

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

探討 Lucidone 在人類皮膚細胞株 HaCaT 中
抗發炎及促損傷癒合的影響

**The effect of lucidone on anti-inflammatory and
wound healing-promoting activities in human
keratinocytes HaCaT cell**

研究生：黃彬鈞 (Pin-Chun Huang)

指導教授：楊新玲 博士 (Hsin-Ling Yang, Ph. D.)

共同指導教授：許游章 博士 (You-Cheng Hseu, Ph. D.)

2009 年 7 月

July, 2009

目 錄

摘要

Abstract

縮寫表

第壹章、前言

第一節、皮膚與發炎	2
第二節、發炎與自由基	3
第三節、COX-2 和 PGE ₂ 與發炎的關係	4
第四節、發炎與 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 之相關性	6
第五節、AAPH 對生理之傷害	8
第六節、Lucidone 之介紹	9
第七節、皮膚的損傷癒合	10
第八節、MMPs 與皮膚損傷癒合的關係	11
第九節、研究動機	13

第貳章、實驗設計流程架構

第參章、實驗材料與方法

第一節、實驗儀器	17
第二節、實驗材料	18
第三節、Lucidone 之配製	21
第四節、AAPH 之配製	22
第五節、細胞培養(Cell Culture)	23
第六節、細胞生長率(Growth)與存活率(Viability)測定分析	26
第七節、MTT 存活率試驗 (MTT assay)	28
第八節、細胞內活性氧化物(Reactive oxygen species)產量	

測定分析·····	30
第九節、蛋白質定量分析與西方墨點法(Western blotting) ···	32
第十節、細胞酵素連結免疫分析法(PGE ₂) ······	41
第十一節、細胞遷移試驗 (Transwell invasion assay) ······	43
第十二節、統計分析 ······	45
第肆章、實驗結果與圖表	
第一部分：Lucidone對HaCaT細胞抗發炎的影響·····	47
一、 Lucidone對HaCaT細胞的影響·····	48
二、 AAPH誘導COX-2蛋白的表現 ······	52
三、 AAPH誘導活化ERK、p38 MAPK及JNK/SAPK···	55
四、 Lucidone經由MAPKs路徑減少AAPH誘導的 COX-2及iNOS蛋白表現，進而減少前發炎因 子PGE ₂ 的分泌·····	58
五、 Lucidone是經由ERK和p38路徑而使COX-2表現 量減少·····	64
六、 Lucidone可以減少HaCaT細胞內AAPH所誘導的 ROS產量 ······	66
七、 Lucidone預防AAPH誘導IκBα的降解增加其穩 定 ······	68
第二部分：Lucidone對HaCaT細胞migration的影響 ······	70
八、 Lucidone 促進 HaCaT 細胞的移行(migration) ···	71
九、 Lucidone 藉由活化 MMP-9、抑制 TIMP-2 的表 現增加 HaCaT 細胞的遷移 ······	76
十、 Lucidone 經由 MAPKs 訊息途徑促進 HaCaT 細 胞遷移·····	78

第五章、討論	80
第陸章、結論	87
第柒章、參考文獻	89



謝誌

兩年的研究所生涯將要畫上句點，回想這兩年中有歡笑、有辛苦，除了學習到許多研究方法和實驗技巧外，還有滿滿的回憶。首先要感謝指導老師 楊新玲 教授及共同指導老師 許游章 副教授在實驗過程中給予的方向和指導，使我得以順利完成實驗和論文，也要感謝實驗室的研究夥伴及研究所同學，在研究所期間，除了課業上和實驗上的相互交流及幫忙外，還有一起分享研究所實驗過程的點點滴滴，當然學長姐的經驗更讓我免去不少不必要的麻煩，還有大學部的學弟妹，不時會在平凡的實驗室帶來些許歡樂的氣氛，這些我都將會永遠記得。特別要感謝口試委員 王升陽 老師提供的實驗樣品，及 呂鋒洲 老師、林一郎 老師在課堂和實驗上的教導，讓我獲益良多，使我研究論文能夠更加完整。感謝一路上支持鼓勵與陪伴我的師長、朋友、學長姐、同學、學弟妹和親戚，同時也要感謝許多曾經幫助與鼓勵我的人，謝謝你們！最後，要感謝我的父母和家人，沒有他們最好的支持，我沒辦法這麼順利且勇敢的完成這個碩士學位，他們是我求學過程中最大的精神支柱，讓我能夠順利完成學業。謹以本文獻給所有關懷我的師長、親友們，並致上萬分誠摯的謝意。

黃彬鈞 謹誌

中國醫藥大學營養學系碩士班

中華民國九十八年七月

摘要

先前已有研究證實紅果釣樟 (*Lindera erythrocarpa* Makino) 的果實抽出物及其主成分 Lucidone 在體內和體外實驗中具有很好的抗發炎活性。在 RAW264.7 細胞株實驗中，紅果釣樟果實可以顯著地抑制脂多醣體 (Lipopolysaccharide, LPS) 所誘導一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 的產生；此外研究亦證實 iNOS 和 COX-2 的蛋白表現量也會隨 Lucidone 的劑量增加而被抑制。

本研究主要想探討 Lucidone 對人類皮膚細胞株 HaCaT 抗發炎的影響。因此本實驗想探討 Lucidone 是否可以減少水溶性自由基產生者 AAPH 對人類皮膚細胞株 HaCaT 所造成的傷害。實驗給予 Lucidone 不同濃度 24 小時後再給予 AAPH (30 mM) 處理 4~6 小時，細胞存活率顯示隨著 Lucidone 濃度的增加，可以減少 AAPH 對人類皮膚細胞株 HaCaT 的傷害。另外，AAPH 會促進細胞內 ROS 量的增加，而 Lucidone 也可以很顯著地抑制細胞內 ROS 的產生。隨著給予 AAPH 的時間增加，COX-2 蛋白的表現量也隨之增加；而有給予不同濃度 Lucidone 保護後的 HaCaT 細胞，可以顯著地抑制 AAPH 所誘導的 COX-2 和 iNOS 蛋白表現。接著以酵素免疫分析法來觀察 PGE₂ 的結果顯示，Lucidone 可以顯著地減少因 AAPH 所誘導的 PGE₂ 分泌。另外，在 MAPKs 訊息途徑方面，Lucidone 也可以減少磷酸化蛋白 (p-ERK1/2、p-p38、p-JNK1/2) 的表現。然而，在 MAPKs 抑制劑結果上，顯示可能不是經 JNK 路徑而抑制 COX-2 的表現。而隨著 Lucidone 濃度的增加，可以增加 IκBα 的穩定性，預防其泛素化而被降解。

本研究的另一個目的想探討 Lucidone 在皮膚損傷癒合的機轉。結果顯示低濃度的 Lucidone 有促進 HaCaT 細胞增生的效果，且會經由 MAPK 訊息途徑促進 HaCaT 細胞的移行現象，進而促成皮膚損傷的癒

合。在皮膚中，包括組織傷害、腫瘤形成、血管新生、細胞凋亡和發炎等都會使許多基質金屬蛋白酶 (MMPs) 表現。MMP-9 已經被證實和皮膚真皮層的疾病及一般損傷癒合 (wound healing) 有關。本實驗結果顯示 Lucidone 促進皮膚細胞的癒合可能是藉由增加 MMP-9、減少 TIMP-2 蛋白的表現，而促進細胞的遷移 (migration) 作用。

總結上述結果，Lucidone 抑制發炎反應相關的 ROS 產生、PGE₂ 分泌和 COX-2 及 iNOS 蛋白表現是經由抑制 MAPKs 訊息傳遞路徑中 ERK、p38 蛋白的磷酸化進而增加 IκBα 的穩定性最後減少皮膚的發炎反應；而 HaCaT 細胞中促進損傷癒合的過程是經由調節 MAPKs 訊息途徑及相關的 MMP-9 蛋白表現進而促成細胞遷移而達到皮膚損傷癒合的效果。

關鍵詞：Lucidone、人類皮膚細胞株(human keratinocytes cell, HaCaT)、發炎(inflammation)、水溶性自由基起始者(AAPH)、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)、第二型環氧化酵素(cyclooxygenase-2, COX-2)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)、絲裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)、IκBα、遷移(migration)、損傷癒合(wound healing)、基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)

Abstract

The anti-inflammatory activities of lucidone isolated from the fruits of *Lindera erythrocarpa* Makino in an *in vivo* and *in vitro* were investigated. *Lindera erythrocarpa* fruits inhibited significantly nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS) induced NO in the murine macrophage cell line (RAW264.7) assay. Furthermore, lucidone suppressed iNOS and COX-2 protein expression in a dose-dependent manner.

In this study, we here investigate the effect of lucidone on AAPH-induced oxidative stress in human keratinocyte (HaCaT) cell. Our data indicate that pretreatment of HaCaT cells with different concentration of lucidone inhibited AAPH (30mM)-mediated decrease in cell viability. In addition, AAPH is a potent inducer of reactive oxygen species (ROS), which can induce oxidative stress and cellular damage, including inflammatory response; whereas lucidone reduced AAPH-induced ROS generation in a dose-dependent manner. Moreover, a marked increase in COX-2 protein expression was observed 4~6 h after treating with 30 mM of AAPH. Lucidone also reduced the COX-2 and iNOS protein expression after AAPH treated in a dose-dependent manner. Additionally, examining the human PGE₂ immunoassay kit, suggesting that AAPH-induced PGE₂ production was inhibited by lucidone significantly. On the other hands, lucidone diminished AAPH-induced MAPKs signaling pathway activation (phosphorylation of ERK, p38 and JNK). However, the results of MAPKs inhibitor suggest that lucidone possibly not though JNK pathway inhibited AAPH-induced COX-2 expression. Besides, lucidone caused a dose-dependent enhancement of IκBα protein stability, prevention of its proteolytic degradation.

On the other side, the purpose of this study was to investigate the effect of lucidone on wound healing and its underlying mechanism. Our result demonstrated that a low dose of lucidone enhanced the proliferation and

facilitated the migration of HaCaT cells through different MAPK signaling pathways, and accelerated scrape-wound healing in vitro. In the skin, expression of several matrix metalloproteinases (MMPs) occurs in response to tissue injury, tumorigenesis, angiogenesis, apoptosis and inflammation. MMP-9 has been reported to be implicated in both dermail diseases and normal wound healing. Our results demonstrate that lucidone-mediated migration and wound healing were increased MMP-9, inhibited TIMP-1 protein expression in HaCaT cells.

Taken together, lucidone inhibited pro-inflammatory mediators ROS generation, PGE₂ production and COX-2, iNOS protein expression through regulation MAPKs family of ERK and p38 phosphorylation and promotes IκBα protein stability to reduce inflammatory responses in skin. Lucidone possesses a therapeutic effect in the wound healing process by regulating MAPKs signaling cascade and MMP-9 protein expression in human keratinocyte HaCaT cells.

Keyword : Lucidone, human keratinocytes HaCaT cell, inflammation, AAPH, reactive oxygen species (ROS), cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E₂ (PGE₂), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), IκBα, migration, wound healing, matrix metalloproteinases (MMPs)

縮寫表

AP-1	: activator protein-1
BSA	: Bovine serum albumin
COX-1	: cyclooxygenase-1
COX-2	: cyclooxygenase-2
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DCFH ₂ -DA	: 2,7- dihydrodichlorofluorescein diacetate
ECL	: Enhancer chemiluminescence
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK1/2	: Extracellular signal-regulated kinase
FBS	: Fetal bovine serum
iNOS	: induce nitric oxide synthase
JNK/SAPK	: c-Jun NH ₂ -terminal protein kinase/stress activated protein kinase
Lucidone	
LPS	: Lipopolysaccharide
MAPKs	: Mitogen-activated protein kinases
MMPs	: Matrix metalloproteinases
NF-κB	: Nuclear factor kappa B
NO	: nitric oxide
PBS	: Phosphate-buffered saline
PBS-T	: Phosphate-buffered saline containing-Tween-20
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
ROS	: Reactive oxygen species

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha

TEMED : N,N,N,N'-Tetramethylene diamine

Tris : Tris (hydroxymethyl)-aminomethane



.



第壹章、前言

第一節、皮膚與發炎

發炎 (inflammation) 是當身體發生感染或有抗原入侵、或是受傷時所引發的免疫反應，此時發炎部位的血流量增加，微血管的通透性也增加，使得較大的分子如抗體、補體等更易到達發炎部位。

造成皮膚發炎反應的因素有很多，其中最主要的環境因子就是陽光中的紫外線(UV)。UV照射皮膚會誘導許多不同的活性氧自由(ROS)產生，包括超氧自由基、過氧氫化物(H₂O₂)和氫氧自由基【Ichihashi *et al.*, 2003】。過量曝曬在陽光下會發展成急性發炎是一個很重要的病因，徵狀有紅斑(erythema)、水腫(edema)和免疫抑制反應等，並因此會持續發展成為皮膚癌。

其中UVB(波長280~320 nm)會使表皮急性發炎和導致皮膚癌是最被人熟知的危險因子【De Fabo *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2004】。已有許多研究指出，UVB主要透過直接造成DNA損害或是誘導活性氧自由(ROS)釋放並引起皮膚發炎反應【de Gruijl, 2002; Kulms *et al.*, 2002; Heck *et al.*, 2003】。直接地DNA損害或ROS會引發一些訊息途徑，例如在細胞分化或存活上重要的絲裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)【Rhee, 1999; Torres *et al.*, 2003】。

許多不同的外在刺激包括UV照射會化MAPK訊息途徑。其中p38 MAPK在細胞凋亡(apoptosis)、細胞激素產生、轉錄調節和細胞骨架重組等都相當重要【Obata *et al.*, 2000】，已有研究證實p38 MAPK在UV所導致的細胞凋亡中扮演一個重要的角色【Shimizu *et al.*, 1999; Assefa *et al.*, 2000; Hildesheim *et al.*, 2004】。

MAPKs是一個脯胺酸關聯的絲胺酸/酰胺酸激酶(Proline-directed

Ser/Thr kinases) 家族，組成包括ERK (extracellular signal-regulated kinase)、JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) 和p38 MAPK。近來的研究發現活化ERK、JNK和p38，並增加第二型環氧化酵素 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表現與皮膚急性發炎和癌症有很緊密的關係【Chen *et al.*, 2001; Mahns *et al.*, 2004】。

第二節、發炎與自由基

內生性和外生性的活性氧自由基 (ROS) 會致使DNA氧化傷害及細胞訊息調節不良，包括多階段性過程的癌症生成 (carcinogenesis)，像是腫瘤的起始 (initiation)、促進 (promotion) 和進展 (progression) 【Ho *et al.*, 2007】。發炎過程是一多種的分子機轉，其中兩個最重要的：誘導性一氧化氮合成酶 (inducible NO synthase, iNOS) 產物一氧化氮 (NO) 及第二型環氧化酵素 (cyclooxygenase-2, COX-2) 所產生的前列腺素E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 【Moncada, 1999; Turini & DuBois, 2002】。COX-2和iNOS在發炎相關過程、細胞分化及促成皮膚腫瘤形成中都是很重要的兩種酵素【Saleem *et al.*, 2004; Herschman, 1994】。

近來的研究已經證明UVB誘導的ROS所造成的發炎及腫瘤促成因子是透過一些機轉包括DNA損害、脂質過氧化和酵素活性的改變等【Goldberg *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1994; Pinnel *et al.*, 2003】。

第三節、COX-2和PGE₂與發炎的關係

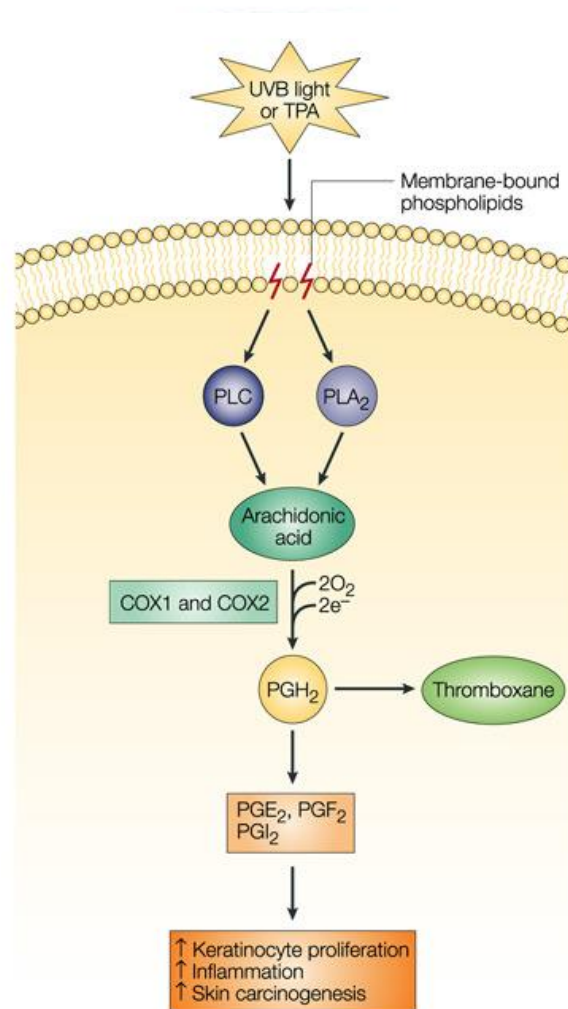
環氧化酵素(cyclooxygenase, COX)主要有兩種異構形式,COX-1和COX-2。COX-1的基因為*Ptgs-1*,其mRNA的編碼有2.8 kb,且基因表現相對穩定【Rouzer & Marnett, 2008】;COX-1廣泛地存在和持續表現在體內各器官中,維持細胞正常生理功能,例如維護細胞內恆定、調節血液凝集、調節腎臟血流量及維持胃黏膜等功能,即使受荷爾蒙、生長因子、外在因子或炎症反應物刺激,也僅有極少量改變而已。COX-2的基因為*Ptgs-2*,是一個立即的早期基因,會被很多不同的發炎及增生刺激而活化,COX-2的mRNA編碼4 kb會快速地轉換是由於其3'端未轉譯的區域有不穩定的序列【Smith *et al.*, 2000; Rouzer & Marnett】;COX-2除了在特定器官中有常態少量存在外,大部分器官在正常情況下含量微乎其微。

當體內有狀態改變,如脂多醣體(LPS)、促氧化劑、細胞激素(cytokines)及一些發炎物刺激下COX-2便會大量增加,將花生四烯酸(arachidonic acid)轉化成前列腺素(prostaglandins, PGs)造成更劇烈的發炎反應,如PGE₂。前列腺素是一群很重要的發炎媒介物,當組織創傷和發炎期間分泌和釋放【Vane, 1971; Treede *et al.*, 1992】,也是很多病理症狀的前趨酵素,包括疼痛、發燒、傷口愈合、血管新生和血管舒張滲透等。COX-2的表現及其產物PGE₂已經被證實促進癌症形成有關,特別是皮膚癌【Higashi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003】。因此,將目標放在降低COX-2表現將有助於減少皮膚發炎和癌症的發展。

PGE₂是COX-2下游最主要的產物,已有研究證明COX-2的過量表現和癌症生成、腫瘤生長及轉移有關,這些都和COX-2的產物前列腺

素 (prostaglandins, PGs) 有直接的關係，PGE₂是導致發炎反應最主要的前驅物質，進而可能會演變成癌症，如圖一所示。

近來，第三種異構物COX-3已被確認，COX-3是由不同的COX-1所接合 (有時亦稱COX-1b)，在人類及小鼠中COX-3的第一個內含子 (intron 1)被保留造成插入(insertion) 30~34個胺基酸且置換基因骨架的解碼。COX-3在腦、心和腎臟高度被表現，但也因為其架構置換 (frame shift)的關係，這種由不同接合所譯成的密碼完全沒有相對應的蛋白因此沒有環氧化酵素的活性【Kis *et al.*, 2006; Chandrasekharan *et al.*, 2002】。



Nature Reviews | Cancer

【Tim Bowden, 2004】

圖一、COX酵素與PGs對皮膚細胞的影響。(註：PLC：phospholipase; PLA₂：phospholipase A₂; TPA：12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)

第四節、發炎與Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)之相關性

MAPKs在細胞受到刺激或損傷時扮演著重要的角色，會藉由訊息傳遞的調控，使細胞存活、增生、分化或是走向死亡 (Oleinick et al., 2002)。近來常被探討的MAPK family為：(1) extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)、(2) c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase (JNK/SAPK)、(3) p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)，它們藉由調控訊息傳遞以及調節轉錄因子與基因的表現【Kyriakis & Avruch, 2001】，使細胞存活、生長、分化、增生、移行及凋亡等。

(1) extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)

ERK1/2 目前已知有兩種異構物：ERK1 (分子量約為44 kDa) 及ERK2 (分子量約為42 kDa)。當細胞受到生長因子、細胞激素或神經傳導物質等的刺激時會活化ERK1/2。有研究認為ERK1/2在推動細胞週期前進、細胞生長和分化上扮演著極重要的角色【Kumar *et al.*, 1998】。

(2) c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase (JNK/SAPK)

JNK是一種被壓力活化的蛋白激酶 (stress activated protein kinase, SAPK)，當細胞受到生長因子、細胞激素或紫外線照射時會被大量活化【Kyriakis & Avruch, 1996】。JNK有三種異構物：JNK1 (分子量約為46 kDa)、JNK2 (分子量約為55 kDa) 和JNK3 (分子量約為57 kDa)，JNK1/2廣泛地表現在各種細胞

及組織中，而JNK3主要在心臟、腦與睪丸中表現。JNK可被上游的訊息傳遞分子Cdc42/Rac活化，經由一連串的分分子磷酸化訊息傳遞，最後JNK上的tyrosine和threonine兩種胺基酸磷酸化【Griendling *et al.*, 2000】。活化後的JNK可活化轉錄因子：AP-1 (activator protein-1)、ATF-2和Elk-1，並調節AP-1的功能【Davis *et al.*, 1998】。

(3) p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)

p38 MAP kinase的分子量約為38 kDa，具有四種異構物：p38 α 、p38 β 、p38 γ 及p38 δ 。當p38之 kinase subdomain VIII上的tyrosine被磷酸化因此活化p38，並進而活化下游的轉錄因子：ATF-2、Elk-1、Max、CHOP/DADD153和CREB等，其中CHOP/DADD153是DNA受損或是細胞生長停滯時所產生的蛋白質，因此p38被認為和調控細胞週期有關【Wang & Ron, 1996】。

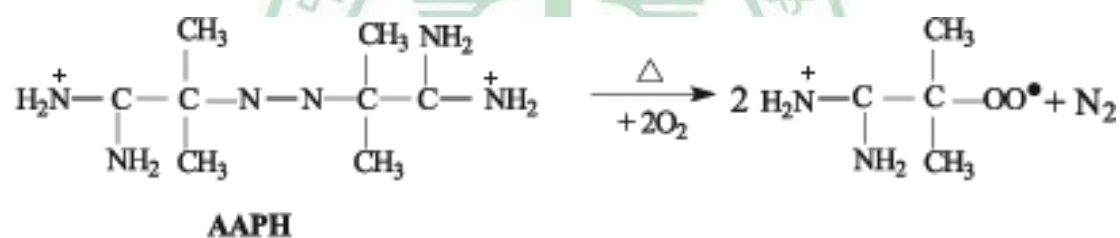
MAPKs在不同的癌細胞型態中是常見的上調節 (up-regulated) 角色，包括細胞的轉化 (transformation) 和增生 (proliferation) 【Sebolt-Leopold *et al.*, 2004】。p38 MAP激酶在許多的前發炎反應中扮演一個主要的角色，主要經由轉譯後控制發炎相關基因的表現【Saklatvla, 2004; Schieven, 2005】，其中之一就是COX-2。p38 MAP激酶可以被許多不同的外在刺激而活化，像是UV光、熱、滲透性休克(osmotic shock)、發炎細胞激素及生長因子等 (Zarubin & Han, 2005)。

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 訊息路徑已經被證實是主要導致COX-2 mRNA表現的關鍵要素【Goppelt-Struebe &

Stroebel, 1998】。同時亦證實了ERK及p38 MAPK和UVB所誘導的人類皮膚細胞COX-2基因表現有關【Chen *et al.*, 2001】。因此想探討APPH誘導人類皮膚細胞株HaCaT之COX-2表現與MAPK訊息路徑的關係。

第五節、AAPH對生理之傷害

2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH) 為一種水溶性自由基產生者，在水中會自行解離，形成兩個以碳原子為中心的自由基，如圖二所示。



圖二、AAPH在水中形成自由基之反應式。

AAPH所生成的自由基會與氧分子反應產生過氧化自由基 (peroxyl radicals)，在細胞內會氧化蛋白質和多元不飽和脂肪酸，使細胞產生ROS，進而造成發炎反應。先前曾有研究以50 mM AAPH處理小鼠的紅血球之後，其被降解的比例隨時間而增加【Niki *et al.*, 1988】。還有實驗以不同濃度的AAPH處理小牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 及單胺氧化酶 (monoamine oxidase) 之後，結果顯示AAPH會隨處理的時間和濃度增加而破壞其蛋白質的結構和活性【Dean *et al.*, 1991】。另外，AAPH的分解速率主要決定於溫度的高低，在37°C 二次水中AAPH的半衰期大約175小時，所以再處理

AAPH後數小時內具有穩定的分解速率【Niki, 1990】。

近來已有研究確認，給予人類皮膚細胞株HaCaT不同濃度的AAPH處理後，其前發炎蛋白COX-2會隨AAPH濃度增加而表現量增加；研究亦證實AAPH處理後的HaCaT皮膚細胞，會在短時間內使其MAPKs路徑中的ERK、p38及JNK磷酸化【Cui *et al.*, 2004】進而活化下游發炎因子的表現，如PGE₂以及ROS的產量增加。

第六節、Lucidone之介紹

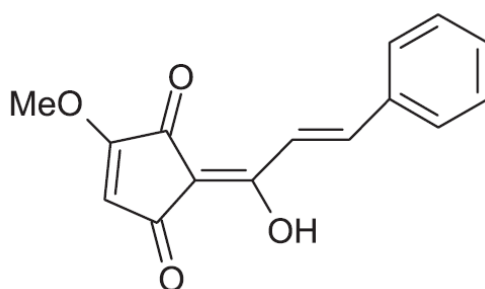
紅果釣樟(*Lindera erythrocarpa* Makino)又稱鐵釘樹、脈葉釣樟，為樟科釣樟屬，生長於中國大陸及台灣北部太平山等海拔1100~1800公尺地區，也分布於日本和朝鮮半島，果實紅熟，直徑約5~6 mm(圖三)。民間用法認為其果實具有解熱、止痛、抗菌、解毒、消化及利尿等功效，但對其確切的活性成分與作用機轉仍不清楚。



圖三、紅果釣樟(鐵釘樹)之果實及葉形。
(農委會林務局)

目前已有研究以巴豆油 (Croton Oil) 誘發鼠耳急性發炎的動物模式證實紅果釣樟的果實抽出物及其主成分Lucidone (如圖四) 具有很好的抗發炎活性；亦證實了Lucidone對於促發炎物質一氧化氮 (NO) 和前列腺素E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 也具有很強的抑制作用，並顯著的降低腫瘤壞死因子 (TNF- α) 蛋白的釋出【Wang *et al.*, 2008】。

在RAW264.7細胞株實驗中，紅果釣樟果實可以顯著地抑制脂多糖LPS (Lipopolysaccharide) 所誘導NO (Nitric Oxide) 的產生。研究並證實iNOS和COX-2的蛋白表現量也會隨Lucidone的劑量增加而被抑制，亦探討了MAPK訊息途徑在Lucidone抗發炎的關聯性，同時Lucidone也抑制了I κ B的降解，進而抑制核轉錄因子(NF- κ B)的轉位及細胞核內p50蛋白的量【Wang *et al.*, 2008】。



圖四、Lucidone之結構式

第七節、皮膚的損傷癒合

皮膚損傷癒合 (wound healing) 是一個複雜的過程，包括凝塊的

形成、發炎反應、顆粒組織堆積及重整胞外基質等【Clark, 1996】，同時也需要表皮和真皮細胞的相互作用及發炎細胞、纖維母細胞和皮膚角質細胞釋出的介質【Martin, 1997】。皮膚受傷後，不同型態的發炎細胞立即釋放許多的發炎因子，然後開始短暫的發炎反應，接著開始增生階段使傷口癒合。皮膚細胞的遷移（migration）和增生（proliferation）在傷口邊緣離纖維母細胞最近的地方開始增生使損傷癒合【Singer & Clark, 1999; Werner & Grose, 2003】。

皮膚角質細胞、纖維母細胞和上皮細胞在皮膚的傷口修復中非常重要【Kung *et al.*, 2008】。表皮的傷口產生細胞激素和生長因子且啟動合成胞外的組成基質，這些都可以調節皮膚角質細胞移行和增生的過程，特別是表皮再生（re-epithelialization）【Martin, 1997】。傷口收縮在皮膚損傷癒合中是有益的，目的是降低傷口面積和形成物理上堅硬的結痂【Katz *et al.*, 1991; Rudolph *et al.*, 1992】。了解皮膚角質細胞的遷移、增生和傷口收縮以及真皮的纖維母細胞和上皮細胞的調節機轉將有助於發明新的療法來調節皮膚纖維的形成和傷口收縮，最終將可促進皮膚損傷癒合的過程。

第八節、MMPs 與皮膚損傷癒合的關係

皮膚角質細胞的表皮再生是在表皮近端的傷口邊緣進行移行（migration）和有絲分裂（mitosis）來完成皮膚的損傷癒合【Santoro & Gaudino, 2005】。許多因子影響傷口的癒合，包括生長因子、細胞激素、金屬蛋白酶和胞外基質蛋白等【Coulombe, 2003; Martin, 1997; Santoro & Gaudino, 2005】。

細胞的移行是一個複雜的過程，需要需要靠胞外的蛋白水解酶來控制胞外基質（extracellular matrix, ECM）的降解，像是絲胺酸蛋白水解酶及基質金屬蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）等

【Okada *et al.*, 1997; Kerkela & Saarialhokere, 2003】。MMPs 是個結構和鋅依賴性有關的內生肽水解酶家族，它們可以降解幾乎所有的胞外基質蛋白【Nagase & Woessner, 1999】。MMPs 家族依據它們的受質特異性和結構特性可以被分類成明膠分解酶（gelatinases）、基質溶解素（stromelysins）、膠原蛋白酶（collagenases）及膜型金屬蛋白酶（membrane type-MMPs, MT-MMPs）等【Seomun *et al.*, 2008】。

許多的生理過程包括損傷癒合、組織重組再造、血管新生及胚胎發育等都會被 MMPs 調節【Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Sternlicht & Werb, 2001】。然而，許多 MMPs 的不正常表現被認為會導致許多的疾病，例如類風濕性關節炎、動脈粥狀硬化和腫瘤侵襲等【Ravanti & Kahari, 2000; Chakraborti *et al.*, 2003; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003】。

MMP-9 是一種誘發性的基質金屬蛋白酶，能分解 laminin 及第四型膠原蛋白（collagen type IV 等），MMP-9 的過量表現會促使血管平滑肌細胞移行，進而導致動脈粥狀硬化的發生，而和 MMP-9 相關的拮抗劑是 TIMP-1（tissue inhibitors of metalloproteinase-1）。MMPs 和 TIMPs 都是調節膠原蛋白代謝的主要酵素，MMPs 分解 ECM 而 TIMPs 抑制 MMPs 的活性以防止 ECM 的分解【Brenneisen *et al.*, 2002】。TIMP-1 在 ECM 代謝中相當重要，它可以抑制所有 MMPs 的活性，但除了 MT-MMP 之外【Bassiouny *et al.*, 1998】。

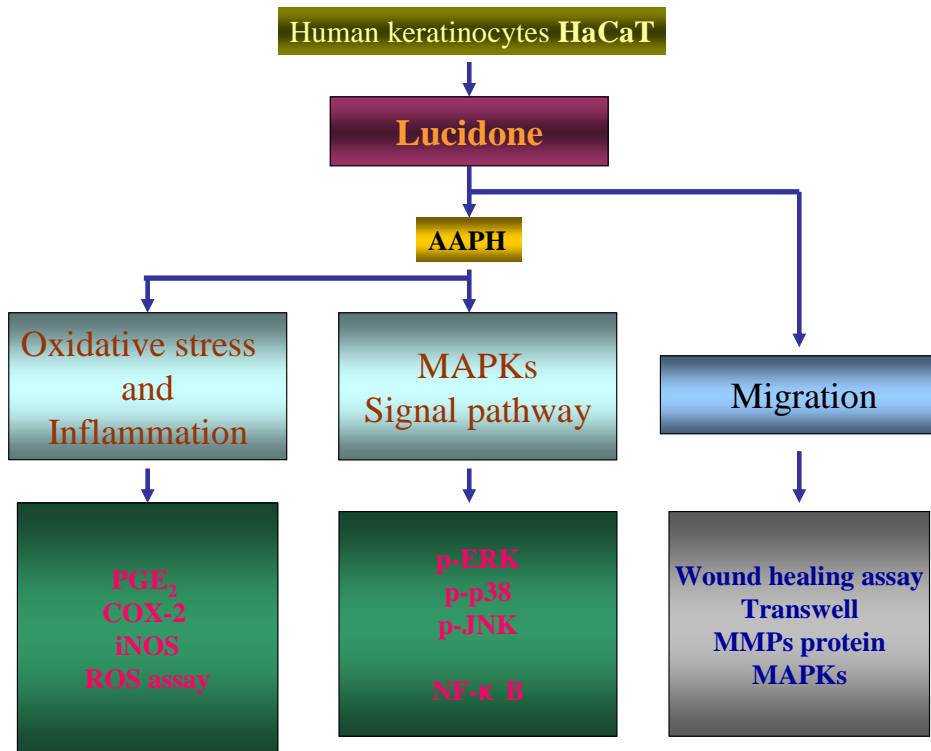
第九節、研究動機

在自然環境中，引起皮膚發炎反應的因素有很多，最常被研究的就是陽光中的紫外線 (UV)，許多研究都證實UVB會造成皮膚細胞傷害，導致皮膚紅腫、老化、發炎等現象，最後甚至可能演變成皮膚癌。造成這一連串病理癥狀的起因，就是UVB照射會使皮膚產生自由基 (ROS)，經過一連串的氧化傷害，使DNA受損，進一步造成腫瘤形成，相關的研究機轉近年來已經被大量研究證實。因此，本研究想將目標放在腫瘤形成前的發炎反應上，而造成發炎的因子就是氧化壓力的傷害，期望能夠利用天然的抗氧化劑在氧化傷害的過程中就能減少發炎反應的發生，進而使細胞不會因氧化壓力而演變成癌症。

本研究利用AAPH當作氧化壓力模式，使細胞產生自由基，進而模擬發炎反應的發生；而研究所用的細胞為正常的人類皮膚角質細胞HaCaT；另外，本實驗所使用的樣品是由中興大學森林系所王升陽副教授提供，經粹取純化後的紅果釣樟果實抽出物的主成分Lucidone，其結構經質譜儀及核磁共振儀鑑定確定其結構，為一純物質。本研究利用Lucidone已被證實的抗發炎特性當做一天然的抗氧化劑，來研究皮膚細胞經氧化壓力誘導後一連串的蛋白質和訊息傳遞的表現，最後是否可減少發炎反應的發生。另外，研究亦想了解天然抗氧化劑Lucidone純物質是否可以藉由調節不同的機轉來達到促進皮膚損傷癒合的速度，進而發展成一個有潛力的皮膚外傷用藥。

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 cross. 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 in English (CHINA MEDICAL UNIVERSITY) at the bottom. There are also small floral motifs on the sides.

第貳章、實驗設計流程架構



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 cross. 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 in English (CHINA MEDICAL UNIVERSITY) at the bottom. There are also small floral motifs on the sides.

第叁章、實驗材料與方法

第一節、實驗儀器

- 一、天秤：Scaltec SBC31
- 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(low 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皮膚細胞株 (HaCaT) 購自財團法人食品工業研究所
- 二、購自美國 Sigma-Aldrich 公司：
Sodium chloride (NaCl)、Potassium chloride (KCl)、TritonX-100、Sodium bicarbonate (NaHCO₃)、Sodium phosphate (NaHPO₄)、Potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄)、Tris base、Ethylenediamide-tetraacetic acid (EDTA)、Sodium pyruvate、 β -actin mouse monoclonal antibody、Bovine serum albumin (BSA)、Trypan blue
- 三、購自 Amersham Life Science 公司：
Recombinant protein molecular weight marker、ECL Western blotting detection reagent、Tween 20、BioMax light film
- 五、購自 BD BioCoat：
BD Matrigel™ Invasion Chamber 24-well Plate 8.0 Micron
- 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：
- 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 、 MMP-2 goat polyclonal antibody 、 MMP-9 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 、

(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) 、 Triton-X 100 、 RNase A 、 Sodium chloride (NaCl) 、 Potassium chloride (KCl) 、 Sodium phosphate

(NaHPO_4)、Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)、
Tris-base、Ethylenediamide-tetraacetic acid (EDTA)、sodium
Ethylenediamide-tetraacetic acid (Na_2EDTA)、sodium pyruvate、
Sodium dodecyl sulfate (SDS)、
N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
(HEPEs)、Bovine serum albumin (BSA)、Phenylmethyl sulfonyl
fluoride、

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、Lucidone之配製

一、Lucidone之製備

經由國立中興大學森林學系王升陽教授實驗室將紅果釣樟以 95% 乙醇進行萃取，分離出 7 種化合物、並由質譜儀及核磁共振儀鑑定決定其結構。所得 Lucidone 利用 DMSO 將其配成所需濃度以利實驗之進行。



第四節、AAPH 之配製

一、AAPH之製備

AAPH之分子量為271.19，實驗前以微量天秤秤量所需AAPH之重量，然後以實驗用培養液來配置所需濃度之AAPH，過程在無菌操作台內避光操作，配置完所需濃度含AAPH的培養液後，直接加入已種好細胞的培養盤中反應實驗所需時間。

AAPH製備方法：

(例如本實驗條件AAPH濃度為30 mM，則需要X mg的AAPH加在20 mL培養液中)

$$\frac{X \text{ mg}}{271.19} = 30 \text{ mM} \quad , \quad \text{則 } X=162.714 \text{ mg}/20 \text{ mL}$$

0.02 (L)

所以需秤量0.162714 g的AAPH溶在20 mL的培養液中，其final濃度就是含30 mM的AAPH培養液。

第五節、細胞培養(Cell Culture)

一、人類皮膚細胞株 HaCaT 培養

(一) 試劑配製

1、DMEM (1 升)：

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 、110 mg sodium pyruvate。溶解後調 pH 值至 7.3，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 $\text{pH}=7.2-7.4$ ，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，以孔徑 0.45 μm 之濾膜(filter)過濾掉雜質後，室溫保存。

(二) 細胞培養條件

人類皮膚細胞株 HaCaT 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 1 mL 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 1200 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(1200 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 HaCaT 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。



第六節、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 subconfluent，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 confluent，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 2×10^5 cells/mL (共1 mL)的HaCaT cells，等至細胞貼附後，加入含不同濃度Lucidone的培養液(含1% FBS)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、存活率測定步驟【Lee et al., 2005】

在12 well中種 2×10^5 cells/ml (共1 ml)的HaCaT cells，等至細胞貼附後，加入含不同濃度Lucidone的培養液(含1% FBS)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HaCaT 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 μ l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。



第七節、MTT 存活率試驗 (MTT assay)

(1) 原理

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 是一種水溶性的 tetrazolium salt，當溶解於 PBS 緩衝液中，會形成淡黃色的溶液，在細胞內會經由粒線體酵素 dehydrogenase 還原，MTT 的環狀結構 tetrazolium ring 會被切斷進而轉換成藍紫色不溶於水的 formazan 結晶，再利用 10% SDS 或是 DMSO 溶解細胞膜及藍紫色的 formazan 結晶，在波長 570 nm 會有最大吸收波。由於此環狀結構的轉變只發生在活細胞中，且藍紫色 formazan 結晶所產生的量和細胞存活的數目成正比，因此細胞內粒線體酵素代謝的活性越高，其與 MTT 反應生成的 formazan 結晶量就越多，吸光值也就越高，此可反應出細胞經藥物處理後的生長和存活率情形。

(2) 試劑

MTT 以 1x 的 PBS 作溶劑，先配置成濃度為 5 mg/mL 的 stock solution，避光保存在 4°C 備用（不超過兩星期）。使用前用 1x PBS 稀釋成最終濃度為 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液。

(3) 實驗步驟

HaCaT 細胞培養在 24 well culture plate (密度 2×10^5 /well)，細胞貼壁後，換成含 1% FBS 的培養液，隔天再加入不同濃度的 Lucidone 培養細胞 24 小時後，再換成含 30 mM AAPH 的 1% FBS 培養液培養 6 小時後，反應時間到後將培養液移除，並以 PBS 清洗 2~3 次，再加入 400 μ L 濃度為 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液，置入 37°C、5% CO₂ 培養箱中反應 4 小時，接著再加入 400 μ L 10% 的 SDS 溶液，繼續放入 37°C、5% CO₂ 培養箱中，至少經過反應 12 小時以便將藍紫

色 formazan 結晶溶解，然後取 200 μ L 溶液置於 96 孔盤中，以 ELISA reader 讀取波長 570 nm 的吸光值。



第八節、細胞內活性氧化物(Reactive oxygen species)產量測定分析

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) 結合形成非螢光性還原型的 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)，接著會被 H₂O₂ 氧化成具螢光性的 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)。當 DCF 受到 485 nm 波長的光激發後，會散射出 530 nm 波長的螢光，可利用螢光光譜儀 (fluorescence spectrophotometer) 來偵測。利用 H₂DCF-DA 的螢光特性對細胞進行染色，可用來評估細胞內 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 HaCaT 細胞種於 12 well (2×10⁵/well)，隔天細胞貼壁後，換成含 1% FBS 的 DMEM 培養液置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中隔夜(overnight)。以不同濃度的 Lucidone 加入含 1% FBS 的 DMEM 培養液置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時後，以 PBS 清洗後，再換上含有 30 mM AAPH 的 1% FBS 的 DMEM

培養液置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 4 小時後，以 PBS 清洗 2 次後，再加入含有 10 μM H₂DCF-DA 的培養液（含 1% FBS），於 37°C 下反應 30 分鐘後，以 PBS 清洗 3 次去除多餘染劑後，最後每格加入體積 500 μL 的 0.25% Triton®X-100 打破細胞，再以黑色 96 孔盤拿到激發波長設定為 485±20 nm、散射波長設定為 528±25 nm 的螢光光譜儀測定吸光值。



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 μg /mL 之標準溶液，也就是 eppendorf 分別先加 800、780、760、740、720、700 mL 的二次水，再依序分別加入 0、20、40、60、80、100 mL 的 BSA 就是所要濃度的標準液。接著再加入 200 μL protein assay dye (BIO-RAD)，振盪均勻後靜置 5 分鐘。加在 96 孔盤，標準液序列做三重複，接著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 μL 的待測蛋白質溶液加入 799 μL 二次蒸餾水，再加入 200 μL protein assay dye，均勻混合後，室溫下反應 5 分鐘後，加在 96 孔盤測，待測蛋白質溶液做二重複，接著放入分光光度計讀取波長 595 nm 的吸光值，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 sulfonyl 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 sulfonyl 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 μ m 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 μ m 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 (NH₄)₂S₂O₈ 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 -mercaptoethanol

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 -mercaptoethanol 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 fixer 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)

HaCaT 細胞種於 10 公分培養盤，每盤細胞密度 3×10^6 cells/plates，實驗條件同前述方法。將經過 Lucidone 反應的 HaCaT 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。

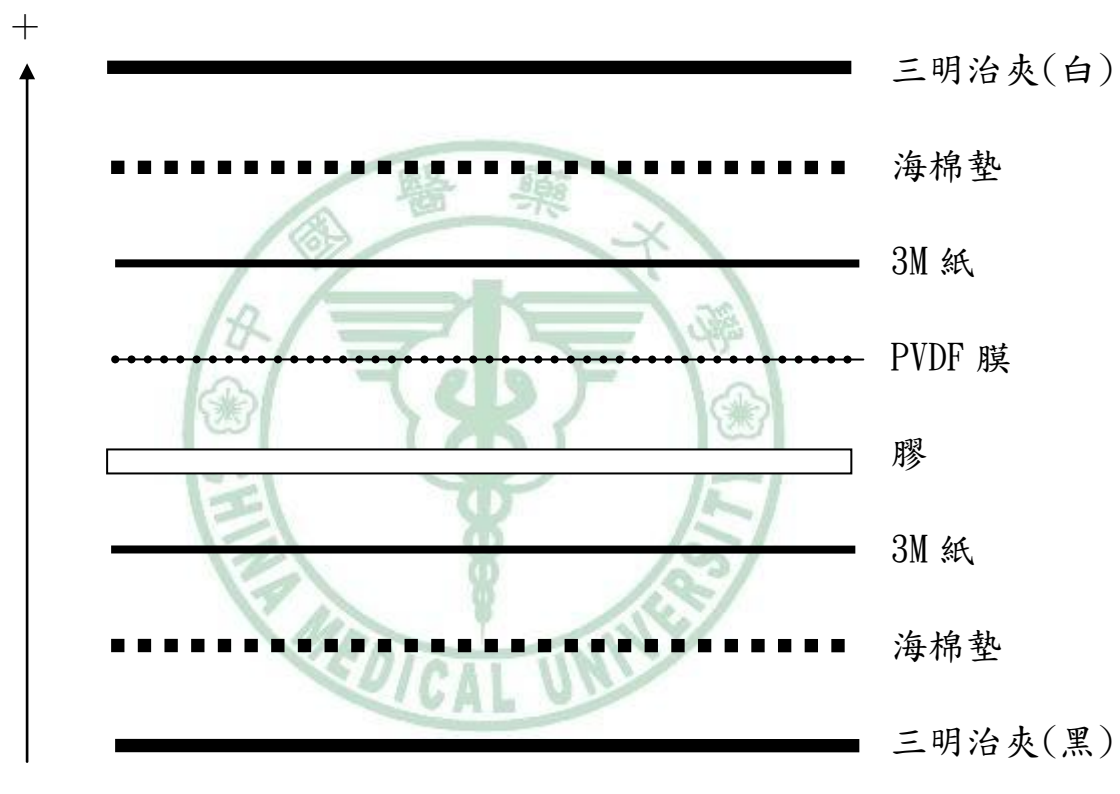
6、蛋白質轉移(Transfer protein to PVDF membrane)

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，最後再放上一片海綿墊片後夾上轉漬夾，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 membrane 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，

(1) 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；(2) 若使用冷光影像分析系統 LAS-4000mini，先將電腦及影像分析儀開機暖機，並打開分析軟體，待影像分析儀鏡頭溫度降到-30°C 顯示藍色時表示可以開始分析，將已泡好 superSignal WestPico chemiluminescent substrate 螢光液的 PVDF 膜放到平盤上，蓋上分析儀門，調整焦距及亮度，即可開始照相，照相時間設定依所要分析的蛋白螢光強度不同而有所不同，每照完一次儲存影像，影像的 bands 以分析軟體積分及統計軟體做組間差異。



電極

第十節、細胞酵素連結免疫分析法(PGE₂)

一、原理

此市售試劑套組是以競爭性免疫分析方法進行 PGE₂ 分析。細胞培養之上清液中 PGE₂ 與 HRP 標示之 PGE₂ 競爭 mouse monoclonal antibody，然後 PGE₂-antibod complex 結合到含有二級抗體 (gout anti-mouse polyclonal antibody) 的 96 孔盤底，培養一段時間後，移除物結合的物質，加入 substrate solution 作用，再加入硫酸終止反應，產生深淺不一的黃色產物，於 450 nm 下測定吸光值，用來評估 PGE₂ 酵素的活性。吸光值愈高表示培養液中 PGE₂ 酵素含量愈少，並可利用標準品序列稀釋得到的標準曲線來換算細胞培養液中 PGE₂ 的含量。

二、試劑（市售 Prostaglandin E₂ immunoassay kit；R&D Systems）

1. Goat Anti-mouse Microplate。
2. PGE₂ Conjugate。
3. PGE₂ Standard。
4. Primary Antibody Solution：用於稀釋標準品及培養液。
5. Calibrator Diluent RD5-39。
6. Wash Buffer：取 25 mL 的 Wash Buffer Concentrate 加二次水定
量到 500mL。
7. Color Reagent A and B：使用前以 1：1 方式混合配成 Substrate
Solution，15 分鐘內使用完，全程須避光操作。
8. Stop Solution。

三、方法

實驗前將細胞種於 12 well-plates，密度 2×10^5 cells/well，隔天換成 1% FBS 培養液 overnight，接著加入含不同濃度 Lucidone 的 1% FBS 培養液培養 24 小時後，再換成含 30 mM AAPH 的 1% FBS 培養液反應 4 小時後，分別收集不同組別細胞上清液，離心後即可以上清液做 kit。

1. Microplate 加入 150 μ L 的 Calibrator Diluent RD5-39 作為 NSB 組。
2. 加入 100 μ L 的 Calibrator Diluent RD5-39 作為 zero standard (B_0) wells。
3. 加入 100 μ L 的 Standard、control 和 sample*。（*sample 是細胞培養上清液需事先以 3 倍稀釋：150 μ L 上清液+ 300 μ L 的 Calibrator Diluent RD5-39）
4. 再加入 50 μ L 的 Primary Antibody Solution 到每格（NSB 組除外）。
5. 再加入 50 μ L 的 PGE_2 Conjugate 到每格。
6. 置於 shaker 上室溫反應 2 小時。
7. 以 Wash Buffer 清洗 4 次。
8. Color Reagent A and B 以 1:1 方式混合配成 Substrate Solution，每格各加入 200 μ L，避光反應 30 分鐘。
9. 每格加入 50 μ L 的 Stop Solution。
10. 30 分鐘內以波長 450 nm 測定吸光值
11. 以 % B/B_0 對標準品濃度建構標準曲線，並以 four parameter logistic (4-PL) curve-fit 求出樣品中 PGE_2 濃度。（Y 軸吸光值設定 linear y-axis，X 軸濃度設定 logarithmic x-axis）

第十一節、細胞遷移試驗 (Transwell invasion assay)

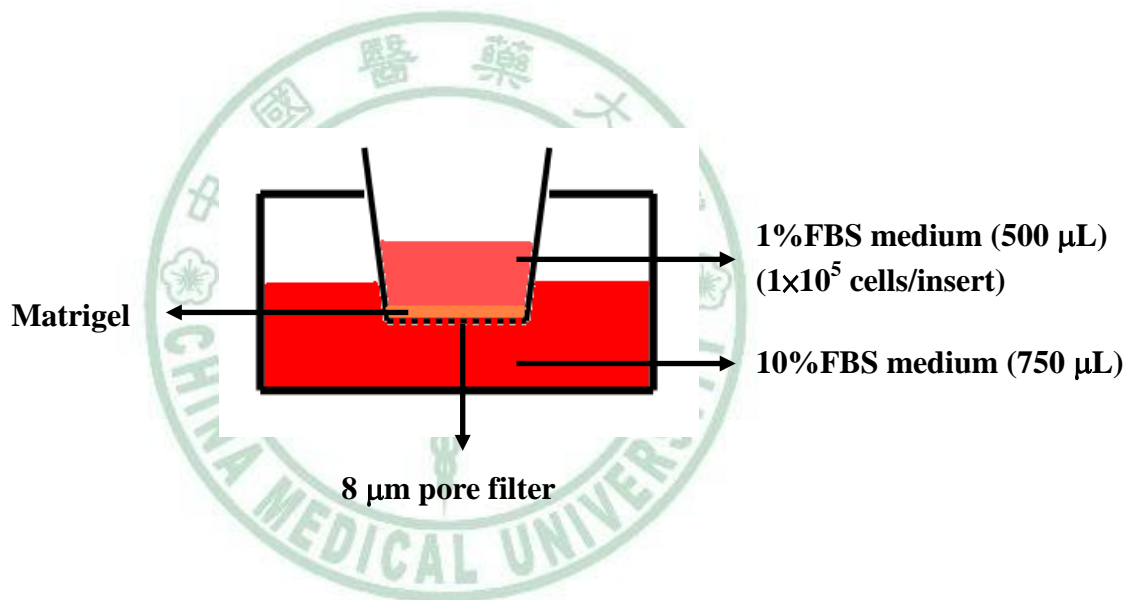
一、 原理

利用 Matrigel invasion chamber，將細胞種在上層盤的 Insert 內，若細胞有遷移情形，則會穿過 Insert 內的 Matrigel 及 8 μm 孔洞的濾膜，掉落至下層盤的 well 中，造成細胞侵入性的現象。

二、 方法

先將 invasion chamber 專用 24 孔下層培養盤各加入 750 μL 含 10% FBS 的培養液，再將 BD Matrigel™ Invasion Chamber 從 -20°C 拿出，將已預先覆蓋 (coating) Matrigel 的上層盤 insert 先放入已加培養液的 24 孔下層盤中，並在 37°C 培養箱復水反應 2 小時，接著將 HaCaT 細胞以 Trypsin- EDTA 處理後，使細胞懸浮，將細胞離心，以 1×10^5 cells/well 的細胞密度均勻懸浮在已加入不同濃度 Lucidone 且含有 1% FBS 的培養液中，接著控制各組總體積 500 μL 並加入 insert 內 (8 μm pore size, polycarbonate membrane)，移入 37°C 、5% CO_2 的培養箱中反應 24、48 小時，之後將 invasion chamber 拿出，將上層盤 insert 倒扣在紙巾上，以 75% 的冰乙醇(或 100% 甲醇)固定 15 分鐘，之後置於室溫下自然乾燥 (約 20~30 分鐘)。以 Giemsa Stain (1:4 = 1 mL 染劑 + 3 mL 二次水) 染色 60 分鐘後，並用已沾濕二次水的棉花棒將 insert 內的細胞、

培養基 Matrigel 輕輕旋轉移除，以二次水洗去多餘染劑。之後在顯微鏡下以 200 X 視野觀察，隨機選取位於上層盤 insert 膜下表面中的 9 個視野，並計算每一視野中的總細胞數；9 個視野細胞數的平均值為每個 invasion chamber 之人類皮膚細胞趨化性移動的指標。



第十二節、統計分析

實驗結果數據皆以平均值±標準差 (Mean ± 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。



肆、實驗結果與圖表





第一部份

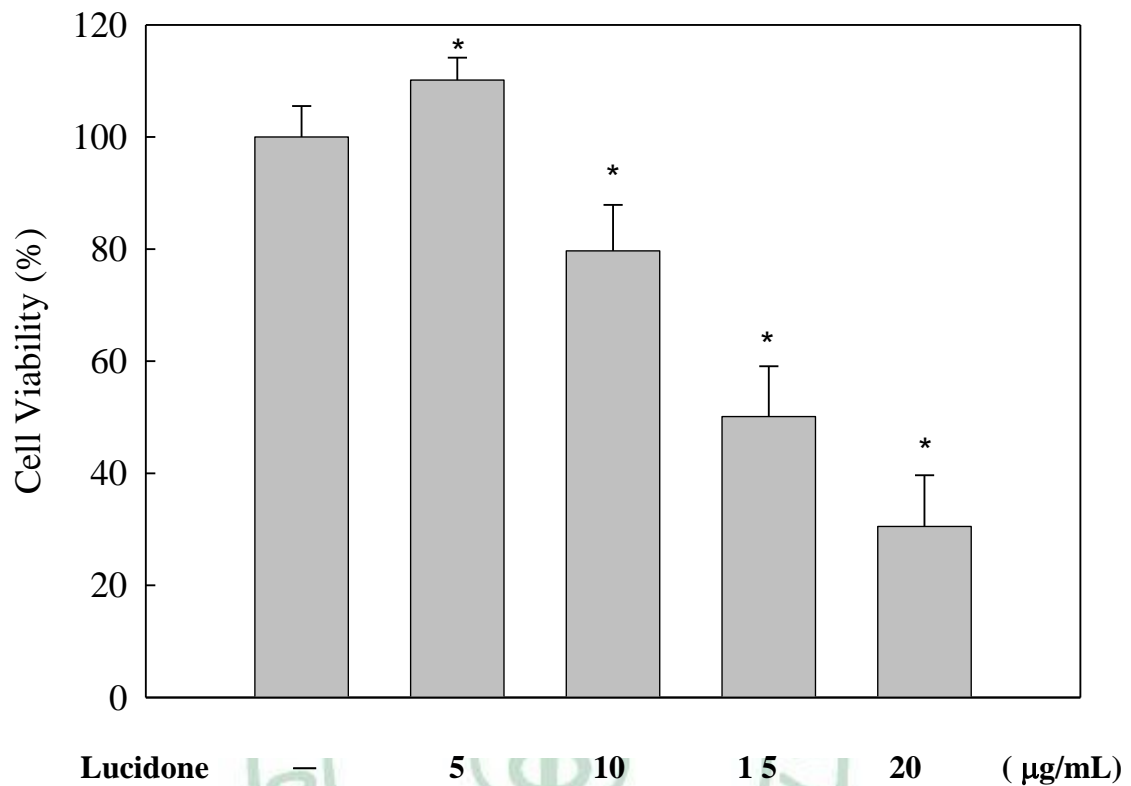
Lucidone對HaCaT細胞

抗發炎的影響

一、Lucidone對HaCaT細胞的影響

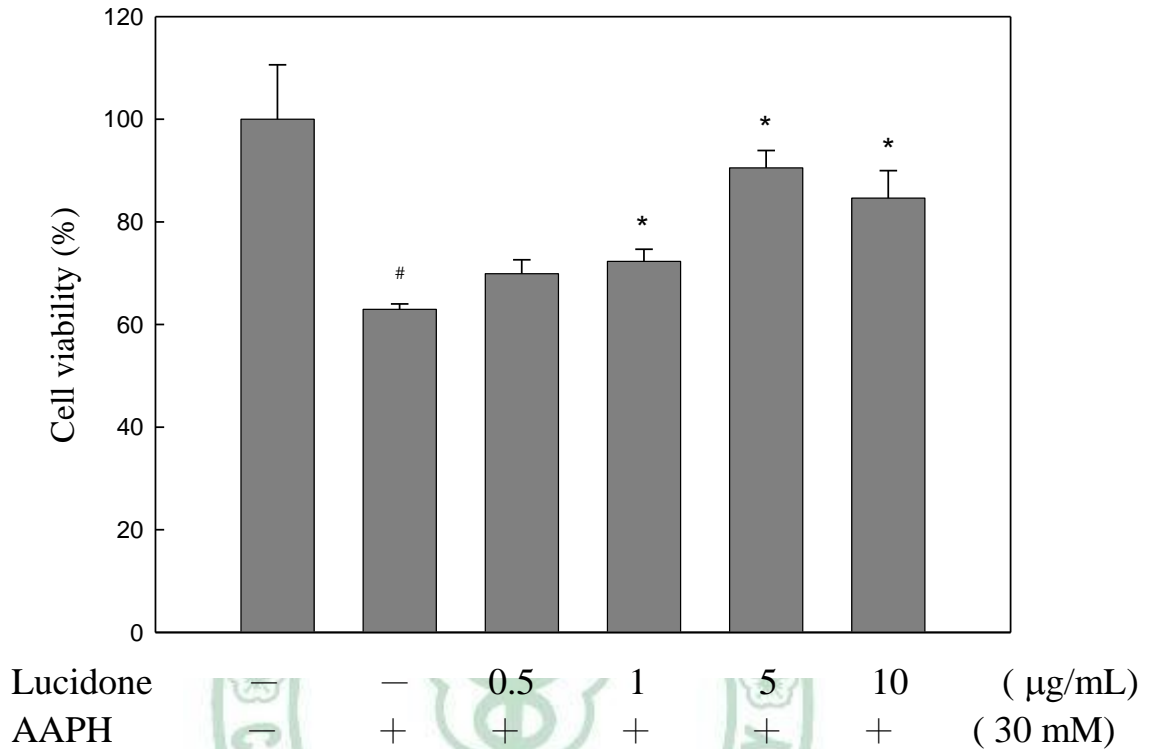
實驗以含有Lucidone不同濃度（5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的10% FBS培養液分別培養24小時後，以細胞計數器來看計算HaCaT細胞存活率。結果顯示，Lucidone濃度在5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，細胞數甚至比控制組還多，表示有促進HaCaT細胞生長的情形，而隨著Lucidone濃度的增加，存活率明顯下降，在濃度15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時存活率和控制組相比只有一半左右（圖一）。

所以後面實驗的Lucidone濃度取在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下。接著在開始實驗前先換成1% FBS的培養液starvation overnight後，以含有不同濃度Lucidone（0.5、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的1% FBS培養液分別培養24小時後，再換過含30 mM AAPH的1% FBS新鮮培養液反應6小時後，以MTT來測定細胞存活率。結果顯示，有給予不同濃度Lucidone保護後的HaCaT細胞，其抵抗AAPH的效果隨著Lucidone濃度的增加而增加，在5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時細胞存活率已達90%，顯示在低濃度對抗AAPH的傷害即有很好的效果（圖二A、B）。



圖一、. 觀察 Lucidone 對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞存活率之影響。實驗分別以不同濃度 Lucidone : 5、10、15、20 µg/mL 處理 HaCaT 細胞 24 小時後，觀察對 HaCaT 細胞存活率之影響。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。

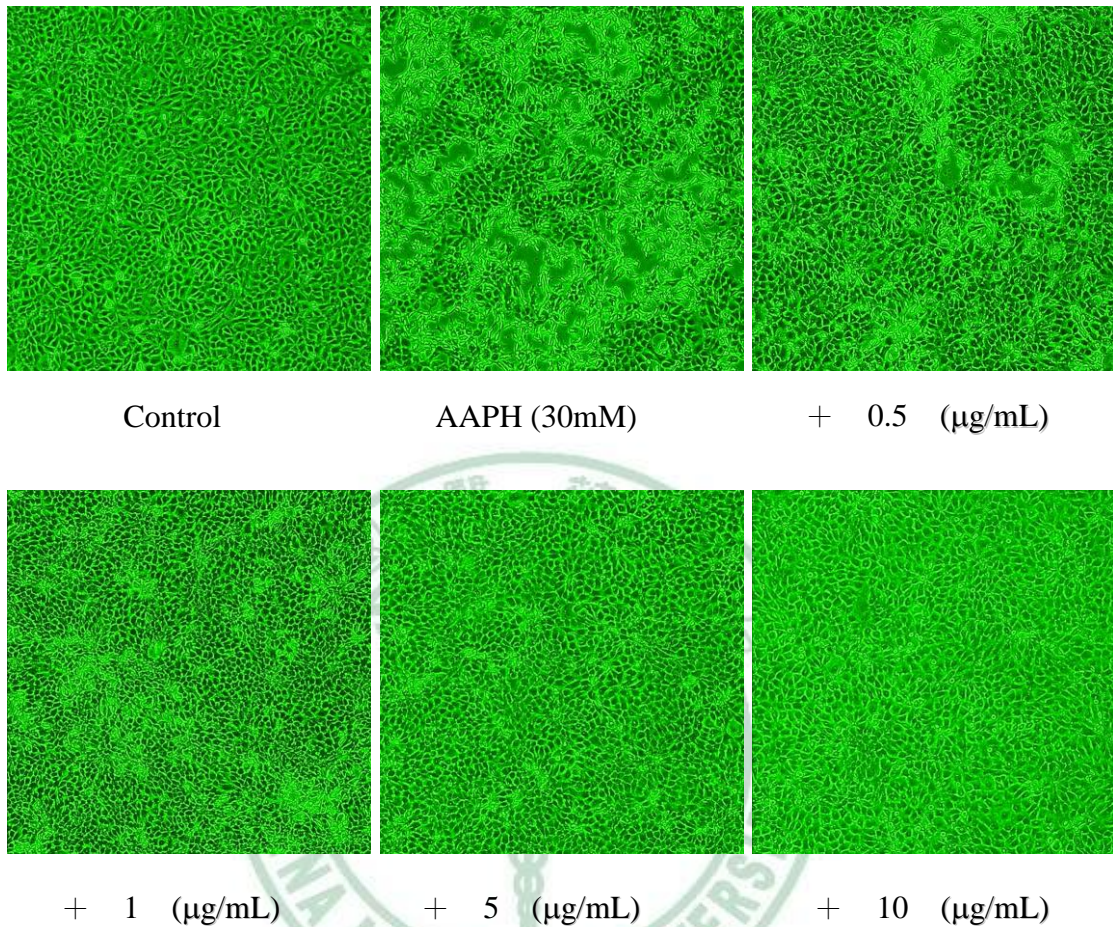
(A)



圖二、觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後的影響。

實驗以 Lucidone : 0.5、1、5、10 µg/mL 預培養 HaCaT 細胞 24 小時後，換過新鮮培養液，再以 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 6 小時後，觀察對 HaCaT 細胞的保護效果。(A) 為量化的圖；(B) 為顯微鏡下的細胞型態(40x)。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。# p<0.05 v.s. Control；* p<0.05 v.s. AAPH。

(B)



圖二、觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後的影響。

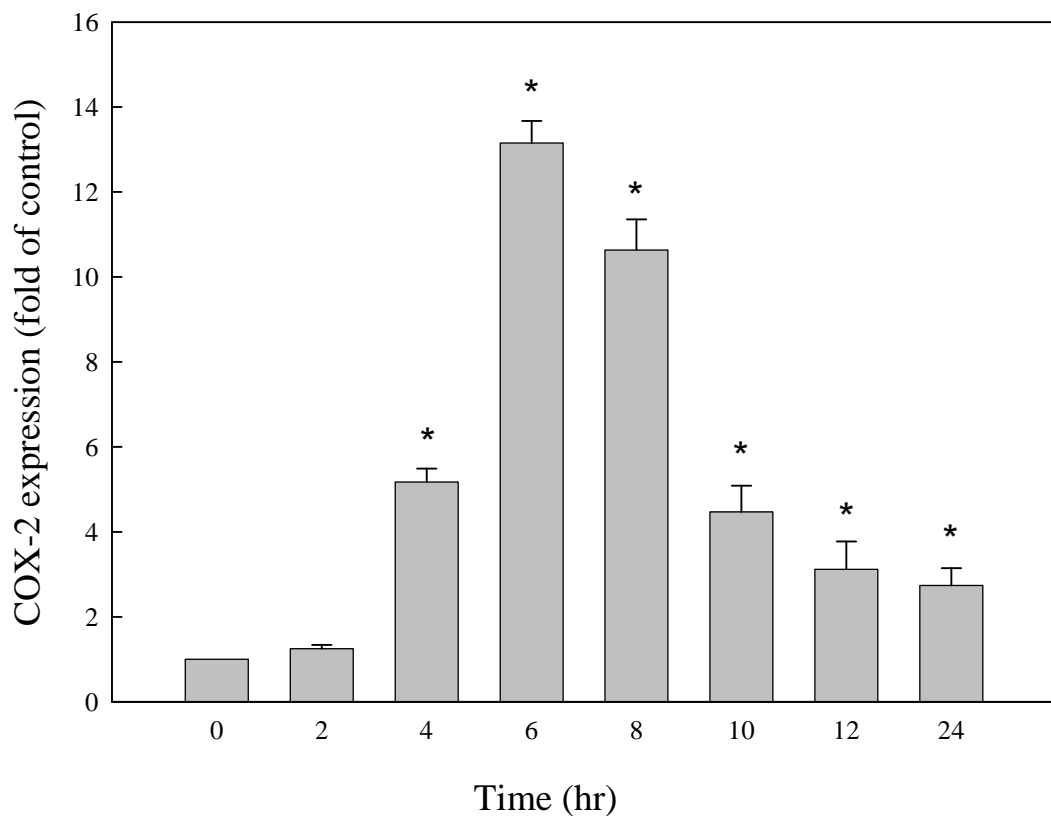
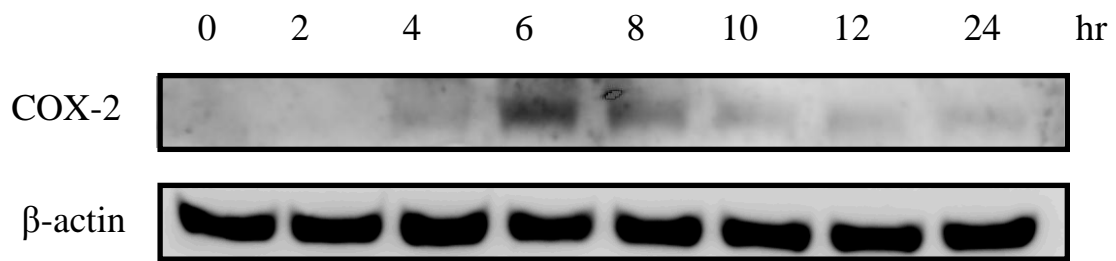
實驗以 Lucidone : 0.5、1、5、10 µg/mL 預培養 HaCaT 細胞 24 小時後，換過新鮮培養液，再以 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 6 小時後，觀察對 HaCaT 細胞的保護效果。(A)為量化的圖；(B)為顯微鏡下的細胞型態 (40x)。

二、AAPH誘導COX-2蛋白的表現

以西方墨點分析法來觀察AAPH對HaCaT細胞COX-2蛋白表現的影響，如圖三所示，實驗前以1% FBS的培養液starvation overnight後，再給予HaCaT細胞含30 mM AAPH的1% FBS刺激4小時後，其COX-2蛋白開始有明顯的表現，而6小時COX-2蛋白表現量達到最高，隨後逐漸下降，持續表現到24小時。

接著，實驗同樣條件下以不同濃度的AAPH (0、5、10、30、50 mM) 分別刺激HaCaT細胞4小時後，以西方墨點分析法來觀察COX-2蛋白的表現。結果顯示隨著AAPH濃度的上升，HaCaT細胞的COX-2蛋白表現量也增加 (圖四)。

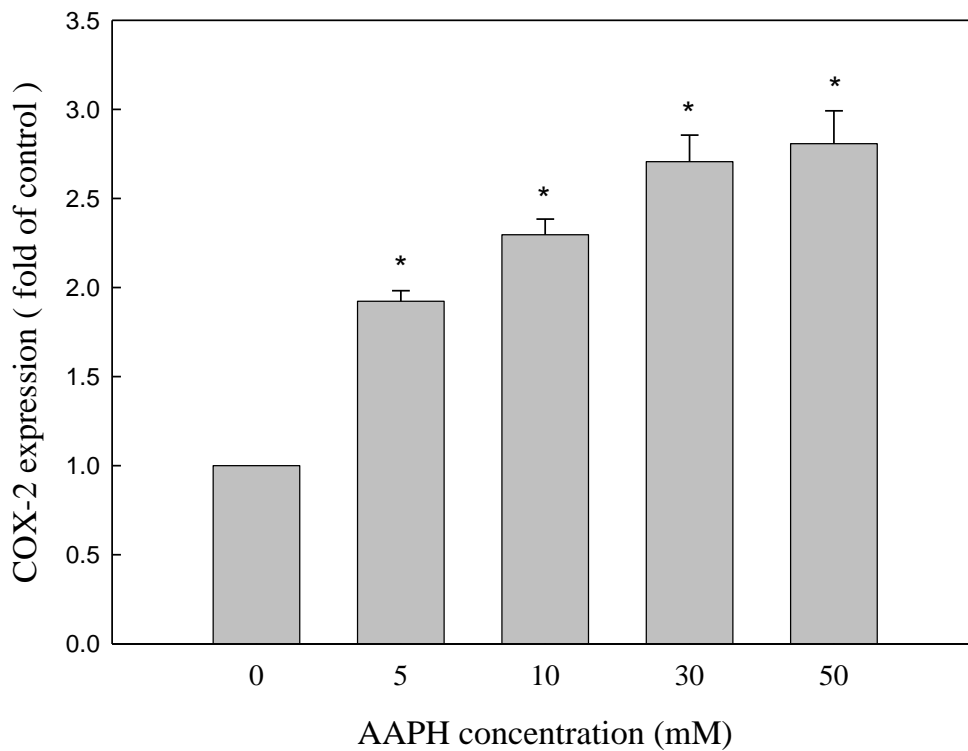
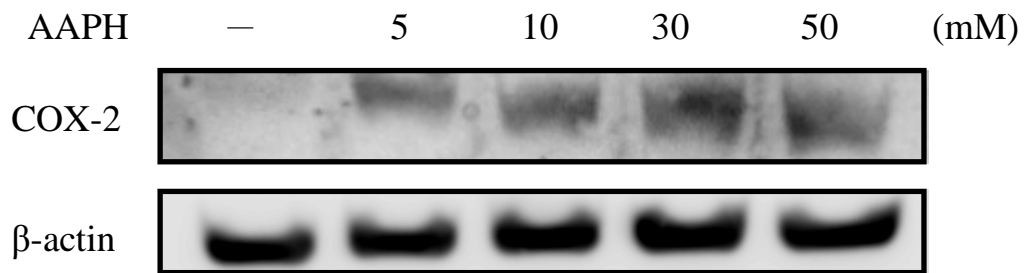




圖三、以西方墨點法觀察 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後 COX-2 表現的影響。

以 30 mM 的 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT：0、2、4、6、8、10、12、24 小時後，以西方點墨分析法來觀察 COX-2 之表現情形。

數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。



圖四、以西方墨點法觀察 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後 COX-2 表現的影響。

分別以 0、5、10、30、50 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 4 小時後，以西方點墨分析法來觀察 COX-2 之表現情形。

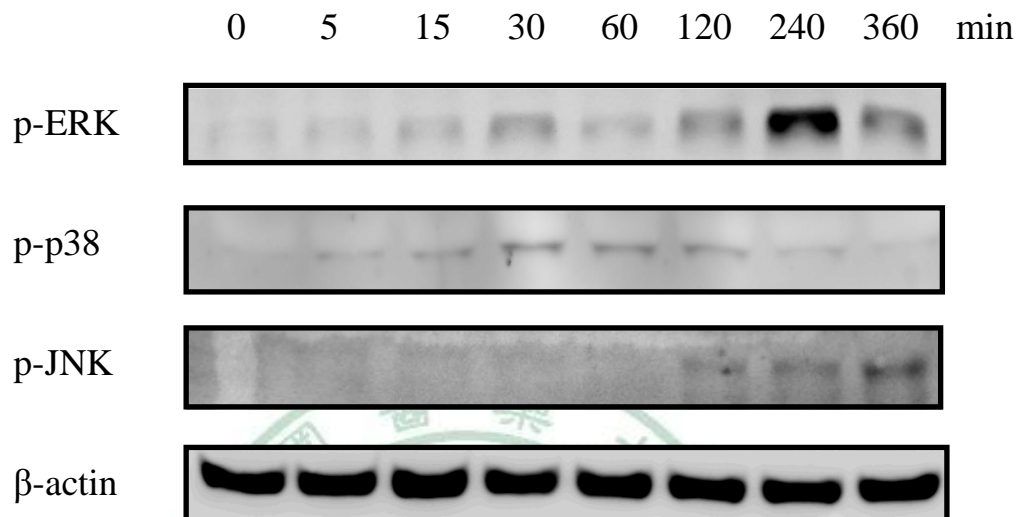
數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。

三、AAPH誘導活化ERK、p38 MAPK及JNK/SAPK

已有相當多的研究證實MAPK家族成員再COX-2基因的表現上扮演一重要的角色。因此以同樣條件下實驗用30 mM AAPH刺激HaCaT細胞不同時間點（0、5、15、30、60、120、240、360分鐘）後，以西方墨點分析法來觀察MAPKs家族蛋白活化之表現情形。結果顯示，ERK磷酸化在AAPH刺激15分鐘後開始表現，並在240分鐘表現量達到最高；p38磷酸化在AAPH刺激5分鐘後開始表現，並且在30分鐘表現量達到最大，隨後下降；而JNK磷酸化在AAPH刺激後120分鐘有明顯開始表現（圖五 A、B）。



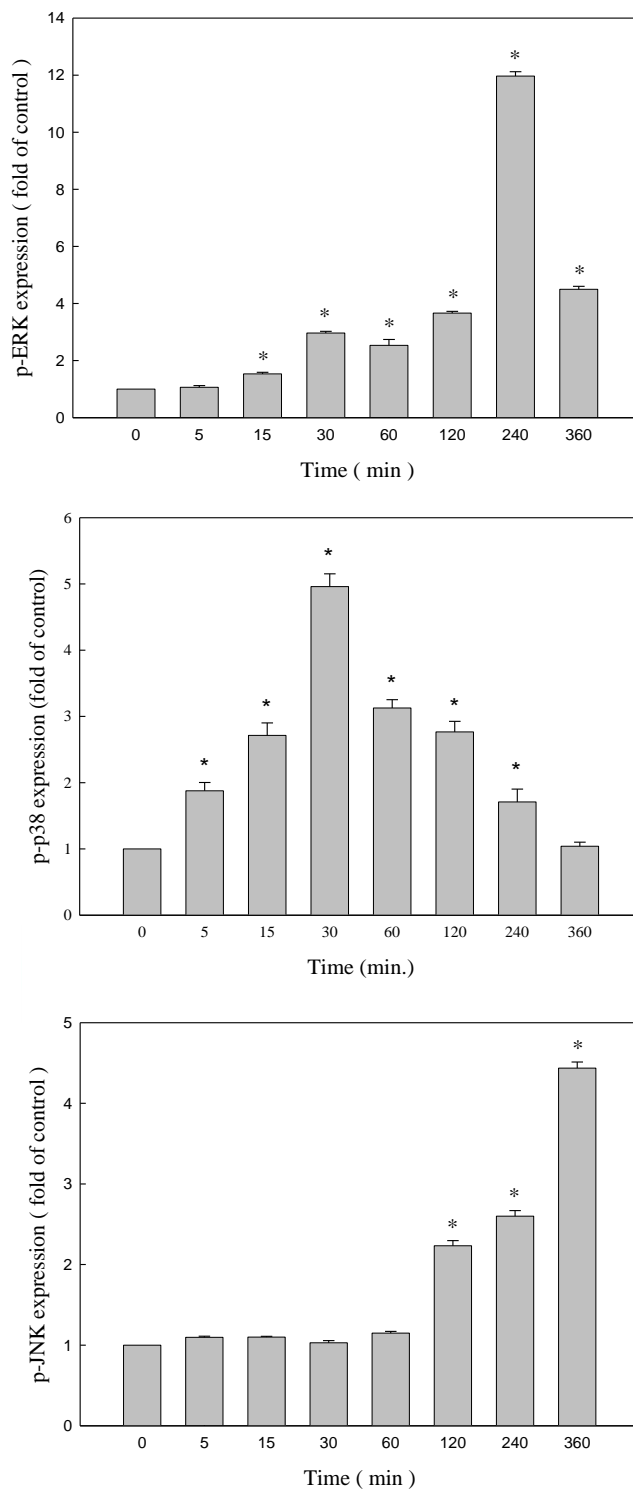
(A)



圖五、以西方墨點法觀察 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後磷酸化 MAPKs 表現的影響。

以 30 mM 的 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT : 0、5、15、30、60、120、240、360 分鐘後，以西方點墨分析法來觀察磷酸化 MAPKs 之表現情形。(A)為以西方墨點法來觀察磷酸化 ERK、p38 及 JNK 的蛋白質表現；(B)為量化圖。

(B)



圖五、以西方墨點法觀察 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後磷酸化 MAPKs 表現的影響。

以 30 mM 的 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT : 0、5、15、30、60、120、240、360 分鐘後，以西方點墨分析法來觀察磷酸化 MAPKs 之表現情形。(A)為以西方墨點法來觀察磷酸化 ERK、p38 及 JNK 的蛋白質表現；(B)為量化圖。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。

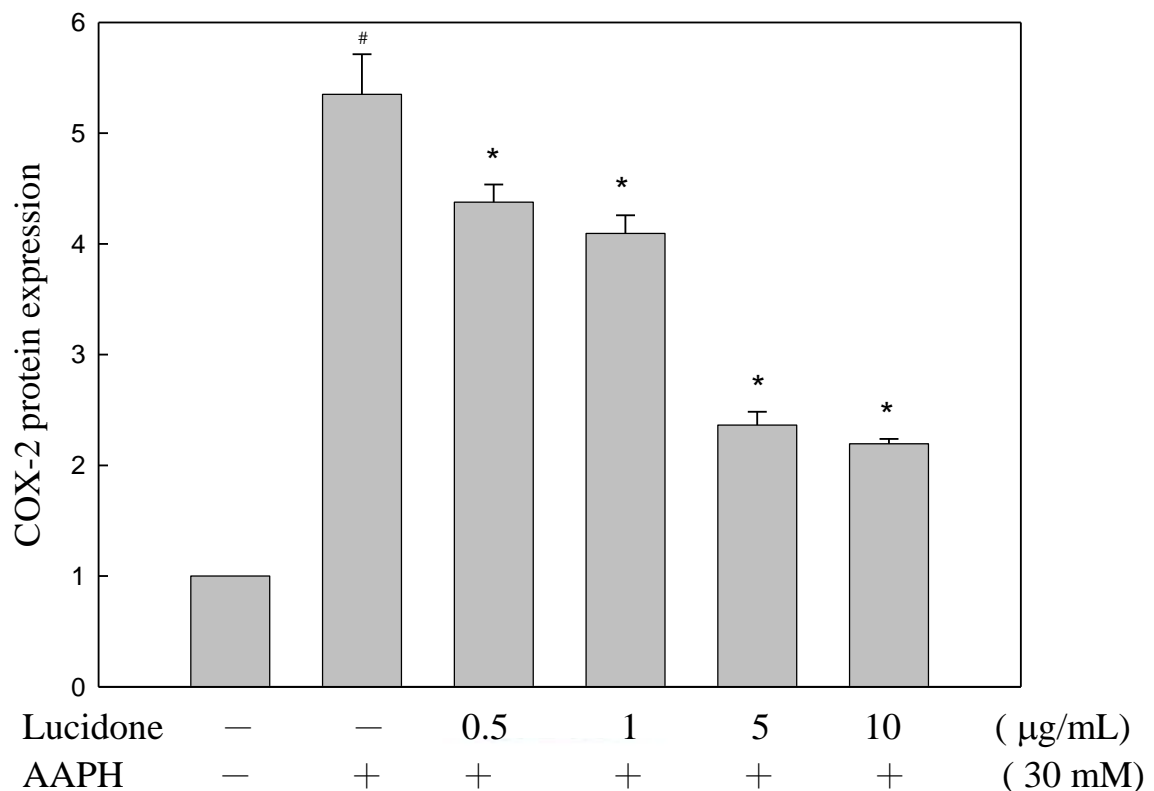
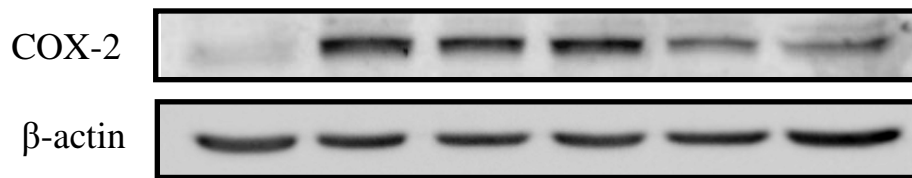
四、Lucidone經由MAPKs路徑減少AAPH誘導的COX-2及iNOS蛋白表現，進而減少前發炎因子PGE₂的分泌

許多研究指出，COX-2和iNOS在發炎相關過程、細胞分化及促成皮膚腫瘤形成中都是很重要的兩種酵素【Saleem *et al.*, 2004; Herschman, 1994】。因此實驗以同樣條件下先加入不同濃的Lucidone (0.5、1、5、10 µg/mL) 分別培養24小時後，再換過含30 mM AAPH的新鮮培養液繼續反應4小時後，以西方墨點分析法來觀察COX-2和iNOS蛋白的表現情形。結果顯示，COX-2和iNOS的蛋白表現在單獨給予AAPH刺激後有很明顯表現量，而有預先給予Lucidone處理後的HaCaT細胞，其COX-2和iNOS的蛋白表現隨Lucidone濃度增加而表現量下降 (圖六、圖八)。

COX-2是調節下游PGE₂分泌最主要的蛋白，接著以酵素免疫分析法來觀察HaCaT細胞分泌PGE₂之情形，如圖七結果所示，隨著Lucidone濃度的上升而可以很顯著的抑制HaCaT細胞分泌PGE₂的情形。

以西方墨點法來觀察MAPK訊息途徑的結果也顯示，隨著Lucidone濃度的上升而可以很顯著的抑制HaCaT細胞EPK磷酸化的情形；而在磷酸化p38及JNK的結果也顯示，Lucidone在不同濃度下也有很明顯的減少其磷酸化的情形 (圖九 A、B)。

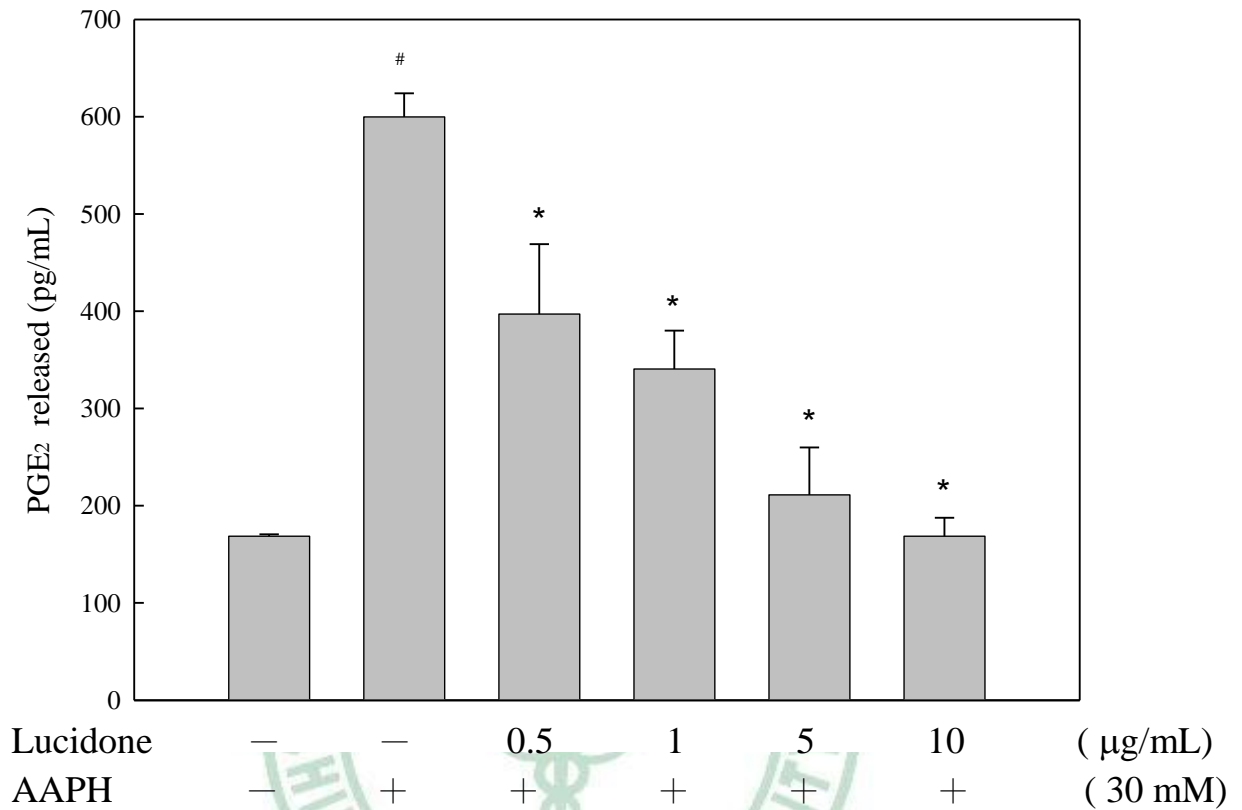
Lucidone	—	—	0.5	1	5	10	($\mu\text{g/mL}$)
AAPH	—	+	+	+	+	+	(30 mM)



圖六、以西方墨點法觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後 COX-2 表現的影響。

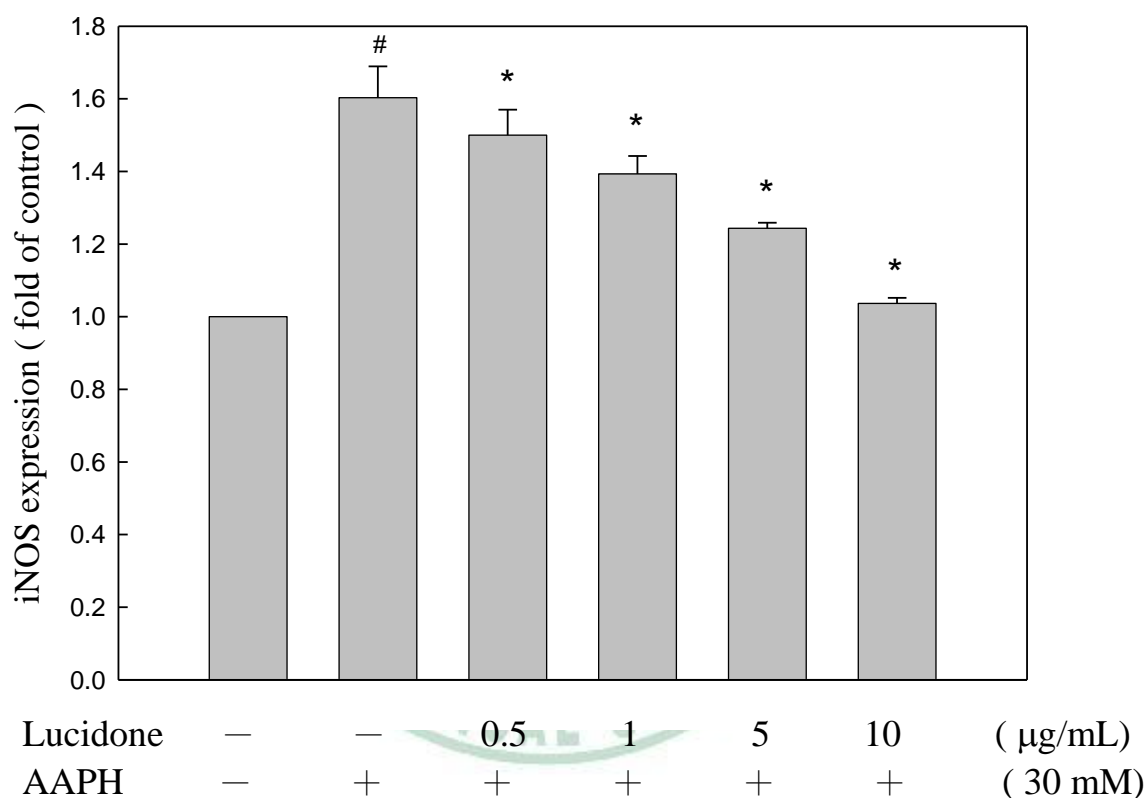
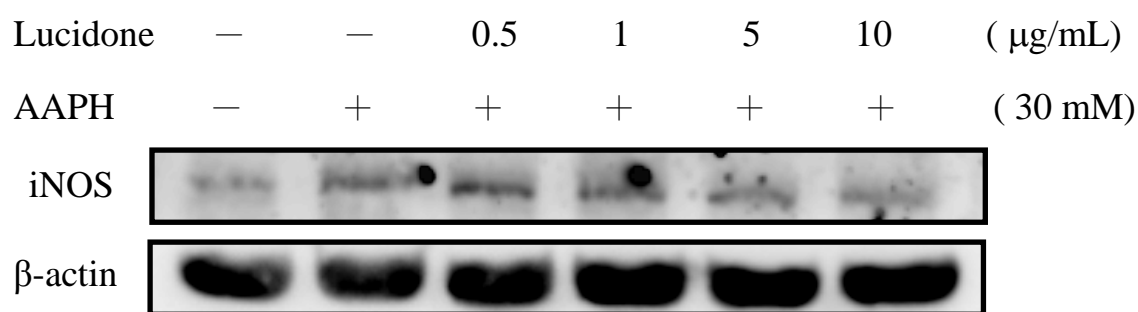
以 Lucidone : 0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 預先培養 HaCaT 細胞 24 小時後，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 4 小時後，以西方點墨分析法來觀察 COX-2 之表現情形。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。

p<0.05 v.s. Control ; * p<0.05 v.s. AAPH。



圖七、以酵素免疫法分析 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後分泌 PGE₂ 的影響。

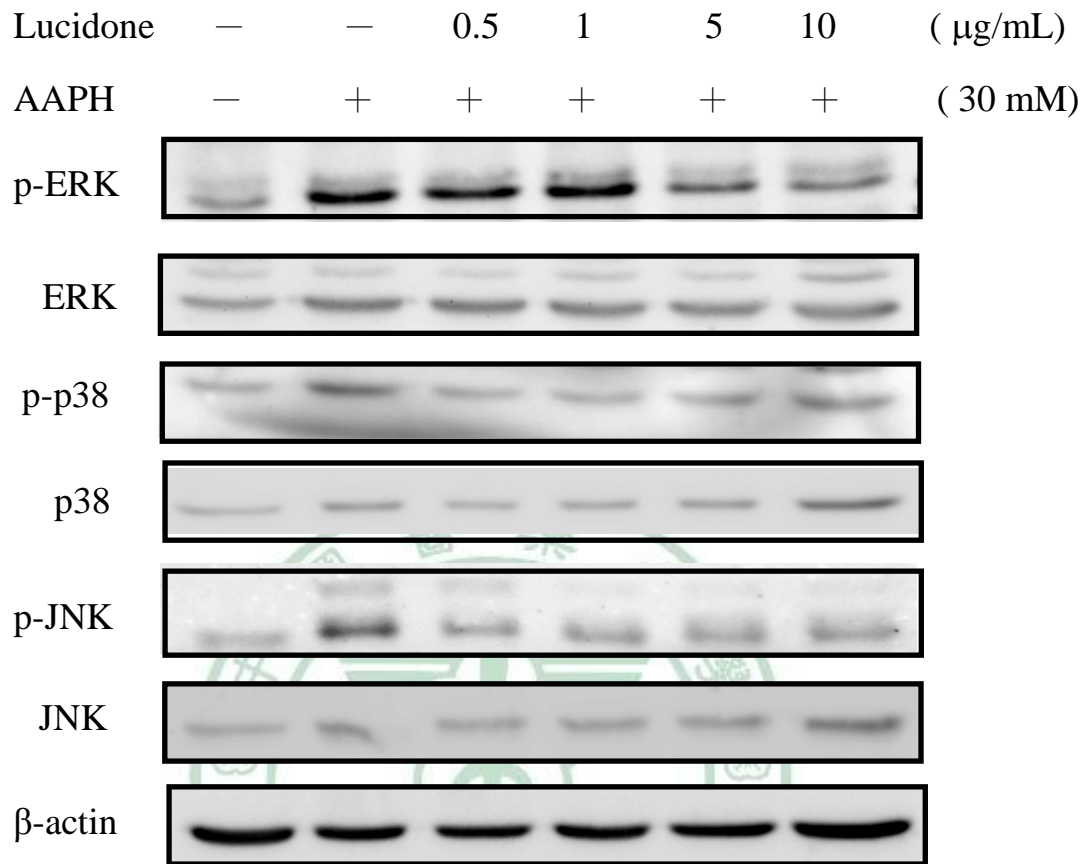
以 Lucidone : 0.5、1、5、10 µg/mL 預先培養 HaCaT 細胞 24 小時後，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 6 小時後，以酵素免疫分析法來觀察細胞分泌 PGE₂ 之情形。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。
p<0.05 v.s. Control ; * p<0.05 v.s. AAPH。



圖八、以西方墨點法觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後 iNOS 表現的影響。

以 Lucidone : 0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 預先培養 HaCaT 細胞 24 小時後，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 4 小時後，以西方點墨分析法來觀察 iNOS 蛋白之表現情形。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。
p<0.05 v.s. Control ; * p<0.05 v.s. AAPH。

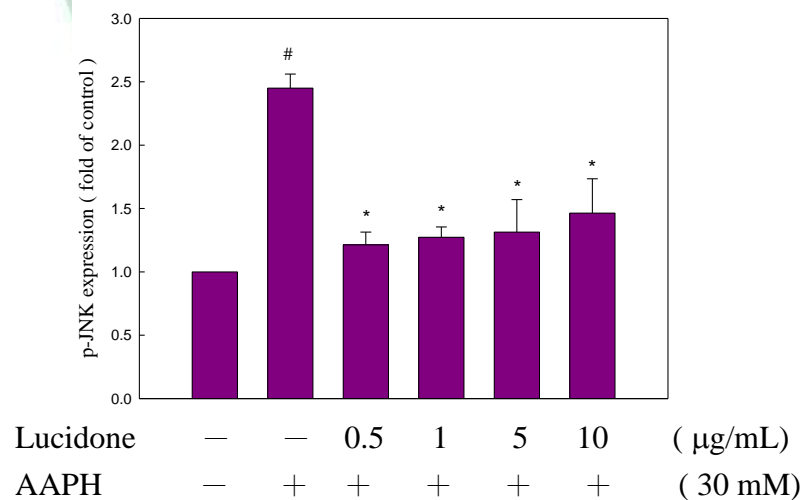
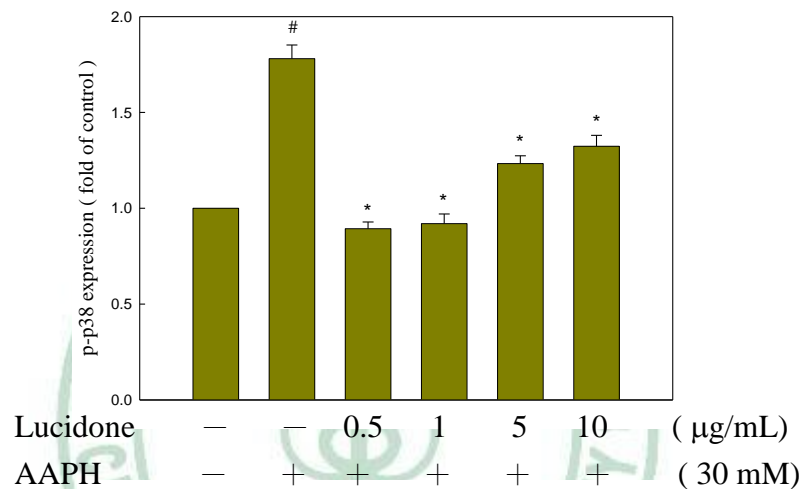
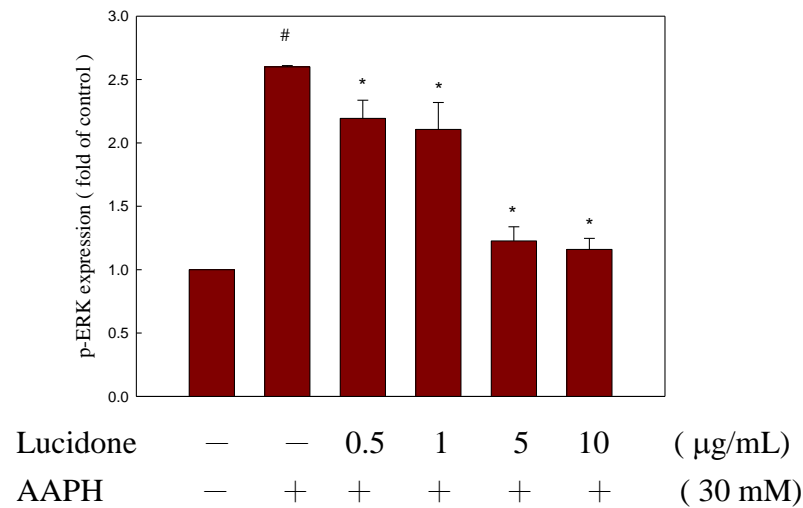
(A)



圖九、以西方墨點法觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後 MAPKs 蛋白質表現的影響。

以 Lucidone : 0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 預先培養 HaCaT 細胞 24 小時後，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 4 小時後，以西方點墨分析法來觀察 MAPKs 蛋白質之表現情形。(A)為以西方墨點法來觀察磷酸化 MAPKs 的蛋白質表現；(B)為量化圖。

(B)



圖九、以西方墨點法觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後 MAPKs 蛋白質表現的影響。

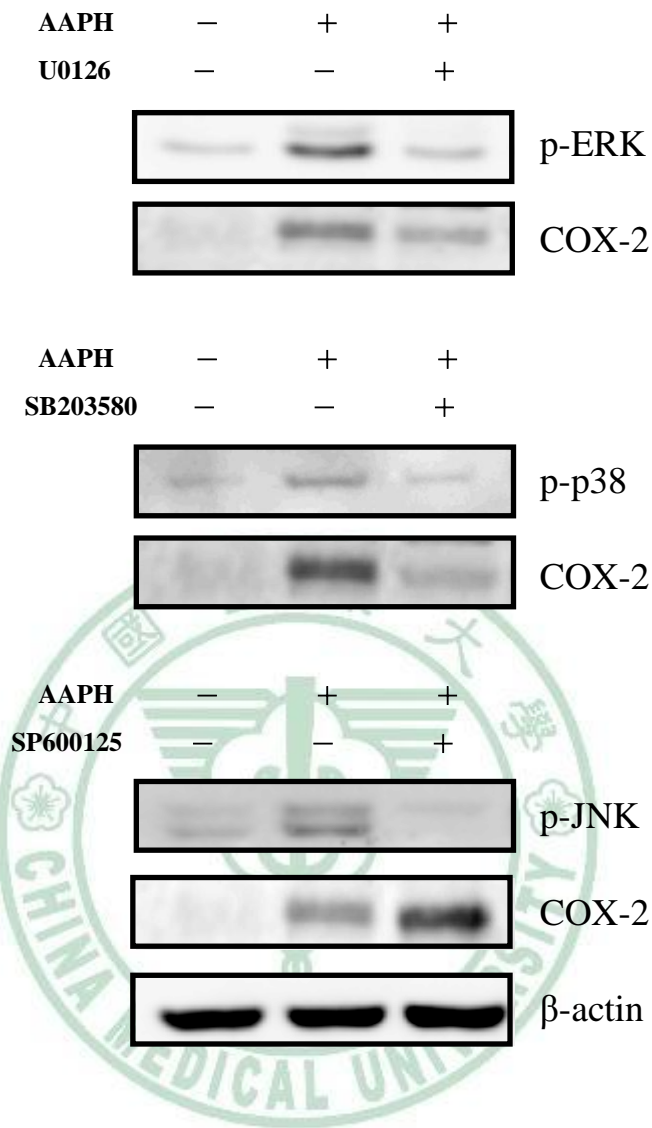
以 Lucidone : 0.5、1、5、10 µg/mL 預先培養 HaCaT 細胞 24 小時後，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 4 小時後，以西方點墨分析法來觀察 MAPKs 蛋白質之表現情形。(A)為以西方墨點法來觀察磷酸化 MAPKs 的蛋白質表現；(B)為量化圖。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。# p<0.05 v.s. Control；* p<0.05 v.s. AAPH。

五、Lucidone是經由ERK和p38路徑而使COX-2表現量減少

接著想確認Lucidone是經由MAPKs中哪一條路徑來抑制COX-2的表現，因此實驗預先以ERK抑制劑U0126及p38抑制劑SB203580和JNK抑制劑SP600125各30 mM培養 1 小時，再使用30 mM 的AAPH 刺激HaCaT細胞4小時後，以西方點墨分析法來觀察MAPKs及COX-2蛋白質之表現情形。

結果顯示ERK抑制劑U0126及p38抑制劑SB203580確實可以抑制ERK和p38的磷酸化，且進而減少COX-2的表現；而JNK抑制劑SP600125可以抑制JNK的磷酸化，但卻不會抑制COX-2的表現，如圖十。





圖十、以西方墨點法觀察 MAPKs 抑制劑對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞 MAPKs 及 COX-2 蛋白質表現的影響。

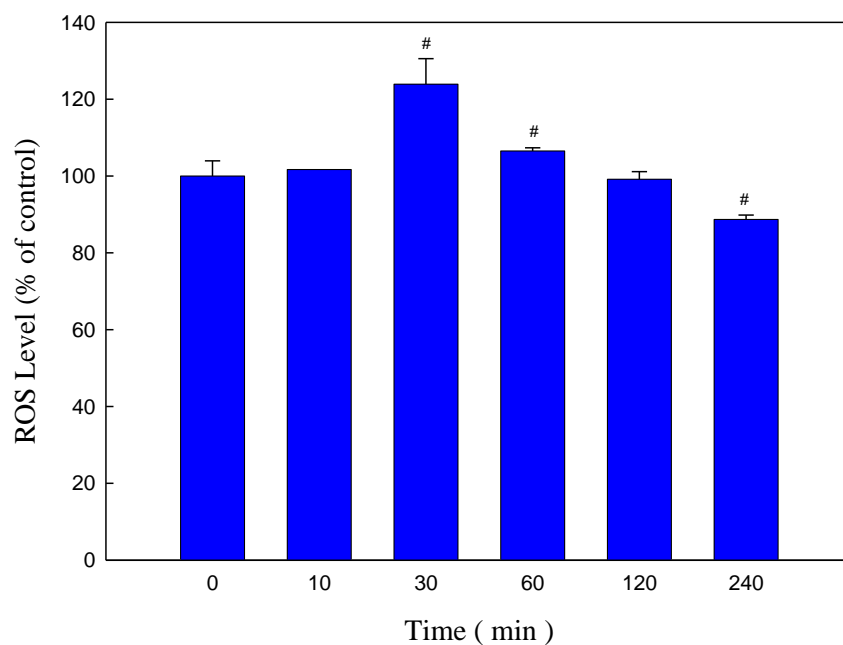
HaCaT 細胞預先以 ERK 抑制劑 U0126 或 p38 抑制劑 SB203580 或 JNK 抑制劑 SP600125 各 30 mM 培養 1 小時，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 4 小時後，以西方點墨分析法來觀察 MAPKs 及 COX-2 蛋白質之表現情形。

六、Lucidone可以減少HaCaT細胞內AAPH所誘導的ROS產量

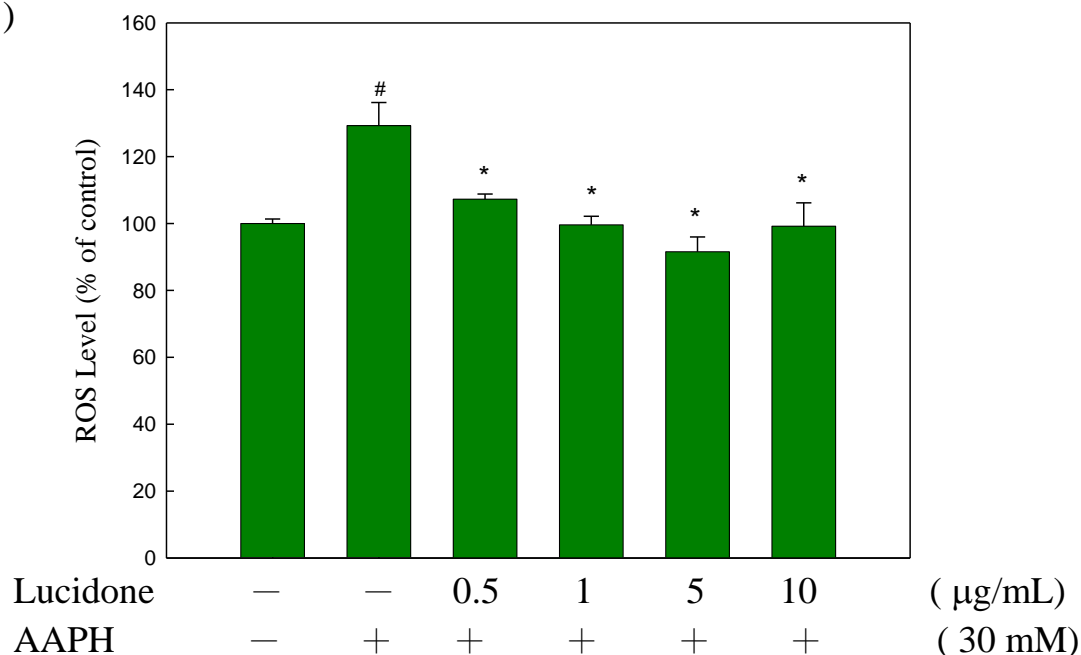
實驗在同樣條件下先以30 mM的AAPH分別刺激HaCaT細胞0、10、30、60、120、240分鐘後，以H₂DCF-DA染劑作用後，利用螢光光譜儀來偵測細胞內的ROS產量。結果顯示，再給予AAPH刺激後30分鐘，HaCaT細胞內的ROS產量達到最高（圖十一 A），隨即下降。

接著實驗預先加入不同濃的Lucidone（0.5、1、5、10 μg/mL）分別培養24小時後，再換過含30 mM AAPH的新鮮培養液繼續反應4小時後，再以H₂DCF-DA染劑作用後，利用螢光光譜儀來偵測細胞內的ROS產量。結果顯示，隨著Lucidone濃度的增加，可以顯著的抑制HaCaT細胞ROS的產生（圖十一 B）。

(A)



(B)



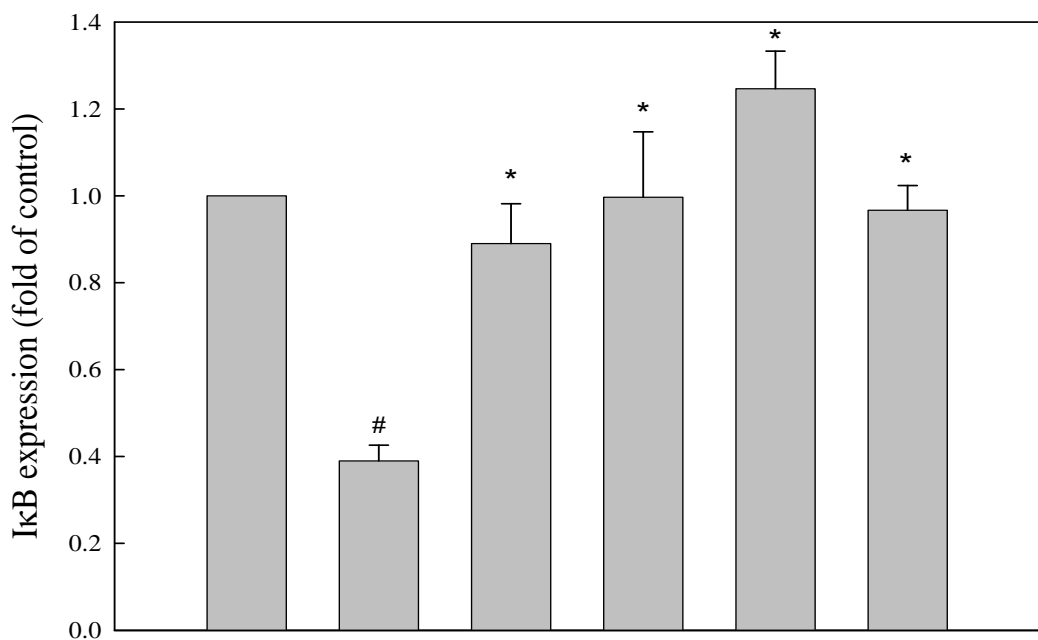
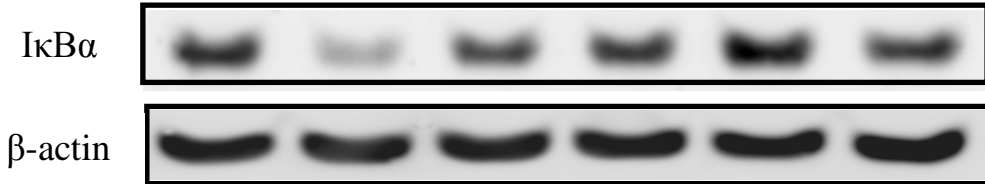
圖十一、觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激 HaCaT 細胞內 ROS 表現之影響。(A)以 30 mM 的 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT: 0、10、30、60、120、240 分鐘後，觀察 AAPH 對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞內 ROS 之表現。(B)以 Lucidone: 0.5、1、5、10 µg/mL 預先培養 HaCaT 細胞 24 小時後，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 30 分鐘後，觀察對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞內 ROS 產量。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。# p<0.05 v.s. Control; * p<0.05 v.s. AAPH。

七、Lucidone預防AAPH誘導I κ B α 的降解增加其穩定性

已有許多研究證實，增加I κ B α 的穩定性抑制其泛素化（ubiquitination）而被降解，有助於抑制轉錄因子NF- κ B的活化而轉位（translocation）到核內，啟動下游基因表現，而使前發炎蛋白COX-2或iNOS蛋白的表現量下降，將可減少發炎反應的發生。

實驗以同樣條件下先加入不同濃的Lucidone（0.5、1、5、10 μ g/mL）分別培養24小時後，再換過含30 mM AAPH的培養液繼續反應4小時後，以西方墨點分析法來觀察I κ B α 蛋白的表現情形。結果顯示，單獨給予AAPH刺激後I κ B α 的表現量明顯和控制組比有很顯著的下降，表示I κ B α 被降解；而有預先給予Lucidone處理後的HaCaT細胞，其I κ B α 的蛋白表現隨Lucidone濃度增加而表現量增加（圖十二），表示隨Lucidone濃度的增加，可以增加I κ B α 的穩定性，預防泛素化而被降解掉，進而抑制NF- κ B轉位至細胞核內啟動下游基因表現。

Lucidone	—	—	0.5	1	5	10	($\mu\text{g/mL}$)
AAPH	—	+	+	+	+	+	(30 mM)



Lucidone	—	—	0.5	1	5	10	($\mu\text{g/mL}$)
AAPH	—	+	+	+	+	+	(30 mM)

圖十二、以西方墨點法觀察 Lucidone 對 AAPH 刺激人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞後 I κ B α 蛋白質表現的影響。

以 Lucidone : 0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 預先培養 HaCaT 細胞 24 小時後，再使用 30 mM 的 AAPH 刺激 HaCaT 細胞 4 小時後，以西方點墨分析法來觀察 I κ B α 蛋白質之表現情形。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。

p<0.05 v.s. Control ; * p<0.05 v.s. AAPH。



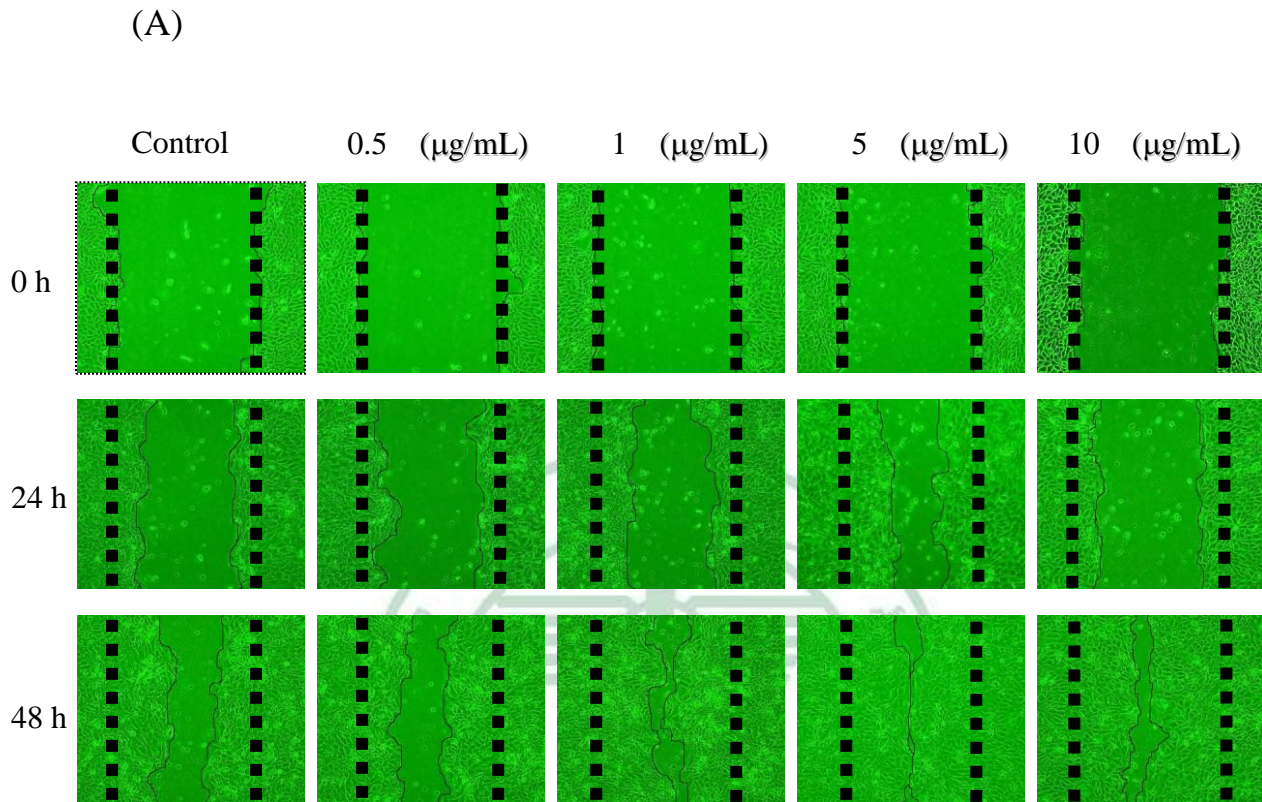
第二部份

**Lucidone對HaCaT細胞
migration的影響**

八、Lucidone 促進 HaCaT 細胞的移行 (migration)

Lucidone 在 HaCaT 細胞的移行試驗是利用損傷癒合 (wound healing) 的模式。實驗將 HaCaT 細胞培養在 12-well plate，接著以 200 μ L 的黃色 Tip 在已貼附好的細胞上刮一條模擬皮膚細胞損傷癒合(wound healing)情形，接著以含有不同濃度 Lucidone : 0.5、1、5、10 μ g/mL 的 10% FBS 培養液培養 HaCaT 細胞，並觀察 0、24、48 小時 HaCaT 細胞移行(migration)的現象。結果顯示，隨著時間的增加，以不同濃度的 Lucidone 培養的 HaCaT 細胞移行的情形也增加，和控制組比起來，隨著 Lucidone 濃度的增加，細胞移行的情形也越明顯 (圖十三 A、B)。

為了要排除 Lucidone 在模擬細胞損傷癒合模式中促進細胞增生 (proliferation) 的影響【Kung *et al.*, 2008】，接下來實驗利用 Transwell 來觀察 Lucidone 對 HaCaT 細胞遷移 (migration) 的情形。實驗步驟在方法中已述，結果顯示，在給予 Lucidone 不同濃度培養 24 小時後，高濃度組 (10 μ g/mL Lucidone) 有較明顯的遷移現象；而觀察 48 小時的結果顯示，隨著 Lucidone 濃度的增加，HaCaT 細胞遷移的情形也隨之增加 (圖十四 A、B)。

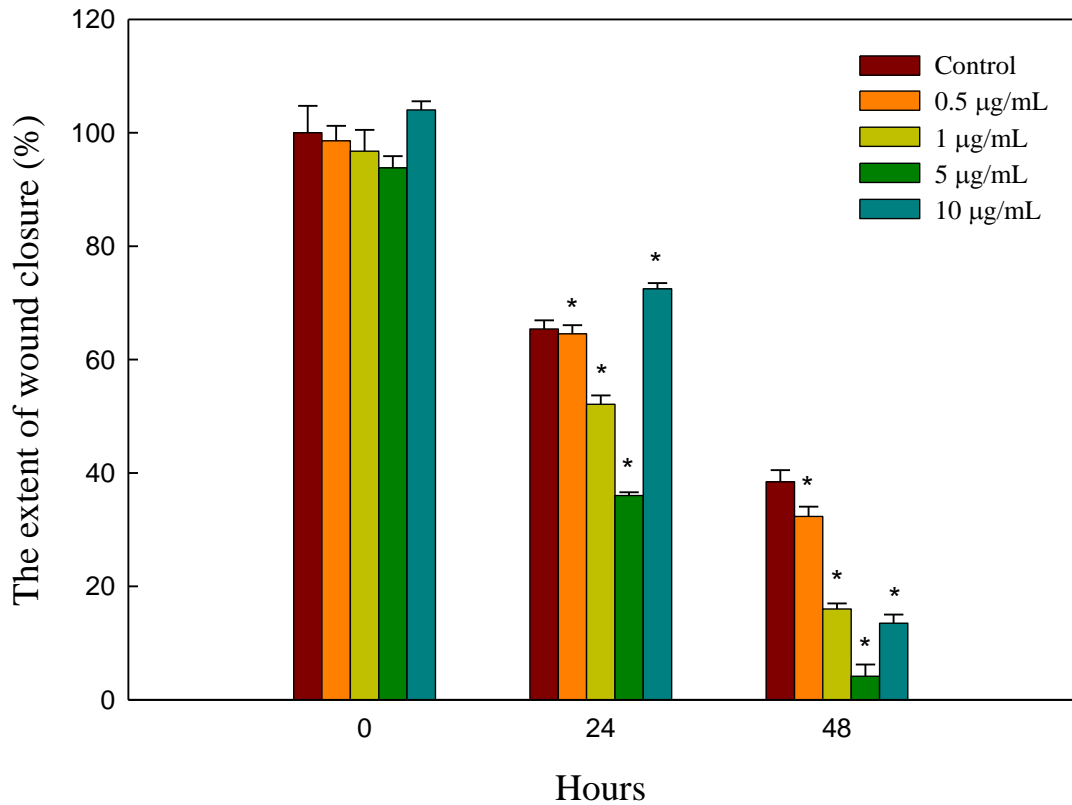


圖十三、觀察 Lucidone 對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞的移行 (migration) 情形。

實驗以 200 μL 的 Tip 在細胞上刮一條模擬皮膚細胞損傷癒合(wound healing)情形，接著以 Lucidone : 0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 培養 HaCaT 細胞，並觀察 HaCaT 細胞 0、24、48 小時後 HaCaT 細胞移行(migration)的情形。

(A)為顯微鏡下的細胞型態；(B)為量化的圖。

(B)

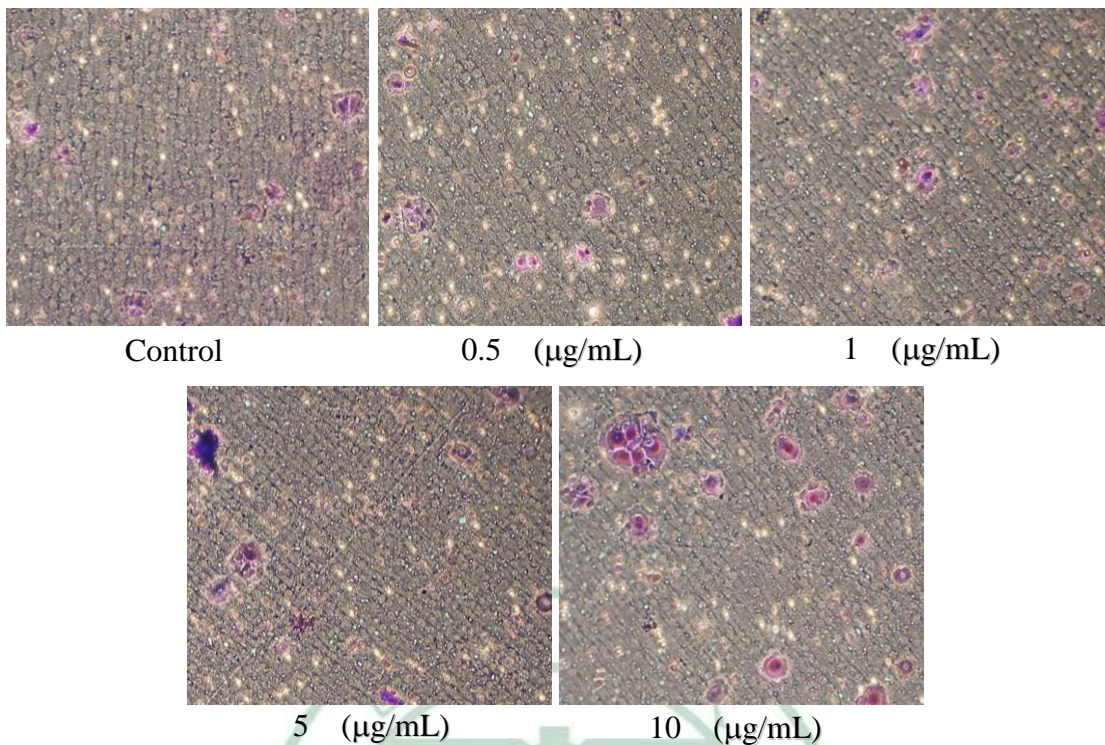


圖十三、觀察 Lucidone 對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞的移行 (migration) 情形。

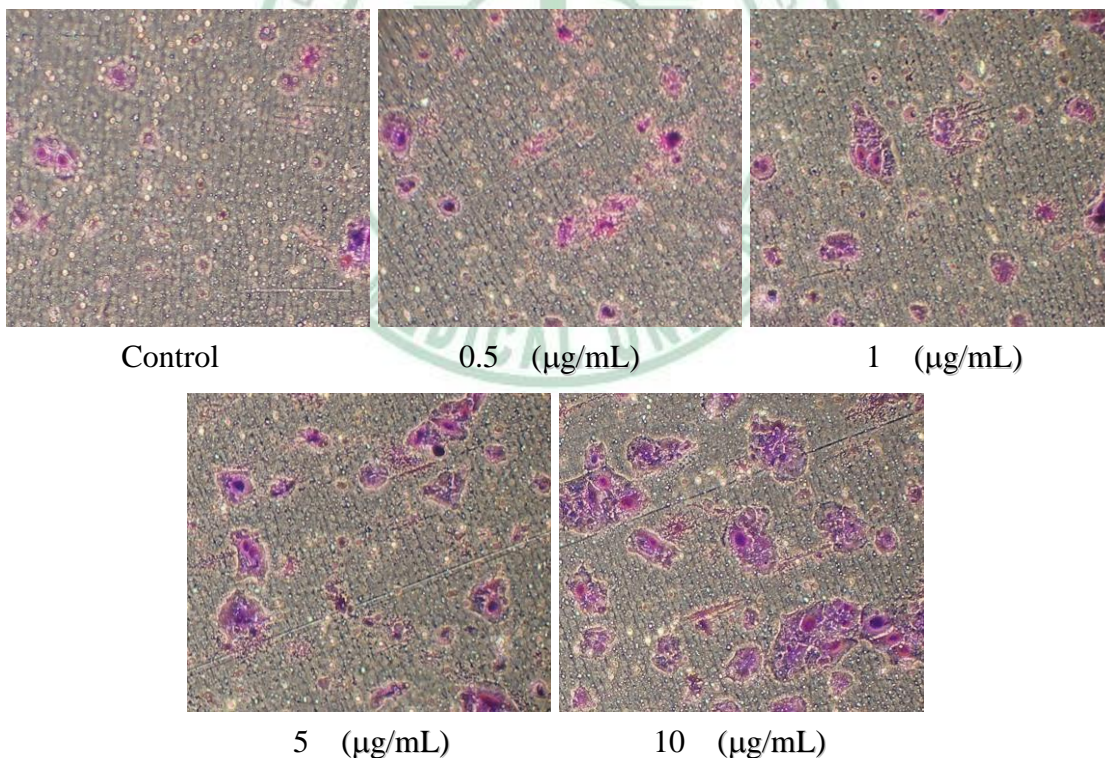
實驗以 200 µL 的 Tip 在細胞上刮一條模擬皮膚細胞損傷癒合 (wound-healing) 情形，接著以 Lucidone : 0.5、1、5、10 µg/mL 培養 HaCaT 細胞，並觀察 HaCaT 細胞 0、24、48 小時後 HaCaT 細胞移行(migration) 的情形。(A)為顯微鏡下的細胞型態；(B)為量化的圖。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。

(A)

24 h



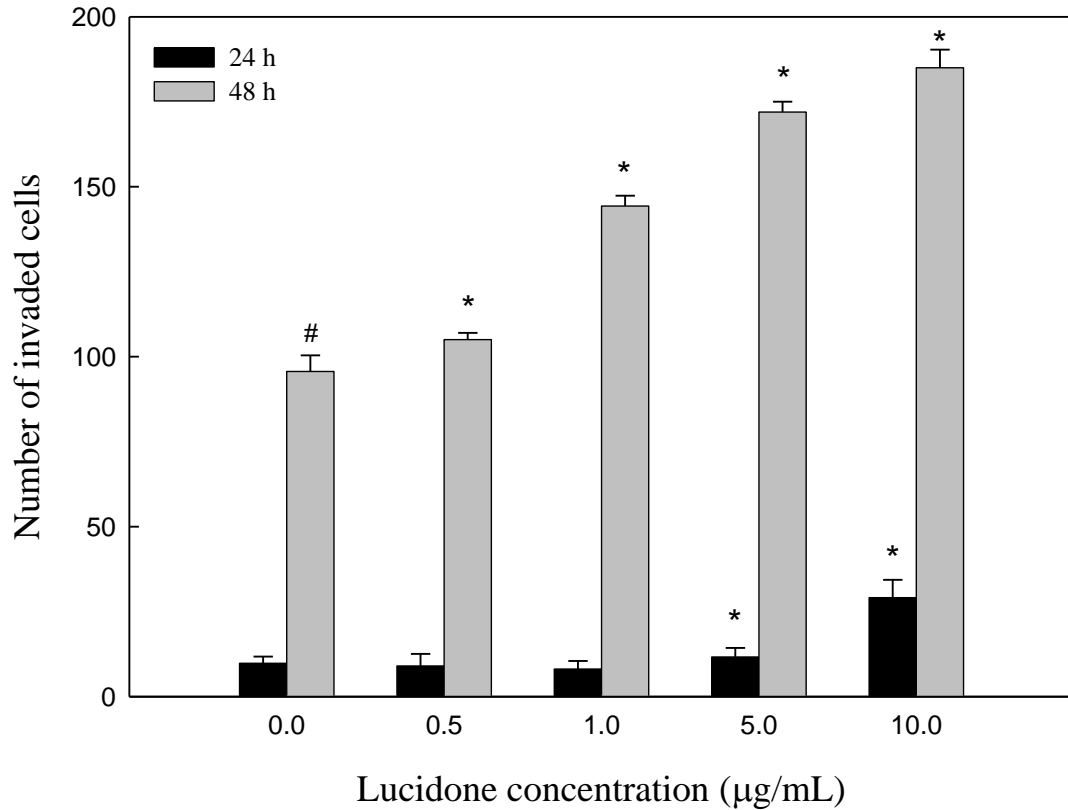
48 h



圖十四、以 Transwell 觀察 Lucidone 對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞遷移 (invasion) 情形。

實驗以 Lucidone : 0.5、1、5、10 µg/mL 培養 HaCaT 細胞，並以 Transwell 觀察 HaCaT 細胞 24、48 小時後 HaCaT 細胞遷移(invasion)的情形。(A) 為 Giemsa Stain 染色後顯微鏡下的情形 (200x)；(B)為量化的圖。

(B)



圖十四、以 Transwell 觀察 Lucidone 對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞遷移 (invasion) 情形。

實驗以 Lucidone : 0.5、1、5、10 µg/mL 培養 HaCaT 細胞，並以 Transwell 觀察 HaCaT 細胞 24、48 小時後 HaCaT 細胞遷移(invasion)的情形。(A) 為 Giemsa Stain 染色後顯微鏡下的情形 (200x)；(B)為量化的圖。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。# p<0.05 v.s. 24 h Control；* p<0.05 v.s. 24 h 或 48 h Control。

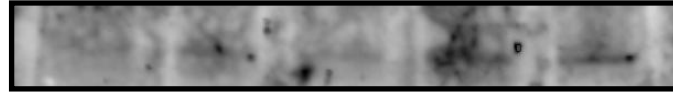
九、Lucidone藉由活化MMP-9、抑制TIMP-2的表現增加 HaCaT細胞的遷移

MMP-9在組織發炎和再造的過程中，發炎細胞（e.g. neutrophil granulocytes）、皮膚角質細胞及纖維母細胞的遷移（migration）扮演一個關鍵的角色【Goetzl *et al.*, 1996; Ravanti & Kahari, 2000; Parks *et al.*, 2004】。實驗以含有Lucidone不同濃度（0.5、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的10% FBS培養液分別培養24小時後，結果顯示MMP-9的蛋白表現隨Lucidone的濃度增加而表現量上升，而MMP-9的抑制因子TIMP-2蛋白表現量隨Lucidone濃度的增加而表現量下降（圖十五）。



Lucidone — 0.5 1 5 10 (μg/mL)

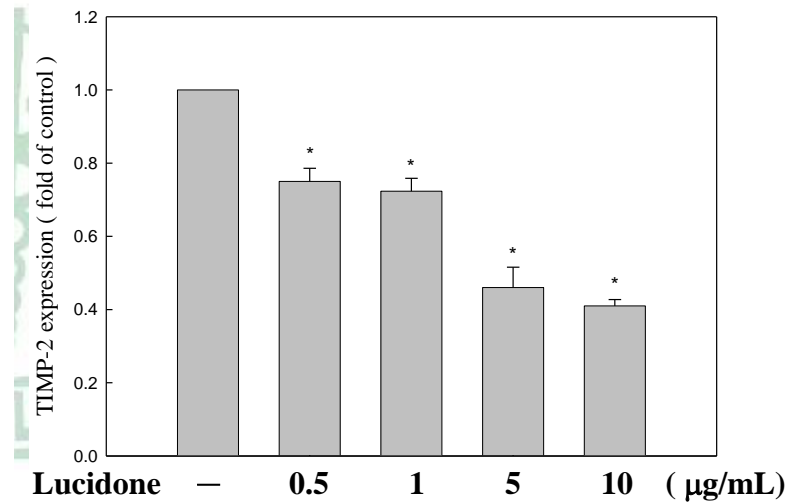
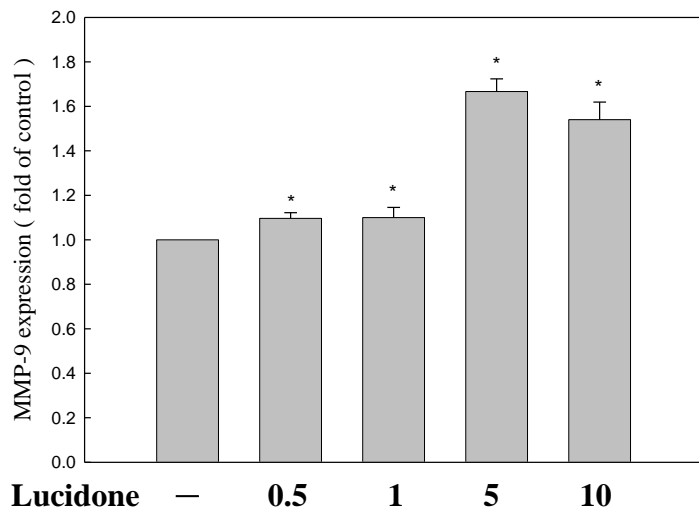
MMP-9



TIMP-2



β-actin



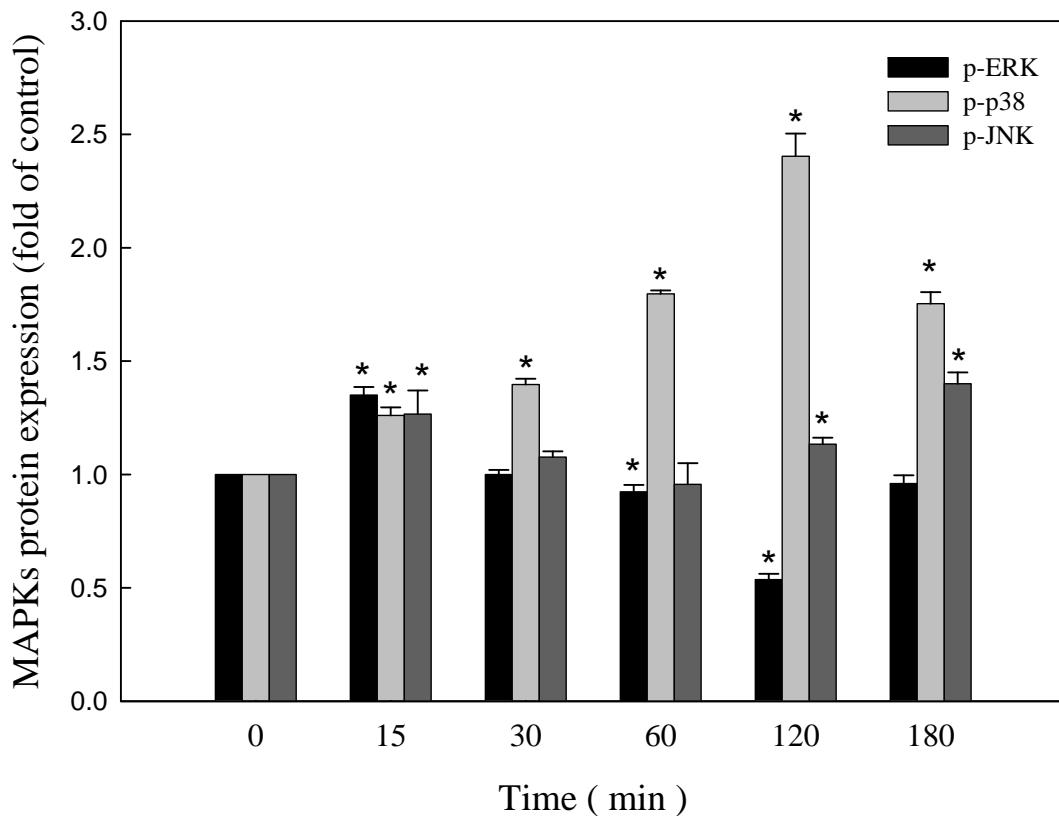
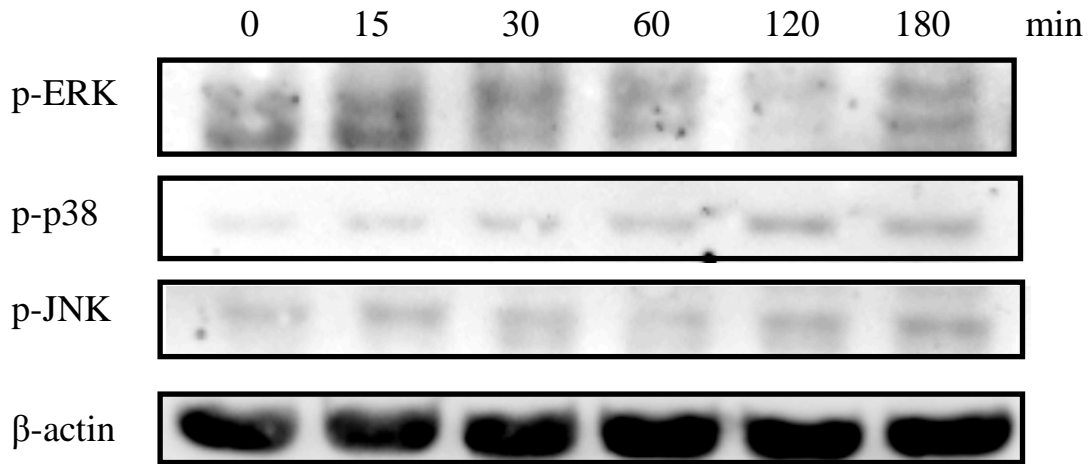
圖十五、以西方墨點法觀察人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞 MMP-9 和 TIMP-2 蛋白表現的結果。

以 Lucidone : 0.5、1、5、10 μg/mL 培養 HaCaT 細胞 24 小時後，以西方墨點法來分析 MMP-9 和 TIMP-2 蛋白之表現情形。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。

十、Lucidone經由MAPKs訊息途徑促進HaCaT細胞遷移

MAPKs訊息途徑在細胞生長和遷移中扮演一相當重要的角色【Kung *et al.*, 2008】。實驗以含有5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lucidone的10% FBS培養液分別培養人類皮膚細胞株HaCaT：0、15、30、60、120、180分鐘。結果顯示，ERK磷酸化在給予Lucidone後15分鐘表現量最高，隨後逐漸下降；磷酸化p38在給予Lucidone後15分鐘開始有明顯的表現，然後持續至120分鐘表現量最高；而JNK磷酸化在給予Lucidone後15分鐘開始有明顯的表現，隨後逐漸下降（圖十六）。總結來說，上述結果證明Lucidone誘導的HaCaT細胞遷移和MAPKs訊息途徑的表現有密切的關係。





圖十六、以西方墨點法觀察 Lucidone 對人類皮膚細胞株 HaCaT 細胞磷酸化 MAPKs 表現的影響。

以含有 5 $\mu\text{g/mL}$ Lucidone 的培養液培養人類皮膚細胞株 HaCaT: 0、15、30、60、120、180 分鐘後，以西方點墨分析法來觀察磷酸化 MAPKs 之表現情形。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。* p<0.05 v.s. control。



已有許多研究指出，包括發炎反應、UVB 及氧化壓力的刺激會誘導 COX-2 的表現【Punnonen *et al.*, 1991】。此外，AAPH 已被確認會誘導微脂體 (liposomes) 氧化及起始脂質過氧化【Kikuzaki *et al.*, 2002; Niki, 1987】。因此，本研究利用 AAPH 模式誘導氧化壓力和細胞損傷，來模擬相似的發炎反應。近來已有研究指出，水溶性自由基起始者 AAPH 在人類表皮細胞株 HaCaT 中可以很顯著地增加 COX-2 蛋白的表現【Cui *et al.*, 2004】。利用這個模式，本研究亦證實了 AAPH 誘導 COX-2 蛋白表現的機轉，同時也確認 AAPH 會降低 HaCaT 細胞的存活率。另一方面許多研究指出，COX-2 的表現在許多癌細胞凋亡 (apoptosis) 中扮演一重要角色【Miyata *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2003】。因此，實驗觀察到的 AAPH 降低 HaCaT 細胞存活率應該不是由於 COX-2 蛋白的表現，細胞死亡和 COX-2 表現之間的關係還需要更進一步的研究來證實。

先前已有研究證實，紅果釣樟 (*Lindera erythrocarpa* Makino) 果實抽出物的主成分 Lucidone 可以很顯著地抑制 COX-2 的表現，進而抑制發炎反應相關前驅物的生成，但不會抑制 COX-1 蛋白的表現，具選擇性。本實驗結果顯示，隨著 Lucidone 濃度的增加而減少 AAPH 所誘導 COX-2 及 iNOS 的表現。但減少 COX-2 的表現並非因為 Lucidone 所造成的細胞存活率下降，本實驗結果顯示，Lucidone 濃度在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上對 HaCaT 細胞即有細胞毒性，濃度 15 mg/mL 時即達半數致死劑量，因此實驗濃度取在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下，即有抑制 COX-2 表現之效果。

已有研究確認 COX-2 的過量表現和癌症生成、腫瘤生長及轉移有關，這些都和 COX-2 的產物前列腺素 (prostaglandins, PGs) 有直接的關係，接著會將原致癌物轉變成致癌物、抑制細胞凋亡、促進血管新生、調節發炎和免疫功能及增加腫瘤細胞的侵襲能力等【Xu,

2002】。因此，給予 AAPH 處理後的皮膚細胞，其 COX-2 的表現和活性增加使 PGE₂ 的產生，造成發炎反應也會增加腫瘤生成的風險。許多的證據證明高度表現的 COX-2 和 PGE₂ 的產生在腫瘤形成中有高度相關性，特別是皮膚癌【Higashi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003】。因此，經由選擇性的抑制 COX-2 進而減少 PGs 的形成在化學預防劑上是很有前景的方法。PGE₂ 是 COX-2 下游最主要的產物，實驗結果顯示，在 HaCaT 細胞，AAPH 很明顯的增加 COX-2 表現及 PGE₂ 的分泌，而 Lucidone 可以顯著地減少因 AAPH 所誘導的 COX-2 蛋白表現與 PGE₂ 分泌。此外，iNOS 和 COX-2 已經被證明也會導致腫瘤生成，此兩種蛋白亦可在癌細胞中被觀察到其表現【Rahman *et al.*, 2001】。最近，Wang 等人的研究證實隨著 Lucidone 濃度的上升而抑制 RAW264.7 細胞之 iNOS 及 COX-2 的 mRNA 和蛋白質表現，也抑制其 JNK 和 p38 MAPK 的訊息傳遞，同時抑制了 NF-κB/AP-1 的活化【Wang *et al.*, 2008】。

UVB 經由產生氧化壓力誘導 MAPKs 蛋白磷酸化（也就是 ERK1/2、JNK1/2 及 p38）和許多皮膚相關疾病有關，包括皮膚癌和光所造成的老化現象【Peus *et al.*, 1999】；這過程已有實驗證明可以被抗氧化劑所抑制，因此利用這模式來減少 ROS 的量是很重要的方法【Katiyar *et al.*, 2001】。本實驗結果顯示，預先給予 HaCaT 細胞 Lucidone 保護後，可以抑制 AAPH 誘導的 ERK、p38 及 JNK 磷酸化，如圖八所示。

p38 激酶有 α、β、γ 及 δ 四種異構物【Saklatvala, 2004】，在皮膚細胞中只有 α、β 及 δ 三種異構物；然而所有的異構物都可以被壓力刺激而活化，例如前發炎細胞激素 TNF-α 及 IL-1 等【Goedert *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1997】。

近來的研究指出，在HaCaT細胞中包括ERK及p38 MAPK和UVB誘導的COX-2基因表現有關，因此ROS在ERK活化的角色也已被證實【Cui *et al.*, 2004】。本實驗結果顯示，AAPH誘導的COX-2表現和ERK的活化有關；也觀察到AAPH會誘導p38 MAPK及JNK/SAPK的活化，而這些都可被Lucidone抑制。

但在MAPKs抑制劑結果上，顯示可能不是經JNK路徑而抑制COX-2的表現，說明了ERK和p38 MAPK在AAPH誘導COX-2表現上的重要角色。

UV產生的ROS除了會活化下游MAPKs訊息路徑外，也會影響轉錄因子NF- κ B的活性。近來的研究顯示AP-1及NF- κ B優先調節COX-2的表現以及上游MAPKs【Suzukawa *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2000】，活化MAPKs及其它轉錄因子進而改變目標基因的表現。在大部分研究中，許多外在的刺激會活化p38及JNK，也會活化AP-1【Minden *et al.*, 1994; Minden & Karin, 1997】，許多調節系統中，AP-1也被熟知會調節COX-2的表現【Lin *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004】。

已有許多研究證實，抑制NF- κ B的轉位（translocation）而抑制COX-2和iNOS的mRNA表現進而抑制發炎反應【Kim *et al.*, 2007; Tsoyi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009】。AAPH和前發炎細胞激素經由活化COX-2表現促進PGE₂的產生，接下來會活化NF- κ B【Di Mari *et al.*, 2003】，而Lucidone抑制AAPH所誘導的NF- κ B活化是經由抑制I κ B激酶的活性【Demarco *et al.*, 2004】。已有研究證實以TPA誘導的iNOS和COX-2啟動子（promoter）中活化NF- κ B是必要的【Saleem *et al.*, 2004】。在本實驗中，隨著Lucidone濃度的增加，可以增加I κ B α 的穩定性，預防其泛素化（ubiquitination）而被降解掉，進而抑制AAPH所誘導NF- κ B轉位至細胞核內與DNA結合啟動下

游基因表現。所以 Lucidone 抑制 AAPH 所刺激 COX-2 表現導致的發炎反應，間接證實可能是經由抑制 NF- κ B 的轉位而達到降低發炎反應的效果。

AAPH 會產生活性氧自由基 (ROS) 對皮膚造成傷害，因此清除這些自由基可以預防及保護 AAPH 對皮膚所造成的氧化傷害。所以近年來較新的方法是利用植物性抗氧化劑來清除自由基以減少 AAPH 的傷害性進而減緩發炎反應的發生。本實驗結果顯示，和控制組比起來，AAPH 會顯著的降低細胞的存活率，而從圖三結果可以證明，Lucidone 對 AAPH 處理後 HaCaT 細胞的保護效果確實有很好的抗氧化活性。Lucidone 可以抑制 O_2^- 和 NO 自由基的產生，因此可被視為一具有抗發炎潛力的天然抗氧化劑，因為過氧亞硝基陰離子 (Peroxynitrite, $ONOO^-$)、超氧陰離子 (O_2^-) 及一氧化氮 (NO) 等 ROS 會促進 COX-2 的活性【Landino *et al.*, 1996】，造成發炎反應的產生進而導致癌症生成。所以 AAPH 誘導的 ROS 產生造成發炎反應可能經由許多機轉促進腫瘤形成，包括 DNA 損傷、脂質過氧化及改變酵素活性等。最後，AAPH 會促進 HaCaT 細胞內 ROS 量的增加，而 Lucidone 也可以很顯著地抑制 HaCaT 細胞內 ROS 的產生。

總結上述結果，本實驗顯示 AAPH 誘導的皮膚細胞 COX-2、 PGE_2 和 ROS 的產生可以被 Lucidone 所抑制進而減少發炎反應的過程。因此 Lucidone 在對抗皮膚發炎上是一很好的抗氧化劑，在對抗皮膚癌症的形成上也許是很有潛力的天然物質，但仍需更進一步的研究來證實。

MMP-9 已經被證實和皮膚真皮層的疾病及一般損傷癒合 (wound healing) 有關【Ries *et al.*, 2008】。有研究證實小鼠皮膚角質細胞中，TGF- β 是經由 Ras/MAPK 路徑調節的 MMP-9 表現【Santibáñez *et al.*, 2002】以及人類初代皮膚細胞培養中，NF- κ B 經由結合 MMP-9 啟動子

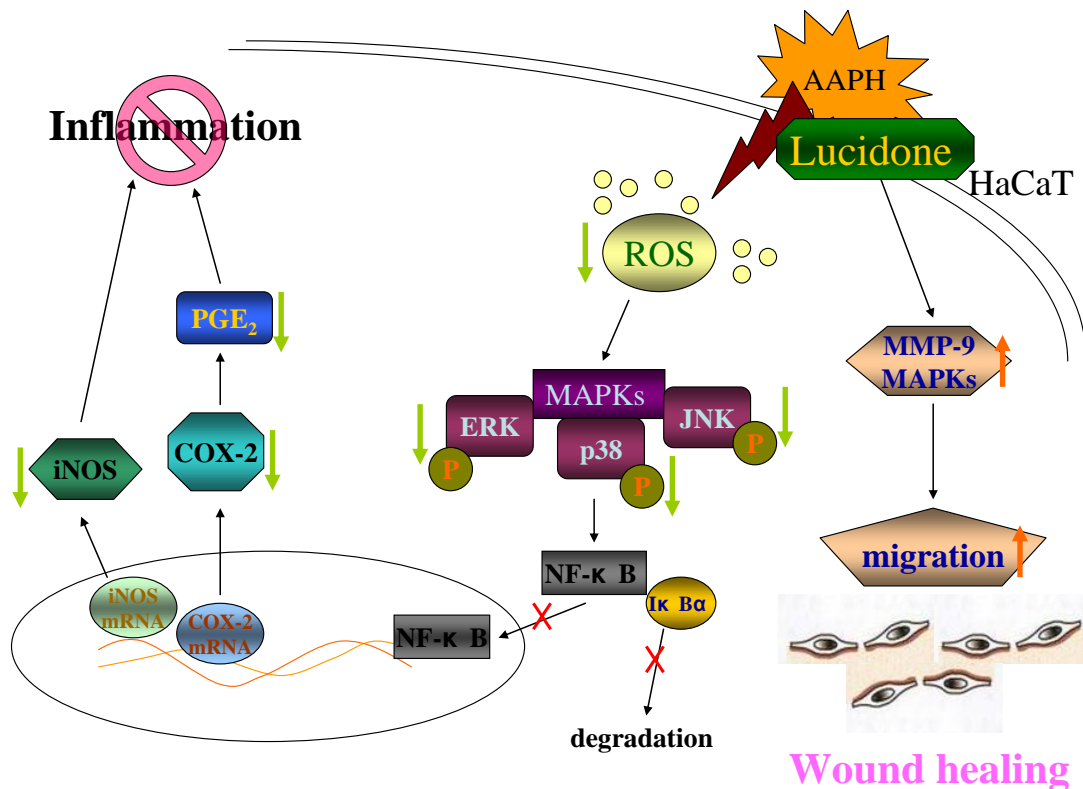
而誘導的細胞遷移 (migration) 【Han *et al.*, 2001】；不過亦有研究證實MMP-9的過度表現而誘導皮膚角質細胞遷移不需要像是TGF- β 1的刺激因子，因為儘管MMP-9在皮膚角質細胞的遷移中相當重要，但TGF- β 如何調節MMP-9還不是很清楚【Seomun *et al.*, 2008】，然而亦有研究顯示，在給予TGF- β 1刺激皮膚角質細胞後48小時抑制其增生【Benassi *et al.*, 1997】。所以不管有無刺激因子的存在下，MMP-9的表現在皮膚角質細胞的遷移和腫瘤形成上是相當重要的。MMPs和TIMPs都是調節膠原蛋白代謝的主要酵素，但是它們的作用相反，本實驗結果顯示，在模擬皮膚細胞損傷癒合 (wound healing) 試驗中，Lucidone會隨著濃度的上升而增加細胞的癒合速度；而Lucidone促進皮膚細胞的癒合可能是藉由增加MMP-9、減少TIMP-2蛋白的表現，而促進細胞的遷移 (migration) 作用。

MAPKs 家族在調節細胞增生、分化及凋亡上相當重要，活化MAPKs 導致不同的蛋白質磷酸化，包括很多的轉錄因子而調節基因表現和控制細胞的增生和遷移【Bose *et al.*, 2005】。許多不同的細胞株研究中，MAPKs 被細胞激素或 mitogens 活化後，引發下游生長及遷移的訊息傳遞【Frey *et al.*, 2006】。血管生長因子像是 VEGF 等，會活化 ERK、JNK 和 p38，使內皮細胞增生、遷移及存活【Liu *et al.*, 2007; Saika, 2004; Sharma *et al.*, 2003】。JNK 路徑在骨母細胞 (osteoblastic cell) 中包括血小板衍生的生長因子刺激遷移和增生終站主導地位；p38 路徑和遷移有關；而 ERK 路徑則和增生有很大的相關性【Munoz-Chapuli *et al.*, 2004; Salameh *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 1999】。在角膜損傷癒合中，包括肝細胞生長因子與角質細胞生長因子都已被證明會活化 ERK1/2 路徑且促進傷口的密合【Mehrotra *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2003】。本實驗顯示，在 HaCaT 細胞中，Lucidone

會活化 ERK、p38 及 JNK 路徑，而刺激 MAPK 訊息傳遞在 Lucidone 引起的細胞增生和遷移中是相當重要的；。因此本研究證實在 HaCaT 細胞中促進損傷癒合的過程是經由調節 MAPKs 訊息途徑及相關的 MMP-9 蛋白表現進而促成細胞遷移而達到皮膚損傷癒合的效果。







AAPH 會刺激細胞內 ROS 的產生，經由 MAPKs signaling pathway，活化 ERK、p38 MAPK 和 JNK/SAPK，使 IκBα 磷酸化而被降解，進而使 COX-2 和 iNOS 蛋白表現增加，促使 PGE₂ 分泌而引起發炎反應；而 Lucidone 可以從頭減少 ROS 的產量，抑制 MAPKs 相關訊息的傳遞並增加 IκBα 的穩定性預防其被降解及抑制 COX-2、iNOS 蛋白的表現，進而抑制 PGE₂ 的分泌，最後抑制發炎反應的發生；而 HaCaT 細胞中促進損傷癒合的過程是經由調節 MAPKs 訊息途徑及相關的 MMP-9 蛋白表現進而促成細胞遷移而達到皮膚損傷癒合的效果。



1. Assefa Z, Vantieghem A, Garmyn M, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, Bouillon R, Merlevede W, Agostinis P (2000) p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275:21416–21421.
2. Bassiouny, H. S., R. H. Song, X. F. Hong, A. Singh, H. Kocharyan and S. Glagov (1998) Flow regulation of 72-kD collagenase IV (MMP-2) after experimental arterial injury. *Circulation* 98, 157–163.
3. Benassi L, Ottani D, Fantini F, Marconi A, Chiodino C, Giannetti A et al. (1997) 1,25-dihydroxyvitamin D₃, transforming growth factor beta1, calcium, and ultraviolet B radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109:276–82.
4. Bose C, Zhang H, Udupa KB, Chowdhury P. Activation of p-ERK1/2 by nicotine in pancreatic tumor cell line AR42J: effects on proliferation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 289(5):G926-34.
5. Brenneisen, P., H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek (2002) Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 31–43.
6. Chakraborti S, Mandal M, Mandal A, Chakraborti T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem* 253:269–285.

7. Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. T. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton and D. L. Simmons (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 13926–13931.
8. Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 2001; 20:3921-6.
9. Chêne G, Dubourdeau M, Balard P, Escoubet-Lozach L, Orfila C, Berry A, Bernad J, Aries MF, Charveron M, Pipy B. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPARgamma activation in human keratinocyte HaCaT cells. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1771(5):576-89.
10. Cho JW, Park K, Kweon GR, Jang BC, Baek WK, Suh MH, Kim CW, Lee KS, Suh SI. Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. *Exp Mol Med*. 2005; 37(3):186-92.
11. Clark, R.A., 1996. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* second ed. Plenum, New York, NY.
12. Coulombe, P.A., 2003. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J. Invest. Dermatol.* 121, 219–230.
13. Cui Y, Kim DS, Park SH, Yoon JA, Kim SK, Kwon SB, Park KC. Involvement of ERK AND p38 MAP kinase in AAPH-induced COX-2 expression in HaCaT cells. *Chem Phys Lipids*. 2004; 129(1):43-52.

14. Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(2):161-8.
15. De Fabo EC, Noonan FP, Fears T, Merino G. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res* 2004; 64:6372-6.
16. de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15:316-20.
17. Demarco VG, Scumpia PO, Bosanquet JP, Skimming JW. alpha-lipoic acid inhibits endotoxin-stimulated expression of iNOS and nitric oxide independent of the heat shock response in RAW 264.7 cells. *Free Radic Res.* 2004; 38(7):675-82.
18. Di Mari JF, Mifflin RC, Adegboyega PA, Saada JI, Powell DW. IL-1alpha-induced COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts is dependent on a PKCzeta-ROS pathway. *Gastroenterology.* 2003; 124(7):1855-65.
19. Frey MR, Golovin A, Polk DB. Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *Biol Chem.* 2004; 279(43):44513-21.
20. Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1997; 409(1):57-62.
21. Goetzl, E.J., Banda, M.J., Leppert, D., 1996. Matrix metalloproteinases in immunity. *J. Immunol.* 156, 1-4.

22. Goldberg, H. J.; Viegas, M. M.; Margolis, B. L.; Schlessinger, J.; Skorecki, K. L. The tyrosine kinase activity of the epidermal-growth- factor receptor is necessary for phospholipase A2 activation. *Biochem. J.* 1990, 267, 461–465.
23. Goppelt-Struebe, M., Stroebel, M., 1998. Signaling pathways mediating induction of the early response genes prostaglandin G/H synthase-2 and egr-1 by serotonin via 5-HT2A receptors. *J. Cell Physiol.* 175 (3), 341–347.
24. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis.* 2009; 30(3):377-86.
25. Griending KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(10):2175-83.
26. Han JM, Lee WS, Kim JR, Son J, Kwon OH, Lee HJ, Lee JJ, Jeong TS. Effect of 5-O-Methylhirsutanonol on nuclear factor-kappaB-dependent production of NO and expression of iNOS in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(1):92-8.
27. Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. 2001. Transforming growth factor-b- and tumor necrosis factor-alpha mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 2001; 276:22341–22350.

28. Han ZS, Enslen H, Hu X, Meng X, Wu IH, Barrett T, Davis RJ, Ip YT. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(6):3527-39.
29. Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J Biol Chem* 2003; 278:22432-6.
30. Herschman, H.R. (1994) Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer Metastasis Rev.*, 13, 241–256.
31. Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer.* 2000 Jun 1;86(5):667-71.
32. Hildesheim J, Awwad RT, Fornace AJ Jr (2004) p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. *J Invest Dermatol* 122:497–502.
33. Hou DX, Yanagita T, Uto T, Masuzaki S, Fujii M. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(3):417-25.
34. Ho YS, Lai CS, Liu HI, Ho SY, Tai C, Pan MH, Wang YJ. Dihydrolipoic acid inhibits skin tumor promotion through anti-inflammation and anti-oxidation. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(11):1786-95.

35. Hsu TC, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 200; 28(9):1338-48.
36. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* 189:21–39.
37. Kang G, Kong PJ, Yuh YJ, Lim SY, Yim SV, Chun W, Kim SS. Curcumin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression by inhibiting activator protein 1 and nuclear factor kappaB bindings in BV2 microglial cells. *J Pharmacol Sci.* 2004; 94(3):325-8.
38. Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis.* 2001; 22(2):287-94.
39. Katz MH, Alvarez AF, Kirsner RS, Eaglstein WH, Falanga V. Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. *J Am Acad Dermatol* 25: 1054–1058, 1991.
40. Kerkela E, Saarialho-Kere U. 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: Focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 12:109–125.
41. Kim HH, Lee Y, Eun HC, Chung JH. Eicosapentaenoic acid inhibits TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human keratinocytes, HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 4;368(2):343-9.

42. Kim JK, Kim Y, Na KM, Surh YJ, Kim TY. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. *Free Radic Res.* 2007; 41(5):603-14.
43. Kis, B., J. A. Snipes, T. Gaspar, G. Lenzser, C. D. Tulbert and D. W. Busija (2006) Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. *Inflamm. Res.* 55, 274–278.
44. Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(7):2161-8.
45. Kulms D, Zeise E, Poppelmann B, Schwarz T. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* 2002; 21:5844-51.
46. Kumar A, Middleton A, Chambers TC, Mehta KD. Differential roles of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and p38(MAPK) in interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha-induced low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(25):15742-8.
47. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 235(3):533-8.
48. Kung HN, Yang MJ, Chang CF, Chau YP, Lu KS. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of beta-lapachone. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295(4):C931-43.

49. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001; 81(2):807-69.
50. Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays.* 1996; 18(7):567-77.
51. Lai CS, Li S, Chai CY, Lo CY, Ho CT, Wang YJ, Pan MH. Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice. *Carcinogenesis.* 2007; 28(12):2581-8.
52. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(26):15069-74.
53. Lee JL, Mukhtar H, Bickers DR, Kopelovich L, Athar M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;192:294–306.
54. Li JL, Liu N, Chen XH, Sun M, Wang CB. Inhibition of UVA-induced apoptotic signaling pathway by polypeptide from *Chlamys farreri* in human HaCaT keratinocytes. *Radiat Environ Biophys.* 2007; 46(3):263-8.
55. Lin SK, Kok SH, Yeh FT, Kuo MY, Lin CC, Wang CC, Goldring SR, Hong CY. MEK/ERK and signal transducer and activator of transcription signaling pathways modulate oncostatin M-stimulated CCL2 expression in human osteoblasts through a common transcription factor. *Arthritis Rheum* 2004; 50:785-93.

56. Liu B, Ryer EJ, Kundi R, Kamiya K, Itoh H, Faries PL, Sakakibara K, Kent KC. Protein kinase C-delta regulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells through the extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Vasc Surg* 45: 160–168, 2007.
57. Liu Y, Borchert GL, Surazynski A, Phang JM. Proline oxidase, a p53-induced gene, targets COX-2/PGE2 signaling to induce apoptosis and inhibit tumor growth in colorectal cancers. *Oncogene*. 2008; 27(53):6729-37.
58. Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO, Sies H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3:257-62.
59. Matsuura K, Kuratani T, Gondo T, Kamimura A, Inui M. Promotion of skin epithelial cell migration and wound healing by a 2-benzazepine derivative. *Eur J Pharmacol*. 2007; 563(1-3):83-7.
60. Martin, P., 1997. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81.
61. Mehrotra M, Krane SM, Walters K, Pilbeam C. Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 93: 741–752, 2004.
62. Miller, C. C.; Hale, P.; Pentland, A. P. Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 3529–3533.

63. Minden A, Lin A, Smeal T, Dérijard B, Cobb M, Davis R, Karin M. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(10):6683-8.
64. Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1333(2):F85-104.
65. Miyata Y, Koga S, Kanda S, Nishikido M, Hayashi T, Kanetake H. Expression of cyclooxygenase-2 in renal cell carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of matrix metalloproteinase-2, and survival. *Clin Cancer Res.* 2003 May;9(5):1741-9.
66. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 1999; 92:164–9.
67. Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel MM. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 2224–2243, 2004.
68. Nagase, H., Woessner, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491–21494.
69. Niki E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol.* 1990;186:100-8.
70. Niki E. Lipid antioxidants: how they may act in biological systems. *Br J Cancer Suppl.* 1987; 8:153-7.
71. Niki E, Takahashi M, Tsuchiya J, Komuro E, Ito E, Terao K. Oxidation of lipids. XV. Role of hydrophilic diarylamines as

antioxidants in the oxidations of lipids and biological tissues.
Chem Biol Interact. 1988;67(1-2):81-93.

72. Niki E, Yamamoto Y, Takahashi M, Yamamoto K, Yamamoto Y, Komuro E, Miki M, Yasuda H, Mino M. Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1988 Oct;34(5):507-12.
73. Obata T, Brown GE, YaVe MB (2000) MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 28:N67–N77.
74. Oh HM, Choi SK, Lee JM, Lee SK, Kim HY, Han DC, Kim HM, Son KH, Kwon BM. Cyclopentenediones, inhibitors of farnesyl protein transferase and anti-tumor compounds, isolated from the fruit of *Lindera erythrocarpa* Makino. *Bioorg Med Chem.* 2005; 15; 13(22):6182-7.
75. Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. 1997. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: Evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of progelatinase A. *J Cell Biol* 137:67–77.
76. Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1999; 112(5):751-6.
77. Pinnell, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003, 48, 1–19.
78. Punnonen K, Puntala A, Jansén CT, Ahotupa M. UVB irradiation induces lipid peroxidation and reduces antioxidant enzyme

activities in human keratinocytes in vitro. *Acta Derm Venereol.* 1991; 71(3):239-42.

79. Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res.* 2001 May;7(5):1325-32.
80. Ramos J, Villa J, Ruiz A, Armstrong R, Matta J. UV dose determines key characteristics of nonmelanoma skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:2006-11.
81. Ravanti L, Ka'ha'ri VM. 2000. Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int J Mol Med* 6:391-407.
82. Rhee SJ. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999; 31:53-9.
83. Ries C, Popp T, Egea V, Kehe K, Jochum M. Matrix metalloproteinase-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: Upregulation in response to sulphur mustard. *Toxicology.* 2008 Sep 3.
84. Rouzer, C. A., and L. J. Marnett. 2003. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem. Rev.* 103: 2239-2304.
85. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl:S29-34.
86. Rudolph R, Berg J, Ehrlich HP. Wound contraction and scar contracture. In: *Wound Healing: Biochemical and Clinical*

Aspects, edited by Cohen IK, Diegelmann RF, and Lindblad WJ. Philadelphia, PA: Saunders, 1992, p. 114.

87. Rundhaug JE, Fischer SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(2):322-9.
88. Saika S. TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. *Cornea* 23: S25–S30, 2004.
89. Saklatvala J (2004) The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol* 4:372–7.
90. Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, Bussolino F, Oliviero S. Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* 106: 3423–3431, 2005.
91. Saleem, M. et al. (2004) Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*, 23, 5203–5214.
92. Santibáñez JF, Guerrero J, Quintanilla M, Fabra A, Martínez J. Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 16;296(2):267-73.
93. Santoro, M.M., Gaudino, G., 2005. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp. Cell Res.* 304, 274–286.
94. Schieven GL (2005) The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem* 5:921–8.

95. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen- activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:937–47.
96. Senthil Kumar KJ, Wang SY. Lucidone inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 murine macrophage cells via NF-kappaB and MAPKs signaling pathways. *Planta Med.* 2009; 75(5):494-500.
97. Seomun Y, Kim JT, Joo CK. MMP-14 mediated MMP-9 expression is involved in TGF-beta1-induced keratinocyte migration. *J Cell Biochem.* 2008; 104(3):934-41.
98. Sharma GD, He J, Bazan HE. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* 278: 21989–21997, 2003.
99. Shimizu H, Banno Y, Sumi N, Naganawa T, Kitajima Y, Nozawa Y (1999) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells. *J Invest Dermatol* 112:769–774.
100. Simeone AM, McMurtry V, Nieves-Alicea R, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson MM, Tari AM. TIMP-2 mediates the anti-invasive effects of the nitric oxide-releasing prodrug JS-K in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(3):R44.
101. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738–746, 1999.
102. Skoog T, Elomaa O, Pasonen-Seppänen SM, Forsberg S, Ahokas K, Jeskanen L, Pärssinen J, Tiala I, Rollman O, Lohi J, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinase-21 expression is

- associated with keratinocyte differentiation and upregulated by retinoic acid in HaCaT cells. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(1):119-30.
103. Smith, W. L., D. L. DeWitt, and R. M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 145–182.
104. Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463–516.
105. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. 1993. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541–573.
106. Sur R, Babad JM, Garay M, Liebel FT, Southall MD. Anti-inflammatory activity of sertaconazole nitrate is mediated via activation of a p38-COX-2-PGE2 pathway. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(2):336-44.
107. Suzukawa K, Weber TJ, Colburn NH. AP-1, NF-kappa-B, and ERK activation thresholds for promotion of neoplastic transformation in the mouse epidermal JB6 model. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(9):865-70.
108. Tanaka K, Abe M, Sato Y. Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res* 90: 647–654, 1999.
109. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactor* 2003; 17:287-96.

110. Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1992) Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 38:397–421
111. Tsoyi K, Park HB, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Lee WS, Seo HG, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression and PGE₂ production through regulation of the nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(19):8969-74.
112. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 2002; 53:35–57.
113. Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New Biol* 231:232–5.
114. Wang SY, Lan XY, Xiao JH, Yang JC, Kao YT, Chang ST. Antiinflammatory activity of *Lindera erythrocarpa* fruits. *Phytother Res.* 2008; 22(2):213-6.
115. Wang XQ, Li H, Van Putten V, Winn RA, Heasley LE, Nemenoff RA. Oncogenic K-Ras regulates proliferation and cell junctions in lung epithelial cells through induction of cyclooxygenase-2 and activation of metalloproteinase-9. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(3):791-800.
116. Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science.* 1996; 272(5266):1347-9.
117. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835–870, 2003.

118. Williams JL, Nath N, Chen J, Hundley TR, Gao J, Kopelovich L, Kashfi K, Rigas B. Growth inhibition of human colon cancer cells by nitric oxide (NO)-donating aspirin is associated with cyclooxygenase-2 induction and beta-catenin/T-cell factor signaling, nuclear factor-kappaB, and NO synthase 2 inhibition: implications for chemoprevention. *Cancer Res.* 2003 Nov 15; 63(22):7613-8.
119. Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs.* 2002; 13(2):127-37.
120. Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincón M, Flavell RA. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity.* 1998; 9(4):575-85.
121. Zaid MA, Afaq F, Syed DN, Dreher M, Mukhtar H. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochem Photobiol.* 2007; 83(4):882-8.
122. Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11–8.
123. 行政院農業委員會 98 年度農業科技產學合作計畫研究構想書
124. 財團法人國家實驗研究院，中華民國科學技術年鑑，2008 年 12 月
125. 國立臺灣大學 生物資源暨農學院 <http://bioagri.ecaa.ntu.edu.tw/>