



中國醫藥大學臨床醫學研究所
碩士學位論文

薑黃素引發人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 細胞凋
亡的機轉研究

The Mechanisms of Curcumin-Induced Apoptosis
of NCI-H460 Human Large Cell Carcinoma of Lung

指導教授：杭良文 助理教授

共同指導教授：鍾景光 教授

研究生：吳莘華

中華民國九十八年七月

中文摘要

已陸續有報導薑黃素在抗癌上的效果。但薑黃素對於人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 的作用機轉卻未被詳細探討過。本研究以薑黃素處理人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 以評估其抗癌效果。我們以不同濃度的薑黃素對 NCI-H460 細胞作用不同的時間，其後再評估後續的細胞形態、存活率、蛋白質表現與 mRNA 轉錄等的變化。結果顯示：隨著薑黃素濃度增高至 20 μM 以上，NCI-H460 細胞凋亡與死亡的比率也隨之上升。薑黃素處理後，抗細胞凋亡的 Bcl-2、XIAP 和 Bcl-xl 蛋白表現量下降，促細胞凋亡的 Bad 和 Bax 蛋白表現量增加。此外，活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 與細胞質內鈣離子的濃度也在處理後上升。這些訊號導致粒腺體膜電位下降，後續激發了 caspase 9 與 caspase 3 的活化，最終產生細胞死於細胞凋亡的結果。另外，薑黃素的處理亦可導致 Fas 蛋白質表現增加與 caspase 8 的活化，而經由所謂的外路徑 (extrinsic pathway) 引起細胞死於細胞凋亡。我們也分別以 ROS 與 caspase 8 抑制劑來阻礙細胞凋亡的訊息傳遞，結果發現在前述任一種抑制劑作用下，NCI-H460 細胞的死亡率均明顯下降。這顯示了這些訊息傳導物質確實相當程度地介入了薑黃素所引發的細胞凋亡。薑黃素另外可導致 NCI-H460 細胞週期停滯於 G2/M 期，此舉可能是藉由降低 cyclin-dependent kinase 1 來達成的。總結來說，薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 可產生引發細胞凋亡或導致細胞週期停滯而達到抗癌的效果。我們認為它有潛力成為治療人類大細胞肺癌的藥物。

關鍵字：細胞凋亡、細胞週期、薑黃素、肺癌。

英文摘要 (Abstract)

Reports about the anti-cancer activities of curcumin are accumulating. However, its effect on human large cell carcinoma NCI-H460 cells has never been scrutinized. In this study, we used curcumin to treat human non-small cell lung cancer cells (NCI-H460) to determine its anti-cancer activity. Various concentrations of curcumin were added to NCI-H460 cells for different durations *in vitro* and the subsequent changes in cell morphologies, viabilities, cell cycles, intracellular proteins and mRNA expressions were investigated. We found curcumin, when over 20 μM in concentration, induced NCI-H460 cell apoptosis and morphologic changes in a dose-dependent manner. After curcumin treatment, Bax and Bad were up-regulated, Bcl-2, Bcl-xL and XIAP were down-regulated. In addition, reactive oxygen species (ROS), cytoplasmic calcium and endoplasmic reticulum stress were increased in NCI-H460 cells after treatment with curcumin. These signals led to mitochondrial membrane potential decrease and culminated in caspase-3 activation. Apoptosis could also be induced through Fas-caspase-8 (extrinsic) pathway. The cell death induced by curcumin could be significantly reversed by adding ROS or caspase 8 inhibitors. NCI-H460 cells tended to be arrested at G2/M cell cycle stage after curcumin treatment. Down-regulation of cyclin-depedent kinase 1 by curcumin may be involved in the mechanism of such an arrest. In conclusion, curcumin exerts its anti-cancer effects on lung cancer NCI-H460 cells through apoptosis or cell cycle arrest. Curcumin is potentially an anti-cancer therapy for human large cell carcinoma of lung.

Key words: apoptosis, cell cycle, curcumin, lung neoplasms.

誌謝

在碩士班這段時間，天天都沈浸在求知的喜悅中。

感謝杭良文老師慨允指導我，在我剛到這個陌生的環境時給我諸多寶貴的建議；也體恤我臨床忙碌，未苛責我在研究工作上經常有的虧欠。鍾景光老師是我的另一位恩師。在他的指導下，我終可一瞥基礎研究的堂奧。鍾老師著作等身、譽滿全球，卻虛懷若谷、毫無大教授的架子。每次參加鍾老師實驗室 seminar，總是笑聲不斷、氣氛愉悅，讓我既驚訝又佩服。

還要感謝本所藍先元所長及顧正崙、曾昱綸老師等在雜誌論文討論會時對我論文的建議與批評。這些意見在我下台後詳加考查，竟發現可引伸出非常寶貴的資料，我把它們整理後寫入本論文中「討論」欄內，使論文涵蓋的面向更加深廣。特別感謝顧正崙老師幾次對我的稱讚，雖多溢美，但使我重拾信心、意義重大。

彰基林楷煌主任准許我在職進修且多方支持我的研究工作，謹申謝悃。

內人子瑜在我仍信心不足時，鼓勵我報考研究所、又在我求學期間分攤許多家務；我在學業上若有絲毫成就，她絕對功不可沒。

聖經說：「若不是耶和華建造房屋、建造的人就枉然勞力。若不是耶和華看守城池、看守的人就枉然儆醒。」回首前塵，歷數上帝所安排的這一切人與事，內心充滿感恩。我何其渺小卑微，竟能得這一切我根本不配的恩典，只能說是神恩浩瀚。願上帝厚待這些有恩於我的師長與家人。

吳莘華 謹誌於

中國醫藥大學 臨床醫學研究所

中華民國九十八年七月

目錄

	頁次
中文摘要	I
英文摘要	II
誌謝	III
目錄	IV
圖表目錄	VII
符號與縮寫	IX
第一章 前言	1
第一節 研究背景	1
一、肺癌	1
二、薑黃素簡介	2
三、薑黃素的抗癌效果	10
四、細胞凋亡	13
五、細胞週期與細胞週期調控	14
第二節 研究目的	18
第二章 研究方法	19
第一節 研究材料	19
一、細胞株來源	19
二、細胞株特性	19
三、藥品試劑	19
四、儀器設備、器材	22
第二節 研究設計	23
一、實驗架構	23
(一) 探討薑黃素對NCI-H460細胞生長之影響	23
(二) 探討薑黃素對 NCI-H460 細胞週期影響及細胞 凋亡之機制	23

二、實驗方法	24
(一) 藥品配製	24
(二) 細胞培養	25
A. 培養條件	25
B. 細胞冷凍保存	25
C. 繼代培養	26
D. 藥物處理	26
(三) 流式細胞儀分析測定	26
A. 細胞存活率測定	27
B. 細胞週期分析	28
C. 粒腺體膜電位之檢測	28
D. 活性氧化物產生之檢測	29
E. 鈣離子釋出之檢測	30
F. Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性分析	31
G. 加入Caspase 8 與 ROS 抑制劑的效果	32
(四) 免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡顯像	33
(五) 西方點墨法 (Western blotting)	33
(六) Real Time PCR 分析 AIF、caspase 3、8、9 以及endo G 的mRNA 轉錄表現量	35
第三節 統計方法	36
第三章 研究結果	37
第一節 描述性統計分析	37
一、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞株NCI-H460的增生抑制與細胞形態改變	37
二、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 細胞週期的影響	40
三、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 產生活性氧化物量的改變	44
四、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 粒腺體	45

膜電位的影響	
五、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460之鈣離子釋出影響	47
六、利用流式細胞儀檢測薑黃素對大細胞肺癌細胞 NCI-H460 之細胞凋亡相關蛋白質 Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 活性的影響	48
七、加入Caspase 8 與 ROS 抑制劑對薑黃素在 NCI-H460 細胞影響的改變	52
八、免疫螢光染色法偵測 endo G、AIF、 cytochrome c、GADD153 與 GRP78 在細胞質與細胞核的表現	56
九、利用西方墨點法檢測薑黃素對人類 NCI-H460 細胞之凋亡與週期調控有關蛋白表現量的影響	59
十、Real Time PCR 分析 AIF、caspase 3、-8、-9 以及 endo G 的 mRNA 轉錄表現量	62
第二節 推論性統計分析	63
第四章 討論	64
第一節 結果討論	64
一、薑黃素濃度與生體可用率相關的結果討論	64
二、外路徑相關的結果討論	65
三、內路徑相關的結果討論	65
四、ROS 相關的結果討論	66
五、內質網壓力路徑相關的結果討論	67
第二節 其他相關性討論	68
第三節 研究限制	69
第五章 結論與建議	70
第一節 結論	70
第二節 建議	70
參考文獻	70

圖表目錄		頁次
圖 1.1	薑黃的外形與薑黃素的萃取	6
圖 1.2	薑黃素的化學結構式	7
圖 1.3	薑黃素的結構名稱	7
圖 1.4	薑黃素的兩種同分異構物	8
圖 1.5	類薑黃素的化學結構式	9
圖 1.6	可被薑黃素抑制或預防的癌症	11
圖 1.7	薑黃素對於腫瘤進展的抑制及其可能的分子機轉	12
圖 1.8	細胞凋亡的顯微鏡下的變化示意圖	14
圖 1.9	細胞週期示意圖	15
圖 1.10	不同的 cyclin 蛋白質在細胞週期間的濃度變化	16
圖 2.1	薑黃素作用於 NCI-H460 細胞的實驗架構	24
圖 3.1	不同濃度之薑黃素處理 NCI-H460 細胞 24 小時後的細胞存活率	37
圖 3.2	不同濃度之薑黃素處理 NCI-H460 細胞 48 小時後的細胞存活率	38
圖 3.3	薑黃素作用 24 與 48 小時對 NCI-H460 細胞的毒殺效果重疊作圖	39
圖 3.4	薑黃素處理 24 小時後細胞的形態的改變	39
圖 3.5	薑黃素處理 48 小時後細胞的形態的改變	40
圖 3.6	不同濃度之薑黃素作用 24 小時對 NCI-H460 細胞細胞週期分佈影響	42
圖 3.7	不同濃度之薑黃素作用 48 小時對 NCI-H460 細胞細胞週期分佈影響	44
圖 3.8	25 μ M 薑黃素作用不同作用時間所造成的 NCI-H460 細胞之 ROS 產量變化	45
圖 3.9	25 μ M 薑黃素作用不同作用時間所造成的 NCI-H460 細胞之粒腺體膜電位變化	46
圖 3.10	NCI-H460 細胞給予濃度 25 μ M 之薑黃素所造成的胞內鈣離子濃度變化	48

圖 3.11	NCI-H460 細胞接受 25 μ M 薑黃素作用後其 caspase 3 活性的變化	50
圖 3.12	NCI-H460 細胞接受 25 μ M 薑黃素作用後其 caspase 8 活性的變化	51
圖 3.13	NCI-H460 細胞接受 25 μ M 薑黃素作用後其 caspase 9 活性的變化	52
圖 3.14	接受薑黃素作用後的 NCI-H460 細胞在有或無 Caspase 8 抑制劑(Z-IETD-fmk)的情況下，對 Caspase 8 活性與細胞存活比率的影響	54
圖 3.15	接受薑黃素作用後的 NCI-H460 細胞在有或無 ROS 抑制劑 (NAC) 的情況下，對 ROS 產量與細胞存活比率的影響	56
圖 3.16	經過 25 μ M 薑黃素作用 24 小時後，以免疫螢光法染色、共軛焦顯微鏡偵測 NCI-H460 內 endo G、AIF、cytochrome c、GADD153 與 GRP78 的含量與位置	59
圖 3.17	用西方墨點法檢測薑黃素對人類 NCI-H460 細胞之凋亡與週期調控有關蛋白表現量的影響	61
圖 3.18	Real Time PCR 分析 AIF、caspase 3、8、9 以及 endo G 的 mRNA 轉錄表現量	63
圖 3.19	薑黃素引發人類 NCI-H460 細胞凋亡的可能抑癌機轉	68
表 1.1	各民族語言對薑黃的稱呼	2
表 1.2	調控細胞週期之 cyclins 及其配合的 CDKs	16
表 2.1	不同濃度之薑黃素溶液的配製	24
表 2.2	PCR 所使用的引子及其核酸序列	35

符號與縮寫

AIF: apoptosis inducing factor

APAF1: apoptotic peptidase activating factor 1

BAD: Bcl2-antagonist of cell death

Bax: Bcl2-associated X protein

Bcl2: B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2

Bcl-xL: Bcl extra long

CDK: Cyclin-dependent kinase

CHOP: C/EBP homologous protein

$\Delta\Psi_m$: Mitochondrial membrane potential

DioC6: 3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine iodide

DMSO: dimethyl sulfoxide

Endo G: endonuclease G

GADD153: growth arrest and DNA damage-inducible gene 153

GRP78: glucose regulated protein 78

H₂DCF-DA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

NAC : N-acetylcysteine

PCR: polymerase chain reaction

PI: Propidium iodine

PUMA, p53-upregulated modulator of apoptosis

ROS: Reactive oxygen species

第一章 前言

第一節 研究背景

一、肺癌

在西元 1900 年時，肺癌還是一個十分罕見的疾病。上個世紀的一篇肺癌的病例報告，指陳此病只是「醫學上古怪的病例、對治療幾全無反應、太過罕見而沒有臨床上的重要性」(Pepper 1850)。然而，肺癌的發生率在最近這數十年來呈現戲劇性地快速增長(Jemal et al. 2008)。且由於目前尚欠缺有效的治療，使得因肺癌而死亡的人數，不論在美國或是全世界都名列第一 (Parkin et al. 2005)。

肺癌依組織形態被分成小細胞肺癌(small cell lung cancer)與非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)兩大類形。前者約佔百分之十，後者則包括腺癌(adenocarcinoma)、鱗狀細胞癌(squamous cell carcinoma)及大細胞癌(large cell carcinoma)(約佔 10%)三種主要類形，共約佔百分之九十(Johnson et al. 2008)。分成這兩大類形的主要原因是無論在生物特質、臨床表現與對治療的敏感度方面，它們之間都有很大的差異。

小細胞肺癌的第一線治療是以化療為主 (Alberg et al. 2005)。與小細胞肺癌相比，非小細胞肺癌的增生、擴散較慢，對化療敏感度低，根治的辦法是趁早把腫瘤完全切除。可惜的是可以開刀完全切除的早期病患（第一、二期及第三期早期）不到三成，而手術後的復發率也不低；第一期（肺局部之小腫瘤）約有四分之一；第二期（肺腫瘤較大，或小腫瘤但漫延到肺門淋巴結）可能超過一半；第三期早期（肺腫瘤雖大，但沒有侵犯到主要血管及內臟，並可能超越肺門漫延到同側的縱隔淋巴結）更高，達四分之三。這些復發的病例，不論期別高低，其中八成均有遠處轉移，而這些轉移在手術之前應已發生，卻因為太小而偵測不出來。依此看來，不管是小細胞或是非小細胞肺癌，都應該被當作全身性的疾病來考慮病人的治

療，而要改善肺癌的治療率，局部與全身性的治療一樣的重要，都不能忽視 (紀炳銓 2008)。

抗癌藥物對非小細胞肺癌效果不夠好，再加上抗癌藥物有抑制造血功能 (引發後續的感染及出血) 及損傷其他器官 (如噁心、嘔吐、掉髮、食慾不振、疲倦無力、口腔潰瘍等) 的明顯副作用，嚴重時甚至會危及生命。因此，研發出能夠抑制肺癌細胞並使其自行細胞凋亡，且不會產生過多副作用的藥物，是有其的必要的。

二、薑黃素簡介

天然植物是古代人們取得藥物的主要來源。在醫藥發達的今天，它們仍然是新藥研發的首要源頭 (Harvey 2008)。在 1988 年至 2002 年間面世的 877 種小分子藥物中，其來源百分之 61 可以追溯到天然植物 (Newman et al. 2003)。雖然現代醫學界對於天然植物的藥用並不太重視，但普羅大眾至今仍廣泛地使用它們作為藥劑。一項世界衛生組織的調查顯示：百分之 80 的開發中國家人民仍以天然植物解決其醫療需求 (Mukherjee et al. 2006)。另一項以美國人為對象的研究顯示：每三個美國人中就有一個每天使用天然植物；而在罹癌的病人中，此比例更高達百分之 50 (Goel et al. 2008)。

薑黃素 (Curcumin) 是由天然植物 *Curcuma longa* (又叫作 turmeric) 所提煉的。此植物早為世界各方、各民族所週知，因而各以其特有的語言稱呼此植物。在中華民族的語言稱之為「薑黃」，又稱「鬱金」；阿拉伯語稱為”Kurkum”，“Uqdah safra”，日語稱為”Ukon”，“Tamerikku”；英語稱”Indian Saffron”。更詳細的各國語言稱謂可參閱 Ravindran 的著作 (Ravindran 2006)，或見「表 1.1」：

表 1.1 各民族語言對薑黃的稱呼

語言	名稱
----	----

語言	名稱
Arabic	Kurkum, Uqdah safra
Armenian	Toormerik, Turmerig
Assamese	Halodhi
Bengali	Halud
Bulgarian	Kurkuma
Burmese	Hsanwen, Sanwin, Sanae, Nanwin
Catalan	Cúrcuma
Chinese	Yu chin, Yu jin, Wohng geung, Geung wohng, Wat gam, Huang jiang, Jiang huang, Yu jin, Yu jin xiang gen
Croatian	Indijski šafran, Kurkuma
Czech	Kurkuma, Indický šafrán, Žlutý kořen, Žlutý zázvor
Dhivehi	Reen'dhoo
Danish	Gurkemeje
Dutch	Geelwortel, Kurkuma
	Tarmeriek, Koenjit, Koenir
English	Indian saffron
Esperanto	Kurkumo
Estonian	Harilik kurkuma, Kurkum, Pikk kollajuur, Lõhnav kollajuur
Farsi	Zardchubeh
Finnish	Kurkuma, Keltajuuri
French	Curcuma, Safran des Indes, Terre-mérite, Souchet des Indes
Galician	Cúrcuma
German	Curcuma, Kurkuma, Indischer Safran, Gelbwurz
Greek	Kitrinoriza, Kourkoumi, Kourkoumas

語言	名稱
Gujarati	Halad, Haldar
Hebrew	Kurkum
Hindi	Haldi
Hungarian	Kurkuma, Sárga gyömbérgyökér
Icelandic	Túrmerik
Indonesian	Kunyit, Kunir; Daun kunyit
Italian	Curcuma
Japanese	Ukon, Tamerikku
Kannada	Arishina, Arisina
Khmer	Romiet, Lomiet, Lamiet
Korean	Kang-hwang, Keolkuma Kolkuma, Sim-hwang, Teomerik, Tomerik, Tumerik, Ulgum, Ulgumun
Laotian	Khi min khun, Khmin khün
Latvian	Kurkuma
Lithuanian	Ciberžolė, Kurkuma, Dažinė ciberžolė
Malay	Kunyit basah
Malayalam	Manjal
Marathi	Halad
Nepali	Haldi, Hardi, Besar
Norwegian	Gurkemeie
Pahlavi	Zard-choobag
Pashto	Zarchoba
Polish	Kurkuma, Ostryż długi, Szafran indyjski
Portuguese	Açafrão da Índia, Curcuma

語言	名稱
Punjabi	Haldi
Romanian	Curcumă
Russian	Koren, kurkumy, Kurkuma
Sanskrit	Ameshta, bahula, bhadra, dhirgharaja, gandaplashika, gauri, gharshani, haldi, haridra, harita, hemaragi, hemaragini, hrivilasini, jayanti, jwarantika, kanchani, kaveri, krimighana, kshamada, kshapa, lakshmi, mangalaprada, mangalya, mehagni, nisha, nishakhya, nishawa, pavitra, pinga, pinja, pita, patavaluka, pitika, rabhangavasa, ranjani, ratrimanika, shifa, shiva, shobhana, shyama, souhagouhaya, suvarna, suvarnavarna, tamasini, umavara, vauragi, varavarnini, varnadatri, varnini, vishagni, yamini, yohitapriya, yuvati
Singhalese	Kaha
Slovak	Kurkuma
Slovenian	Kurkuma
Spanish	Cúrcuma, Azafrán arabe
Swahili	Manjano
Swedish	Gurkmeja
Tagalog	Dilaw
Tamil	Manjal
Telugu	Haridra, Pasupu
Thai	Kha min chan, Kha min; Wanchakmadluk
Tibetan	Gaser, Sga ser
Turkish	Hint safranı, Sarı boya, Zerdeçal, Safran kökü, Zerdali, Zerdeçöp, Zerdecube
Ukrainian	Kurkuma
Urdu	Haldi, Zard chub

語言	名稱
Vietnamese	Bot nghe, Cu nghe, Nghe, Uat kim, Khuong hoang
Yiddish	Kurkume

(修改自(Ravindran 2006))

薑黃是一種多年生的草本植物，屬薑科 (Zingiberaceae)。主要產於中國、印度、東南亞等地。十四世紀歐洲的探險家到達亞洲後，遂將此植物傳入西方世界(Aggarwal et al. 2007)。薑黃植物的外形如圖 1.1：

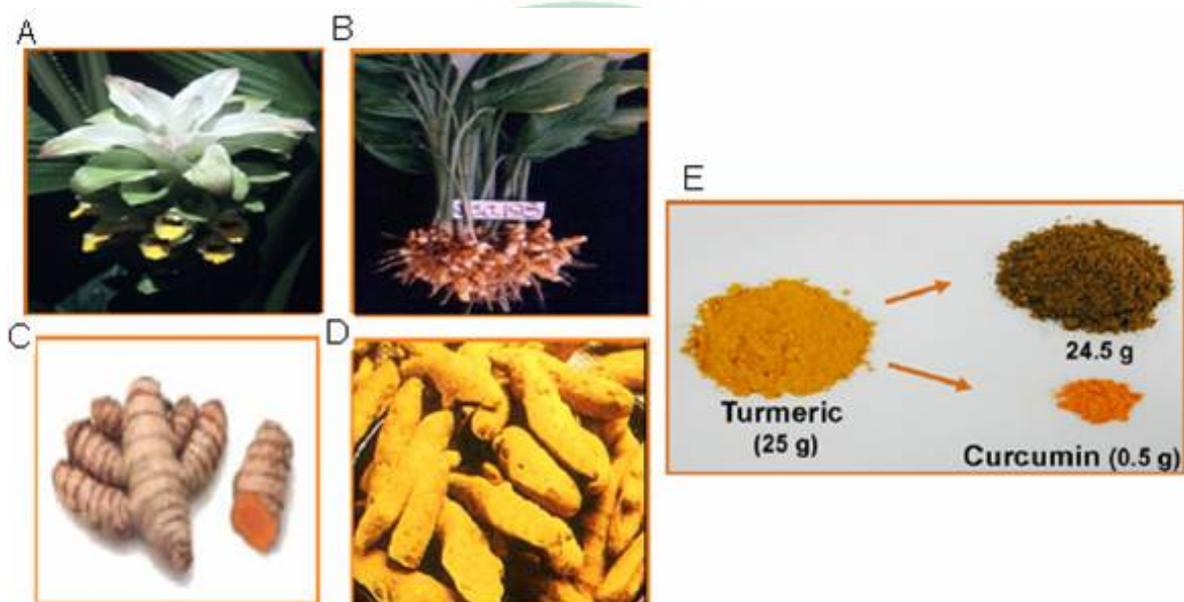


圖 1.1. 薑黃的外形與薑黃素的萃取。A: 薑黃的葉子。B: 薑黃的根莖。C: 與葉片分離後的薑黃根莖。D: 乾燥後的薑黃根莖。E: 薑黃根莖被研磨成粉末狀後，以 95% 乙醇萃取，可得薑黃素。(擷取自(Goel et al. 2008))

薑黃的根莖呈卵圓形。其根莖經乾燥磨粉後，以 95% 乙醇萃取 24 小時後，可得金黃色的粉末，其主要成分稱為「薑黃素」(Curcumin)。薑黃素首次在 1842 年被 Vogel 分離出。其化學結構則是在 1910 年被 Lampe 和 Milobedzka 繪出 (Milobedzka 1910)。圖 1.2 顯示薑黃素(Curcumin I) 的化學結構：

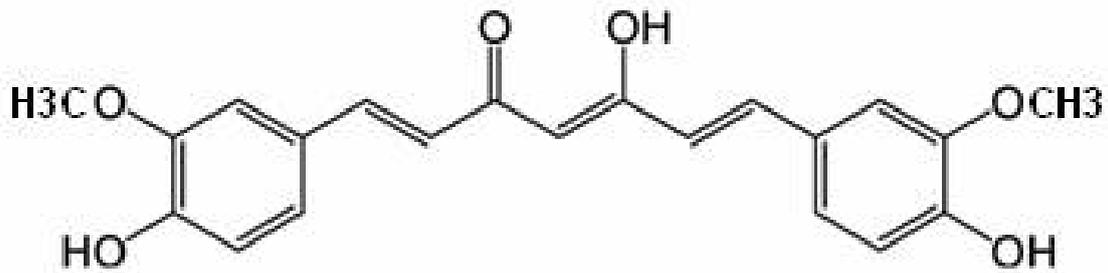


圖 1.2. 薑黃素的化學結構式。

薑黃素的結構中有其特定的稱謂：圖 1.3 中圓形圈起結構(A)稱為 phenolic；四方形框起鍵結(B)稱作 alkene linker；四方形框起結構(C) 叫作 β -diketone，又叫作 keto-enol。

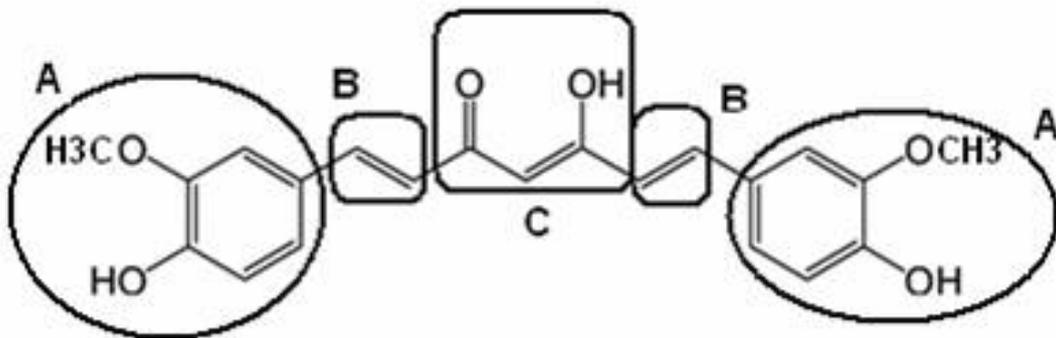


圖 1.3. 薑黃素的結構名稱。圓形圈起結構(A)稱為 phenolic；四方形框起鍵結(B)稱作 alkene linker；四方形框起結構(C) 叫作 β -diketone，又叫作 keto-enol。

薑黃素的 β -diketone 結構可存有兩種同分異構物：keto- 和 enol- 如圖 1.4.

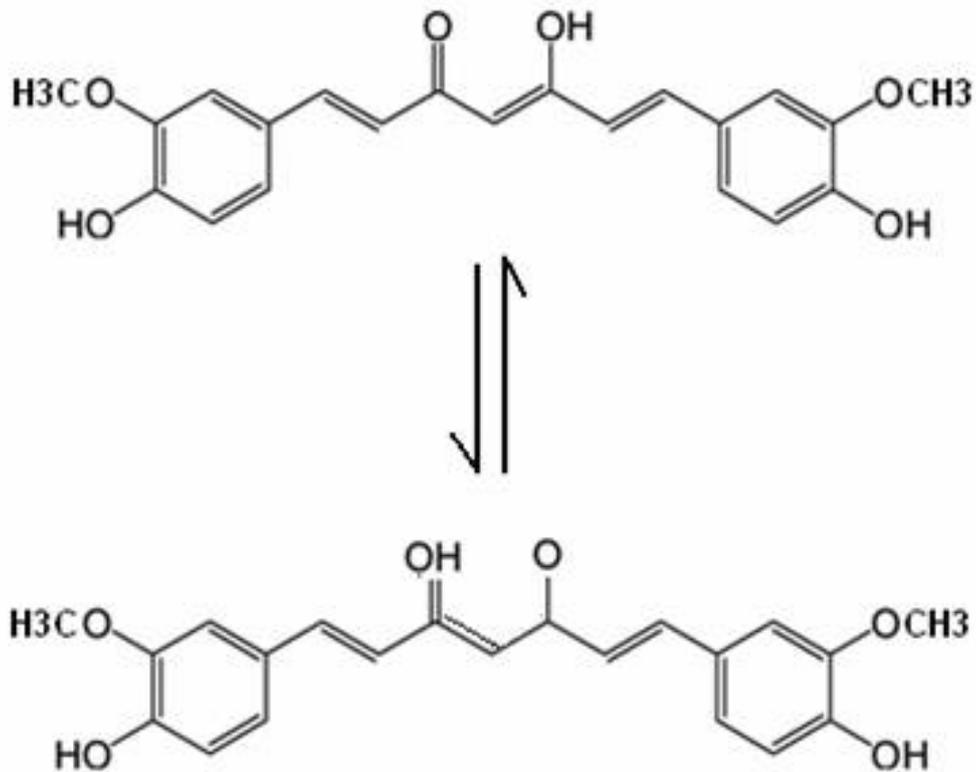


圖 1.4.薑黃素的兩種同分異構物：keto- 和 enol-，兩者互動呈平衡狀態。

人類首次合成薑黃素是在 1913 年 (Lampe 1913)。除了薑黃素以外，這黃色粉末另含有其他與薑黃素類似的成分，統稱為「類薑黃素」(curcuminoid)。「類薑黃素」包含了 demethoxycurcumin (curcuman II), bisdemethoxycurcumin (curcuman III) 和 cyclocurcumin (curcumin IV) (Kiuchi et al. 1993)。市售的「薑黃素」除了主成分(curcumin I) 約佔 77% 外，curcumin II 和 curcumin III 各佔約 3% 與 17%。圖 1.5.顯示類薑黃素的化學結構式：

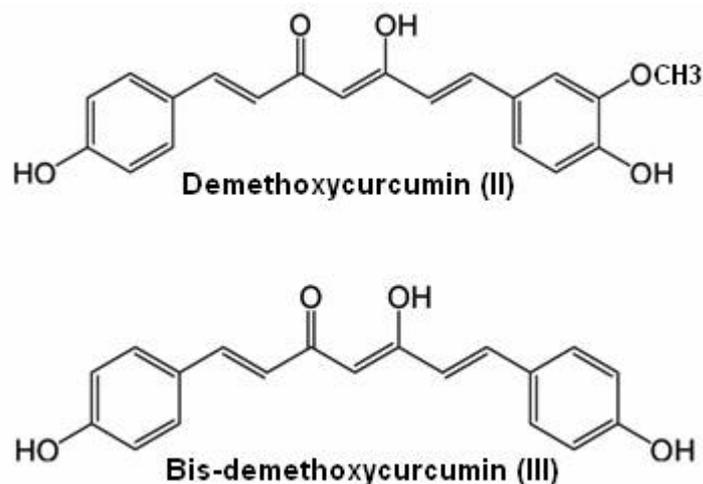


圖 1.5. 類薑黃素的化學結構式。

至於薑黃素(curcumin I) 還是類薑黃素 (curcuminoid III) 的抗氧化、抗癌效果較佳？目前的證據尚不一致 (Ruby et al. 1995; Ramsewak et al. 2000)。薑黃素是加哩 (curry) 的主成分，它出現在印度人的食物中已經數千年了，現今更深受全世界各地人民的喜愛。除此之外，薑黃素也是合法的食品添加劑，又稱為「天然色素三號」(natural yellow 3)。

薑黃素的藥用也幾乎與它的食品用途具有一樣悠久的歷史。5000 年前古印度的阿育吠陀 (Ayurveda) 醫學系統裡，薑黃是用在傷口復原、血液淨化以及胃部疾病的主要藥劑。薑黃素復被製成藥膏用於醫治常見眼疾、包敷傷口、蚊蟲叮咬、燒燙傷、剝瘡、以及其他的皮膚疾病。薑黃素藥膏另被用於敷在產婦的會陰部治療生產過程中造成的撕裂傷。粉狀的薑黃素則與牛奶混合以治療咳嗽等呼吸道疾病。烤過的薑黃素粉末被用於治療兒童下痢 (Thakur 1989)。由於印度人民長久以來對薑黃素的醫療功效深信不疑，美國嬌生公司甚至在當地推出內含薑黃素的OK繃 (Macgregor 2006)。

中國人運用薑黃素治病的歷史也相當久遠。「大明諸家本草論：薑黃療效可治癥瘕血塊。通月經、治補損瘀血、暴風痛、冷氣下食。蘇頌嘉佑圖經本草則謂祛邪辟惡、治氣脹、產後敗血攻心。李時珍謂能治風痺臂痛」(黃俊銘 2002)。現代中醫對於薑黃的療效也多有推崇：「用於血瘀氣滯之

胸脇脘腹疼痛，癥瘕積聚，痛經閉經，跌打損傷。薑黃辛散苦泄溫通，入血分能活血行瘀，入氣分能行散滯氣，且歸入肝經，故多用於肝鬱氣滯之脇肋及脘腹疼痛。至脇肋疼痛，可配枳殼、桂心，至脘腹痛可配木香、烏藥、當歸等，以舒肝行氣活血止痛，如〈濟生續方〉推氣散、〈聖濟總錄〉薑黃散。治婦女經閉、痛經，則與當歸、赤芍、川芎等活血散瘀同用，以活血通經：本品亦治產後瘀血腹痛，可以配伍沒藥散瘀止痛。治跌打傷痛，亦多配伍活血祛瘀之品當歸、桃仁、牛膝等同用，如〈傷科方書〉薑黃散。用於風寒濕痺。薑黃辛散溫通，外散風寒，內行氣血，善通痺止痛，為治肩背疼痛之良藥。常與羌活、當歸、芍藥等同用。如〈婦人良方〉五痺湯。薑黃治癰疽發背起初，紅腫熱痛，屬於陽症者，可與大黃、白芷、天花粉、南星、黃柏等配伍，研末外敷，如〈外科正宗〉如意金黃散，亦取其活血消腫止痛之功。」(國家中醫藥管理局〈中華本草〉編委會 1999)

薑黃素在近代醫學研究的探討下，其療效的確實性更發屹立不搖，且擴及許多古人不知曉的領域。現在已經被證實的療效包括：抗氧化 (Sreejayan et al. 1997)、抗發炎 (Ammon et al. 1993)、抗癌 (Rao et al. 1995)、保肝 (Kiso et al. 1983)、抑制血栓 (Srivastava et al. 1985)、預防心肌梗塞 (Nirmala et al. 1996)、降血糖 (Srinivasan 1972; Babu et al. 1995)、治療類風濕性關節炎 (Deodhar et al. 1980) 等等。

三、薑黃素的抗癌效果

近代對薑黃素的研究中很重要的一項發現是它的抗癌效果。已知可以被薑黃素所抑制或預防的癌症包括消化道癌症（包括食道、胃、腸、肝、胰、大腸直腸癌症）、頭頸腫瘤（包括口腔癌、胸腺瘤）、肺癌、泌尿道腫瘤（包括膀胱、腎臟、攝護腺癌）、血液腫瘤（包括白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤）、黑色素細胞瘤、腦瘤、乳癌、骨癌、婦癌（包括子宮癌、子宮頸癌、卵巢癌）。請參閱圖 1.6。

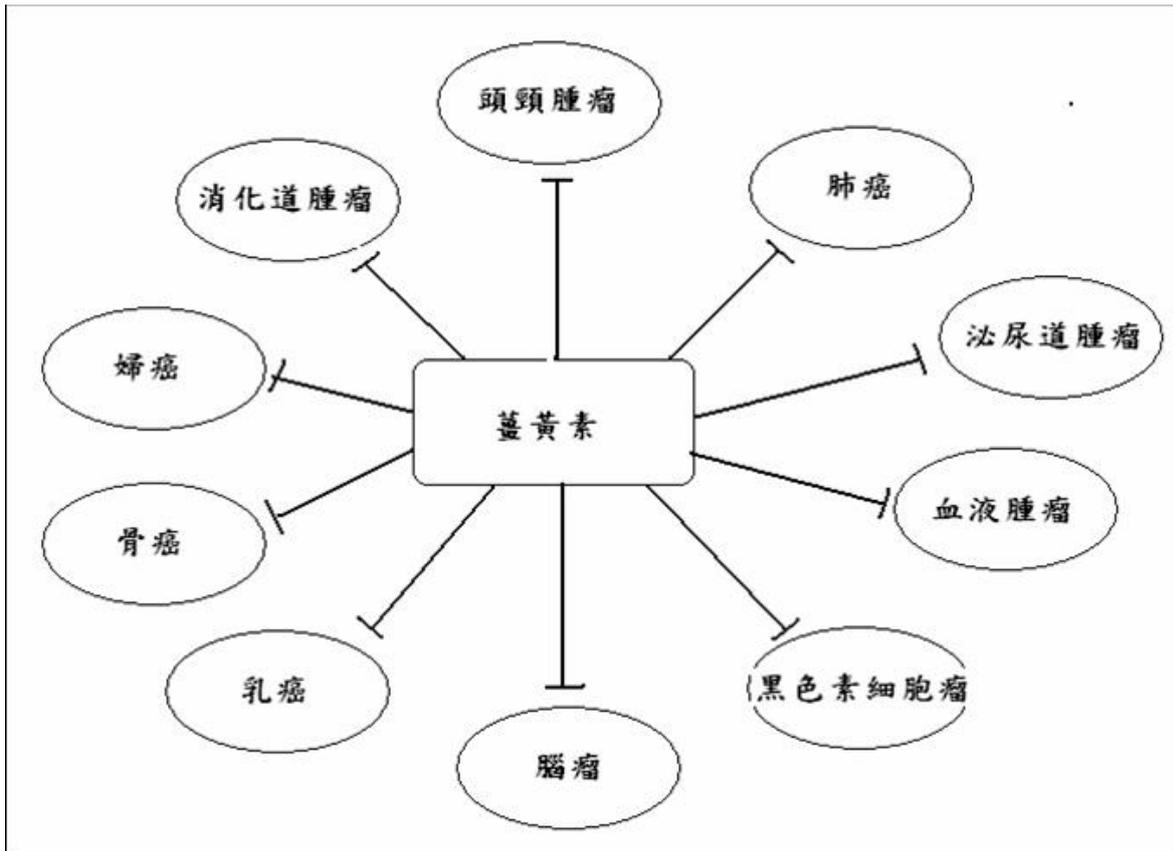


圖 1.6. 可被薑黃素抑制或預防的癌症 (修改自 (Anand et al. 2008))

這些抗癌的效果目前也有相當堅強的分子生物證據作基礎。圖 1.7 所繪製的是已知的薑黃素的分子生物作用及其對癌症進展的不同階段所可能達到的抑制效果。

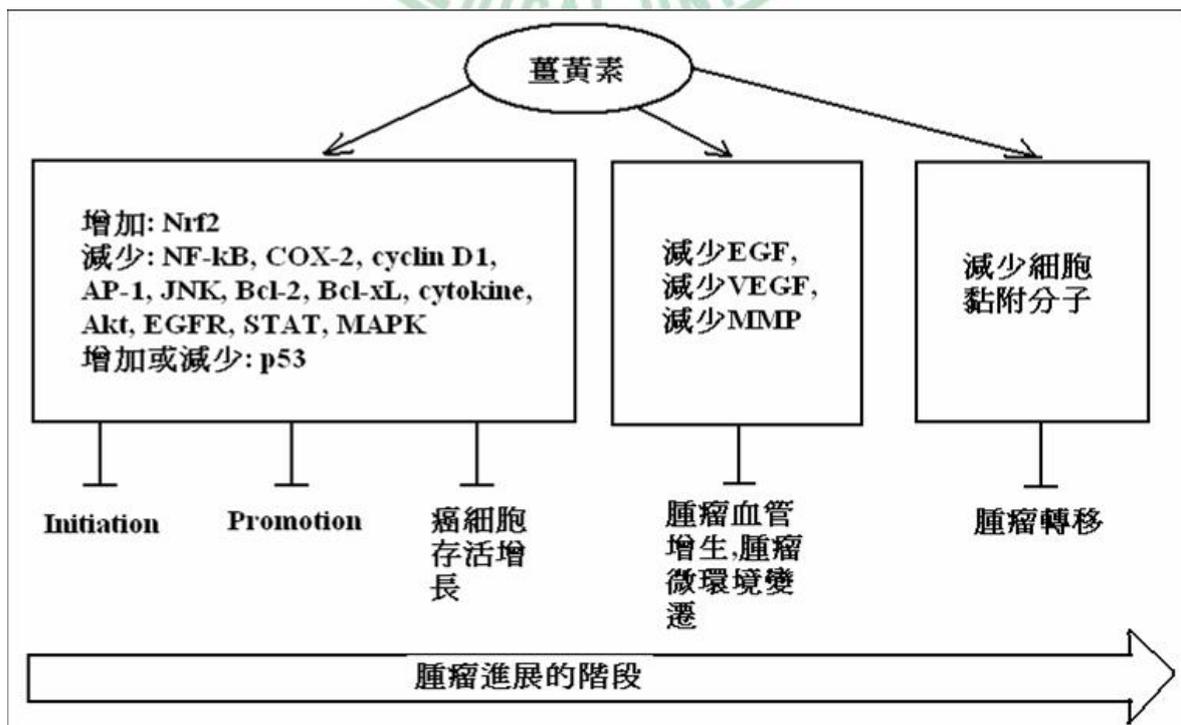


圖 1.7. 薑黃素對於腫瘤進展的抑制及其可能的分子機轉（修改自(Hatcher et al. 2008)）。

不惟如此，薑黃素的抗癌成效已經有相當的動物體實驗佐證。最早的薑黃素動物研究是以老鼠的腹水淋巴瘤作題材 (Kuttan et al. 1985)。此後陸續有許多動物研究指出薑黃素確切的生物體內抗癌效果(Odot et al. 2004; Aggarwal et al. 2005; LoTempio et al. 2005; Lin et al. 2007)。這些動物研究所給予的薑黃素包括口服、靜脈注射、腹膜注射或胃沖洗等不同的方式都可以產生可見的抗癌效果(Goel et al. 2008)。

薑黃素的活體抗癌研究也已經進展到以人為對象的臨床試驗。最早的研究是由台大醫院所發表的第一期臨床試驗。該研究顯示：連續三週以口服方式每日攝取薑黃素 8 公克，並不會對人體產生任何治療相關的副作用。薑黃素的劑量未再繼續調高，主要是避免藥物體積太大所造成的胃部不適，並非藥物本身的副作用 (Cheng et al. 2001)。此外，以末期胰臟癌病人為對象的薑黃素第二期臨床研究亦顯示部分病人服用此藥後可得到臨床進步 (Dhillon et al. 2008)。另外，在以色列台拉維夫的Sourasky 醫學中心有一項合併薑黃素、gencitabime（健澤）、celecoxib 治療轉移性大腸直腸癌的第三期臨床試驗刻在進行中(Strimpakos et al. 2008)。相信隨著這些研究的結果陸續出爐，我們對於薑黃素在人體的實際效能會有更清楚的認識。

藥物動力學的研究顯示：給予 ICR 老鼠尾巴靜脈注射標有同位素的薑黃素，兩分鐘後在動物的肺部可發現有相當濃度的薑黃素出現 (Ryu et al. 2006)。因此，探討薑黃素在肺癌方面的作用是有相當的可行性價值的。目前已有部分薑黃素抗肺癌的研究報告：(1) 薑黃素可抑制 Lewis lung carcinoma 細胞的縱膈淋巴轉移，且抑制 activator protein 1 (Ichiki et al. 2000)。(2) 薑黃素可導致肺腺癌細胞 A549 產生細胞凋亡而自死 (Radhakrishna Pillai et al. 2004; Lin et al. 2008)。(3) 薑黃素藉著啟動腫瘤抑

制因子：DnaJ-like heat shock protein 40 (HLJ1) 而達成抑制人類肺腺癌細胞 (CL1-5) 的侵犯與轉移 (Chen et al. 2008)。(4) 薑黃素在 BALB/c 老鼠的動物實驗中，可抑制 N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine 對肺部的致癌效果 (Huang et al. 2008)。NCI-H460 細胞是來自人類大細胞肺癌的細胞，屬於人類肺癌的三大類之一。關於薑黃素對 NCI-H460 細胞的直接抗癌效果的研究尚無報告，因此乃本研究之主題。

四、細胞凋亡

「細胞凋亡」(apoptosis) 一詞最早是在 1972 年由病理學家 John Kerr 所提出。細胞凋亡又被稱為細胞計畫性的死亡(programmed cell death)，是一種正常生理性細胞死亡，目的為除去不要的或已無用的細胞；過程中由特定的蛋白質及酵素調控，循序漸進使細胞死亡。其特徵為細胞萎縮 (shrinkage)、細胞膜形成空泡狀 (membrane blebbing)、細胞核之染色質濃染且緻密 (chromatin condensation)、DNA 斷裂成小片段 (internucleosomal fragmentation)，進而細胞膜內陷將細胞分割為多個有包膜包覆之凋亡小體 (apoptotic body)，最後由鄰近之吞噬細胞吞噬，而出現細胞凋亡現象之細胞則分散於組織中，其細胞膜並不會破裂，故不會引起炎症反應 (Nagata 1997) (圖 1.8)。

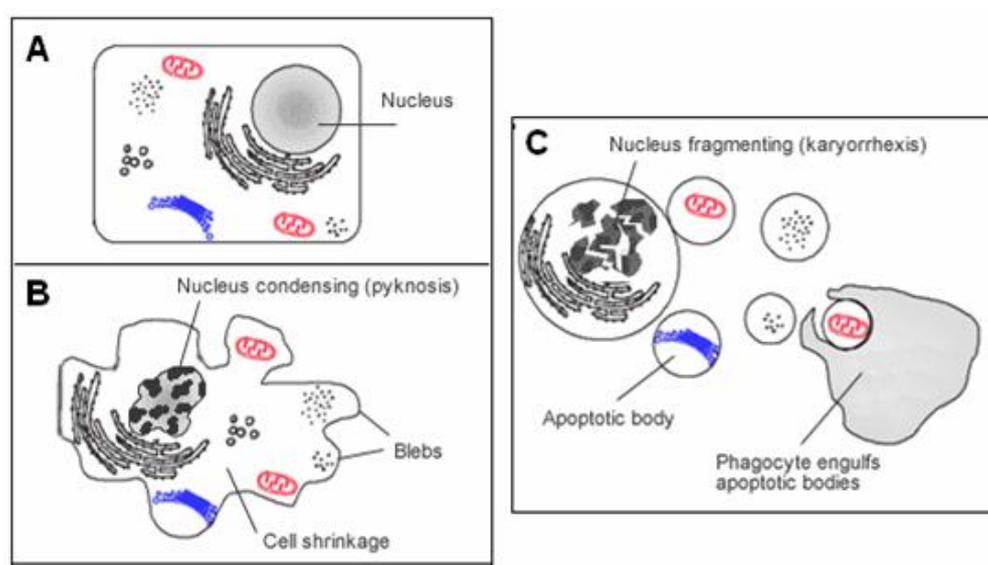


圖 1.8. 細胞凋亡的顯微鏡下的變化示意圖。(A)尚未開始凋亡前 (B)凋亡初期 (C)凋亡晚期。

細胞凋亡是一個高度調控的細胞程序性自殺。其調控的過程牽涉到許許多多的步驟。傳統上，把這些導致細胞凋亡的眾多步驟約略分作兩類：「外路徑」(extrinsic pathway) 與「內路徑」(intrinsic pathway)。前者是由細胞膜上的接受器 (包括：Fas, 腫瘤壞死因子接受器、death receptors) 被激發開始，後續在路徑上被激發的還有 Fas-associated death domain, caspase 8 和 caspase 3。後者(內路徑)則可由不同的因素匯聚成粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 的降低；再經由這 $\Delta\Psi_m$ 的改變引發後續的caspase 9 及caspase 3 的活化，最終達到細胞的凋亡。

晚近的研究指出內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 的壓力也可以成為啟動細胞凋亡的原因。

不被細胞凋亡所控制是細胞癌化的一個重要表徵(Hanahan et al. 2000)。薑黃素的抗癌機轉之一就是引起細胞自動凋亡。Ramachandran 等人發現乳癌細胞 MCF-7 在被薑黃素作用後，與細胞凋亡有關的 214 個基因中有 104 個產生了改變 (Ramachandran et al. 2005)。這樣的結果顯示了薑黃素引起的細胞凋亡是非常複雜的。除此之外，越來越多的證據顯示：薑黃素引起的細胞凋亡是與劑量相關 (dose dependent)，且因細胞種類而有差異的 (cell-type specific) (Reuter et al. 2008)。本研究旨在探討薑黃素對 NCI-H460 細胞的抗癌效果。我們並研究了「外路徑」、「內路徑」與「內質網壓力」等三個系列相關的細胞凋亡路徑，以釐清所涉及的機轉。

五、細胞週期與細胞週期調控

從親代細胞進行細胞分裂，形成兩個子代細胞的過程稱為：細胞週期。簡單來說就是分裂細胞從有絲分裂結束到下次有絲分裂結束的過程。細胞週期可分為 Interphase (又細分作G₀、G₁、S和G₂) 及Mitosis (M)期。分述

如下：

1. 休止期(G₀期)：細胞處於靜止的狀態，可能是暫時休眠或者是永久性休眠，需要有適當的訊息，細胞才會進入細胞週期或 G₁ 期。
2. 分裂後期(G₁期)：細胞開始正常代謝並且生長，並產生RNA及蛋白質，細胞體積會增加，G₁期的染色體數目是二倍數。此為合成前期。
3. DNA合成期(S期)：細胞進行DNA合成及將原本的二倍數染色體複製另一份。此染色體數目為二至四倍數之間。
4. 分裂前期(G₂期)：染色體從二倍數變成四倍數。除了繼續生長並且合成蛋白質之外，在細胞要進入M期之前會負責檢查染色體DNA的複製是否完整以利進行有絲分裂 (mitosis)。
5. 有絲分裂期 (M期)：由一個母細胞變成兩個子細胞，複製完成的染色體會各自分配到子細胞內，使子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，新細胞在此期完成。

圖 1.9 將上述細胞週期的轉化以圖形表示。

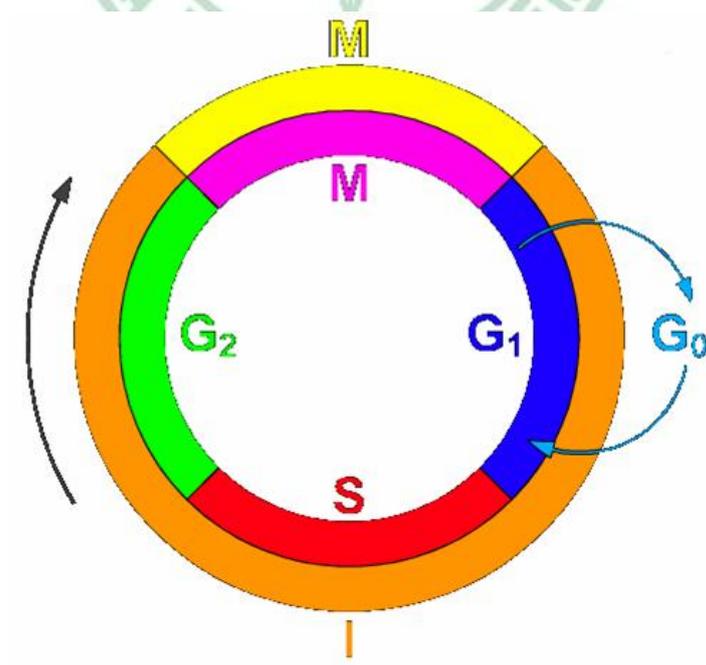


圖 1.9 細胞週期示意圖。外圈：I=Interphase, M=Mitosis；內圈：M=Mitosis, G₁=Gap 1, G₂=Gap 2, S=Synthesis；不在圈內：G₀=Gap 0/Resting。

前述細胞週期中能規律的進行，須要有精密的調控系統來控制。此調控系統主要由一些特殊的蛋白質，叫做 cyclins 來主控。Cyclins 的週期性升高、降低伴隨著細胞週期之間的循序轉換（參圖1.10）。

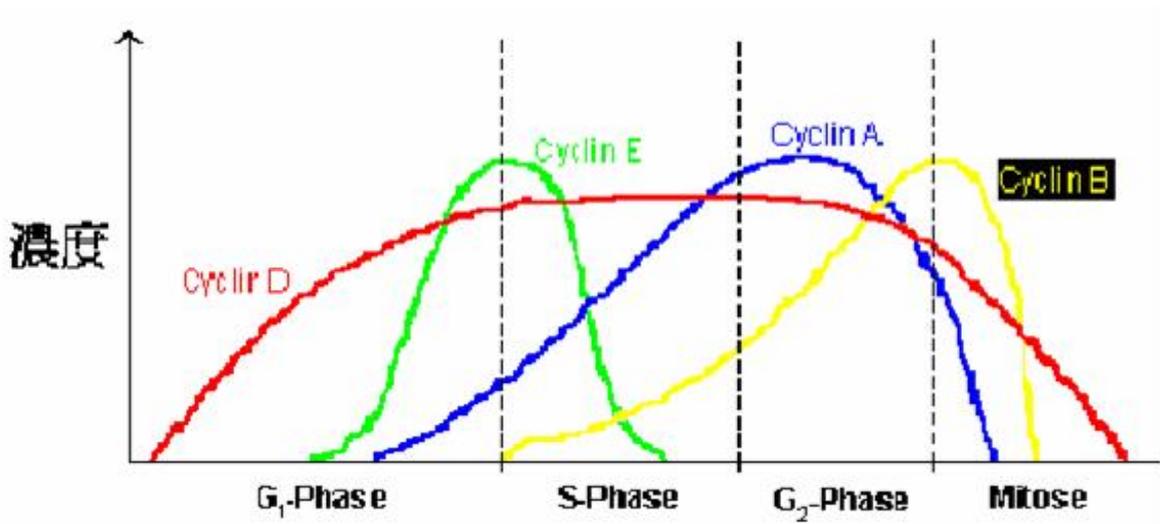


圖1.10 不同的cyclin蛋白質在細胞週期間的濃度變化。

然而 cyclins 本身並不具有催化反應的功能。Cyclins 必須透過與它們合作的另一群具有催化功能的催化酵素：叫做 cyclin-dependent kinases (CDKs) 來催化適當的反應，達成細胞週期的轉換。這些 CDKs 在未與 cyclins 結合前，是完全沒有催化功能的。如此，則細胞週期的啟動或關閉的按鍵才不至於被誤觸，而產生嚴重的後果（例如：致癌）。

真核細胞的 cyclins 與其配合的 CDKs 有一定的組合（如表1.2）：

表1.2 調控細胞週期之cyclins 及其配合的 CDKs

細胞週期的階段	Cyclins	CDKs
G0 /G1	Cyclin D	CDK, CDK6

G1 後期	Cyclin E	CDK2
S	Cyclin A	CDK2
G2/M	Cyclin A,B	CDK1

至於 cyclins 與 CDKs 另受到一些因子的調控：

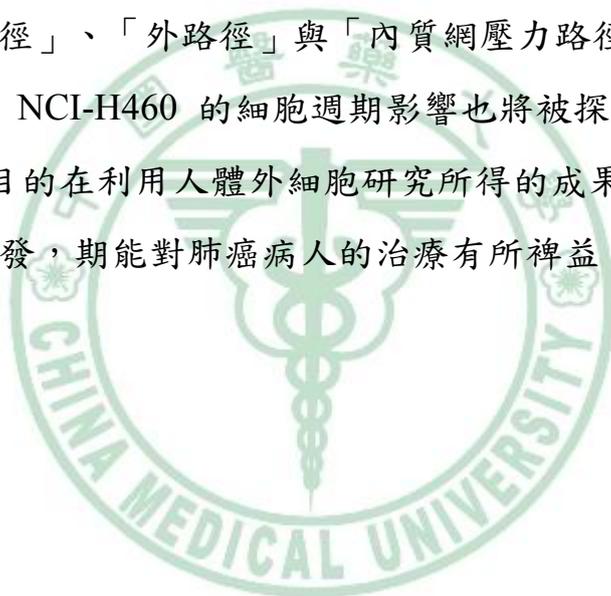
- (1) Rb 蛋白質：E2F 因子是一群轉錄因子的集合。被它所啟動的基因除了一些與 DNA 合成相關的基因外，尚包括 cyclin E (G1 晚期的 cyclin)、cyclin A (S 期的 cyclin) 與 CDK2 (G1 晚期與 S 期的 CDK)。E2F 當與 Rb 蛋白質結合時，不具有轉錄因子的功效。但是當 cyclin D + CDK4/6 在 G1 期中間以後將 Rb 蛋白質磷酸化後，E2F 不再被 Rb 蛋白質羈絆而可啟動前述的基因，使得細胞週期由 G1 進展到 S 期。
- (2) CDK 抑制蛋白 (CDK inhibitory protein, CIPs)：包含了 p27^{KIP1}, P57^{KIP2}, 和 p21^{CIP}。這些抑制蛋白好像一把鎖把 cyclin A-CDK2 鎖住，使細胞週期無法由 G1 進入 S 期。當 cyclin E-CDK2 將 p27^{KIP1} 磷酸化後，p27^{KIP1} 隨後被 polyubiquitination 而被分解。細胞週期便可進入 S 期。至於 P57^{KIP2} 和 p21^{CIP} 是藉由什麼機轉來抑制 CDK，目前尚不清楚。
- (3) Cdc25A 和 Cdc25C 去磷酸酶：Cdc25A 移除了 CDK2 上的某個關鍵位置上的磷酸根，進而使 CDK2 有活性、細胞週期由 G1 進到 S 期。而 Cdc25C 則是移除了 CDK1 上的某個關鍵位置上的磷酸根，進而使 CDK1 有活性、細胞週期由 S 進到 G2/M 期。
- (4) Inhibitors of kinase 4 (INK4s)：這類的蛋白質與 CDK4/6 結合，阻止後者與 cyclin D 結合。前面提過，CDK 若不與其相對應的 cyclin 結合則全無催化功能。因此，INK4 可使細胞週期被停滯

於 G1 期。INK4 中的一種叫做 p16，是有名的腫瘤抑制蛋白。許多腫瘤的生成與細胞週期的控制失調有關 (Diehl 2002)。且已有報導：薑黃素可改變一些腫瘤細胞的週期 (Lin et al. 2008)，所以本研究亦會探討薑黃素的作用對 NCI-H460 細胞的影響。

第二節 研究目的

本研究旨在探討薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 的抗癌效果，並嘗試研究此抗癌效果的可能機轉。由於薑黃素抑制腫瘤的機轉常透過引發癌細胞凋亡來達成(Reuter et al. 2008)，在本實驗中與細胞凋亡有關的「內路徑」、「外路徑」與「內質網壓力路徑」都會被研究。同時，薑黃素對 NCI-H460 的細胞週期影響也將被探討。

本研究最終目的在利用人體外細胞研究所得的成果，推及人體內抗肺癌新藥物的研發，期能對肺癌病人的治療有所裨益。



第二章 研究方法

第一節 研究材料

一、細胞株來源

本實驗所使用之細胞株NCI-H460為人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460株 (human large cell carcinoma)，由新竹食品工業研究所 (Food Industry Research and Development Institute) 購得。

二、細胞株特性

NCI-H460 細胞

- 組織：人類大細胞肺癌細胞，肋膜積液
- 形態：上皮細胞
- 描述：來自尚未接受治療的大細胞肺癌病人的肋膜積液。此細胞表現出易偵測到的 p53 mRNA，且此 mRNA 的表現量與正常細胞相當。無 DNA 外型上的異常。本細胞可被染出角質素(keratin)與 vimentin，但無 neurofilament triplet protein。此細胞株呈現部分神經內分泌細胞的特性。對化學治療相對地敏感。可在軟瓊脂上培養（無論有或無血清）。

三、藥品試劑

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)：購自Sigma Chemical Co.
2. RPMI1640 medium：購自Gibco
3. Fetal bovine serum (胎牛血清, FBS)：購自Gibco
4. L-Glutamin (麩胺酸, LG)：購自Gibco
5. Penicillium Streptomycin (PS)：購自Gibco

6. 3,3'-Dihexyloxacarbo-cyanine iodide (DioC6) : 購自 Molecular Probes (Invitrogen, Carsband, CA)
7. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA): 購自 Molecular Probes (Invitrogen, Carsband, CA)
8. Fluo-3/AM: 購自 Molecular Probes (Invitrogen, Carsband, CA, USA)
9. propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
10. Trypsin-EDTA : 購自 Amersco
11. Trypan blue : 購自 Sigma Chemical Co.
12. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) : 購自 Merck
13. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck
14. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) : 購自 Merck
15. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
16. PhiPhiLux®-G1D1 kit : 購自 OncoImmunin (Gaithersburg, MD, USA)
17. USA)
18. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amersco
19. Triton X-100 : purchase from Sigma chemical Co.
20. Ethanol : 購自 TEDIA
21. Ammonium persulfate (APS) : 購自 Amersco
22. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BISTM29:1) : 購自 Amresco
23. Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Merck
24. Glycine : 購自 Amresco
25. Methanol : 購自 TEDIA
26. formaldehyde : 購自 Merck
27. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amersham

28. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
29. Protein marker : 購自 Femantas
30. 10X SDS buffer (Sodium dodecyl sulfata) : 購自 Amresco
31. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine) : 購自 Amresco
32. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane) : 購自 Amresco
33. Tween 20 : 購自 Amresco
34. 顯影劑 : 購自 Kodak
35. 定影劑 : 購自 Kodak
36. BioMax Flim : 購自 Kodak
37. Agarose I : 購自 Amresco
38. 核酸純化試劑組 (DNA purification kit) : 購自 Gene Mark
39. 蛋白質萃取試劑 (protein extraction solution) (PRO-PREP) : 購自 iNtRON Biotechnology, INC.
40. 5× TBE buffer : 購自 Amresco
41. N-actely cysteine: 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
42. Z-IETD-FMK: 購自 R & D Systmes (Minneapolis, MN, USA)
43. Primary antibody (1°抗體) :
 - anti-actin : 購自 Oncogen ; cat # cp47
 - anti-caspase-3 : 購自 Upstate ; cat# 05-654
 - anti-caspase-8 : 購自 Calbiochem ; cat# AM46
 - anti-caspase-9 : 購自 Upstate
 - anti-cdc25c : 購自 Upstate; c at#05-507
 - anti-cyclin E : 購自 Upstate
 - anti-cdk2 : 購自 Upstate cat#5-596

- anti-cyclin D3：購自Upstate
- anti-cdk4：購自Upstate；cat# 06139
- anti-cdk6：購自Upstate
- anti-Fas：購自Upstate
- anti-bcl-2：購自Upstate；cat# 05729
- anti-bax：購自Upstate
- anti-cytochrome c：Calbiochem；cat#PC323

44. Secondary antibody (2°抗體)：

- goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自Chemicon；AP124P
- goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自Chemicon

四、儀器設備、器材

1. 細胞培養皿：購自FALCON
2. 細胞培養盤：購自FALCON
3. 細胞培養箱：購自Nuair
4. 細胞計數器 (Haemocytometer)：購自Boeco
5. 倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope)：購自Olympus
6. 微量天平 (TE-200; MILLTER)
7. 去離子水製造機：購自Minipore
8. 電源供應器：購自Amersham
9. 酸鹼值測定計 (C831)：購自Consort
10. PVDF membrane：購自Minipore
11. Mini-3D Shaker：購自Boeco
12. SDS-PAGE 電泳槽套組：購自Bio-Rad

13. Transfer Cell Blot 套組：購自Bio-Rad
14. 加熱板：購自Lab-Line
15. 流式細胞計數儀（Flow cytometry）：購自Becton Dickinson
16. 高速離心機：購自HERMLE
17. 分光光度計：from Beckman
18. 光學顯微鏡（Olympus CH2）
19. 光學顯微鏡（Nikon LABOPHOT-2）
20. 酵素免疫分析儀（anthos 2020）：購自Anthos Labtec, Australia
21. DNA 電泳槽：購自 Mupid-2

第二節 研究設計

一、實驗架構

本實驗以細胞模式來探討，觀察curcumin 對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460株（NCI-H460）生長之影響，並探討curcumin是否具有誘導H460細胞凋亡作用及細胞週期的調控作用(如圖2.1)。

（一）探討薑黃素對NCI-H460細胞生長之影響

本實驗為將不同濃度之薑黃素curcumin，直接加入H460 細胞之培養液中，於37°C、5% CO₂ 及充分溼度下，不等小時後，收集細胞。評估薑黃素對H460細胞生長或是存活之影響。

（二）探討薑黃素對NCI-H460細胞週期影響及細胞凋亡之機制

經由存活率之實驗可得之薑黃素curcumin 會抑制H460細胞株之生長，並會誘導細胞進行細胞凋亡作用，故本實驗將以流式細胞儀檢測H460

細胞之細胞週期，並探討薑黃素curcumin 誘導細胞凋亡之機制。

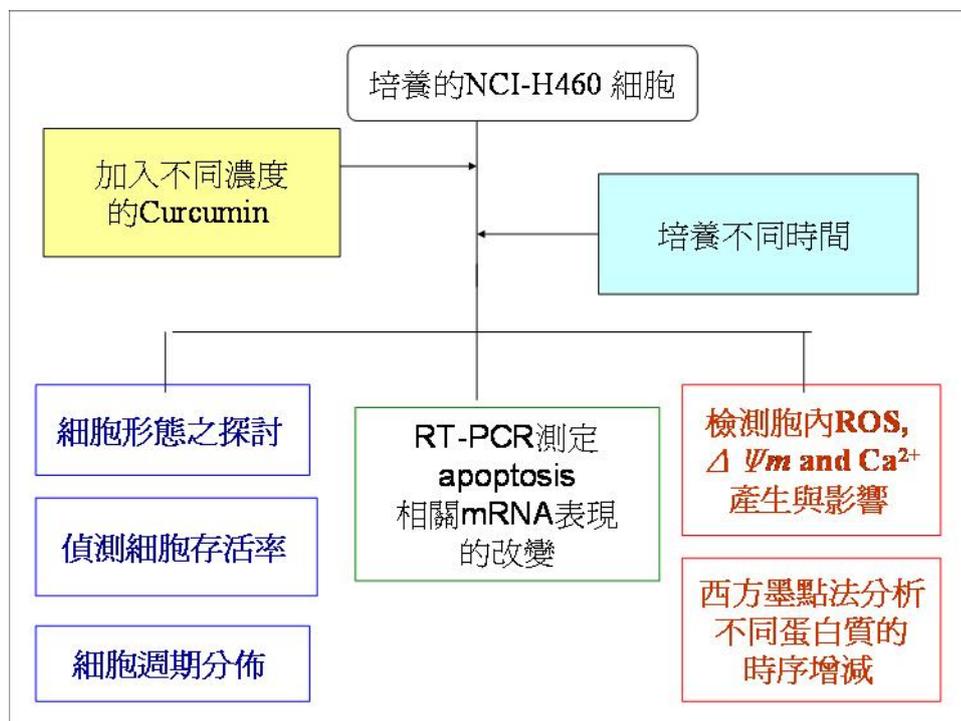


圖2.1 薑黃素作用於 NCI-H460 細胞的實驗架構

二、 實驗方法

(一) 藥品配製

將購自Sigma Chemical Co.之 curcumin 純化物，秤取7.37 mg，溶於1ml DMSO，配製成20 mM stock solution，從stock solution 分別取不同濃度配製所需濃度，配製濃度如下：

化學名：(1*E*,6*E*)-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)

-1,6-heptadiene-3,5-dione

分子式：C₂₁H₂₀O₆

分子量= 368.38 g/mol

表 2.1 不同濃度之薑黃素溶液的配製

溶液的終濃度	20 mM 薑黃素加入的 體積	DMSO 加入的量
0.5 mM	25 μ l	975 μ l
1 mM	50 μ l	950 μ l
2 mM	100 μ l	900 μ l
2.5 mM	125 μ l	875 μ l
3 mM	130 μ l	870 μ l
4 mM	167 μ l	833 μ l

將配製好不同濃度之薑黃素用來進行細胞增生及細胞週期試驗以及利用西方點墨法 (Western blotting) 觀察蛋白質表現等分析。

(二) 細胞培養

A. 培養條件

人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460株 (NCI-H460) 以RPMI1640 培養基添加10%胎牛血清、1% L-glutamine 及1% penicillin streptomycin 之培養液，置於5% CO₂ 及充分溼度下的37 °C的細胞培養箱 (incubator) 中培養，約二天更換一次培養液至細胞長滿。

B. 細胞冷凍保存

NCI-H460細胞株經大量培養後，可利用液態氮冷凍保存，欲冷凍保存之細胞應在生長旺盛且存活率高之狀態下進行。細胞冷凍保存方法為，冷凍前應注意細胞生長情形，並在前一日更換培養基。凍細胞前需先配製冷凍保存溶液：將 DMSO (dimethyl sulfoxide) 加入新鮮培養基中，使其最終濃度為1%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液(約100 μ l)，

計數細胞濃度及凍前存活率。離心後倒掉上清液，加入事前配製好的冷凍保存液，使其細胞數在 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml，混合均勻後置於以標示好名稱、數目及冷凍日期之冷凍管中，1 ml/管。

冷凍保存方法：冷凍管置於 4°C ，10 min \rightarrow -20°C ，30 min \rightarrow -80°C ，16~18 小時 \rightarrow 液態氮槽長期保存。

C. 繼代培養

待細胞長至八分滿時，將培養液取出丟棄，先以PBS (phosphate buffer saline) 清洗細胞1~2 次，再加入3 ml trypsin，置於 37°C 培養箱中處理2 分鐘後，加入乾淨培養液以中和trypsin 之作用，再將瓶中所有液體裝到離心管中以1500 rpm 離心5 分鐘，離心後倒掉上清液，加入20 ml 新鮮培養液，再使用電動吸量管反覆抽吸使均勻混和，取20 μl 之細胞懸浮液加入80 μl trypan blue 溶液，以血球計數盤 (Counting chamber) 計算細胞數目 (死細胞會被trypan blue 染成藍色，而活細胞則不被染色)。

細胞數計算：

χ (為所計數的細胞數) $\times 20$ (20 ml 培養液) $\times 5$ (trypan blue 5倍稀釋) $\times 10^4$ ，依實驗目的不同，計算所需細胞液置於不同培養皿中。

D. 藥物處理

重新繼代的細胞經24 小時培養後，待貼壁細胞貼覆瓶底後，依實驗所需不同的時間長短選擇是否加藥前置換培養液，若24 小時內可不需置換培養液，若超過48 小時則先置換培養液再加入藥物處理。microplate 每well 加入培養液體積2 ml，則加20 μl 藥物；3 ml，則加30 μl ，則藥物濃度被稀釋100 倍為最終濃度。

(三) 流式細胞儀分析測定

流式細胞儀廣泛的應用於癌細胞臨床樣品檢測當中，是腫瘤生物學研究的重要工具之一，為癌細胞的早期的藥效評估提供重要資訊。流式細胞分析技術的發展提供一快速檢測且可靠的方法定量細胞懸浮液，若配合適當的染劑，則可以對藥物處理細胞後做不同的效果評估，具有準確及快速的優點。

A. 細胞存活率測定

Propidium iodine (PI) 是一種核酸染劑，當細胞死亡時會進行壞死或細胞凋亡的路徑，死亡的細胞膜會失去完整性，使得PI 可進入細胞內與核酸結合，PI 會與DNA 雙股螺旋中之A=T、C≡G鍵結的氫鍵 (hydro bond) 接在一起；存活的細胞因其細胞膜完整PI 無法和細胞內的核酸結合，經PI 染色完成的細胞可由流式細胞儀於488 nm 的雷射光激發後死亡的細胞會呈現較強紅色螢光，存活細胞會成較弱的紅色螢光以CellQuest 軟體分析細胞存活率 (Yeh et al. 1981; Holmes et al. 2002)。也可以併入其他實驗 (如：與FITC 標記之annexin V 共同偵測，以區別存活壞死或凋亡細胞) 或者與其他染劑共同使用，評估細胞存活狀態。

【實驗步驟】

將NCI-H460 細胞依照 2×10^5 cells /well 種植於 12-well 培養皿中，經過24 小時靜置培養後，待細胞貼附後加入不同濃度的curcumin(0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 mM)，分別持續培養24及48 小時後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin 處理，置於37°C 培養箱中處理2 分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin 之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 離心5 分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心5 分鐘，去除上清液，加入PI 染劑350 μ l(350~550 μ l，可依照細胞數做調整)，均勻混合後，transfer至FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析，固定秒數及流數，紀錄細胞增殖率gate%存活百分比。

B. 細胞週期分析

PI 可專一的鍵結的核酸而廣泛的應用於流式細胞儀技術中，正常情況下細胞膜維持完整PI 無法穿透細胞之細胞膜，故若以酒精將細胞膜打洞固定後，進入細胞內之PI 可與核酸進行鍵結，利用流式細胞儀 (Flow cytometry; FACS) 偵測PI 所貢獻之螢光，則可以反應細胞內之DNA 狀態或進行細胞週期分析 (Darzynkiewicz et al. 1992)。

【實驗步驟】

將細胞依照 2×10^5 cells /well 種植於 12-well 培養皿中，經過24 小時靜置培養後，待細胞貼附後加入不同濃度的curcumin (0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 mM)，分別培養24及48小時後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin 處理，置於37 °C 培養箱中處理2 分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS 以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 5 分鐘的離心 (重複此步驟一次)，去除上清液，置於震盪器輕輕震盪再加入70% EtOH/PBS，一滴一滴滴入離心管中以固定細胞，使細胞完全均勻分散於70% EtOH/PBS 中，靜置-20 °C至少一小時，取出細胞後離心 (1500 rpm 5 分鐘)，倒掉上清液加入PBS 3 ml清洗細胞，離心去除上清液，加入cycle PI 染劑350 μ l，將細胞團打散，避光30 分鐘，以流式細胞儀行樣品分析，所得之結果以Modfit LT 軟體分析。

C. 粒腺體膜電位之檢測

細胞膜電位探針，DioC6 (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) 是一種可穿透細胞膜，可專一性的結合並累積在細胞粒腺體中，DioC6在細胞內外的分佈可反應出細胞膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可顯示細胞膜電位改變的情形，可發射出綠色螢光 (green-fluorescent) 之陽離子 (cationic dye) 親脂性染劑；在不需要固定細胞或其他處理的情況下可以即時、快速

的偵測活細胞內粒腺體膜電位。粒腺體膜功能不良 (mitochondrial dysfunction) 通常伴隨早期細胞凋亡發生，而細胞粒腺體膜電位的改變也因此當作早期凋亡偵測上的指標 (Rottenberg et al. 1998)。

【實驗步驟】

將細胞依照 2×10^5 cells /well 種植於 12-well 培養皿中，經過24小時靜置培養後，待細胞貼附後加入2.5 mM curcumin, 20 μ l/well 到 12 well plate 當中 (最終濃度為 25 μ M)，經不同時間培養 (1、3、6、12及24 h) 後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin處理，置於37°C 培養箱中處理2分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS清洗細胞，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，取MMP ($\Delta\Psi_m$) 染劑 (10 μ l DioC6/500 μ l PBS) DioC6 (3,3'-Dihexyloxacarbo-cyanine iodide) 染劑每管加入500 μ l，需有一管blank不加藥也不加染劑，於37°C 培養箱避光培養30 min後，transfer至FACS管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000顆細胞以CellQuest軟體分析。將blank 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1 gated約75% peak，以上sample上機後，分析MMP (peak往右不產生細胞凋亡，往左產生細胞凋亡)。

D. 活性氧化物產生之檢測

免疫細胞進行需氧性滅菌過程中，會在細胞內啟動一連串的氧化還原反應，因而產生一些氧化代謝物，如 H_2O_2 ， $\cdot O_2^-$ 自由基。藉由 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($H_2DCF-DA$) 對細胞進行染色，再以產生的螢光來測量ROS 的產生。 $H_2DCF-DA$ 是一種具有螢光性質，可滲透細胞膜特異性的追蹤評估ROS 的產生。 $H_2DCF-DA$ 會被細胞內的乙醯酯

酶 (esterases) 去乙酰化 (deacetylated) 成非螢光性的DCFH，DCFH 會在細胞內被H₂O₂氧化成螢光性質的DCF，並聚集在粒腺體中，所發散螢光則可反映出細胞內H₂O₂的濃度 (Guthrie et al. 2006)。

【實驗步驟】

將細胞依照 2×10^5 cells /well種植於 12-well 培養皿中，經過24小時靜置培養後，待細胞貼附後加入2.5 mM curcumin，20 μ l/well到12 well plate當中(最終濃度為 25 μ M)，經不同時間培養 (1, 3, 6, 12, 及 24 h) 後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin處理，置於37°C培養箱中處理2分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS清洗細胞，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，取ROS染劑H₂DCF-DA染劑 (1 μ l H₂DCF-DA /500 μ l PBS) 每管加入500 μ l，需有一管 blank不加藥也不加染劑，只加入500 μ l PBS，在置於37°C培養箱避光培養30 min後，transfer至FACS管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000顆細胞以CellQuest軟體分析。將blank 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control 調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1 gated約75% 以上，sample上機後，分析ROS (peak 往右是產生自由基，往左是抗氧化)。

E. 鈣離子釋出之檢測

胞內鈣離子作為細胞信號傳遞的信差，是細胞激活過程中重要的功能參數。螢光染劑 (如Fura-Red、Fluo-3和Indo-1等) 通過乙酰甲酯

(Acetatoxymethyl Ester; AE) 導入細胞後，Fluo-3/AM會與鈣離子特異性結合。這些螢光染劑的結構式，一般與EDTA相似，可螯合鈣離子，螯合鈣離子之螢光染劑會有光學特性上的改變，在 (紫外光) UV 的激發下，Fluo-3/AM 放出光 (emission) 的強度會隨著細胞內鈣離子濃度的改變，

而發散出不同強度的螢光，故可用比例法測得或直接測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值，實際濃度需經校對後獲得 (Rijkers et al. 1990)。

【實驗步驟】

將細胞依照 2×10^5 cells /well 種植於12 well 培養皿中，經過24小時靜置培養後，待細胞貼附後加入 2.5 mM curcumin，20 μ l/well 到12 well plate 當中（最終濃度為 25 μ M），經不同時間培養（1, 3, 6, 12, 及 24 h）後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin 處理，置於37°C 培養箱中處理2分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS清洗細胞，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，取Fluo-3/AM 染劑每管加入1000 μ l，需有一管blank不加藥也不加染劑，只加入1000 μ l PBS，在置於37°C 培養箱避光培養1h，每10 min上下混合一次，1h後加入PBS洗2次，1500 rpm離心5 min，倒掉上清液，每管加入400 μ l PBS，再transfer至FACS管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000顆細胞以CellQuest軟體分析。將blank 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，M1 gated約0%，以上sample上機後，分析calcium release (peak往右為鈣離子釋出)。

F. Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性分析

利用PhiPhiLux-G1D1 kit 來檢測凋亡細胞caspase-3、caspase-8、caspase-9 之產生，PhiPhiLux- G1D1 kit 基質是種含有螢光物質之胺基酸序列（amino acid sequence），而活化之caspase-3、caspase-8、caspase-9 可以裂解胺基酸序列之特定位置，而是螢光物質釋放出來，再經由流式細胞儀分析，可得知若螢光產量越多則產生活性之caspase-3、caspase-8、caspase-9 越多(Kohler et al. 2002)。

【實驗步驟】

將細胞種植於細胞依照 2×10^5 cells /well 種植於12 well 培養皿中，經過24小時靜置培養後，待細胞貼附後，加入2.5 mM curcumin 20 μ l/well 到12 well plate 當中（最終濃度為25 μ M），經不同時間培養（0, 6, 12, 及 24 h）後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以 trypsin 處理，置於37°C 培養箱中處理2 分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS 以中和trypsin 之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 離心5 分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心5 分鐘，去除上清液，取10 μ M substrate（Phiphilux green for caspase-3）（Phiphilux red for mitochondria）每管加入25 μ l，在置於37°C 培養箱避光培養1 h，1 h 後加入1 ml PBS 洗1 次，1500 rpm 離心5min，倒掉上清液，每管加入500 μ l PBS，再transfer 至FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000 顆

細胞以CellQuest 軟體分析。將blank 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間control調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1 gated 約75%，以上sample上機後，分析caspase-3 活性（peak 往右為caspase-3 產生）。

G. 加入Caspase 8 與 ROS 抑制劑的效果

NCI-H460 細胞在尚未與 25 μ M curcumin 作用前三小時先以 20 μ M 的 caspase 8 抑制劑：z-IETD-fmk 作用。然後再比較有否 caspase 8 抑制劑對 caspase 8 活性與細胞存活率的差別（測量的方法已詳述於前）。另在 NCI-H460 細胞在尚未與 25 μ M curcumin 作用前三小時先以 15 mM 的 ROS 抑制劑：N-acetyl-cysteine (NAC)作用。然後再比較有否 NAC 對 ROS 產量與細胞存活率的差別（測量的方法已詳述於前）。

(四) 免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡顯像

將NCI-H460 細胞依照 5×10^4 cells /well 種植於 4 well 培養皿中，經過 24 小時靜置培養後，待細胞貼附後，加入最終濃度為 25 μ M 的 curcumin 作用 24 小時後，以 4% formaldehyde in PBS 固定 15 分鐘，並以 0.3% Triton-X 100 in PBS 穿透一小時，最後再以 2% BSA 阻絕非特異的結合。接著玻片與對抗人類 endo G, 細胞凋亡 inducing factor (AIF), cytochrome c, growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 (GADD153) 及 glucose-regulated protein (GRP)-78 等抗體作用（稀釋 100 倍，Santa Cruz）到次日。再加入稀釋 100 倍的二級抗體（接合著 FITC 螢光的山羊對抗老鼠 IgG 抗體，Santa Cruz）。細胞的 DNA 以 PI 染色。影像採用萊卡 TCS SP2 共軛焦顯微鏡觀察、攝影 (Suzuki et al. 1997)。

(五) 西方點墨法 (Western blotting)

【抽取細胞蛋白質】

將NCI-H460 細胞依照 2×10^5 cells /well 種植於 12 well 培養皿中，經過 24 小時靜置培養後，待細胞貼附後，加入 2.5 mM curcumin, 20 μ l/well 到 12 well plate 當中（最終濃度為 25 μ M），經不同時間培養（6, 12, 24 及 48 h）後收細胞，將上層液移至離心管中，加入 PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以 trypsin 處理，置於 37°C 培養箱中處理 2 分鐘後，將細胞打下來，加入 1 ml PBS 以中和 trypsin 之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，再加入 1 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心 5 分鐘，取出上清液即含細胞蛋白質 (Hayes et al. 1989)。

【轉漬步驟】

先將 PVDF membrane 裁剪好，再以 methanol 短暫濕潤後，再浸入轉印緩衝液（transfer buffer）中，接著將裁好的濾紙先浸泡在 transfer buffer 中備用，

將轉漬夾打開後，黑色面朝下，將海綿墊片先以transfer buffer潤濕並鋪在黑夾上，再將3M濾紙鋪上，接下來裁剪下層膠（separation gel）中所要轉漬的區域後，將SDS-PAGE gel小心的鋪於3M濾紙上，可在濾紙上加入多量的transfer buffer，再鋪上SDS-PAGE gel時勿陷入任何氣泡，再依序放上PVDF membrane，同樣避免氣泡產生，及3M濾紙，最後再放上一片海綿墊片，即可把整個轉漬夾裝好，形成似三明治夾層狀之構造。置入已裝有transfer buffer的電泳槽中將黑夾朝負極，紅夾朝正極，電泳槽外圍放置足夠冰塊，使整各系統維持低溫狀態。以400 mA、2小時的條件下進行蛋白質轉漬步驟。轉印完成後取出轉印膜裁去多餘部分，轉印膜後以0.05% tween 20/1X PBS 清洗10分鐘共3次。緊接將轉印膜以2% FBS（溶於0.05% tween 20/1X PBS 中）進行blocking 步驟，以室溫1小時為條件進行。取出轉印膜後於小盒中以0.05% tween 20/1X PBS 清洗10分鐘共3次。倒掉清洗液，加入8 ml的一級抗體（溶於新鮮配製之blocking solution中，稀釋倍數依不同抗體有所不同），4℃隔夜進行搖盪。隔天取出，回收一級抗體，以0.05% Tween 20/1X PBS 清洗轉印膜10分鐘共3次。加入8ml稀釋10000倍的goat anti IgG (HRP) horseradish peroxidaseconjugated antibody 二級抗體（溶於含2% FBS的0.05% Tween 20/1X PBS中），於室溫下搖盪進行1小時，最後取出轉印膜後以0.05% Tween 20/1X PBS 洗清洗10分鐘共3次。

【壓片步驟】（暗房中進行）

將轉印膜浸泡於ECL 試劑之混合液（每瓶各取1.5 ml等比例混合）中1分鐘反應。以兩張投影片黏貼固定於cassette 內，轉印膜並正面朝上放置於壓片卡匣（cassette）兩張投影片中間，以Hyperfilm 軟片置於上層投影片上，對準轉印膜進行壓片，感光時間依轉印膜上螢光亮度決定時間長短，約5 秒至1 小時不等。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)，再以清水沖洗30秒後放入定影劑中，過30 秒後再以清水沖洗30 秒。

(六) Real Time PCR 分析 AIF、caspase 3、8、9 以及endo G 的mRNA 轉錄表現量

在本次實驗，real-time PCR 用於檢測五個目的基因在不同細胞的cDNA 中含量差別(即mRNA 含量，倍數關係)。

表 2.2 PCR 所使用的引子及其核酸序列	
引子名稱	引子的核酸序列
homo caspase3-F	CAGTGGAGGCCGACTTCTTG
homo caspase3-R	TGGCACAAAGCGACTGGAT
homo caspase8-F	GGATGGCCACTGTGAATAACTG
homo caspase8-R	TCGAGGACATCGCTCTCTCA
homo caspase9-F	TGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTT
homo caspase9-R	GTGAGCCCACTGCTCAAAGAT
homo AIF-F	GGGAGGACTACGGCAAAGGT
homo AIF-R	CTTCCTTGCTATTGGCATTTCG
homo EndoG-F	GTACCAGGTCATCGGCAAGAA
homo EndoG-R	CGTAGGTGCGGAGCTCAATT

每一檢測都重複兩次以確定其「可重複性」

cDNA 的製備：培養細胞，裂解細胞， Trizol 法抽提RNA，反轉錄。然後，救用Real-time PCR去檢測五個目的基因(AIF, caspase -3, -8 and -9 以及endo G) 的量。本實驗中用薑黃素25 μ M 處理NCI-H460 細胞經過24,48小時後，以Qiagen RNeasy Mini Kit 萃取出全部RNA。RNA 反式轉錄樣品是用高容量的 cDNA反式轉譯 kit 根據標準程式處理42 $^{\circ}$ C 溫度30分鐘後，Quantitative PCR 緊接著執行以下的處理：50 $^{\circ}$ C的溫度2分鐘、95 $^{\circ}$ C的溫度

10分鐘，以95°C,15秒，共40個循環。用cDNA 反式轉錄kit 1μl 60°C的溫度1分鐘，2X SYBR Green PCR主要混合螢光染料(Applied Biosystems)，和200 nM的正向與反向引子(表2.2)，每一個分析是應用生物系統公司的7300 Real-Time PCR系統可得到三倍的表達折疊改變後可由comparative C_T method處理取得所需的 mRNA 序列的資料 (Kubista et al. 2006)。

第三節 統計方法

實驗結果以平均值標準差 (mean ± SD) 表示，使用Unpaired Student's t-test 來決定實驗組與對照組之差異。*表示 $p < 0.05$ ，表示統計上具顯著差異。** 表 $p < 0.01$;***表 $p < 0.001$ 。



第三章 研究結果

第一節 描述性統計分析

一、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞株NCI-H460的增生抑制與細胞形態改變

利用流式細胞計數儀(flow cytometry)評估細胞存活率，結果發現加入不同濃度的薑黃素之後，細胞的存活率隨著藥物濃度的上升而下降。圖3.1、3.2 分別表示薑黃素作用24 與 48 小時所呈現的細胞存活率變化圖。

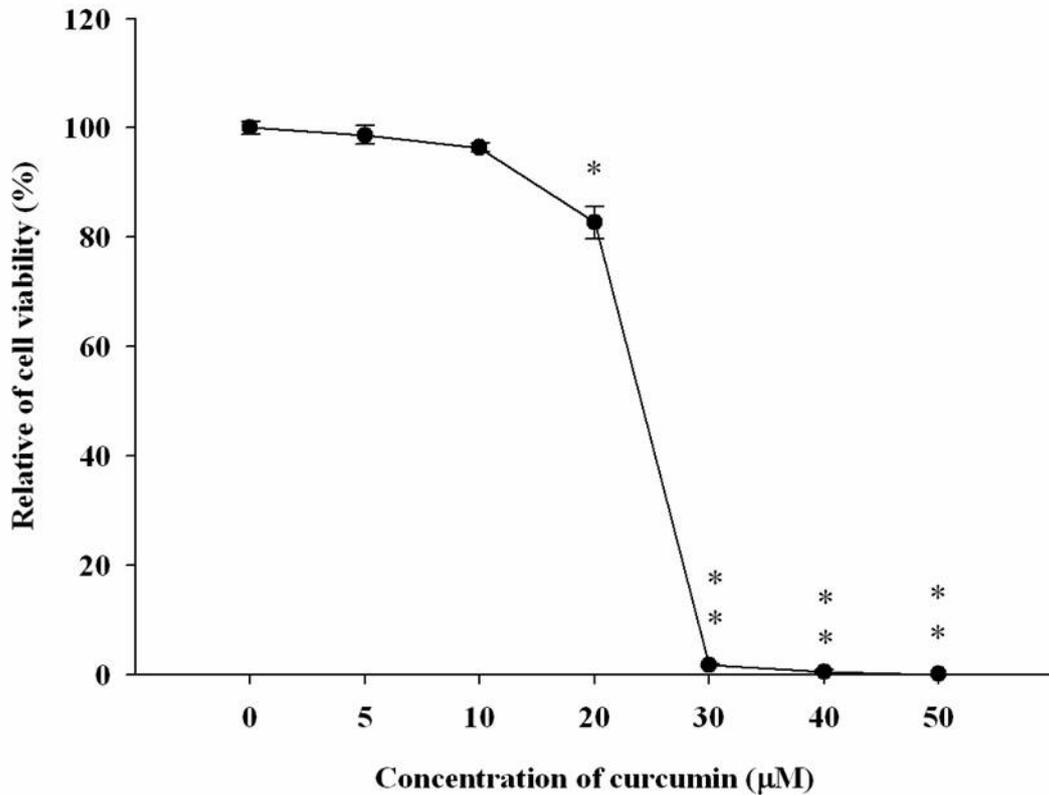


圖3.1 不同濃度之薑黃素處理 NCI-H460 細胞24小時後的細胞存活率。數據結果以 mean ± SD 值表示 (* p < 0.05, ** p < 0.01) (n=3)。

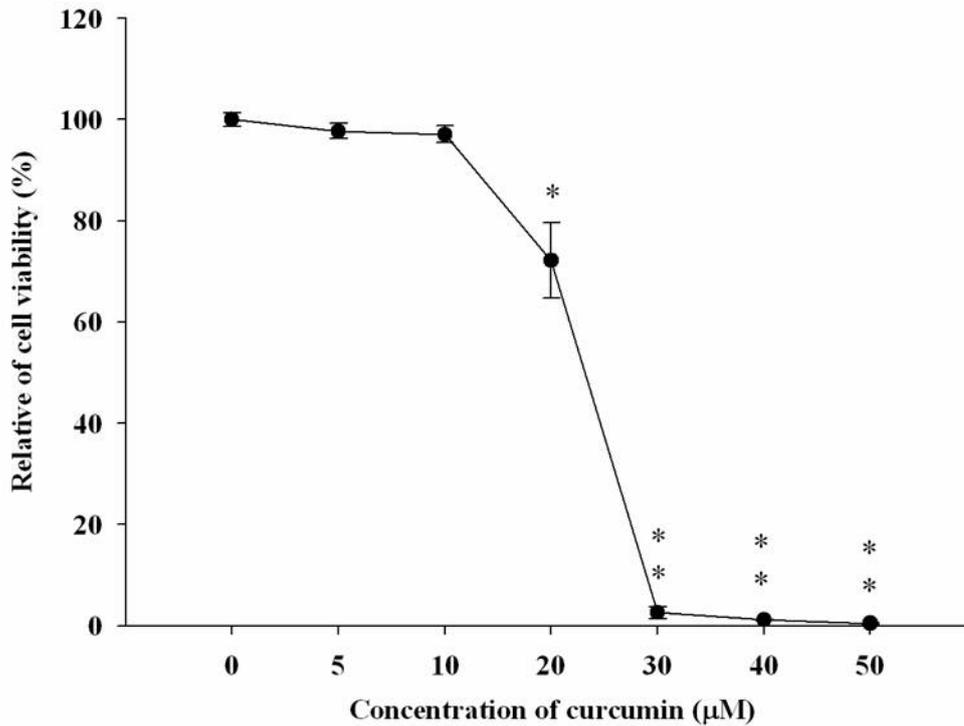


圖3.2 不同濃度之薑黃素處理 NCI-H460 細胞48小時後的細胞存活率。數據結果以 mean±SD 值表示 (* p< 0.05, ** p< 0.01) (n=3)。

可以發現大細胞肺癌細胞 NCI-H460 在薑黃素濃度超過 20 μM後，其存活率乃急速下降。但若將圖3.1與圖3.2 重疊起來，二者的存活率曲線十分相近。顯示薑黃素作用24或48小時對NCI-H460細胞的毒殺效果是類似的（圖3.3）。利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的形態，加入不同濃度的薑黃素處理24小時後，發現隨著薑黃素的濃度增加，NCI-H460細胞數目明顯下降，且有細胞形態不完整、細胞膜皺縮、與空泡化的現象（如圖3.4）。當薑黃素的作用時間為48小時，NCI-H460細胞的外形也出現類似的變化（圖3.5）。

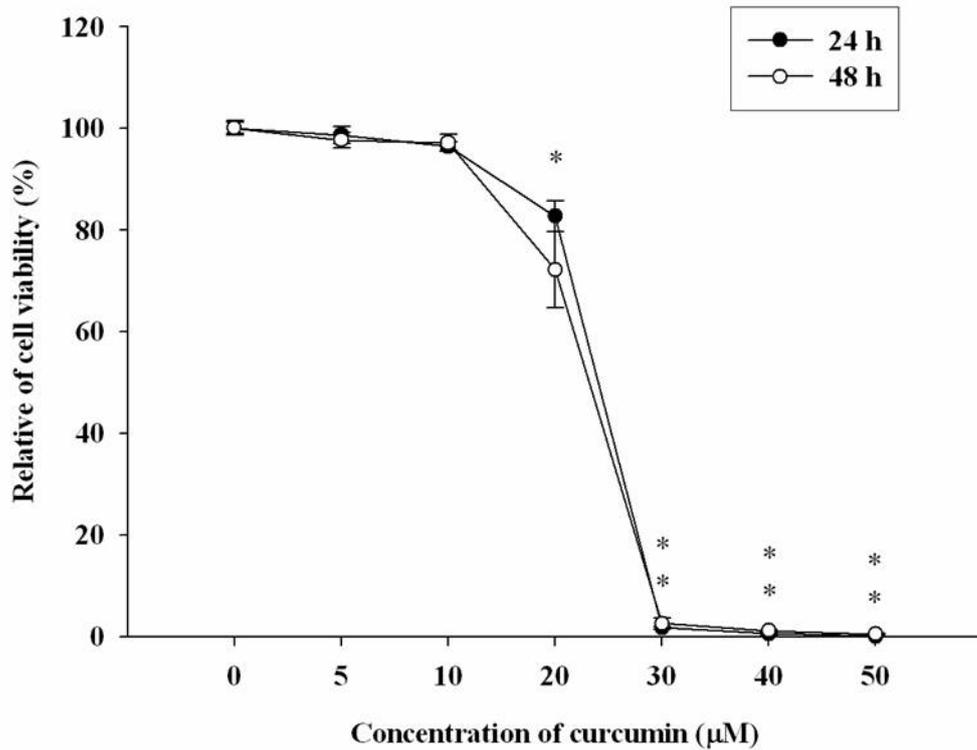


圖3.3.薑黃素作用24與48小時對NCI-H460細胞的毒殺效果重疊作圖。二者曲線十分相似。

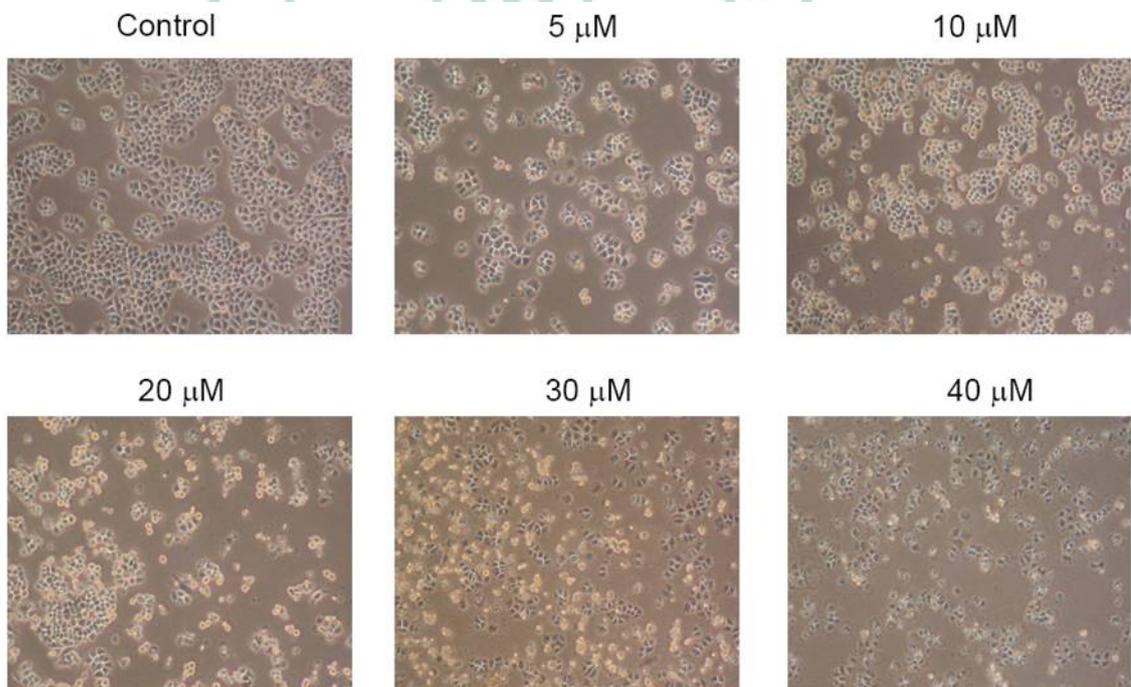


圖3.4 薑黃素處理 24 小時後細胞的形態的改變。以倒立式相位差顯微鏡觀察發現隨著藥物濃度的上升，NCI-H460 細胞數目有明顯下降的趨勢，且有細胞形態不完整、細胞膜皺縮與細胞空泡化的現象。放大倍率200 X。

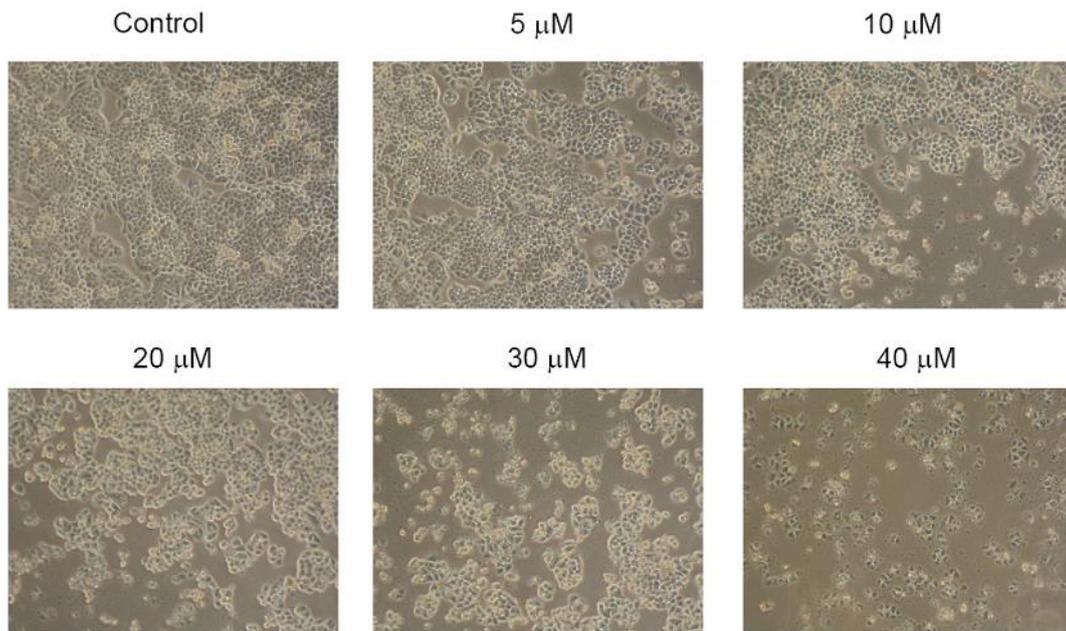


圖3.5 薑黃素處理48小時後細胞的形態的改變。以倒立式相位差顯微鏡觀察發現隨著藥物濃度的上升，NCI-H460 細胞數目有明顯下降的趨勢，且有細胞形態不完整、細胞膜皺縮與細胞空泡化的現象，放大倍率200 X。

二、 薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460細胞週期的影響

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的薑黃素處理24及48小時後，加入PI，並觀察其細胞週期的改變。結果在某些濃度下，G2/M 期之細胞比例有顯著的上升，由此可知，薑黃素可以使人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 的細胞週期在G2/M 期停滯 (G2/M arrest)。而且當薑黃素濃度高於20 μM ，sub-G₁ peak 所佔比例顯著升高，代表了細胞凋亡的比例增加（如圖3.6、圖3.7）。

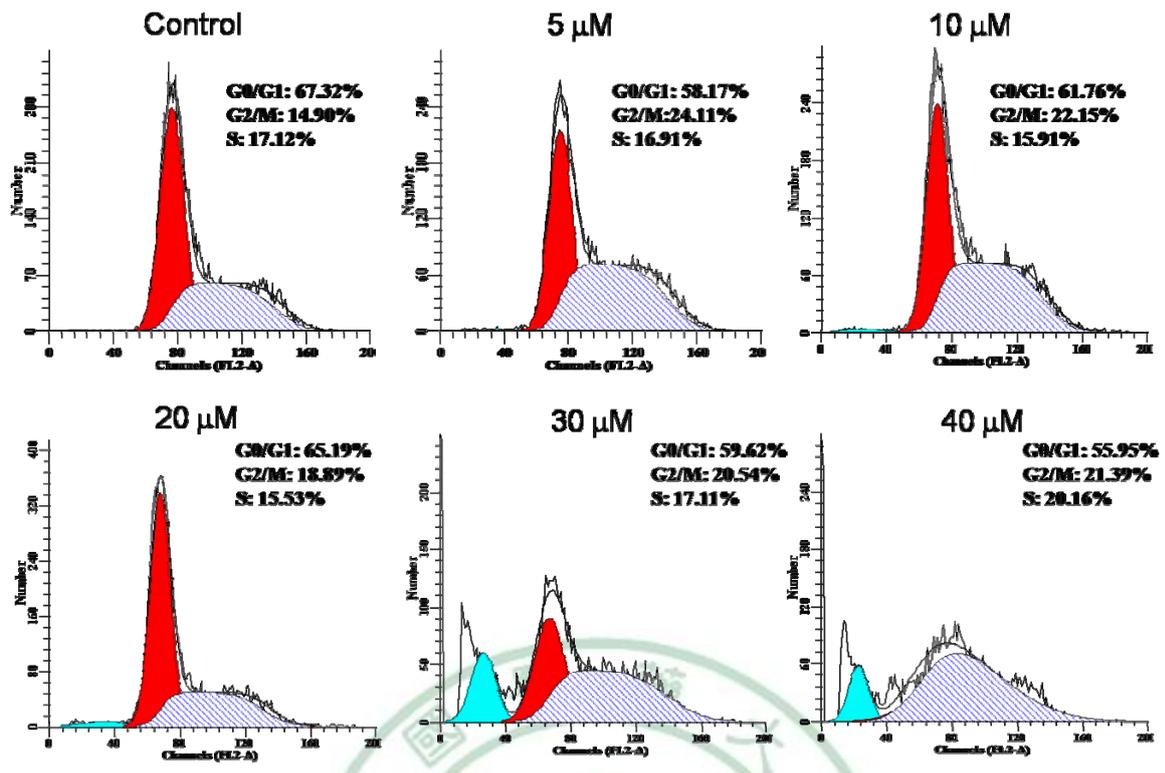


圖 3.6B

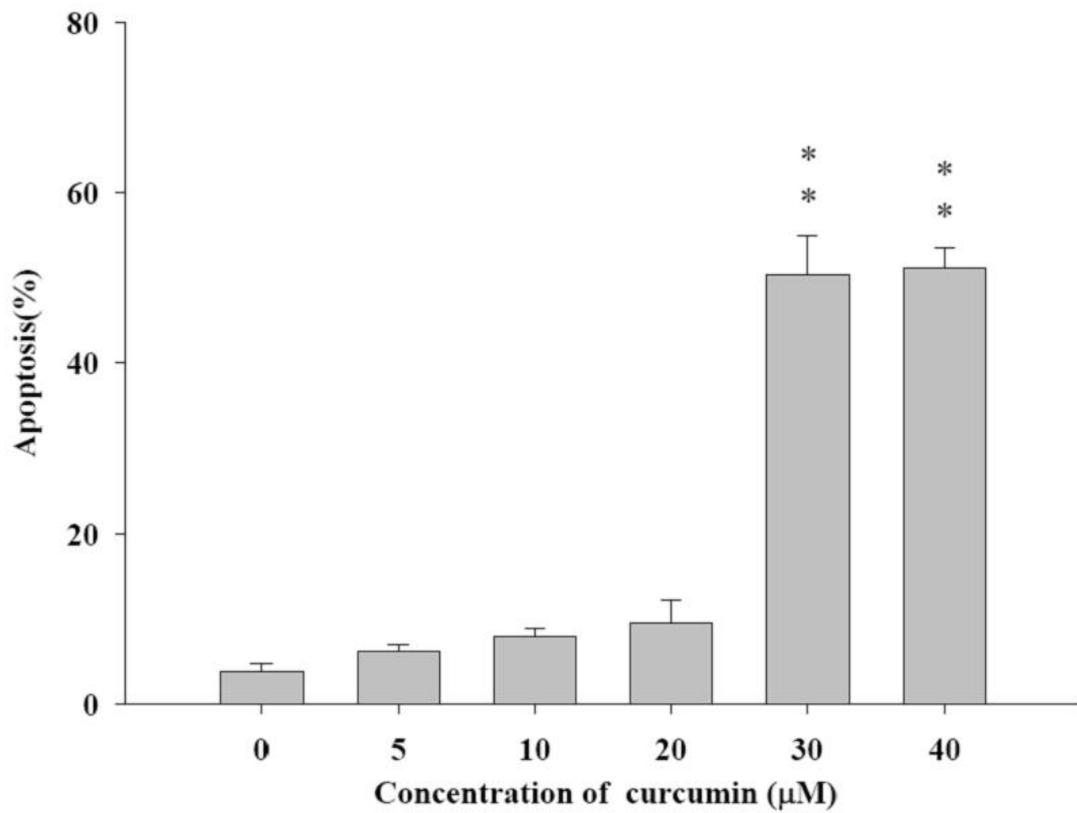


圖 3.6C

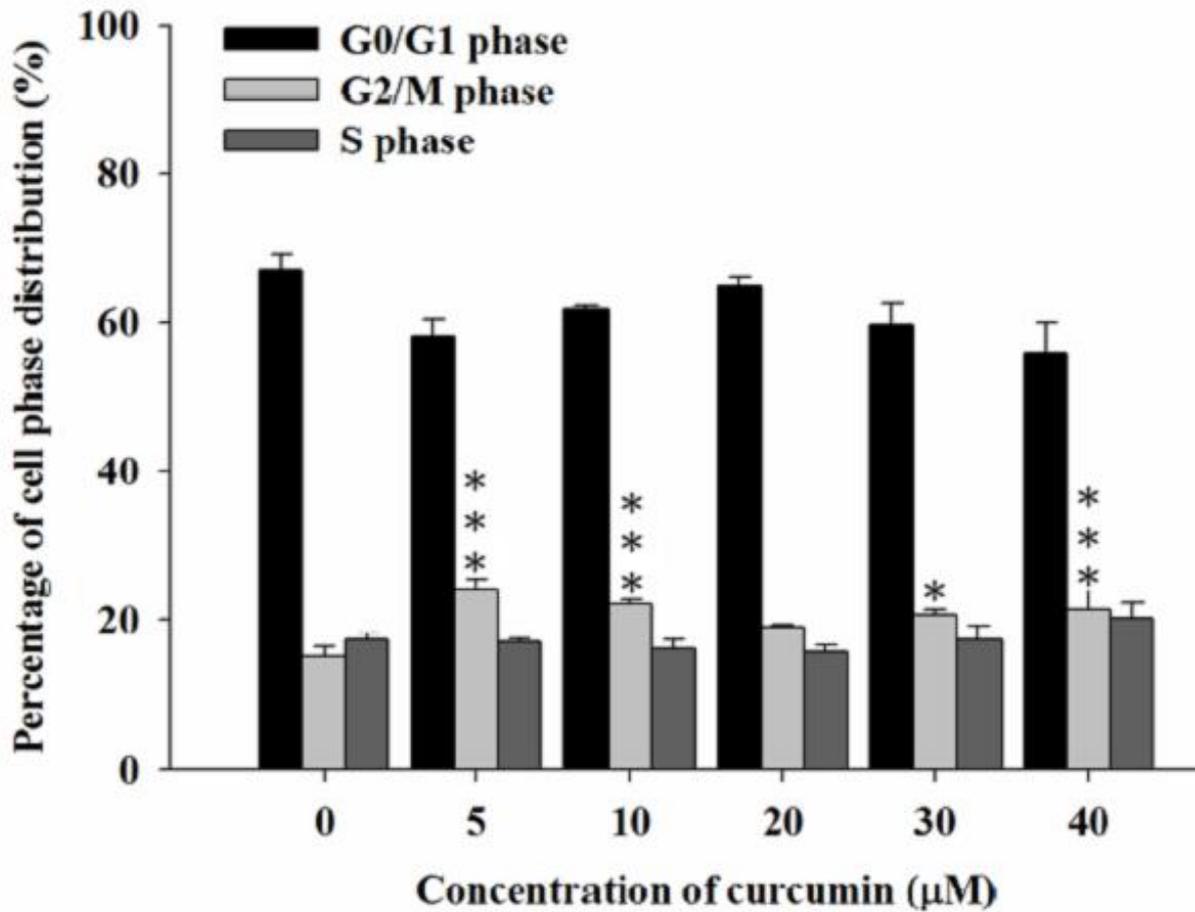


圖3.6 不同濃度之薑黃素作用24小時對NCI-H460細胞細胞週期分佈影響。數據結果以mean ± SD 值表示，A：流式細胞儀圖；B：Sub-G1 peak（代表apoptosis）所佔的比例；C：長條圖顯示部分濃度的curcumin會導致G2/M arrest。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ）。（n=3）

圖3.7A

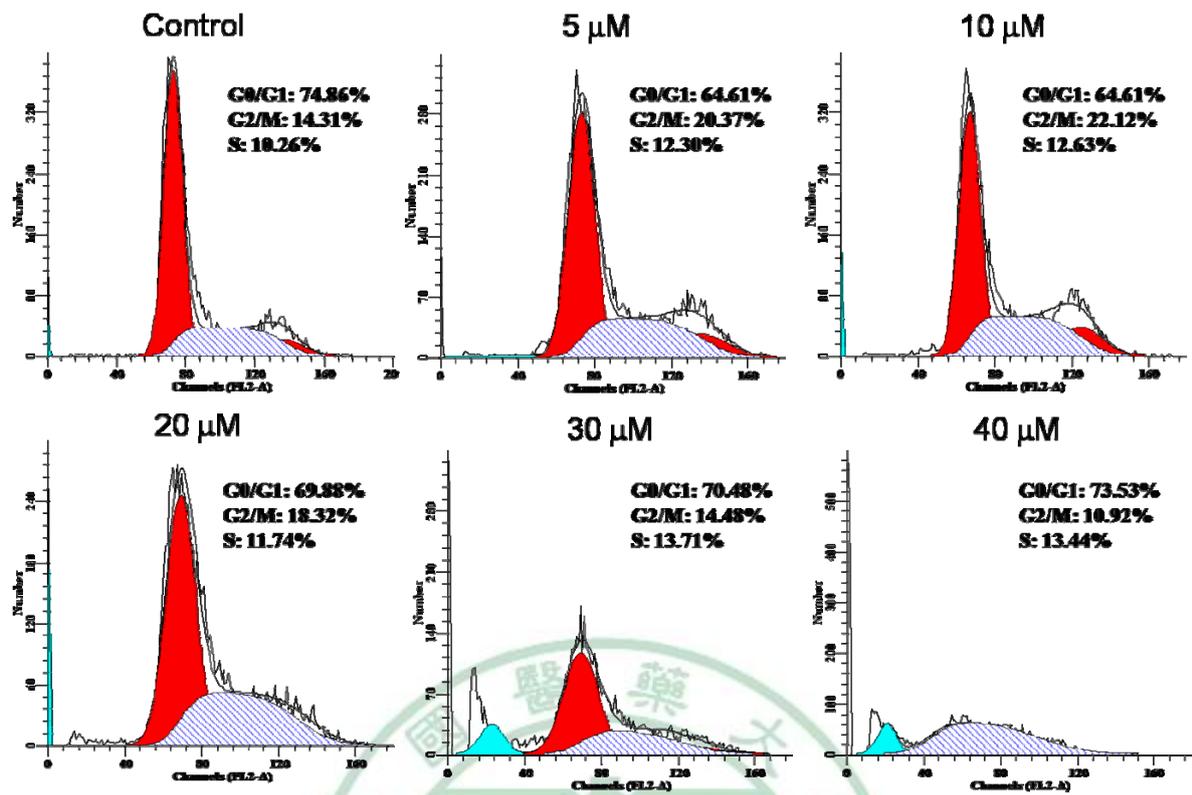


圖 3.7B

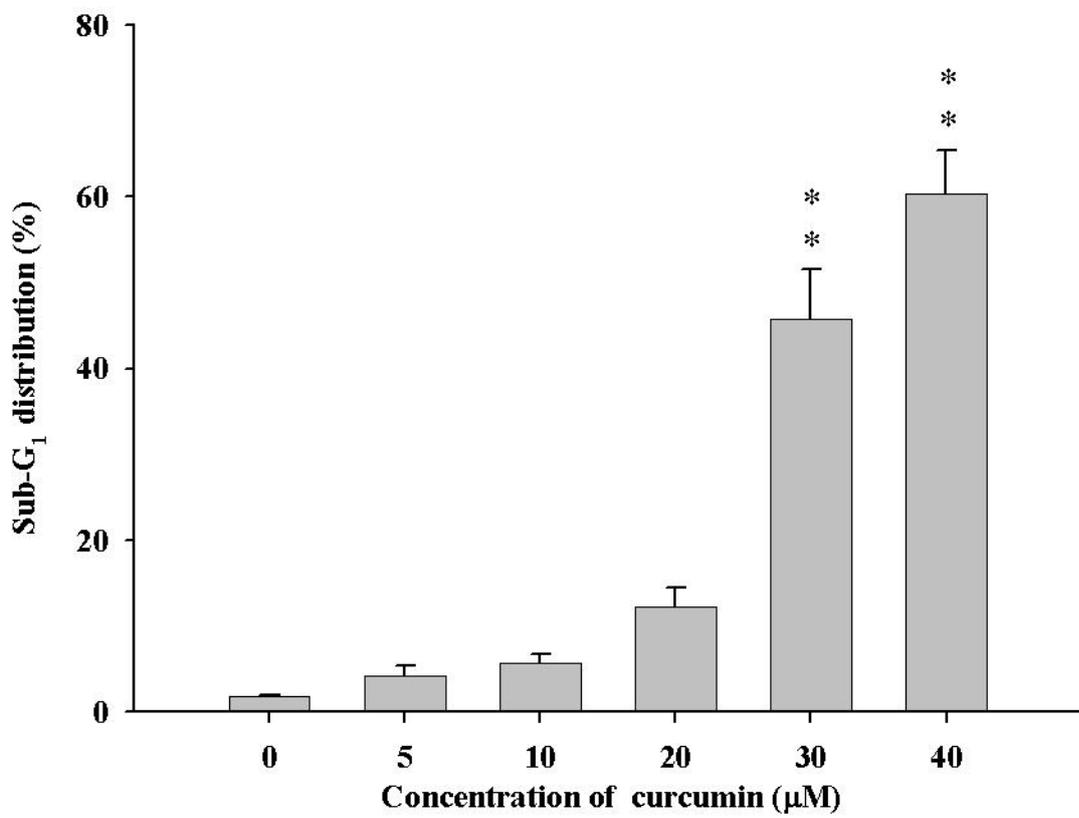


圖3.7C

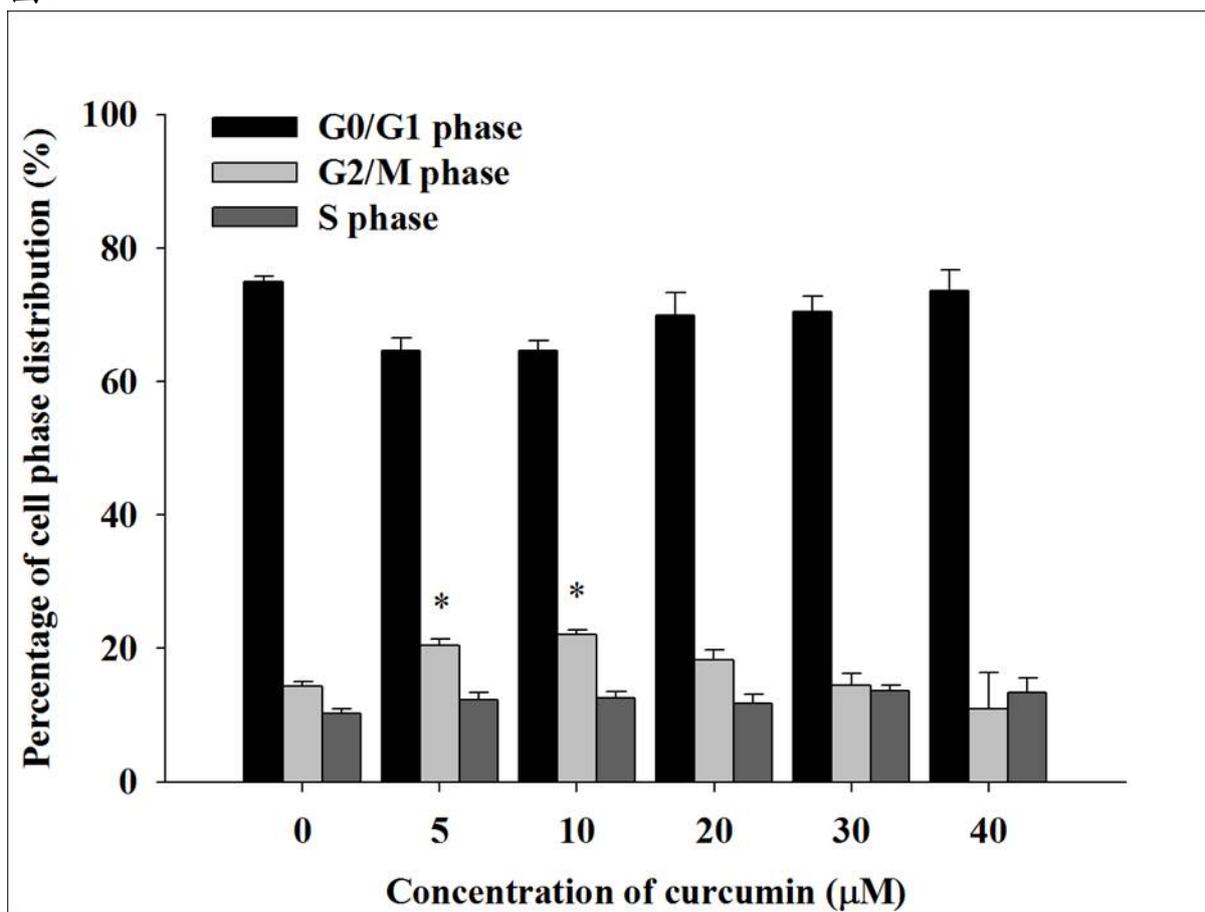


圖3.7 不同濃度之薑黃素作用48小時對NCI-H460細胞細胞週期分佈影響。數據結果以mean ± SD 值表示，A：流式細胞儀圖；B：Sub-G1 peak（代表細胞凋亡）所佔的比例；C：長條圖顯示部分濃度的curcumin會導致G2/M arrest。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ）。(n=3)

三、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 產生活性氧化物的改變

活性氧化物（reactive oxygen species；ROS）在誘導細胞凋亡

當中扮演一個重要的角色。粒線體是ROS產生的主要位置而這又和細胞的死亡有關。粒線體中ROS的大量產生（ROS burst）會造成粒線體的功能不良（mitochondrial dysfunction）。為了檢測薑黃素誘導之細胞凋亡是否和ROS的產生有關，在此利用流式細胞儀分析細胞中ROS的產生。利用流式細胞計數儀評估濃度25 μM的薑黃素處理不同時間1、3、6、12、24小時，再加入H₂DCFDA，並觀察其產生活性氧化物的情形。結果發現因著薑黃素的作用，流式細胞儀曲線有右移的趨勢（圖3.8），表示薑黃素作用作用導

致活性氧化物 ROS產量增多。

圖3.8A

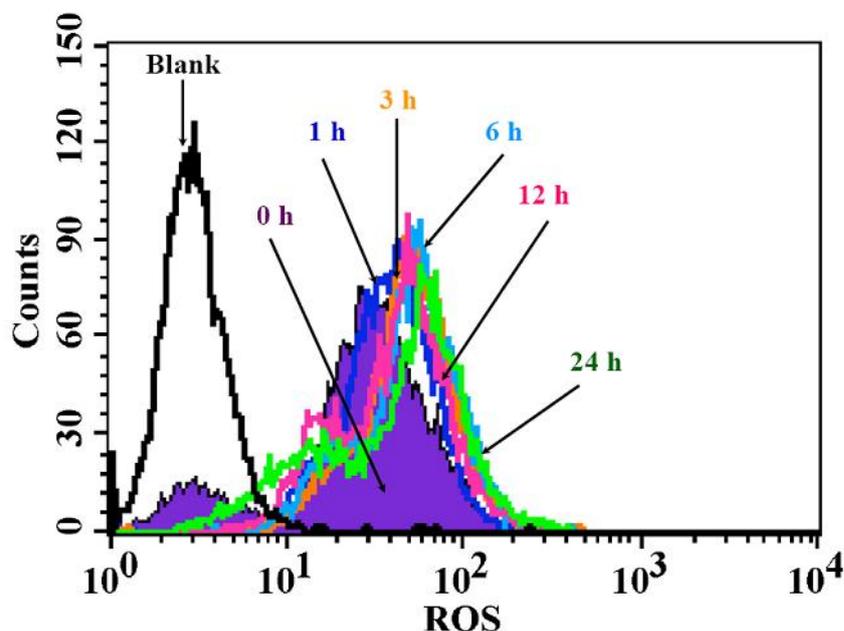


圖3.8B

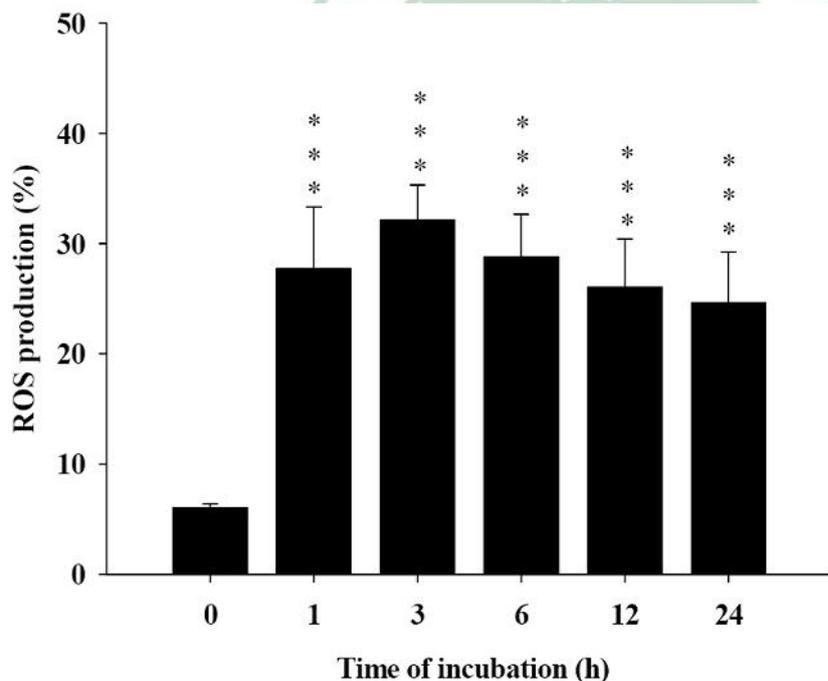


圖3.8 25 μ M薑黃素作用不同作用時間所造成的 NCI-H460 細胞之 ROS 產量變化。結果發現流式細胞計數儀曲線因著薑黃素的作用有右移的趨勢(圖A)，表示薑黃素可導致活性氧化物 ROS 產生增多(圖B)。(n=3)

四、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 粒腺體膜電位的影響

利用流式細胞計數儀評估濃度25 μ M的薑黃素分別處理1、3、6、12及24 小時之後，加入DioC6，並觀察其產生膜電位變動的情形。結果顯示：

薑黃素作用後，流式細胞儀曲線地有左移的趨勢，表示細胞粒線體膜電位差的降低（Mitochondria depolarization），進而誘導細胞凋亡的發生（圖 3.9）。

圖3.9A

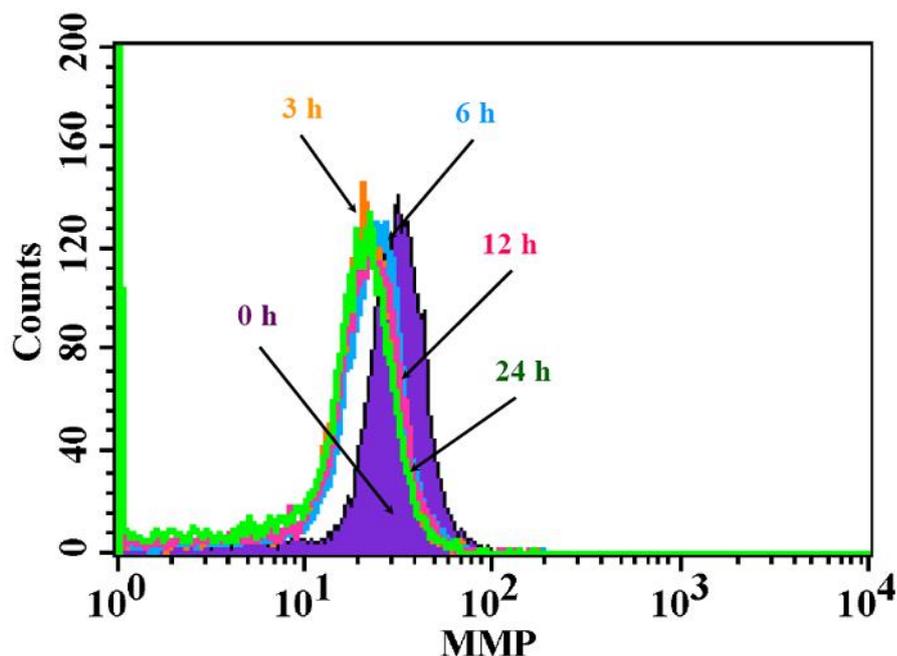


圖3.9B

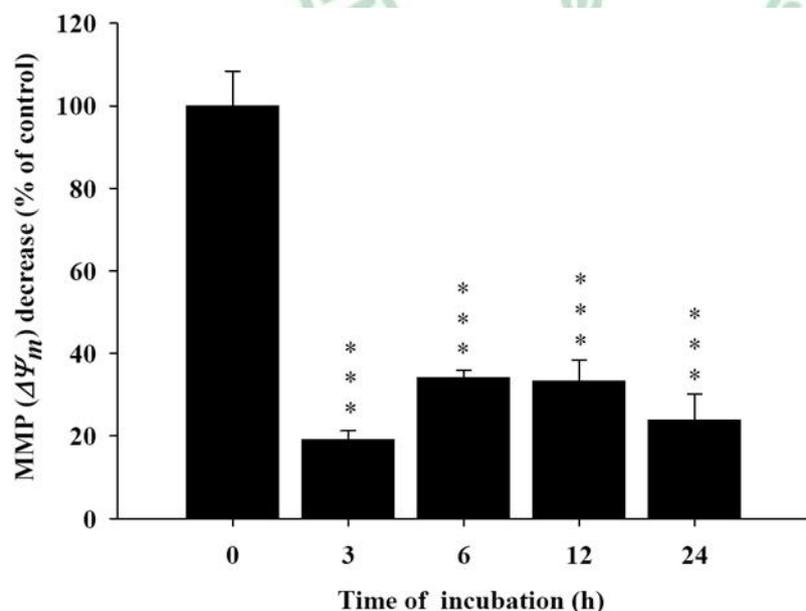


圖3.9 25 μM 薑黃素作用不同作用時間所造成的 NCI-H460 細胞之粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 變化。A：流式細胞儀圖。B：長條量化圖。結果顯示：薑黃素作用後，粒腺體膜電位差數值明顯下降。數據結果以 mean \pm SD 值表示 (***) $p < 0.001$ 。(n=3)

五、薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460之鈣離子釋出影響

已知內質網中鈣離子釋出會造成粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 之下降，前述結果得知粒線體膜電位在24小時內即有下降之現象發生，為探討先前發現之粒線體膜電位在短時間即下降之原因，在此以Fluo-3/AM 會特異性的和鈣離子結合之特性，利用流式細胞儀分析鈣離子的釋出，Fluo-3/AM會與鈣離子特異性結合，螯合鈣離子之螢光染劑會有光學特性上的改變，在（紫外光）UV 的激發下，Fluo-3/AM 放出光（emission）的強度會隨著細胞內鈣離子濃度的改變，而發散出不同強度的螢光，故可用比例法測得或直接測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值，實際濃度需經校對後獲得。利用流式細胞計數儀評估濃度25 μM 的薑黃素分別處理1、3、6、12及24 小時之後，加入Fluo-3/AM，並觀察其產生鈣離子的情形。結果發現薑黃素作用後，流式細胞儀圖曲線向右偏移，表示薑黃素會促使細胞內鈣離子濃度增加（如圖3.10）。

圖3.10A

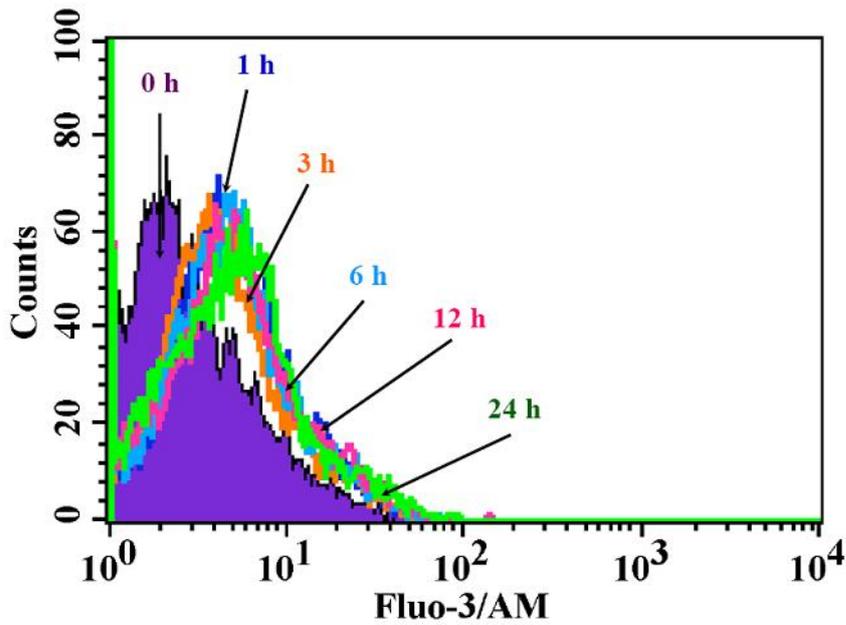


圖3.10B

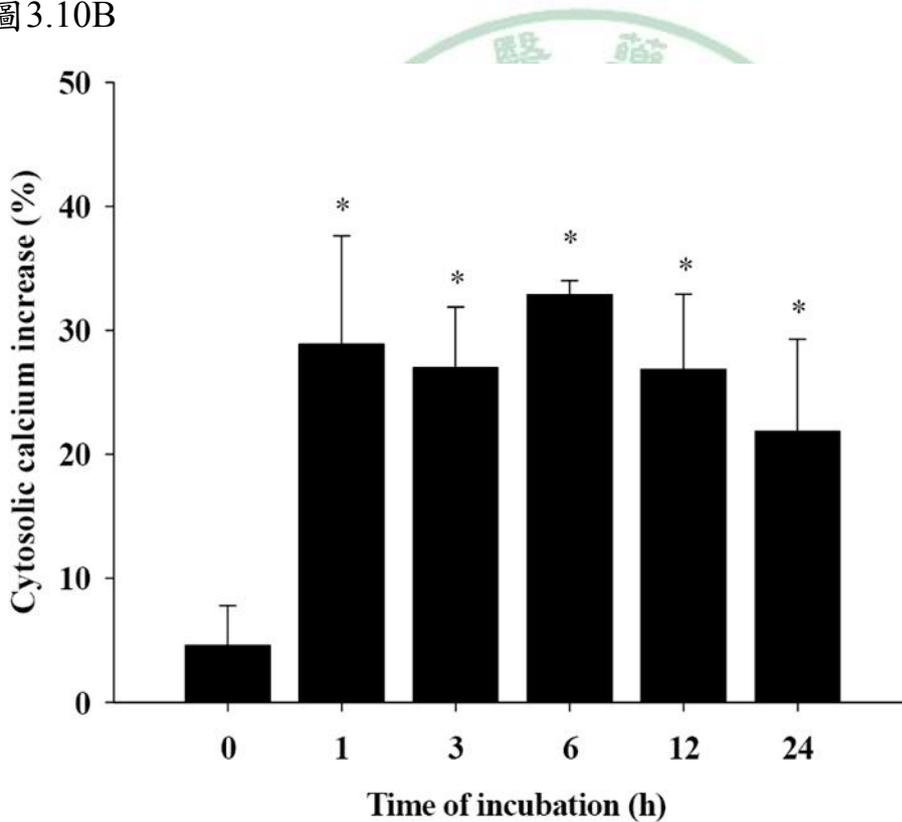


圖3.10 NCI-H460 細胞給予濃度 $25 \mu\text{M}$ 之薑黃素所造成的胞內鈣離子濃度變化。A：流式細胞儀圖。B：長條量化圖。結果顯示：薑黃素作用後，胞內鈣離子濃度明顯升高。數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 值表示 (* $p < 0.05$)。 (n=3)

六、利用流式細胞儀檢測薑黃素對大細胞肺癌細胞 NCI-H460之細胞凋亡相關蛋白質Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9 活性的影響

由前述實驗結果顯示，以薑黃素處理 NCI-H460 細胞，會造成細胞週期的停滯，並誘導細胞走向細胞凋亡途徑。Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9為cysteine protease family之成員，是參與細胞凋亡之主要作用蛋白。Caspase-3 的活化會促使 PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) 分解，進而造成DNA fragmentation 之產生，造成細胞凋亡之現象。

本實驗利用PhiPhiLux-G1D1 kit (OncoImmunit, Inc., Maryland, USA) 檢測casapse-3、Caspase-8及Caspase-9之活性。以25 μ M 濃度之薑黃素投予 NCI-H460細胞經6~72小時後收集細胞，加入PhiPhiLux-G1D1 kit 中之基質反應，以探討薑黃素是否誘導Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9活性產生。實驗結果顯示，以薑黃素處理之人類大細胞肺癌NCI-H460細胞可見流式細胞儀圖形的 caspae-3、Caspase-8 及capsase 9曲線都有向右偏移的趨勢，由此可推知：薑黃素可誘導人類大細胞肺癌NCI-H460細胞之caspase-3、Caspase-8及Caspase-9 活性增加，進而促使細胞凋亡發生(如圖3.11、3.12、3.13)。

圖3.11A

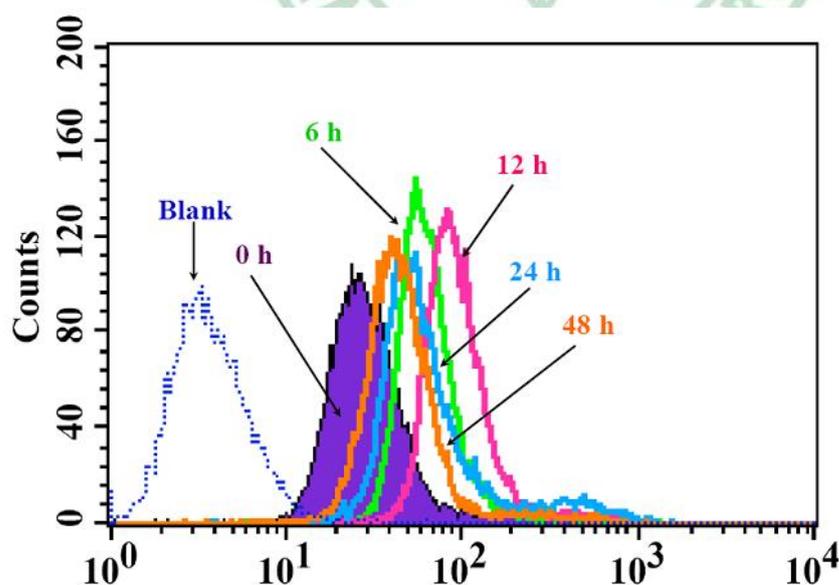


圖3.11B

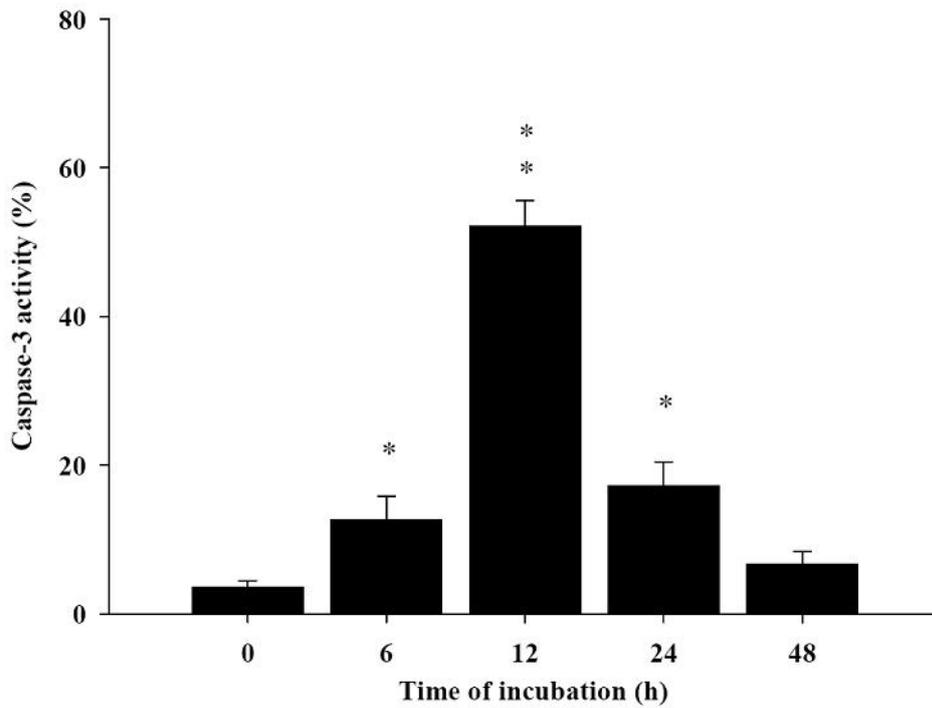


圖3.11. NCI-H460 細胞接受25 μM 薑黃素作用後其 caspase 3 活性的變化。A：流式細胞儀圖。B：長條量化圖。結果顯示：薑黃素作用後，caspase 3 活性明顯升高。數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 值表示 (* $p < 0.05$)。(n=3)

圖3.12A

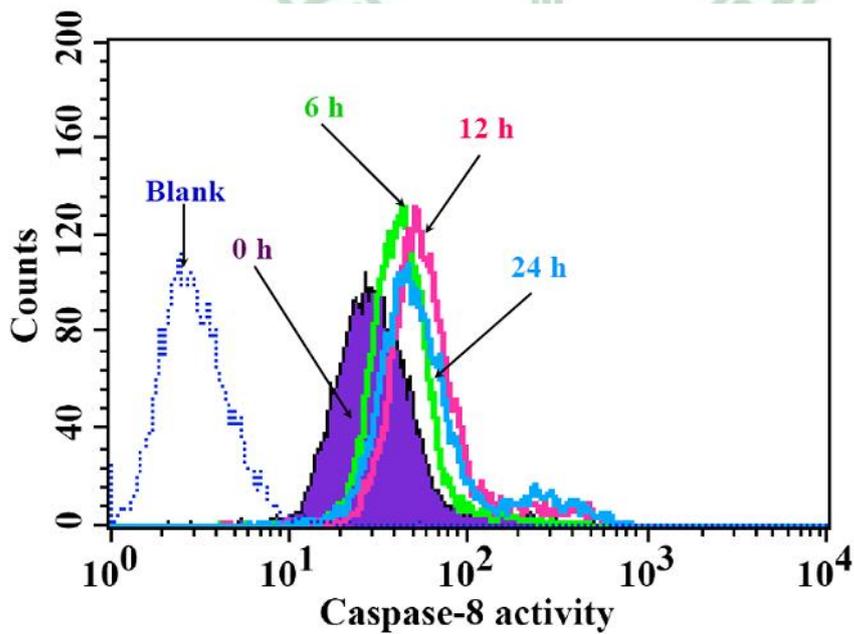


圖3.12B

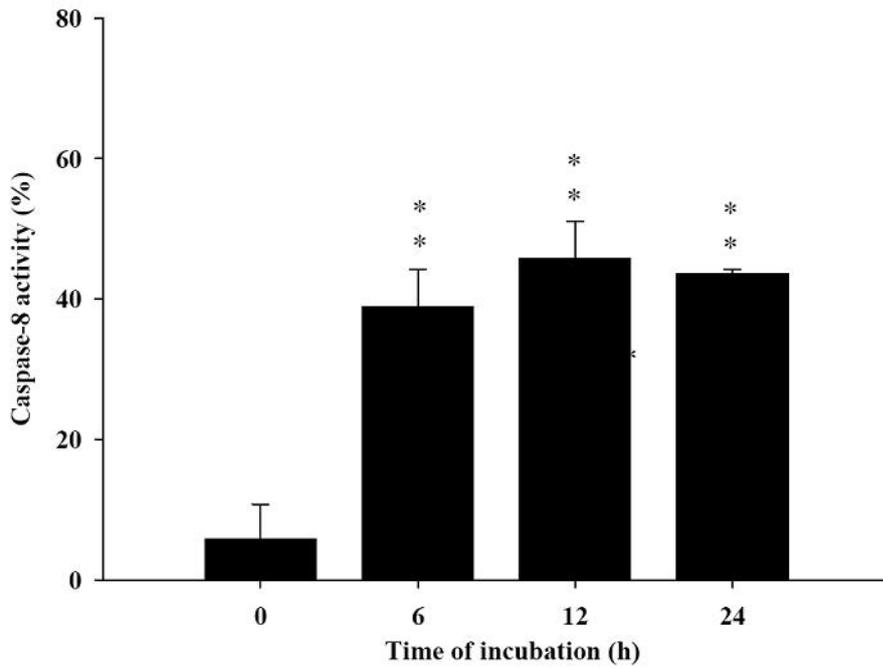


圖3.12 NCI-H460 細胞接受25 μ M薑黃素作用後其 caspase 8 活性的變化。A：流式細胞儀圖。B：長條量化圖。結果顯示：薑黃素作用後，caspase 8 活性明顯升高。數據結果以 mean \pm SD 值表示 (* p< 0.05; ***p<0.001)。(n=3)

圖3.13A

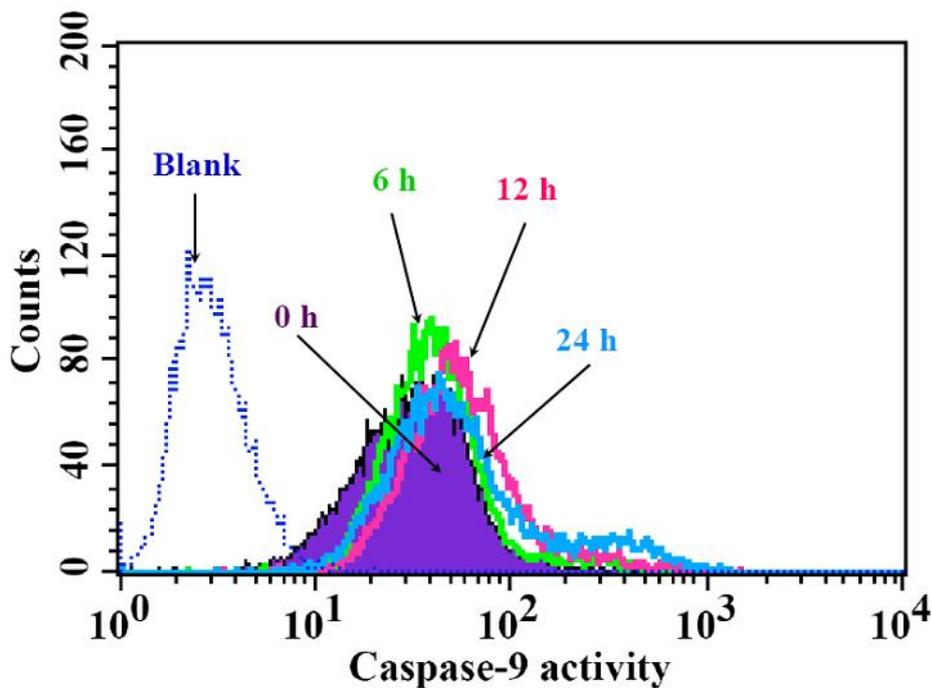


圖3.13B

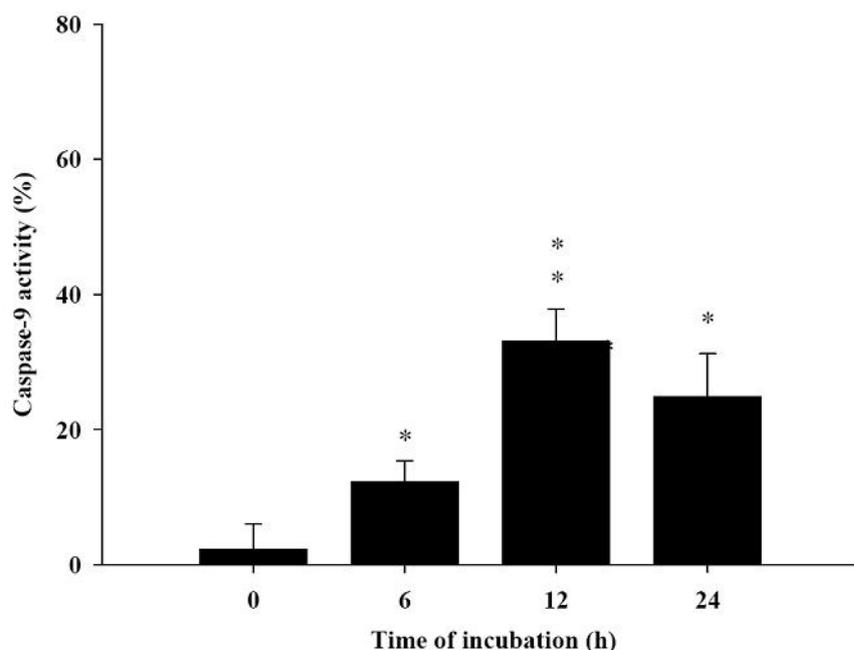


圖3.13 NCI-H460 細胞接受25 μ M薑黃素作用後其 caspase 9 活性的變化。A：流式細胞儀圖。B：長條量化圖。結果顯示：薑黃素作用後，caspase 9 活性明顯升高。數據結果以 mean \pm SD 值表示 (* p< 0.05; **p<0.01)。(n=3)

七、加入Caspase 8 與 ROS 抑制劑對薑黃素在 NCI-H460 細胞影響的改變

接受薑黃素作用後的 NCI-H460 細胞在有Caspase 8 抑制劑 (Z-IETD-fmk) 的情況下，其caspase 8 活性曲線在流式細胞儀圖右移的程度較小，表示其caspase 8活性增加較不明顯；且細胞存活率較沒有抑制劑時明顯變高（圖 3.14）。

接受薑黃素作用後的 NCI-H460 細胞在有ROS 抑制劑 (NAC) 的情況下，其ROS產量曲線在流式細胞儀圖右移的程度較小，表示其ROS產量增加較不明顯；且細胞存活率較沒有抑制劑時明顯變高（圖3.15）。

圖3.14A

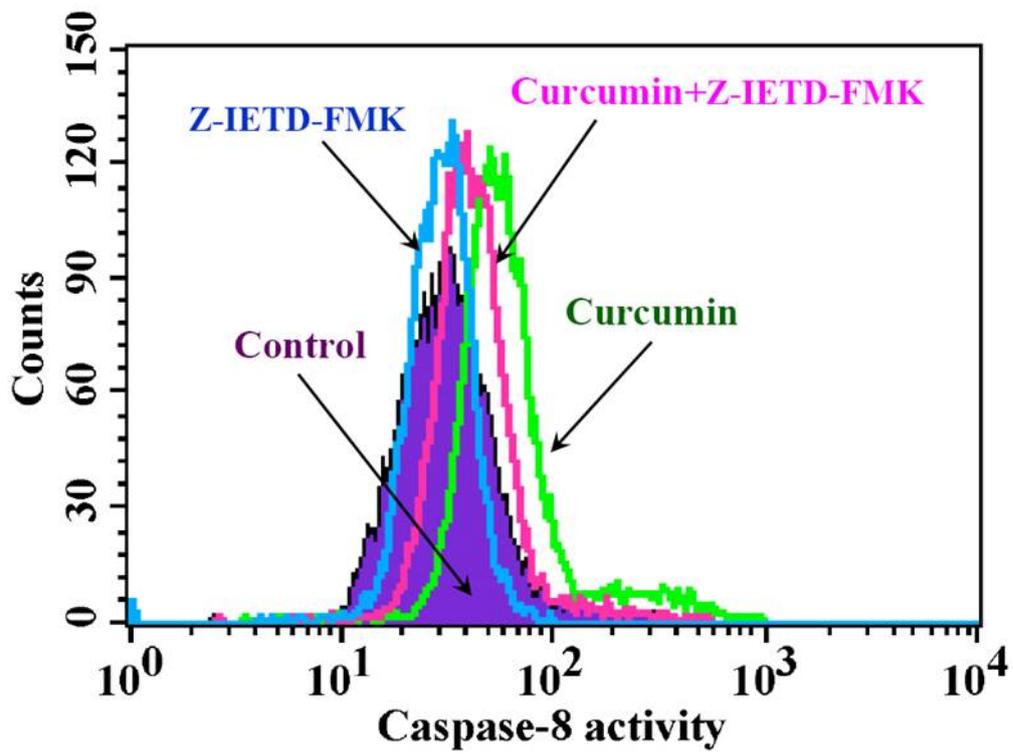


圖3.14B

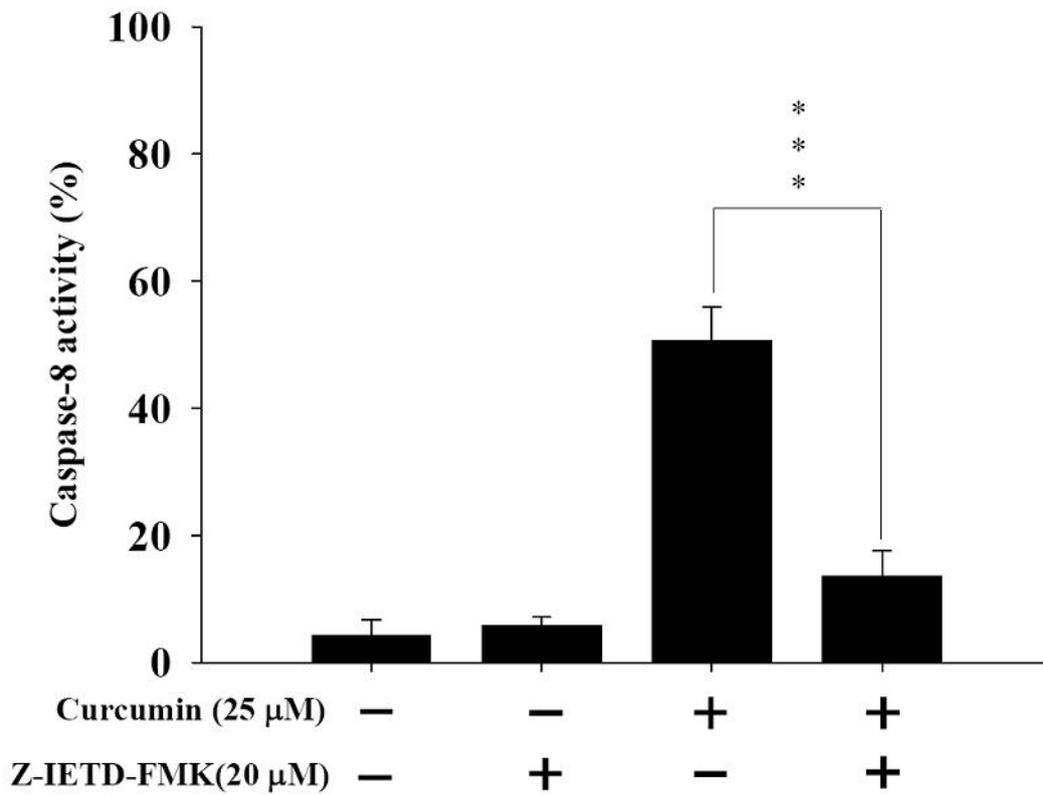


圖3.14C

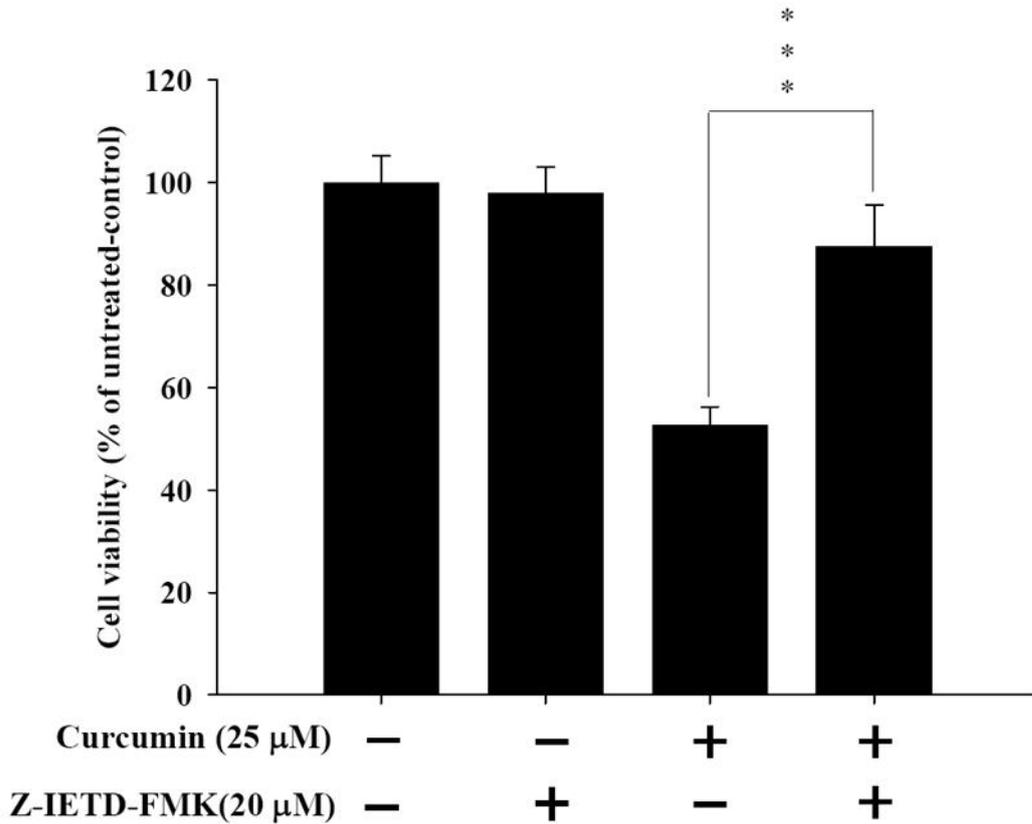


圖3.14 接受薑黃素作用後的 NCI-H460 細胞在有或無 Caspase 8 抑制劑 (Z-IETD-fmk)的情況下，對 Caspase 8 活性與細胞存活比率的影响。A：流式細胞儀顯示加入caspase 8 抑制劑的細胞其caspase 8活性曲線右移的程度較小；B：長條圖顯示加入抑制劑的細胞其caspase 8活性增加較不明顯；C：有同時加入 caspase 8 抑制劑的NCI-H460 細胞存活比例較高。(n=3)

圖3.15A

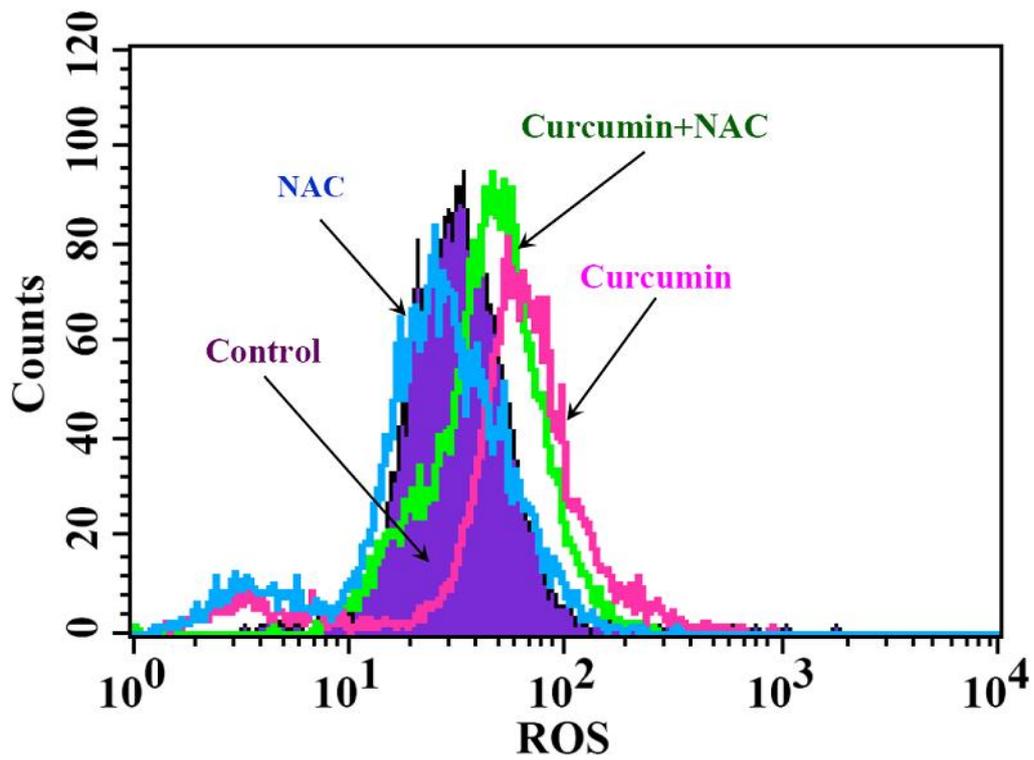


圖3.15B

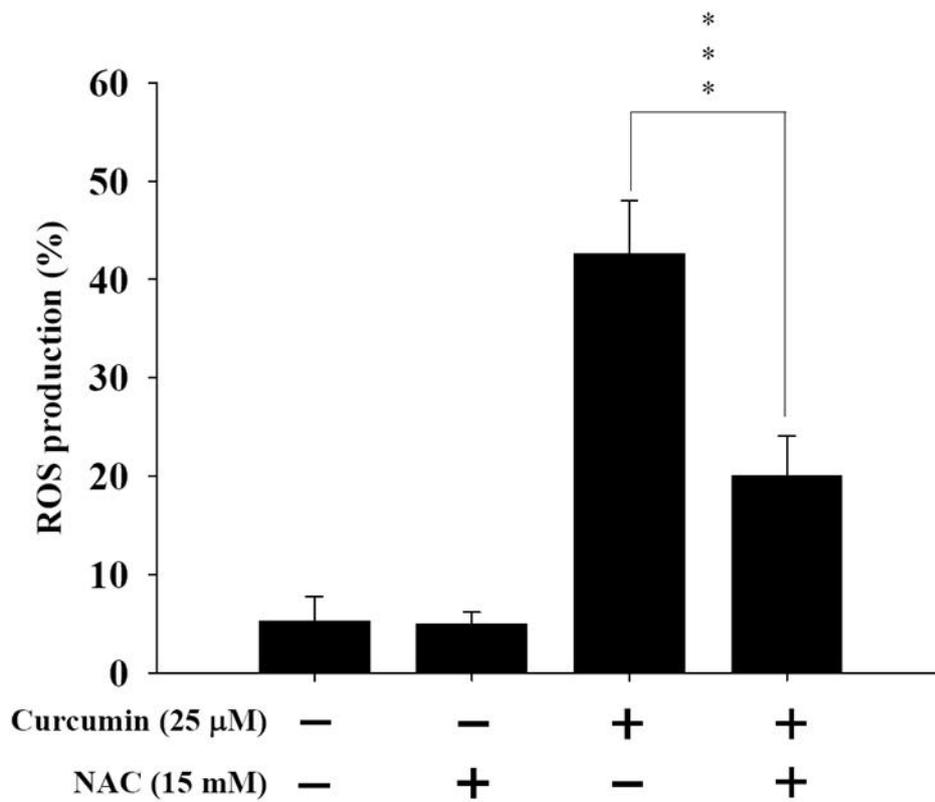


圖3.15C

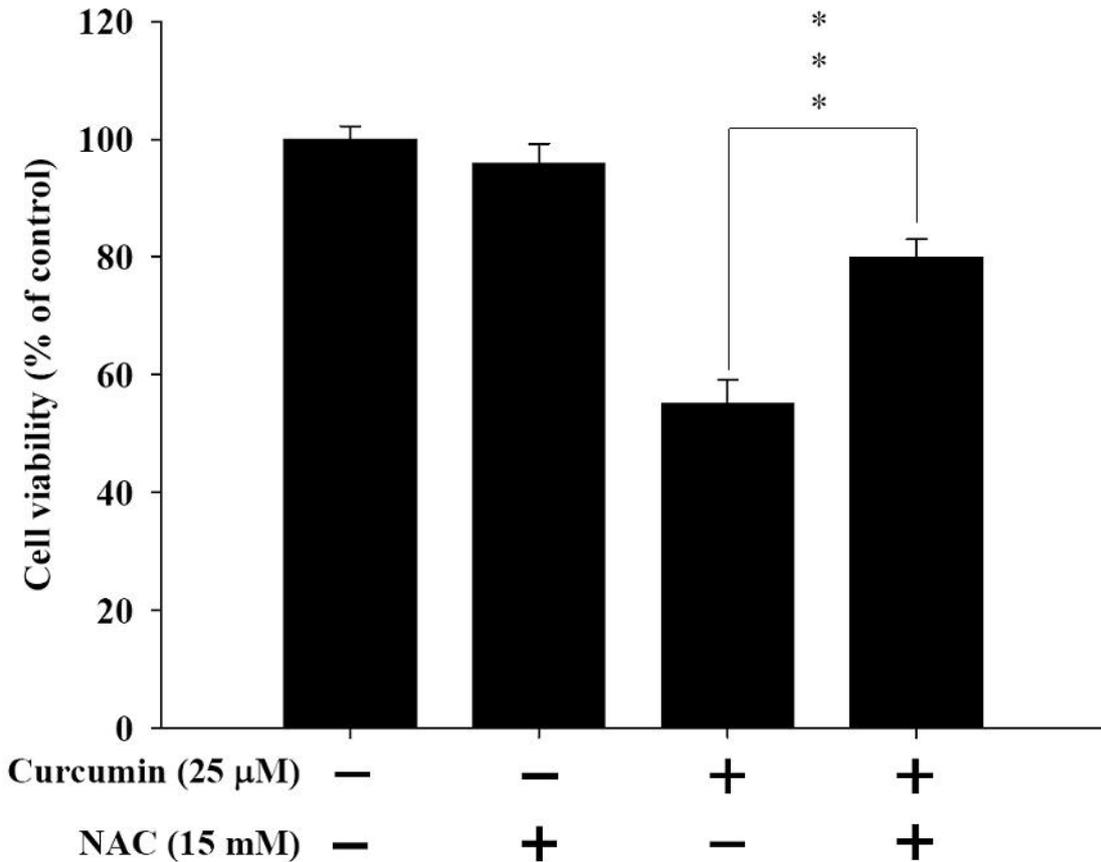


圖3.15. 接受薑黃素作用後的 NCI-H460 細胞在有或無 ROS 抑制劑 (NAC) 的情況下，對ROS 產量與細胞存活比率的影响。A：流式細胞儀顯示加入NAC的細胞其ROS 產量曲線右移的程度較小；B：長條圖顯示加入抑制劑的細胞其ROS產量增加較不明顯；C：有同時加入NAC的NCI-H460 細胞存活比例較高。(n=3)

八、免疫螢光染色法偵測 endo G、AIF、cytochrome c、GADD153 與 GRP78 在細胞質與細胞核的表現

經過25 μM 薑黃素作用24小時後，以免疫螢光法可偵得NCI-H460 細胞質內的endo G, AIF, cytochrome c, GADD153 與 GRP78 都有增加，且其中 endo G, cytochrome c 與 GADD153 亦呈現 nuclear translocation 現象 (圖 3.16)。

圖3.16A

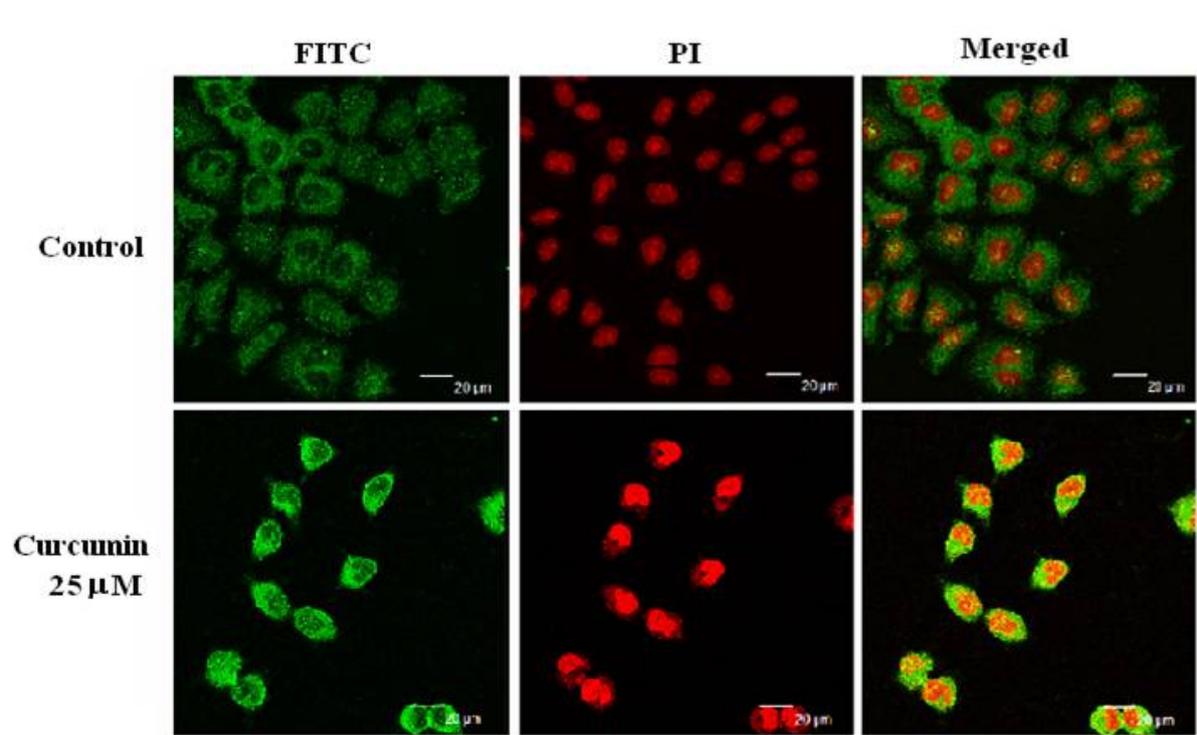


圖3.16B

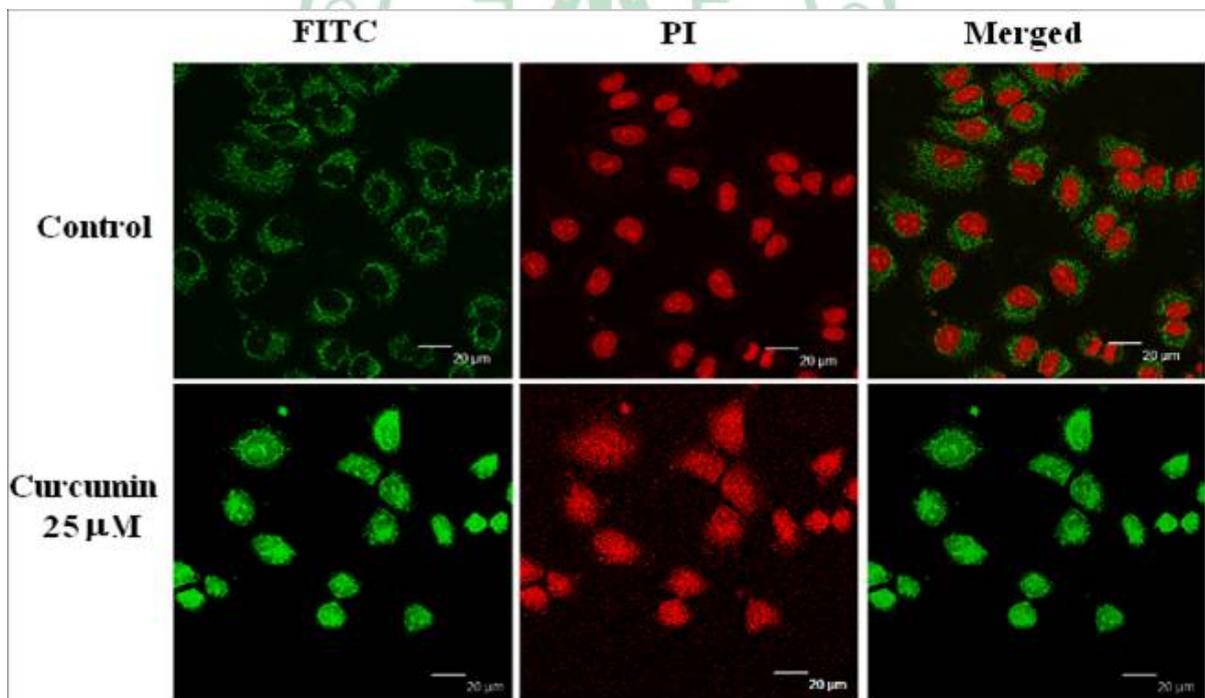


圖3.16C

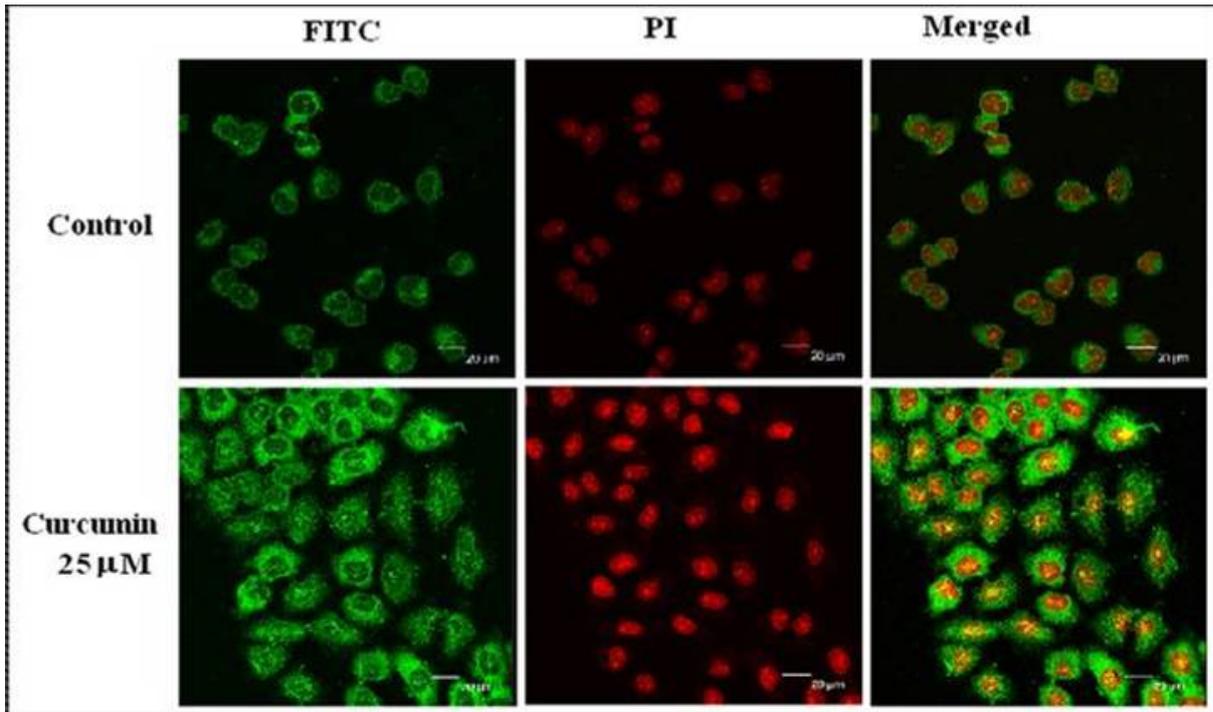


圖 3.16D

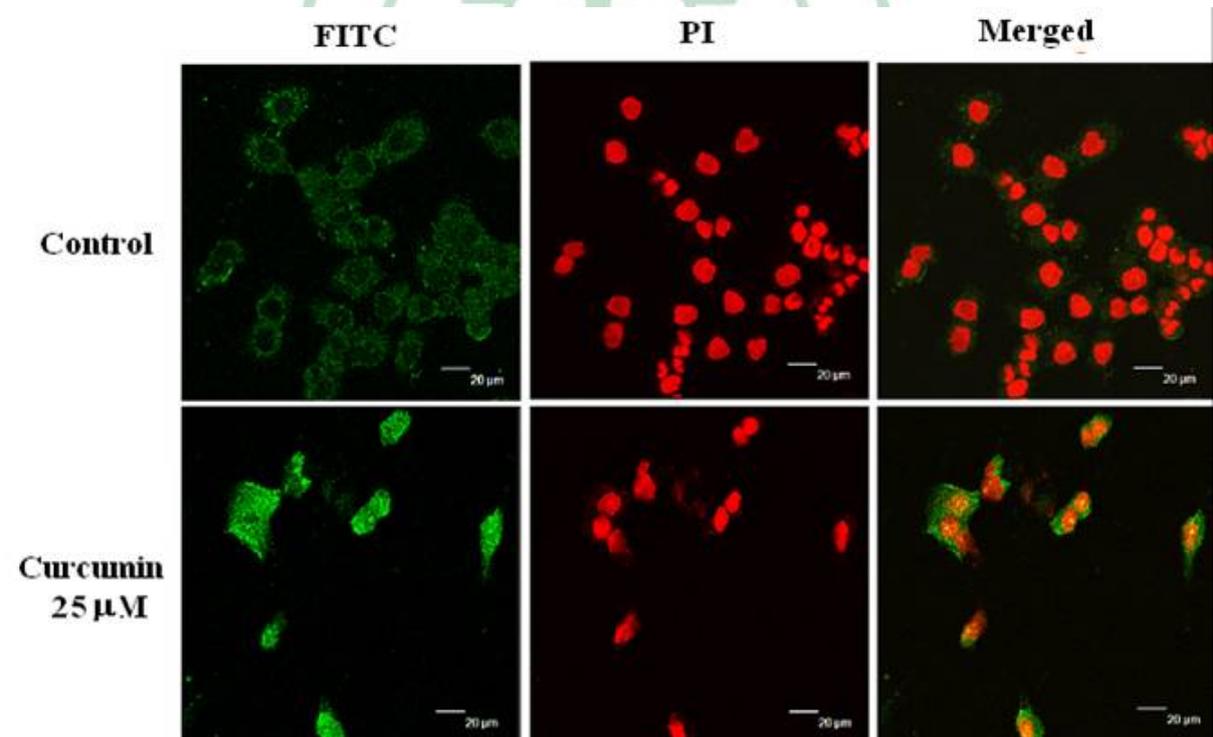


圖3.16E

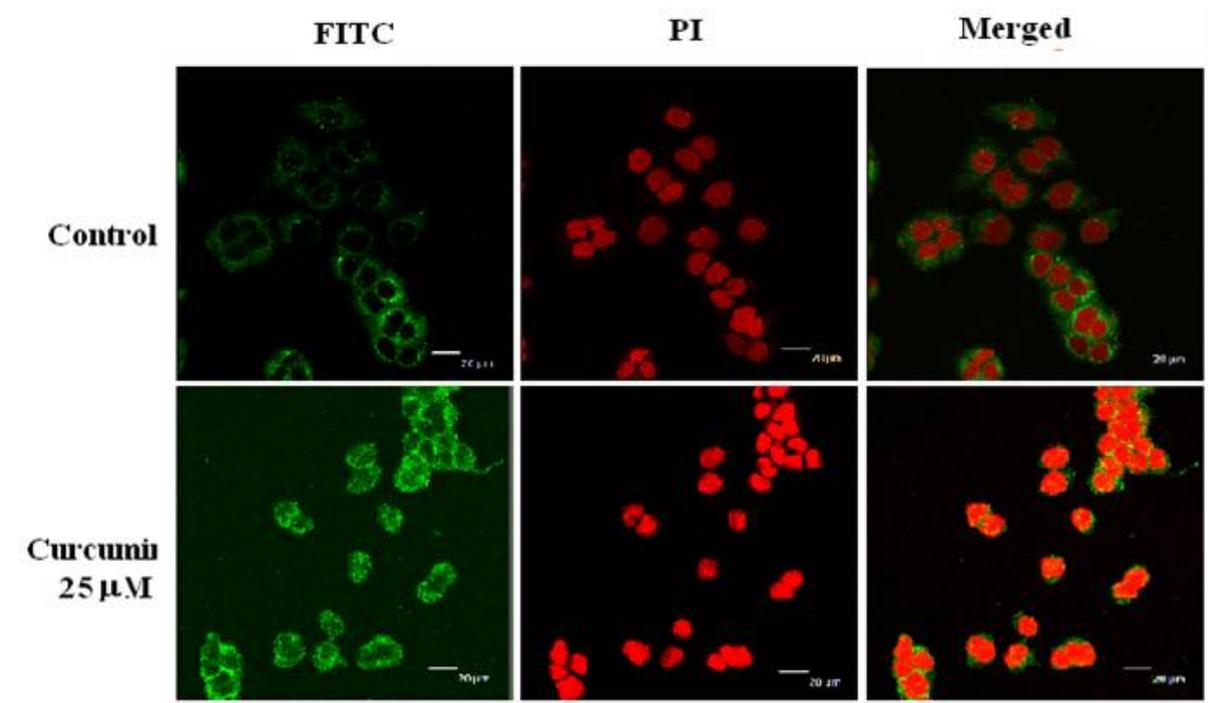


圖3.16. 經過25 μM 薑黃素作用24小時後，以免疫螢光法染色、共軛焦顯微鏡偵測 NCI-H460 內endo G (A)、AIF (B)、 cytochrome c (C)、 GADD153 (D) 與 GRP78 (E)的含量與位置。圖形顯示：前述五種物質在細胞質內都有增加，且其中endo G, cytochrome c 與 GADD153 亦呈現 nuclear translocation 現象。

九、利用西方墨點法檢測薑黃素對人類 NCI-H460 細胞之凋亡與週期調控有關蛋白表現量的影響

先前的實驗結果顯示，薑黃素會導致大細胞肺癌細胞 NCI-H460 凋亡，為探究其機制，故接著以西方墨點法偵測參與調控細胞凋亡相關蛋白的表現，以 α -tubulin 作為 internal control。結果分項敘述於後（圖 3.17）：

一、細胞膜死亡受體凋亡路徑的相關蛋白表現

以濃度 25 μM 薑黃素處理人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 株 NCI-H460 不同時間後，利用西方墨點法觀察發現，隨著時間的延長，Fas 蛋白表現量增加。

圖3.17A

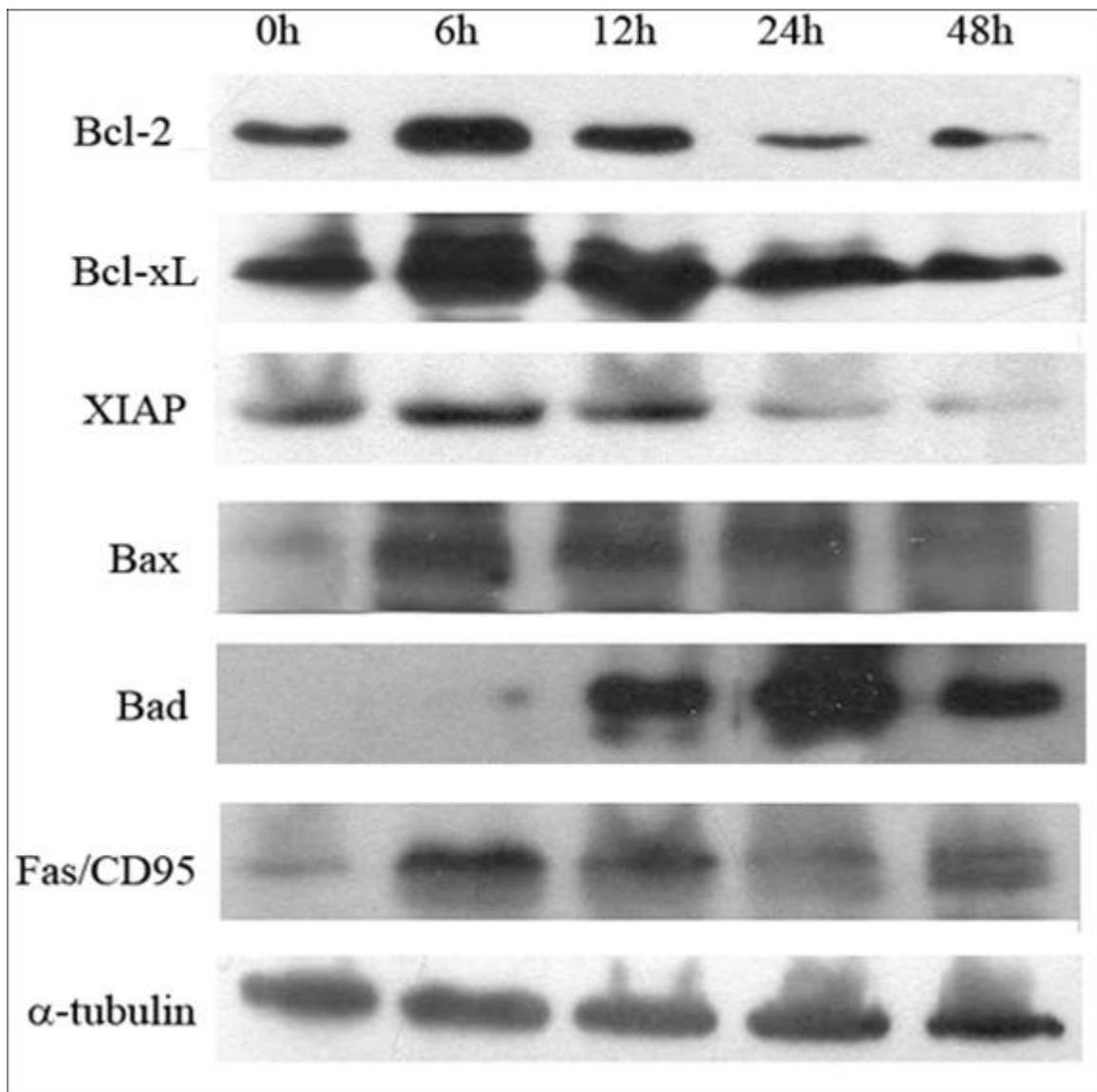


圖3.17B

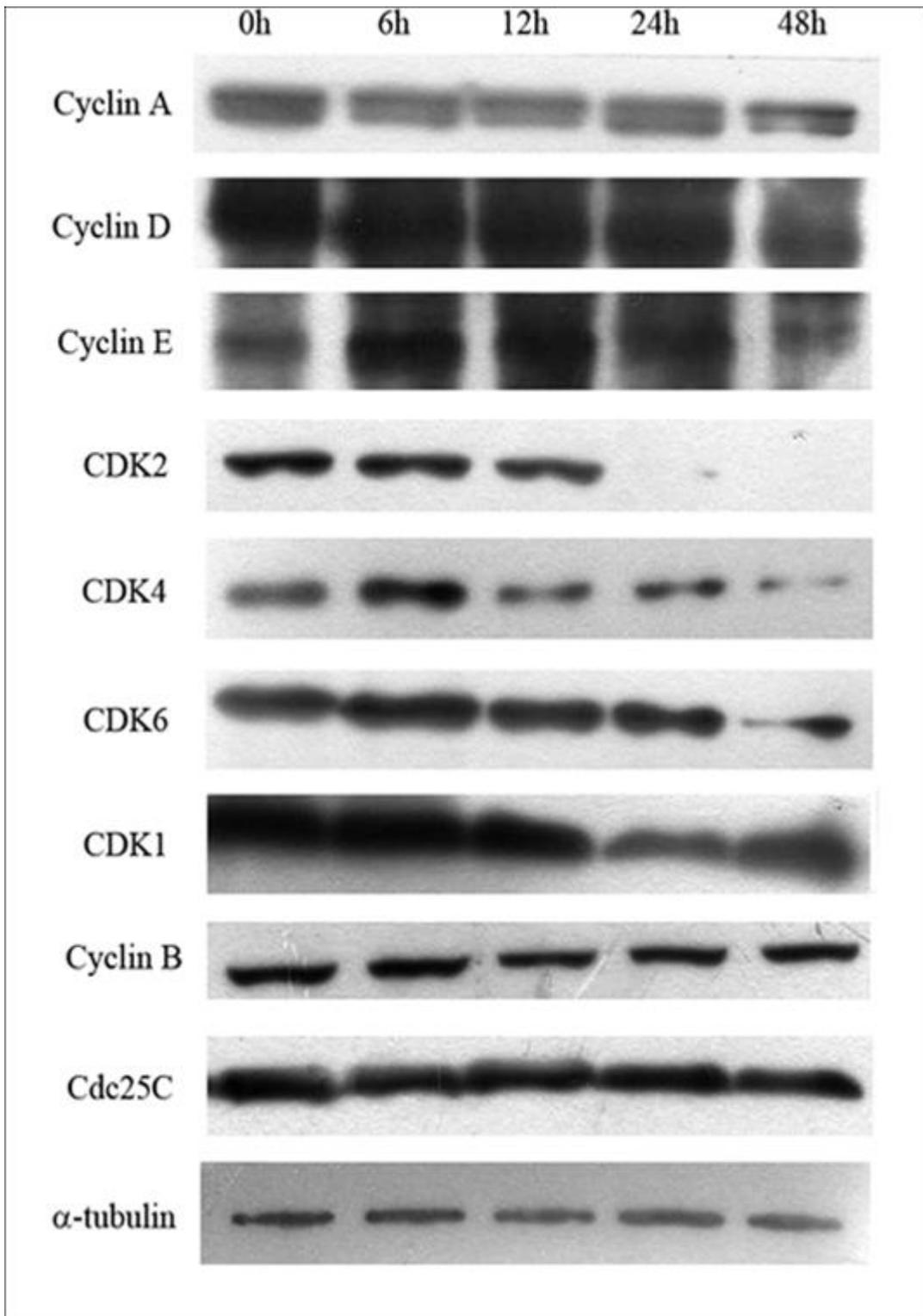


圖3.17 用西方墨點法檢測薑黃素對人類NCI-H460細胞之凋亡與週期調控有關蛋白表現量的影響。經薑黃素25 μ M作用不同時間後，測定NCI-H460細胞內蛋白質含量的改變。A圖：與細胞凋亡相關蛋白；B圖：調控細胞週期相關蛋白。

二、調控細胞凋亡的 Bcl-2 family 蛋白表現

以濃度 25 μ M 薑黃素處理人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 株 NCI-H460 不同時間後，利用西方墨點法觀察 Bcl-2 family 蛋白的表現量，結果發現隨著時間的延長，抗細胞凋亡的 Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白表現量下降，促細胞凋亡的 Bad 和 Bax 蛋白表現量增加。

三、與細胞週期調控有關蛋白表現

以濃度 25 μ M 薑黃素處理人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 株 NCI-H460 不同時間後，Cyclin A 與 CDK-1, -2, -4, -6 蛋白的總量均呈現漸次下降，而 Cyclin D 與 Cyclin E 則是在作用 6 與 12 小時後先上升，隨後再漸漸降下。

十、Real Time PCR 分析 AIF、caspase 3、-8、-9 以及 endo G 的 mRNA 轉錄表現量

以濃度 25 μ M 薑黃素處理人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 株 NCI-H460 24 與 48 小時後，caspase 8 的 mRNA 轉錄水平隨作用時間增長而漸漸上升；而 endo G 的 mRNA 轉錄水平則僅在作用 24 小時有明顯上升。其他諸如：AIF, caspase-3 and -9 並無明顯的的 mRNA 轉錄水平改變（圖 3.18）。

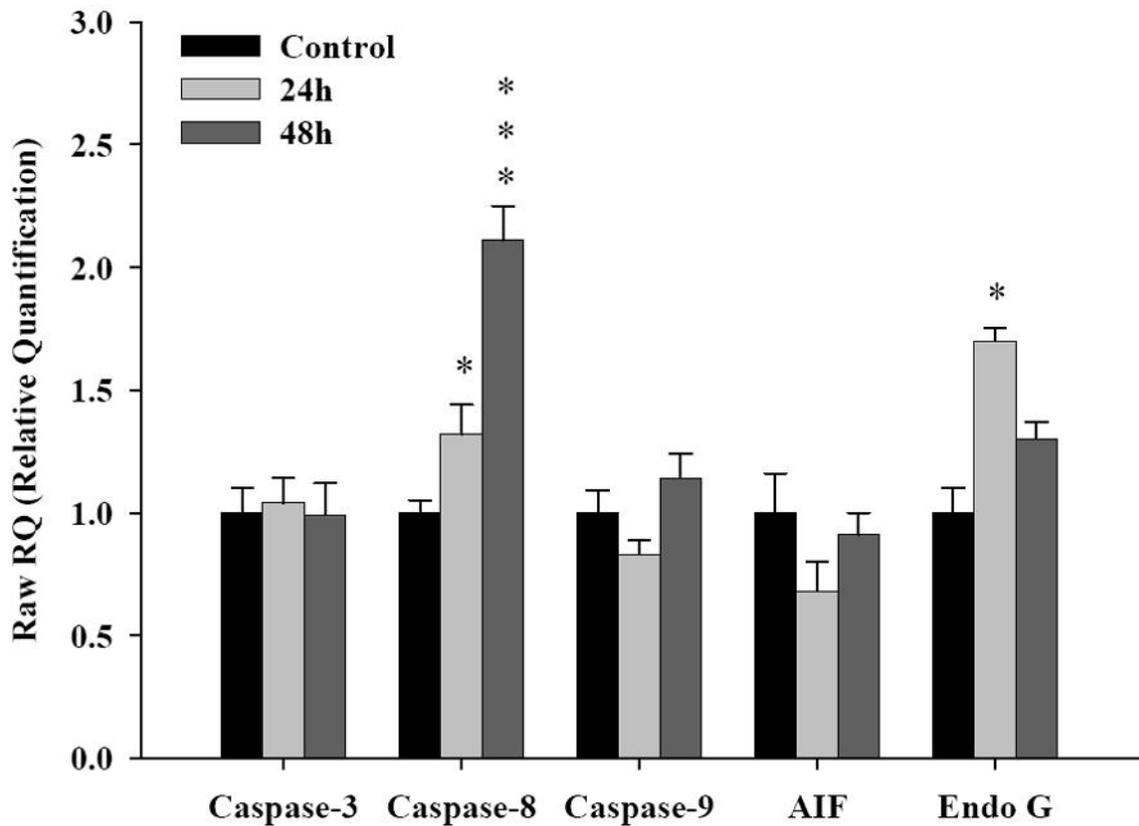


圖3.18. Real Time PCR 分析 AIF、caspase 3、8、9 以及endo G 的mRNA 轉錄表現量。(* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)。

第二節 推論性統計分析

本研究為細胞實驗。前述描述性統計所得的結果，雖是得自有限的樣本，但可推論母全體（即所有的 NCI-H460 細胞）在相同的條件下，接受薑黃素的作用後，都會產生類似的變化。

第四章 討論

第一節 結果討論

一、薑黃素濃度與生體可用率相關的結果討論

本研究證實了薑黃素對人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460 具有細胞毒性，且此毒性是與其劑量成正相關的 (dose-dependent)。在圖 3.1 至圖 3.3 可見：當薑黃素的濃度升高至 20 μM 以上時，NCI-H460 細胞的存活率便急遽下降。當薑黃素的濃度為 30 μM 時，約 95% 的 NCI-H460 都死亡了。這樣的細胞死亡恰與流式細胞儀上 sub-G1 peak 大量出現的時間相吻合。所以我們可以推論：大部分被薑黃素所殺的 NCI-H460 細胞很可能是經由引發細胞凋亡的方式程序性自殺的。相對地，若要殺死 50% 的人類肺癌細胞 A549，則須要 40-50 μM 的薑黃素才能辦到 (Radhakrishna Pillai et al. 2004) (Lin et al. 2008)。因此，我們可以說：薑黃素對人類肺癌細胞的毒殺效果，NCI-H460 細胞是比 A549 細胞更敏感的。但是，薑黃素的生體可用率 (bioavailability) 是有名的差。給予鼠 (rat) 靜脈注射每公斤 10 毫克的薑黃素，其血清濃度最高僅達到 $0.36 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ ($0.98 \pm 0.14 \mu\text{M}$)。若改以口服的方式給予，即使劑量比靜注時高出 50 倍，所能產生的血中濃度甚至更低 (Yang et al. 2007)。人類服用 4 到 8 公克的薑黃素後一小時抽血，發現血中濃度只有 0.41-1.75 μM (Cheng et al. 2001)。因此，本研究所採細胞實驗中所用的薑黃素濃度在動物或人體上是很難達到的。薑黃素縱使有如此低的生體可用率，它對一些疾病的臨床療效已經得到證實了。這種「生體可用率」與「療效」不相稱的奇特現象，目前尚無很好的解釋 (Hatcher et al. 2008)。除此之外，目前已經發展出一些方法來克服薑黃素的低生體可用率：其一、是加入其他配方，例如：piperine 等可提升薑黃素的生體可用率；其二、可使用 liposomal curcumin，也有較原本未修飾的薑黃素更佳的生體可用率 (Anand et al. 2007)。

二、外路徑相關的結果討論

西方墨點分析法顯示：NCI-H460 細胞在接受薑黃素作用後，其 Fas 蛋白質的表現會增加（圖 13.17A）。併同薑黃素作用後增加的 caspase 8 活性（圖 3.12A）與 mRNA（圖 3.18），我們可推斷薑黃素引起的 NCI-H460 細胞凋亡涉及了外路徑（extrinsic pathway）機轉的啟動。在加入 caspase 8 抑制劑後，原本被薑黃素殺死的 NCI-H460 細胞存活的數目變多了（圖 3.14）。這證實了 caspase 8 的啟動確實與 NCI-H460 細胞的死亡有關。這樣的發現與薑黃素在其他種類的癌細胞所產生的變化是相同的。目前已知的包括黑色素瘤細胞 (Bush et al. 2001)、胃癌細胞、大腸癌細胞 (Moragoda et al. 2001)、前列腺癌細胞 (Mukhopadhyay et al. 2001)、以及血癌細胞 (Anto et al. 2002) 都可因薑黃素的作用而造成 caspase 8 的激發。Fas 是一種細胞膜上的接收器，通常它在生理狀態下是被 Fas ligand 所激發。Bush et al. 曾很清楚地證明了：薑黃素的作用可在沒有 Fas ligand 的情況下激發黑色素細胞瘤的 Fas 接收器 (Bush et al. 2001)。此外，其他的一些抗癌藥物也可以產生這種所謂的「Fas ligand-independent Fas activations」(Micheau et al. 1999) (Shao et al. 2001)。

三、內路徑相關的結果討論

薑黃素作用後，NCI-H460 細胞的促細胞凋亡蛋白質：Bax 和 Bad 量升高；而抑細胞凋亡蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-xL 的量卻降低（圖 3.17A）。前述這些蛋白質都屬於 Bcl-2 家族，其中促細胞凋亡蛋白質與抑細胞凋亡蛋白質彼此拮抗以達到調控細胞凋亡的效果 (Korsmeyer 1999)。薑黃素的作用打破了原本 Bcl-2 家族間原本的平衡，使得它們向細胞凋亡的方向傾斜，間接地造成了粒腺體膜電位的降低（圖 3.9）。粒腺體膜電位的降低是細胞凋亡的內路徑 (internal pathway) 中很關鍵的步驟，它接著引發粒腺體內的細胞色素 c 被釋出到細胞質中（圖 3.16C）。細胞色素 c 接著在 adaptor

蛋白質 Apaf 1 的媒介下促使 procaspase 9 被切割生成具有活性的 caspase 9 (圖 3.13)。Caspase 9 接續切割 procaspase 3 成為具活性狀態的 caspase 3 (圖 3.11)。Caspase 3 再接著執行裂解蛋白質的工作最終達到細胞凋亡的結果。本研究發現被釋出到細胞質的細胞色素 c 後來會跑到細胞核中 (圖 3.16C)。根據前人的研究,跑到細胞核內的細胞色素 c 是執行與 caspase 無關的細胞核細胞凋亡 (Nur-E-Kamal et al. 2004)。此外,另有兩種執行細胞核細胞凋亡的蛋白質 AIF 與 endo G 也都會在薑黃素的作用下從 NCI-H460 細胞原本的粒腺體中釋出,而進到細胞核中 (圖 3.16A, 3.16B)。這些媒介細胞核細胞凋亡的:細胞色素 c、AIF、endo G 所造成的結果就是染色質濃縮與 DNA 分解,形成了細胞凋亡典型的細胞核與染色體變化。這些經由粒腺體膜電位改變所引發的細胞凋亡就稱為「內路徑」(internal pathway),或稱做「粒腺體路徑」(mitochondrial pathway)。

四、ROS 相關的結果討論

ROS 包括自由基,例如:superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) 和非自由基的氧化物,例如:過氧化氫 (H_2O_2)。薑黃素雖是眾所周知的抗氧化劑,但在與 NCI-H460 細胞作用後,可引發該細胞的 ROS 產量增加 (圖 3.8)。由於薑黃素的脂溶性特性,它可以自由地穿過細胞膜 (Jaruga et al. 1998)。在穿過的過程中,可造成細胞膜上的 phosphatidylserine 外翻 (Bhaumik et al. 1999)。外翻的 phosphatidylserine 在有 NADPH 的情況下可在胞外製造出 superoxide (Tamura et al. 1988)。這些胞外的 ROS 可以透過陰離子通道 (Ikebuchi et al. 1991) 或是非特異的方式 (Higuchi et al. 1998) 跑進胞內。胞內的 ROS 在存有中介金屬(例如:銅)的情況下,可造成 DNA 和其他胞器的傷害,進而造成細胞凋亡 (Yoshino et al. 2004)。本研究在加入 ROS 抑制劑 NAC 後,因薑黃素而死的 NCI-H460 細胞明顯變少 (圖 3.15),這間接證實了 ROS 在薑黃素引發的細胞凋亡中扮演關鍵的角色。

五、內質網壓力路徑相關的結果討論

ROS 可抑制內質網的鈣離子泵(pump)，導致原本蓄積於其中的鈣離子被傾倒到細胞質中（圖 3.10）。粒腺體拾取了這些鈣離子後，造成了其膜電位的改變，最終引起細胞凋亡被啟動 (Hajnózký et al. 2006)。此外，內質網的鈣離子倒出後，會影響原本內質網的正常功能：使其中的初形成蛋白質無法被正常地折疊起來(folding)，因而產生了所謂的「內質網壓力」(ER stress)。當細胞偵測到「內質網壓力」之初，會啟動 GRP78 蛋白質的轉錄增加（圖 3.16E）。GRP78 是一種 chaperone，對於內質網裡的初形成蛋白質折疊有助益，所以可以減少「內質網壓力」(Rao et al. 2004)。倘若「內質網壓力」仍持續未解，另一種蛋白質：GADD153 的轉錄將會被提升。GADD153 本身又是一種轉錄因子。它可調節部分與細胞凋亡有關的基因。然而，目前尚無法完全釐清 GADD153 作用的機轉，只知道它可能是藉著 Bcl-2 家族來啟動「粒腺體路徑」，而達到啟動細胞凋亡的效果 (Oyadomari et al. 2003)。綜觀本研究所推測出的「薑黃素引起 NCI-H460 細胞細胞凋亡」的複雜機轉，我們以示意圖繪製於（圖 3.19），以一窺其全貌。

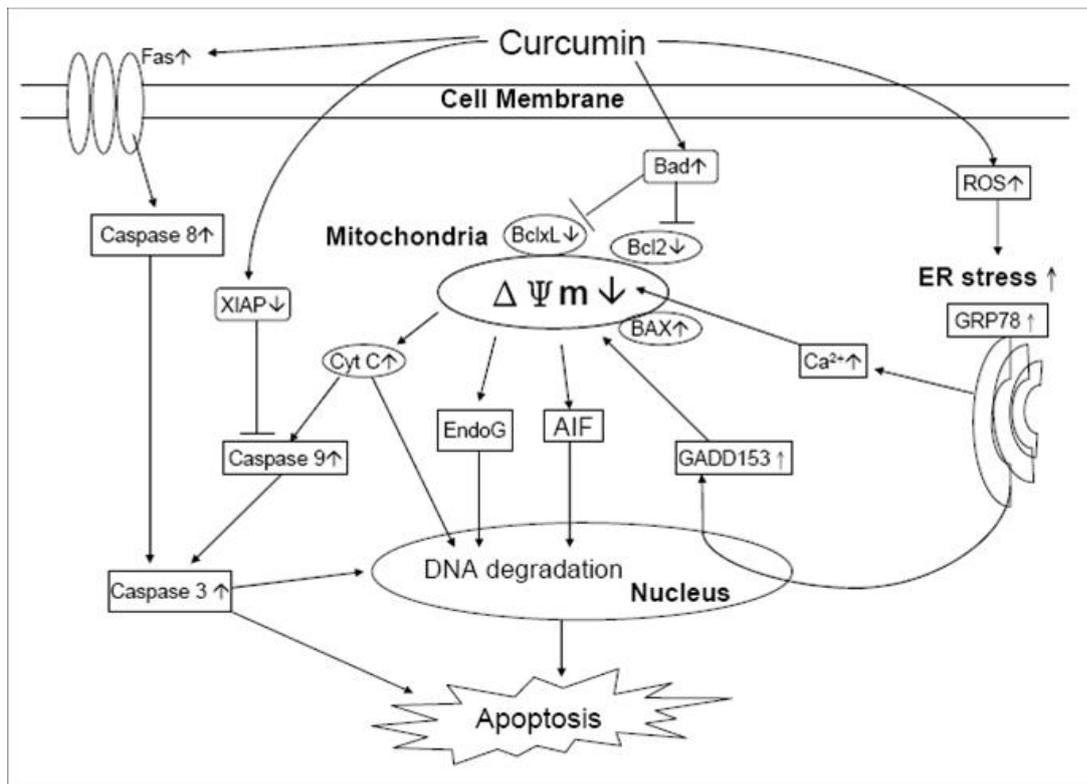


圖 3.19 薑黃素引發人類 NCI-H460 細胞凋亡的可能抑癌機轉。

第二節 其他相關性討論

細胞週期的失調是一個已知的細胞癌化機轉 (Diehl 2002)。本研究發現薑黃素的作用可將 NCI-H460 細胞的週期停滯於 G2/M 期 (圖 3.6, 圖 3.7)。受到薑黃素作用而漸減的 CDK1 (圖 3.17B) 或許部分解釋了 NCI-H460 細胞被停滯於 G2/M 期的可能機轉。根據肝細胞癌的研究, 若是癌細胞被停滯於 G2/M 期, 它們便不容易被薑黃素殺死; 若以藥物將此停滯解除, 癌細胞便較容易死於細胞凋亡 (Wang et al. 2008)。Choudhuri 等人用乳癌表皮細胞作研究, 採用 time-lapse video-micrography 結合 quantitative fluorescence microscopy 的方法觀察, 發現乳癌表皮細胞在薑黃素作用後所引致的細胞凋亡是發生在 G2 期。但在正常的乳房表皮細胞則會因薑黃素的作用而停滯於 G1 期, 因此可躲過 G2 期的毒殺。這或許可部分解釋了為何薑黃素對正常細胞幾乎沒有毒殺效果, 而在癌細胞則不然 (Choudhuri et al. 2005)。同樣的薑黃素作用在同樣的 NCI-H460 細胞, 卻可

產生「細胞週期停滯」或是「細胞凋亡」兩種不同的結果。誠如 Sa 等人所言：「細胞週期停滯」與「細胞凋亡」好比「一個銅板的兩個面」(“two sides of the same coin”) (Sa et al. 2008)。當細胞受薑黃素作用而產生週期停滯時，細胞可進行修補以便再行週期運轉；但當細胞損傷嚴重以致無法修補時，細胞便可能越過週期停滯期、而啟動細胞凋亡的程序 (Lin et al. 2008)。

第三節 研究限制

- 一、本研究為活體外 (*in vitro*) 的細胞實驗，所以無法完全推論活體內 (*in vivo*) 的薑黃素作用是否相仿。
- 二、本研究為單一生物、單一細胞(人類大細胞肺癌細胞 NCI-H460) 所作的研究，無足夠的證據可推論薑黃素在人類的其他癌細胞、或其他生物可產生相同的結論。
- 三、本研究所推得的細胞凋亡可能路徑，並無排他性。也就是說：無法排除仍有其他同時並存的路徑亦在薑黃素作用後產生作用。此點可由加入 caspase 8 或 ROS 抑制劑只能「部分」、而無法「完全」恢復所有因凋亡而死的 NCI-H460 細胞可見。舉例而言：細胞凋亡路徑中的「細胞核路徑」(p53, PUMA, NOXA...等)、「lysosome 路徑」(cathepsin B、caspase 2 等) 與「細胞存活因素」(NF- κ B、Akt...等) 因囿於經費人力，無法在本研究中一併探究，也因此本研究的結論無法推及該部分。
- 四、本研究雖推論 NCI-H460 細胞的死亡導因於細胞凋亡，但是否有細胞死於 necrosis 而非 apoptosis？其比例為何？都無法由本研究現有的數據得知。

第五章 結論與建議

第一節 結論

本研究顯示薑黃素在人類大細胞肺癌細胞NCI-H460 上具有引發細胞凋亡而殺死細胞或是導致「細胞週期停滯」的效果。在細胞凋亡上所涉及的機轉包括：內路徑、外路徑、以及「內質網壓力」等三方面都有。而在「細胞週期停滯」部分則是將 NCI-H460 細胞停滯於 G2/M 週期，其可能的機轉為抑制 CDK1 所造成。無論是引發細胞凋亡而殺死細胞或是導致「細胞週期停滯」，都具有抑制癌症的功效。薑黃素已知的毒性甚低，且又具有上述的抗癌效果，因此不失為在治療大細胞肺癌上一個相當有潛力的藥物。

第二節 建議

- 一、本研究為細胞株實驗，後續可就動物體內的抗癌功效(*in vivo*) 繼續實驗。甚至可考慮在環境許可下，逕行人體試驗。
- 二、本研究所採的薑黃素濃度較一般動物體內所能達到的濃度為高，如何藉著調整薑黃素的化學結構以增加其生體可用率，達到較高的血中濃度當為另一亟待突破的課題。
- 三、可用 Annexin V 與 PI 共同作用後以流式細胞儀計數，或可較詳細地瞭解到薑黃素作用下的 NCI-H460 究竟確實死於細胞凋亡的比例。
- 四、其他與細胞凋亡有關的機轉，也可在經費人力許可下繼續探究，以繪出更完整的細胞凋亡路徑圖。

參考文獻

- Aggarwal, B. B., S. Shishodia, et al. (2005). "Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice." Clin Cancer Res **11**(20): 7490-8.
- Aggarwal, B. B., C. Sundaram, et al. (2007). "Curcumin: the Indian solid gold." Adv Exp Med Biol **595**: 1-75.
- Alberg, A. J., R. C. Yung, et al. (2005). Epidemiology of Lung Cancer. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. R. J. Manson and J. F. Murray. Philadelphia, Pennsylvania 19106, Elsevier Saunders
- Ammon, H. P., H. Safayhi, et al. (1993). "Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids." J Ethnopharmacol **38**(2-3): 113-9.
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, et al. (2007). "Bioavailability of curcumin: problems and promises." Mol Pharm **4**(6): 807-18.
- Anand, P., C. Sundaram, et al. (2008). "Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution." Cancer Letters **267**(1): 133-164.
- Anto, R. J., A. Mukhopadhyay, et al. (2002). "Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl." Carcinogenesis **23**(1): 143-50.
- Babu, P. S. and K. Srinivasan (1995). "Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat." Mol Cell Biochem **152**(1): 13-21.
- Bhaumik, S., R. Anjum, et al. (1999). "Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates." FEBS Letters **456**(2): 311-314.
- Bush, J. A., K. J. J. Cheung, et al. (2001). "Curcumin Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells through a Fas Receptor/Caspase-8 Pathway

- Independent of p53." Experimental Cell Research **271**(2): 305-314.
- Chen, H. W., J. Y. Lee, et al. (2008). "Curcumin inhibits lung cancer cell invasion and metastasis through the tumor suppressor HLJ1." Cancer Res **68**(18): 7428-38.
- Cheng, A. L., C. H. Hsu, et al. (2001). "Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions." Anticancer Res **21**(4B): 2895-900.
- Choudhuri, T., S. Pal, et al. (2005). "Curcumin Selectively Induces Apoptosis in Deregulated Cyclin D1-expressed Cells at G2 Phase of Cell Cycle in a p53-dependent Manner." J. Biol. Chem. **280**(20): 20059-20068.
- Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, et al. (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." Cytometry **13**(8): 795-808.
- Deodhar, S. D., R. Sethi, et al. (1980). "Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane)." Indian J Med Res **71**: 632-4.
- Dhillon, N., B. B. Aggarwal, et al. (2008). "Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer." Clin Cancer Res **14**(14): 4491-4499.
- Diehl, J. A. (2002). "Cycling to cancer with cyclin D1." Cancer Biol Ther **1**(3): 226-31.
- Goel, A., A. B. Kunnumakkara, et al. (2008). "Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic." Biochem Pharmacol **75**(4): 787-809.
- Guthrie, H. D. and G. R. Welch (2006). "Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry." J Anim Sci **84**(8): 2089-100.
- Hajnóczy, G., G. Csordás, et al. (2006). "Mitochondrial calcium signalling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis." Cell Calcium **40**(5-6): 553-560.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell

100(1): 57-70.

Harvey, A. L. (2008). "Natural products in drug discovery." Drug Discovery Today **13(19-20): 894-901.**

Hatcher, H., R. Planalp, et al. (2008). "Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials." Cell Mol Life Sci **65(11): 1631-52.**

Hayes, P. C., C. R. Wolf, et al. (1989). "Blotting techniques for the study of DNA, RNA, and proteins." BMJ **299(6705): 965-8.**

Higuchi, M., T. Honda, et al. (1998). "Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases." Oncogene **17(21): 2753-60.**

Holmes, K. L., G. Otten, et al. (2002). "Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACS Calibur." Curr Protoc Immunol **Chapter 5: Unit 5 4.**

Huang, A. C., S. Y. Lin, et al. (2008). "Effects of curcumin on N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)-induced lung and liver tumorigenesis in BALB/c mice in vivo." In Vivo **22(6): 781-5.**

Ichiki, K., N. Mitani, et al. (2000). "Regulation of activator protein-1 activity in the mediastinal lymph node metastasis of lung cancer." Clin Exp Metastasis **18(7): 539-45.**

Ikebuchi, Y., N. Masumoto, et al. (1991). "Superoxide anion increases intracellular pH, intracellular free calcium, and arachidonate release in human amnion cells." J Biol Chem **266(20): 13233-7.**

Jaruga, E., S. Salvioli, et al. (1998). "Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes." FEBS Lett **433(3): 287-93.**

Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer Statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58(2): 71-96.**

Johnson, D. and W. Blot (2008). Chapter 76 – Cancer of the Lung: Non-Small

- Cell Lung Cancer and Small Cell Lung Cancer. Abeloff's Clinical Oncology. M. Abeloff and J. Amitage. Philadelphia, PA Churchill Livingstone Elsevier.
- Kiso, Y., Y. Suzuki, et al. (1983). "Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes." Planta Med **49**(3): 185-7.
- Kiuchi, F., Y. Goto, et al. (1993). "Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids." Chem Pharm Bull (Tokyo) **41**(9): 1640-3.
- Kohler, C., S. Orrenius, et al. (2002). "Evaluation of caspase activity in apoptotic cells." J Immunol Methods **265**(1-2): 97-110.
- Korsmeyer, S. J. (1999). "BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death." Cancer Res **59**(7 Suppl): 1693s-1700s.
- Kubista, M., J. M. Andrade, et al. (2006). "The real-time polymerase chain reaction." Mol Aspects Med **27**(2-3): 95-125.
- Kuttan, R., P. Bhanumathy, et al. (1985). "Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*)." Cancer Lett **29**(2): 197-202.
- Lampe, V. a. M., J. (1913). "Curcumin." Ber. Dtsch. Chem. Ges. **46**: 2235-2240.
- Lin, S. S., H. P. Huang, et al. (2008). "DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade- and mitochondrial-dependent pathway." Cancer Lett.
- Lin, Y. G., A. B. Kunnumakkara, et al. (2007). "Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway." Clin Cancer Res **13**(11): 3423-30.
- LoTempio, M. M., M. S. Veena, et al. (2005). "Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **11**(19 Pt 1): 6994-7002.
- Macgregor, H. E. (2006). Out of the spice box, into the lab. Los Angeles Times. Los Angeles, CA.

- Micheau, O., E. Solary, et al. (1999). "Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs." J Biol Chem **274**(12): 7987-92.
- Milobedzka, J., V. Kostanecki, S. and Lampe, V. (1910). "Curcumin." Ber. Dtch. Chem. Ges. **43**: 2163-70.
- Moragoda, L., R. Jaszewski, et al. (2001). "Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells." Anticancer Res **21**(2A): 873-8.
- Mukherjee, P. K. and A. Wahile (2006). "Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines." J Ethnopharmacol **103**(1): 25-35.
- Mukhopadhyay, A., C. Bueso-Ramos, et al. (2001). "Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines." Oncogene **20**(52): 7597-609.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.
- Newman, D. J., G. M. Cragg, et al. (2003). "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002." J Nat Prod **66**(7): 1022-37.
- Nirmala, C. and R. Puvanakrishnan (1996). "Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats." Mol Cell Biochem **159**(2): 85-93.
- Nur-E-Kamal, A., S. R. Gross, et al. (2004). "Nuclear Translocation of Cytochrome c during Apoptosis." J. Biol. Chem. **279**(24): 24911-24914.
- Odot, J., P. Albert, et al. (2004). "In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells." Int J Cancer **111**(3): 381-7.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2003). "Roles of CHOP//GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-389.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Pepper, W. (1850). "Cases of cancer of the lung and mediastinum." Trans Coll

- Physicians Phila **1**: 96-110.
- Radhakrishna Pillai, G., A. S. Srivastava, et al. (2004). "Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin." Cancer Letters **208**(2): 163-170.
- Ramachandran, C., S. Rodriguez, et al. (2005). "Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines." Anticancer Res **25**(5): 3293-302.
- Ramsewak, R. S., D. L. DeWitt, et al. (2000). "Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*." Phytotherapy **7**(4): 303-8.
- Rao, C. V., A. Rivenson, et al. (1995). "Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound." Cancer Res **55**(2): 259-66.
- Rao, R. V., H. M. Ellerby, et al. (2004). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program." Cell Death Differ **11**(4): 372-380.
- Ravindran, P. (2006). Turmeric--the golden spice of life. Turmeric: The genus Curcuma, Taylor and Francis Group: 1-14.
- Reuter, S., S. Eifes, et al. (2008). "Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells." Biochem Pharmacol **76**(11): 1340-51.
- Rijkers, G. T., L. B. Justement, et al. (1990). "Improved method for measuring intracellular Ca⁺⁺ with fluo-3." Cytometry **11**(8): 923-7.
- Rottenberg, H. and S. Wu (1998). "Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells." Biochim Biophys Acta **1404**(3): 393-404.
- Ruby, A. J., G. Kuttan, et al. (1995). "Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids." Cancer Lett **94**(1): 79-83.
- Ryu, E. K., Y. S. Choe, et al. (2006). "Curcumin and Dehydrozingerone Derivatives: Synthesis, Radiolabeling, and Evaluation for beta-Amyloid

- Plaque Imaging." Journal of Medicinal Chemistry **49**(20): 6111-6119.
- Sa, G. and T. Das (2008). "Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death." Cell Div **3**: 14.
- Shao, R. G., C. X. Cao, et al. (2001). "Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells." Oncogene **20**(15): 1852-9.
- Sreejayan and M. N. Rao (1997). "Nitric oxide scavenging by curcuminoids." J Pharm Pharmacol **49**(1): 105-7.
- Srinivasan, M. (1972). "Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject." Indian J Med Sci **26**(4): 269-70.
- Srivastava, R., M. Dikshit, et al. (1985). "Anti-thrombotic effect of curcumin." Thromb Res **40**(3): 413-7.
- Strimpakos, A. S. and R. A. Sharma (2008). "Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials." Antioxid Redox Signal **10**(3): 511-45.
- Suzuki, T., K. Fujikura, et al. (1997). "DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy." J Histochem Cytochem **45**(1): 49-53.
- Tamura, M., T. Tamura, et al. (1988). "The superoxide-generating respiratory burst oxidase of human neutrophil plasma membrane. Phosphatidylserine as an effector of the activated enzyme." J Biol Chem **263**(33): 17621-6.
- Thakur, R., Puri, H. S. and Husain, A. (1989). Major medicinal plants of India, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow.
- Wang, W. Z., J. Cheng, et al. (2008). "Abrogation of G2/M arrest sensitizes curcumin-resistant hepatoma cells to apoptosis." FEBS Lett **582**(18): 2689-95.
- Yang, K. Y., L. C. Lin, et al. (2007). "Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **853**(1-2): 183-9.
- Yeh, C. J., B. L. Hsi, et al. (1981). "Propidium iodide as a nuclear marker in

immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies." J Immunol Methods **43**(3): 269-75.

Yoshino, M., M. Haneda, et al. (2004). "Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death." Toxicology in Vitro **18**(6): 783-789.

紀炳銓 (2008). 五倍子酸誘發大細胞肺癌細胞株 NCI-H460 凋亡之機轉研究. 臨床醫學研究所. 台中市, 中國醫藥大學. 碩士.

國家中醫藥管理局〈中華本草〉編委會 (1999). 薑科, 薑黃. 中華本草. 上海, 上海科學技術出版社. **8**.

黃俊銘 (2002). 薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株(COLO-205)的影響. 中西醫結合研究所. 台中市, 中國醫藥大學. 碩士.

