

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

蜂肽誘導人類乳癌細胞株 MCF-7 凋亡之研究

Bee venom induce human breast cancer cell line MCF-7 apoptosis

指導老師：葉兆雲 副教授

鍾景光 教授

Adviser : Siu-Wan Ip, Ph.D.

Jing-Gung Chung, Ph.D.

研究生：廖士欣 撰

Graduate Student : Shih-Shin Liao

中華民國九十六年七月

July , 2007

目錄

目錄	i
表目錄	iv
圖目錄	v
中文摘要	vii
英文摘要	viii
第一章 前言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 人類乳癌	3
第二節 人類乳癌細胞株(MCF-7)	5
第三節 蜂肽(Bee venom)	5
一、蜂肽來源	5
二、蜂肽組成與特性	5
三、蜂肽抗癌機轉	8
第四節 細胞凋亡	9
一、細胞凋亡	9
二、細胞凋亡的特徵	9
三、細胞凋亡的機轉	10
第五節 細胞週期調控	11
一、細胞週期	11
二、細胞週期調控蛋白	12
第六節、活性氧成分(Reactive oxygenase ; ROS)與抗氧化酵素	14
一、活性氧成分(ROS)	14
二、抗氧化防禦系統	14
三、ROS 與細胞凋亡	14
第三章 研究架構	17

第四章 材料與方法	18
第一節 實驗材料	18
一、細胞株來源	18
二、藥品與試劑	18
三、儀器設備、器材	21
第二節 實驗方法	22
一、藥品配製	22
二、細胞培養	23
三、細胞型態的觀察-利用倒立式相位差顯微鏡觀察	24
四、細胞存活率的測定	24
五、細胞週期測定	26
六、粒線體膜電位測定	26
七、活性氧成分測定	27
八、DAPI 染色	28
九、彗星試驗	29
十、西方墨點法	32
第三節、統計分析	37
第五章 結果	38
第一節、蜂肽 (Bee venom) 對 MCF-7 形態的影響	38
第二節、蜂肽(Bee venom)抑制 MCF-7 增生的效果	38
第三節、蜂肽(Bee venom)對人類乳癌細胞株 MCF-7 之細胞週期影響	39
第四節、利用流式細胞儀來偵測蜂(Bee venom)肽對 MCF-7 的影響	40
一. 活性氧成分(Reactive oxygen species ; ROS)產生的影響	40
二. 粒線體膜電位的影響	40
第五節 蜂肽(Bee venom)是否會造成 MCF-7 之 DNA 損傷	40
一. DAPI staining	41

二. Comet assay.....	41
第六節 利用西方墨點法來探討蜂肽(Bee venom)對 MCF-7 的抗氧化酵素蛋白表現.....	41
第七節 利用西方墨點法來探討蜂肽(Bee venom)對 MCF-7 的調控細胞週期蛋白表現.....	41
第八節 利用西方墨點法來探討蜂肽(Bee venom)對 MCF-7 凋亡相關蛋白表現.....	42
一、 粒腺體途徑.....	42
二、 死亡接受體途徑.....	42
第六章 討論.....	61
第七章 結論.....	64
第八章 參考文獻.....	66



表目錄

表 1-1 中華民國九十五年癌症死因排名	2
表 2-1 蜂肽組成與特性	7
表 4-1 一級抗體	20
表 4-2 不同濃度蜂肽的配製	22
表 4-3 a,b,c 彗星試驗的試劑配製	31
表 4-4 蛋白表準品配製	33
表 4-5 SDS-PAGE 下層膠(separation gel)配製	33
表 4-6 SDS-PAGE 上層膠(stackin del)配製	34
表 4-7 Running buffer(1.5 M Tris-HCl, pH8.8)配製	34
表 4-8 Stacking buffer(0.5 M Tris-HCl, pH6.8)配製	34
表 4-9 電泳緩衝液配製	35
表 4-10 轉漬緩衝液配製	36



圖目錄

圖 2-1 人類乳癌細胞株(MCF-7)形態	5
圖 2-2 細胞週期調控蛋白	15
圖 2-3 細胞內抗氧化防禦系統	16
圖 4-1 MTT 形成 Formazan 反應機制	25
圖 4-2 轉漬夾內部組成	36
圖 5-1 以不同濃度之蜂肽培養 MCF-7 細胞 48 小時細胞形態的變化	43
圖 5-2 以 7.5 μ g/ml 之蜂肽培養 MCF-7 細胞 72 小時細胞型態的變化	44
圖 5-3 不同濃度之蜂肽培養 MCF-7 細胞 24 小時之增生影響	45
圖 5-4 不同濃度之蜂肽培養 MCF-7 細胞 48 小時之增生影響	46
圖 5-5 不同濃度之蜂肽對 MCF-7 細胞細胞週期的分佈影響-24 小時	47
圖 5-6 不同濃度之蜂肽對 MCF-7 細胞細胞週期的分佈影響-24 小時(統計圖)	48
圖 5-7 相同濃度之蜂肽培養 MCF-7 細胞不同時間細胞週期分佈的影響	49
圖 5-8 相同濃度之蜂肽培養 MCF-7 細胞不同時間細胞週期分佈的影響(統計圖)	50
圖 5-9 蜂肽(7.5 μ g/ml)對 MCF-7 細胞之 ROS 產生之影響	51
圖 5-10 蜂肽(7.5 μ g/ml)對 MCF-7 細胞之 MMP 之影響	52
圖 5-11 蜂肽 (7.5 μ g/ml)對 MCF-7 細胞在不同時間的 DNA damage-DAPI staining	53
圖 5-12 不同濃度之蜂肽對 MCF-7 細胞的 DNA damage-Comet assay	54
圖 5-13 以西方墨點法分析 MCF-7 經蜂肽(7.5 μ g/ml)培養後細胞中 GST、SOD(Mn)、SOD(Cu/Zn)、catalase 等蛋白的相對表現量	55
圖 5-14 以西方墨點法分析 MCF-7 經蜂肽(7.5 μ g/ml)培養後細胞中 p53、p27、Cdk2、p21、p16 等蛋白的相對表現量	56
圖 5-15 以西方墨點法分析 MCF-7 經蜂肽(7.5 μ g/ml)培養後細胞中 Bax、Bcl-2、Bcl-xl 等蛋白的相對表現量	57
圖 5-16 以西方墨點法分析 MCF-7 經蜂肽(7.5 μ g/ml)培養後細胞中 cytochrome c、AIF、Endo G 等蛋白的相對表現量	58
圖 5-17 以西方墨點法分析 MCF-7 經蜂肽(7.5 μ g/ml)培養後細胞中	

Apaf、Pro-caspase-9、caspase-3、Pro-PARP 等蛋白的相對表 現量.....	59
圖 5-18 以西方墨點法分析 MCF-7 經蜂肽(7.5μg/ml)培養後細胞中 Fas、Pro-caspase-8、Bid 等蛋白的相對表現量.....	60
圖 7-1 蜂肽誘導 MCF-7 細胞凋亡可能路徑圖.....	65



中文摘要

Apis Mellifera 品種的蜂肽(Bee venom)是一種具有多種藥理與生物活性的複合物質。在一些研究中証實，蜂肽可以減輕疼痛減少過敏反應。蜂肽已經被證實，可以抑制一些癌細胞增生與誘導凋亡，然而蜂肽在誘導乳癌細胞凋亡的機制清楚。在本研究發現，*Apis Mellifera* 品種的蜂肽能抑制乳癌細胞株(MCF-7)生長，具有濃度與時間效應。透過流式細胞儀的分析，*Apis Mellifera* 品種的蜂肽在 1 小時就會使 MCF-7 活性氧成份(Reactive oxygen species)釋出，並降低粒線體膜電位。經由 DAPI 染色法證實，*Apis Mellifera* 品種的蜂肽可以會造成 MCF-7 的細胞凋亡，經由彗星試驗證實，*Apis Mellifera* 品種的蜂肽可以會造成 MCF-7 的 DNA 損傷。經由西方墨點證實，*Apis Mellifera* 品種的蜂肽可以活化 Bax 而抑制 Bcl-2、Bcl-xL 的表現，使粒腺體膜電位下降，從粒腺體釋放出 cytochrome c，活化 caspase-9 並與 Apaf-1 結合，進而活化 caspase-3，使 MCF-7 產生凋亡；*Apis Mellifera* 品種的蜂肽也會增加 Fas 的表現而活化 caspase-8，進而活化 Bid，促使 caspase-3 活化。

關鍵字：蜂肽、細胞凋亡、粒腺體膜電位、活性氧成分

Abstract

Bee venom(BV) of *Apis Mellifera*(A.M.) an complex compound with pharmacology and biological activities. In some study has been confirmed that BV can alleviate pain and reduce allergy. Although, BV has been confirmed that inhibit proliferation and induce apoptosis in some cancer cell. However, the molecular mechanisms involved in BV-induced apoptosis are still unclear in human breast cancer cells. In this study, we find that BV inhibited proliferation of human breast cancer cell line (MCF-7) in the concentration-dependent and dose-dependent. The result of Flow cytometry demonstrated that BV decreased mitochondrial membrane potential(MMP) by releasing reactive oxygen species(ROS) in one hour. Apoptosis was also confirmed by DAPI staining of MCF-7 cells after exposed to different time of BV. Based on the results from Comet assay, it was also indicated that BV induced DNA damage in MCF-7 cells. Based on the result from western blotting, BV can reduce expression of Bcl-2 and Bcl-xL through Bax activation, and reduced MMP lead cytochrome c releasing from mitochondria, increase expression of caspase 9, Apaf-1 and caspase 3. BV also increase expression of Fas, caspase 8 and tBid.

Key words : Bee venom, Apoptosis, Mitochondrial membrane potential, Reactive oxygen species

第一章 前言

根據行政院衛生署的統計資料顯示，自民國 71 年來，癌症就一直是我國國人主要的死亡原因，民國 95 年的國人的癌症死因排行榜中，女性乳癌為癌症死因第四名。隨著國人飲食西化，攝取過多的動物脂肪則會增加乳癌的罹患率，其生理機制為動情激素(estrogen)促使乳房細胞增生進而癌化。

乳癌好發生在停經後婦女，一般是從 25 至 30 歲開始，40 歲較多，50 歲快速增加，但是老年以後增加的速度就變得緩慢，約只有停經前的 1/6。

蜂肽(Bee venom)，是一種具有多種藥理與生物活性的複合物質，。在一些研究中証實，蜂肽可以減輕疼痛減少過敏反應。蜂肽已經被證實可以抑制一些癌細胞增生與誘導凋亡。在 2003 年，克羅埃西亞的學者研究發現，乳癌的老鼠經由靜脈注射蜂肽增加老鼠的存活機率。但是蜂肽如何對抗乳房腫瘤的分子機轉並不清楚，所以本實驗想探討蜂肽如何抑制乳癌細胞株(MCF-7)增生與誘導MCF-7凋亡的分子機轉。

國人主要癌症死亡原因

民國九十五年

順位	合計				男				女			
	ICD-9 癌症死亡原因	死亡 人數	每十萬 人口 死亡率	死亡 百分比	ICD-9 癌症死亡原因	死亡 人數	每十萬 男性人口 死亡率	死亡 百分比	ICD-9 癌症死亡原因	死亡 人數	每十萬 女性人口 死亡率	死亡 百分比
	所有癌症死亡原因	37,998	166.5	100.0	所有癌症死亡原因	24,428	211.0	100.0	所有癌症死亡原因	13,570	120.7	100.0
1	162 肺癌	7,479	32.8	19.7	155 肝癌	5,383	46.5	22.0	162 肺癌	2,330	20.7	17.2
2	155 肝癌	7,415	32.5	19.5	162 肺癌	5,149	44.5	21.1	155 肝癌	2,032	18.1	15.0
3	153,154 結腸直腸癌	4,284	18.8	11.3	153,154 結腸直腸癌	2,485	21.5	10.2	153,154 結腸直腸癌	1,799	16.0	13.3
4	174 女性乳癌	1,439	12.8 (1)	3.8	140,141,143- 146,148,149 口腔癌	2,044	17.7	8.4	174 女性乳癌	1,439	12.8	10.6
5	151 胃癌	2,398	10.5	6.3	151 胃癌	1,571	13.6	6.4	151 胃癌	827	7.4	6.1
6	140,141,143- 146,148,149 口腔癌	2,202	9.6	5.8	150 食道癌	1,230	10.6	5.0	179,180 子宮頸癌	792	7.0	5.8
7	185 攝護腺癌	957	8.3 (2)	2.5	185 攝護腺癌	957	8.3	3.9	157 胰臟癌	498	4.4	3.7
8	179,180 子宮頸癌	792	7.0 (1)	2.1	157 胰臟癌	749	6.5	3.1	20,202,203 非何杰金淋巴瘤	478	4.3	3.5
9	150 食道癌	1,304	5.7	3.4	20,202,203 非何杰金淋巴瘤	733	6.3	3.0	156 膽囊癌	467	4.2	3.4
10	157 胰臟癌	1,247	5.5	3.3	147 鼻咽癌	611	5.3	2.5	183 卵巢癌	380	3.4	2.8
	其他	8,481	37.2	22.3	其他	3,516	30.4	14.4	其他	2,528	22.5	18.6
11	20,202,203 非何杰金淋巴瘤	1,211	5.3	3.2	156 膽囊癌	529	4.6	2.2	204-208 白血病	364	3.2	2.7
12	156 膽囊癌	996	4.4	2.6	204-208 白血病	519	4.5	2.1	188 膀胱癌	233	2.1	1.7
13	204-208 白血病	883	3.9	2.3	188 膀胱癌	448	3.9	1.8	189,0 腎臟癌	197	1.8	1.5
14	147 鼻咽癌	798	3.5	2.1	189,0 腎臟癌	281	2.4	1.2	147 鼻咽癌	187	1.7	1.4
15	183 卵巢癌	380	3.4 (1)	1.0	191 腦癌	221	1.9	0.9	191 腦癌	180	1.6	1.3

附註：1年中人口數計22,823,455人，男性11,577,074人，女性11,246,382人。
 2(1)每十萬女性人口死亡率。
 (2)每十萬男性人口死亡率。

表 1-1、中華民國九十五年癌症死因排名(來自行政院衛生署網站)

第二章 文獻探討

第一節 人類乳癌

乳癌的發生對台灣地區的婦女而言，一直是十分重要的公共衛生問題，因為就婦女好發的癌症來看，乳癌在近年來一直是僅次於子宮頸癌排名第二位的癌症。每年台灣地區的婦女，約有 2200 名新發生的乳癌個案，另一方面，就婦女癌症的死亡率而言，也是排名第四位的女性癌症。更令人值得加以特別注意的是，台灣地區婦女乳癌發生率及死亡率的急速上升，在近二十年間，大概已上升二至三倍之多，而且這個趨勢並未有減緩的情形。台灣地區乳癌發生率上升的原因，一般認為和國人的生活習慣西化有十分密切的關係。

一. 乳癌的成因

乳癌主要致癌機轉，是建立在女性荷爾蒙（主要是動情激素）對乳房細胞（或乳癌細胞）的促進增生作用上。因此西化的生活飲食習慣，包括營養的改善會進一步造成婦女初經年齡的提前、停經年齡的延後以及停經後肥胖人口的增加，均會使得現代婦女相較於從前有更多的機會暴露在荷爾蒙的影響下，進一步增加乳癌發生的危險性。所以對於此一日益重要的公共衛生問題，我們應有立即採取行動的必要。

乳房腫塊是乳癌最重要的臨床表徵，雖然大部份的乳房腫瘤均是良性的，但是有乳房腫瘤都應該請教醫生判別良性與惡性。各種乳房腫瘤的徵狀略述如下：

纖維腺瘤：

20 歲左右的女性最多。腫瘤會移動、實質性、像橡皮樣硬、邊

緣整齊、無壓痛也不會痛。

管內乳頭瘤：

40歲左右的婦女較多，常是單側性發生，乳頭突然有黃色、淡紅色水樣液體排出，此時並無疼痛也摸不到腫塊，通常這是一種較大乳管內上皮增生所致。

乳腺膨脹（粉刺性乳房炎）：

多發現於40歲左右的婦女，乳頭排出顏色多變且較濃稠的液體。兩側發生，且波及數條乳管，病人有灼熱、癢或乳暈隱隱作痛之感，觸診時會發現乳暈下有彎曲腫大的乳管。若病情加劇，腫塊出現，從外表看就好像第三期乳癌，併有漿細胞乳炎。

男性女乳症：

在青春期前或當青春期的男孩，在單側乳暈上會發生一硬且痛的圓形腫塊，會變大或腫脹，使同邊乳房增大且疼痛。

乳癌：

常在單側乳房產生一硬而實質性、不移動、不痛且輪廓不規則的腫塊，多見於乳房的外側上方。隨著癌細胞侵犯，其他症狀相繼出現：如腋窩的淋巴結變硬、乳頭下陷或有血狀分泌物、乳房皮膚如橘子皮。並不是所有乳癌都會出現上述症狀，有些僅是乳頭濕疹、皮膚紅腫、皮下浸潤或摸起來可以移動、不硬的腫塊。

乳癌在醫學臨床上的分期

零 期：即原位癌。

第一期：腫瘤小於2公分。

第二期：腫瘤大於2公分，而且腋下淋巴轉移。

第三期：腫瘤大於5公分，且腋下淋巴結有癌轉移或胸壁

皮膚及乳房下的肌肉有癌轉移。

第四期：轉移到較遠的器官，譬如：骨骼、肺、肝、腦等。⁽¹⁾

第二節 人類乳癌細胞株 MCF-7

MCF-7 是一種 Human breast adenocarcinoma, 生長為貼附型細胞，培養在 RPMI-1640 培養基中，於 37°C、5%CO₂ 下培養

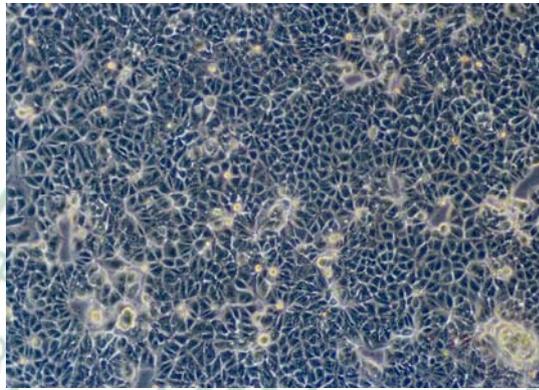


圖 2-1 人類乳癌細胞株 MCF-7 形態(食品工業發展研究所)

第三節 蜂肽(Bee Venom)

一、蜂肽來源

義大利蜜蜂，學名為 *Apis mellifera*(AM)，節足動物門、昆蟲綱、膜翅目、蜜蜂科。蜂肽(Bee Venom) 是由雌蜂腹部之毒腺所分泌的淡黃色物質，為一種複合物，裡面含有 mellitin、apamin、phospholipase A2 等。在古埃及、古印度、敘利亞、古羅馬及中國的民間醫學中，用蜜蜂螫刺病人，治療風濕病、類風濕性關節炎、痛風等病症。

二、蜂肽組成與特性

蜂肽是由胜肽、酵素、胺類等組成且至少含有 18 種活性物質(表 2-2)

，蜂肽之所以可用來治療關節炎與類風濕性關節炎，是因為蜂肽可以刺激腎上腺分泌 cortisol，因此可以減緩發炎反應^(2,3)。而對抗關節炎和抗發炎的機轉，主要是因為 melittin 可以降低 COX-2 與 phospholipase 的表現量，進而減少 tumor factor alpha, interleukin-1、6, nitric oxide 與 reactive oxygen species⁽⁴⁻⁷⁾。Adolapin 可以對抗 prostaglandin 所誘導之大鼠後腳掌水腫的發炎反應，同樣也是透過抑制 Cyclooxygenase 而降低 PG 的合成^(8,9)。Apamin 是一個鈣離子傳導者，可以阻擋鉀離子通道，顯著的抑制卵蛋白所誘發的氣管收縮與組織胺的釋放，可能是因為 apamin 可以穩定 mast cell，也有可能是因為 mast-cell-degranulating (MCD) peptide 抑制 mast cell 釋放出組織胺，也可能是 MCD peptide 與 mast cell receptor 結合而阻止 IgE 的結合位置^(10,11)。最近，更發現 melittin 可以藉由抑制 IκB 的磷酸化進而抑制 NF-κB 的轉錄。蜂肽可以減少巨噬細胞經由 LPS 刺激所產生的一氧化氮，並且發現蜂肽可以降低發揚反應的相關蛋白 iNOS、COX-2、NF-κB 的 mRNA 表現量^(12,13)。

Table 1
Components of bee venom and their major characteristics

Components	MW	Contents (% dry BV)	Major characteristics
<i>Peptides</i>			
Melittin	2840	40–50	26 amino acid Enhance of PLA ₂ activity Cytotoxic effects against cancer cells Anti-inflammatory and anti-arthritic effects
Apamin	2036	2–3	10 amino acid Inhibition of Ca ²⁺ -activated K ⁺ channel Cytotoxic effect against cancer Nociceptive effect
MCD peptide	2588	2–3	Anti-inflammatory properties 22 amino acid Anti-inflammatory and analgesic effect Histamine release (low dose) Histamine release inhibition (high dose)
Adolapin	11,500	1	Anti-allergic effect Inhibition of PLA ₂ and COX activity Anti-inflammatory activity Analgesic effect
Protease inhibitor	9000	<0.8	
Minimine	6000	2–3	
Procamine A, B		1.4	
Secarpin		0.5	
Tertiapin		0.1	
Melittin F		0.01	
Cardiopep		<0.7	
<i>Enzymes</i>			
PLA ₂	19,000	10–12	Cytotoxic effects against cancer cells Inflammatory effects Anti-tumor effects
Hyaluronidase	38,000	1.5–2	Selectively attacks tissue hyaluronic acid polymers Increase the capillary permeability Immune response and tissue-spread properties Antigenic
Glucosidase	170,000	0.6	
Acid phosphomono-esterase	55,000	1	
<i>Amines</i>			
Histamines	307.14	1.5	
Dopamine	189.64	0.13–1	
Norepinephrine	169.18	0.1–0.7	
<i>Others</i>			
Carbohydrates	307.14	1.5	
<i>r</i> -Aminobutyric acid	189.64	0.13–1	
<i>B</i> -Aminoisobutyric acid	169.18	0.1–0.7	

表 2-1 蜂肽的組成與特性⁽¹⁴⁾

來自

Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds.

Pharmacology & Therapeutics 2007.

三、蜂肽對抗癌症的機轉

研究顯示，以蜂肽培養人類肝癌細胞株SMMC-7721，在體外實驗以MTT (Methyl Thiazyl Tetrazolium) assay實驗，發現蜂肽中的多肽可以抑制此細胞株生長，而且具有時間與濃度的效應。利用HE (Haematoxylin & Eosin) staining，發現此細胞株的形態已經改變而且細胞核皺縮、染色體縮合。經由流式細胞儀細胞儀分析，細胞週期停滯在G0/G1期，以雙染(FITC-propidium,annexin V)模式發現凋亡的比例最高。利用DNA fragmentation分析也產生DNA fragmentation。在體內實驗，將此肝癌細胞株植入裸鼠中，以皮下注射蜂肽，發現隨著濃度的增加可以減緩腫瘤的生長⁽¹⁵⁾。

研究顯示，在體外實驗，利用MTT assay證實，蜂肽可以有效的抑制老鼠黑色素瘤細胞株K1735M2的增生，而且具有時間與濃度的效應。利用顯微鏡觀察，發現型態上也有明顯的改變，變的細長類似神經細胞的突觸。以DNA fragmentation分析，也有DNA斷裂的情形發生。利用流式細胞儀分析，蜂肽會誘導此細胞株停滯在G1期。在體內實驗，將老鼠的黑色素瘤細胞B16移植到C57BL老鼠身上，每天以腹腔注射不同濃度的蜂肽12天，然後犧牲，發現老鼠身上的腫瘤比起控制組還輕，在統計上具有顯著差異，而且在這段時間給予老鼠注射蜂肽，老鼠的食慾不受影響⁽¹⁶⁾。

研究顯示，在體外實驗，利用MTT assay證實，蜂肽可以有效的抑制人類肺癌細胞株NCI-H1299生長。利用流式細胞儀分析細胞週期發現，蜂肽顯著的增加sub-G1(30%左右)，並且經由DNA fragmentation、DAPI、TUNEL assay的實驗說明蜂肽可以誘導此株細胞凋亡⁽¹⁷⁾。

研究顯示，培養類風濕性關節炎病人的關節滑液膜纖維母細

胞，以蜂肽處理發現，經由MTT assay證實此細胞生長會受到抑制，再經由TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) assay、DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) staining以及DNA fragmentation assay證實蜂肽可誘導此細胞發生凋亡⁽¹⁸⁾。

第四節 細胞凋亡

一、細胞凋亡

細胞凋亡(apoptosis)，又稱為計畫性的細胞死亡(programmed cell death)，是由Kerr *et al.*所提出。細胞凋亡時不會產生發炎物質，所以不會影響鄰近的細胞。體內的細胞死亡的方式有兩種，細胞壞死(necrosis)與凋亡(apoptosis)，當細胞受到外來刺激時，如藥物、活性氧成分、紫外線等刺激，導致細胞核內的DNA受損，當生物本身無法修復時，此時細胞會發生一連串的訊息傳遞，此時細胞會自行死亡，稱之為細胞凋亡^(19,20)。

二、細胞凋亡的特徵

細胞發生凋亡的過程中，細胞的形態會有所變化，例如；細胞核萎縮、DNA fragmentation、以及形成凋亡小體，但在這個過程中並不會有發炎反應，所以不會影響週遭的細胞或組織，除此之外還有一些生化變化，如下

1. DNA fragmentation

當細胞進入凋亡末期的時候，細胞核內的核酸內切酶會被活化，而可以將DNA降解成小片段⁽²¹⁾。

2. 細胞內的活性氧成分(Reactive oxygen species；ROS)的改變

有研究指出，氧化壓力會誘導細胞發生凋亡，而活性氧成分(ROS)是氧化壓力的主要來源，當細胞內ROS增加，會改變粒腺體外膜

的滲透壓，而使粒腺體膜電位(Mitochondrial membrane potential; MMP)下降，釋放出凋亡相關蛋白，如：AIF(Apoptosis-inducing factor)、Endo G、cytochrome c等等⁽²²⁻²⁶⁾。

三、細胞凋亡的機轉

目前的研究，大概將細胞凋訊息途徑分為內在途徑(粒腺體-mitochondrial pathway)與外在途徑(死亡接受體途徑-death receptor pathway)。

1. 內在途徑---粒線體途徑(Mitochondrial pathway)

在細胞凋亡的過程中，粒腺體是一個很重要的角色，因為粒腺體上面的Bcl-2 family蛋白會維持粒腺體內外膜的電位平衡，當內膜電位不平衡時，cytochrome c、AIF、Endo G會由粒腺體釋放到細胞質中，而改變粒腺體外膜的滲透壓。在dATP存在的情況，會使cytochrome c與Apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)結合，使caspase-9活化，進而活化caspase-3，使細胞產生凋亡⁽²⁷⁾。

(1). Bcl-2 family protein，因為次家族的蛋白可以維持粒腺體膜電位位的平衡，所以此家族蛋白對於粒腺體途徑的凋亡是很重要的調控者，可以分為促進凋亡與抑制凋亡。當DNA受損時，會活化促進凋亡蛋白成員，使Bax由細胞質轉位到粒線體外膜，改變粒腺體膜電位，釋放出凋亡相關蛋白，如AIF、cytochrome c、Endo G等。而抑制凋亡蛋白成員則是維持粒腺體膜電位的平衡，而不改變粒腺體外膜的滲透壓，因此粒腺體不會釋放出凋亡相關蛋白。

促進凋亡蛋白成員：Bax、Bad、Bid、Bak、Bim、Bik、Bcl-xs等。

抑制凋亡蛋白成員：Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、Bid等⁽²⁸⁻³⁰⁾。

(2). Caspase family proteins

當細胞凋亡時，會活化細胞內的蛋白水解酵素(cysteine dependent aspartate specific protease)，進而使其它酵素裂解，而改變細胞形態(31, 32)。此系列蛋白有類似的胺基酸序列及結構，為 single-chain protease，含有 3 個 Domain：NH₂ terminal、large subunit(20) KDa、small subunit(10 KDa)。上游的活化態的 caspase 會裂解將下游未活化的 caspase 的 domain，而使下游未活化的 caspase 活化⁽³³⁾

2. 外在途徑—死亡接受器途徑(Death receptor pathway)

此途徑是經由活化細胞膜表面上的接受器(Fas)，當 Fas 與 Fas ligand 結合之後，將 Fas 活化成三聚化，變成有活性的受體，此活化的受體的末端 death domain 與 Fas-associated death domain 的 death domain 結合，然後與下游的 Pro-caspase 8 結合，形成蛋白複合體，此訊息稱為 Death- inducing signaling，接著再與 Pro-caspase 8 結合形成 death-inducing signaling complex，此時 caspase 8 具有活性，可以直接活化 caspase 3；或者使 Bid 活化成 tBid，tBid 轉位到粒腺體外膜，影響粒腺體膜的滲透壓，釋放出 cytochrome c，然後活化 caspase 9 與 caspase 3^(34, 35)。

第五節 細胞週期調控

一、細胞週期(Cell cycle)

哺乳類動物動物的細胞週期大約 12-24 小時不等。細胞週期指的是細

胞從剛開始的有絲分裂到下次有絲分裂開始之前，代表細胞進行一次的增生。細胞週期大概可以分為：間期(inter phase)與有絲分裂期(M phase)。又可以細分成 G₀、G₁、S、G₂、M phase。

1. G₀ phase：此時細胞休眠不生長。
2. G₁ phase：此時細胞開始分裂，體積開始變大，染色體數目為 2N。

3. S phase：此時細胞內 DNA 進行複製，將染色體數目變成 $4N$ 。
4. G_2 phase：此時染色體數目為 $4N$ 。
5. M phase: 此時細胞會分裂成 2 個細胞。

M phase 可分為四個時期

- 前期：複製的染色體縮短變粗，紡錘體形成，核膜、核仁消失且著絲點附著在紡錘絲上。
- 間期：染色體之著絲點排列在赤道板上。
- 後期：同源染色體往細胞兩極分開。
- 末期：染色體恢復絲狀，核膜、核仁出現。

G_1 期進入到S期或者 G_2 期進入到M期之間都有檢查點，會檢查DNA複製是否有問題。已有文獻指出，當DNA受損時，就無法通過檢查點而導致細胞週期停止不前，此時細胞會自行修復有問題的，假如修復完成就可以繼續進行細胞週期，但是無法修復的話，細胞就會走向凋亡途徑⁽³⁶⁾。

二、細胞週期調控蛋白

真核細胞中，調控細胞週期的蛋白稱為cyclin，而使cyclin活化的酵素稱為cyclin-dependent protein kinase (Cdk)藉由cyclin與Cdk的結合使細胞周期得以運行，細胞才可以增生。當細胞發生DNA damage、分化、老化時，會產生Cyclin dependent protein kinase inhibitor (CdkI)來抑制cyclin的活化，阻止細胞週期的運轉⁽³⁷⁾。

1. Cyclin和Cdk

Cyclin family 與 Cdk family 參與細胞週期的調控，當兩者形成複合體時，Cdk 就會活化，使下游的調控因子磷酸化，使細胞週期運行⁽³⁸⁾。目前所發現到並且有名字的 Cdk 有 7 個：Cdk 1 (cdc2)、Cdk 2、Cdk 3、

Cdk 4、Cdk 5、Cdk 6、Cdk 7，這些命名是依照發現時間排序的，在細胞週期中各時期有各自的 Cyclin-Cyclin dependent protein kinase complex 使細胞週期可以順利運行，例如：當細胞由 G₀ phase 進入到 G₁ phase，此時 Cyclin D 會與 Cdk 4、Cdk 6 結合；當細胞由 G₁ phase 進入 S phase，此時 Cyclin E 會與 Cdk 2 結合；當細胞由 S phase 進入到 G₂ phase，此時 Cyclin A 會與 Cdk2 結合；當細胞由 G₂ phase 進入到 M phase，此時 Cdk1 會與 Cyclin A、Cyclin B 結合^(39, 40)。

2. Cyclin-dependent protein kinase inhibitor (CdkI)

顧名思義，這類的蛋白可以抑制 Cdk，此家族可以分成兩類：(1)INK4 (Inhibitor of Cdk4)：此類蛋白含有 p16^{INK4a}、p15^{INK4b}、p18^{INK4c}、p19^{INK4d}，會與 Cdk4、Cdk6 結合，使 Cdk4 和 Cdk6 無法活化，使細胞停滯在 G₀/G₁ phase。

(2)CIP/KIP：此類蛋白含有 p21^{CIP1}、p27^{KIP1}、p57^{KIP2}，這 3 種蛋白結構上的胺基酸末端會有特定的構型會與特定的 Cyclin 及 Cdk 結合而抑制 Cdk 活化，如：G₀ phase 進入 G₁ phase 的 Cyclin D-Cdk4/6 complex，G₁ phase 進入 S phase 的 Cyclin E-Cdk2 complex，S phase 進入 G₂ phase 的 Cyclin A-Cdk2 complex^(39, 41, 42)。

第六節 活性氧成分(Reactive oxygenase ; ROS)與抗氧化酵素

一、 活性氧成分 (ROS)

ROS 可以分成內源性與外源性，內源性 ROS 的來源有巨噬細胞吞噬作用、氧化作用與粒腺體的電子傳遞鏈等；外源性 ROS 來源有廢氣排放污染、抽菸、油煙等。當細胞受到外來刺激，如藥物、UV 等，細胞內 ROS 增加，會造成氧化壓力，當細胞內的抗氧化酵素無法負荷時，會氧化細胞膜上的脂質與使粒腺體氧化壓力上升，然後使細胞走向凋亡⁽⁴³⁾。

二、 抗氧化防禦系統

生物體內的防禦系統可以分為：一級防禦系統(Primary defense system)，如 β -carotene、Vitamin C、Vitamin E 以及一些抗氧化酵素等；二級防禦系統(Secondary defense system)，包括脂質分解酵素(lipolytic enzyme)、蛋白質分解酵素(proteolytic enzyme)以及 DNA 修復酵素(DNA repair enzyme)等，可以清除 ROS 之氧化產物，或一級防禦系統無法清除的自由基⁽⁴⁴⁾。

三、 ROS 與細胞凋亡

文獻指出，一般的抗癌藥物可以分成產生多量的 ROS 和少量的 ROS，ROS 造成凋亡時，會釋放出 cytochrome c，NADH dehydrogenase 與還原態 coenzyme Q10 會使電子經過電子傳遞鏈形成氧氣，過多氧氣則會變成超氧自由基並且在細胞的其他胞器形成 ROS(19)。有學者將 Bcl-2 轉染到小鼠的表皮細胞，比較正常的老鼠表皮細胞與有轉染 Bcl-2 的老鼠表皮細胞的生長情況，發現轉染 Bcl-2 的這一組可以干擾自由基(hydrogen peroxide、superoxide)的生成且延遲細胞死亡。但是 Bcl-2 並不會改變細胞內

抗氧化酵素(superoxide dismutase、 catalase 、 glutathione peroxidase)的活性，而是增加 glutathione 的濃度，因此可以部份調節氧化所導致的細胞死亡⁽⁴⁵⁾。

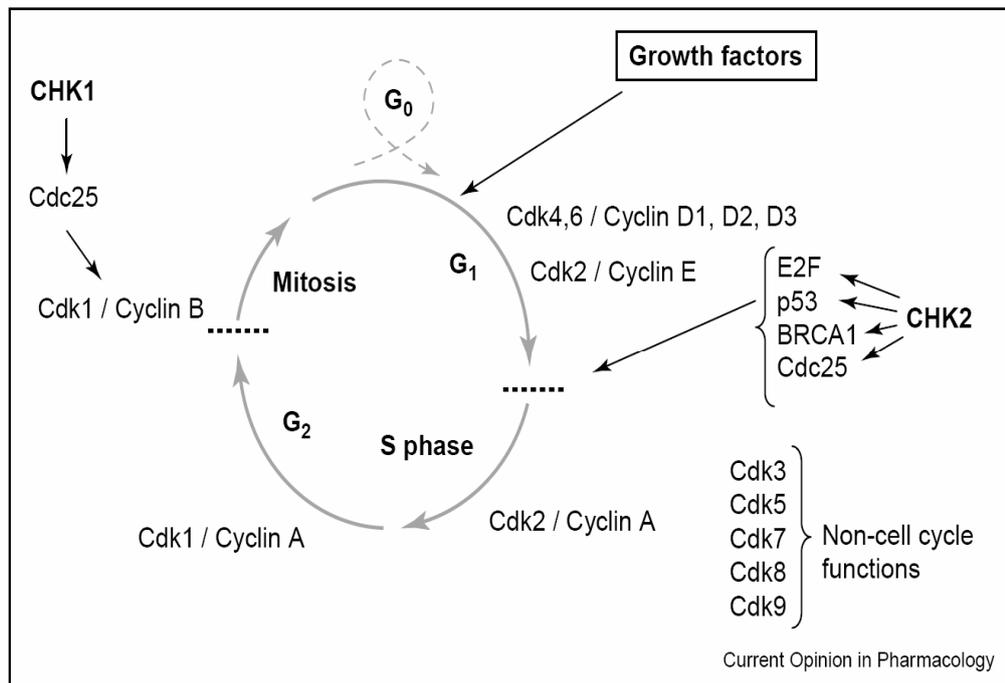


圖 2-2 細胞週期調控蛋白⁽⁴⁶⁾

來自

Collins IG, Michelle D Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. Current Opinion in Pharmacology 2005;5(4):366-73.

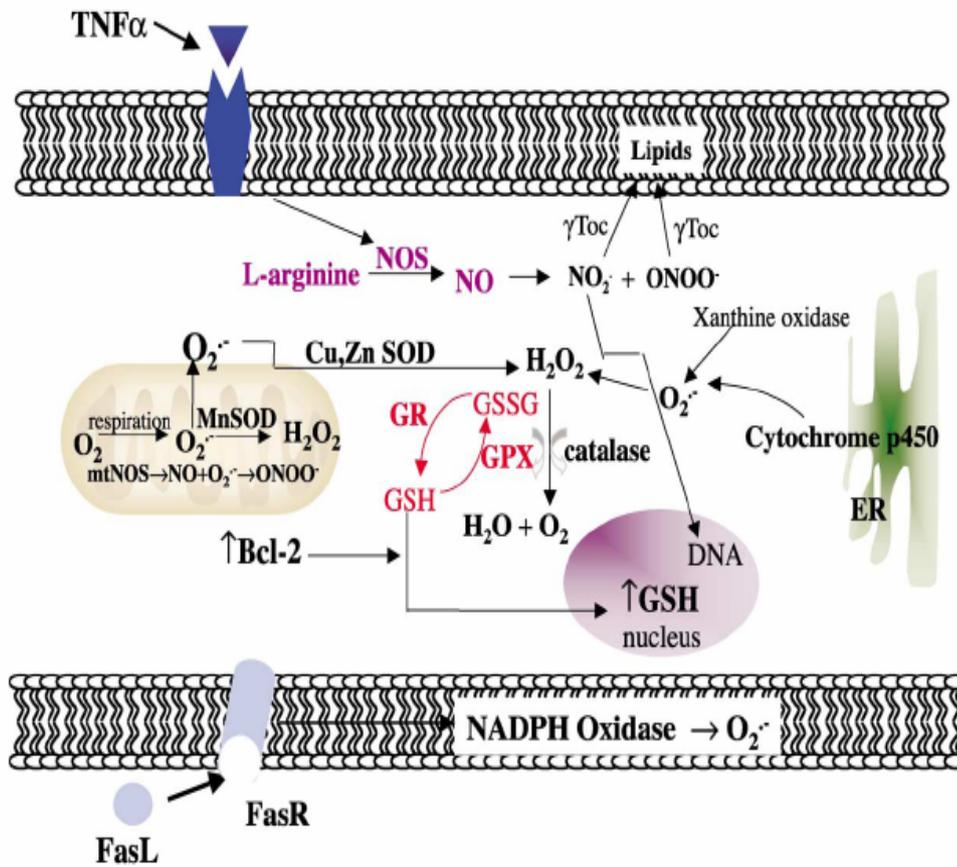
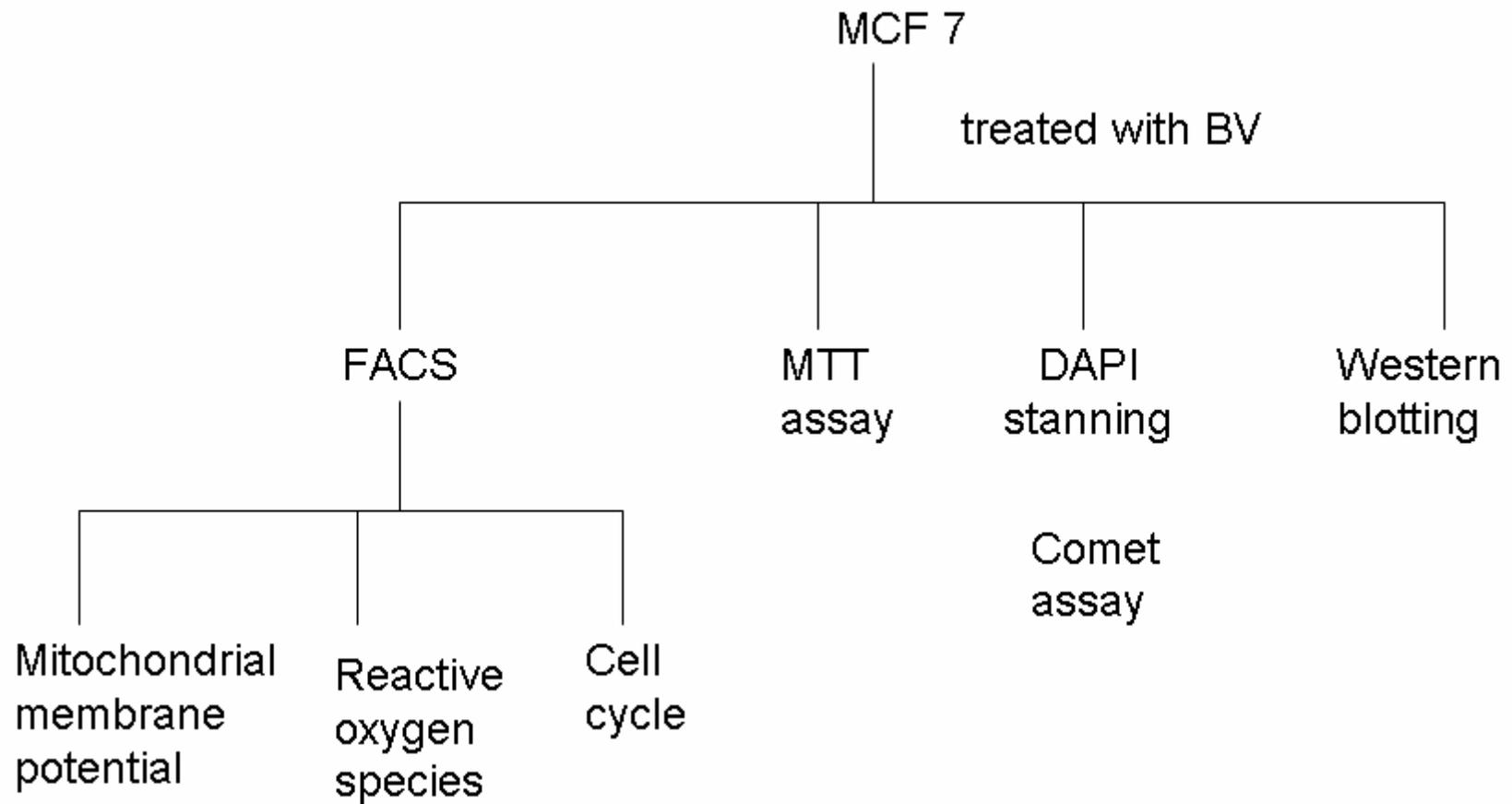


圖 2-3 細胞內抗氧化防禦系統⁽⁴⁷⁾

來自

Curtin JF DM, Cotter TG. , Articles R. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis.265 2002 Jul 1;265(1-2):49-72.

第三章 研究架構



第四章 材料和方法

第一節 實驗材料

一、細胞株來源

本實驗使用的細胞株：人類乳癌上皮細胞株 (Human breast adenocarcinoma epithelial cell line) — MCF 7，購自新竹食品發展工業研究所(Food Industry Research and Development Institute)

二. 藥品與試劑

1. Bee Venom (BV)：購自 Sigma Chemical Co.
2. RPMI medium：購自 HyClone Co.
3. Fetal bovine serum (FBS)：購自 Gibco
4. L-glutamin(LG)：購自 Gibco
5. Penicillium Streptomycin(PS)：購自 Gibco
6. Typsin-EDTA：購自 Amerso
7. Trypan blue：購自 Sigma Chemical Co.
8. Etanol：購自 TEDIA
9. Formaldehyde：購自 Merck
10. Dimethyl sulfoxide(DMSO)：購自 Sigma Chemical Co.
11. Disodium hydrogen phosphate(Na_2HPO_4)：購自 Merck
12. Sodium chloride (NaCl)：購自 Merck
13. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)：購自 Merck
14. Potassium chloride (KCl)：購自 Merck

15. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
16. RNase A (Ribonuclease) : 購自 Amersco
17. Triton X-100 : 購自 Sigma Chemical Co.
18. DiOC6 (MMP 試劑) : 購自 calbiochem
19. H₂DCFDA (ROS 試劑) : 購自 calbiochem
20. Indo-1 (calcium 試劑) : 購自 calbiochem
21. 蛋白質萃取試劑 (protein extraction solution) (PRO-PREP) : 購自 iNtRON Biotechnology, INC.
22. Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Merck
23. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
24. Ammonium persulfate (APS) : 購自 Amersco
25. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BIStm29 : 1) : 購自 Amersco
26. SDS (Sodium dodecyl sulfate) : 購自 Amersco
27. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine) : 購自 Amersco
28. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane) : 購自 Amersco
29. Glycine : 購自 Amersco
30. Methanol : 購自 TEDIA
31. Protein marker : 購自 Femantas
32. Tween 20 : 購自 Amersco
33. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amersham
34. 顯影劑 : 購自 Kodak
35. 定影劑 : 購自 Kodak

36. BioMax Flim : 購自 Kodak

37. 核酸純化試劑組 (DNA purification kit) : 購自 Gene Mark

38. Agarose I : 購自 Amersco

39. 5× TBE buffer : 購自 Amersco

40. PhiPhiLux-G₁D₁ kit : 購自 OncoImmunin (Gaithersburg, MD, USA)

41.1° 抗體

表 4-1

Antibody	Brand	Antibody	Brand
Alpha-tubulin	Oncogen	anti-caspase 3	upstate
anti-p53	Santa cruz Biotechnology	anti-p27	Santa cruz Biotechnology
anti-p21	Calbiochem	anti-Fas	upstate
anti-PARP	upstate	anti-catalase	Calbiochem
anti-SOD (Mn)	Calbiochem	anti-caspase 8	Calbiochem
anti-SOD (Cu/Zn)	Calbiochem	anti-Bid	Calbiochem
anti-cytochrome <i>c</i>	Calbiochem	anti-Bax	upstate
anti-AIF	upstate	anti-Cdk2	Calbiochem
anti-endo G	Calbiochem	anti-Bcl-2	upstate
anti-caspase 9	upstate	anti-p16	Calbiochem
anti-GST	Calbiochem	Anti-Bcl-xL	upstate

42.2° 抗體

43.(1) Goat anti-mouse IgG(HRP) horseradish peroxidase

conjugated antibody : 購自 Chemicon ; AP124P

(2) Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase

conjugated antibody : 購自 Chemicon

- (3) Goat anti-sheep IgG (HRP) horseradish peroxidase
conjugated antibody : 購自 Chemicon

三. 儀器設備、器材

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

第二節 實驗方法

一. 藥品配製

將購買之蜂肽(Bee Venom) 100 mg 溶於 10ml 之 1XPBS，配製成 10mg/ml 的 stock solution，再從 stock solution 稀釋配製本實驗所使用的各種濃度，之後儲存於 -20 °C 冰箱。

配製濃度如下：

表 4-2 不同濃度蜂肽的配製

Working solution	Stock solution (μl)	1 × PBS (μl)
0.25 mg/ml	2.5	97.5
0.5 mg/ml	5	95
0.75 mg/ml	7.5	92.5
1 mg/ml	10	90
1.25 mg/ml	12.5	87.5

將各個濃度的藥加入培養基中，稀釋倍率為 100X

爾後的藥物濃度以稀釋的濃度(最終濃度)稱之，分別為：

2.5、5、7.5、10、12.5 μg/ml

二、 細胞培養

1. 冰凍細胞的活化：

將冰凍管從液態氮桶中小心取出，迅速放入 37°C 水浴槽中回溫，輕搖冰凍管使其融化剩下一小塊冰，以 70% 酒精噴衛生紙，再以衛生紙擦拭冰凍管外部，移入無菌操作台內。將解凍的細胞懸浮液取出，放入有 50 ml 離心管中，以 pipetmam 取 5 ml 培養基慢慢加入此離心管中，離心 1500 rpm、5 分鐘。之後再將上清液倒掉，加入新的 6 ml 培養基，混合均勻，緩緩放入 25 cm² 培養容器中，移置培養

箱中培養(5% CO₂、37 °C)。翌日細胞貼附後更換培養基。

2. 細胞冰凍保存：

冰凍前應觀察細胞狀況並於前一日更換培養基。冰凍細胞前應先配置冰凍保護劑：將 DMSO 加入新鮮的培養基中，混合均勻，最終濃度為 7%，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液（約 100 μl）計數細胞濃度及凍前存活率。離心後去除上清液，加入事先以配置好的冷凍保護劑，使其細胞數為 2-5 × 10⁶ cells/ml，混合均勻，分裝於標示完全之冰凍管中（1 ml/bot）。再將冰凍管放入冰凍盒中放入 -80 °C 冰箱中，翌日再將冰凍管取出放入液態氮桶中保存

3. 細胞繼代培養：

將 MCF-7 培養在 RPMI 1640 培養液(含有 10% Fetal bovine serum、1% Penicillin Streptomycin、1% L-Glutamin)，放置於 5% CO₂、37 °C 培養箱培養。每 2-3 天更換新的培養液，等到細胞生長到 9 分滿時，將舊的培養液吸出丟棄到廢液桶，然後加入 10 毫升的 1× PBS 輕輕搖晃並吸出丟棄到廢液桶，再加入 3 毫升的 trypsin，靜置約 2-3 分鐘，輕輕拍打 flask，等到大部分的細胞懸浮於液體中，加入 10 毫升的培養液與 trypsin 中和，取置於 50 毫升的離心管，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，將上清液輕輕倒入廢液桶，以另 1 管 50 毫升離心管拍打下層 pellet，加入 3 毫升的培養液混勻 pellet 再加入 10 毫升的培養液，置於 75 cm² flask 培養。

4. 計數細胞：

利用 Trypan blue 當作染劑，因為死細胞的細胞膜不完整而會被 trypan blue 滲入而呈色，而活細胞則反之。將混勻的細胞液取 300-800 微毫升到 1.5 毫升的 eppendorf，再取出含有細胞的 100

微毫升的液體與 10 微毫升的 Trypan blue 混勻，取 10 微毫升的混勻液到血球計數器，以倒立式相位差顯微鏡計算四個角落與中間共五個方格的細胞數總和，每個小方格的體積為 $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$ ，將總細胞數除以 5 再乘以 10^4 代表每毫升所含有的細胞數。⁽⁴⁸⁾

三. 細胞形態的觀察-利用倒立式相位差顯微鏡觀察

將 MCF-7 細胞培養在 6-well 培養盤中，將細胞數調整為 $2 \times 10^5/\text{well}$ ，然後培養在 5% CO_2 、 37°C 的培養箱中培養 24 小時並更換新的培養皿，分別加入不同濃度的蜂肽(最終濃度 0、2.5、5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)培養 48 小時，加入 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蜂肽培養 0、6、12、24、48、72 小時，以倒立式相位差顯微鏡觀察並拍照，來觀察蜂肽對 MCF-7 細胞形態的影響。

四. 細胞存活率的測定

1. 原理：

MTT((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 根據 Mossmann 所提出的方法，MTT 為一種黃色的 tetrazolium，會被活細胞粒腺體上的 Succinate dehydrogenase 還原成紫藍色的 formazan，在 500~600 nm 具有較高的吸光值，以此吸光值的比較來表示細胞存活率。^(48, 49)

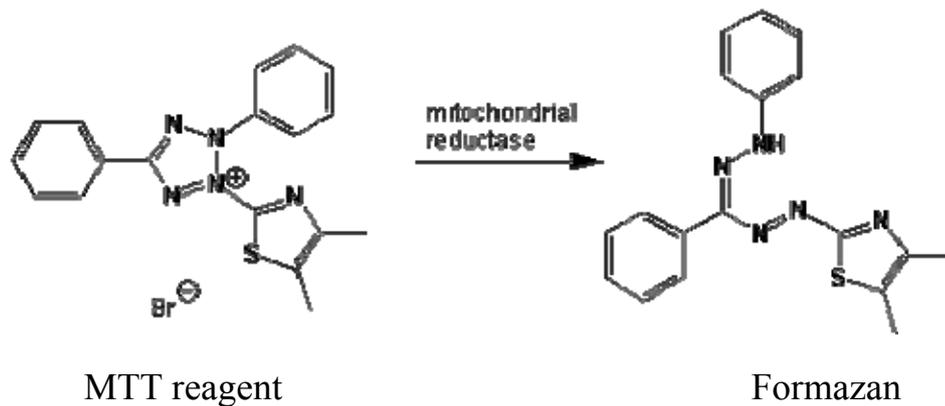


圖 4-1 MTT 形成 Formazan 反應機制

2. 實驗步驟：

將 MCF-7 細胞，種殖在 96-well 培養盤中，每個 well 種殖 1×10^4 ，將細胞培養在 5% CO₂、37°C 的培養箱中培養 24 小時，加入不同濃度的蜂肽(0、2.5、5、7.5、10、12.5 μg/ml)培養 24 和 48 小時，將培養液吸出丟棄，每個 well 加入 200μl 的 MTT (0.5 mg/ml)，放置於 5% CO₂、37°C 的培養箱反應 4 小時，加入 10% SDS，放入 5% CO₂、37°C 的培養箱反應 16 小時，以 ELISA reader 測定在 595 nm 的吸光值。

五. 細胞週期測定：

1. 原理：

利用 PI (Propidium Iodide) 染劑會與核酸鍵結，當細胞膜被酒精打開固定，PI 螢光染劑就可以進入細胞與核酸鍵結，利用流式細胞儀進行細胞週期的分析。⁽⁵⁰⁾

2. 實驗步驟：

將 MCF-7 細胞，種殖在 6-well 培養盤中，每個 well 種殖 2×10^5 ，將細胞培養在 5% CO₂、37°C 的培養箱中培養 24 小時並更換新的培

養皿，加入不同濃度的蜂肽(最終濃度 0、2.5、5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g/ml}$) 培養 24 小時；加入蜂肽(最終濃度 7.5 $\mu\text{g/ml}$)培養 0、6、12、24、48、72 小時。之後將細胞液吸出到 15 毫升的離心管，以 1×PBS 清洗 well 並吸入離心管中，加入 trypsin 0.5 ml/well 靜置 1-2 分鐘，輕輕拍打培養盤，等到大部份的細胞懸浮，每個 well 加入 3 ml 的 1×PBS 清洗，將細胞懸浮液吸至離心管中，放入離心機中離心，1500 rpm、5 mins，等待離心的同時，加入 3 毫升的 1×PBS 到 well 中，離心之後將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，再將 well 中的細胞懸浮液吸到離心管中，再離心一次，將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，慢慢的滴入 70% 的酒精到離心管中(2 ml/tube)，將所有離心管蓋蓋子並冰入 -20°C 的冰箱至少隔夜，冰箱儲存最好不要超過 2 個星期，上機前，先將酒精離心去除，並刮散底部的 pellet，加入 1×PBS 到離心管(5 ml/tube)再離心一次，倒掉上清液，每管離心管加入 500 μl 的染劑 (0.002% propidium iodide 10 ml、5% triton 10 ml、2 mg/ml Rnase 2.5 ml、1×PBS 27.5 ml)，室溫避光反應 30 分鐘，再以流式細胞儀進行分析，分析時每秒的細胞數不要超過 150 顆(最好每秒低於 100 顆)，細胞太多可以用染劑稀釋，數據以 Cell Quest 進行分析，記下 G_0G_1 、S、 G_2M 以及 $\text{Sub}G_1$ 的比例。

六. 粒腺體膜電位(Mitochondrial membrane potential； $\Delta\Psi_m$)測定：

1. 原理：

DioC6(3,3'-Dihexyloxacarboxyanine iodine)是一種親脂性的螢光染劑，而此染劑可以與粒線體基質結合，依照結合螢光的多寡來判別粒腺體膜電位上升還是下降。⁽⁵¹⁾

2. 實驗步驟：

將 MCF-7 細胞，種殖在 6-well 培養盤中，每個 well 種殖 2×10^5 ，將細胞培養在 5% CO₂、37°C 的培養箱中培養 24 小時並更換新的培養皿，加入蜂肽(最終濃度 7.5 µg/ml)培養 0、1、3、6、12、24、48 小時，之後將細胞液吸出到 15 毫升的離心管，以 1×PBS 清洗 well 並吸入離心管中，加入 trypsin 0.5 ml/well 靜置 1-2 分鐘，輕輕拍打培養盤，等到大部份的細胞懸浮，加入 3 ml/well 的以 1×PBS 清洗，將細胞懸浮液吸至離心管中，放入離心機中離心，1500 rpm、5 mins，等待離心的同時，加入 3 毫升的 1×PBS 到 well 中，離心之後將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，再將 well 中的細胞懸浮液吸到離心管中，再離心一次，將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，每管加入 500 µl 的 MMP 染劑(10 µl 的 1 mM 的 MMP 試劑+500 µl 的 1×PBS)混勻，0 小時中有一管只加入 500 µl 的 1×PBS(當作 Blank)，放入 37 °C 的水浴槽反應 30 分鐘，以流式細胞儀進行分析，使用 MMP 軟體，將 blank 的 M1 調成約 100%，然後分析 0 小時，將 M1 與 M2 調成約各為 50%，之後不能再調整計績上機，波峰往左移動代表粒線體膜電位下降；波峰往右移動代表粒線體膜電位上升)

七. 活性氧成分測定(Reactive oxygen species；ROS)

1. 原理：

H₂DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)為一種螢光物質，可以通過細胞膜進入細胞內，此時會被細胞內的 esterase 分解，形成 H₂DCF，H₂DCF 會被細胞內的過氧化氫氧化形成具有螢光的

HDCF，並聚集在粒腺體中，可藉由螢光的強度來評估活性氧化物的產生與否。(52)

2. 實驗步驟：

將 MCF-7 細胞，種殖在 6-well 培養盤中，每個 well 種殖 2×10^5 ，將細胞培養在 5% CO₂、37°C 的培養箱中培養 24 小時並更換新的培養皿，加入蜂肽(最終濃度 7.5 µg/ml)培養 0、1、3、6、12、24、48 小時，之後將細胞液吸出到 15 毫升的離心管，以 1×PBS 清洗 well 並吸入離心管中，加入 trypsin 0.5 ml/well 靜置 1-2 分鐘，輕輕拍打培養盤，等到大部份的細胞懸浮，加入 3 ml/well 的以 1×PBS 清洗，將細胞懸浮液吸至離心管中，放入離心機中離心，1500 rpm、5 mins，等待離心的同時，加入 3 毫升的 1×PBS 到 well 中，離心之後將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，再將 well 中的細胞懸浮液吸到離心管中，再離心一次，將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，每管加入 500 µl 的 ROS 染劑(1 µl、200 µM 的 ROS 試劑+500 µl 的 1×PBS)混勻，0 小時中有一管只加入 500 µl 的 1×PBS(當作 Blank)，放入 37°C 的水浴槽反應 30 分鐘，以流式細胞儀進行分析，使用 ROS 軟體，將 blank 的 M1 調成約 100%，然後分析其餘 0 小時，將 M1 與 M2 調成約各為 50%，之後不能再調整繼續上機，波峰往左移動代表蜂肽可能具有抗氧化的物質；波峰往右移動代表有活性氧成分的生成)。

八. DAPI(4'-6-diamidino-2-phenyl indole)染色

1. 原理：

DAPI(4'-6-diamidino-2-phenyl indole)是一種螢光染劑，可以專

一性與 DNA 雙股螺旋的小溝(minor groove)鍵結，當細胞凋亡時，DNA 會斷裂，DNA 斷裂越嚴重，DAPI 染劑可以鍵結的位置就越多，顯微鏡下觀察的螢光亮度越亮。⁽⁵³⁾

2. 實驗步驟：

將 MCF-7 細胞，種殖在 6-well 培養盤中，每個 well 種殖 1×10^5 ，將細胞培養在 5% CO₂、37°C 的培養箱中培養 24 小時並更換新的培養皿，加入蜂肽(最終濃度 7.5 µg/ml)培養 0、6、12、24、48 小時，將培養液吸出至廢液桶，滴入 1×PBS 3 ml/well 輕輕清洗兩次，加入 3% Formaldehyde/ 1 ml/well 室溫空氣流通處固定細胞 20 分鐘，之後再滴入 1×PBS 3 ml/well 輕輕清洗兩次，再加入 0.1% triton X-100 1 ml/well 反應 20 分鐘，再滴入 1×PBS 3 ml/well 輕輕清洗兩次，避光加入 DAPI 染劑 500 µl/well，置於培養箱反應 30 分鐘，將 DAPI 染劑吸出至廢液桶，再滴入 1×PBS 3 ml/well 輕輕清洗兩次，以螢光顯微鏡觀察並拍照。

九. 彗星試驗(Comet assay)

1. 原理：

彗星試驗是來檢測 DNA 損傷的程度，利用電泳的特性，當 DNA 受到損傷，DNA 會從細胞核游離出來而拖尾，類似彗星的形狀，拖尾越長表示 DNA 受損得程度越嚴重。⁽⁵⁴⁾

2. 實驗步驟：

將 MCF-7 細胞，種殖在 6-well 培養盤中，每個 well 種殖 2×10^5 ，將細胞培養在 5% CO₂、37°C 的培養箱中培養 24 小時並更換新的培養皿，加入蜂肽(最終濃度 0、2.5、5、7.5、10、12.5 µg/ml)培養 24

小時。將細胞液吸出到 15 毫升的離心管，以 1×PBS 清洗 well 並吸入離心管中，加入 trypsin 0.5 ml/well 靜置 1-2 分鐘，輕輕拍打培養盤，等到大部份的細胞懸浮，加入 3 ml/well 的以 1×PBS 清洗，將細胞懸浮液吸至離心管中，放入離心機中離心，1500 rpm、5 mins，等待離心的同時，加入 3 毫升的 1×PBS 到 well 中，離心之後將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，再將 well 中的細胞懸浮液吸到離心管中，再離心一次，將上清液倒入廢液桶，輕輕刮散底部的 pellet，加入 1 ×PBS 40 µl/tube 混勻取至 eppendorf 至於冰上備用。以鉛筆將磨砂面的載玻片寫上組別，將下膠(70 µl 的 0.5% LMA+ 0.5% NMA)置於載玻片，將蓋玻片以 45° 蓋上，等到下膠凝固，輕輕撥離蓋玻片。取 10 µl 的細胞液與 70 µl 的 0.5% LMA 混合均勻，將此含有細胞上膠置於下膠上方並蓋上蓋玻片，等到凝固將蓋玻片輕輕撥離。將整個裝了玻片的架槽小心的浸入 Lysis buffer solution 一個小時(冰上，需新鮮配製)。將整個架槽移到 Alkaline buffer solution 二十分鐘。跑膠：將玻片放在以 Alkaline 做為電泳液，以 300mA 跑 30 分鐘。將玻片再放入架槽進入 0.4 M Tris buffer solution 三十分鐘，使 pH 變回中性。將架槽進入 methanol 五分鐘，使膠脫水。加 PI 染劑(2.5 µg/ml)40µl，以螢光顯微鏡觀察並拍照。

3. 溶液配方：

(1). Lysis buffer solution (需新鮮配製)，調整 pH = 8~10，需混合均勻，添加 NaOH_(l) 可以幫助 EDTA 溶解。

作用：可將細胞膜通道打開

Comet assay 試劑配製

表 4-3 a

材料	體積(毫升)
5 M NaCl	100
1 M Tris-HCl	2
0.5 M EDTA	40
Triton	2
DDW	56
Total volume	200

(2). Alkaline buffer solution，調整 pH = 13

4-3 b 作用：解開 DNA 雙股螺旋

材料	體積/重量
NaOH	12 g
EDTA	0.3724 g
DDW	1000 ml

(3). 0.4 M Tris buffer solution，以 HCl₍₁₎調整 pH = 7.5

作用：使膠變回中性

4-3 c

材料	體積/重量
Tris	48.456 g
DDW	1000 ml

註解：

LMA：low melting agarose

NMA：normal melting agarose

十. 西方墨點法(Western blotting)^(55, 56)

1. 粗萃取細胞蛋白質
2. 定量蛋白質
3. SDS-PAGE 電泳分析
4. 轉漬
5. 壓片

1. 粗萃取細胞蛋白質

將 MCF-7 細胞，種殖在 10 公分的培養盤中，每盤種殖 3×10^6 ，將細胞培養在 5% CO₂、37°C 的培養箱中培養 24 小時並更換新的培養皿，加入蜂肽(最終濃度 7.5 μg/ml)培養 6、12、24、48 小時，之後將細胞液吸出到 50 毫升的離心管，以 1×PBS 清洗 dish 並吸入離心管中，加入 trypsin 3 ml/dish 靜置 1-2 分鐘，輕輕拍打培養盤，等到大部份的細胞懸浮，加入 10 ml/dish 的以 1×PBS 清洗兩次，將細胞懸浮液吸至離心管中，放入離心機中離心，1500 rpm、5 mins，將上清液倒入廢液桶，取 1×PBS 1 ml/tube 混合均勻到 eppendorf，以高速離心機離心 1500 rpm、5 mins，小心以 pipetman 吸掉上清液。加入適量 protein extraction solution(視 pellet 多寡而定)，以 pipetman 混合均勻並以震盪機震盪 2 分鐘，移到 -20 °C 冰箱儲存隔夜，以高速離心機離心 14000rpm、20 分鐘，取上清液存放於 -20 °C 冰箱。

2. 定量蛋白質

(1). 定量蛋白質標準品

以胎牛血清白蛋白(Bovine serum albumin : BSA)當作蛋白質標準品。取 2 毫升的 Bradford 染劑與 8 毫升 DDW (Double distilled

water)混合備用，然後取 15 μl 的蛋白質標準品與 735 μl 的 Bradford 染劑混和均勻取到 eppendorf 中，從各個蛋白質標準品中取出 200 μl /wel(三重複)到 96 well plate 中，利用酵素免疫分析儀 (ELISA Reader)在 595 nm 測定各蛋白質標準品的吸光值並算除平均值。利用 Microsoft office excel 軟體計算出蛋白質標準品吸光值與濃度之間的標準檢量線，並計算出趨勢線方程式以及 r^2 ($r^2 > 0.99$)。

蛋白質標準品的製備

將 3 毫克的 BSA 溶於 3 毫升的 DDW，配成 1000 $\mu\text{g/ml}$ ，當成 stock

表 4-4

BSA 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	1000	800	600	400	200	0
1000 $\mu\text{g/ml}$ BSA (μl)	1000	800	600	400	200	0
DDW (μl)	0	200	400	600	800	1000

(2) 樣品蛋白質定量

取 15 μl 的各樣品蛋白質與 735 μl 的 Bradford 染劑混和均勻取到 eppendorf 中，從各樣品蛋白質中取出 200 μl /wel(三重複)到 96 well plate 中，利用酵素免疫分析儀 (ELISA Reader)在 595 nm 測定各樣品蛋白質的吸光值並算除平均值。將平均值帶入趨勢線方程式，可以計算出該樣品蛋白質的濃度。

3. 電泳膠片製作

表 4-5 下層膠 (Separation gel) 的配製 (6 片膠)

材料	12% Separation gel
DDW	12.9 ml
Running buffer	7.5ml

40% Acrylamide/Bis (29 : 1)	9ml
10% SDS	0.3 ml
10% APS	0.3 ml
TEMED	13 μ l

表 4-6 上層膠 (Stacking gel) 之組成及配製 (6 片膠)

材料	Stacking gel
DDW	6.09 ml
Stacking buffer	1.59 ml
40% Acrylamide/Bis (29 : 1)	1.63 ml
10% SDS	0.3ml
10% APS	0.3 ml
TEMED	10 μ l

表 4-7 Running buffer (1.5M Tris- HCl, pH8.8) 的配製

材料	重量/體積
Tris	36.3 g
DDW	150 ml
HCl	調整 pH=8.8
調整 pH=8.8 之後加 DDW 使總體積等於 200 毫升	

表 4-8 Stacking buffer (0.5M Tris- HCl, pH6.8) 的配製

組成	重量/體積
Tris	3 g

DDW	40 ml
HCL	調整 pH=6.8
調整 pH=6.8 之後加 DDW 使總體積等於 50 ml	

將配置好的下層膠注入鑄膠台後，再加入 isopropanol 將膠壓平，靜置到 50 毫升離心管中的下膠凝固，將鑄膠台傾斜，使 isopropanol 流出，加入上層膠並插上梳子，要避免有氣泡產生。靜置到 15 毫升離心管中的下膠凝固，小心將梳子拔出，再將做好的膠放入電泳槽中，加入 Running buffer 以 70V 先預跑 30 分鐘。將樣品蛋白和 5x protein loading dye 混合並以 100°C 加熱 10 分鐘後，取 4 μ l 分子量標準品 (maker) 和 18 μ l 配置好的樣品由左而右分別 loading 到樣品槽中。剛開始以 70V 跑到上層膠與下層膠的界線，再以 100V、跑 90 分鐘。

表 4-9 電泳緩衝液的配製

材料	體積 (ml)
10 \times SDS buffer	200
DDW	1800
總體積 2000 ml	

4. 轉漬

先將轉漬夾打開後黑色面朝下，取出一片泡過轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 的海綿墊片放於其上面，之後並依序在海綿墊片放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 轉漬膜 (先泡過甲醇 5 分鐘，再放入轉漬緩衝液

中)、3M 濾紙，最後再放上一片海綿墊片後夾上轉漬夾(SDS-PAGE gel 與 PVDF 之間不要有氣泡)。放入已裝有 Transfer buffer 的電泳槽中，將黑夾朝負極、紅夾朝正極後，再放入冰盒並加滿轉漬緩衝液，於電泳槽外圍放入足夠的冰塊，使整各系統維持低溫狀態。以 400 mA、90 分鐘的條件下進行蛋白質轉漬。



圖 4-2 轉漬夾內部的組成

轉漬完成後，取出轉漬膜，以剪刀裁出適當的位置與大小，將轉漬膜以 0.02% tween 20/1×PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘。倒掉清洗液，加入 2%FBS (1 ml FBS+49 ml 0.02% tween 20/1x PBS) 進行 blocking 步驟，在室溫下搖 1 個小時。1 小時之後，將 blocking solution 倒掉，再以 0.05% tween 20/1×PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘。倒掉清洗液，加入配製好的一級抗體，放入 4 °C 冰箱搖 12~16 個小時。隔天取出轉漬膜 0.05% tween 20/1×PBS 清洗 5 分鐘 3 次，再加入 2 級抗體，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出轉漬膜以 0.05% tween 20/1×PBS 清洗 5 分鐘 3 次，進行壓片。

表 4-10 轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 之組成和配置

材料	重量/體積
Tris	6 g
Glycine	28.8 g
methanol	400 ml
DDW	1500 ml

5. 壓片（於暗房中進行）

將 Koda 感光相紙(勿弄濕)剪成適當的大小，放入乾淨的盒子中。將轉漬膜浸入混合的 ECL (Enhanced chemoluminsence)試劑中（每瓶各取 2ml 等比例混合）中反應 30 秒到 2 分鐘。以 2 張投影片黏貼於壓片匣（cassette）內，將轉漬膜正面朝上放置於壓片匣兩張投影片內，以 Koda 感光相紙放於投影片上，進行壓片，感光時間依轉漬膜上螢光強弱而定，約 5 秒至 40 分鐘不等。感光完成後，放入顯影劑進行顯影步驟（時間依實際觀察決定），再以清水清洗一下，放入定影劑約 40 秒，再以清水沖洗乾淨，底片晾乾後，再以分析軟體進行分析結果。

第三節、統計分析

本實驗所得資料以 SAS 統計軟體進行土壤分析，實驗結果以平均值±標準偏差(mean±SD)表示，利用單因子變異數分析(one-way analysis of variance；one-way ANOVA)來檢定多組之間差異，以 t-test 檢定兩組之間差異

第五章 結果

本實驗將探討蜂肽 (A.M. Bee venom) 造成人乳癌細胞株(MCF-7) 凋亡機制。就五個部份探討：

1. 蜂肽 (A.M. Bee venom) 對 MCF-7 形態、增生及細胞週期之影響。
2. 利用 DAPI staining、comet assay 觀察蜂肽(A.M. Bee venom)對 MCF-7 是否會造成 DNA 損傷。
3. 蜂肽 (A.M. Bee venom) 是否影響 MCF-7 粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 的改變、活性氧成份 (Reactive oxygen species) 的釋出。
4. 利用西方墨點法 (Western blot) 探討凋亡途徑相關蛋白。

第一節 蜂肽 (A.M. Bee venom) 對人乳癌細胞株(MCF-7)形態的影響

加入不同濃度的蜂肽 (2.5、5、10、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，培養 48 小時之後，以倒立式相位差顯微鏡觀察並拍照(圖 5-1)。發現 MCF-7 在 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 已有明顯抑制細胞生長作用，在 5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑制 MCF-7 生長的效果更加明顯，可看到細胞膜不完整、細胞數目減少。加入 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蜂肽，培養 0、6、12、24、48、72 小時，發現隨著時間增加、細胞膜不完整、細胞數目減少等現象會更明顯(圖 5-2)。

第二節 蜂肽 (A.M. Bee venom) 抑制人類乳癌細胞株(MCF-7)增生的效果

利用 MTT assay 來評估 MCF-7 增生的情況，發現 MCF-7 隨著蜂肽 (A.M. Bee venom) 的濃度或培養時間的增加，抑制 MCF-7 增生的效果更加顯著，具有濃度與時間的效應。加入不同濃度的蜂肽培養 24 小時，發現 7.5、10、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 都可以有效的抑制 MCF-7 的增生(圖 5-3)：加

入不同濃度的蜂肽培養 48 小時，發現 2.5、5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 都可以有效的抑制 MCF-7 的增生，7.5 $\mu\text{g/ml}$ 這個濃度可以抑制增生大約為 50%(圖 5-4)。

第三節 蜂肽 (A.M. Bee venom) 對人類乳癌細胞株 (MCF-7) 之細胞週期影響

本實驗是將不同濃度蜂肽 (0、2.5、5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g/ml}$) 培養 24 小時之後，利用流式細胞儀偵測細胞週期變化的情形(圖 5-5)。將 MCF-7 細胞的細胞週期分成： G_0/G_1 、S、 G_2/M 、 $subG_1$ ，每一個時期以百分比表示，各個濃度實驗均三重複。由統計結果顯示在 24 小時處理後，0、2.5、5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 之 G_0/G_1 分別為 $56.67\pm 0.97\%$ ； $57.61\pm 0.86\%$ ； $57.96\pm 1.4\%$ ； $62.1\pm 0.69\%$ ； $62.09\pm 1.13\%$ ； $55.01\pm 3.01\%$ 。2.5、5、7.5、10 $\mu\text{g/ml}$ 這四個濃度的 G_0/G_1 有些微上升，從統計圖來看 7.5、10 $\mu\text{g/ml}$ 這兩個濃度的 G_0/G_1 在統計上有顯著的增加，10 與 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 G_2/M 也有顯著性的增加，而 $SubG_1$ 則是在 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 有顯著的增加(圖 5-6)。以 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 培養 0、6、12、24、48、72 小時，利用流式細胞儀偵測細胞週期變化的情形(圖 5-7)。由統計結果顯示， G_0/G_1 分別為 $56.45\pm 1.00\%$ ； $53.7\pm 1.84\%$ ； $62.69\pm 1.00\%$ ； $62.76\pm 0.06\%$ ； $59.19\pm 0.15\%$ ； $45.9\pm 1.83\%$ 。從統計圖可以發現 G_0/G_1 在 12、24、48 小時有顯著性的增加，S 在 48 與 72 小時也有顯著性的增加， $Sub G_1$ 在 24、48、72 小時都有顯著性的增加。由此實驗結果，蜂肽可能使細胞週期停滯，進而導致細胞凋亡(圖 5-8)。

第四節 利用流式細胞儀來偵測蜂(A.M. Bee venom)肽對人類乳癌細胞株(MCF-7)的影響

一. 活性氧成分(Reactive oxygen species ; ROS)產生的影響

活性氧成分(ROS)的產生會毒殺細胞，當有大量的 ROS 生成會造成粒腺體膜電位的下降。由圖顯示，以蜂肽(7.5 $\mu\text{g/ml}$)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)，在 1、3 小時可以顯著性的增加 ROS 的產生，在 12、24、48 小時則活性氧成分的釋放被抑制了。

二. 粒腺體膜電位(Mitochondrial membrane potential)的影響

當有外來刺激物影響粒線體時，例如 ROS 的釋放會影響粒腺體的膜電位。由上述的結果得知，蜂肽會誘導人類乳癌細胞株(MCF-7)產生活性氧成分。由圖顯示，以蜂肽(7.5 $\mu\text{g/ml}$)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)，在 1、3、6、12、24、48 小時可以顯著性的降低粒線體膜電位，雖然在 3 小時之後有回升的現象，但是仍比控制組(0 h)低。

第五節 蜂肽 (A.M. Bee venom) 是否會造成人類乳癌細胞株(MCF-7)之 DNA 損傷

一. DAPI staining

以 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 培養 MCF-7 0、6、12、24、48 小時，以 DAPI 染劑將細胞染色，再以螢光顯微鏡觀察並拍照。由圖(5-11)可發現隨著培養時間的增加，細胞核內的螢光強度越明顯，證實蜂肽會造成人類乳癌細胞株(MCF-7)之 DNA 損傷。

二. Comet assay

以不同濃度的蜂肽(0、2.5、5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g/ml}$)培養人類乳癌細胞株 MCF-7 24 小時，利用電泳可將損傷的 DNA 拖出膜外的原理，加入

PI 染劑來觀察拖尾的程度，由圖(5-12)可發現隨著濃度的增加，拖尾的程度越嚴重。

第六節 利用西方墨點法來探討蜂肽(A.M. Bee venom)對人類乳癌細胞株(MCF-7)的抗氧化酵素蛋白表現

細胞中的 ROS 主要來自於粒腺體所進行的電子傳遞鏈，細胞中的抗氧化酵素可以清除過多 ROS，使細胞存在一個氧化還原平衡的狀態之下。本實驗經由西方墨點法來探討蜂肽培養 MCF-7 時，細胞 glutathione S transferase (GST)、superoxide dismutase-Mn(SOD-Mn)、superoxide dismutase -Cu/Zn(SOD-Cu/Zn)、catalase 這些抗氧化物酵素的蛋白表現量變化。由結果(圖 5-13)發現，GST、SOD(Cu/Zn)的蛋白表現量隨著培養的時間增加而減少，catalase 與 SOD(Mn)的蛋白隨著培養時間也有些微減少。

第七節 利用西方墨點法來探討蜂肽(A.M. Bee venom)對人類乳癌細胞株(MCF-7)的調控細胞週期蛋白表現

經由流式細胞儀分析，蜂肽會誘導 MCF-7 細胞週期停滯在 G_0/G_1 與 S 期(圖 5-8)而造成停滯的原因可能是蜂肽調控了 G_0/G_1 近入到 S 期與 S 進入到 G_2/M 的調控蛋白表現，所以利用西方墨點法來探討調控細胞週期之相關蛋白的表現。由結果(圖 5-14)發現，cyclin-dependent protein kinase 中的 p53、p27 隨著培養的時間而增加，但是 p21 則隨著培養的時間而減少，p16 的表現幾乎不受影響，Cdk2 則是到了 48 小時才明顯的減少。

第八節 利用西方墨點法來探討蜂肽(A.M. Bee venom)對人類乳癌細胞株(MCF-7)凋亡相關蛋白表現

一、粒腺體途徑

先前已利用流式細胞儀偵測發現，以蜂肽培養會造成 MCF-7 的粒腺體膜電位下降，由西方墨點法發現，Bcl-2 family 中的促凋亡蛋白 Bax 表現量，實驗組均比控制組高；而抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 表現量，實驗組均比控制組低(圖 5-15)。粒腺體釋放出來的促凋亡蛋白：cytochrome c、AIF、Endo G 的實驗組蛋白表現量均比控制組高(圖 5-16)。Cytochrome c 增加會降解 pro-caspase 9 變成活化態的 caspase 9，然後活化態的 caspase 9 會與 Apaf 結合，進一步活化 caspase 3，活化態的 caspase 3 會裂解細胞核內的 PARP，使 PARP 失去修復受損 DNA 的功能，使細胞走向凋亡。Apaf 在 24 小時蛋白表現量比控制組高(圖 5-17)；實驗組的 pro-caspase 9 蛋白表現均比控制組低(圖 5-17)；實驗組的 pro-caspase 3 蛋白表現量在 12、24、48 小時比控制組低(圖 5-17)，實驗組 act-caspase 3 蛋白表現量在 6、12、24、48 小時均比控制組高(圖 5-17)；實驗組的 pro-PARP 在 6、12、24、48 小時均比控制組低(圖 5-17)。

二、死亡接受體途徑

本實驗想探討蜂肽誘導 MCF-7 走向凋亡是否會經由死亡接受體途徑，利用西方墨點法來觀察死亡接受體的相關蛋白表現。經結果(圖 5-18)發現，實驗組的 Fas 表現量均比控制組高，接著裂解 pro-caspase 8，實驗組的 pro-caspase 8 均比控制組低，活化的 caspase 8 可以直接活化 caspase 3 造成 MCF-7 凋亡。活化的 caspase 8 也會使 Bid 裂解成 t-Bid，Bid 的蛋白表現量在 6 小時之後就減少，t-Bid 在 48 小時增加(圖 5-18)，

tBid 則會活化 Bax，進而影響粒腺體膜電位，釋放出促凋亡蛋白，造成 MCF-7 凋亡。

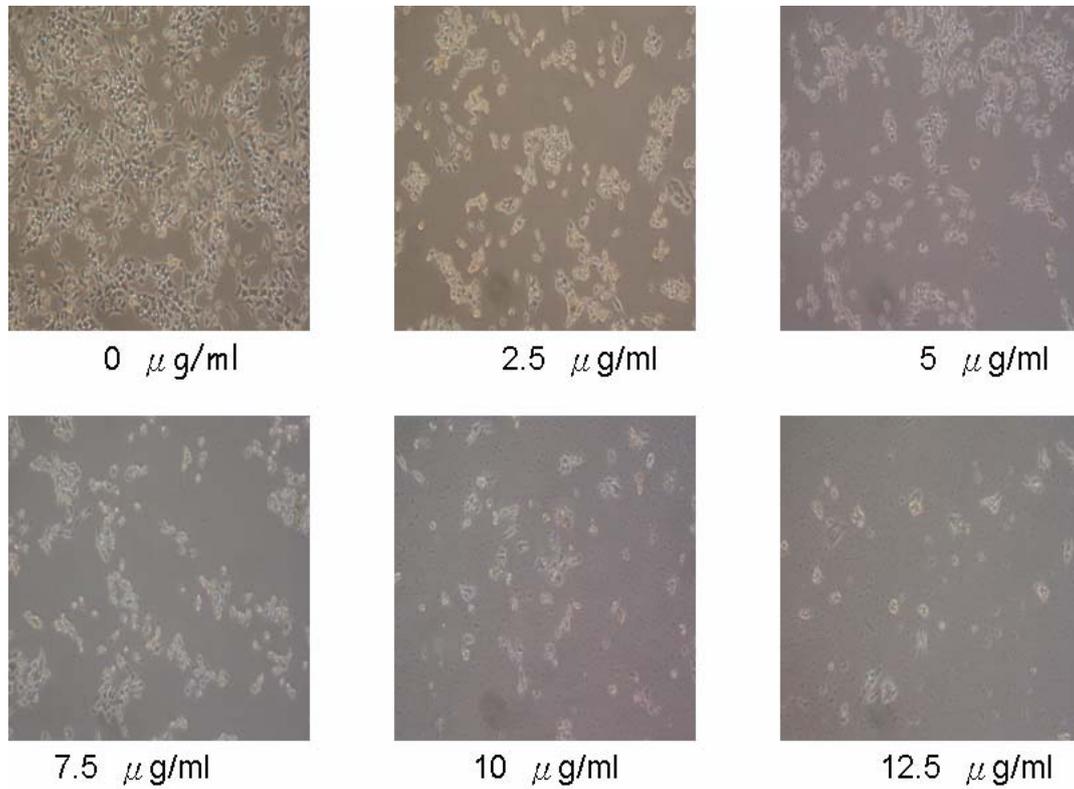


圖 5-1

以不同濃度之蜂肽(0、2.5、5、7.5、10、12.5 μg/ml)培養人類乳癌細胞株(MCF-7) 48 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞形態及數目的變化

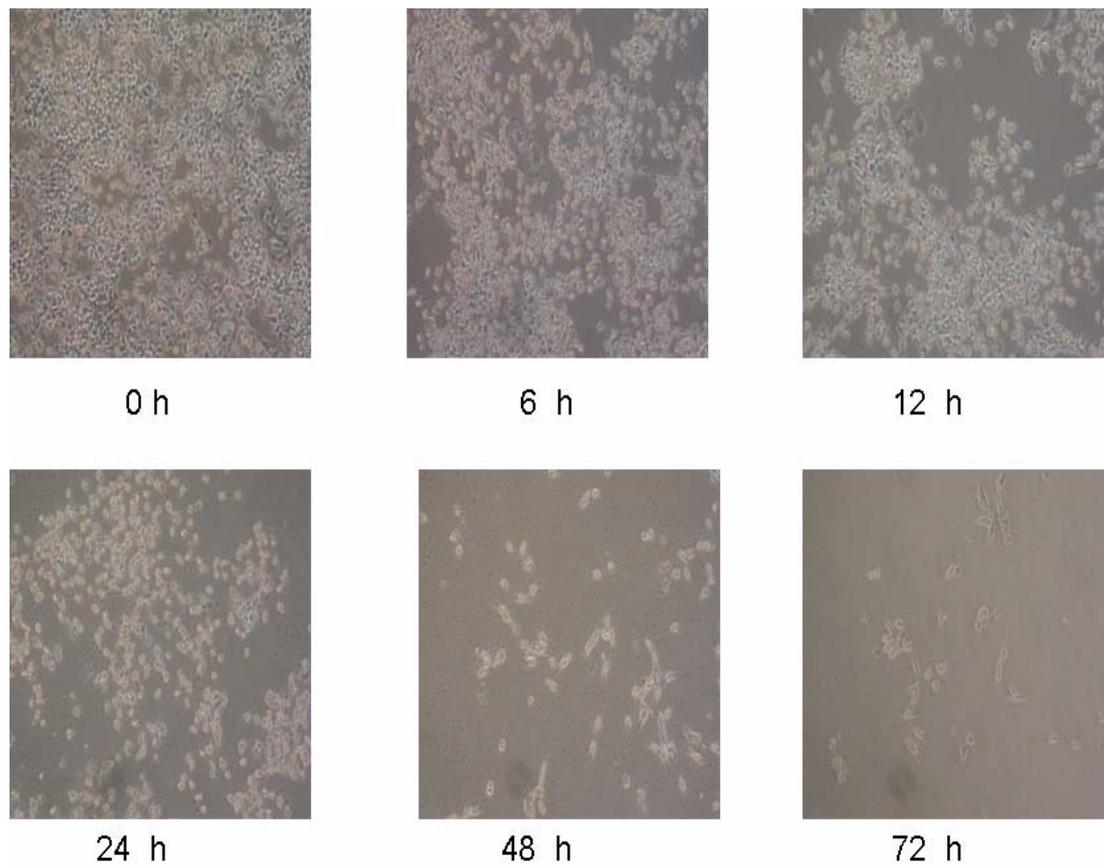


圖 5-2

以 $7.5\mu\text{g/ml}$ 之蜂肽培養培養人類乳癌細胞株(MCF -7) 6、12、24、48、72 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態及數目的變化

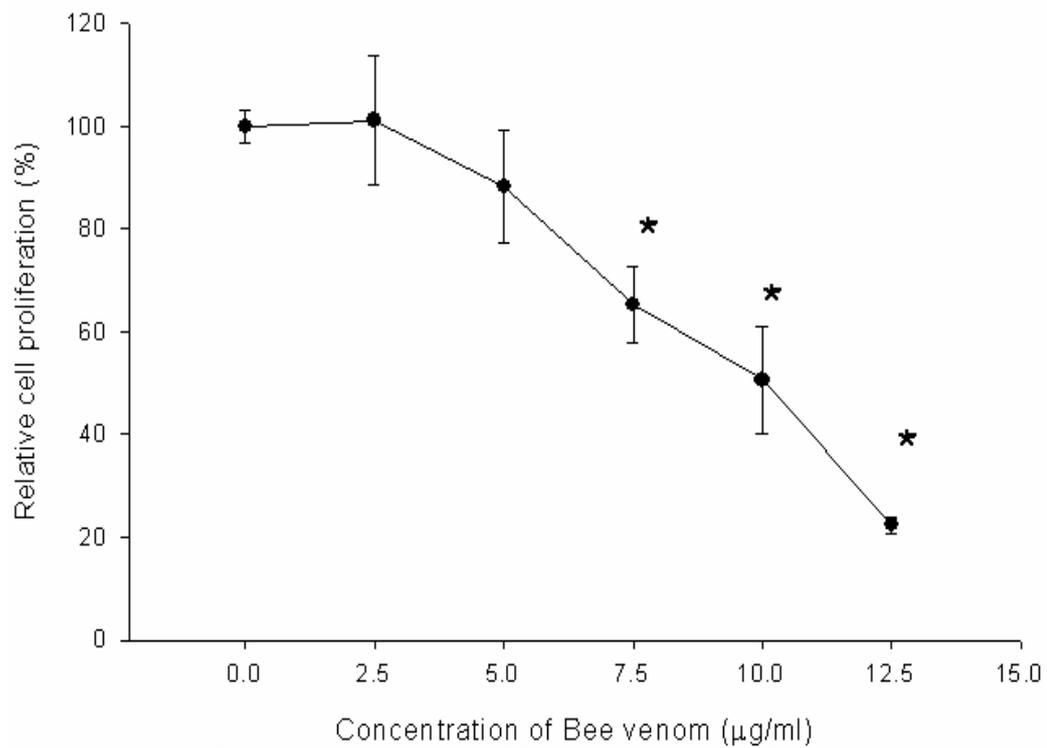


圖 5-3
利用 MTT assay 測量不同濃度之蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞
株(MCF -7) 24 小時之增生影響

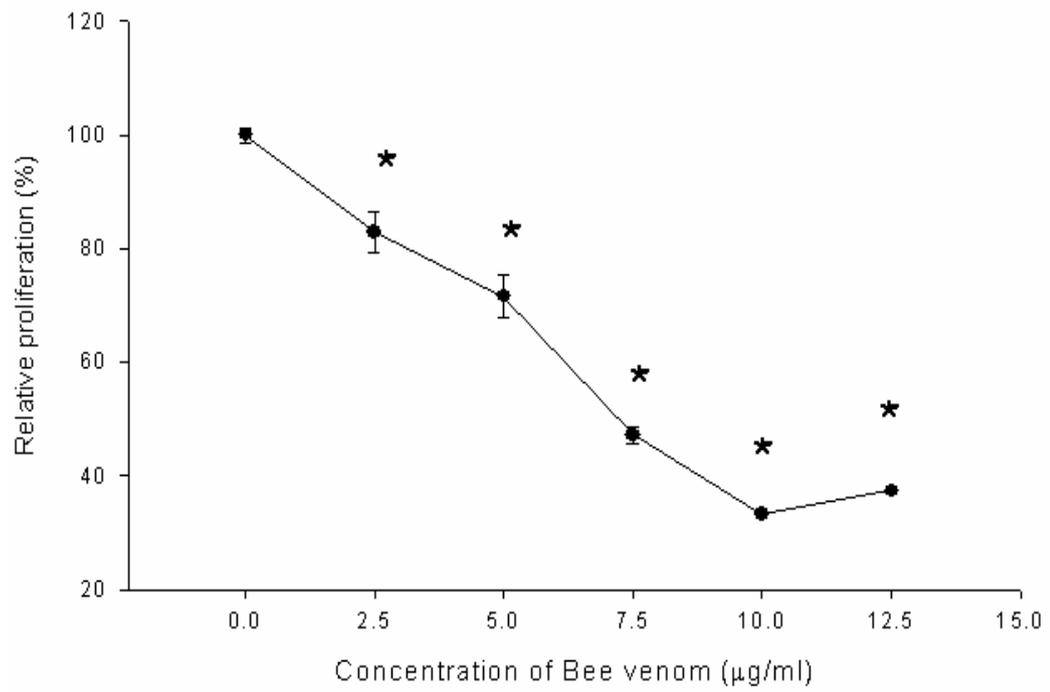


圖 5-4
利用 MTT assay 測量不同濃度之蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞
株(MCF -7) 48 小時之增生影響

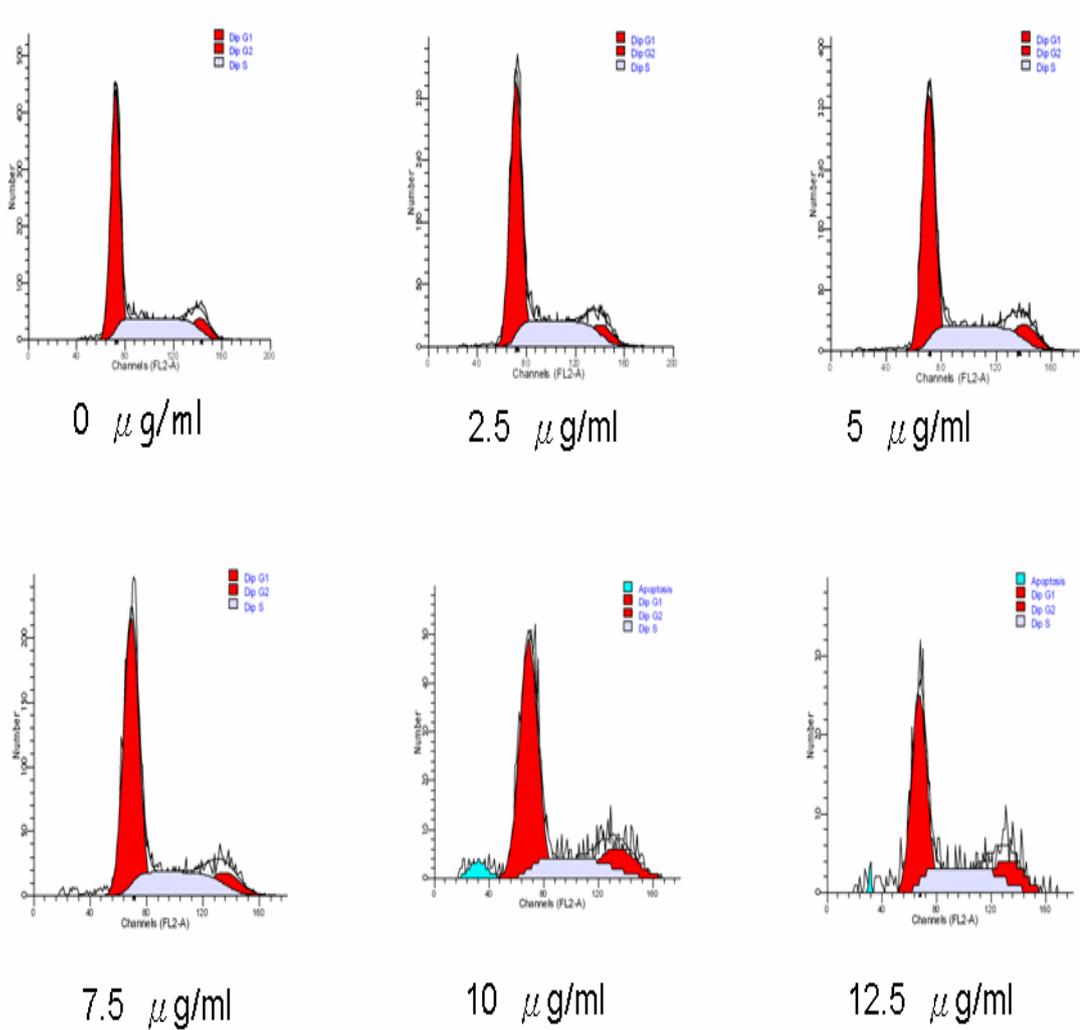


圖 5-5
利用流式細胞儀評估各濃度的蜂肽處理人類乳癌細胞株 MCF-7 24 小時之細胞週期變化

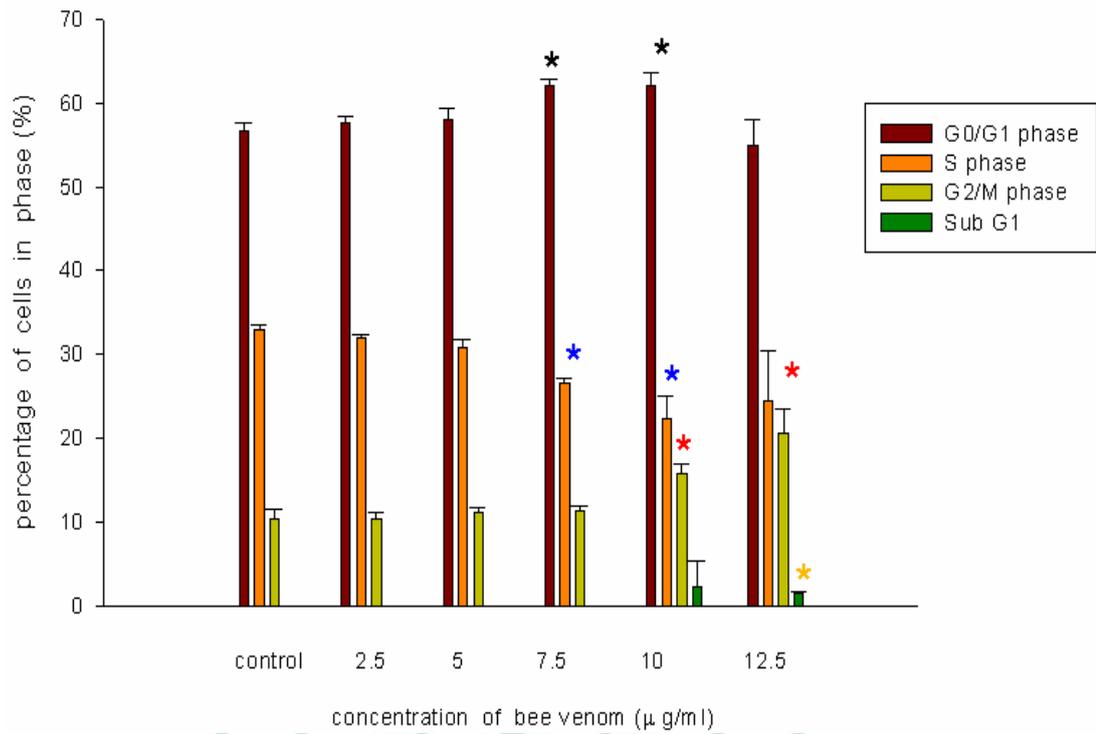


圖 5-6
 利用流式細胞儀評估各濃度的蜂肽處理人類乳癌細胞株 MCF-7 24
 小時之細胞週期變化
 *代表 $p < 0.05$

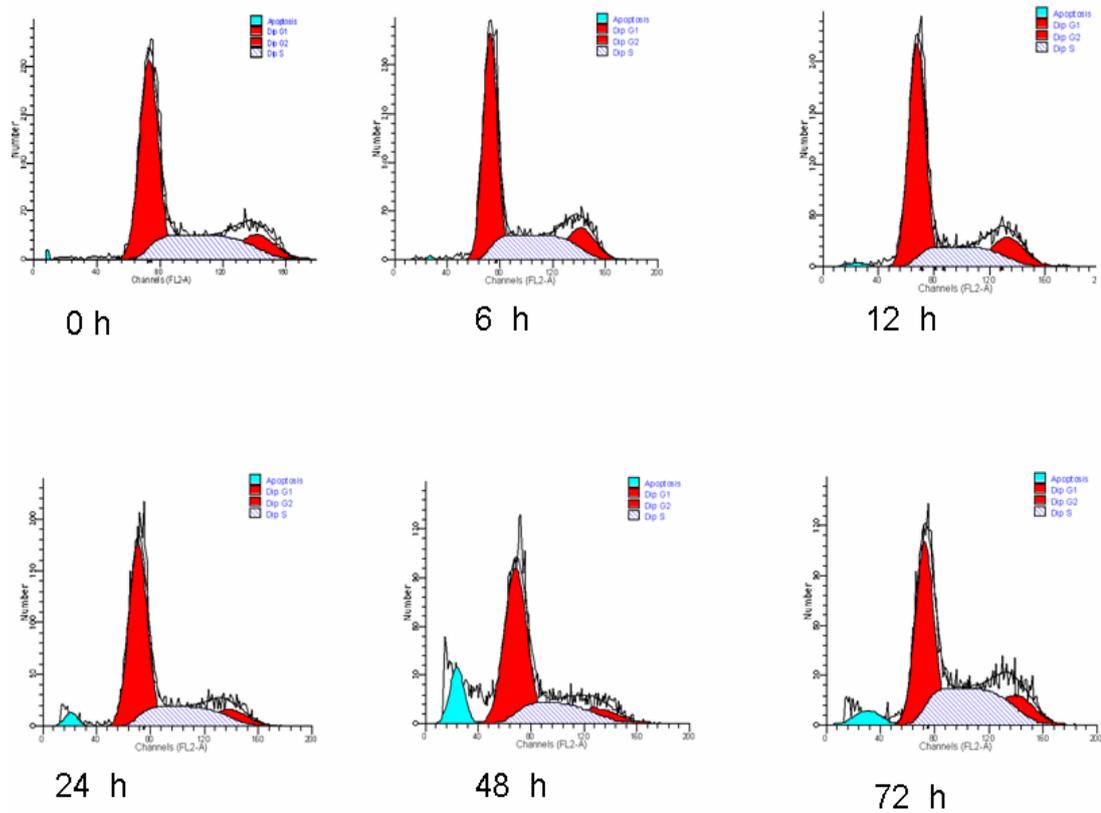


圖 5-7
 利用流式細胞儀評估蜂肽(7.5 µg/ml)處理人類乳癌細胞株 MCF-7
 0、6、12、24、48、72 小時之細胞週期變化

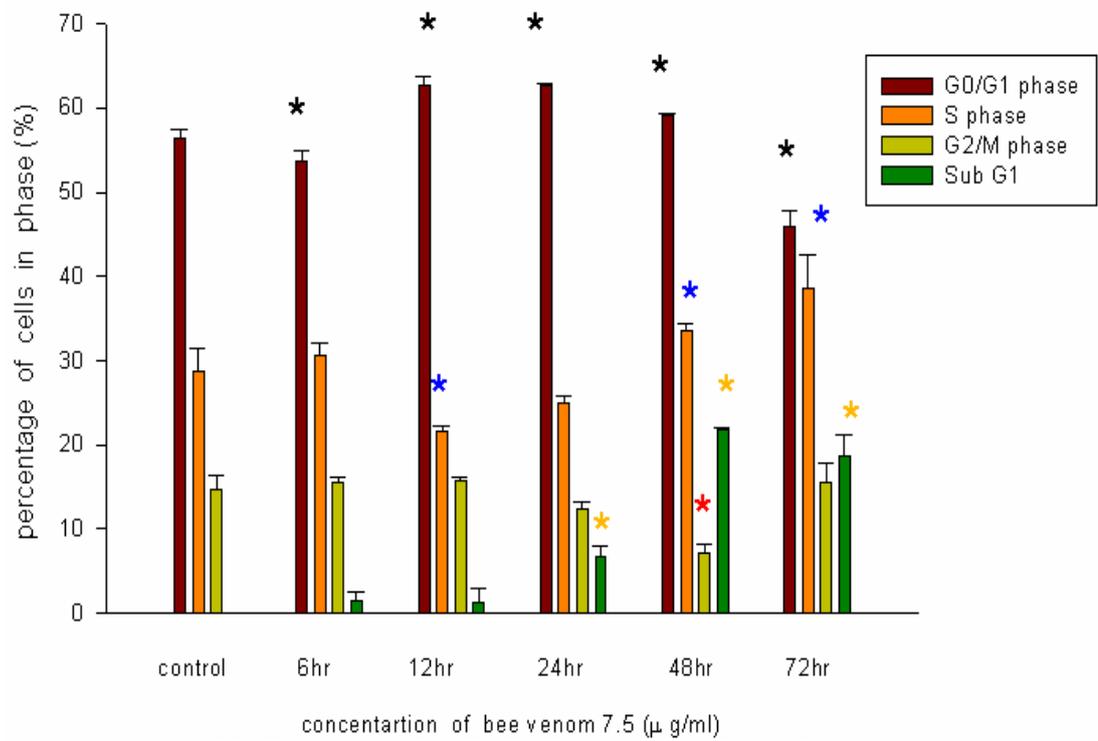
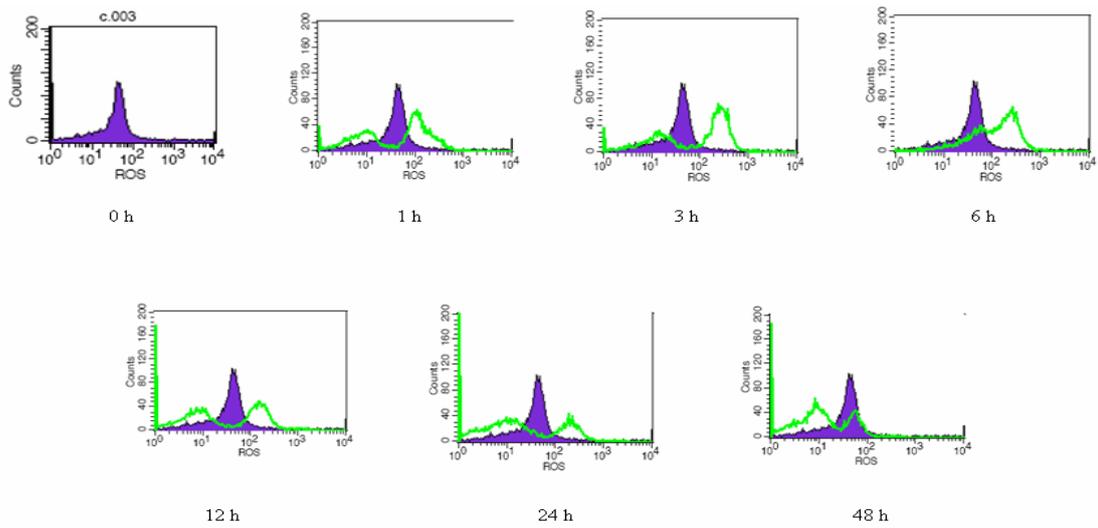


圖 5-8
 利用流式細胞儀評估蜂肽(7.5 µg/ml)處理人類乳癌細胞株 MCF-7
 0、6、12、24、48、72 小時之細胞週期變化
 *代表 $p < 0.05$



Reactive oxygen species of MCF 7

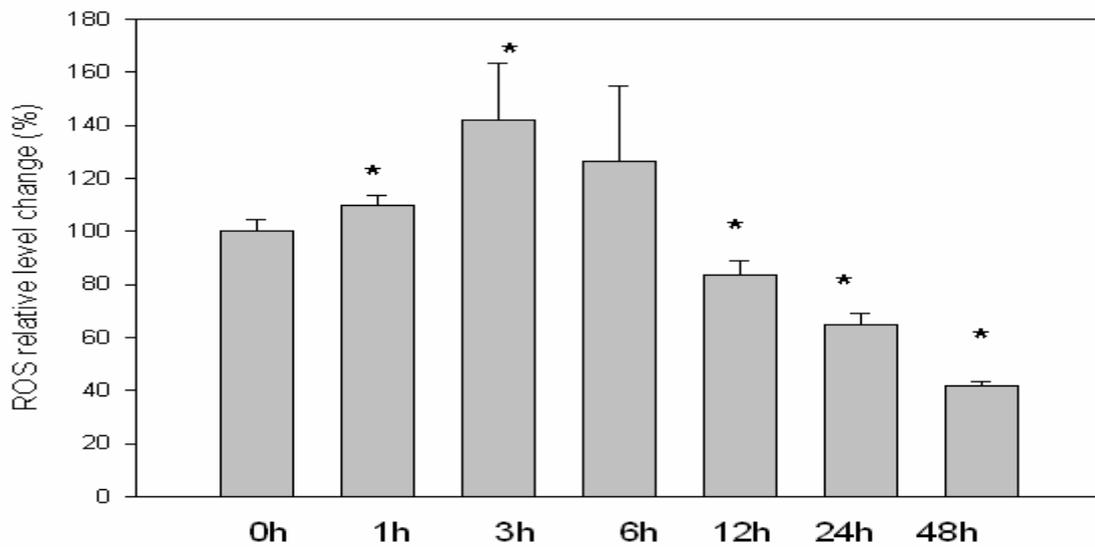
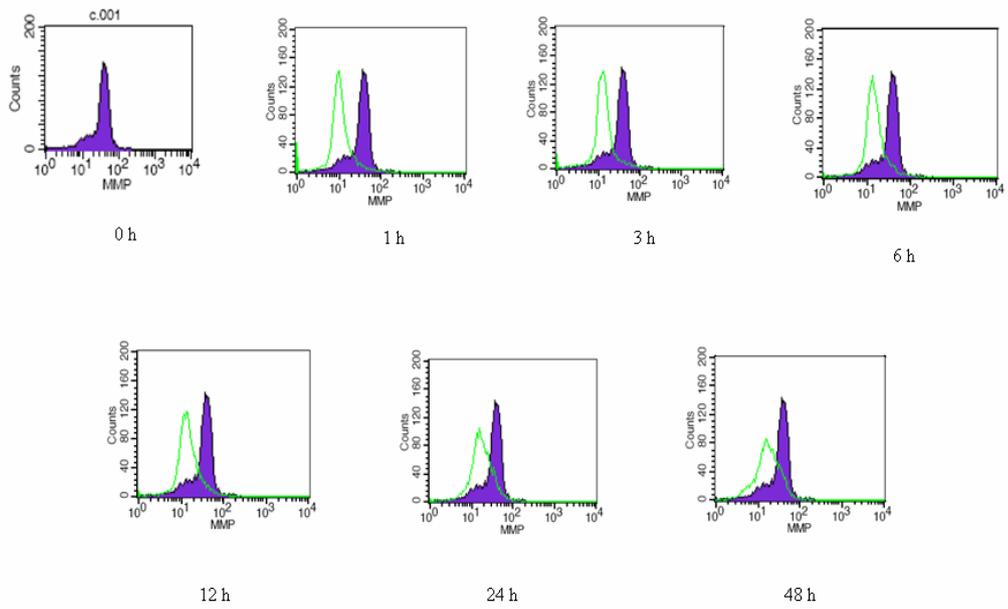


圖 5-9

利用流式細胞儀來評估蜂肽處理人類乳癌細胞株 MCF-7 在 0、1、3、6、12、24、48 小時活性氧成分釋放之變化

*代表 $p < 0.05$



Mitochondrial membrane potential of MCF 7

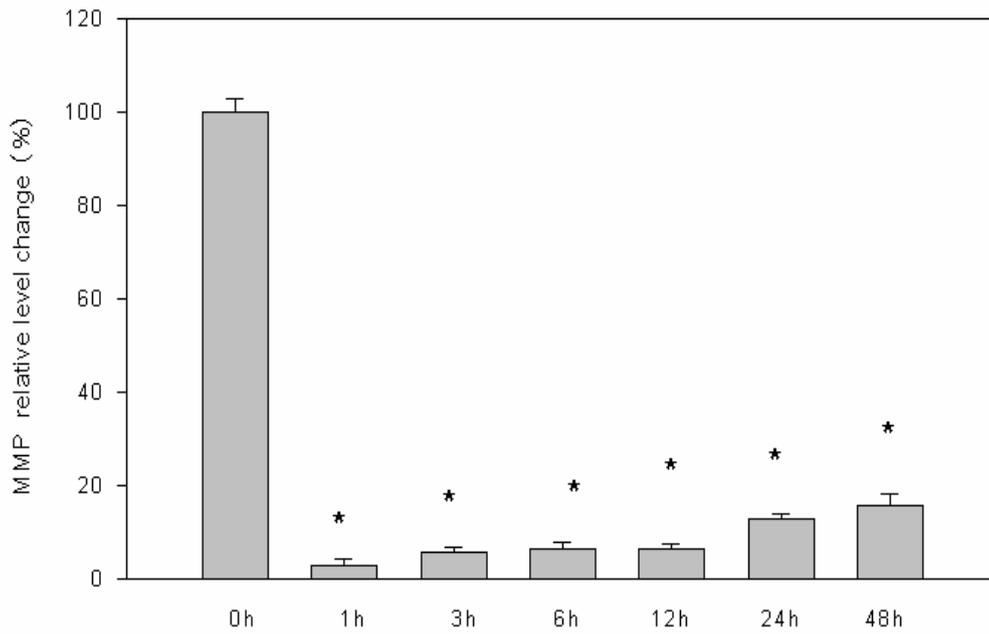


圖 5-10

利用流式細胞儀來評估蜂肽處理人類乳癌細胞株(MCF-7) 0、1、3、6、12、24、48 小時粒腺體膜電位之改變

*代表 $p < 0.05$

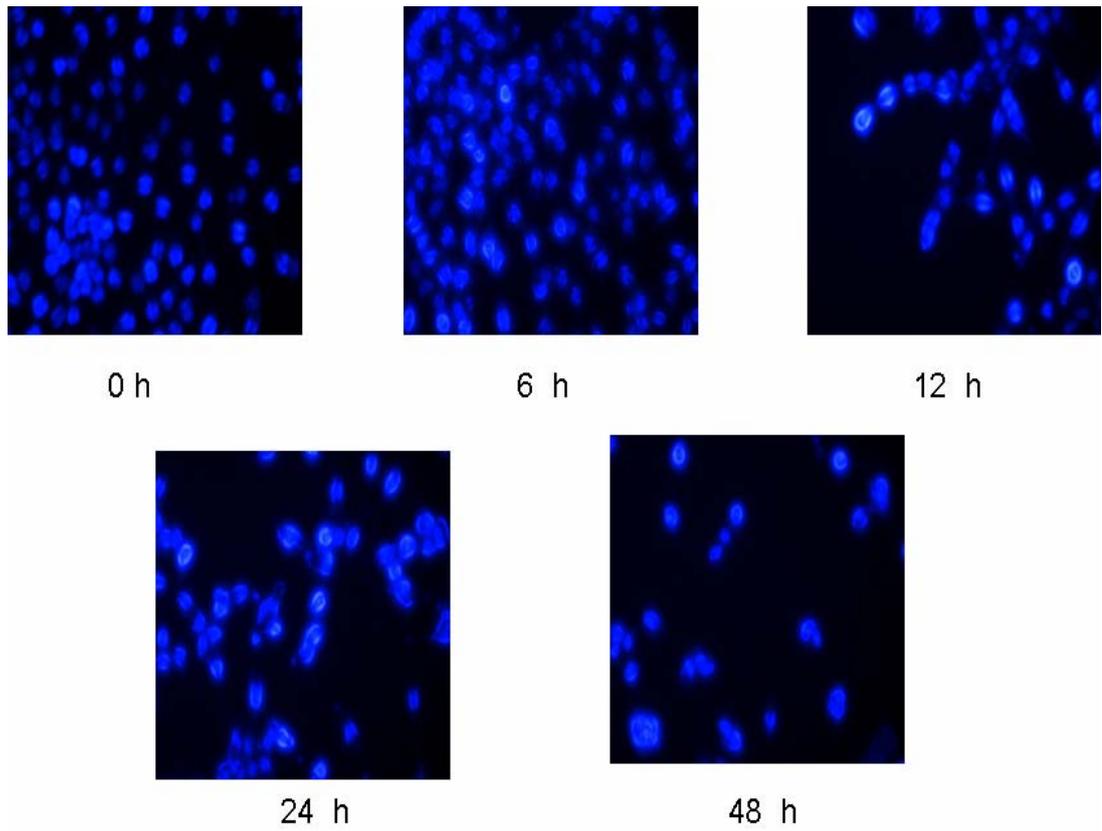


圖 5-11

利用 DAPI staining 觀察以 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 培養 MCF-7 0、6、12、24、48 小時的 DNA 損害情形。

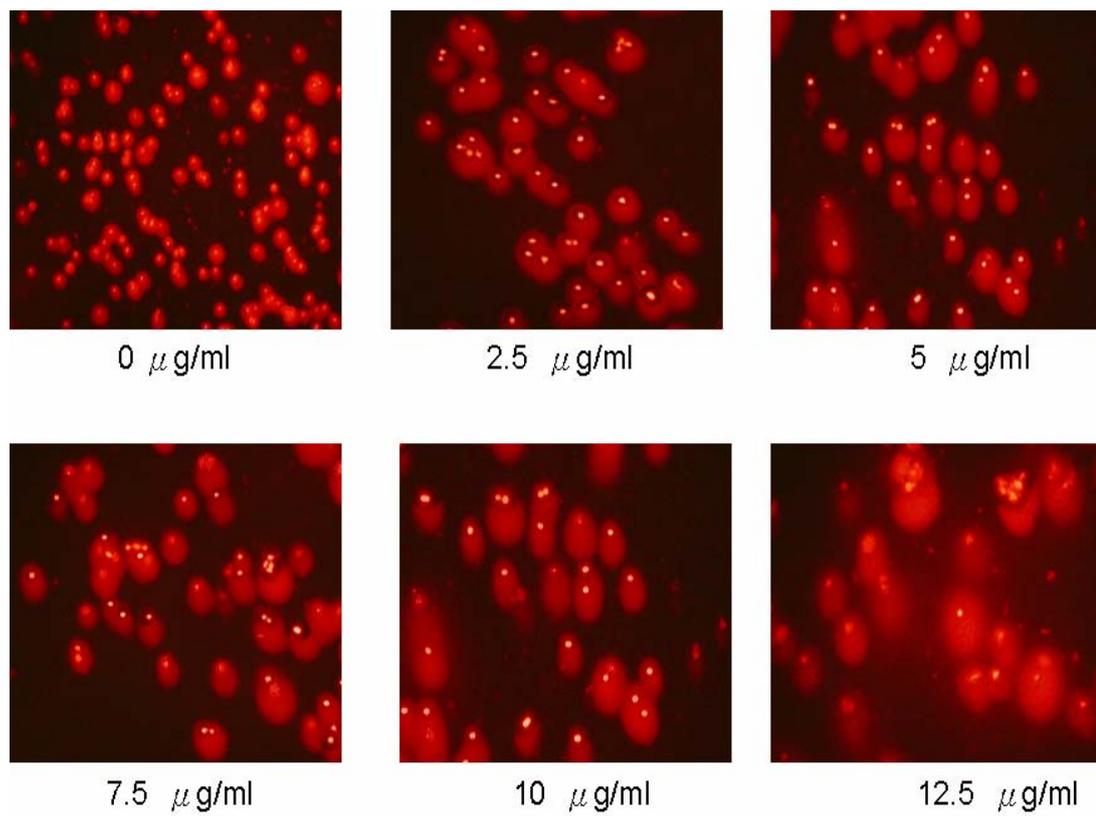


圖 5-12 (200X)
利用 Comet assay 觀察以不同濃度的蜂胎(Bee venom) 培養 MCF-7 24 小時的 DNA 損害情形

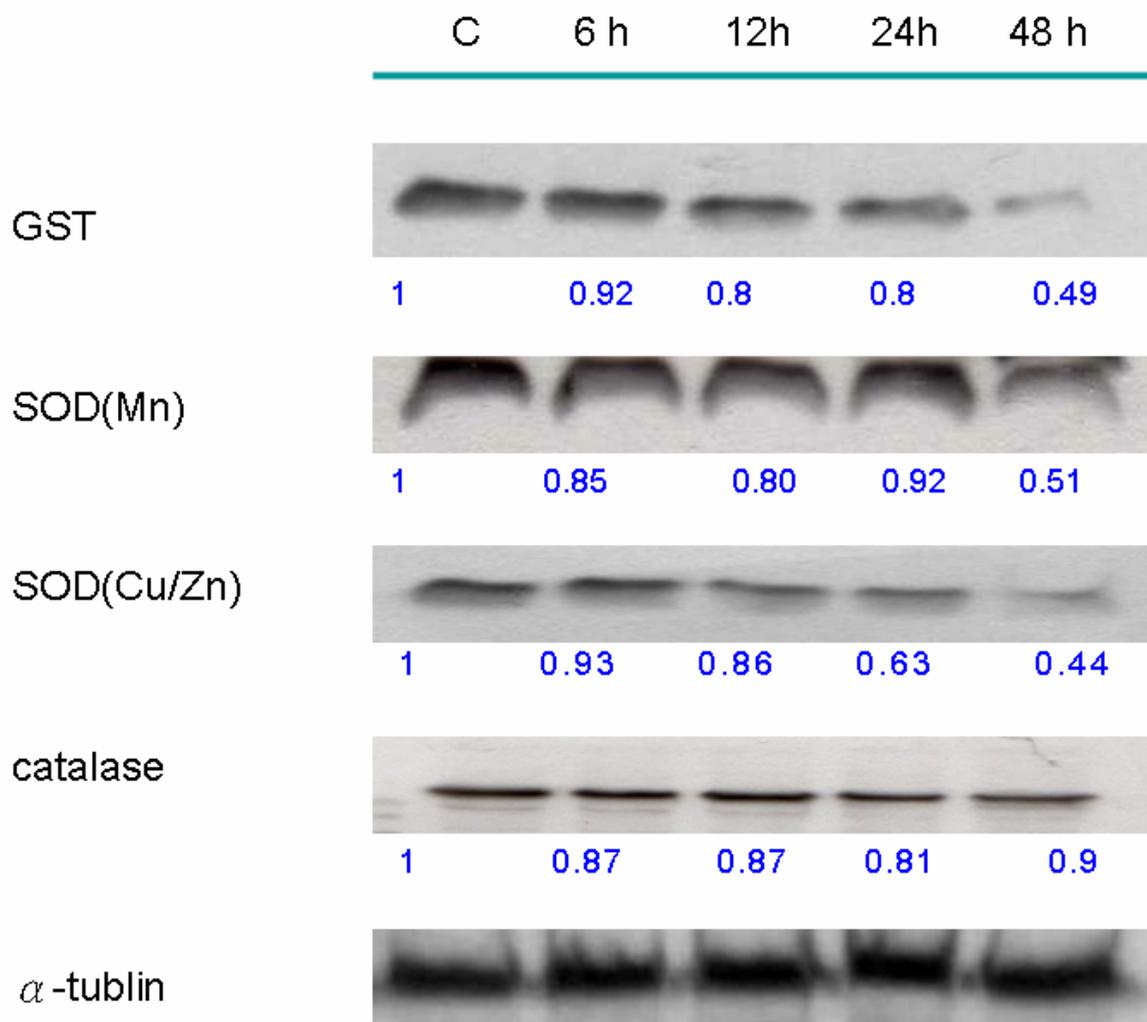


圖 5-13

利用西方墨點法來探討以蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)各個時間(0、6、12、24、48 小時)後，分析細胞中 GST、SOD(Mn)、SOD(Cu/Zn)、catalase 等蛋白的相對表現量

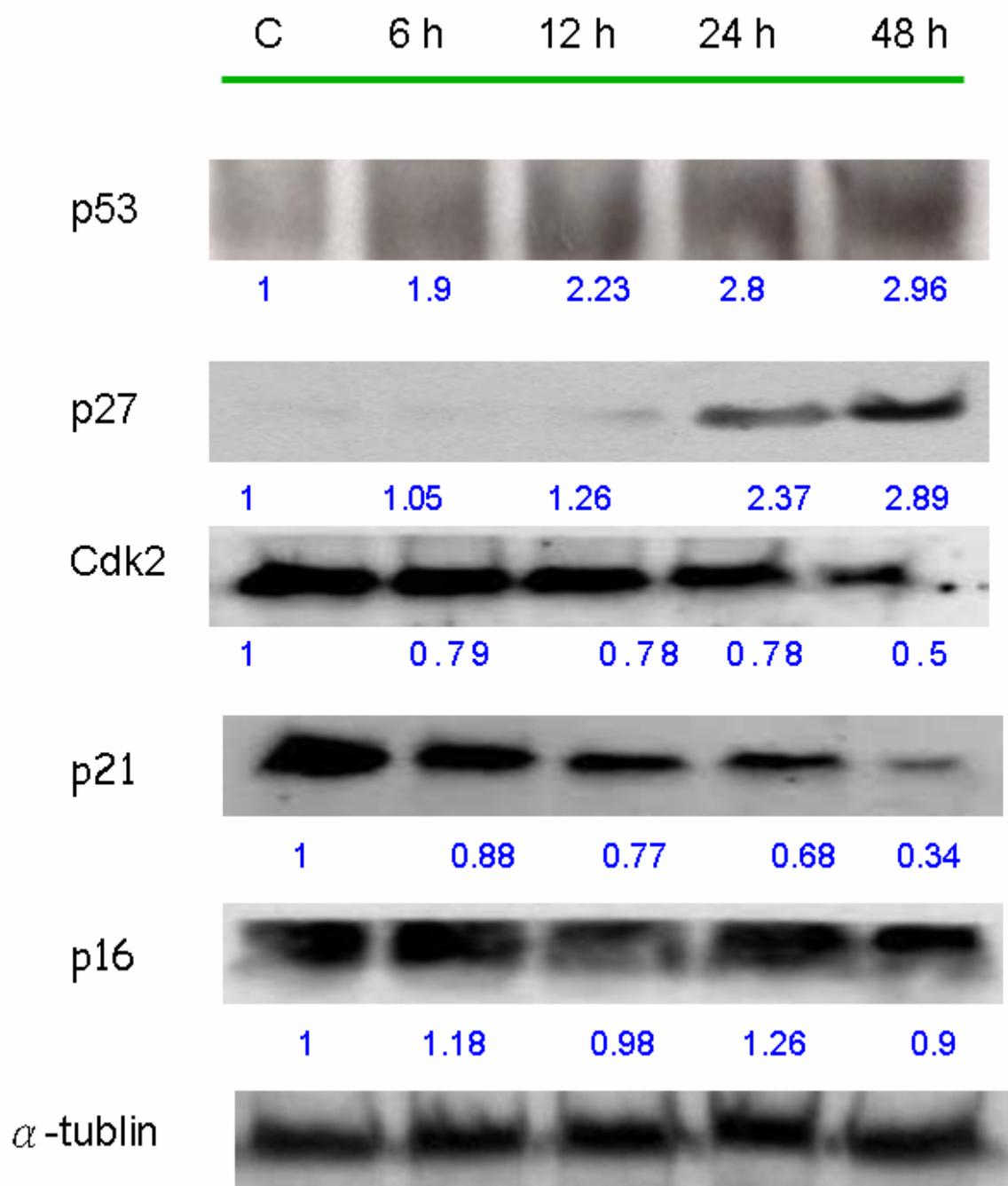


圖 5-14

利用西方墨點法來探討以蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)各個時間(0、6、12、24、48 小時)後，分析細胞中 p53、p27、Cdk2、p21、p16 等蛋白的相對表現量

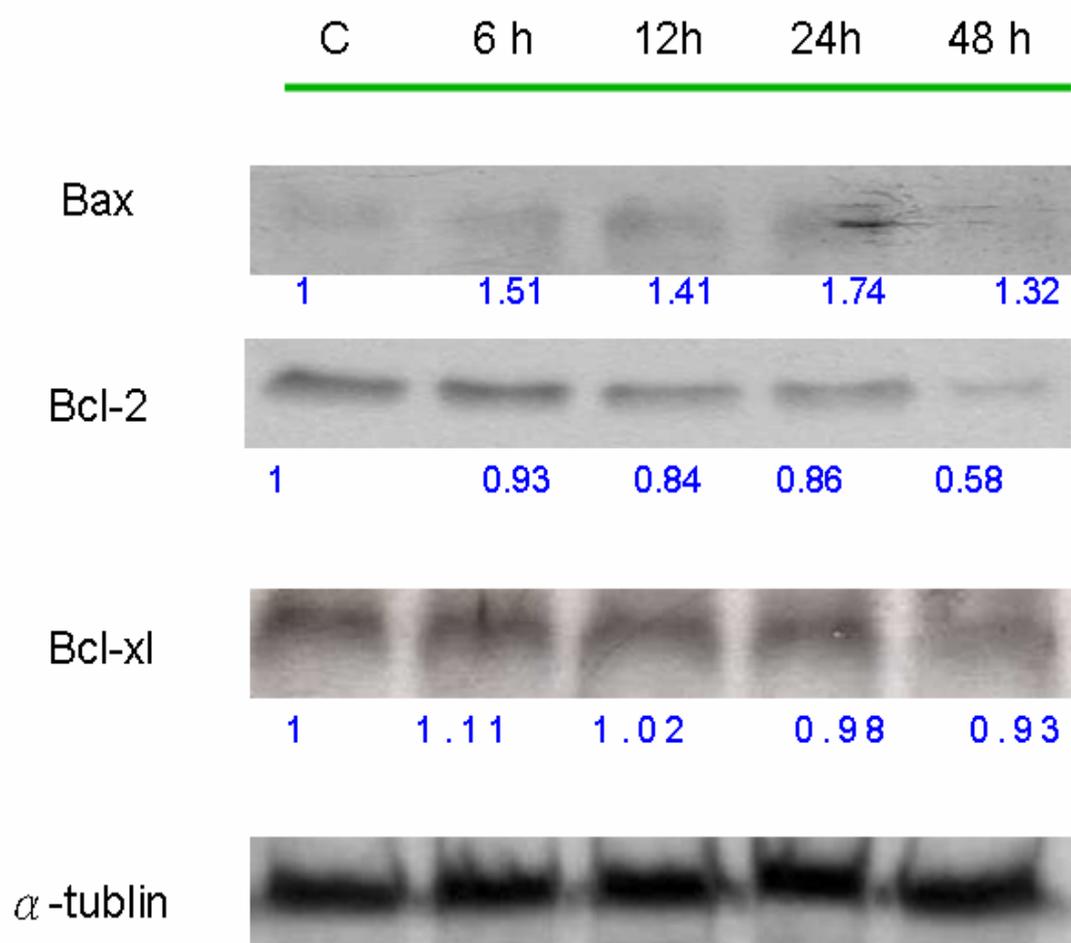


圖 5-15

利用西方墨點法來探討以蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)各個時間(0、6、12、24、48 小時)後，分析細胞中 Bax、Bcl-2、Bcl-xl 等蛋白的相對表現量

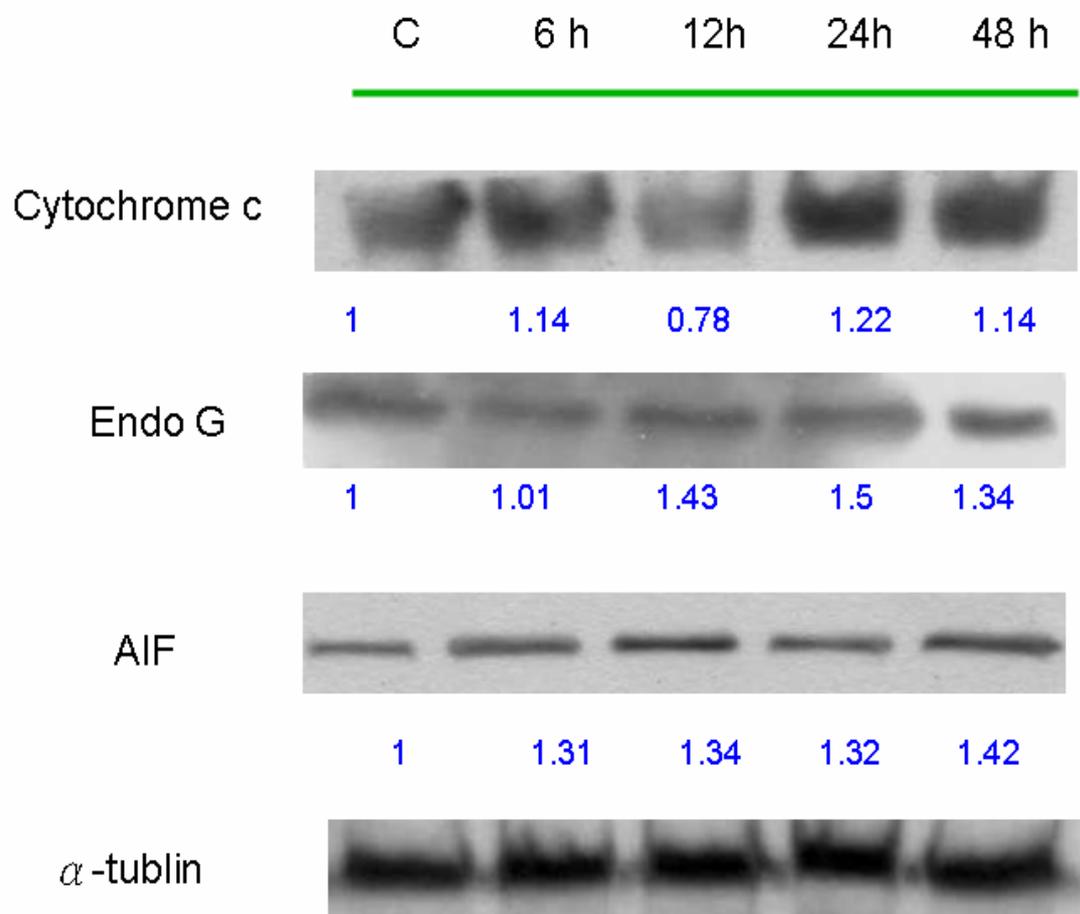


圖 5-16

利用西方墨點法來探討以蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)各個時間(0、6、12、24、48 小時)後，分析細胞中 cytochrome c、AIF、Endo G 等蛋白的相對表現量

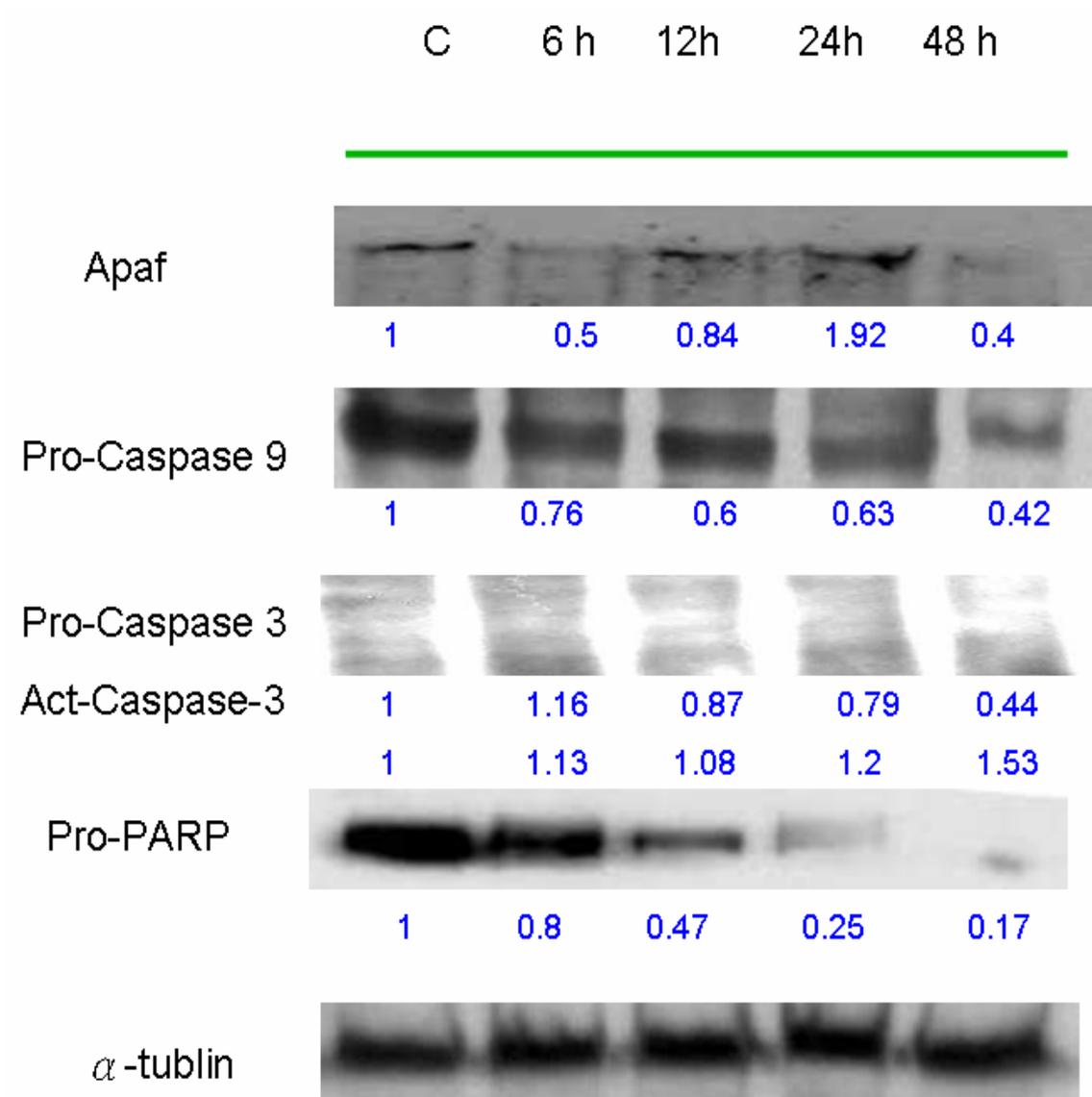


圖 5-17

利用西方墨點法來探討以蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)各個時間(0、6、12、24、48 小時)後，分析細胞中 Apaf、Pro-caspase-9、caspase-3、Pro-PARP 等蛋白的相對表現量

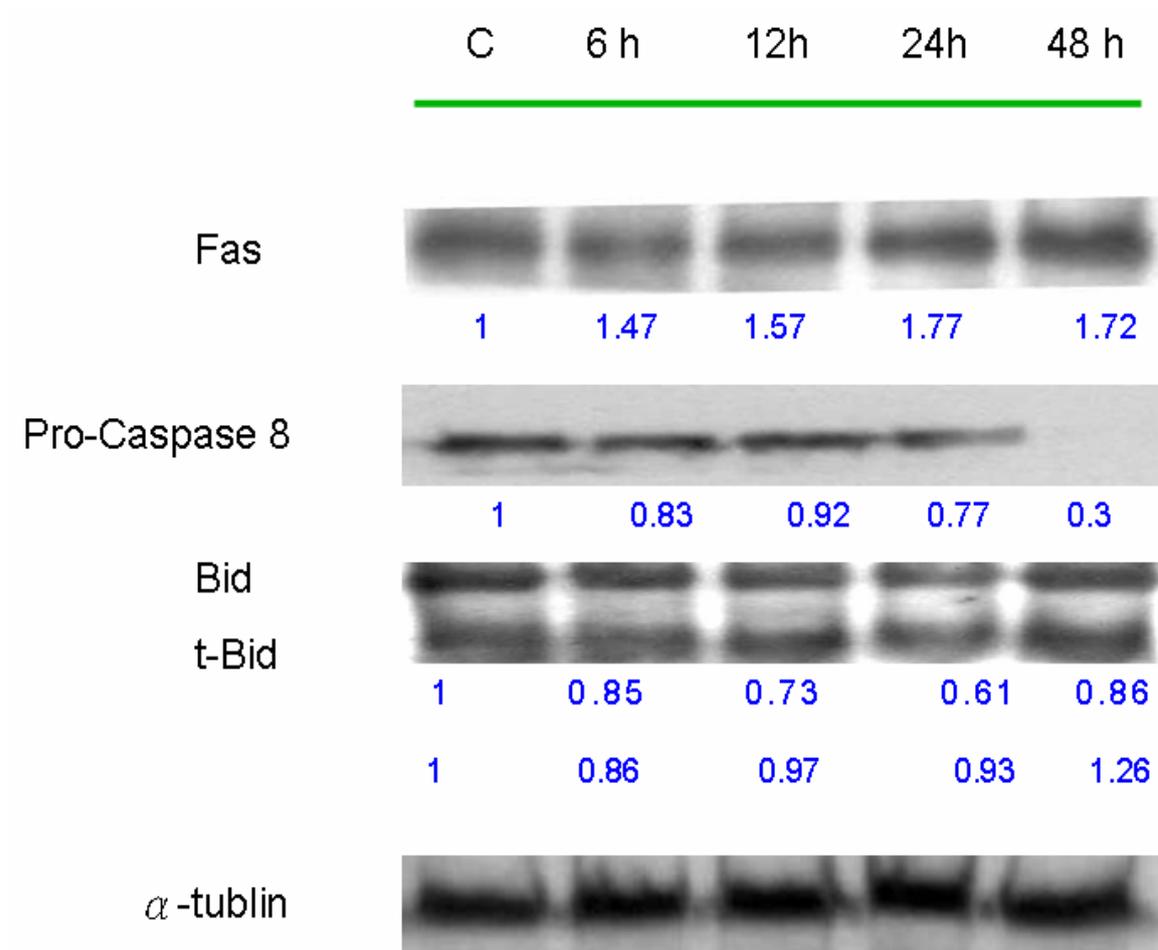


圖 5-18

利用西方墨點法來探討以蜂肽(Bee venom)培養人類乳癌細胞株(MCF-7)各個時間(0、6、12、24、48 小時)後，分析細胞中 Fas、Pro-caspase-8、Bid 等蛋白的相對表現量

第六章 討論

蜂肽是一種複合物，研究上已經證實蜂肽具有多種功能，如抗關節炎、減輕疼痛、抗癌等。在體內或體外實驗已經證實蜂肽可以抑制多種癌細胞的生長，如人類肺癌細胞株(NCI-H1299)、人類肝癌細胞株(SMMC-7721)、人類淋巴瘤細胞株(U937)等(17, 57-59)。雖然有文獻指出，將乳癌細胞轉殖到正常的小鼠，讓小鼠自然的長出腫瘤，將蜂肽以注射的方式到有自發性腫瘤的小鼠身上，發現隨著蜂肽的注射濃度增加，腫瘤轉移的數目越少且小鼠的存活越高；作者還將由小鼠的腫瘤組織分離出來癌細胞培養，當蜂肽的濃度為 2.85 $\mu\text{g/ml}$ 在 24 小時可以有效的抑制細胞的存活，並且利用流式細胞儀的雙染法，以濃度 1.425 $\mu\text{g/ml}$ 和 2.85 $\mu\text{g/ml}$ 培養 15 小時，發現 1.425 $\mu\text{g/ml}$ 的凋亡與壞死百分比差距最大，而 2.85 $\mu\text{g/ml}$ 的凋亡與壞死的百分比差距最小(60)。

本實驗室，之前有以 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂肽培養人類正常胸主動脈平滑肌(A10)培養 48 小時，發現此細胞的存活率還達 92%，有此可知此濃度的蜂肽可能對正常細胞的傷害不大(61)。本實驗以 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 培養人類乳癌細胞株(MCF-7)48 小時，以 MTT assay 發現可以抑制細胞增生約 50%(圖 5—4)。

有文獻指出，以不同濃度的蜂肽(0、1.4、2.8、5.7、11、23、28 $\mu\text{g/ml}$) 培養老鼠黑色素瘤細胞株(K1735M2)24 小時，以 MTT assay 發現隨著蜂肽的濃度增加，吸光值越低；以蜂肽 14.2 $\mu\text{g/ml}$ 培養 K1735M2 五個小時，經流式細胞儀分析會使細胞週期停滯在 G_0/G_1 (62)。本實驗室，之前以不同濃度的蜂肽(1.25、2.5、5、7.5、10 $\mu\text{g/ml}$)處理人類子宮頸癌細胞株(Ca Ski)，發現細胞週期也是停滯在 G_0/G_1 (61)。本實驗結果顯示也可以使細胞週期停滯在 G_0/G_1 。

本實驗利用 DAPI staining 與 Comet assay 來證實蜂肽會導致 MCF-7 產生 DNA 損傷，以 DAPI staining 觀察發現在 6、12、24、48、72 小時，細胞的亮度比例明顯增加。(圖 5-11)。

本實驗以流式細胞儀偵測 ROS 的變化，發現在 1、3、6 小時有 ROS 的釋放，可能是蜂肽抑制了細胞內的抗氧化酵素(圖 5-9)。有文獻指出，PLA2 會破壞粒腺體及 lysosome 的完整性，而釋放出 ROS，影響粒線體膜電位，釋放出促凋亡蛋白(63-65)。在 12、24、48 小時的 ROS 則是被抑制，但抗氧化酵素：GST、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、catalase 的蛋白表現則無明顯回升，因此推測 ROS 的清除可能與這些抗氧化酵素無關(圖 5-13)。有文獻指出 mellitin 可以減少 neutrophil 產生 superoxide 與 hydrogen peroxide，屬於一種抑制 superoxide 產生的多肽(66)。

經由流式細胞儀分析，以不同濃度蜂肽培養 24 小時，發現 7.5、10 $\mu\text{g/ml}$ 的 G_0/G_1 有顯著增加，在 10、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 G_2/M 也有顯著的增加；以 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 的蜂肽培養不同時間，發現在 12、24、48 小時 G_0/G_1 有顯著的增加，在 48、72 小時 S 與 $\text{Sub}G_1$ 均有顯著的增加(圖 5-5~8)。有文獻指出，以 Scriptaid 可以誘導人類子宮內膜癌與卵巢癌細胞株細胞週期停滯，當 Scriptaid 濃度為 5×10^{-6} M 使細胞週期停滯在 G_0/G_1 ；而當濃度為 1×10^{-5} M 則使細胞週期停滯在 G_2/M (67)。有文獻指出，Arsenic Trioxide 可以誘導胰臟癌細胞株凋亡與細胞週期停滯，當以 6.25 μM Arsenic Trioxide 培養 24 小時，細胞週期停滯在 G_0/G_1 ；而當 72 小時，細胞週期停滯在 G_2/M (68)。調控細胞週期的蛋白表現，發現 p53、p27 的表現隨時間而增加，而 p21、Cdk2 隨時間而減少，p16 則幾乎不受影響，有此推論蜂肽可能使 p27 表現增加而抑制 Cdk2，進而使細胞週期停滯，Cdk2 可以使細胞週期由 G_1 進入到 S 和 S 進入 G_2 。但許多文獻指

出，p53 的活化的增加會促使 p21 的表現(38, 69)。

粒腺體途徑的凋亡，當粒腺體受到藥物的刺激會造成粒腺體內外膜的電位不平衡，而釋放出促凋亡蛋白：AIF、Endo G，造成 DNA 傷害，此時，p53 會活化使 Bax 從細胞質轉位到粒腺體膜上，影響粒腺體外膜的透壓與抑制 Bcl-2，釋放出 cytochrome c，然後促使 Apaf-1 與 caspase 9 結合，進而活化 caspase 3，使 PARP 裂解失去修復 DNA 的功能，使細胞走向凋亡(35, 70-72)。也有文獻指出，PARP 活化後，會使粒腺體中的 AIF 轉位到細胞核(73)，當 AIF 表現過多時，會使染色體聚集、DNA 斷裂、PS 外翻、核膜電位下降(74)。本實驗經由西方墨點法也證實蜂肽可能經由粒腺體途徑誘導 MCF-7 凋亡(圖 5-14~7)

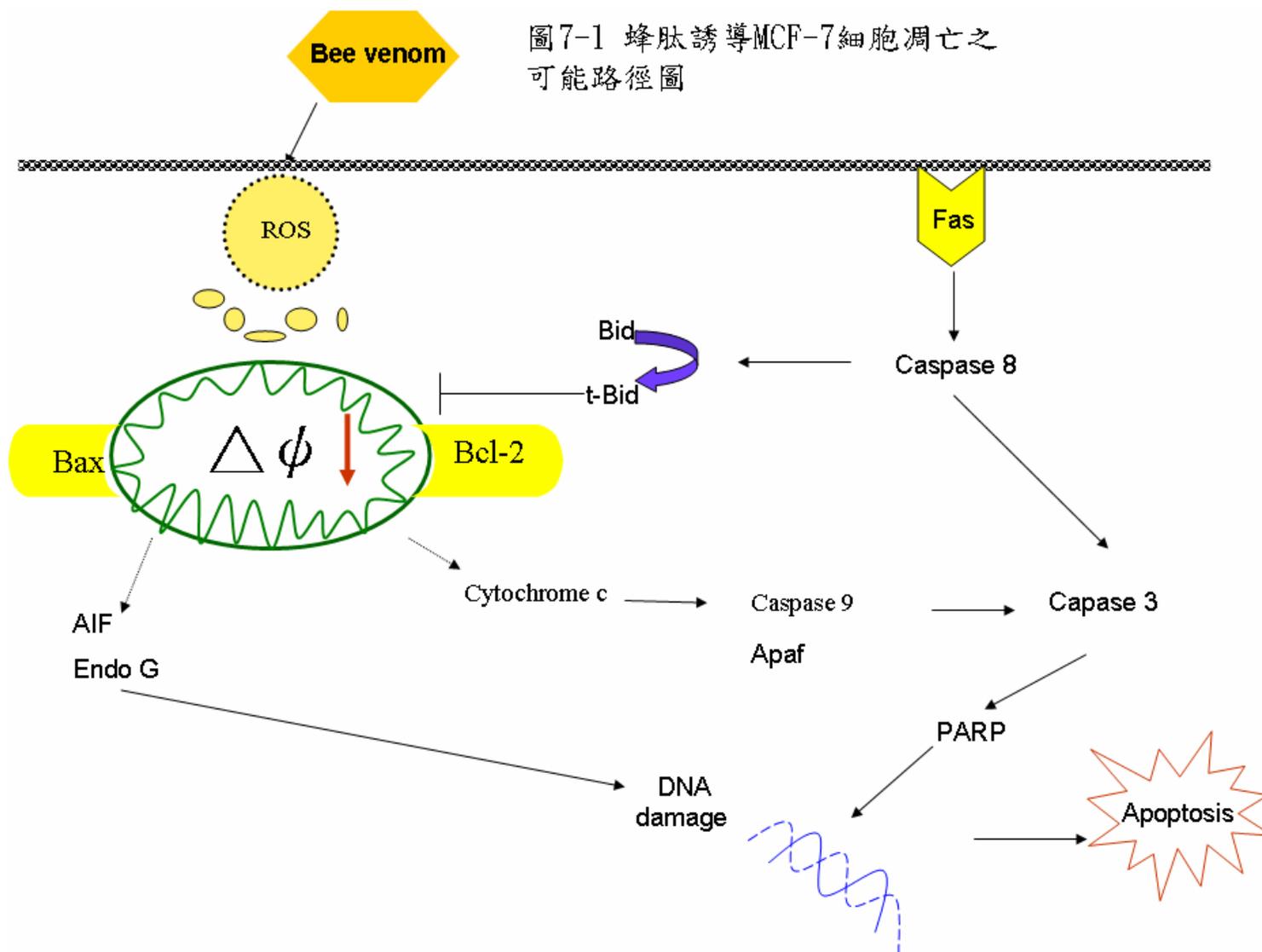
死亡接受體途徑，Fas 位於細胞膜表面，當 Fas 與 Fas ligand 結合後，會活化 Fas receptor，然後吸引 FADD(Fas associated death domain；FADD)。FADD 中的 death effector domain 活化 initiator caspase(caspase 8、10)。活化態的 caspase 8 可以直接活化 caspase 3，也可以使 Bid 裂解成促凋亡的形式—tBid，tBid 會轉位到粒腺體膜上活化 Bax，使粒腺體釋放出促凋亡蛋白，使細胞走向凋亡^(28, 35, 75, 76)。本實驗經由西方墨點法證實蜂肽可能經由死亡接受器途徑誘導 MCF-7 凋亡(圖 5-18)。本實驗的數據無法得知蜂肽所誘導 MCF-7 走向凋亡是內在途徑先還是外在途徑先或者同時進行，也無法判斷兩種途徑所佔的百分比。

第七章 結論

在本篇研究中，由細胞增生、細胞週期、細胞凋亡來探討蜂肽對人類乳癌細胞株(MCF-7)的抗癌機制。由實驗結果知道蜂肽可以抑制 MCF-7 增生，具有濃度與時間效應。而且蜂肽會誘導 MCF-7 細胞株停滯以及凋亡。更進一步探討發現，蜂肽影響細胞週期調控蛋白、活性氧成份(ROS)的釋出、粒腺體膜電位的下降，然後經由粒腺體途徑與死亡接受體途徑誘導 MCF-7 凋亡。

經由流式細胞儀偵測發現，以蜂肽處理在 1 小時就有 ROS 的釋放，而使粒腺體膜電位下降釋出促凋亡蛋白：AIF、Endo G、cytochrome c。ROS 也使 DNA 損傷，活化 p53 而使 Bax 轉位到粒腺體膜上。蜂肽也可能增加 p27 的表現量而抑制了 Cdk2 的表現，使細胞週期停滯。當 Bax 轉位到粒腺體膜上，會抑制 Bcl-2 的表現，進而影響粒腺體膜電位及改變粒腺體膜滲透壓，釋放出 cytochrome c，活化下游的 caspase 9、caspase 3，以粒腺體途徑使 MCF-7 走向凋亡。也發現經由死亡接受體途徑，蜂肽會增加 Fas 的表現，活化 caspase 8，直接活化 caspase 3 或使 Bid 裂解成 t-Bid 而影響粒腺體膜電位，而再次經過粒腺體途徑，使 MCF-7 走向凋亡。

圖7-1 蜂肽誘導MCF-7細胞凋亡之可能路徑圖



第八章 參考文獻

1. 陶聲洋防癌基金會
2. Vick JA, Mehlman, B., Brooks, R. *et al.* Effect of the bee venom and melittin on plasma cortisol in the unanesthetized monkey. *Toxicon* 1972;10(6):581-6.
3. Vick JA, & Shipman, W. H. . Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon* 1972;10(4):377-80.
4. Murakami M, Nakatani, Y., Atsumi, G. *et al.* Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* 1997;17(3-4):225-83.
5. Pelletier JP, Jovanovic, D., Fernandes, J. C. *et al.* Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998; 41(7):1275-86.
6. Yang Y, Hutchinson, P., & Morand, E. F. *et al.* Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. . *Arthritis Rheum* 1999;42(7):1538-44.
7. Amin AR, Attur, M., & Abramson, S. B. Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11(3): 202-9.
8. Shkenderov S, & Koburova, K. Adolapin-a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon* 1982;20(1):371-21.
9. Koburova KL, Michailova, S. G., & Shkenderov, S. V. Further investigation on the anti-inflammatory properties of adolapin-bee venom polypeptide. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 1985;11(2):50-5.
10. Buku A. Mast cell degranulating peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. *Peptides* 1999;20(3):415-20.
11. Buku A, Price, J. A., Mendlowitz, M.*et al.* Mast cell degranulating peptide binds to RBL-2H3 mast cell receptors and inhibits IgE binding. *Peptides* 2001;22(12):1993-8.
12. Park HJ, Lee SH., Son, D J *et al.* Anti-arthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. . *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3504-15.
13. Park HJ, Son, DJ., Lee, CW. *et al.* Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with IkappaB kinase. *Biochem Pharmacol* 2007;73(2):237-47.
14. Son DJ, Lee JW, Lee YH *et al.* Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing ,and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007;115(2):246-70.

15. Hu H , Li Y, Zhang X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *Pharm Pharmacol* 2006 Jan;58(1):83-9.
16. Liu X , Xie L, Zhang R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2002 Aug;54(8):1083-9.
17. Jang MH SM, Lim S, Han SM *et al.* Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *J Pharmacol Sci* 2003 Feb;91(2):95-104.
18. Hong SJ RG, Yang HI, Yin CS *et al.* Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicol* 2005 Jul;46(1):39-45.
19. T. O. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007 Jun 25.
20. JC R. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* 1999 Jan; 11(1):68-75.
21. Zhang JH XM. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 2000 Sep;10(3):205-11.
22. She MR LJ, Guo KY, Lin W *et al.* Requirement of reactive oxygen species generation in apoptosis of leukemia cells induced by 2-methoxyestradiol. *Acta Pharmacol Sin* 2007 Jul;28(7):1037-44.
23. Kanupriya PD, Sai Ram M, Sawhney RC *et al.* Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicol In Vitro* 2007 Aug;21(5):546-854.
24. Yan C X-MQ, Li-Kun G, Lin-Lin L *et al.* Tetrandrine-induced apoptosis in rat primary hepatocytes is initiated from mitochondria: caspases and endonuclease G (Endo G) pathway. *Toxicology* 2006 Jan 20;218(1):1-12.
25. Hong SJ DT, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2004 May;25(5):259-64.
26. Bratton SB WG, Srinivasula SM, Sun XM *et al.* Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 2001 Mar 1;20(5):998-1099.
27. Kim JY PJ. ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. *FEBS Lett* 2003 Aug;14(549(1-3)):94-8.

28. Finucane DM B-WE, Waterhouse NJ, Cotter TG *et al.* Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* 1999 Jan;22(274(4)):2225-33.
29. M KR, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. *Emi Breast Cancer Res* 2005;7(6)(6):940-52.
30. Donovan M DF, Cotter TG. Decreased expression of pro-apoptotic Bcl-2 family members during retinal development and differential sensitivity to cell death. *Dev Biol* 2006 Mar 1;291(1):154-69.
31. Fan TJ HL, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005 Nov;37(11):719-21.
32. Miller DK. The role of caspase family of cysteine protease in apoptosis *Immunology* 1997;9:35-49.
33. Nicholson DW TN. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997 Aug ;22(8): 299-306.
34. Hakem R HA, Duncan GS, Henderson JT *et al.* Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998 Aug 7;94(3):339-52.
35. Belka C RJ, Wesselborg S, Stepczynska A *et al.* Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* 2000 Feb; 19(9):1181-90.
36. Bartek J LJ. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 2007 Apr;19(2):238-45.
37. EA. N. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 1995 Jun;117(6):471-80.
38. Golias CH CA, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004 Dec;58(12):1134-41.
39. Polyak K KJ, Solomon MJ, Sherr CJ *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994 Jan;8(1):9-22.
40. Sherr CJ RJ. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995 May 15;9(10):1149-63.
41. Schwartz GK SM. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005 Dec 20;23(36):9408-21.

42. Brooks G PR, Li JM. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc Res* 1998 Aug;39(2):301-11.
43. JM. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000 Nov 16;153(1-3):83-104.
44. E. N. Free radical pathology and antioxidants: overview. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1992;Spec No.:538-40.
45. Amstad PA LH, Ichimiya M, Berezsky IK *et al.* BCL-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production. *Redox Rep* 2001;6(6):351-62.
46. Collins IG, Michelle D Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 2005;5(4):336-73.
47. Curtin JF DM, Cotter TG, Articles R. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol. Methods* 2002, 265(1-2):49-72.
48. Wang X HT, Sun DW, Liu B *et al.* Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me(2)SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology* 2007 Jun 9.
49. Parada-Turska J PR, Majdan M, Kandefler-Szerszeń M *et al.* Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol Rep* 2007 Mar-Apr;59(2):233-7.
50. Pagliacci MC SM, Migliorati G, Grignani F *et al.* Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer* 1994;30A(11):1675-82.
51. Farrokh-Siar LRK, Palmer EM, Patel SC *et al.* Human fetal retinal pigment epithelium - induced cell cycle arrest, loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 ;41(12):3991-8.
52. Iwai K KT, Watanabe M, Yabu T, Kitano T *et al.* Ceramide increases oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis. *J Biol Chem* 2003 Mar 14;278(11):9813-22.
53. Jang MH, Shin MC, Kang IS, *et al.* Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SK-N-MC. *Journal of Korean medical science* 2002;17(5):674-8.
54. Rinner B SV, Pürstner P, Efferth T, Brem B, Greger H, Pfragner R. Activity of novel plant extracts against medullary thyroid carcinoma cells. *Anticancer Res* 2004 May-Apr;24(2A):495-500.

55. Shyur LF, Chen CH, Lo CP, et al. Induction of apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by phytochemicals from *Anoectochilus formosanus*. *Journal of biomedical science* 2004;11(6):928-39.
56. Jang JH, Surh YJ. Bcl-2 attenuation of oxidative cell death is associated with up-regulation of gamma-glutamylcysteine ligase via constitutive NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(37):38779-86.
57. Son DJ, Lee JW, Lee YH *et al.* Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007;115(2):246-70.
58. Hu H, Chen D, Li Y, Zhang X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2006;58(1):83-9.
59. Moon DO, Park SY, Heo MS, et al. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int Immunopharmacol* 2006;6(12):1796-807.
60. Orsolich N, Sver L, Verstovsek S *et al.* Basic I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicol* 2003;41(7):861-70.
61. 魏秀涓. 蜂肽誘導人類子宮頸癌細胞株 Ca Ski 細胞週期停滯及細胞凋亡作用之探討. 台中市: 中國醫藥大學營養所; 2006.
62. Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2002;54(8):1083-9.
63. Nethery D, Callahan LA, Stofan D *et al.* Supinski G. PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 2000;89(1):72-80.
64. Zhao M, Brunk UT, Eaton JW. Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS letters* 2001;509(3):399-404.
65. Zhao M, Antunes F, Eaton JW *et al.* Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *European journal of biochemistry / FEBS* 2003;270(18):3778-86.
66. Somerfield SD SJ, Mraz C, Gervais F *et al.* Bee venom melittin blocks neutrophil O₂⁻ production. *Inflammation* 1986 Jun;10(2):175-82.

67. Takai N, Ueda T, Nishida M, Nasu K *et al.* A novel histone deacetylase inhibitor, Scriptaid, induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells. *International journal of molecular medicine* 2006;17(2):323-9.
68. Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide induces apoptosis in pancreatic cancer cells via changes in cell cycle, caspase activation, and GADD expression. *Pancreas* 2003;27(2):174-9.
69. Cui Q YJ, Wu JN, Tashiro S *et al.* P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3- independent, but caspase-9-dependent caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007 Jul;28(7):1057-66.
70. Pan G HE, Dixit VM. Activation of caspases triggered by cytochrome c in vitro. *FEBS Lett* 1998 Apr 10;426(1):151-4.
71. Li PF DR, Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J* 1999 Nov 1;18(21):6027-36.
72. Lorenzo HK SS. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett* 2004 Jan 16;557(1-3):14-20.
73. Hong SJ DT, Dawson VL. . Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2004 May;25(5):259-64.
74. Susin SA DE, Ravagnan L, Samejima K *et al.* Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000 Aug 21;192(4):571-80.
75. Yoon JH GG. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol* 2002 Sep;37(3):400-10.
76. Scaffidi C FS, Srinivasan A, Friesen C *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998 Mar 16;17(6):1675-87.