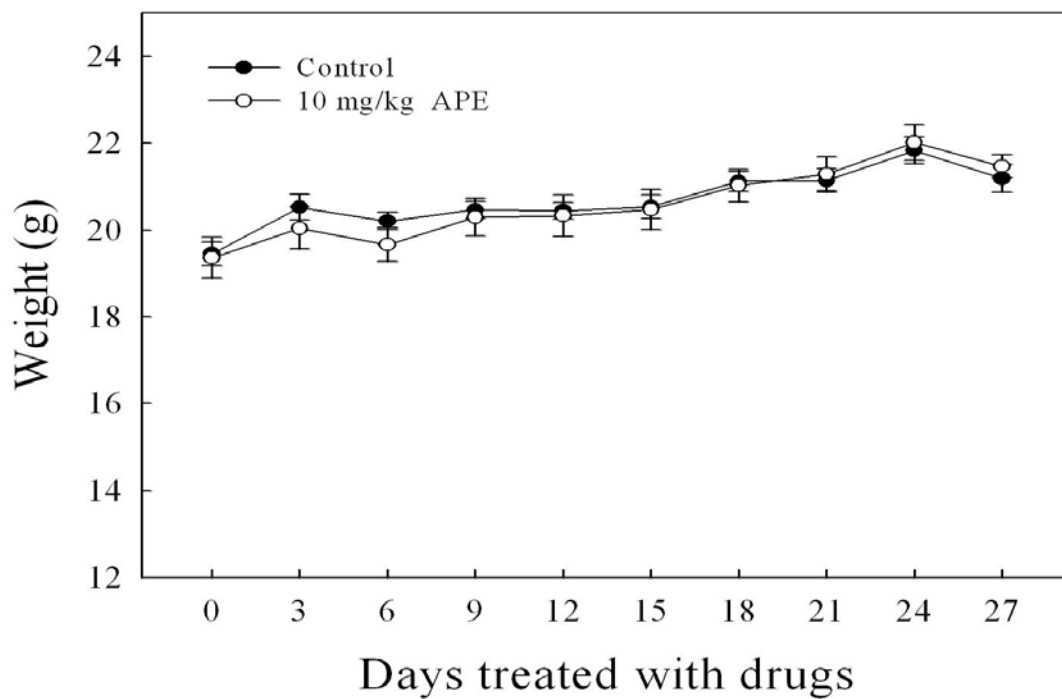


一、月桃萃取物(APE)抑制裸鼠皮下植入人類口腔鱗狀上皮癌(KB)腫瘤的生長

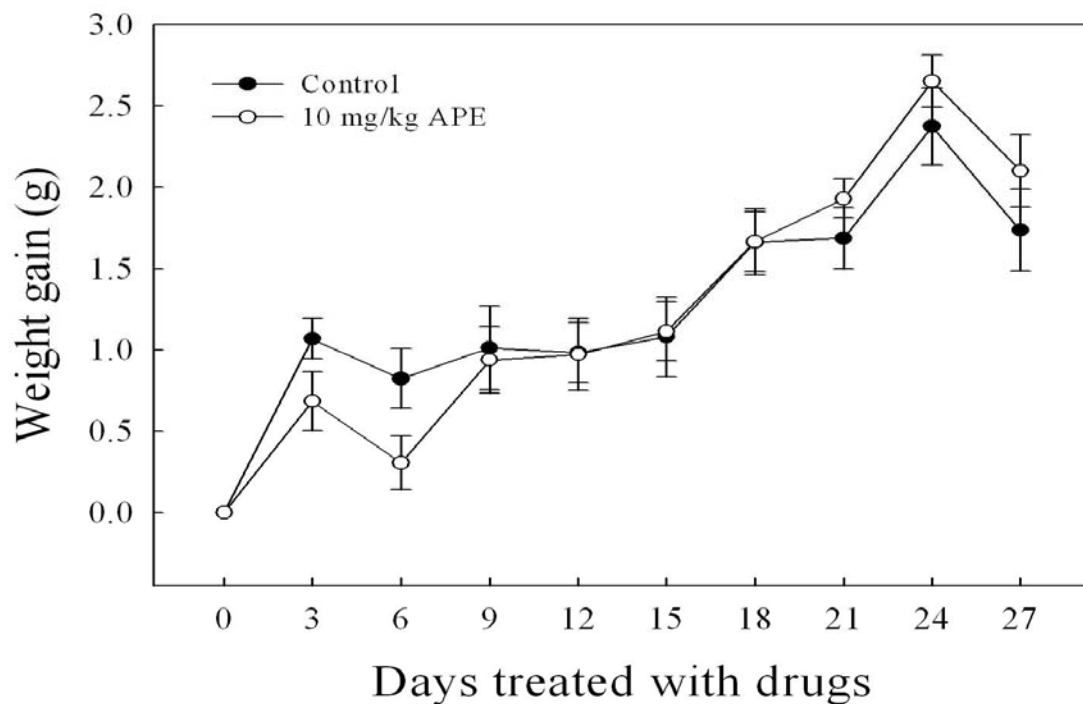
利用裸鼠異位移植腫瘤 (nude mice xenograft tumor model)模式後，以月桃萃取物(APE)進行抑制人類口腔鱗狀上皮癌(KB)腫瘤的實驗。裸鼠腹腔注射投予APE作為實驗組(10 mg/kg)，而腹腔注射投予PBS作為控制組，實驗進行四週。在體重方面，結果發現實驗組和控制組體重的變化在實驗前及在實驗後並沒有影響($p > 0.05$)(圖三十九、表九)。測量各裸鼠其腫瘤體積之變化，結果發現APE組($0.16 \pm 0.89 \text{ cm}^3$)相較於控制組 ($1.12 \pm 0.25 \text{ cm}^3$)抑制腫瘤有明顯的效果(圖四十)。

之後將各組KB腫瘤進行包埋，方便日後腫瘤組織病理切片判讀。結果發現控制組裸鼠腫瘤內含有multiple cysts且分泌mucin material (B. 400x)，並內部有細胞分裂與血管形成的情形發生(圖四十一)；APE組裸鼠腫瘤組織內則呈現有Regressive tumor cells且以不具活性的細胞居多，但內部仍有少量血管形成的情形發生(圖四十二)。

(A)



(B)



圖三十九、APE 對裸鼠皮下植入 KB 腫瘤觀察抑制結果(A) KB 細胞於裸鼠腫瘤生成期間之體重變化;(B) 裸鼠實驗前及在實驗後之體重變化，數據結果以 mean \pm SE. 值表示，n=6。

表九、裸鼠實驗前後體重變化差異，數據結果以 mean ± SE. 值表示，
n=6。* p< 0.05 v.s. control。

Group	Pre-experiment		Post-experiment		Weight gain (g)
	n	Weight(g)	n	Weight(g)	
Control	6	19.45 ± 0.27	6	21.19 ± 0.31	1.73 ± 0.17
APE (10 mg/kg)	6	19.36 ± 0.46	6	21.46 ± 0.26	2.10 ± 0.22



(A)

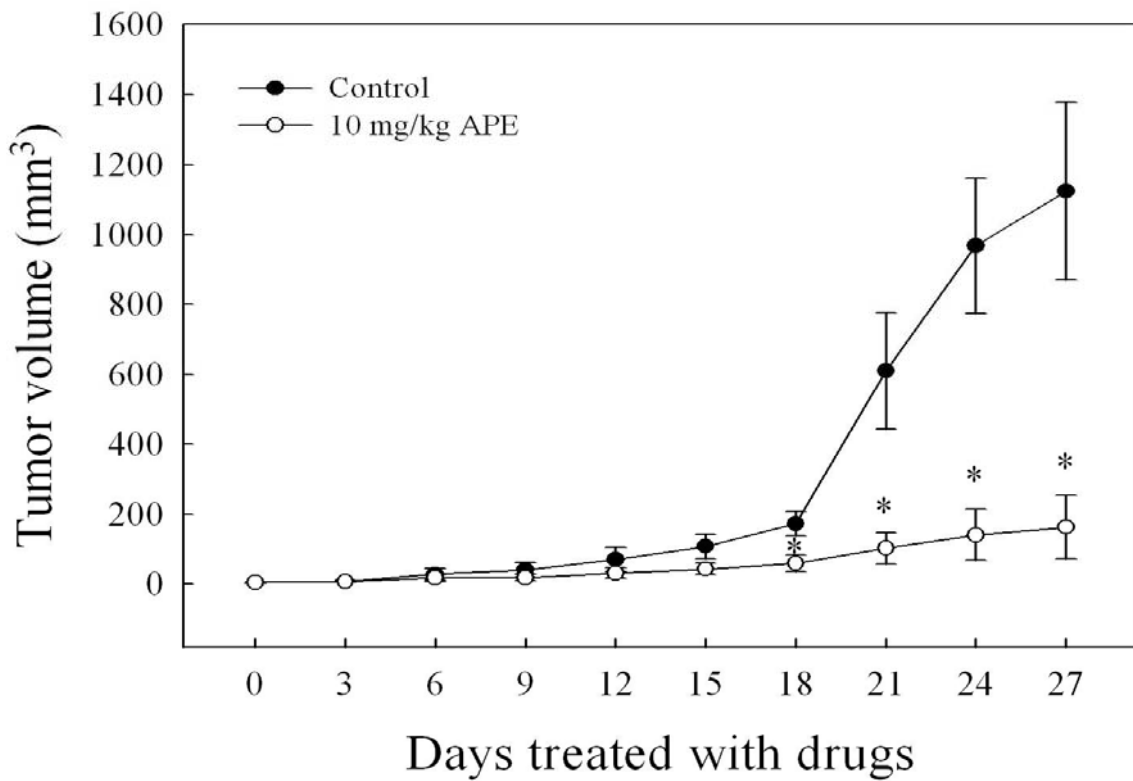
Control 組



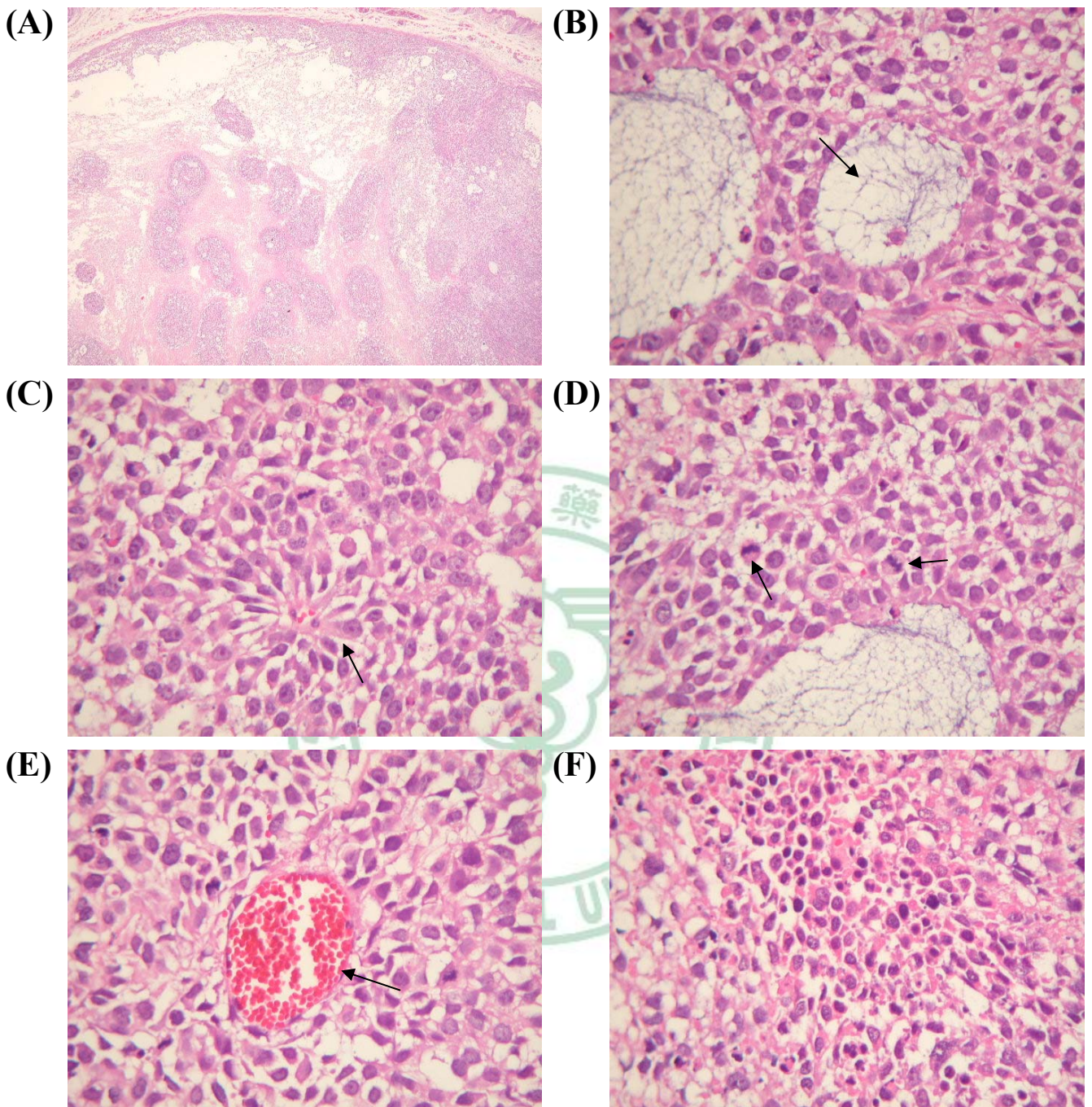
APE 10 mg/kg



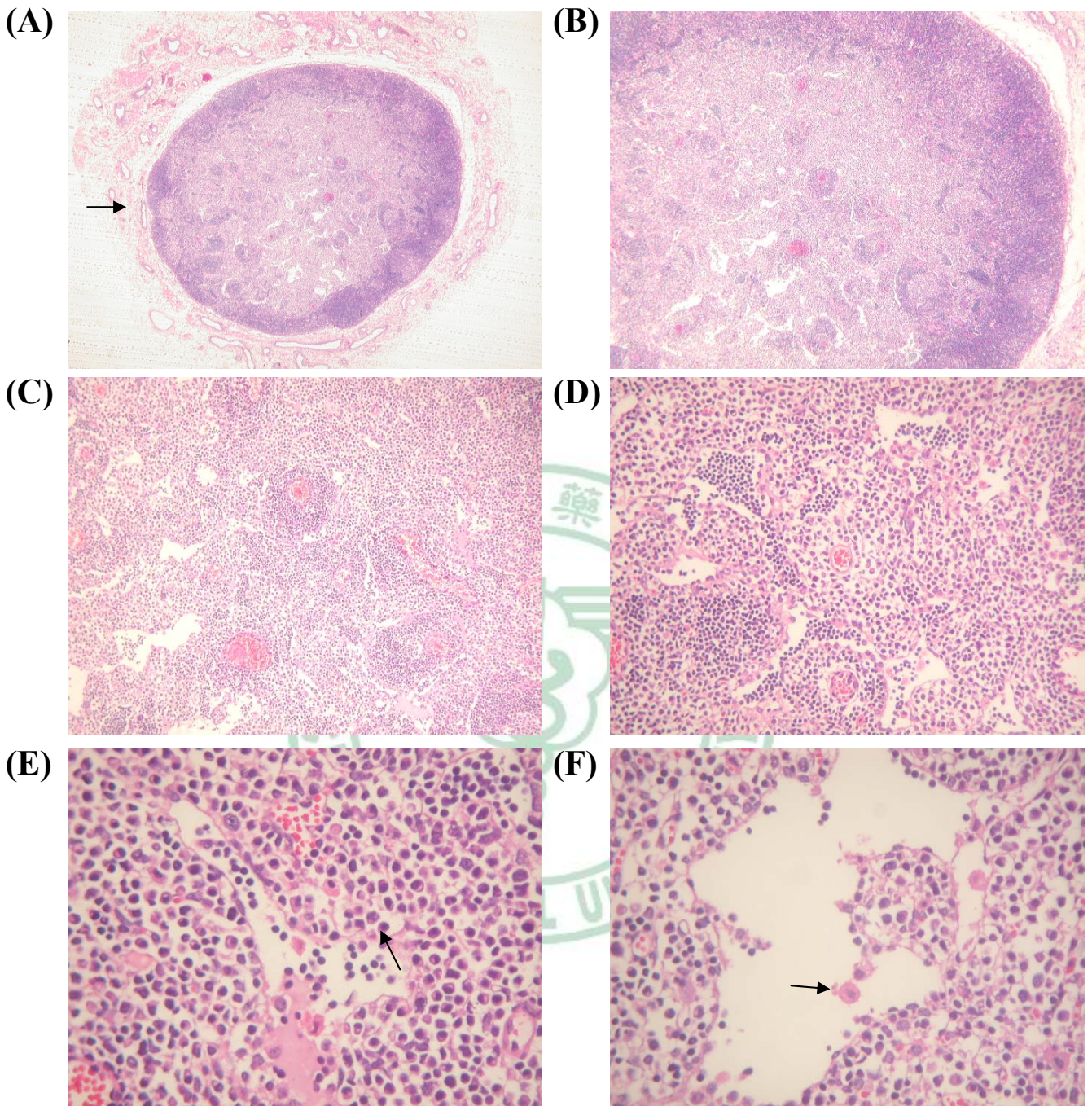
(B)



圖四十、APE 對裸鼠皮下植入 KB 腫瘤觀察抑制結果(A) KB 細胞於裸鼠腫瘤生成後腹腔注射月桃萃取物(APE)四週後外觀體積變化；(B) 裸鼠腫瘤體積測量變化，數據結果以 mean ± SE. 值表示，n=6，* p< 0.05。



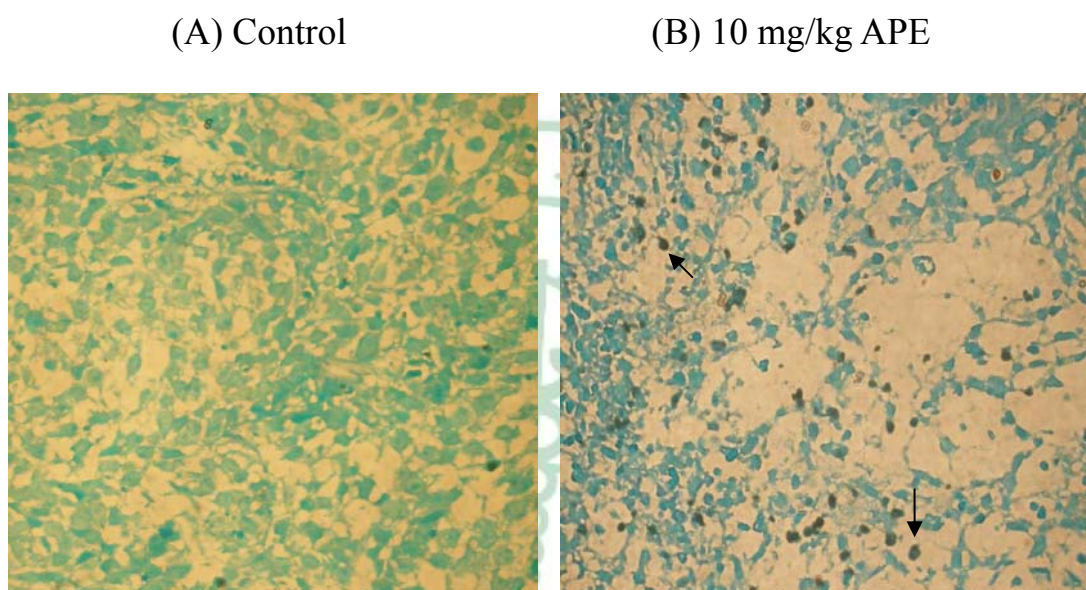
圖四十一、控制組裸鼠腫瘤組織病理切片(H&E stain)。腫瘤內有 multiple cysts (A. 20x)、mucin material (B. 400x)、rosette formation (C. 400x)與有絲分裂(D. 400x)情形；內部有血管形成(E. 400x)及 necrosis 的情形發生(F, 400x)。



圖四十二、APE 組裸鼠腫瘤組織病理切片。腫瘤內有 Regressive tumor cells (A. 20x; B. 40x; C. 100x; D. 200x) ，內部有少量血管形成與 nuclei condensation (E. 400x; F, 400x, H&E stain) 。

二、APE對裸鼠腫瘤內KB cells產生DNA fragmentation分析

將控制組與 APE 組的腫瘤予以切片，之後進行脫蠟、復性等步驟後，利用 TUNEL assay kit 分析。控制組內的腫瘤細胞幾乎都呈現 TUNEL⁻細胞(藍色)，而經過 APE 反應的腫瘤細胞，有表現出 TUNEL⁺，明顯看出產生細胞凋亡的棕色細胞之現象(圖四十三)。



圖四十三、控制組與 APE 組的腫瘤內部 DNA fragmentation 的表現。箭頭所指即表示凋亡細胞。

所以對已植入 KB 細胞的裸鼠給予 APE 時，可以有效的造成內部腫瘤細胞產生 DNA fragmentation 的情形。同時也證實在 APE 無論在細胞實驗或是動物實驗，均能造成 KB 細胞產生 apoptosis，進而抑制腫瘤細胞的生長。



癌症自 1982 年即躍居台灣十大死因之首位，而口腔癌的盛行率也有逐年增加的趨勢，亦是威脅國內男性健康及生命的重大疾病。因此研發天然藥物來阻止多階段癌化(multistep carcinogenesis)形成的癌症化學預防理論是近年來致力發展的工作【Sporn, 1976】。目前癌症化學預防在研究方向主要有：誘導癌細胞產生自然凋亡情形、抑制細胞增殖、減少腫瘤的浸潤和轉移發生、阻斷致癌劑致癌活性、提高 DNA 修復能力和抗氧化活性、抑制原癌基因啟動和抑癌基因失活等方向來進行。在本論文將在細胞凋亡(Apoptosis)現象、細胞週期停滯情形與抑制腫瘤細胞轉移三方面來探討薑科普來氏月桃及其主要成分對人類口腔鱗狀細胞癌細胞(oral carcinoma cells; KB cells)在細胞實驗(*in vitro*)和動物實驗(*in vivo*)的表現情形。

近年來促使過度增生的腫瘤細胞走向自然凋亡是一種解決外科手術、放射療法或是化學療法所造成的藥物毒性及造成正常細胞的傷害副作用的方法之一，因此誘導癌細胞產生細胞凋亡已變成研發有效的治療藥物及新的治療機轉方向。由本實驗結果得知月桃萃取物(APE)在對人類正常口腔纖維母細胞無傷害的情況下，對 KB 細胞發現具有細胞毒殺性與抑制生長的效果；且細胞型態呈現變形、萎縮(cell shrinkage)的現象。在 DNA fragmentation detection (DNA 片段偵測)中發現在 50 $\mu\text{g/ml}$ 月桃萃取物濃度下，KB 細胞呈現凋亡(棕色)的

現象更為明顯。

細胞凋亡訊息調控路徑，目前主要是粒線體傳遞路徑、死亡接受器路徑及內質網路徑，其中經由粒線體而誘發細胞凋亡之路徑常被探討。結果顯示APE在粒線體傳遞路徑中活化Caspase-9，促使下游的Caspase-3活化，繼而造成PARP產生裂解。藉由Western blotting結果得知APE並未活化Caspase 8，進而推論APE並不會經由死亡接受器路徑促使細胞走向細胞凋亡。此外，同時APE也影響粒線體上的Bax、Bcl-2等蛋白質的表現，進一步促使cytochrome c 的釋放，因此Bax與cytochrome c 蛋白表現量會增加；Bcl-2蛋白表現量下降。由於cytochrome c 在釋放的同時，原本以電化學位能儲存於粒線體內膜，稱之為 mitochondrial membrane potential (Dym) 開始下降，最後matrix 滲透壓增高，造成粒線體漲大，外膜漲破之後使caspase-inducing factors (cytochrome c 和 AIF) 釋放到細胞質中。在此可以使用親脂性染劑來偵測，因為許多親脂性的陽離子化合物(如DiOC6 (3,3,- Dihexyloxacarbocyanine iodide))會結合到粒線體內膜，在雷射激發光下放出螢光，而偵測細胞凋亡的粒線體膜電位的改變。此時利用流式細胞計數儀評估KB細胞經150 µg/ml月桃萃取物反應後，發現隨時間的延長，曲線有左移的趨勢，尤其在反應的第4個小時，粒線體膜電位下降情形最明顯，約下降了56%。

粒線體膜電位之所以會下降，其原因可能是細胞受到外來壓力而造成 ROS 的產生，繼而使粒線體滲透性轉換孔洞(permeability transition pore)的打開。為此本實驗利用流式細胞計數儀評估以 150 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的月桃萃取物處理 KB 細胞株，之後加入 H_2DCFDA 染劑，並觀察不同反應時間內其產生活性氧化物的情形。 H_2DCFDA 會與細胞核、粒線體內膜、細胞質的 ROS 反應，繼而使 cytochrome c 與 DCF 產生結合，形成具有螢光特性的 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF)，藉此偵測到螢光生成量來評估 ROS 的生成。結果發現隨著時間的延長，曲線有右移的趨勢，在 60 分鐘時候就產生大量的 ROS，90 分鐘達到高峰，約上升了 82% 而後逐漸地下降。顯示 KB 細胞在加入 APE 之後，造成 ROS 增加、粒線體膜電位下降及 cytochrome c 釋放，最後引起粒線體上一連串的凋亡訊息傳遞。

文獻中指出，細胞會經由調控活化一系列的 Cyclin-CDK (Cyclin-CDK complex) 複合體蛋白來進行細胞的增生，但是當細胞受到損傷時，則會藉由細胞週期檢查點(checkpoint)產生停滯來進行修復的過程，倘若無法進行修復，則細胞會走向凋亡【Smith et al., 1999】。由於腫瘤細胞使負責調節細胞週期蛋白及參與細胞週期檢查點調控失去正常功能，而造成不斷地進行增生。因此可藉由調控腫瘤細胞其細胞週期相關因子的表現，使其週期產生停滯及無法修復的情形，來

達到抑制癌細胞生長效果。

利用流式細胞儀評估 KB 細胞經由月桃萃取物處理於不同劑量與作用時間反應之後，觀察其細胞週期的變化。觀察發現 24 小時下，在 25、50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度呈現出 G2/M 期之細胞比例有增加的趨勢；隨著反應 24、48、72 小時 sub-G1 peak(細胞凋亡趨勢)有上升的情形。因此推測 KB 細胞於加入月桃萃取物造成其細胞週期 G2/M 期停滯，並隨著反應時間增加有呈現細胞凋亡情形。在經 APE 處理過的 KB 細胞發現，APE 可藉由抑制 cdc 2、cyclin A、cyclin B、cdc25c 蛋白表現使其無法形成 Cyclin-CDK complex 而阻斷細胞週期的運行，同時也會活化 p53、p-p53、p21 和 Wee1 表現增加來抑制 Cyclin-CDK complex 活化。綜合上述推測 APE 可能藉由抑制細胞週期調控蛋白中 Cyclin-CDK 複合體的形成，進而影響細胞週期進行。此外亦有文獻指出當 p53 被活化時，亦會使細胞內的 bax 蛋白表現增加，進而促進其細胞內的 bax/bcl-2 ratio 失去平衡，最後造成細胞走向細胞凋亡。因此在本研究中亦證明 p53 除了會活化下游 p21，使 KB 細胞產生細胞週期停滯之外，也同時造成 KB 細胞有細胞凋亡的情形發生【Han et al., 2007】。

腫瘤細胞為了要擷取更多的養分來進行生長，會藉由周圍組織轉移其他部位的方式來獲得。而與腫瘤組織轉移相關的基質金屬蛋白

酶-9 (MMP-9)主要會受到體內其他因子的調控，這些因子包括活化因子 urokinase-type plasminogen activator (uPA) 、 urokinase-type plasminogen activator receptor(uPAR)；抑制活化因子tissue inhibitor of metalloproteinase 1/2 (TIMP 1/2)、 plasminogen activator inhibitor 1/2 (PAI-1/2)。在一般正常情況下，這些調控因子會維持平衡，由於腫瘤細胞此平衡已產生失調的現象，進而促使腫瘤轉移的情況發生【Thomas et al., 1999】。

結果發現，APE可抑制KB細胞內MMP-9蛋白表現與活性；對於MMP-9的促進因子uPA蛋白表現於25 $\mu\text{g/ml}$ 有顯著的抑制作用。在抑制因子方面APE不僅可增加PAI-1及PAI-2的表現，同時也增加TIMP-1、TIMP-2蛋白表現來減少細胞外基質降解。綜合上述結果得知APE可抑制MMP-9蛋白表現和活性，同時也抑制uPA表現來降低MMP-9的活化。APE也會促使PAI-1/2和TIMP-1/2蛋白表現增加進而抑制MMP-9活性。推論APE藉此減少細胞外基質降解，降低腫瘤轉移的情形。

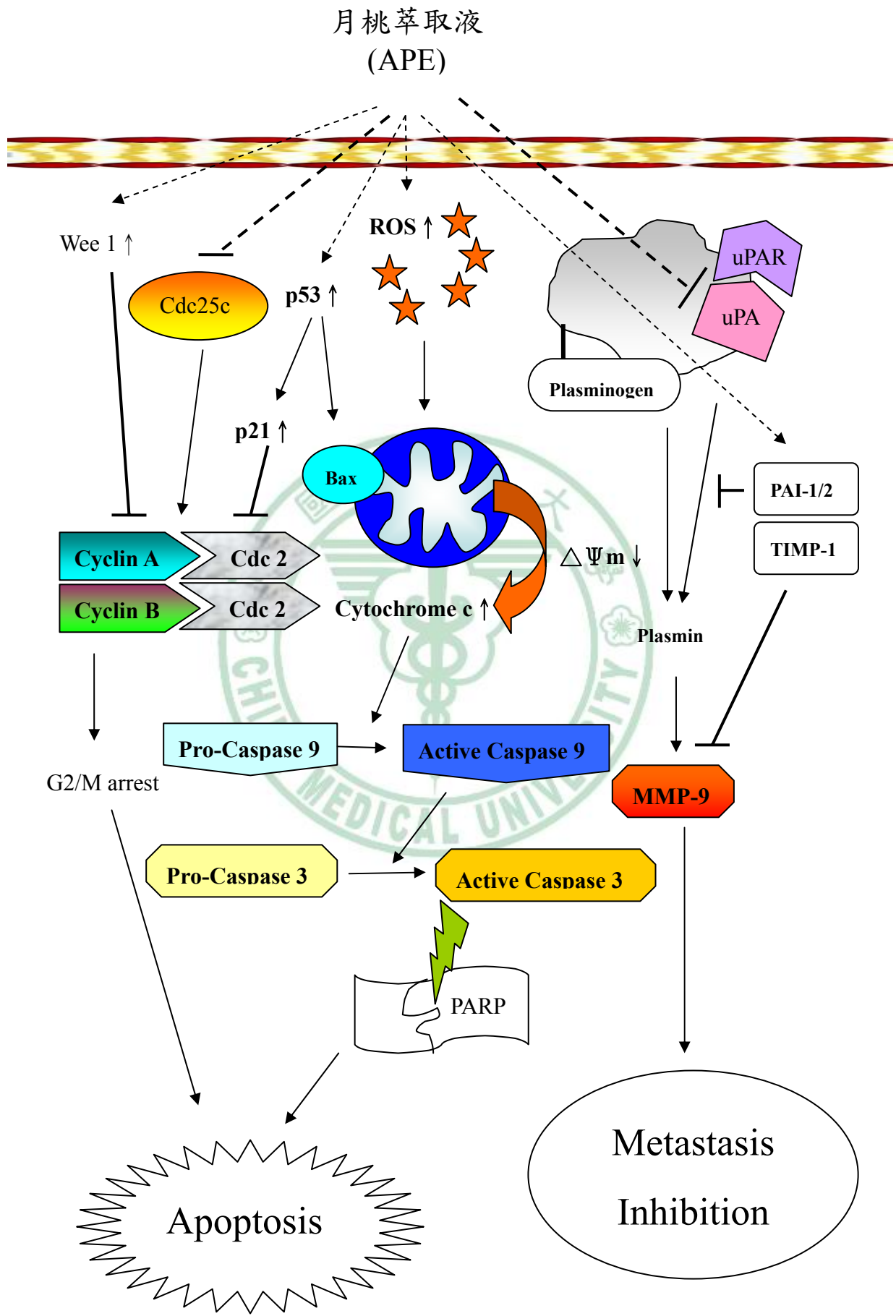
在確認 APE 在細胞實驗中確實可以造成 KB 細胞產生細胞週期停滯與細胞凋亡情形，因此於體內實驗則進行給予月桃萃取物腹腔注射方式來治療裸鼠(nude mice)皮下來誘發 KB 腫瘤生成，結果發現月桃萃取物組(10 mg/kg)相較於控制組，其抑制腫瘤效果明顯，且在整個實驗過

程各組裸鼠犧牲後比較其體重，實驗組與對照組相較之下均沒有影響。

由於先前在細胞實驗中已發現 APE 能造成 KB 細胞產生細胞凋亡，為證實腫瘤組織內是否為細胞凋亡而不是細胞壞死，因此將其腫瘤組織予以切片，利用 TUNEL kit 中使 endogenous endonuclease 活化而將 DNA 切成 oligonucleosome，這些斷裂的 DNA fragment 末端出現 3'-OH 基，而這 3'-OH 基即可被 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 結合，而偵測出凋亡的細胞。在 400 倍之倍率光學顯微鏡觀察腫瘤組織切片。結果如圖四十三所示，在月桃萃取物組(10 mg/kg)中 TUNEL⁺細胞(棕色)的數目有增加的趨勢，即表示 APE 在動物腫瘤組織內引發細胞凋亡。由此可知，月桃萃取物具有延緩腫瘤的生長速度並引起腫瘤組織內細胞產生 Apoptosis，在未來有機會可以開發成為臨床抗腫瘤的用藥。



綜合以上第一部分的結果，月桃萃取物(APE)對 KB 細胞具有產生 Apoptosis 的現象、細胞週期停滯情形與抑制腫瘤細胞轉移。其機制是藉由降低 cdc 2、cyclin A、cyclin B、cdc25c 蛋白表現；增加 p53、p-p53、p21 和 Wee1 表現使其無法形成 Cyclin-CDK complex，而使細胞停滯在 G2/M 期。同時 APE 也會造成 KB 細胞內活性氧化物增加，進而造成膜電位下降；bax 與 cytochrome c 蛋白表現增加；bcl-2 蛋白下降。最後活化粒線體路徑中的 caspase 9 誘發 KB 細胞走向細胞凋亡。在腫瘤轉移方面 APE 主要是藉由直接抑制 MMP-9 表現以及透過抑制 MMP-9 的活化因子如 uPA 與提高抑制因子 PAI-1/2 和 TIMP-1 的表現，減少 MMP-9 的活化避免細胞外基質分解進而達到抑制轉移之作用。動物實驗中也發現，APE 可抑制 KB 細胞所誘發之腫瘤增生並誘導細胞凋亡。本研究清楚顯示 APE 對於癌細胞增生及轉移在細胞與動物實驗均有良好的抑制作用，也顯現出 APE 具有潛力發展成天然的抗腫瘤藥物。



第二部份

探討月桃主成分(Flavokawain B)對人類
口腔鱗狀上皮癌細胞株(KB)之影響





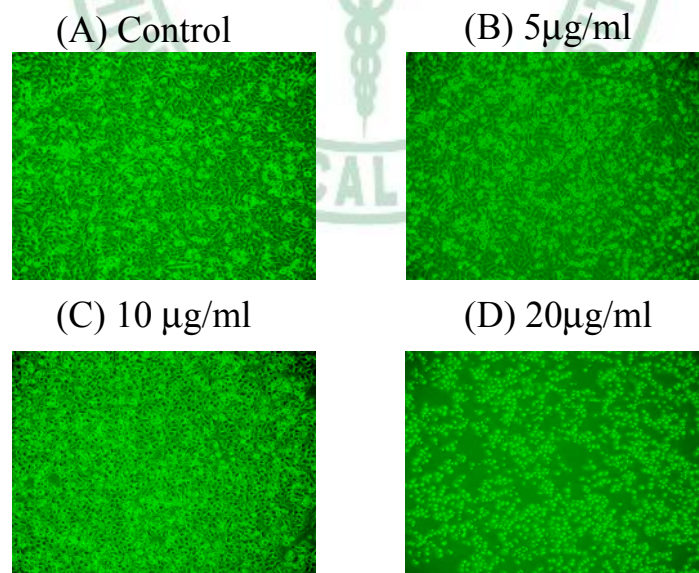
一、細胞實驗(*In Vitro*)

一、月桃主成分(Flavokawain B ; FKB)對人類口腔鱗狀上皮癌細胞株(KB)之細胞毒性與細胞型態的影響

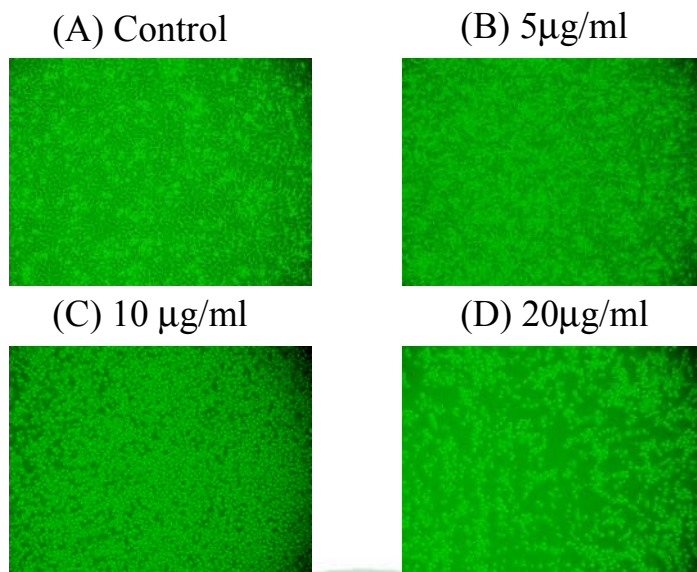
(一) 月桃主成分(FKB)對 KB 細胞存活率(Cell viability)

加入不同濃度的FKB(0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)作用於KB (3×10^5 cells/12 well)中，分別於24、48、72小時後觀察KB細胞存活的情形(圖四十四、四十五、四十六)。結果發現隨著加入5-20 $\mu\text{g/ml}$ FKB，細胞型態均有不完整的現象。在反應24、48、72小時部分在濃度5-20 $\mu\text{g/ml}$ 下對KB細胞存活率就有明顯的下降(圖四十七)。

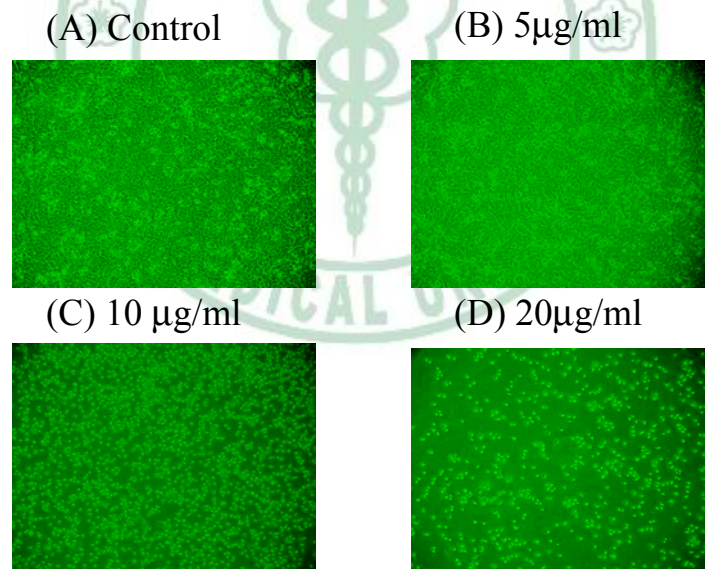
利用流式細胞儀(flow cytometry)評估細胞凋亡情形，結果發現加入5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB之後，sub-G1(細胞凋亡指標)的百分比隨著反應濃度的上升而增加(圖四十八、表十)。



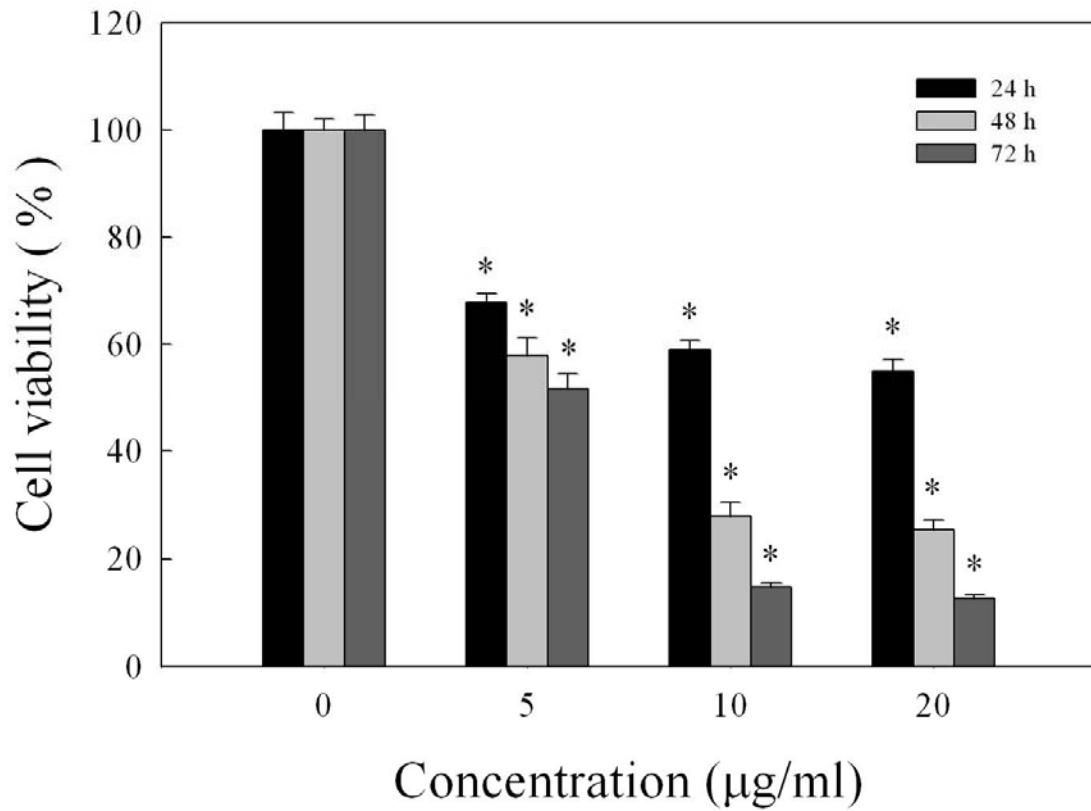
圖四十四、以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 24 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



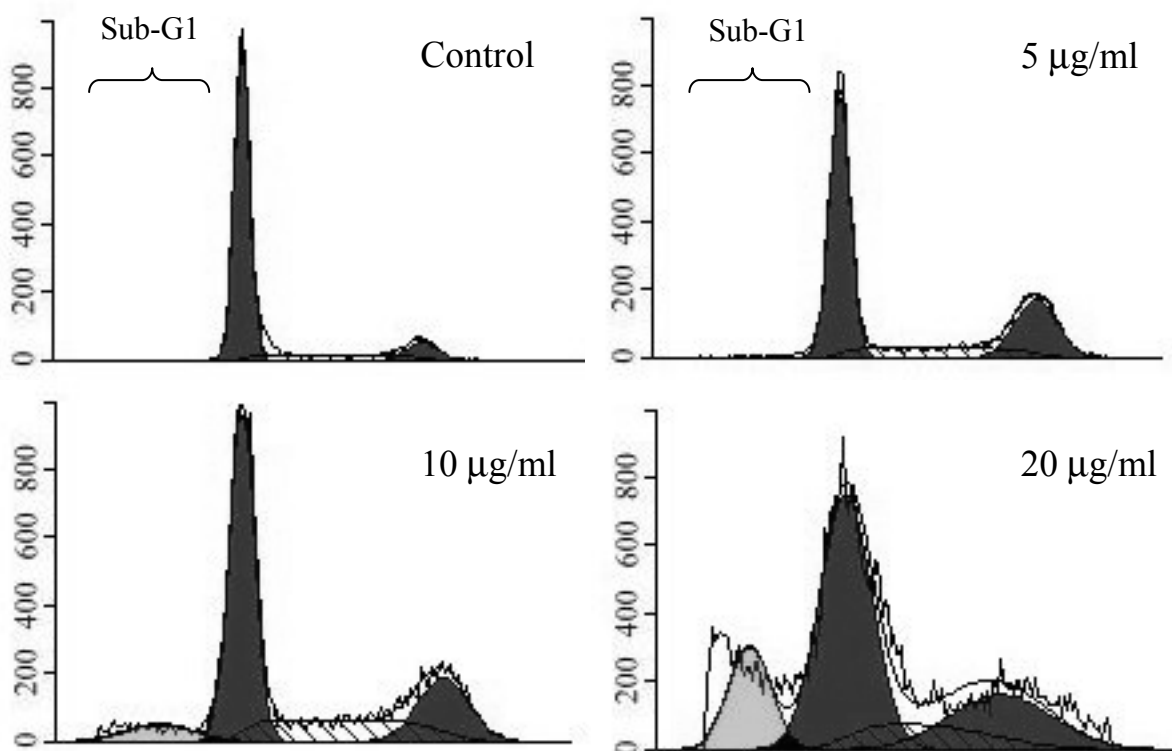
圖四十五、以 0、5、10、20 μ g/ml FKB 處理 KB 細胞株 48 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



圖四十六、以 0、5、10、20 μ g/ml FKB 處理 KB 細胞株 72 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



圖四十七、以 0、5、10、20 µg/ml FKB 處理 KB 細胞株 24、48、72 小時後細胞的存活率。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3，* p < 0.05 v.s. control。



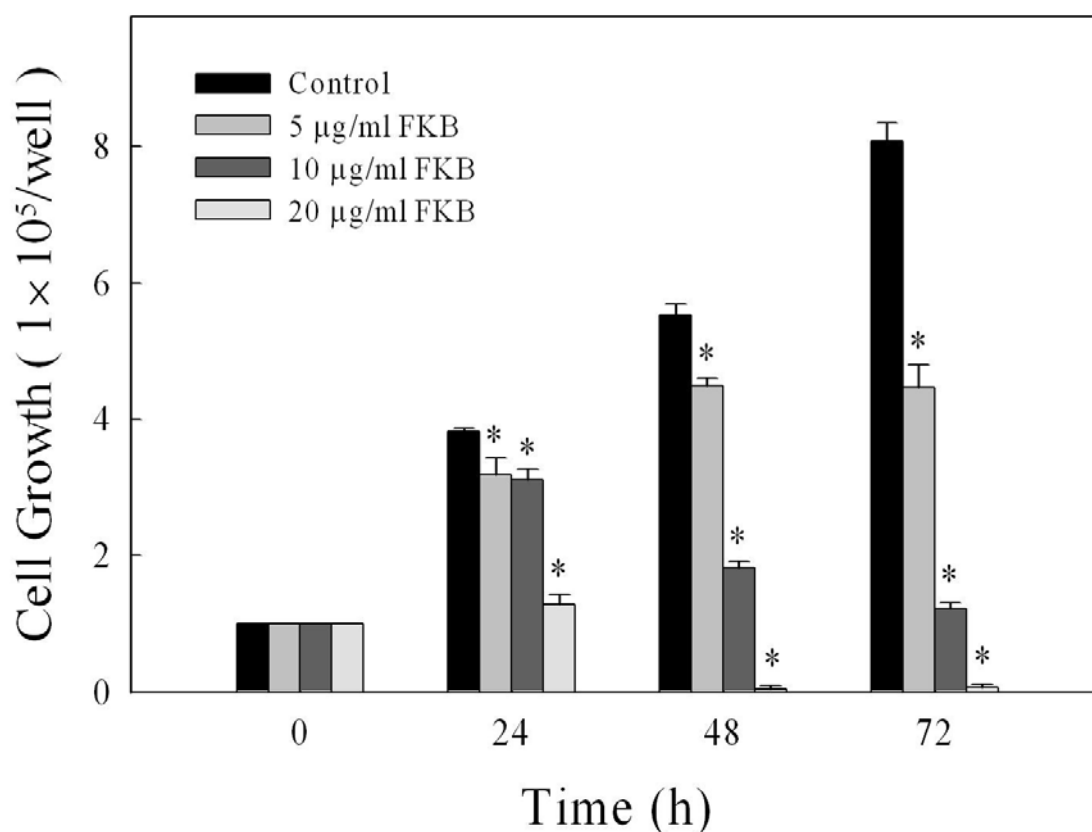
圖四十八、利用流式細胞儀偵測以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 24 小時後 sub-G1 的情形。

表十、利用流式細胞儀計算以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 24、48、72 小時後 sub-G1 細胞比例。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* p < 0.05 v.s. control。

($\mu\text{g/ml}$)	Sub-G1 Cell population (%)		
	24 h	48 h	72 h
0	0.26 \pm 0.15	0.80 \pm 0.48	1.16 \pm 0.3
5	1.02 \pm 0.84*	8.71 \pm 0.38*	8.37 \pm 1.32*
10	6.82 \pm 0.58*	45.04 \pm 2.92*	57.77 \pm 3.28*
20	16.58 \pm 2.23*	63.18 \pm 2.26*	73.97 \pm 1.22*

(二) 月桃主成分(FKB)對 KB 細胞生長率(Cell growth)

加入不同濃度的 FKB (0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)作用於 KB (1×10^5 cells/6 well)中，分別於 24、48、72 小時後觀察 KB 細胞的生長情形。結果發現 5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 作用下，在反應 24、48、72 小時之後會使 KB 細胞生長率有明顯的抑制情形($p < 0.05$) (圖四十九)。

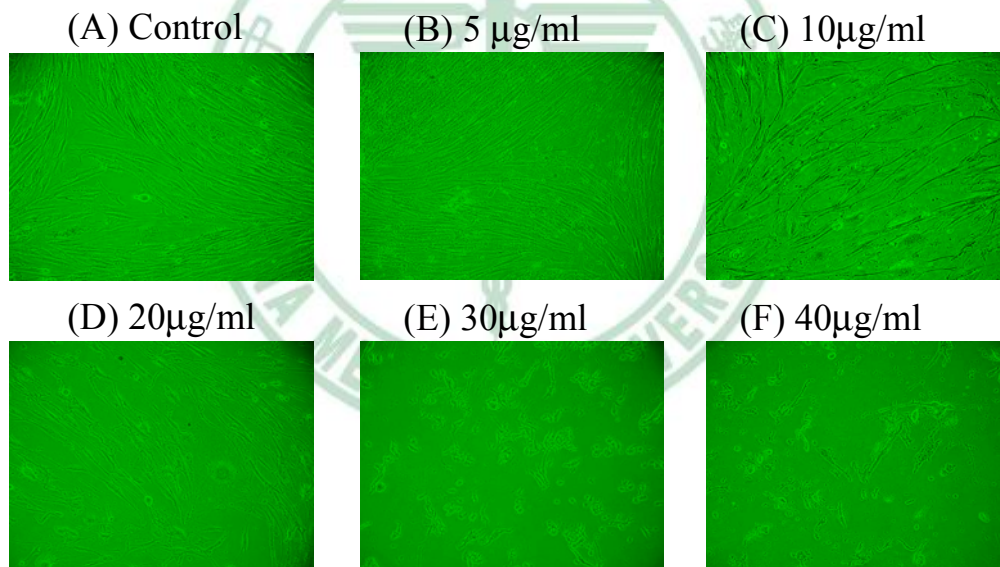


圖四十九、以 5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 24、48、72 小時後細胞的生長率。數據結果以 mean \pm SD 值表示， $n=3$ 。
* $p < 0.05$ v.s. control。

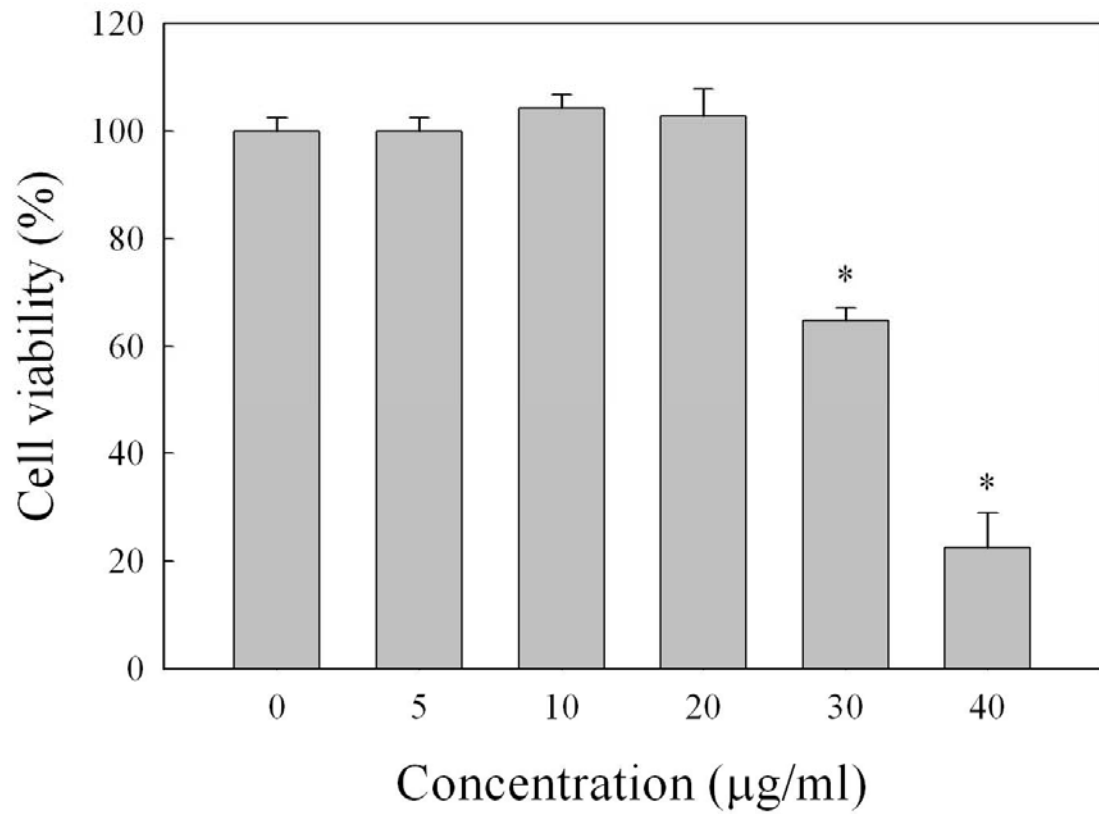
二、月桃主成分(FKB)對人類正常牙齦纖維母細胞(Human gingival fibroblast cells)之細胞毒性與細胞型態的影響

(一) 月桃主成分(FKB)對 HGF 細胞存活率(Cell viability)

加入不同濃度的FKB(5、10、20、30、40 $\mu\text{g/ml}$)作用於HGF (3×10^5 cells/12 well)中，分別於24小時後觀察HGF細胞生長的情形(圖五十)。由圖五十一結果得知5-20 $\mu\text{g/ml}$ FKB對HGF細胞存活率沒有影響，但是高濃度30、40 $\mu\text{g/ml}$ FKB對HGF細胞存活率則有明顯細胞毒殺性，且細胞型態呈現不完整的現象。



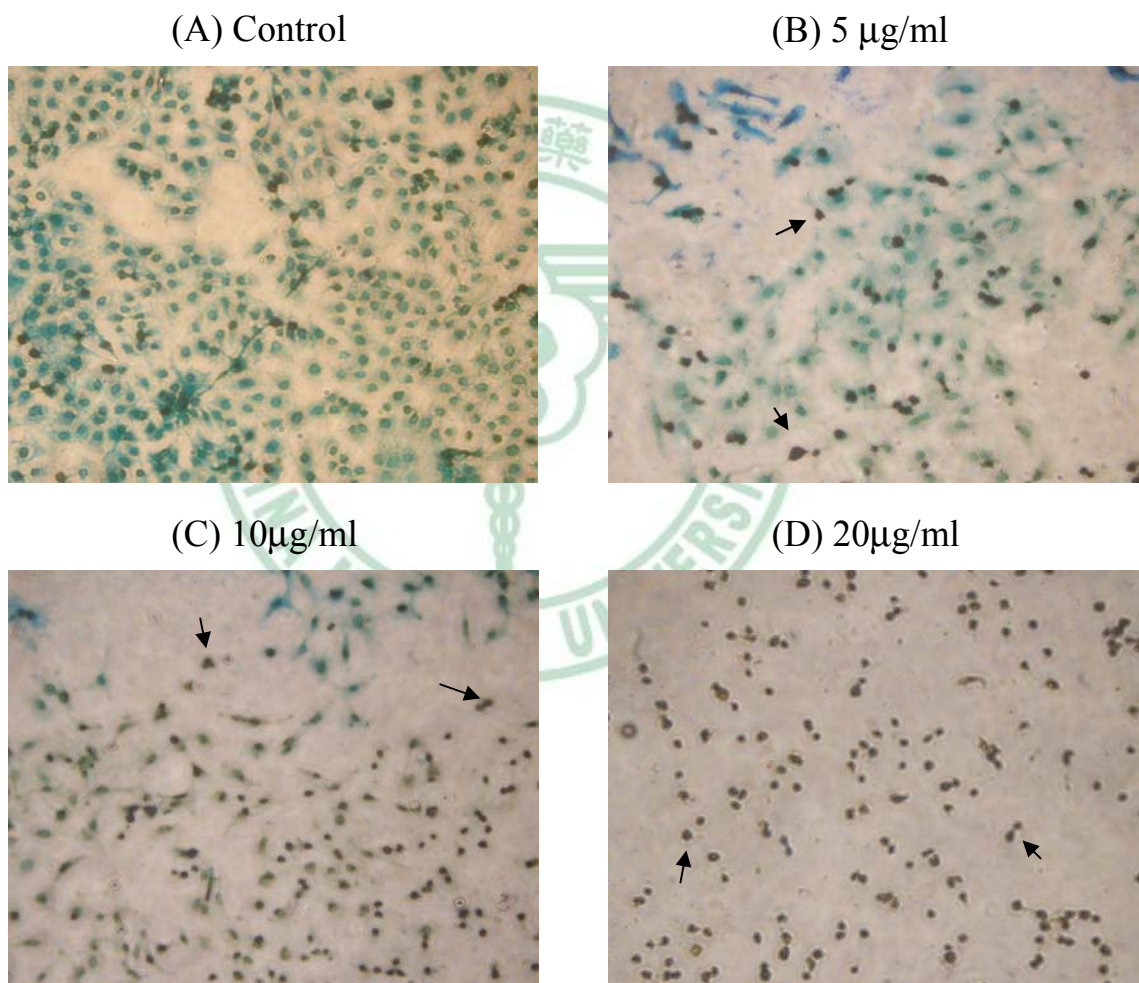
圖五十、以 5、10、20、30、40 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 HGF 細胞株 24 小時後細胞型態的變化，放大倍率 200 X。



圖五十一、以 5、10、20、30、40 µg/ml FKB 處理 HGF 細胞株 24 小時後細胞的存活率。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

三、FKB對KB cells產生DNA fragmentation分析

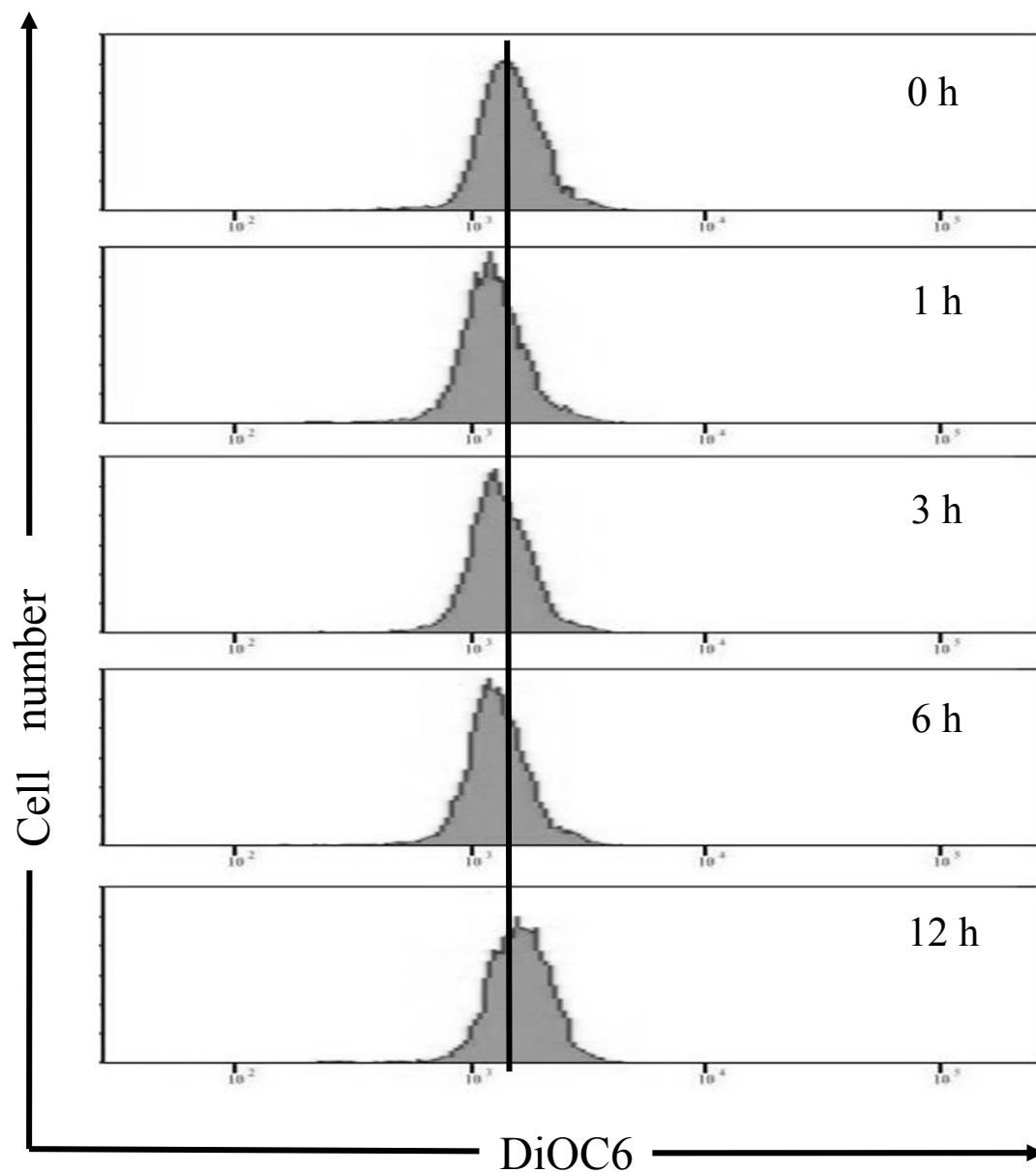
加入不同濃度的FKB(5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)作用於KB (3×10^5 cells/6 well)中，分別於24小時後利用TUNEL assay kit分析。控制組的KB細胞幾乎都呈現TUNEL⁻細胞(藍色)，而經過5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB反應的KB細胞，有表現出TUNEL⁺，明顯看出產生細胞凋亡的棕色細胞之現象；而隨著濃度增加，其凋亡的細胞就愈多。



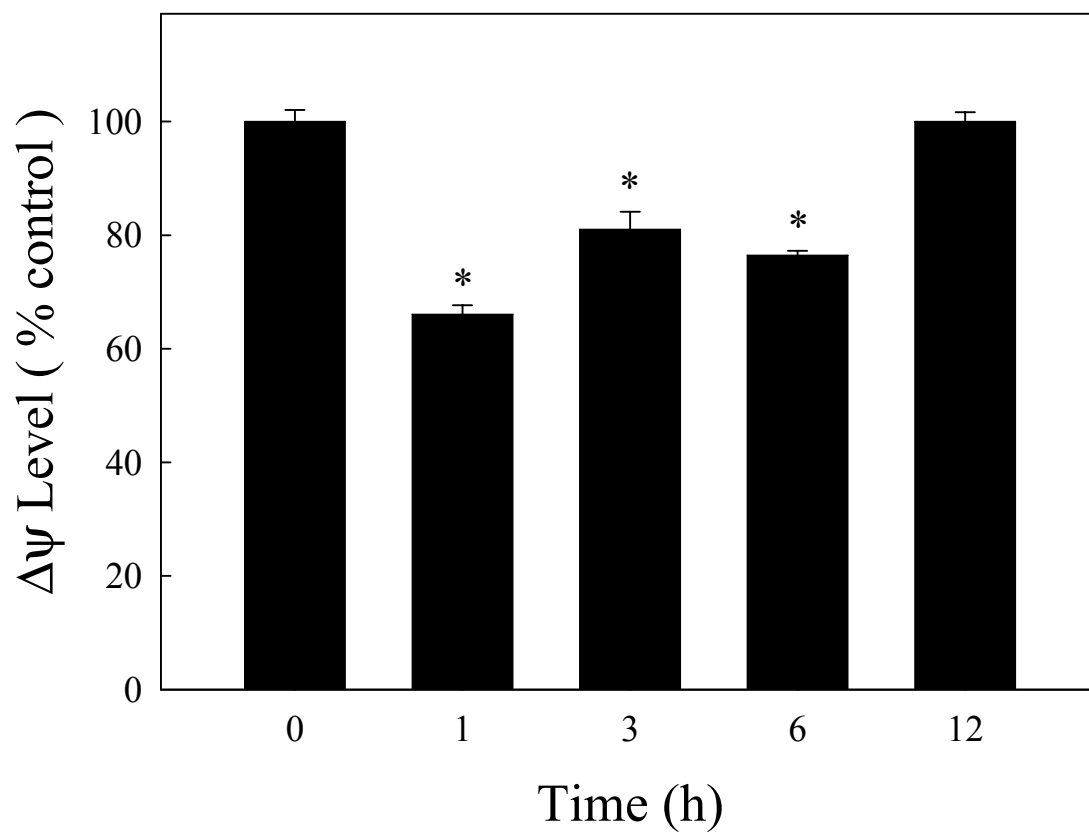
圖五十二、以5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB細胞株24小時後細胞產生DNA fragmentation的表現。箭頭所指即表示凋亡細胞。

四、細胞膜電位($\Delta\Psi$)測定分析

利用流式細胞儀檢測加入 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 FKB 作用於 KB 細胞中，分別於 1、3、6、12 小時的反應時間來檢測細胞產生膜電位後變動的情形(圖五十三)。由圖五十四量化圖結果發現在反應 1、3、6 小時即有顯著膜電位下降的情況($p < 0.05$)，顯示細胞可能藉由粒線體路徑而造成膜電位下降。



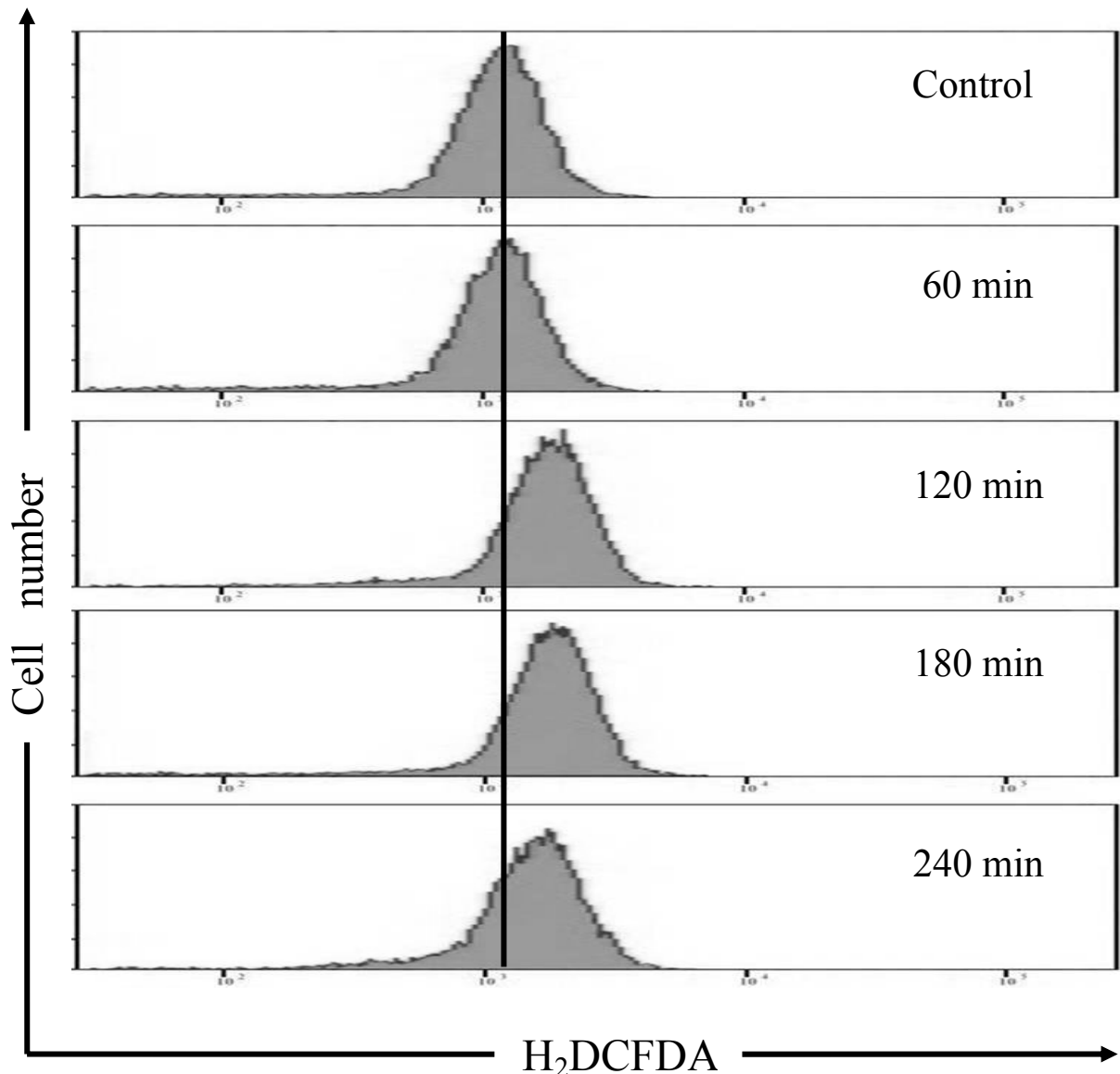
圖五十三、以 10 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 1、3、6、12 小時後膜電位變動的情形。



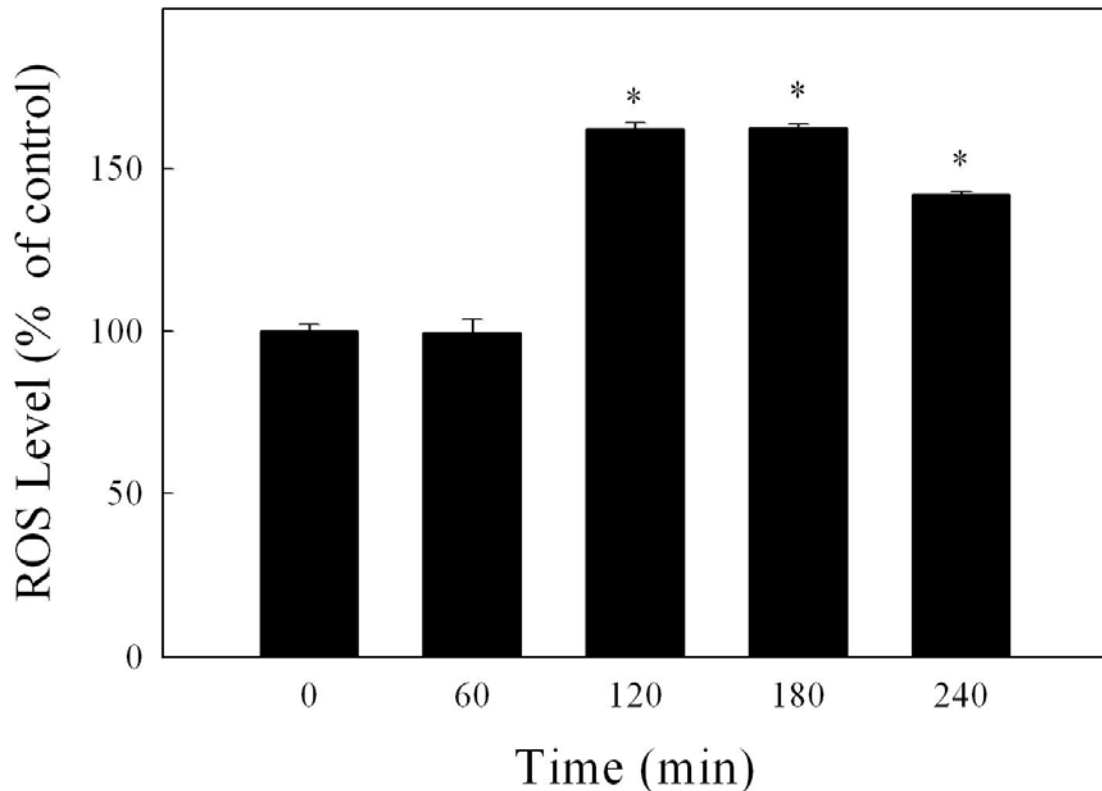
圖五十四、KB 細胞株經過 10 $\mu\text{g/ml}$ FK506 處理 1、3、6、12 小時後膜電位變動量化圖。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。
* $p < 0.05$ v.s. control。

五、活性氧化物(Reactive oxygen species)測定

利用流式細胞儀評估10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的FKB處理不同時間0、60、120、180、240分鐘，再加入 H_2DCFDA ，並觀察其產生活性氧化物的情形(圖五十五)。由量化圖(五十六)得知在120分鐘就達到高峰，之後持續有往右移情形，顯示細胞在加入FKB有產生活性氧化物的情形，可能因此而造成細胞的DNA傷害。



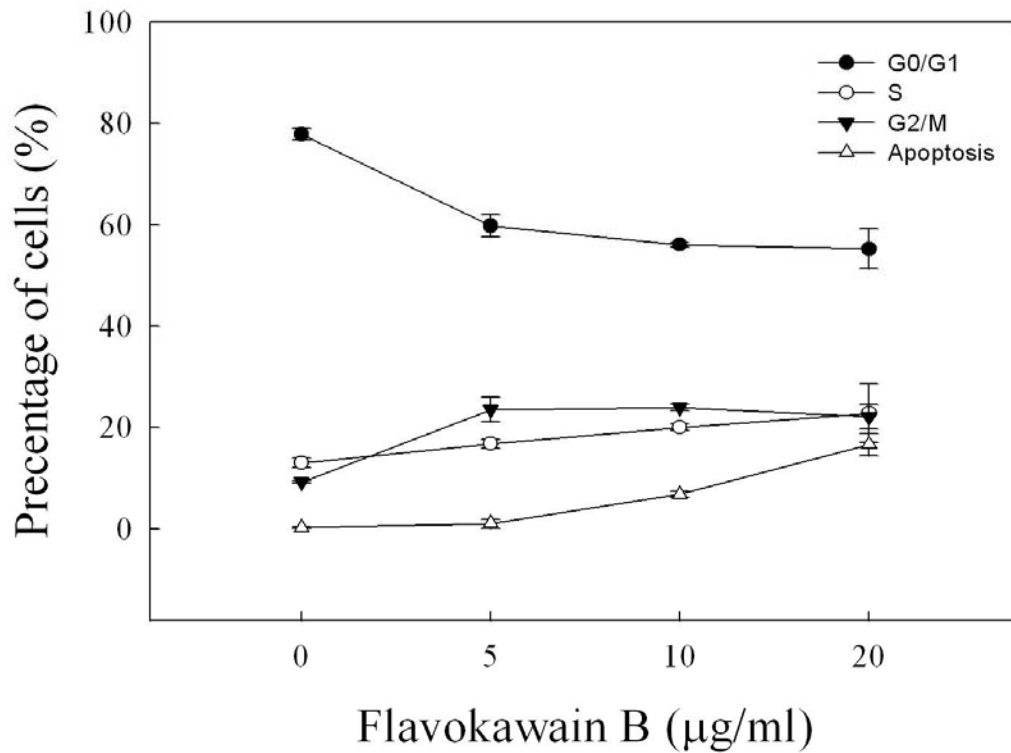
圖五十五、以10 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB細胞株處理0、60、120、180、240分鐘後活性氧化物生成的情形。



圖五十六、KB 細胞株經過 10 µg/ml FKB 處理 0、60、120、180、240 分鐘後活性氧化物生成量化圖。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

六、KB cells 細胞週期之影響

利用流式細胞儀評估以 5、10、20 µg/ml FKB 處理 24 小時後，觀察其細胞週期的表現。發現在 5、10、20 µg/ml 濃度，均造成 G0/G1 期之細胞比例有逐漸降低，且 G2/M 期細胞比例就增加。由此可知，FKB 可以使 KB 細胞株引起細胞週期停在 G2/M 期(圖五十七、表十一)。



圖五十七、利用流式細胞儀偵測 5、10、20 µg/ml 月桃主成分處理 KB 細胞株 24 小時後細胞週期停滯情形。

表十一、利用流式細胞儀計算 0、5、10、20 µg/ml FKB 處理 KB 細胞株 24 小時之細胞各週期表現。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

(µg/ml)	Cell population (%)			
	Sub-G1	G1	S	G2/M
0	0.26 ± 0.14	77.79 ± 1.16	12.98 ± 0.95	9.22 ± 0.23
5	1.02 ± 0.83*	59.76 ± 0.89*	16.75 ± 0.89*	23.47 ± 2.42*
10	6.82 ± 0.58*	56.06 ± 0.43*	20.00 ± 0.66*	23.93 ± 0.71*
20	16.58 ± 2.22*	55.21 ± 3.93*	22.75 ± 5.76*	22.03 ± 2.33*

七、西方墨點法分析細胞蛋白的表現

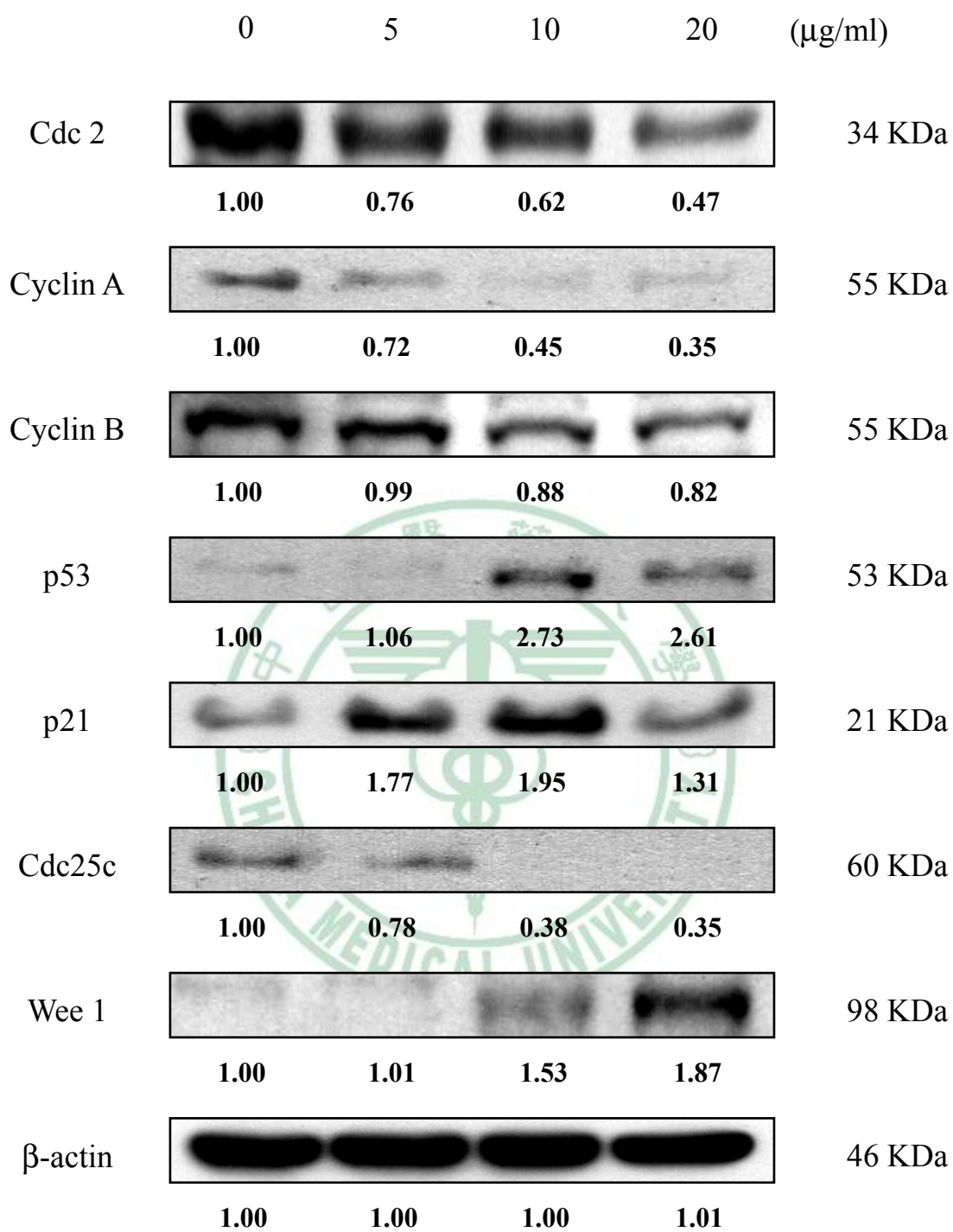
(一) 細胞週期蛋白表現(Cell cycle protein expression)

先前的實驗結果顯示FKB造成細胞停滯在G2/M期，為探究其機制，以西方墨點法(Western blotting)分析FKB對細胞週期蛋白質表現量影響。偵測參與調控細胞週期相關的G2/M 期的蛋白有：

1. CDKs：Cdc 2
2. Cyclins：Cyclin A、Cyclin B
3. CDKIs：p53、p21
4. 其他：Cdc 25c、Wee 1

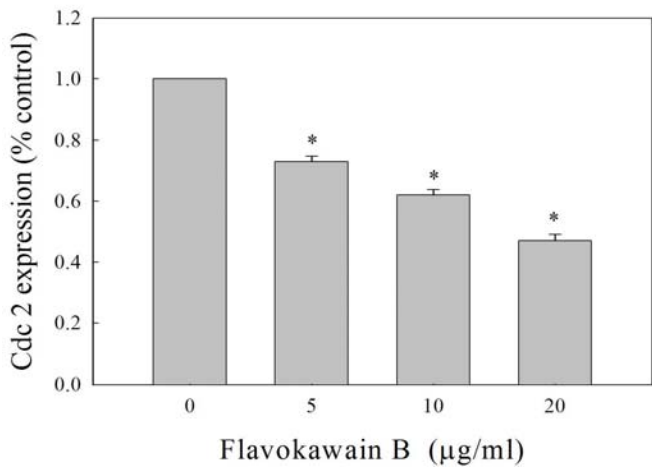
分別以0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB細胞24小時後觀察蛋白表現量變化，結果發現Cdc 2、Cyclin A、Cyclin B、Cdc 25c在10-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白表現下降；p53、Wee 1在10-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白表現有增加的情形，而p21也在加入5-20 $\mu\text{g/ml}$ FKB時其蛋白表現就有逐漸增加的情形(圖五十八、圖五十九)。

所以KB細胞可能在FKB濃度的作用下，首先活化p53、Wee 1；抑制Cdc 25c，之後p53活化下游的p21，最後抑制Cdc 2、Cyclin A、Cyclin B所形成Cyclin-CDK複合體結合，進而導致細胞停滯於G2/M期。

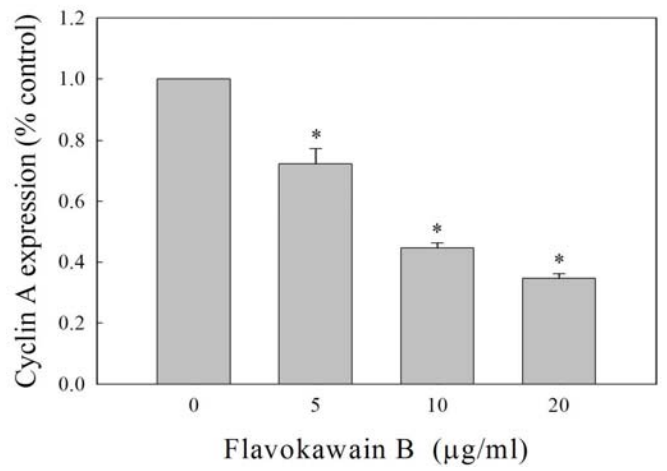


圖五十八、利用西方點墨法觀察以0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB細胞株24小時，G2/M期中的cdc 2、cyclin A、cyclin B、p53、p21、cdc25c、Wee 1表現。以 β -actin作為internal control。

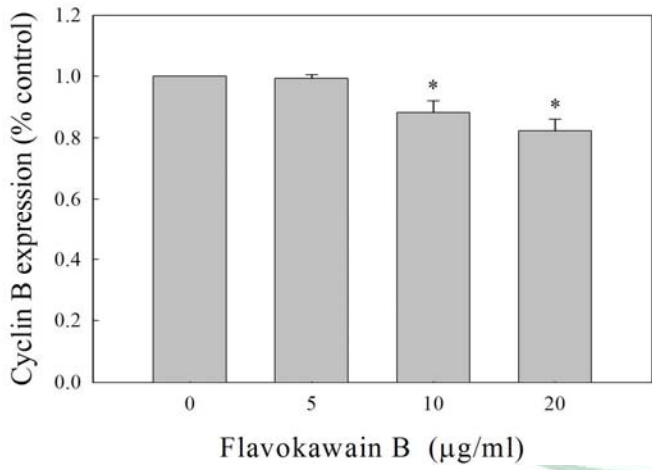
Cdc 2



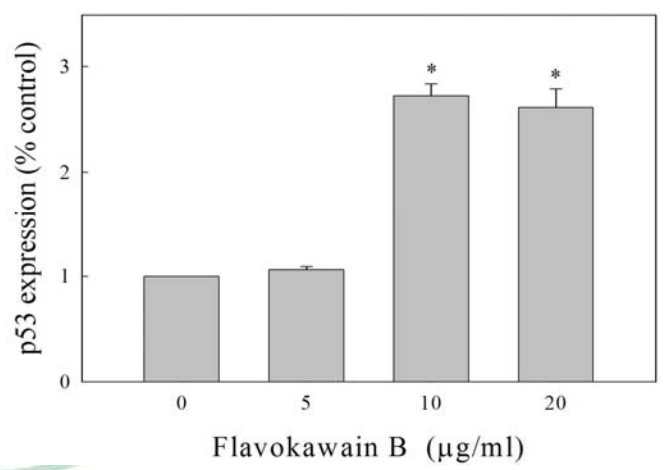
Cyclin A



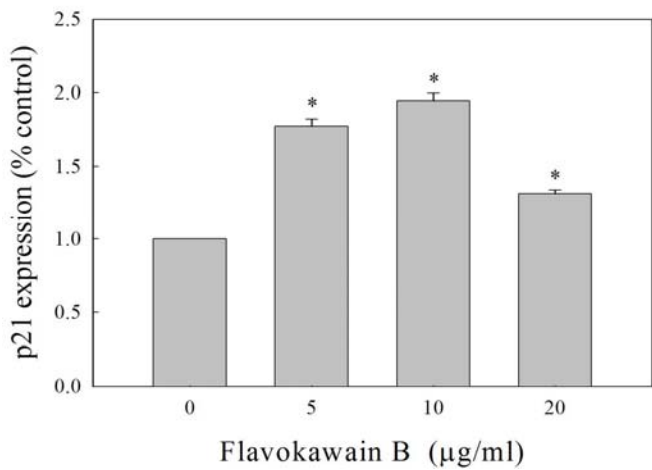
Cyclin B



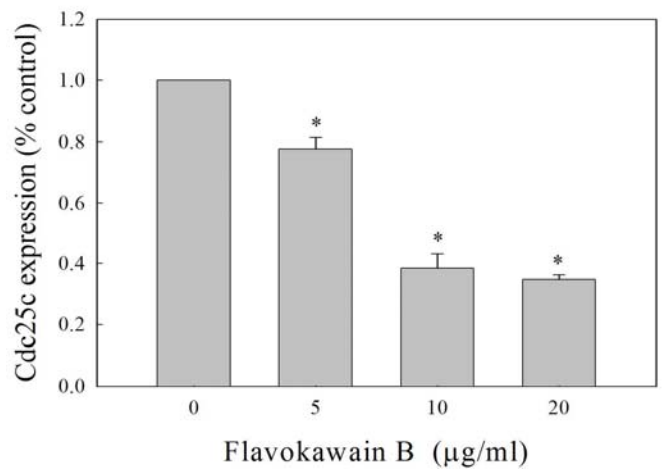
p53

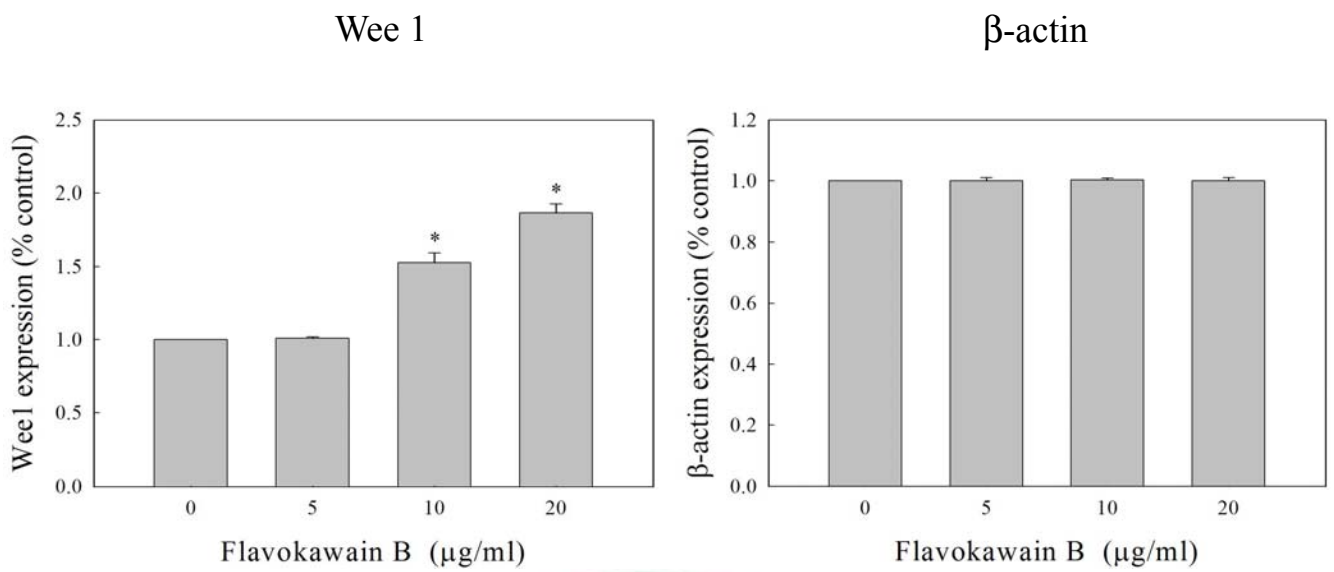


p21



Cdc25c





圖五十九、利用西方點墨法觀察以0、5、10、20 µg/ml FKB處理KB處理KB細胞株24小時，G2/M期中的cdc 2、cyclin A、cyclin B、p53、p21、cdc25c、Wee 1量化表現。以β-actin作為internal control。數據結果以mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

(二) 細胞凋亡蛋白表現(Apoptosis protein expression)

先前的實驗結果顯示FKB造成細胞呈現凋亡的現象發生，為探究其機制，因此利用西方墨點法(Western blotting)分析FKB對細胞凋亡蛋白質表現量影響。偵測參與調控細胞凋亡相關的蛋白有：

1. Caspase 9
2. Caspase 8
3. Caspase 3
4. Cytochrome c
5. Bax
6. Bcl-2
7. PARP
8. FAS
9. FAS-L
10. Bid

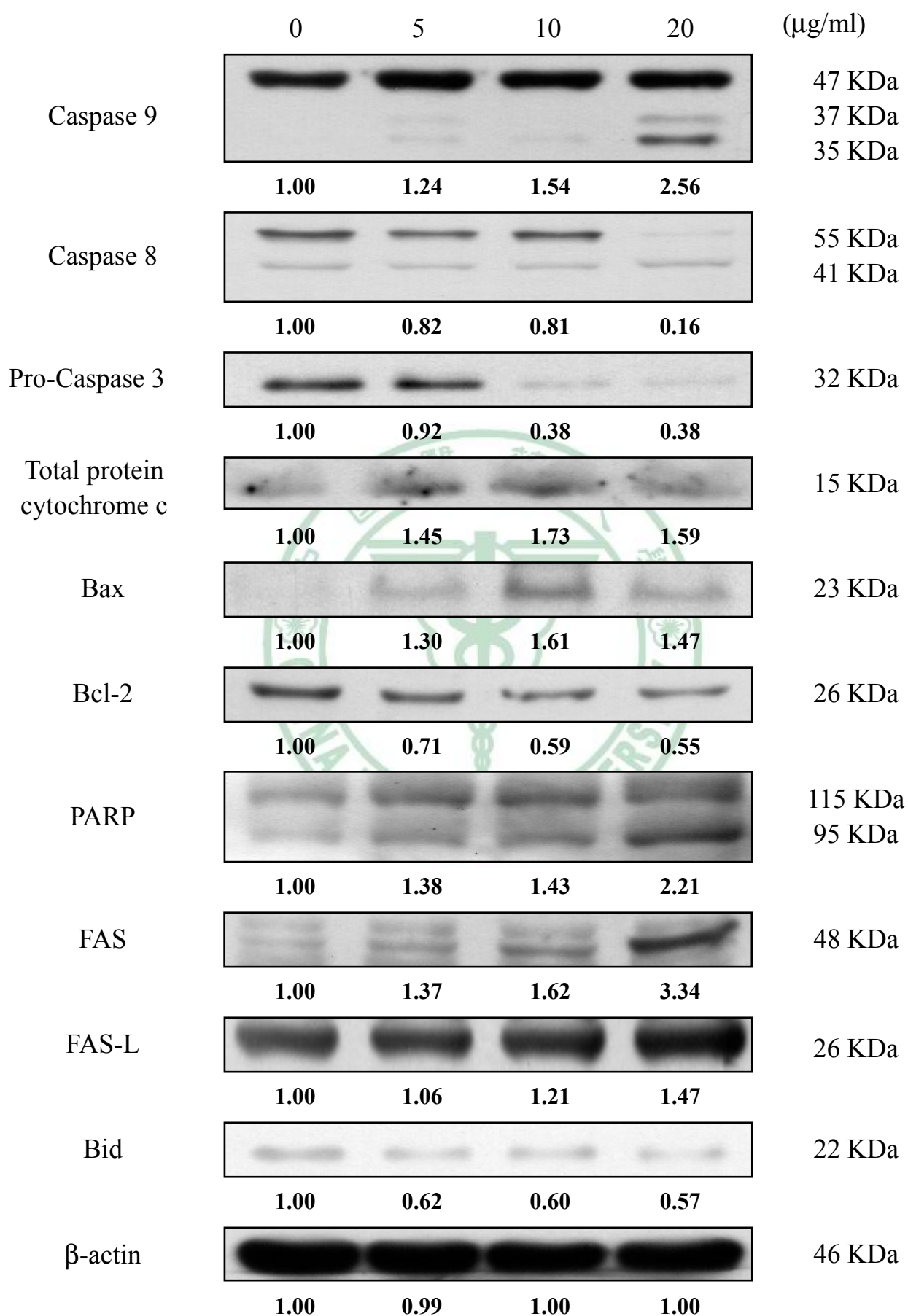


分別以0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB細胞24小時後，觀察蛋白表現量變化，結果發現bax、cytochrome c、FAS在5-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白表現上升；FAS-L則在10-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下隨著濃度增加而蛋白表現上升，而bcl-2、pro-caspase 3、bid在加入10-20 $\mu\text{g/ml}$ FKB時，隨著濃度增加而蛋白表現下降。此外caspase 9、caspase 8、PARP在20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白呈現裂解現象（圖六十、圖六十一）。Bax/bcl-2 ratio有隨著濃度增加而顯著增加。

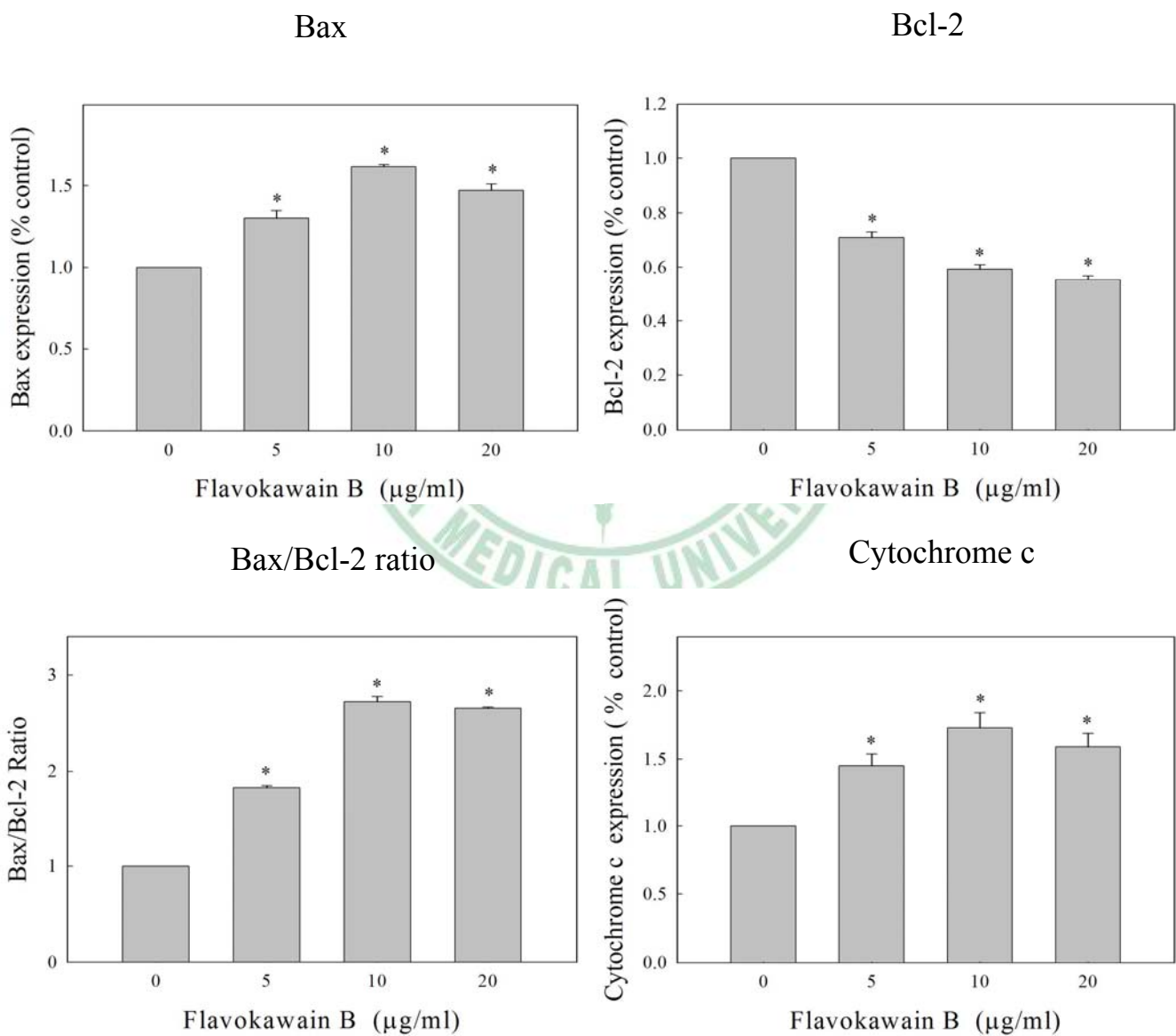
所以KB細胞可能在FKB濃度的作用下，繼而造成粒線體上的cytochrome c釋放、bax與bcl-2的平衡失調、進而活化了caspase 9並促使下游的pro-caspase 3、PARP裂解，最後使細胞走向細胞凋亡。而FKB

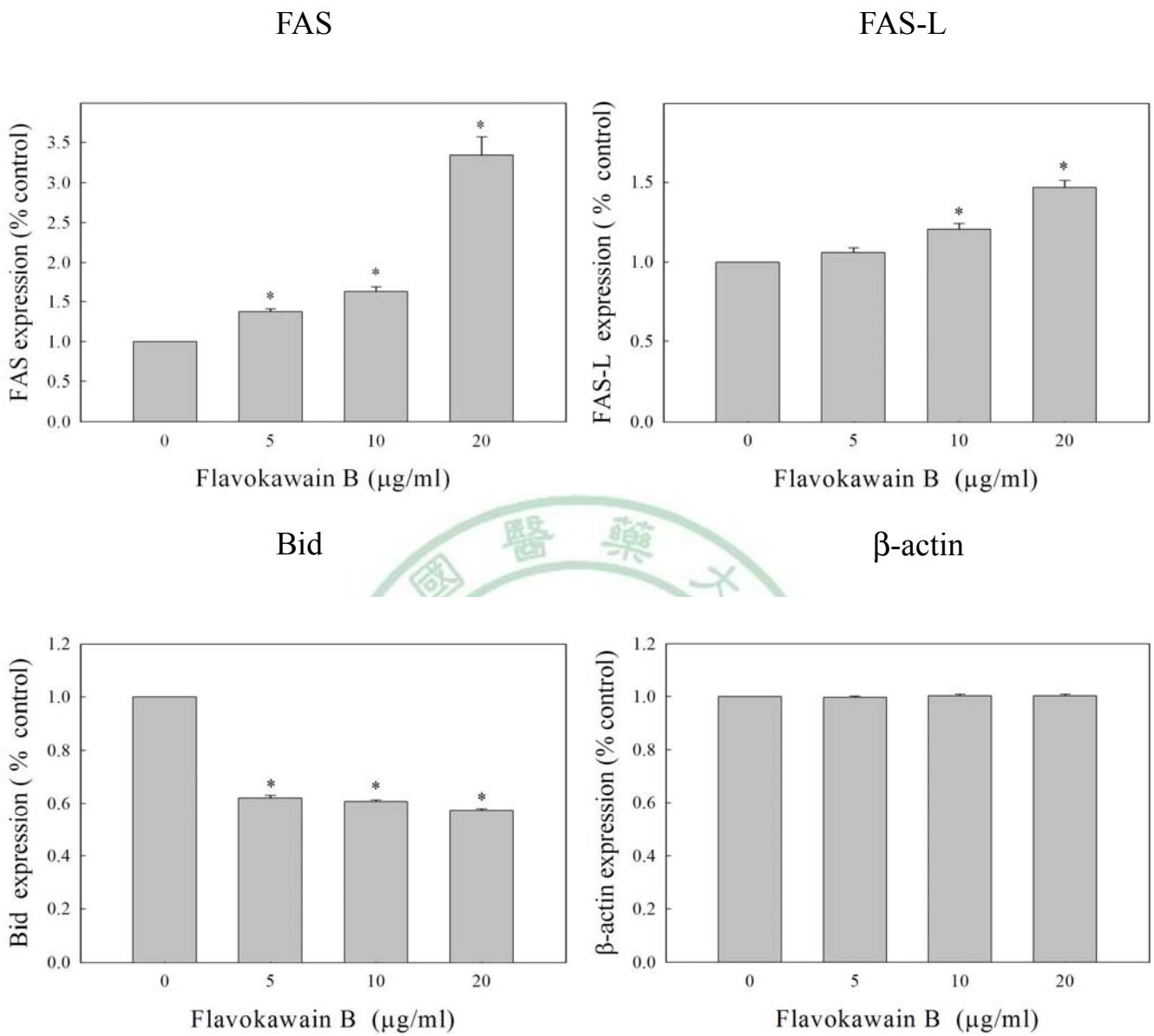
也同時先活化FAS、FAS-L，之後活化caspase 8並造成Bid蛋白表現減少，繼而影響粒線體上的bax與bcl-2的平衡。因此在此推測FKB可能同時活化粒線體路徑與死亡接受器路徑來促使KB細胞走向凋亡。





圖六十、利用西方點墨法觀察以0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB處理KB細胞株24小時，細胞凋亡表現蛋白中的caspase 9、caspase 8、pro-Caspase 3、cytochrome c、bax、bcl-2、PARP、FAS、FAS-L、bid表現。以 β -actin作為internal control。





圖六十一、利用西方點墨法觀察以0、5、10、20 µg/ml FKB 處理KB 處理KB細胞株24小時，細胞凋亡表現蛋白中的bax、 bcl-2、cytochrome c、bax/bcl-2 ratio、FAS、FAS-L、bid 量化表現。數據結果以mean ± SD 值表示，n=3。* p< 0.05 v.s. control。

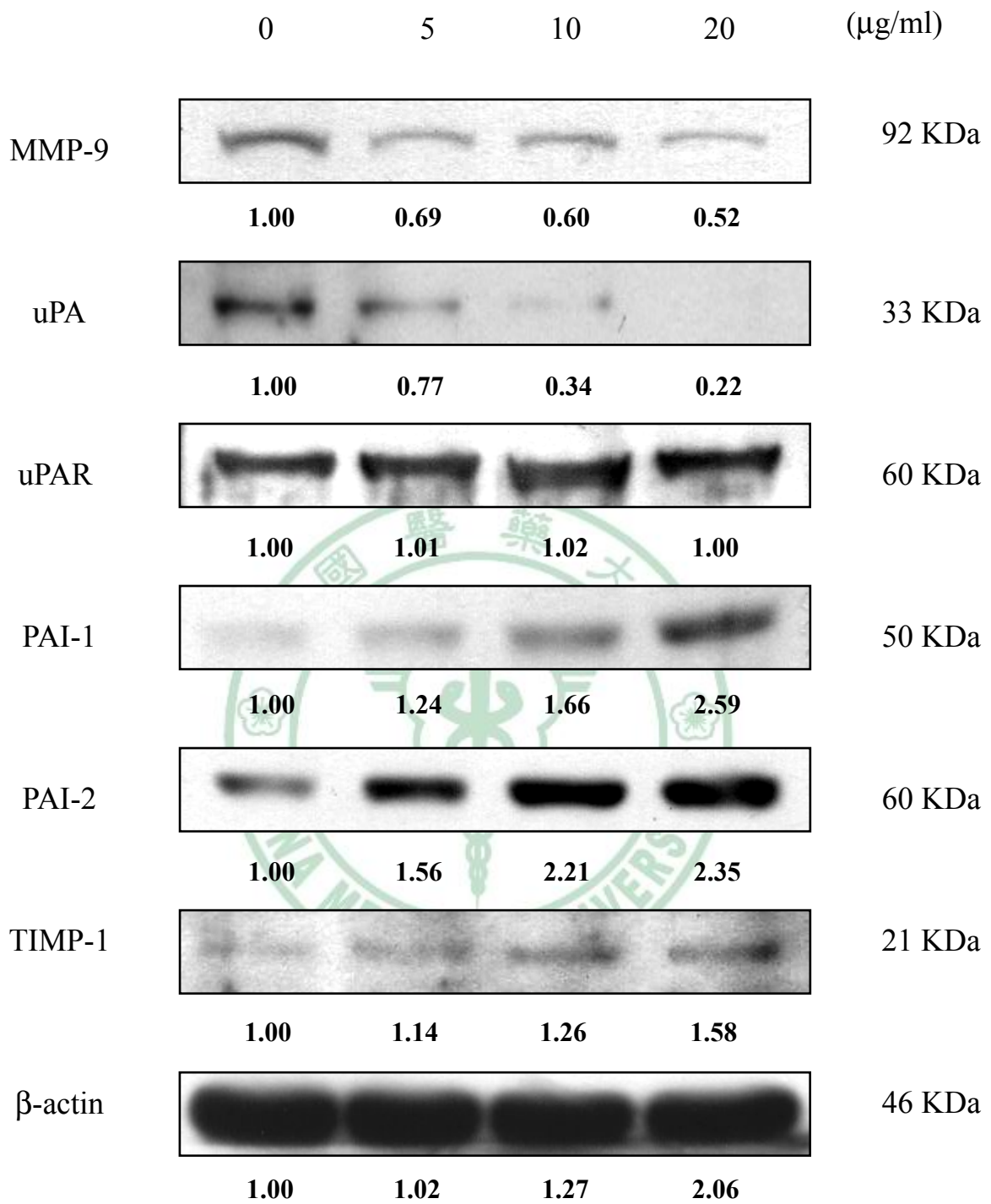
(三) 細胞轉移蛋白表現(Metastasis protein expression)

先前的實驗結果顯示FKB均會造成細胞呈現細胞週期停滯與細胞凋亡的現象發生，因此進一步以西方墨點法(Western blotting)分析FKB對細胞轉移蛋白質表現量影響。探究FKB是否具有抑制細胞轉移的表現，偵測參與調控細胞轉移相關的蛋白有：

1. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)
2. Urokinase-type plasminogen activator (uPA)
3. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)
4. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)
5. Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2)
6. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)

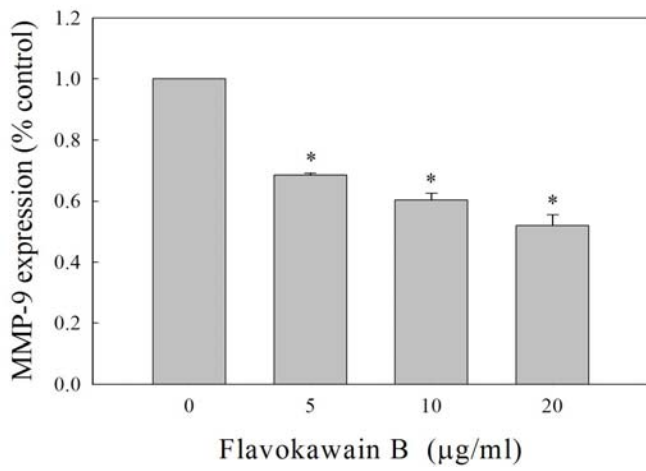
分別以0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB細胞24小時後，觀察蛋白表現量變化，結果發現MMP-9、uPA在5-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白表現明顯降低，而PAI-1、PAI-2、TIMP-1也是在加入5-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，隨著濃度增加而蛋白表現上升。此外uPAR則在任何濃度反應下沒有任何變化(圖六十二、圖六十三)。

所以KB細胞可能在FKB濃度的作用下，藉由抑制uPA與活化PAI-1、PAI-2、TIMP-1來抑制MMP-9的表現，進而達到抑制腫瘤轉移的效果。而FKB對於uPA receptor可能不造成影響，因為任何濃度FKB均不會對uPA receptor有任何變化。

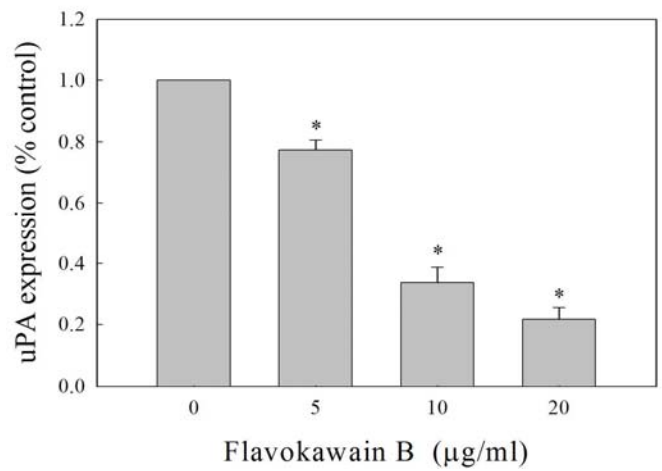


圖六十二、利用西方點墨法觀察以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 24 小時，調控細胞轉移中的 MMP-9、uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2、TIMP-1、表現。以 β -actin 作為 internal control。

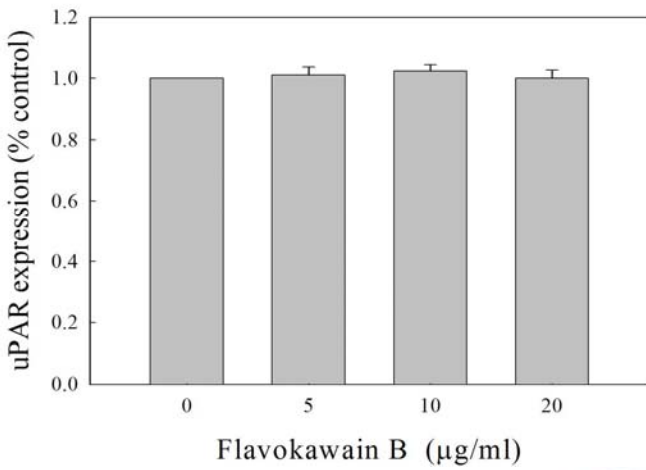
MMP-9



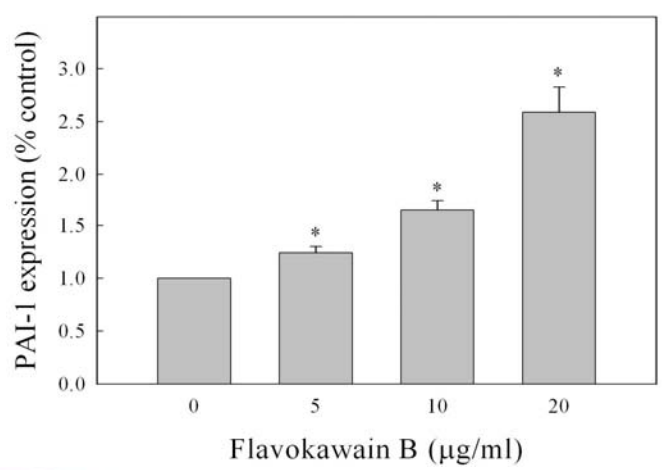
uPA



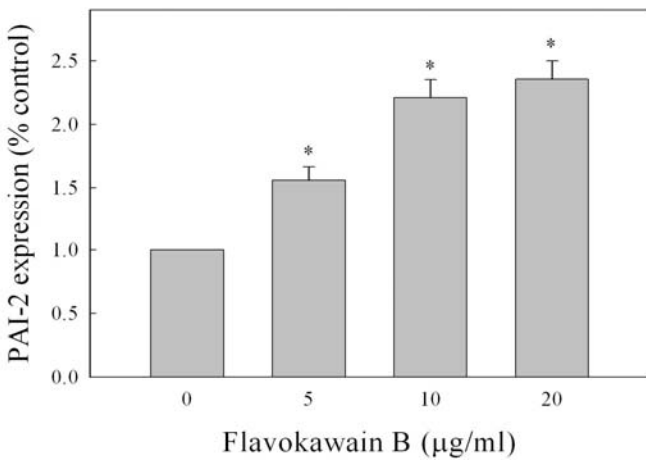
uPAR



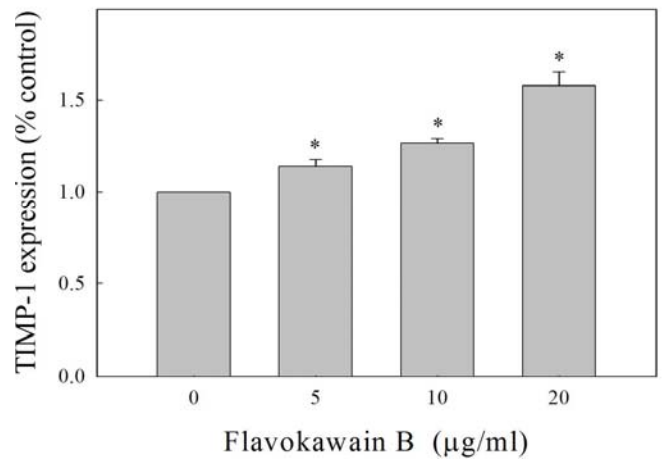
PAI-1



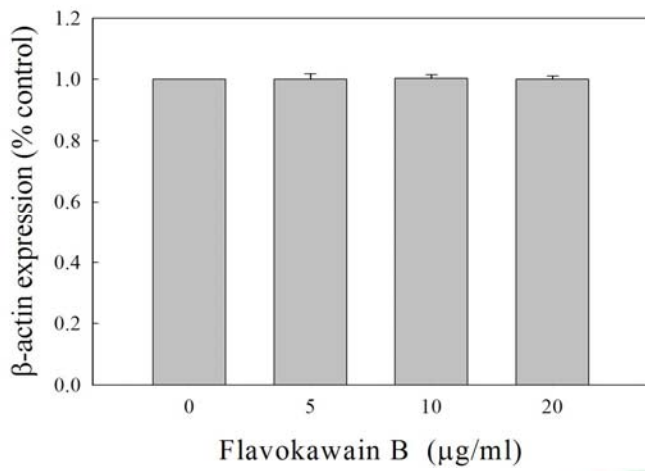
PAI-2



TIMP-1



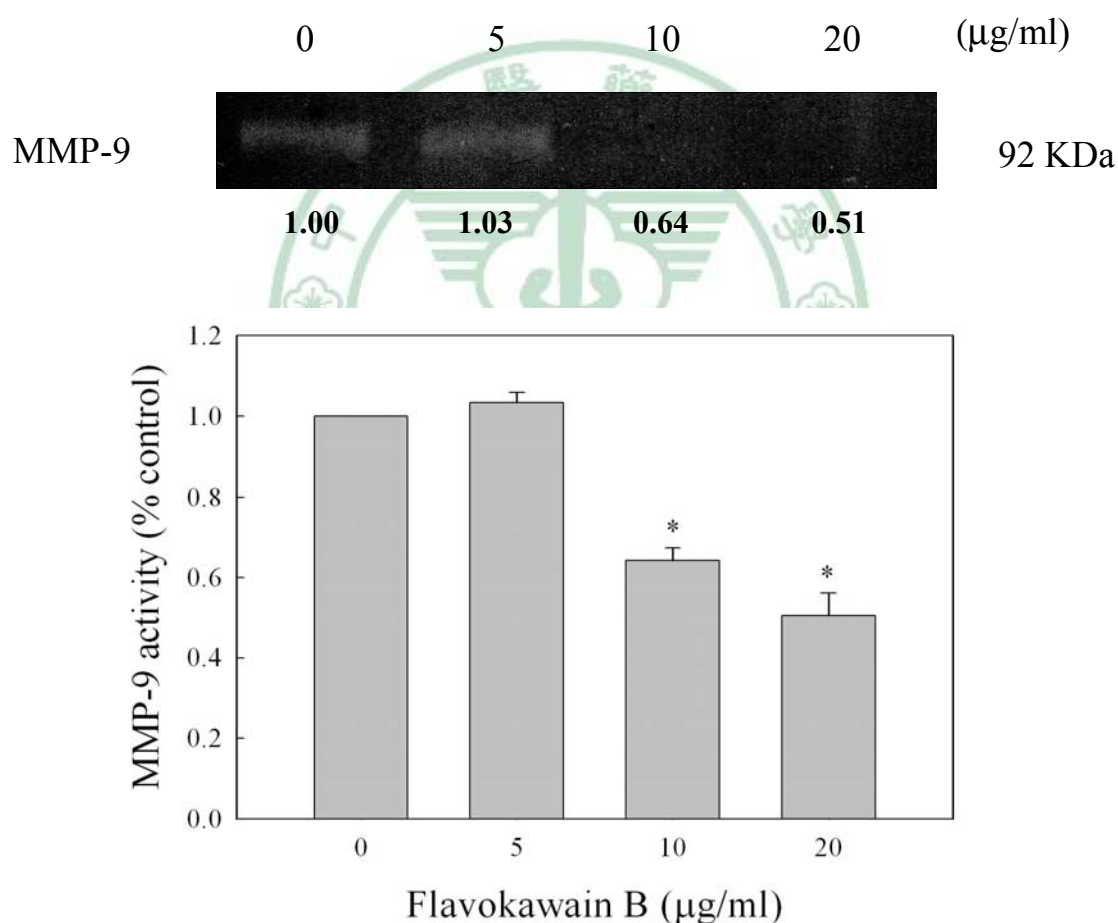
β -actin



圖六十三、利用西方點墨法觀察以0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB處理KB細胞株24小時，調控細胞轉移中的MMP-9、uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2、TIMP-1表現。以 β -actin作為internal control。數據結果以mean \pm SD 值表示，n=3。* $p < 0.05$ v.s. control。

八、酵素活性分析(Zymography)測定 MMP-9 活性

先前的實驗結果顯示 FKB 會抑制細胞轉移相關的蛋白的表現，因此再以酵素活性分析來測定 FKB 是否會抑制 MMP-9 本身的活性，而達到抑制腫瘤轉移的效果。由圖六十四得知 10-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下蛋白表現量均明顯降低，顯示 KB 細胞可能在 FKB 濃度的作用下，藉由抑制 MMP-9 活性的表現，進而達到抑制腫瘤轉移的效果。



圖六十四、利用酵素活性分析法觀察以 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株 24 小時，調控細胞轉移中的 MMP-9 活性。

* $p < 0.05$ v.s. control。

The logo of China Medical University is a circular emblem. It features a central caduceus (a staff with two snakes entwined and wings at the top) superimposed on a stylized human figure. The emblem is surrounded by a circular border containing the university's name in Chinese characters (中國醫藥大學) at the top and 'CHINA MEDICAL UNIVERSITY' at the bottom. There are also small floral motifs on the sides.

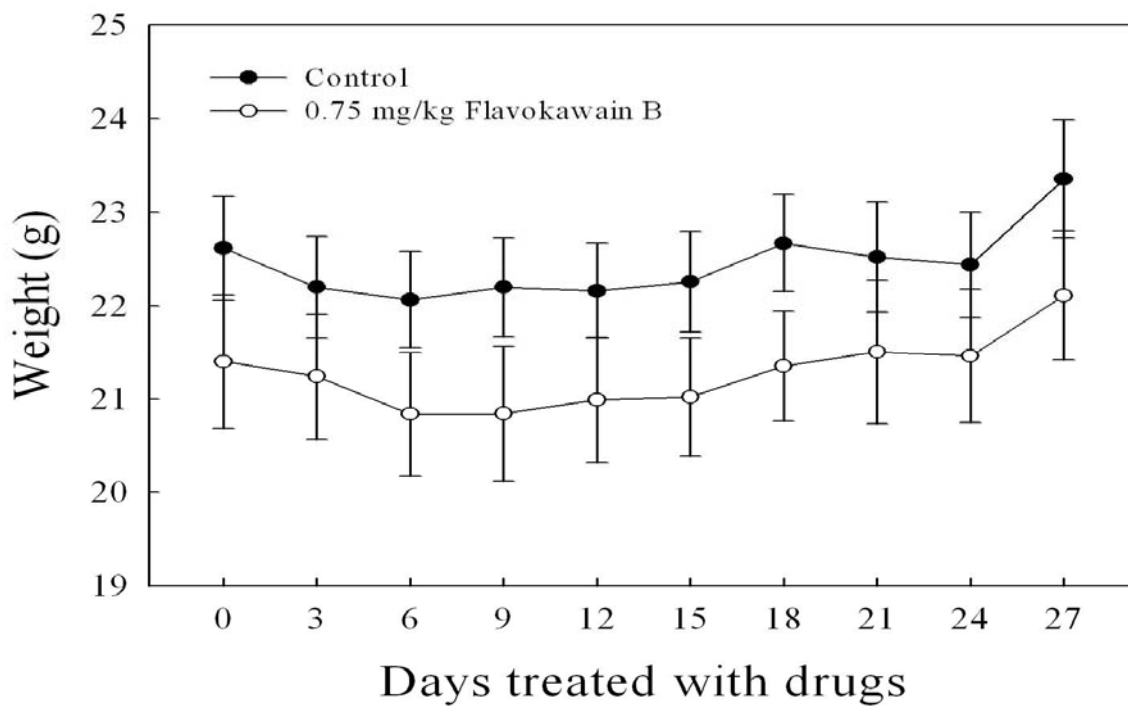
二、動物實驗(*In Vivo*)

一、月桃主成分(FKB) 抑制裸鼠皮下植入人類口腔鱗狀上皮癌(KB)腫瘤的生長

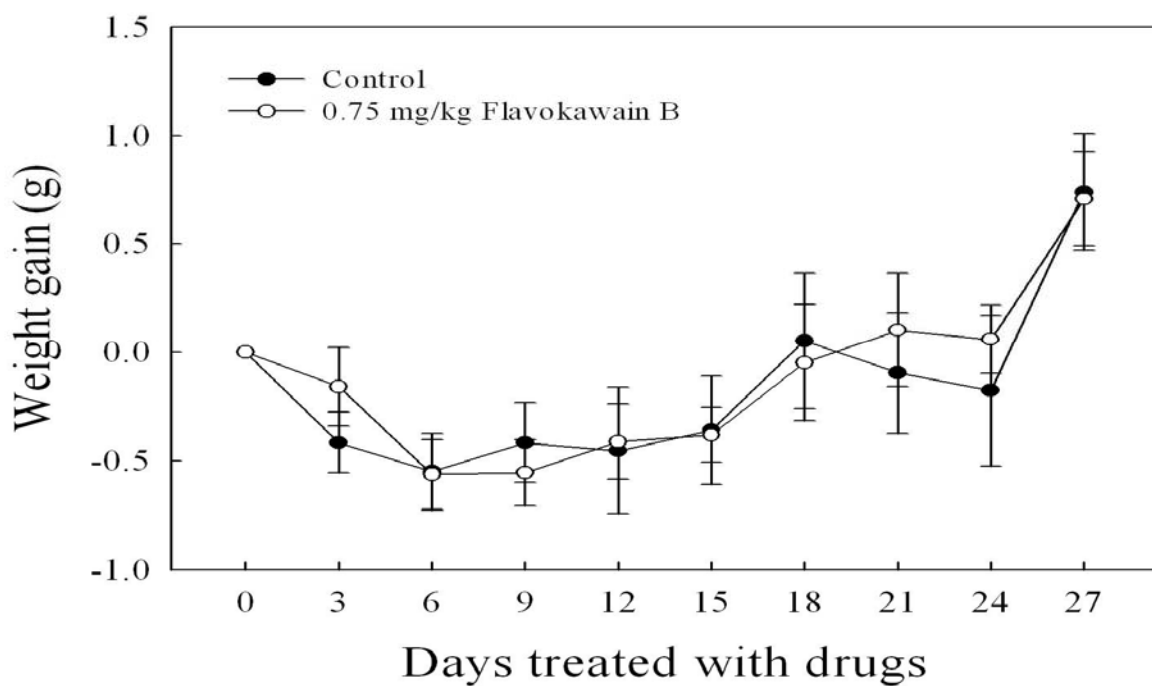
利用裸鼠異位移植腫瘤 (nude mice xenograft tumor model) 模式，以FKB進行抑制人類口腔鱗狀上皮癌(KB)腫瘤的實驗。裸鼠腹腔注射投予FKB作為實驗組(0.75 mg/kg)，而腹腔注射投予PBS作為控制組，實驗進行四週。在體重方面，結果發現實驗組和控制組體重的變化在實驗前及在實驗後並沒有影響(圖六十五、表十二)。測量各裸鼠其腫瘤體積之變化，結果發現FKB組($0.23 \pm 0.07 \text{ cm}^3$)相較於控制組($0.83 \pm 0.11 \text{ cm}^3$)抑制腫瘤有明顯的效果(圖六十六)。

之後將各組KB腫瘤進行包埋，方便日後腫瘤組織病理切片判讀。結果發現控制組裸鼠腫瘤內含有multiple cysts且分泌mucin material (B. 400x)，並內部有細胞分裂與血管形成的情形發生(圖六十七)；FKB組裸鼠腫瘤組織內則呈現有Regressive tumor cells且以不具活性的細胞居多，但內部仍有少量血管形成的情形發生(圖六十八)。

(A)



(B)



圖六十五、FKB 對裸鼠皮下植入 KB 腫瘤觀察抑制結果(A) KB 細胞於裸鼠腫瘤生成期間之體重變化；(B) 裸鼠實驗前及在實驗後之體重變化，數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 值表示， $n=6$ 。

表十二、裸鼠實驗前後體重變化差異，數據結果以 mean ± SE. 值表示，n=6。* p< 0.05 v.s. control。

Group	Pre-experiment		Post-experiment		Weight gain (g)
	n	Weight(g)	n	Weight(g)	
Control	6	22.61 ± 0.55	6	23.35 ± 0.62	0.74 ± 0.26
FKB (0.75 mg/kg)	6	21.39 ± 0.71	6	22.10 ± 0.69	0.70 ± 0.21



(A)

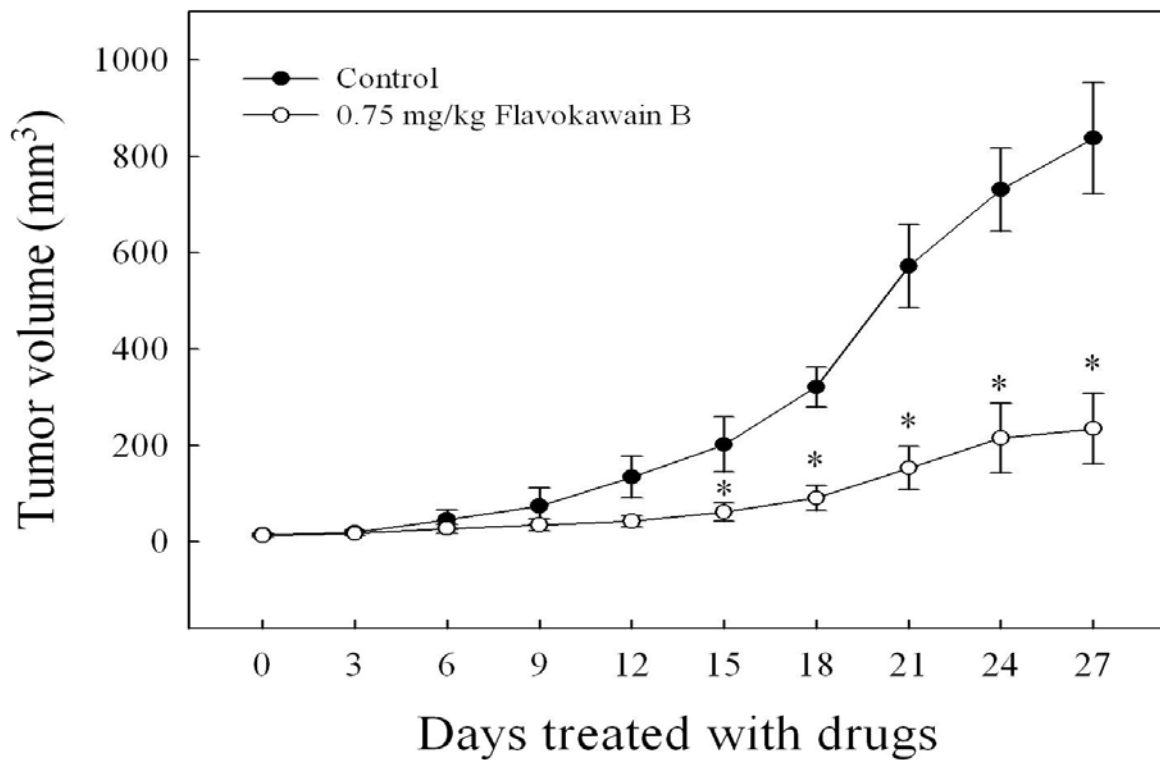
Control 組



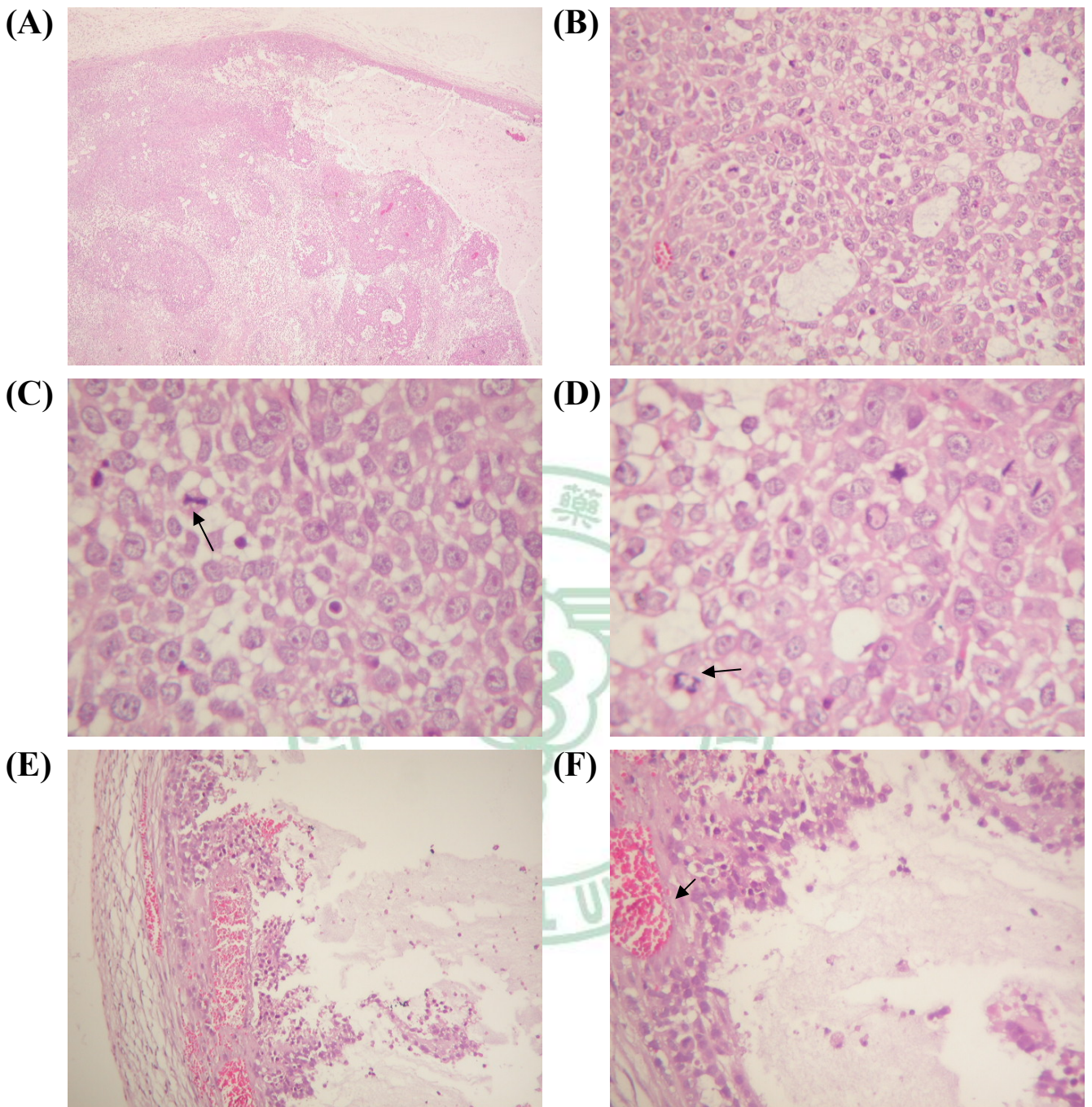
FKB 0.75 mg/kg



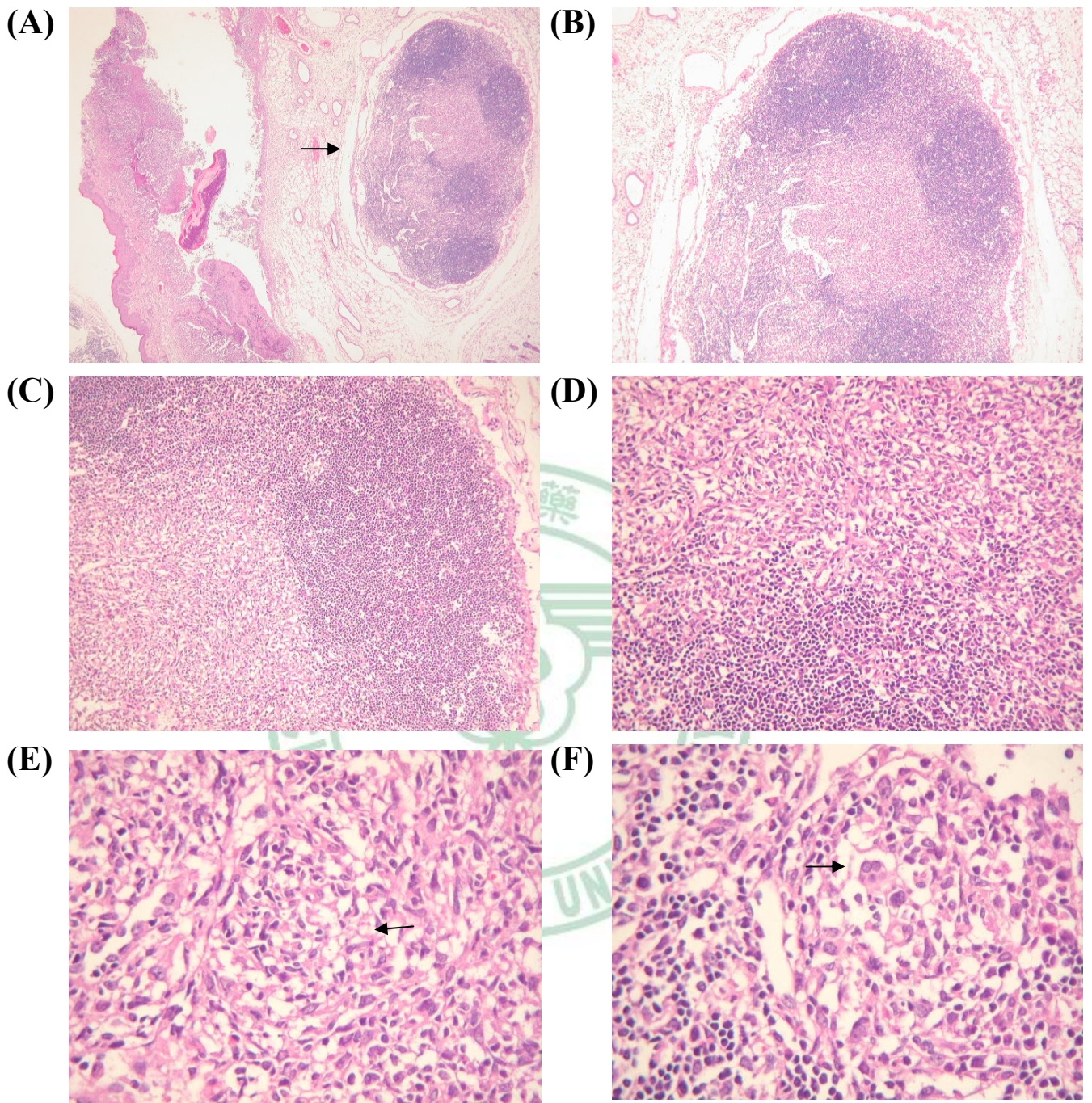
(B)



圖六十六、FKB 對裸鼠皮下植入 KB 腫瘤觀察抑制結果(A) KB 細胞於裸鼠腫瘤生成後腹腔注射 FKB 四週後外觀體積變化;(B) 裸鼠腫瘤體積測量變化，數據結果以 mean ± SE. 值表示，n=6，* p< 0.05。



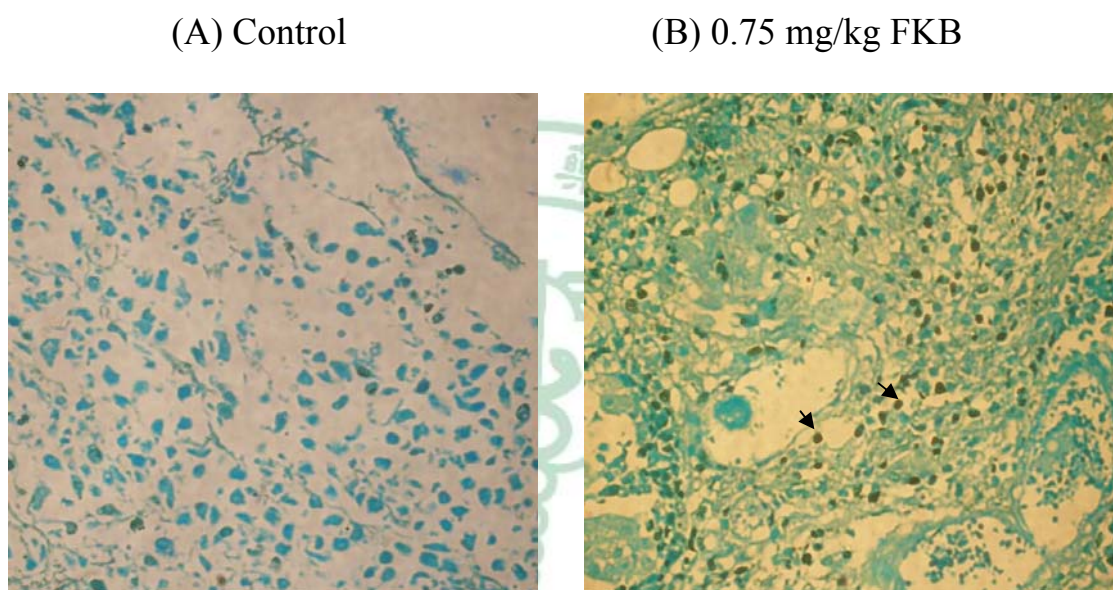
圖六十七、控制組裸鼠腫瘤組織病理切片(H&E stain)。腫瘤內有 multiple cysts (A. 20x)、mucin material (B. 200x)及有絲分裂 (C、D. 400x)情形；內部周圍有血管形成(E. 40x；F. 200x)。



圖六十八、FKB 組裸鼠腫瘤組織病理切片(H&E stain)。腫瘤內有 Regressive tumor cells (A. 20x; B. 40x; C. 100x; D. 200x)；內部有 nuclei condensation (E. 400x; F, 400x)。

二、FKB對裸鼠腫瘤內KB cells產生DNA fragmentation分析

將控制組與FKB組的腫瘤予以切片，之後進行脫蠟、復性等步驟後，利用TUNEL assay kit分析。控制組內的腫瘤細胞幾乎都呈現TUNEL⁻（藍色），而經過FKB反應的腫瘤細胞，有表現出TUNEL⁺，也就是可以明顯看出產生細胞凋亡的棕色細胞之現象（圖六十九）。



圖六十九、控制組與FKB組的腫瘤內部DNA fragmentation的表現。箭頭所指即表示凋亡細胞。

所以給予已植入KB細胞的裸鼠FKB時，可以有效的造成內部腫瘤細胞產生DNA fragmentation的情形。同時也證實在FKB無論在細胞實驗或是動物實驗，均能造成KB細胞產生apoptosis，進而抑制腫瘤細胞的生長。



先前在第一部份已證實薑科普來氏月桃萃取物確實能有效造成 KB 細胞形成 Apoptosis 的現象、細胞週期停滯情形與抑制腫瘤細胞轉移，因此我們在進一步探討普來氏月桃主要成分-Flavokawain B 是否在細胞實驗(*in vitro*)和動物實驗(*in vivo*)也與其萃取物有相同的抗癌功效。

結果由本實驗結果得知 FKB 在對人類正常口腔纖維母細胞無傷害的情況下，約 5-20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下即對 KB 細胞具有細胞毒殺性與抑制生長的效果；且細胞型態呈現變形、萎縮(*cell shrinkage*)的現象。在 DNA fragmentation detection (DNA 片段偵測)中發現在 5 $\mu\text{g/ml}$ FKB 濃度下，就有呈現凋亡(棕色)的現象，在 10-20 $\mu\text{g/ml}$ 則凋亡情形更為明顯。

細胞凋亡訊息調控路徑，目前主要是粒線體傳遞路徑、死亡接受器路徑及內質網路徑，其中經由粒線體而誘發細胞凋亡之路徑常被探討。結果顯示FKB在粒線體傳遞路徑中活化caspase 9，促使下游的Caspase 3活化，繼而造成PARP產生裂解。在死亡接受器傳遞路徑中，當FAS與FAS-L的蛋白表現增加時，會活化下游的caspase 8，活化的caspase 8會將Bid蛋白予以分解形成t-Bid，由細胞質移動到粒線體上，可經由bax進一步促使cytochrome c釋放，進而促使細胞凋亡。由Western blotting結果同時發現FAS、FAS-L蛋白表現增加，進而活化

Caspase 8，最後減少Bid蛋白的表現。因此在此推論FKB會經由死亡接受器路徑促使細胞走向細胞凋亡。此外，FKB也影響粒線體上的bax、bcl-2等蛋白質的表現，進一步促使cytochrome c的釋放，因此bax與cytochrome c蛋白表現量會增加；bcl-2蛋白表現量下降。由於cytochrome c在釋放的同時，原本以電化學位能儲存於粒線體內膜(約 250 mV/5~10 nm)，稱之為 mitochondrial membrane potential (Dym) 開始下降，最後matrix 滲透壓增高，造成粒線體漲大，外膜漲破之後使caspase-inducing factors (cytochrome c) 釋放到細胞質中。在此可以使用親脂性染劑來偵測(如 DiOC6 (3,3-Dihexyloxacarbocyanine iodide))，它會結合到粒線體內膜，在雷射激發光下放出螢光，而偵測細胞凋亡的粒線體膜電位的改變。此時利用流式細胞計數儀評估KB細胞經10 $\mu\text{g/ml}$ FKB反應後，發現隨時間的延長，曲線有左移的趨勢，尤其在反應的第1個小時，粒線體膜電位下降情形最明顯。

粒線體膜電位會之所以下降，其原因之一也可能是細胞受到外來壓力而造成 ROS 的產生，繼而使粒線體滲透性轉換孔洞(permeability transition pore)的打開。為此本實驗利用流式細胞計數儀評估以 10 $\mu\text{g/ml}$ FKB 處理 KB 細胞株，之後加入 H_2DCFDA 染劑，並觀察不同反應時間內其產生活性氧化物的情形。 H_2DCFDA 會與細胞

核、粒線體內膜、細胞質的 ROS 反應，繼而使 cytochrome c 與 DCF 產生結合，形成具有螢光特性的 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF)，藉此偵測到螢光生成量來評估 ROS 的生成。結果發現隨著時間的延長，曲線有右移的趨勢，在 120 分鐘時候就產生大量的 ROS，180 分鐘達到高峰，而後逐漸地下降。顯示 KB 細胞在加入 FKB 之後，造成 ROS 增加、粒線體膜電位下降及 cytochrome c 釋放，最後引起粒線體上一連串的凋亡訊息傳遞。

文獻中指出，細胞會經由調控活化一系列的 Cyclin-CDK (Cyclin-CDK complex) 複合體蛋白來進行細胞的增生，但是當細胞受到損傷時，則會藉由細胞週期檢查點(checkpoint)產生停滯來進行修復的過程，倘若無法進行修復，則細胞會走向凋亡【Smith et al., 1999】。由於腫瘤細胞使負責調節細胞週期蛋白及參與細胞週期檢查點調控失去正常功能，而造成不斷地進行增生。因此可藉由調控腫瘤細胞其細胞週期相關因子的表現，使其週期產生停滯及無法修復的情形，來達到抑制癌細胞生長效果。

利用流式細胞儀評估KB細胞經由FKB處理於不同劑量反應之後，觀察其細胞週期的變化。觀察發現24小時下，在5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下呈現G1/S期之細胞比例有明顯減少，且G2/M 期之細胞比例有增加的情形；隨著反應24小時sub-G1 peak(細胞凋亡趨勢)有隨著濃

度增加而上升。因此推測KB細胞於加入FKB造成其細胞週期G2/M期停滯，並隨著反應濃度增加有呈現細胞凋亡情形。在經FKB處理過的KB細胞發現，FKB可藉由抑制cdc 2、cyclin A、cyclin B、cdc25c蛋白表現使其無法形成Cyclin-CDK complex而阻斷細胞週期的運行，同時也會活化p53、p21和Wee1表現增加來抑制Cyclin-CDK complex活化。綜合上述推測FKB可能藉由抑制細胞週期調控蛋白中Cyclin-CDK複合體的形成，進而影響細胞週期進行。此外亦有文獻指出當p53被活化時，亦會使細胞內的bax蛋白表現增加，進而促進其細胞內的bax/bcl-2 ratio失去平衡，最後造成細胞走向細胞凋亡。因此在本研究中亦證明p53除了會活化下游p21，使KB細胞產生細胞週期停滯之外，也同時造成KB細胞有細胞凋亡的情形發生【Han et al., 2007】。

腫瘤細胞為了要擷取更多的養分來進行生長，會藉由周圍組織轉移其他部位的方式來獲得。而與腫瘤組織轉移相關的基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)主要會受到體內其他因子的調控，這些因子包括活化因子 urokinase-type plasminogen activator (uPA)、urokinase-type plasminogen activator receptor(uPAR)；抑制活化因子tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP 1)、plasminogen activator inhibitor 1/2 (PAI-1/2)。在一般正常情況下，這些調控因子會維持平衡，由於腫瘤細胞此平衡已產生失調的現象，進而促使腫瘤轉移的情況發生。

結果發現，FKB可抑制KB細胞內MMP-9蛋白表現與活性；對於MMP-9的促進因子uPA蛋白表現於5 µg/ml有顯著的抑制作用。在抑制因子方面FKB不僅可增加PAI-1及PAI-2的表現，同時也增加TIMP-1蛋白表現來減少細胞外基質降解。綜合上述結果得知FKB可抑制MMP-9蛋白表現和活性，同時抑制uPA表現來降低MMP-9的活化。FKB也會促使PAI-1/2和TIMP-1蛋白表現增加進而抑制MMP-9活性。推論FKB藉此減少細胞外基質降解，降低腫瘤轉移的情形【Thomas et al., 1999】。

在確認FKB在細胞實驗中確實可以造成KB細胞產生細胞週期停滯與細胞凋亡情形，因此於體內實驗則進行給予FKB腹腔注射方式來治療裸鼠(nude mice)皮下來誘發KB腫瘤生成，結果發現FKB組(0.75 mg/kg)相較於控制組，其抑制腫瘤效果明顯，且在整個實驗過程各組裸鼠犧牲後比較其體重，實驗組與對照組相較之下均沒有影響。

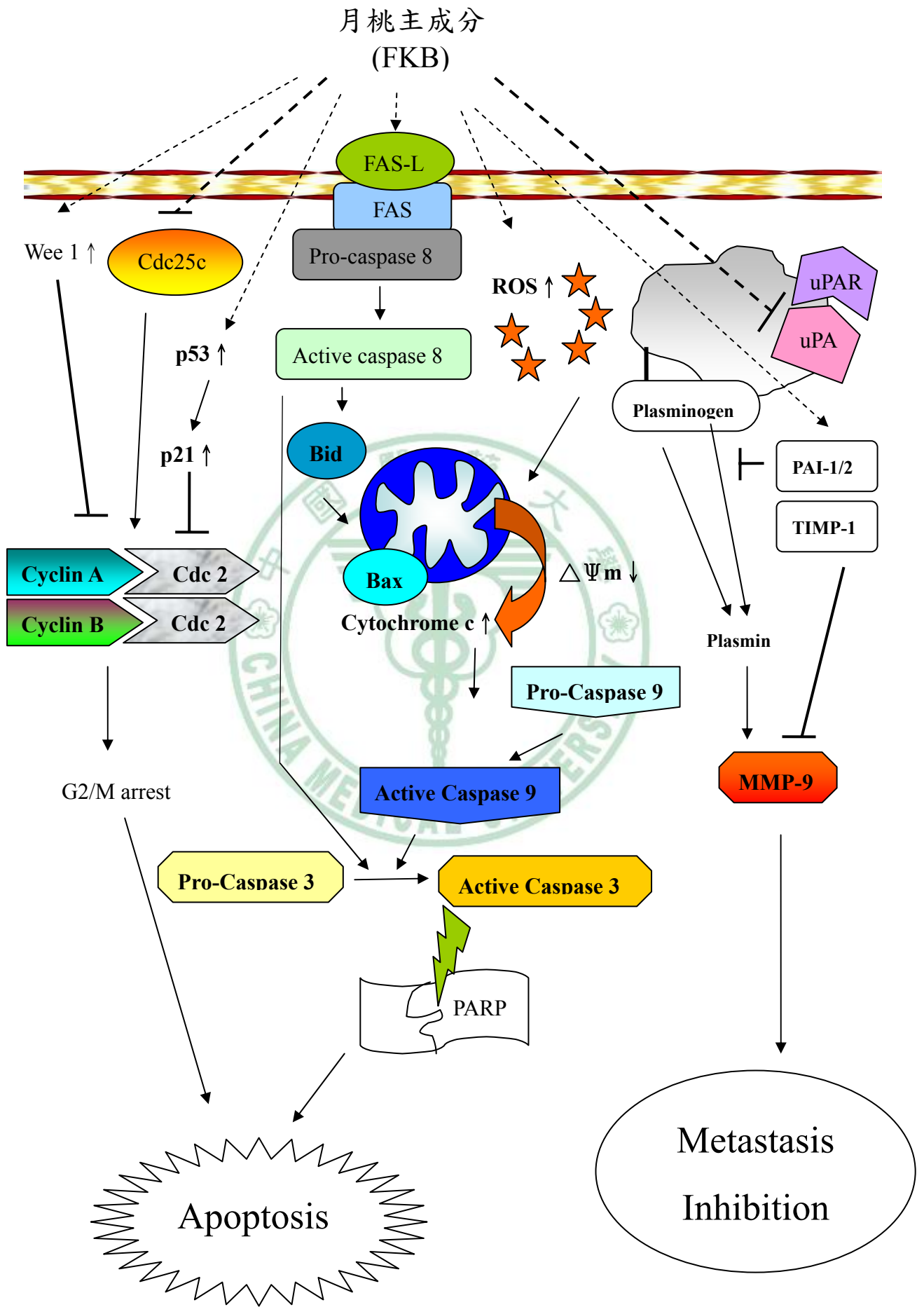
由於先前在細胞實驗中已發現FKB能造成KB細胞產生細胞凋亡，為證實腫瘤組織內是否為細胞凋亡而不是細胞壞死，因此將其腫瘤組織予以切片，利用TUNEL kit中使endogenous endonuclease活化而將DNA切成oligonucleosome，這些斷裂的DNA fragment末端出現3'-OH基，而這3'-OH基即可被terminal deoxynucleotidyl transferase

(TdT)結合，而偵測出凋亡的細胞。在 400 倍之倍率光學顯微鏡觀察腫瘤組織切片。結果如圖六十九所示，在 FKB 組(0.75 mg/kg)中 TUNEL⁺細胞(棕色)的數目有增加的趨勢，即表示 FKB 在動物腫瘤組織內引發細胞凋亡。由此可知，FKB 具有延緩腫瘤的生長速度並引起腫瘤組織內細胞產生 Apoptosis，在未來有機會可以開發成為抗腫瘤的臨床用藥。





綜合以上第二部分的結果，FKB 對 KB 細胞具有產生 Apoptosis 的現象、細胞週期停滯情形與抑制腫瘤細胞轉移。其機制是藉由降低 cdc 2、cyclin A、cyclin B、cdc25c 蛋白表現；增加 p53、p21 和 Wee1 表現使其無法形成 Cyclin-CDK complex，而使細胞停滯在 G2/M 期。同時 FKB 也會造成 KB 細胞內活性氧化物增加，同時造成膜電位下降以及活化死亡接受器路徑中的 caspase 8；bax 與 cytochrome c 蛋白表現增加；bcl-2 蛋白下降，之後活化粒線體路徑中的 caspase 9，最後誘發 KB 細胞走向細胞凋亡。在腫瘤轉移方面 FKB 主要是藉由抑制 MMP-9 表現以及透過抑制 MMP-9 的活化因子如 uPA 與提高抑制因子 PAI-1/2 和 TIMP-1 的表現，減少 MMP-9 的活化避免細胞外基質分解進而達到抑制轉移之作用。動物實驗中也發現，FKB 可抑制 KB 細胞所誘發之腫瘤增生並誘導細胞凋亡。本研究顯示 FKB 對於癌細胞增生及轉移在細胞與動物實驗均有良好的抑制作用，也顯現出 FKB 具有潛力發展成天然的抗腫瘤藥品。





伍、綜合討論

綜合以上第一與第二部分的結果，發現 APE 與 FKB 都對 KB 細胞具有產生 Apoptosis 的現象、細胞週期停滯情形與抑制腫瘤細胞轉移。因此在這將上述兩部分相同與相異處予以統整：

表十二、月桃萃取物與月桃主成分結果比較表

項目	細胞週期(Cell cycle)	
	月桃萃取物(APE)	月桃主成分(FKB)
細胞週期	G2/M arrest	G2/M arrest
Cdc 2	↓	↓
Cyclin A	↓	↓
Cyclin B	↓	↓
Cdc25c	↓	↓
p53	↑	↑
p-p53	↑	—
p21	↑	↑
Wee 1	↑	↑
項目	(細胞凋亡)Apoptosis	
	月桃萃取物(APE)	月桃主成分(FKB)
Cell viability	抑制	抑制
Cell growth	抑制	抑制
膜電位	下降	下降
活性氧化物	上升	上升
Sub-G1 比例	上升	上升
TUNEL	表現增加	表現增加

Caspase 9	表現裂解	表現裂解
Caspase 8	—	表現裂解
FAS	×	↑
FAS-L	×	↑
Bid	×	↓
Pro-caspase3	↓	↓
Cytochrome c	↑	↑
Bax	↑	↑
Bcl-2	↓	↓
PARP	表現裂解	表現裂解
項目	(腫瘤轉移)Metastasis	
	月桃萃取物(APE)	月桃主成分(FKB)
MMP-9 活性	抑制	抑制
MMP-9 蛋白	↓	↓
uPA	↓	↓
uPAR	—	—
PAI-1	↑	↑
PAI-2	↑	↑
TIMP-1	↑	↑
項目	裸鼠異種移植(Xenograft tumor)	
	月桃萃取物(APE)	月桃主成分(FKB)
體重	不影響	不影響
腫瘤	抑制生長	抑制生長
TUNEL	表現增加	表現增加

↑：上升 ↓：下降 —：不變 ×：未做

APE 與 FKB 均會降低 cdc 2、cyclin A、cyclin B、cdc25c 蛋白表現；增加 p53、p21 和 Wee1 表現使其無法形成 Cyclin-CDK complex，而使細胞停滯在 G2/M 期。同時也造成 KB 細胞內活性氧化物增加，造成膜電位下降；bax 與 cytochrome c 蛋白表現增加；bcl-2 蛋白下降進而活化粒線體路徑中的 caspase 9，最後誘發 KB 細胞走向細胞凋亡。但是唯一不同的是 FKB 也亦同時活化死亡接受器路徑上的 FAS、FAS-L、bid、caspase 8，因此 FKB 能在低濃度下就對 KB 細胞產生傷害並使其走向細胞凋亡。

另外在抑制腫瘤轉移方面，APE 與 FKB 都是藉由抑制 MMP-9 活性與蛋白表現以及透過抑制 MMP-9 的活化因子如 uPA 與提高抑制因子 PAI-1/2 和 TIMP-1 的表現，減少 MMP-9 的活化避免細胞外基質分解進而達到抑制轉移之作用。而在動物實驗中也發現，APE 與 FKB 均可抑制 KB 細胞所誘發之腫瘤增生並誘導細胞凋亡。

從實驗結果得知 APE 有效實驗濃度與 FKB 相差 10 倍，且 FKB 部份結果與 APE 相異，推測可能是 APE 本身為粗萃取物，其作用的功能可能不止僅限於抑制 KB 細胞生長，亦可能包含其他功效(如鎮靜安眠效果)；相較於 FKB 則是普來氏月桃主要的成分之一，只需要較少的濃度就有明顯的抗腫瘤的效果，而原本較不明顯的凋亡路徑也因為單一成分而顯現出來，表示 FKB 確實為普來氏月桃中最主要抗腫瘤的成分。因此本研究顯示台灣薑科普來氏月桃及其主成分對於癌細胞增生及轉移在細胞與動物實驗均有良好的抑制作用，也顯現出普來氏月桃具有潛力發展成天然的抗腫瘤藥品。



陸、參考文獻

- Abraham A., Macnicol M.F. Growth arrest lines and recurrent patellar dislocation: a new sign. *Knee*. 8: 163-165. 2001.
- An N., Zou Z.M., Tian Z., Luo X.Z., Yang S.L., Xu L.Z. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Alpinia officinarum* and their anticancer activity. *Fitoterapia*. 79: 27-31. 2008.
- Baker E.A., Leaper D.J., Hayter J.P., Dickenson A.J. Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 45(8): 623-627. 2007.
- Bellosillo B., Dalmau M., Colomer D., Gil J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 89(9): 3378-3384. 1997.
- Biel M.A. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochemistry and photobiology*. 83: 1063-1068. 2007.
- Birnbaum M.J., Clem R.J. Miller L.K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of virology*. 68: 2521-2528. 1994.
- Bredensen D.E. Keeping neurons alive: The molecular control of apoptosis (Part 1). *The Neuroscientist* 2: 181-190. 1996 a .
- Bredensen D.E. Keeping neurons alive: The molecular control of apoptosis (Part II). *The Neuroscientist* 2: 211-216. 1996 b.
- Cain K. Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug metabolism reviews*. 35(4): 337-363. 2003.
- Chang K.C., Su I.J., Tsai S.T., Shieh D.B., Jin Y.T. Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesions in Taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association. *Oncology*. 63(4): 362-369. 2002.

- Chang M.C., Chan C.P., Wang Y.J., Lee P.H., Chen L.I., Tsai Y.L., Lin B.R., Wang Y.L., Jeng J.H. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicology and applied pharmacology*. 218(2): 143-151. 2007.
- Chen P.C., Kuo C., Pan C.C., Chou M.Y. Risk of oral cancer associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan--an integrated molecular and epidemiological study of 58 cases. *Journal of oral pathology and medicine*. 31(6): 317-322. 2002.
- Chevrollier A., Loiseau D., Stepien G. What is the specific role of ANT2 in cancer cells? *Médecine sciences*: 21(2): 156-161. 2005.
- Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of immunological methods*. 265(1-2): 49-72. 2002.
- De Araújo P.F., Coelho-de-Souza A.N., Morais S.M., Ferreira S.C., Leal-Cardoso J.H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine*. 12: 482-486, 2005.
- De Moura R.S., Emiliano A.F., De Carvalho L.C., Souza M.A., Guedes D. C., Tano T., Resende A.C. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *Journal of cardiovascular pharmacology* 46: 288-294. 2005.
- Deng W.J., Zeng Z.L., Liang Y.J., Dai C.L., Zhang J.Y., Fu L.W. Detecting Doxorubicin Concentration in KBv200 and KB Cell Xenografts in Nude Mice by High-Performance Liquid Chromatography. *Chinese journal of cancer*. 27(4): 364-368. 2008.

- Deveraux Q.L. Reed J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development* 13: 239-252. 1999.
- Ding Y., He L.R., Cao K.J., Lu Y., Gu L.Q., Fu L.W. Apoptosis of human carcinoma of mouth floor KB cells and multidrug resistant KBv200 cells induced by azide methyl anthraquinone derivative. *Acta pharmaceutica Sinica*. 40(1): 22-26. 2005.
- Driemel O., Kunkel M., Hullmann M., von Eggeling F., Müller-Richter U., Kosmehl H., Reichert T.E. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 12: 1095-1100. 2007.
- Ekedahl J., Joseph B., Grigoriev M.Y., Muller M., Magnusson C., Lewensohn R. Zhivotovsky B. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in small- and non-small-cell lung carcinoma cells. *Experimental cell research*. 279: 277-290. 2002.
- Eskes R., Desagher S., Antonsson B., Martinou J.C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and cellular biology*. 20(3): 929-935. 2000.
- Fu M., Wang C., Li Z., Sakamaki T., Pestell R.G. Minireview: Cyclin D1 normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 145: 5439-5447. 2004.
- Brooks G, Poolman R.A., Li J.M. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle : Role of Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovascular Research*. 39: 301-311. 1998.
- Grier C.K., Mayer M.N. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. *The Canadian veterinary journal*. 11: 1189-1191. 2007.

- Han H., Pan Q., Zhang B., Li J., Deng X., Lian Z., Li N. 4-NQO induces apoptosis via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicology*. 12; 230(2-3): 151-163. 2007.
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T.C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell*. 1: 3-11. 1997.
- Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Current opinion in cell biology*. 6: 74-81. 1994.
- Hisahara S., Takano R., Shoji S., Okano H., Miura M. Role of caspase-1 subfamily in cytotoxic cytokine-induced oligodendrocyte cell death. *Journal of neural transmission*. 58: 135-142. 2000.
- Ho P.K., Hawkins C.J. Mammalian initiator apoptotic caspases. *The FEBS journal*. 272(21): 5436-5453. 2005.
- Hwang I.Y., Son Y.O., Kim J.H., Jeon Y.M., Kim J.G., Lee C.B., Park J.S., Lee J.C. Plasma-arc generated light inhibits proliferation and induces apoptosis of human gingival fibroblasts in a dose-dependent manner. *Dental materials*. 24(8):1036-1042. 2008.
- Kawabe T., Suganuma M., Ando T., Kimura M., Hori H., Okamoto T. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene*. 21: 1717-1726. 2002.
- Kerr J.F., Winterford C.M. Harmon B.V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 73: 2013-2026. 1994.

- Kim C.S., Cho S.H., Chun H.S., Lee S.Y., Endou H., Kanai Y., Kim do K. BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 31(6): 1096-1100. 2008.
- Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical biochemistry*. 218 : 325-329. 1994.
- Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275(5303): 1132-1136. 1997
- Knudsen E.S., Buckmaster C., Chen T.T., Feramisco J.R. Wang J.Y. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes & development*. 12: 2278-2292. 1998.
- Ko S.H., Choi G.J., Lee J.H., Han Y.A., Lim S.J., Kim S.H. Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inhibiting proliferation and induction of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 19(2): 425-433. 2008.
- Ko Y.C., Huang Y.L., Lee C.H., Chen M.J., Lin L.M., Tsai C.C. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *Journal of oral pathology & medicine* 24: 450-453. 1995.
- Kress W.J., Prince L.M., Williams K.J. The phylogeny and A new classification of the Gingers (Zingiberaceae): Evidence form molecular data. *American journal of botany*. 89: 1682-1696, 2002.

- Kvaal S.I., Warloe T. Photodynamic treatment of oral lesions. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*. 26: 127-133. 2007.
- Lee Y.T., Don M.J., Hung P.S., Shen Y.C., Lo Y.S., Chang K.W., Chen C.F., Ho L.K. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer letters*. 223(1): 19-25. 2005.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91(4): 479-89. 1997.
- Lin L.M., Heideman K.A., Toto P.D. Tumor induction through varying lengths of carcinogen exposure. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2: 394-400. 1986.
- Long M.W. Cyclins and cell division kinases in megakaryocytic endomitosis. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*. 318(6): 649-654. 1995.
- Lu Y.H., Lin T., Wang Z.T., Wei D.Z., Xiang H.B. Mechanism and inhibitory effect of galangin and its flavonoid mixture from *Alpinia officinarum* on mushroom tyrosinase and B16 murine melanoma cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 22: 433-438. 2007.
- Ly T.N., Shimoyamada M., Kato K., Yamauchi R. Antioxidative compounds isolated from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance). *Biofactors*. 21: 305-308. 2004.

- Matsuoka M., Tani K. Asano S. Interferon-alpha-induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19^{Ink4D} and p21^{Cip1} in mouse macrophages. *Oncogene*. 16: 2075-2086. 1998.
- McEleny K.R., Watson R.W., Coffey R.N., O'Neill A.J. Fitzpatrick J.M. Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines. *The Prostate*. 51. 133-140. 2002.
- Melnikova V., Bar-Eli M. Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor. *Cancer metastasis reviews*. 26(3-4): 359-371. 2007.
- Monteiro R., Calhau C., Silva A.O., Pinheiro-Silva S., Guerreiro S., Gärtner F., Azevedo I., Soares R. Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. *Journal of cellular biochemistry*. Mar 17 2008 [Epub ahead of print]
- Montes D.M., Schmidt B.L. Oral maxillary squamous cell carcinoma: management of the clinically negative neck. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2008 Apr; 66(4): 762-6. Review.
- Musacchio A., Hardwick K.G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 731-741. 2002
- Muşat M., Vax V.V., Borboli N., Gueorguiev M., Bonner S., Korbonits M., Grossman A.B. Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Frontiers of hormone research*. 32: 34-62. 2004.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403(6765): 98-103. 2000.

- Norajit K., Laohakunjit N., Kerdchoechuen O. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. *Molecules*. 23: 2047-2060. 2007.
- Oliver R.J., Clarkson J.E., Conway D.I., Glenny A., Macluskey M., Pavitt S., Sloan P., CSROC Expert Panel, Worthington H.V. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. *Cochrane database of systematic reviews*. 4: CD006205. 2007.
- Osborne C.K., Coronado-Heinsohn E.B., Robinson J.P. Human breast cancer in the athymic nude mouse: cytostatic effects of long term anti-oestrogen therapy. *European journal of cancer & clinical oncology*. 23: 1189-1196. 1987.
- Pan C., Yan M., Yao J., Xu J., Long Z., Huang H., Liu Q. Aurora kinase small molecule inhibitor destroys mitotic spindle, suppresses cell growth, and induces apoptosis in oral squamous cancer cells. *Oral oncology*. 44(7): 639-645. 2008.
- Primeau A.J., Adhietty P.J. Hood D.A. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Canadian journal of applied physiology*. 27: 349-395. 2002
- Proia N.K., Paszkiewicz G.M., Nasca M.A., Franke G.E., Pauly J.L. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Preview*. 15(6): 1061-1077. 2006.
- Reed J.C. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Current opinion in oncology*. 7: 541-546. 1995.
- Reed J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*. 387: 773-776. 1997.

- Robertson M.J., Manley T.J., Pichert G., Cameron C., Cochran K.J., Levine H., Ritz J. Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leukemia & lymphoma*. 17: 51-61. 1995.
- Salvesen G.S. Dixit V.M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 10964-10967. 1999.
- Sanchez A., Alvarez A.M., Benito M., Fabregat I. Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 26: 935-943. 1997.
- Schwartz D., Rotter V. p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Seminars in cancer biology*. 8: 325-336. 1998.
- Schwartzman R.A. Cidlowski J.A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews*. 14: 133-151. 1993.
- Selim H., Selim A., Khachemoune A., Metwally S.A. Use of sclerosing agent in the management of oral and perioral hemangiomas: review and case reports. *Medical science monitor*. 13: CS114-119. 2007.
- Sherr C.J., Roberts J.M. CDK inhibitors: positive and negativeregulators of G1-phase progression. *Genes & Development*. 13: 1501-1512. 1999.
- Stewart Z.A., Pietenpol J.A. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chemical Research in Toxicology*. 14: 243-263. 2001.
- Singh R.P., Agarwal R. Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. *Current drug targets*. 7(3): 345-354. 2006.

- Smith M.L., Fornace AJ Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Research*. 340: 109-124. 1996. Review
- Snehal G.P., Jatin P. TNM Staging of Cancers of the Head and Neck: Striving for Uniformity Among Diversity. *CA: a cancer journal for clinicians*. 55: 242-258. 2005.
- Susin S.A., Zamzami N. Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochimica et biophysica acta*. 1366: 151-165. 1998.
- Terhaard C.H. Postoperative and primary radiotherapy for salivary gland carcinomas: indications, techniques, and results. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 69: S52-5. 2007.
- Thomas G.T., Lewis M.P., Speight P.M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral oncology*. 35(3): 227-233. 1999.
- Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267: 1456-1462. 1995.
- Tsai C.H., Hsieh Y.S., Yang S.F., Chou M.Y., Chang Y.C. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 95(6): 710-716. 2003.
- van Weerden W.M., Romijn J.C. Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. *The Prostate*. 43(4): 263-271. 2000.

- Verstappen J., Von den Hoff J.W. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *Journal of dental research*. 85(12): 1074-84. 2006.
- Wang X.H., Jia D.Z., Liang Y.J., Yan S.L., Ding Y., Chen L.M., Shi Z., Zeng M.S., Liu G.F., Fu L.W. Lgf-YL-9 induces apoptosis in human epidermoid carcinoma KB cells and multidrug resistant KBv200 cells via reactive oxygenspecies-independent mitochondrial pathway. *Cancer letters* 249(2): 256-270. 2007.
- Wang Y. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. *Medicinal research reviews*. 2: 146-70. 2001.
- Wright C.W. Duckett C.S. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *The Journal of clinical investigation*. 115: 2673-2678. 2005.
- Xia Z., Lundgren B., Bergstrand A., DePierre J.W., Nässberger L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochemical pharmacology*. 57(10): 1199-1208. 1999.
- Xiao D., Zeng Y., Choi S., Lew K.L., Nelson J.B., Singh S.V. Caspase-dependent apoptosis induction by phenethyl isothiocyanate, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent, is mediated by Bak and Bax. *Clinical cancer research*. 11(7): 2670-2679. 2005.

- Yan Y. H., Lin L. M., Huang Y. L. Growth of hamster cheek pouch tumor induced by DMBA inhibited under cold environmental stress. *The Chinese journal of dental research*. 8: 162-169. 1989
- Yokozaki H., Tahara E. An overview of research on p53 tumor suppressor gene. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*. 24: 2181-2186. 1997.
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspases-3. *Cell*. 90: 405-413. 1997
- Zhang J., Li Y. Shen B. Up-regulation of XIAP by M-CSF is associated with resistance of myeloid leukemia cells to apoptosis. *Leukemia*. 16: 2163-2165. 2002.
- 楊正仲、王震哲. 台灣產薑科月桃屬(*Alpinia* Roxb.)之系統分類. 海峽兩岸植物多樣性與保育. 183-197, 1998.
- 郭育姝、呂福原、杜明原、鄧書麟. 民族植物月桃之藥用潛力. 行政院農業委員會特有生物研究保育中心自然保育期刊. 第50期: 28-31, 2006.
- 郭城孟. 台灣維管束植物-植物簡誌. 行政院農業委員會. 第五卷: 202-206, 1997.
- 吳維修. 台北植物園植株數位化計畫. 行政院農業委員會林業試驗所. GR2Q4622, 2006.
- 李國慶、楊強華. 口腔內科學原理與實用. 451-455. 1987.
- 王道. 口腔病理學要論. 516-526. 1984.

江俊斌、劉步遠、關學婉. 頰黏膜癌之臨床和病理研究. 中華民國口腔
顎面外科學會雜誌. 3: 11. 1991.

陳中和. 口腔頰黏膜鱗狀上皮細胞癌之臨床研究. 中華民國口腔顎面外
科學會雜誌. 3: 271. 1991.

賴德榮、陳鴻榮. 細胞學在口腔癌之診斷價值. 高雄醫學科學雜誌. 2:
122-130. 1986.

邱顯斌、謝地. 用甲苯氨藍染口腔的病變. 中華民國耳鼻喉科醫學會雜
誌. 20: 168-173. 1985.

邱重榕、陳建仁. 口腔黏膜下纖維化之流行病學. 台灣衛誌 20(2):84-92.
2001.

