

中國醫藥大學
醫學檢驗生物技術學系碩士班
碩士論文

苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯會誘導人類前列腺癌細胞株(DU-145)細胞週期停滯和造成細胞凋亡

Benzyl Isothiocyanate and Phenethyl Isothiocyanate
Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human
Prostate Cancer DU-145 Cells

指導教授：鍾景光 教授

研究生：黃雅婷

中華民國九十八年六月

誌 謝

首先要感謝我的父母，因為他們的支持，我才能無憂無慮的專心唸碩士班。接著，要感謝的人就是我的指導教授鍾景光教授，因為鍾老師出錢出力我才能順利完成我的研究，以及感謝鍾老師的教導，才能讓我對於抗癌藥物的研究有一點點的成績。

能夠完成這篇論文要感謝的人實在太多了，一路上幫助我的人也太多了，當然還要感謝來幫我口試的委員們，包括我的指導教授鍾景光教授、醫技系系主任林振文教授以及台灣大學食品科技研究所沈立言教授，因為他們的耐心指導，讓我的論文能夠修改的更完整。

最後，我要感謝實驗室的學長姐、同學以及學弟妹們，感謝你們在實驗上的幫助，我才能順利完成我的研究，以及許多已經畢業的學長姐，因為有你們的幫忙，我才能突破寫論文的困境。這篇論文真的有太多人的幫忙才能完成，我衷心的感謝那些幫助我的人，謝謝你們，讓我的碩士學業交了一張漂亮的成績單！

民國九十八年六月 黃雅婷 於中國醫藥大學醫技所 謹致

總目錄

總目錄.....	I
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XX
中文摘要.....	XXI
英文摘要.....	XXII
第一章 前言.....	1
第一節 研究背景.....	2
一、苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的介紹.....	2
(一) 苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的來源.....	2
(二) 苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的相關文獻探討.....	3
二、前列腺癌的介紹.....	4
(一) 前列腺癌的成因.....	4
(二) 前列腺癌目前的臨床治療.....	5
三、細胞週期的調控.....	6
(一) 細胞週期的介紹.....	6
(二) 細胞週期的相關調控分子.....	9
(a) 細胞週期素(Cyclins).....	9
(b) 細胞週期素依賴性激酶(cyclin dependent kinases ; CDKs)..	11

(c) CDK 抑制蛋白(CDK inhibitors ; CDKIs).....	11
四、細胞凋亡.....	13
(一)細胞凋亡的定義.....	13
(二)細胞凋亡的調控機轉.....	13
(1) 外在路徑，又稱為死亡接受體路徑 (Death receptor pathway)	
(a) TNFR1 (Tumour Necrosis Factor Receptor-1).....	14
(b) TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand).....	14
(c) Fas/FasL (CD95/CD95L).....	14
(2) 內在路徑，又稱為粒線體路徑 (Mitochondrial pathway)	15
(a) Bcl-2 family.....	15
(b) 細胞凋亡誘導因子 (Apoptosis inducing factor ; AIF).....	16
(c) 內核酶 (Endonuclease G; Endo G).....	17
(d) Caspase enzyme family.....	17
(3) 內質網壓力(Endoplasmic Reticulum Stress; ER Stress).....	19
(4) 活性氧化物質 (Reactive oxygen species; ROS).....	21
第二節 研究目的.....	22
第二章 研究方法.....	23
第一節 研究設計.....	23
第二節 研究材料.....	24
一、細胞株.....	24

二、實驗藥物.....	24
三、藥品試劑.....	24
四、儀器設備.....	28
第三節 實驗方法.....	30
一、實驗藥品配置.....	30
二、細胞培養.....	30
(一)配置細胞培養基.....	30
(二)細胞株培養條件.....	30
(三)活化冷凍細胞.....	31
(四)細胞計數.....	32
(五)冷凍細胞株.....	33
三、流式細胞儀的應用.....	33
(一)細胞存活率的分析.....	34
(二)細胞週期的分析.....	36
(三)細胞內粒線體膜電位的分析.....	38
(四)細胞內活性氧化物質的分析.....	40
(五)細胞內鈣離子濃度的分析.....	42
(六)細胞內 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 活性的分析.....	44
四、DNA 損傷的檢測.....	46

(一)DAPI (4-6-diamidine-2-phenyl indole)染色法.....	46
(二)彗星試驗 (Comet assay).....	47
(三) DNA 斷裂電泳分析.....	50
五、西方點墨法.....	51
(一)細胞蛋白的抽取技術.....	51
(二)細胞蛋白濃度的定量.....	52
(三)SDS-PAGE 電泳分析.....	53
六、間接免疫螢光染色法(Indirect immunofluorescence).....	58
七、共軛焦顯微鏡觀察.....	60
八、細胞轉移偵測試驗.....	61
九、活性氧化物抑制劑對於細胞存活率的影響.....	61
十、Caspase 抑制劑對於細胞存活率的影響.....	63
十一、統計方法.....	64
第三章 實驗結果.....	64
第一節 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 型態的影響.....	64
第二節 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活 率的影響.....	65
第三節 苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 細	

胞週期的影響.....	66
第四節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 粒 線體膜電位的改變.....	66
第五節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 產 生活性氧化物(Reactive Oxygen Species).....	67
第六節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 鈣 離子的釋放.....	67
第七節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 Caspase-3, Caspase-9 活性的上升.....	68
第八節 苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 DNA 的損傷.....	68
第九節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 凋 亡相關蛋白的表現.....	70
(一)利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列 腺癌細胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現.....	70
(二)利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列 腺癌細胞株 DU-145 細胞凋亡路徑蛋白的表現.....	71
1. 粒線體路徑相關蛋白的表現.....	71
2. 內質網壓力 (ER stress) 調控細胞凋亡路徑相關蛋白的	

表現.....	72
3. 活性氧化物(ROS)相關蛋白的表現.....	72
(三) 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列 腺癌細胞株 DU-145 細胞轉移相關調控蛋白的表 現.....	73
第十節 利用共軛焦顯微鏡觀察苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列 腺癌細胞株 DU-145 凋亡相關蛋白的細胞分布情形....	73
第十一節 苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 轉移的影響.....	74
第十二節 苯甲基異硫氰酸酯加入 N-acetylcysteine 會抑制人類前 列腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降.....	74
第十三節 苯甲基異硫氰酸酯加入 caspase 抑制劑會抑制人類前 列腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降.....	75
第十四節 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細 胞型態的影響.....	75
第十五節 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 存 活率的影響.....	76
第十六節 苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響.....	77

第十七節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145	
粒線體膜電位的改變.....	78
第十八節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145	
產生活性氧化物(Reactive Oxygen Species).....	78
第十九節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145	
鈣離子的釋放.....	78
第二十節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145	
Caspase-3, Caspase-8 活性的上升.....	79
第二十一節 苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株	
DU-145 DNA 的損傷.....	79
第二十二節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株	
DU-145 凋亡相關蛋白的表現.....	81
(一)利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前	
腺癌細胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現...81	
(二)利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前	
列腺癌細胞株 DU-145 細胞凋亡路徑蛋白的表現 82	
1. 粒線體路徑相關蛋白的表現.....	82
2. 死亡接受器路徑相關蛋白的表現量.....	83
3. 內質網壓力 (ER stress) 調控細胞凋亡路徑相關蛋白	

的表現.....	83
4. 活性氧化物(ROS)相關蛋白的表現.....	84
(三)利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前 列腺癌細胞株 DU-145 細胞增生相關調控蛋白的表 現.....	84
第二十三節 利用共軛焦顯微鏡觀察苯乙基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 凋亡相關蛋白的細胞分布情 形.....	84
第二十四節 苯乙基異硫氰酸酯加入 N-acetylcysteine 會抑制人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降.....	85
第二十五節 苯乙基異硫氰酸酯加入 caspase 抑制劑會抑制人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降.....	86
第四章 討論.....	134
第五章 結論.....	138
第六章 參考文獻.....	142

圖目錄

圖 1-1 前列腺的生理位置.....	4
圖 1-2 細胞凋亡的內在路徑與外在路徑圖.....	19
圖 1-3 內質網壓力與細胞凋亡路徑圖.....	20
圖 1-4 ROS 造成細胞凋亡的相關路徑.....	21
圖 2-1 流式細胞儀 PI 染色之細胞存活率分析圖.....	34
圖 2-2 流式細胞儀 PI 染色之細胞週期分析圖.....	37
圖 2-3 粒線體膜電位軟體分析圖.....	40
圖 2-4 ROS 軟體分析圖.....	42
圖 2-5 鈣離子濃度軟體分析圖.....	44
圖 2-6 Caspase-3, 8, 9 活性軟體分析圖.....	46
圖 2-7 轉漬夾的內部組成.....	57
圖 2-8 無菌膠帶黏貼載玻片於培養皿中的示意圖.....	58
圖 2-9 覆蓋 parafilm 於載玻片上細胞區域示意圖.....	59
圖 2-10 脫除載玻片上覆蓋的 parafilm 示意圖.....	60
圖 3-1-A 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞形態 的影響.....	87
圖 3-1-B 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞形態 的影響.....	87

圖 3-2-A 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞存活率的影響.....	88
圖 3-2-B 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞存活率的影響.....	89
圖 3-3-A 不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響.....	90
圖 3-3-B 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後對於細胞週期的影響.....	91
圖 3-3-C 不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響.....	92
圖 3-3-D 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後對於細胞週期的影響.....	93
圖 3-4-A 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞粒線體膜電位的改變，此為電腦分析結果的重疊圖.....	94
圖 3-4-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞粒線體膜電位的改變，此為粒線體膜電位相對量之統計圖.....	94
圖 3-4-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145	

作用不同時間後，分析細胞粒線體膜電位的改變，此為電腦 分析結果的重疊圖.....	95
圖 3-4-D 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞粒線體膜電位的改變，此為粒線 體膜電位相對量之統計圖.....	95
圖 3-5-A 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 ROS 的產生，此為電腦分析 結果的重疊圖.....	96
圖 3-5-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 ROS 的產生，此為 ROS 相對 表現量之統計圖.....	97
圖 3-5-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，儀分析細胞內 ROS 的產生，此為電腦分 析結果的重疊圖.....	97
圖 3-5-D 以 10 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 ROS 的產生，此為 ROS 相對 表現量之統計圖.....	98
圖 3-6-A 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內鈣離子的產生，此為電腦分析	

結果的重疊圖.....	99
圖 3-6-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內鈣離子的產生，此為鈣離子相 對表現量之統計圖.....	99
圖 3-6-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內鈣離子的產生，此為電腦分析 結果的重疊圖.....	100
圖 3-6-D 以 10 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內鈣離子的產生，此為鈣離子相 對表現量之統計圖.....	100
圖 3-7-A 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-3 的活性，此為電腦 分析結果的重疊圖.....	101
圖 3-7-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-3 的活性，此為 caspase-3 的活性相對表現量之統計圖.....	102
圖 3-7-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-3 的活性，此為電腦 分析結果的重疊圖.....	102

圖 3-7-D	以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-3 的活性，此為 caspase-3 的活性相對表現量之統計圖.....	103
圖 3-7-E	以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-9 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖.....	104
圖 3-7-F	以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-9 的活性，此為 caspase-9 的活性相對表現量之統計圖.....	104
圖 3-7-G	以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-8 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖.....	105
圖 3-7-H	以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-8 的活性，此為 caspase-8 的活性相對表現量之統計圖.....	105
圖 3-7-I	以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，分析細胞內 caspase-9 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖.....	106
圖 3-7-J	以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145	

作用不同時間後，分析細胞內 caspase-9 的活性，此為 caspase-9 的活性相對表現量之統計圖.....	107
圖 3-8-A 不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形.....	107
圖 3-8-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形.....	108
圖 3-8-C 不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形.....	109
圖 3-8-D 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形.....	109
圖 3-8-E 不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 48 小時後，利用 DAPI 染色來觀察 DNA 斷裂受損的情形.....	110
圖 3-8-F 不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 48 小時後，利用 DAPI 染色來觀察 DNA 斷裂	

受損的情形.....	110
圖 3-8-G 不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形.....	111
圖 3-8-H 不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形，此為利用 CometScore 量化後的統計 圖.....	111
圖 3-8-I 不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形.....	112
圖 3-8-J 不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形，此為利用 CometScore 量化後的統計 圖.....	113
圖 3-9-A 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細 胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現.....	114
圖 3-9-B 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細 胞株 DU-145 粒線體路徑相關蛋白的表現.....	115

圖 3-9-C 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 內質網壓力路徑相關蛋白的表現.....	116
圖 3-9-D 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 活性氧化物相關蛋白的表現.....	117
圖 3-9-E 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞轉移相關蛋白的表現.....	118
圖 3-9-F 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現.....	119
圖 3-9-G 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 粒線體路徑相關蛋白的表現.....	120
圖 3-9-H 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 死亡接受器路徑相關蛋白的表現.....	121
圖 3-9-I 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 內質網壓力路徑相關蛋白的表現.....	122
圖 3-9-J 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 活性氧化物相關蛋白的表現.....	122
圖 3-9-K 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞增生相關蛋白的表現.....	123
圖 3-10-A 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145	

作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 AIF 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量.....	124
圖 3-10-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 Endo G 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量。.....	124
圖 3-10-C 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 GADD153 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量.....	125
圖 3-10-D 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 Endo G 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量.....	126
圖 3-10-E 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 GADD153 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量.....	126
圖 3-11-A 以 2.5 μ M、5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時和 48 小時後，藥物對細胞轉移抑制的情形.....	127
圖 3-12-A 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後	

測其存活率.....	128
圖 3-12-B 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 48 小時後 測其存活率.....	128
圖 3-12-C 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯乙基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後 測其存活率.....	129
圖 3-12-D 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯乙基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 48 小時後 測其存活率.....	129
圖 3-13-A 加入 caspase-3 抑制劑能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後 測其存活率.....	130
圖 3-13-B 加入 caspase-9 抑制劑能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 48 小時後 測其存活率.....	130
圖 3-13-C 加入 caspase-3 抑制劑能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後 測其存活率	131

圖 3-13-D 加入 caspase-8 抑制劑能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響, 藥物作用 24 小時後 測其存活率	132
圖 3-13-E 加入 caspase-9 抑制劑能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類 前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響, 藥物作用 24 小時後 測其存活率	132
圖 5-1 苯甲基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 走向細胞 凋亡的機轉.....	140
圖 5-2 苯乙基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 走向細胞 凋亡的機轉.....	140



表目錄

表 1-1 民國 96 年國人十大癌症死亡原因.....	2
表 2-1 彗星試驗之 Lysis buffer 的配置.....	49
表 2-2 彗星試驗之 Alkaline buffer 的配置.....	49
表 2-3 彗星試驗之 Tris buffer 的配置.....	49
表 2-4 蛋白質標準品的配置.....	52
表 2-5 下層膠的配置組成.....	53
表 2-6 上層膠的配置組成.....	54
表 2-7 Running buffer (1.5 M Tris-HCl) 的配置組成.....	54
表 2-8 Stacking buffer (0.5 M Tris-HCl) 的配置組成.....	54
表 2-9 Transfer buffer 的組成.....	57
表 2-10 0.1% PBS-Tween20 的組成.....	57

中文摘要

苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯是來自於十字花科蔬菜的衍生物，常見的十字花科蔬菜包含了花椰菜、甘藍菜、芥菜…等。已有文獻指出苯甲基異硫氰酸酯會造成多種人類癌細胞株的凋亡，例如：卵巢癌細胞、乳癌細胞和胰臟癌細胞。另外，也有文獻指出苯乙基異硫氰酸酯會造成人類非小細胞肺癌和前列腺癌細胞(PC-3)的凋亡。但是苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 的凋亡機轉則尚未有較詳細的報導，所以本研究即是探討苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 的相關凋亡機轉。由結果顯示，苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯確實會造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期停滯以及誘導細胞凋亡的產生。除此之外，苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯也會造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 粒線體膜電位的改變，活性氧化物質和鈣離子的釋放以及造成 DNA 的損傷。接著，由西方點墨法的結果發現苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯會造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 凋亡蛋白的增加和 Caspase 活性的上升。由此可知，苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯會造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 走向凋亡的命運，值得更進一步研究發展為抗癌藥物。

Abstract

Benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate, are derived isothiocyanates from cruciferous vegetable, including watercress, broccoli and cabbage. Benzyl isothiocyanate has been shown that to induce cell cycle arrest and apoptosis in many human cancer cell lines, such as ovarian cancer cells, breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells and pancreatic cancer Capan-2 cells. Phenethyl isothiocyanate also has been shown that to induce cell cycle arrest and apoptosis in many human cancer cell lines, such as human non-small lung cancer cells, prostate cancer PC-3 cells (Prostate cancer metastasized to bone). In this study, we investigate the effect of benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on human prostate cancer DU-145 cells, the results demonstrate that benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate induced cause G₂ / M phase arrest and apoptosis. These effects are in a dose- and time-dependent manners. Besides, benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate also decreased the levels of mitochondria membrane potential, induced reactive oxygen species and calcium ion production in examined DU-145 cells. Benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate induced apoptosis of DU-145 cells which also were confirmed by DAPI staining and DNA gel electrophoresis. Western blotting show that benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate treatment gradually decreased the level of anti-apoptotic proteins, but increased the level of pro-apoptotic proteins. Besides, benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate increased caspase-3 activity. Therefore, benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate

induce apoptosis in human prostate cancer DU-145 cells.



第一章 前言

根據台灣衛生署的統計，惡性腫瘤為 97 年國人十大死亡原因的第一位⁽¹⁾，惡性腫瘤的死亡人數占率超過百分之二十八，已經連續蟬聯二十五年的十大死因榜首，平均每十三分三十秒就有一人死於癌症，所以惡性腫瘤為目前臨床醫療上相當重要的研究課題。

前列腺癌占 95 年台灣國人十大癌症死亡原因第七位⁽¹⁾，除了在台灣具有相當的重要性以外，在美國 2007 年所統計的男性癌症十大死因中⁽²⁾，前列腺癌更是高居第二位，所以治療前列腺癌是全球醫療的重要課題。

前列腺癌是出自前列腺的惡性腫瘤，前列腺是屬於男性生殖系統的一個腺體，若其中有細胞的基因突變導致細胞增生失控，就可能會形成癌症。但是目前臨床上對於前列腺癌的治療方法，都還未有能夠完全治癒又不會產生副作用的治療方法，治療前列腺的方法往往會導致患者產生副作用，所以目前臨床醫學上需要有更有效的前列腺癌治療方法。

順位	癌症死亡原因	死亡率(%)
1	肺癌(Trachea, bronchus, and lung cancer)	27.9
2	肝癌(Liver and intrahepatic bile ducts cancer)	28.1
3	結腸直腸癌(Colon and rectum cancer)	15.6
4	女性乳癌(Female breast cancer)	11.1
5	胃癌(Stomach cancer)	8.5
6	口腔癌(Oral cavity cancer)	8.3
7	攝護腺癌(Prostate cancer)	6.7
8	子宮頸癌(Cervix uteri cancer)	5.8
9	食道癌(Oesophagus cancer)	5.2
10	胰臟癌(Pancreas cancer)	4.8

表 1-1 民國 96 年國人十大癌症死亡原因⁽¹⁾

第一節 研究背景

一、苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的介紹

(一) 苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的來源

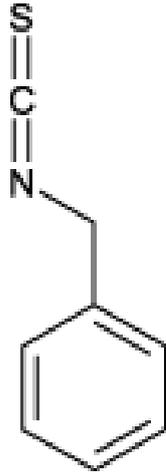
苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的主要結構是來自十字花科蔬菜的衍生物，常見的十字花科蔬菜有甘藍菜、綠花椰菜、水田芥…等⁽³⁾⁽⁴⁾。

苯甲基異硫氰酸酯(benzyl isothiocyanate ; BITC)

分子式：Ph-CH₂-N=C=S

分子量：149.22

化學結構式⁽⁸⁷⁾：



苯乙基異硫氰酸酯(phenethyl isothiocyanate ; PEITC)

分子式：Ph-CH₂-CH₂-N=C=S

分子量：163.24

化學結構式⁽⁸⁸⁾：



(二) 苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的相關文獻探討

目前已有相關文獻證實苯甲基異硫氰酸酯能夠造成人類胰臟癌細胞株的 DNA 損傷，並且使細胞週期停滯在 G2/M phase，而使細胞走向凋亡⁽⁵⁾，除此之外，苯甲基異硫氰酸酯也被證實對於人類乳癌細胞株也會誘導其細胞凋亡⁽⁶⁾。而苯乙基異硫氰酸酯也有研究指出會造成人類非小型細胞肺癌的凋亡⁽⁷⁾，以及會誘導人類血癌細胞株⁽⁸⁾、子宮

頸癌細胞株⁽⁹⁾ 和乳癌細胞株⁽¹⁰⁾的凋亡。

二、前列腺癌的介紹

(一)前列腺癌的成因

前列腺癌是出自前列腺的惡性腫瘤，前列腺又稱為攝護腺，是屬於男性生殖系統的一個腺體，所以只有男性會罹患前列腺癌，最常發生於 50 歲以上的人。惡性癌細胞除了體積擴大或侵犯鄰近器官，也可能轉移到身體其他部位，尤其是骨頭和淋巴結。前列腺癌可能造成疼痛、排尿困難、勃起功能不全等症狀。會導致前列腺癌的原因，目前尚未清楚，但是研究指出可能跟年齡、飲食、遺傳、環境…等有相關⁽¹¹⁾。

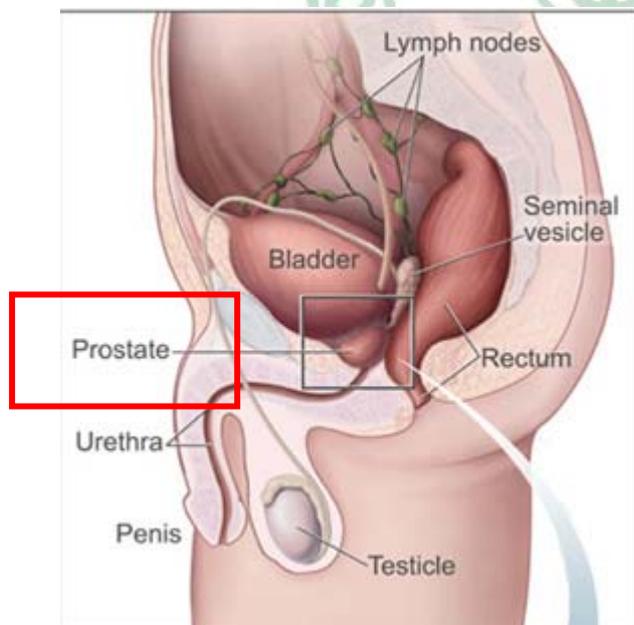


圖 1-1 前列腺的生理位置⁽⁸⁹⁾

年齡：前列腺癌多發生在 65 歲以上的高齡男性，可見這是一種老年

人的癌症，根據病理學家的研究，這種癌症和人類組織老化有關。

種族：一般來說，黃種人較不易罹患前列腺癌。據美國的統計，美國的黑人是世界前列腺癌最好發的人種。

遺傳：有前列腺癌的家族史時，前列腺癌的發生危險度會明顯升高，若有一等親患有前列腺癌，則發生前列腺癌的機會是一般人的 2~4 倍。有家族史的人罹患前列腺癌的年齡都較年輕，約在 45~60 歲之間。

荷爾蒙：人體雄性素的來源，百分之九十以上來自於睪丸，因此前列腺癌與荷爾蒙是有密切關係的。

飲食：高脂肪和缺乏綠色蔬菜的攝取是前列腺癌的促進因子。由於西方人的飲食習慣長久以來以高脂肪的漢堡速食為主，可能因此導致高前列腺癌的罹患率⁽¹²⁾。

(二) 前列腺癌目前的臨床治療

前列腺癌目前的臨床治療方法包括手術、放射治療、荷爾蒙治療，有時也做化學治療，這幾種療法可以合併運用⁽¹³⁾。

手術：前列腺切除術常用於早期前列腺癌，或放射治療效果不佳的患者。前列腺根除術對於癌細胞侷限於前列腺內的患者相當有效，但是手術過程中難免會傷到一些神經，而影響到患者的生活品質，最常見的併發症是尿失禁和陽萎。

放射治療：是以集中的輻射線破壞前列腺內的癌細胞，使癌細胞無法持續增長。

荷爾蒙治療：是用內科或外科的方法，使攝護腺癌細胞無法獲得二氫睪固酮(DHT)，DHT是在前列腺中產生的一種荷爾蒙、使大部份前列腺癌細胞能夠生長與擴散。阻止二氫睪固酮(DHT)，通常使得攝護腺癌停止生長甚至萎縮。但是荷爾蒙療法很少治癒攝護腺癌，因為癌症最初對荷爾蒙療法有反應，但在一到二年以後癌症對治療有抗性。

由於早期前列腺癌沒有任何症狀，所以不易被察覺，可說是中老年男性的隱性殺手，因此發現罹癌的年齡大多較晚，以65至75歲之間的比率較高，當前列腺癌造成患者排尿不適的症狀時，多已是晚期，也不適合施以手術治療了。對於大多數癌症患者來說，手術切除癌症病灶是治療早期癌症最直接有效的方法，一旦癌症侵犯周邊組織或是淋巴腺等器官，則手術切除就有可能殘留癌細胞在切除部位而可能引起復發，造成患者在手術後還必須做局部放射線治療或是藥物治療，這不僅增加了患者的痛苦，同時也不易將癌細胞完全清除。

三、細胞週期的調控

(一)細胞週期的介紹⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

從親代細胞進行細胞分裂，分裂形成兩個子代細胞的過程時間，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。細胞週期主要可分為三個時期：細胞生長期、DNA 複製期、細胞分裂期。細胞週期可分為Interphase(包含G1、S和G2 phase)及Mitosis (M) phase⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾，而在整個細胞週期的過程中，則會有三個checkpoints來決定細胞週期能否進入下一個時期。

G0 phase：為細胞靜止期，又稱為senescence或quiescence，經由某些分子刺激，可進行分化或進入G1 phase。

G1 phase：G意指為Gap，G1 phase介於M phase和S phase的中間，細胞會複製本身胞器與蛋白質，增加體積，準備進入S phase，此期間可長達數小時至數天之久，此時期細胞開始生長，同時產生RNA及合成蛋白質，複製胞器，細胞體積增加，目的是為了DNA複製做準備，而此時期的染色體數目為2N。由G1 phase要進入S phase為第一個checkpoint。

S phase：S意指為Synthesis，此時期細胞主要是進行DNA複製的工作，此時期所需10~12小時，而此時期的染色體數目介於2N~4N之間。

G2 phase：為S phase與mitosis的中間時期，為進入M phase做準備，此時在細胞核內的DNA含量由G1 phase的2N變成了4N，由S phase要進入M phase為第二個checkpoint。

M phase：M意指為Mitosis，為細胞週期最短的一期，此時期主要的

工作為進行細胞核與細胞質的分裂，又可細分為數個時期：

Prophase：核內複製完的染色體進行濃縮，胞質中mitotic spindle進行組裝，兩個centrosome分別向兩側移動。

Prometaphase：centrosome移至spindle pole處，核膜破裂，染色體藉由kinetochores附著到spindle microtubules上，並開始移動。

Metaphase：染色體排列於spindle pole中間的赤道板上，準備進行分裂，此時為第三個checkpoint。

Anaphase：複製完的染色體進行分裂成兩個子染色體，此時kinetochore microtubules開始縮短，spindle pole往外側移動。

Telophase：分裂完的子染色體移至spindle pole處，染色體開始decondense，新的核膜及細胞質中contractile ring開始形成。

Cytokinesis：核膜形成完全，細胞質分裂為二，細胞準備重新回到interphase。

當一個正常的細胞其DNA受到損傷時，便會啟動細胞中的修復機制，它們會使進行中的細胞週期停滯（cell cycle arrest）以緩衝正在受到傷害的細胞，所以當細胞週期停滯時，此時細胞正在進行修補作用，修復完全細胞便可順利進行運轉，倘若細胞無法修補已造成的損傷，那麼便會促使細胞走向凋亡作用，以避免錯誤遺傳至下一代。

(二)細胞週期的相關調控分子

(a) 細胞週期素(Cyclins)

Cyclins 和 CDKs 是主要調控細胞週期的蛋白，細胞週期的調控需要 CDKs 來活化 Cyclin，單獨的 CDKs 是無法使下游分子形成磷酸化，故兩者需結合形成複合物才具有活性進行細胞週期的運轉⁽¹⁸⁾。

目前已發現 12 種 cyclins，分別命名為 cyclin A~H⁽¹⁹⁾。Cyclins 的過度表達可以啟動 CDK 活性，造成細胞週期調節失控，導致腫瘤的形成，因此 cyclins 也被稱為癌蛋白。細胞週期中的各時期都會有特定的 Cyclin-CDK complex: G1 phase 為 Cyclin D-CDK4/6 complex 及 Cyclin E-CDK2complex, S phase 為 Cyclin A-CDK2 complex, G2/M phase 為 Cyclin B-CDK1complex。而 Cyclin H 與 CDK7 會形成一個具有酵素活性的複合物，可以活化 CDK1 (Cdc2) 與 CDK2⁽²⁰⁾。

G1 期的 cyclins 包括 cyclin C, D, E 等三型，其中後兩型是主要的 cyclins。cyclin D 至少有 D₁, D₂, D₃ 等三個亞型，三型 cyclin D 的胺基酸序列同源性達 53.1% ~ 63.5%，它們的 c 末端有一個富含脯氨酸 (P)、谷氨酸 (E)、天冬氨酸、絲氨酸 (S) 和蘇氨酸 (T) 的殘基序列，稱之為 PEST 序列，與蛋白質的降解有關；它們的 N 末端有

一個與某些轉化蛋白如 SV40 的 T 抗原、腺病毒 E₁A 蛋白、乳頭瘤病毒 E₇ 蛋白共同序列 Leu-X-Cys-X-Glu，此序列一樣可與 pRb 及 pRb 相關蛋白結合，隨後在 CDK4 / CDK6 的作用下，使 pRb 磷酸化，從而使細胞從 G1 期進入 S 期。一些生長因子 (growth factors, GFs) 可誘導它們的表達，一旦去除 GFs, cyclin D₁ 的水準會迅速下降，因此，稱它為生長因子感受器 (growth factor sensors)⁽²¹⁾。在 G1 期，給正常的成纖維細胞顯微注射抗 cyclin D₁ 抗體，能夠阻止細胞進入 S 期，但在接近 G1 / S 交界處時則注射無效，這一結果表明 cyclin D₁ 在 G1 的中晚期發揮著重要作用。cyclin E 在 G1 期的表達晚於 cyclin D₁，在 G1 / S 交界處達到高峰，進入 S 期後逐漸下降，給細胞顯微注射抗 cyclin E 抗體，可阻止細胞進入 S 期，因此被認為是調節 G1 / S 期轉換的必需蛋白⁽²²⁾。細胞進入 S 期後，cyclin E 降解，和它結合的 CDK2 被釋放出來和 cyclin A 結合。

S 期 cyclins 包括 cyclin A。它是 cyclins 中最早被發現的，在 G1 晚期於 cyclin E 之後表達，但直到 S 期與 CDK2 結合後才被啟動。給細胞顯微注射抗 cyclin A 抗體或反義 cyclin A 能抑制細胞 DNA 的合成，表明 cyclin A 在 S 期有重要作用。另外，它在 G2 期與 M 期和 CDC2 (CDK1) 結合，可能與有絲分裂有關，因此，cyclin A 也被稱為 M 期 cyclins。

(b) 細胞週期素依賴性激酶(cyclin dependent kinases ; CDKs)

目前已發現的 CDK 至少有九種⁽¹⁹⁾，分別命名為 CDC₂ (CDK1), CDK2 ~CDK9，它們在基因序列上的同源性高，超過 40%。活化的 CDK 包含 CDK 和一個 cyclin，前者還需要一個保守的 Thr 殘基上的磷酸化和 Tyr 殘基上的去磷酸化。

CDK 被啟動後，可使其下游蛋白發生磷酸化。未磷酸化的 pRb 能夠結合轉錄因數 E₂F，並抑制 E₂F 啟動 S 期相關基因的轉錄。磷酸化的 pRb 或 pRb 能導致 E₂F 的游離。游離的 E₂F 與 DP-1 形成異源二聚體，能夠結合到 DNA 的特定位點，啟動 S 期相關基因轉錄，使週期越過 restriction point，細胞即從 G1 期進入 S 期⁽²³⁾。

(c) CDK 抑制蛋白(CDK inhibitors ; CDKIs)

1992 年，Xiong 等在分離純 cyclin-CDK 複合物時，得到了另外一些蛋白質，後來證明其中某些蛋白是該複合物的抑制因子即 CDKIs⁽²⁴⁾。CDK inhibitors 就是抑制 CDK 活性的分子，CDKIs 在細胞週期中具有負性調節作用及多數在人類腫瘤中會突變且失去活性。CDKIs 根據它們序列同源性，主要可分為兩大家族：INK (Inhibitors of CDK4) 家族，包括 p16, p15, p18 和 p19，它們均包含四次錨蛋白 (ankyrin) 重

複結構和特異的調控 cyclin D-CDK4 或 cyclin D-CDK6 活性和 CIP/KIP 家族，包括 p21, p27 和 p57，它們抑制多種 cyclin-CDK 活性⁽²⁵⁾。

CIP/KIP 家族中 p57 主要跟細胞的分化比較有相關，而 p21, p27 則對於所有的 Cyclin-CDK complex 均有抑制作用⁽²⁶⁾。p21 基因定位於染色體 6p21.2，又稱為 cip1 (CDK-interacting protein 1)，waf1 (wild-type p53-activated fragment 1)。哺乳動物細胞中，p21 的功能至少有兩方面：一是 CDK 的抑制因子，另一個是能結合和抑制增殖細胞核抗原 (PCNA)，進而抑制 DNA 的複製。p21 能抑制多種 cyclin-CDK 活性，推測其突變可能是腫瘤形成的主要原因之一。然而目前除了在膀胱癌中發現一個終止密碼子的點突變外，尚未見到關於其他腫瘤細胞中 p21 基因突變的相關研究。p21 在基因轉錄上主要受 p53 調節和啟動，而 p53 基因突變在人類腫瘤中卻是常見的，故現認為 p21 基因主要失活機制與 p53 失活有關⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾。

而 INK 家族則是對於 CDK4 和 CDK6 具有選擇性抑制，會與 cyclin D 競爭 CDK4 和 CDK6 的結合區域，使 cyclin D 無法跟 CDK4 和 CDK6 形成有活性的 complex，而使得細胞週期停滯於 G1 phase⁽²⁹⁾。

四、細胞凋亡

(一)細胞凋亡的定義⁽³⁰⁾

細胞凋亡 (Apoptosis) 又稱為計畫性死亡 (programmed cell death; PCD)，是多細胞生物體受到刺激及發展過程中維持自我平衡的重要機制。細胞凋亡會造成細胞型態的改變，細胞膜的皺縮和細胞核的塌陷和瓦解，染色質濃縮成類似新月形碎片，胞內 DNA 被降解，細胞會逐漸皺縮與聚集，磷脂醯絲胺酸 (PS) 從胞內向外翻出... 等，但胞器與細胞的膜仍維持完整，同時細胞凋亡體 (apoptotic body) 形成，並由鄰近細胞或巨噬細胞所吞噬。

(二)細胞凋亡的調控機轉

細胞凋亡的路徑，主要可分為三大類⁽³¹⁾：

(1) 外在路徑，又稱為死亡接受體路徑 (Death receptor pathway)：

Death-receptor pathway 是指細胞膜表面存在著接受 apoptotic signals 的受器 (receptor)，例如：CD95 (Fas)，TNFR1 (Tumour Necrosis Factor Receptor-1)，TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) 等蛋白，而當這些死亡接受器蛋白與 death ligand (例如：Fas Ligand) 結合時，便會活化這些死亡接受器，而使細胞凋亡訊息傳遞到下游，繼續活化 caspase cascade，而導致細胞很快走向凋亡⁽³²⁾⁽³³⁾。

(a) TNFR1 (Tumour Necrosis Factor Receptor-1)

TNF 是由活化的巨噬細胞或是受感染的 T 細胞所產生的，TNF 和細胞膜表面的 TNFR1 結合後，會吸引 TRADD (TNFR-associated death domain) 結合至 TNFR1 膜內的 domain，進而活化 caspase-8，而使細胞走向凋亡。

(b) TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ⁽³⁴⁾

TRAIL 的 receptor 是 DR4 或 DR5，當 TRAIL 與 DR4 或 DR5 結合後會吸引 DR4/DR5 death domain 結合，進而活化 caspase-8 和 caspase-10，而使細胞走向凋亡。TRAIL 所造成的細胞凋亡路徑跟 Fas 很相似，最大的差異在於 FasL 的表現需要 T 細胞和自然殺手細胞(NK cell)的活化，而 TRAIL 的活化可以藉由許多組織的刺激來表現。

(c) Fas/FasL (CD95/CD95L)

Fas 是屬於 TNF (Tumour Necrosis Factor) receptor superfamily 中 type I 的膜蛋白，FasL 則是屬於 TNF (Tumour Necrosis Factor) receptor superfamily 中 type II 的膜蛋白，當 Fas 與 FasL 結合時，會活化 Fas receptor，並且吸引 FADD (Fas-associated death domain) 結合至 Fas receptor 位於細胞質中的 domain；另一方面，FADD 會進一步吸引多分子 procaspase-8 形成的 DISC (Death-inducing signaling complex)，

此時 procaspase-8 會因構形改變而活化成 caspase-8，而活化的 caspase-8 可以繼續活化下游的 caspase-3 和 caspase-7，而 caspase-3 又可以再活化 caspase-6，進而活化影響一連串的 caspase substrate；除此之外，活化的 caspase-8 會促使 Bcl-2 family 中的 Bid 裂解成 tBid，tBid 會位移至粒線體中，而促使粒線體釋放出 cytochrome *c*，接著活化 caspase-9 和 caspase-3，最後也會使細胞走向凋亡⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾。

(2) 內在路徑，又稱為粒線體路徑 (Mitochondrial pathway)：

誘發細胞凋亡最具代表性的就是粒線體路徑，當細胞受到細胞外或細胞內的壓力及傷害時，像是：放射性輻射、氧氣不足、藥物、DNA 損傷...等，會使細胞質的粒線體膜電位下降，膜孔打開促使 cytochrome *c* 從粒線體的 intermembrane space 釋放到細胞質中，與 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) 與 procaspase-9 結合形成 apoptosome，在 ATP 或 Dap 的存在下，進而活化 caspase-9，活化的 caspase-9 也會促使下游的 caspase-3、caspase-6、caspase-7 活化，最後誘導細胞走向凋亡⁽³⁷⁾。

(a) Bcl-2 family⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾

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

(anti-apoptotic protein) 這兩類蛋白。

功能	分類
Anti-apoptosis	Bcl-2 、 Bcl-xL 、 Bcl-w 、 Mcl-1 、 A1/Bfl-1 、 Boo/Diva 、 Bcl-B/Bcl-2L-10/Nrh
Pro-apoptosis	Bax 、 Bak 、 Bok/Mtd 、 Bcl-xs 、 Bcl-GL 、 Bad 、 Bid 、 Bik/Nbk 、 Blk 、 Hrk/DP5 、 Bim/Bod 、 Bmf 、 Nip3/BNIP3 、 Nix/Bnip3L 、 Noxa/APR 、 PUMA 、 MAP-1 、 Bcl-Gs

Bcl-2 family 這類的蛋白都含有 BH (Bcl-2 homology) domains，而且幾乎 C-terminal 都含有 transmembrane domain，使其可以存在粒線體、內質網、核膜上，但是促進凋亡的分子 Bad、Bid 則沒有，所以它們平常存在細胞質中，如果接受到死亡訊息則會 translocation 到膜上，尤其是粒線體膜上⁽⁴¹⁾，並且和促進凋亡分子結合，進而影響粒線體膜電位的平衡，造成粒線體形成孔洞，粒線體的通透性改變而使 cytochrome *c*、AIF (apoptosis induced factor)、Endo G (Endonuclease G) 外留至細胞質⁽⁴²⁾，cytochrome *c* 釋放至細胞質中會與細胞質中的 dATP、Apaf-結合後活化 caspase-9，而使細胞走向凋亡。

(b)細胞凋亡誘導因子 (Apoptosis inducing factor ; AIF)

細胞凋亡產生與細胞凋亡誘導因子 (Apoptosis inducing factor;AIF)

釋放具相關性，為caspase-independent cell death effector，其分子量57 kDa，存在粒線體內膜中，具有抑制Bcl-2 的能力。當粒線體的通道發生改變時，會從粒線體膜間腔釋出，經細胞質最後到細胞核，之後誘導染色質濃縮，最後造成DNA fragmentation而產生DNA裂解小片段⁽⁴⁴⁾。

(c)內核酸酶 (Endonuclease G; Endo G)⁽⁴³⁾

Endonuclease G是一種非專一性、非經Caspase活化的蛋白質，分子量為30 kDa，也是一種在真核細胞中含量數最多的核酸水解酶 (nuclease)，在DNA單股及雙股皆具有活性，能夠裂解雙股DNA、單股DNA、單股RNA，同時也具有多種生理活性包括：DNA修補、粒線體DNA複製、參與細胞凋亡等等，當細胞凋亡機制被啟動時Bcl-2 家族被活化的pro-apoptosis蛋白，例如：Bax、Bid等，會增加粒線體膜通透性導致Endo G蛋白由粒線體膜間腔釋放出來進入細胞核並且執行nuclease的功能將DNA分解，而形成DNA fragmentation。

(d) Caspase enzyme family

在細胞凋亡過程當中必需要仰賴一群酵素，即為凋亡蛋白酵素 Caspase (cysteine aspartyl-specific protease)，此種蛋白為一群具有專一性的cysteine protease，專門切割aspartic acid residues，能夠進行一

連串的蛋白質酶解作用(proteolysis cascade)。Caspase蛋白系列均具有相似的胺基酸序列、結構和專一性，都是以未活化的形式（pro-caspase）存在細胞質裡，再經由裂解而活化，Caspase主要可分為兩大類：initiator caspase 和effector caspase，initiator caspase受到外來或細胞內凋亡訊息傳遞活化後，才會進一步活化effector caspase，initiator caspase：包含了caspase-2、8、9、10，而 effector caspase：包括caspase-3、6、7。當粒線體凋亡機制被啟動時，此時存在粒線體中的cytochrome c會被釋放出來和細胞質中的Apaf-1結合，形成一個複合物進而活化caspase-9，進而活化caspase-3、6、7，而活化的caspase-3又會去裂解具有DNA修復功能的PARP (Poly ADP-ribose polymerase) 蛋白，由116 kDa裂解成85 kDa，使得DNA損傷無法修復。活化的caspase-3又會將ICAD (inhibitor of CAD)切除放出CAD (caspase-activated Dnase)造成DNA fragmentation，而使細胞走向凋亡路徑。而其中的caspase-3又被認為是The point-of-no- return，意思是指當細胞中的caspase-3蛋白一旦被啟動活化時，細胞便注定走向凋亡作用，因此caspase-3又可當作是細胞凋亡作用晚期的重要指標⁽⁴⁵⁾。

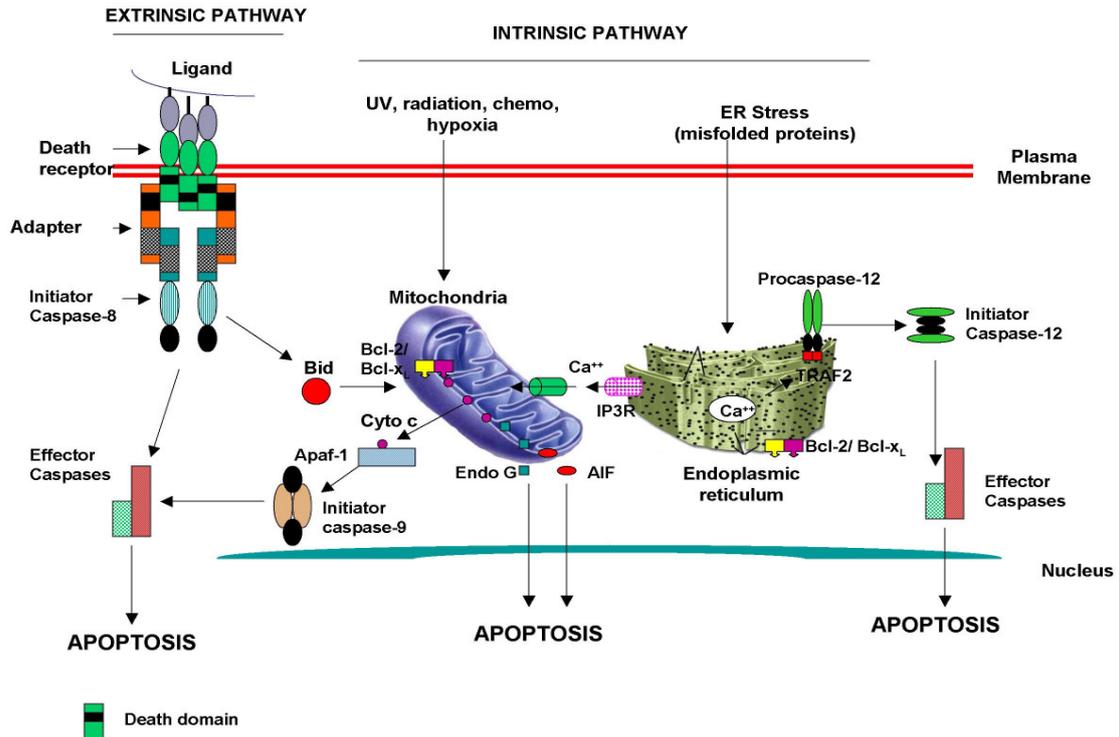


圖 1-2 細胞凋亡的內在路徑與外在路徑圖⁽⁹⁰⁾

(3) 內質網壓力 (Caspase-independent) :

一般來說細胞中的鈣離子 (Ca^{2+}) 會儲存在內質網中，當死亡訊息或藥物刺激下，會促使鈣離子從內質網釋放出來，導致細胞內外的鈣離子恆定改變⁽⁴⁶⁾，已有研究指出，鈣離子會影響粒線體膜電位，而使 cytochrome c 釋出，以及產生大量 ROS，進而導致細胞凋亡⁽⁴⁷⁾。而近年來已有多篇文獻探討內質網和細胞凋亡作用兩者之間的關係⁽⁴⁸⁾，當內質網受到外來環境的刺激，例如：藥物或是鈣離子濃度不平衡等等，皆會造成 ER stress(內質網壓力)，內質網(Endoplasmic Reticulum)也是蛋白質合成與修飾的地方，因此，當內質網受到傷害時會使得蛋

白質無法順利摺疊，形成 Unfolded Protein Response (UPR)、ER-associated degradation (ERAD) 等一連串反應⁽⁴⁹⁾，這時內質網上的功能蛋白 GRP78 便會被活化而與 Unfolded Protein 結合幫助蛋白質摺疊，另一方面 ER stress 時，也會啟動內質網上的三個感應器蛋白：IRE1、PERK、ATF-6，促使這些蛋白被激發活化進而產生大量的 GRP78 等蛋白⁽⁵⁰⁾，同時存在內質網中的鈣離子也會在 ER stress 發生時，大量地被釋放出至細胞質，進而影響粒線體膜通透性導致膜電位改變，最後誘發細胞產生凋亡，除此之外和 apoptosis 相關的 caspase-12 蛋白也會被 IRE1 活化，進而活化下游的 caspase 蛋白導致細胞 apoptosis。總之，大量的內質網壓力產生時，是會誘導細胞走向凋亡路徑的⁽⁵¹⁾。

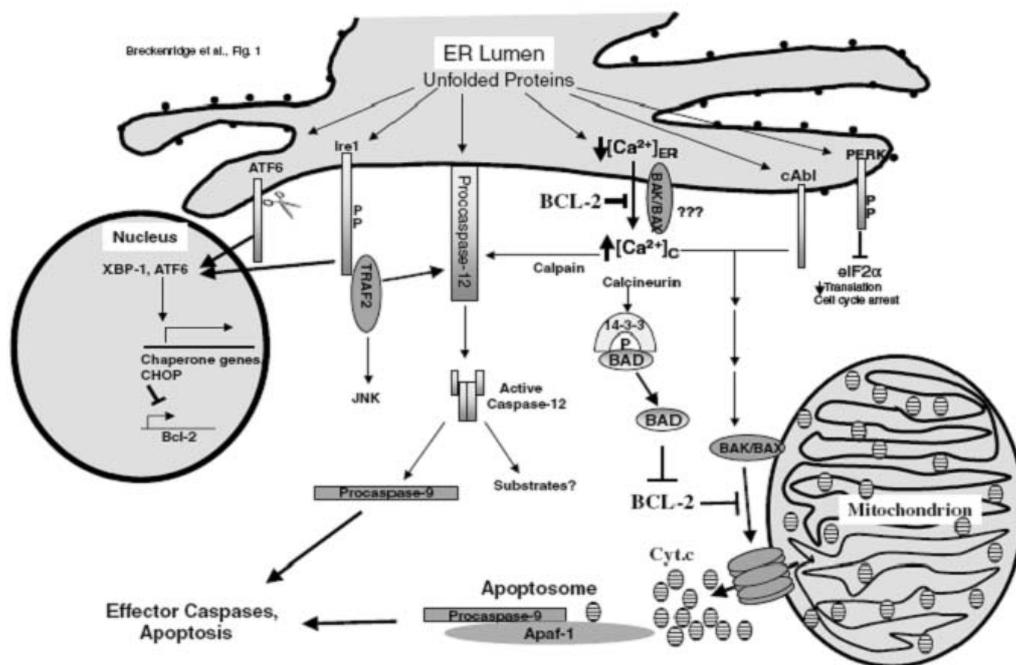


圖 1-3 內質網壓力與細胞凋亡路徑圖⁽⁵²⁾

(4) 活性氧化物質 (Reactive oxygen species ; ROS)

活性氧化物 (Reactive oxide species ; ROS) 在誘導細胞凋亡的過程中扮演相當重要的角色。ROS 誘導細胞凋亡有幾種主要路徑，第一，ROS 會活化 Fas/CD95，再繼續活化 caspase-8 使細胞凋亡進行；第二，ROS 攻擊內質網或粒腺體，誘導凋亡因子釋出讓細胞凋亡路徑產生；第三，ROS 攻擊 DNA，讓 DNA 損害造成細胞週期停滯，誘導產生細胞凋亡。近來有文獻指出，ROS 也會由粒線體所產生，於呼吸鏈反應中產生大量的超氧陰離子⁽⁵³⁾，ROS 會造成細胞內 DNA 的損傷進而誘導凋亡訊息的傳遞，許多外在的刺激皆會刺激細胞產生 ROS，來誘導細胞產生凋亡⁽⁵⁴⁾。ROS 的產生也可能會造成粒線體的通透性改變，而導致粒線體膜電位下降⁽⁵⁵⁾，促使粒線體路徑的發生。

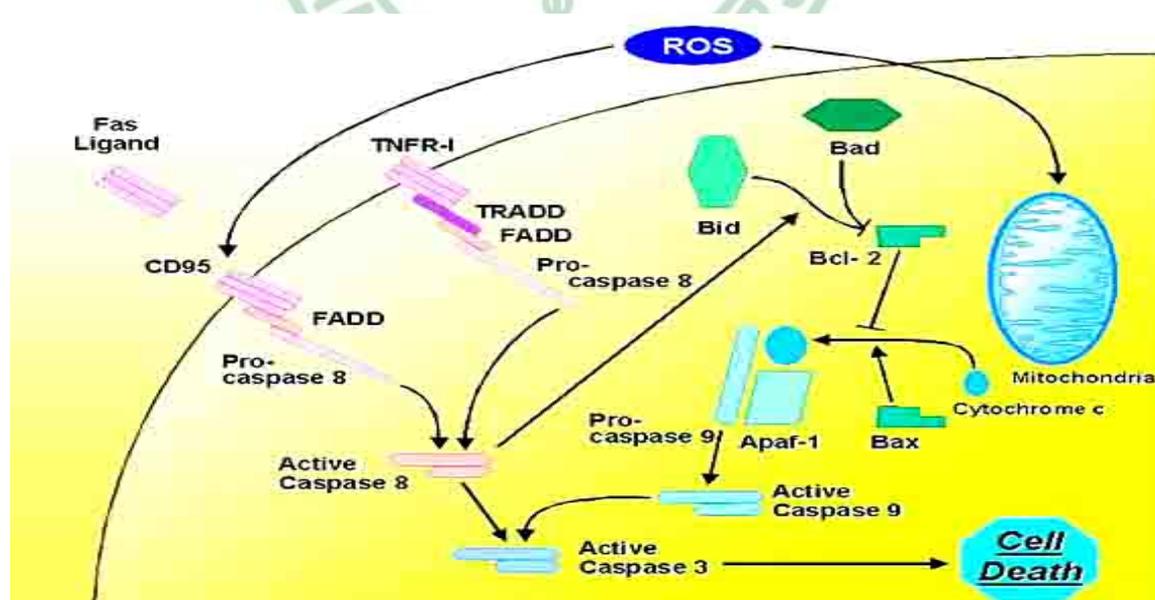


圖 1-4 ROS 造成細胞凋亡的相關路徑⁽⁵⁶⁾

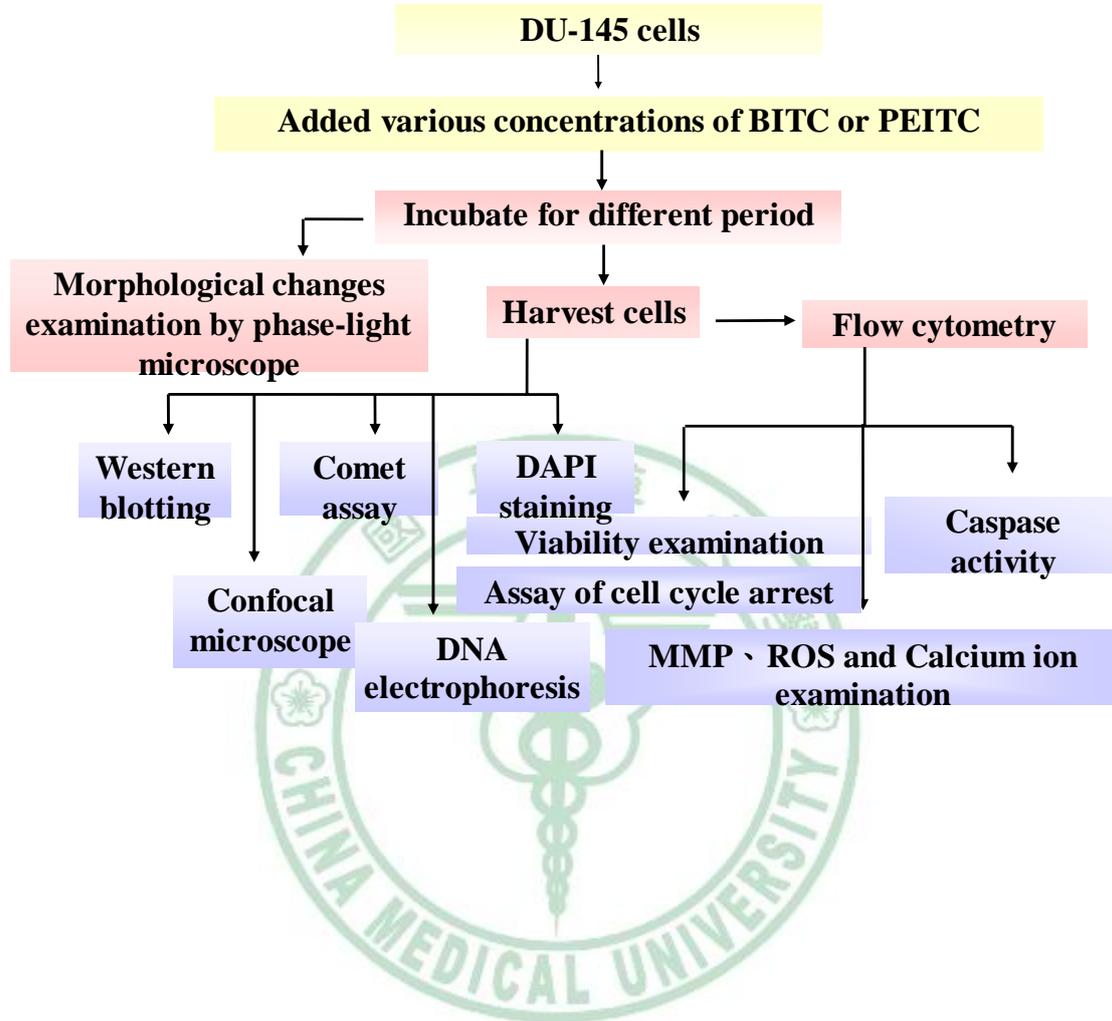
第二節 研究目的

惡性腫瘤已經連續蟬聯二十五年的十大死因榜首，但是醫學上始終沒有更有效的治療方法出現，「早期發現早期治療」是唯一的治療法則，但是當癌細胞轉移至其他器官，甚至是蔓延全身時，難道患者就只能坐以待斃。目前的臨床醫學就只能夠利用手術將癌細胞切除，如果發生轉移的癌細胞，就只能利用放射線化療來毒殺癌細胞，但是放射線化療不只是針對癌細胞，連正常細胞都會被毒殺，使得患者產生相當大的副作用，而影響患者的生活品質。如果能夠研究出一種藥物能夠使癌細胞自己產生凋亡，而不影響正常細胞的運作，而且只需服用藥物，不需要利用手術即可達到治療效果，這將是癌症患者的一大福音。

本論文的研究目的，就是以苯甲基異硫氰酸酯(benzyl isothiocyanate)和苯乙基異硫氰酸酯(phenethyl isothiocyanate)進行體外癌細胞的研究，探討對人類前列腺癌細胞株 DU-145 是否具有生長抑制，並且誘導細胞凋亡的能力，並探討其誘導細胞凋亡的分子機轉。

第二章 研究方法

第一節 研究設計



第二節 研究材料

一、細胞株

本研究之實驗細胞株為人類前列腺癌細胞株（Human prostate carcinoma；DU-145）購自新竹食品發展工業研究所（Food Industry Research and Development Institute）。

二、實驗藥物

苯甲基異硫氰酸酯（benzyl isothiocyanate）

苯乙基異硫氰酸酯（phenethyl isothiocyanate）

三、藥品試劑

1. Dimethyl sulfoxide（DMSO）：購自 Sigma Chemical Co.
2. RPMI medium：購自 Gibco
3. Fetal bovine serum（胎牛血清；FBS）：購自 Gibco
4. L-Glutamine（麩胺酸；LG）：購自 Gibco
5. Penicillum Streptomycin（PS）：購自 Gibco
6. Trypan blue：購自 Sigma Chemical Co
7. Trypsin-EDTA：購自 Amersco
8. Ethanol：購自 TEDIA
9. Formaldehyde：購自 Merck
10. Methanol：購自 TEDIA

11. Agarose I : 購自 Amresco
12. Acrylamide / Bis 40% solution (ACRYL / BISTM 29:1) : 購自 Amresco
13. Ammonium persulfate (APS) : 購自 Amersco
14. ATP Determination Kit : 購自 Blossom Biotechnologies, Inc.
15. BioMax Flim : 購自 Kodak
16. Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Merck
17. 10X SDS buffer (Sodium dodecyl sulfate) : 購自 Amresco
18. Triton X-100 : 購自 Sigma chemical Co.
19. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine) : 購自 Amresco
20. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane) : 購自 Amresco
21. Tween 20 : 購自 Amresco
22. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck Trypsin-EDTA : 購自 Amersco
23. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amersham
24. Glycine : 購自 Amresco
25. 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DioC6) : 購自 Calbiochem
26. Disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄) : 購自 Merck
27. PhiPhiLux[®]-G₁D₁ kit : 購自 OncoImmunitin (Gaithersburg ; MD ; USA)

28. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) : 購自 Merck
29. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
30. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad
31. Protein marker : 購自 Femantas
32. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
33. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amersco
34. 顯影劑 : 購自 Kodak
35. 定影劑 : 購自 Kodak
36. 核酸純化試劑組 (DNA purification kit) : 購自 Gene Mark
37. 蛋白質萃取試劑 (protein extraction solution) (PRO-PREP) : 購自 iNtRON Biotechnology, INC.
38. 5X TBE buffer : 購自 Amresco
39. Indo-1 (calcium) : 購自 Calbiochem
40. H_2DCFDA (ROS 試劑) : 購自 Calbiochem
41. Primary antibody (1°抗體) :
 - A. anti- β -actin : 購自 Sigma
 - B. anti-Wee1 : 購自 Upstate
 - C. anti-MMP-9 : 購自 Sigma
 - D. anti-Bcl-x1 : 購自 BD

- E. anti-Bax : 購自 Calbiochem
- F. anti-Bid : 購自 Sigma Chemical Co
- G. anti-caspase 3 : 購自 Upstate
- H. anti-caspase 8 : 購自 Chemicon
- I. anti-caspase 9 : 購自 Upstate
- J. anti-cytochrome c : 購自 Sigma
- K. anti-GADD153 : 購自 Santa cruz
- L. anti-GRP78 : 購自 Santa cruz
- M. anti-Cyclin B : 購自 Upstate
- N. anti-Rock-1 : 購自 Santa cruz
- O. anti-PI3-Kinase : 購自 BD
- P. anti-Catalase : 購自 Calbiochem
- Q. anti-Cdc25C : 購自 Calbiochem
- R. anti-p53 : 購自 Oncogene
- S. anti-PARP : 購自 BD
- T. anti-PERK : 購自 Santa cruz
- U. anti-Endo-G : 購自 Sigma
- V. anti-MMP-7 : 購自 Sigma
- W. anti-GRB2 : 購自 BD

- X. anti-XIAP：購自 BD
- Y. anti-IRE-1 α ：購自 Santa cruz
- Z. anti-HIF-1 α ：購自 Santa cruz

42. Secondary antibody (2°抗體)：

- A. anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon
- B. anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon
- C. anti-goat IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon
- D. anti-sheep IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody：購自 Chemicon

四、儀器設備

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 Nuaire
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. DNA 電泳槽：購自 Mupid-2
11. Mini-3D Shaker：購自 Boeco
12. PVDF membrane：購自 Minipore
13. SDS-PAGE 電泳槽套組：購自 Bio-Rad
14. Transfer Cell Blot 套組：購自 Bio-Rad
15. 加熱板：購自 Lab-Line
16. 流式細胞計數儀 (flow cytometry)：購自 Becton Dickinson
17. 高速離心機：購自 HERMLE
18. 分光光度計：購自 Beckman
19. 光學顯微鏡 (Nikon LABOPHOT-2)：購自 Nikon
20. 酵素免疫分析儀 (Anthos 2020)：購自 Anthos Labtec,
Australia
21. 冷凍管：購自 TPP
22. 溫控離心機：購自 Beckman
23. 乾浴槽 (Model 110001)：購自 Beckman

24. 無菌操作臺：購自 Lian Shen

25. 微量離心管：購自 Orange

26. 雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡：購自縉階生物科技股份有限公司

第三節 實驗方法

一、實驗藥品配置

將苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯利用 DMSO 為溶劑配製成所需要的濃度。實驗所需苯甲基異硫氰酸酯的濃度為 2.5、5、7.5、10、15 μM ，苯乙基異硫氰酸酯的濃度為 1、5、10、15、20 μM 。

二、細胞培養

(一)配置細胞培養基 (MEM medium) ⁽⁵⁷⁾

培養人類前列腺癌細胞株 (DU-145) 所使用的培養基為 MEM medium，並在其培養基內添加胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS)、Penicillin、Streptomycin、麩胺酸 (L-Glutamine)，配置完成的細胞培養基含有 10% FBS、100 units/ml Penicillin、100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin 以及 2 mM L-Glutamine。

(二)細胞株培養條件 ⁽⁵⁷⁾

首先將培養基以及 PBS 放置水浴鍋回溫至 37°C，使用 70% 的酒精擦

拭實驗操作檯面，並且將所有要放入無菌操作檯的物品以70%的酒精擦拭，並戴無菌手套進行實驗。人類前列腺癌細胞株（DU-145）培養在已配置好的MEM medium中，放置於37°C、5% CO₂的培養箱中培養，並定期更換新鮮的培養液，當其細胞生長到七八分滿時即可進行繼代來做實驗。

(三)活化冷凍細胞⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾

細胞解凍必須掌握“快速”的原則，否則冰晶將會對細胞造成傷害，為了避免在冷凍細胞的過程中，因為水分形成的冰晶造成細胞損傷，而將DMSO的濃度調高到7%來作為抗凍保護措施，所以當快速解凍時也必須儘快的加入培養基以稀釋DMSO的濃度到1%以下，因為DMSO具有介面活性劑的性質，會造成細胞膜的傷害，而DMSO濃度小於1%的情況下是可允許的。首先將新鮮的細胞培養基放入37°C水浴鍋中，等待培養基回溫至37°C時，接著取出回溫好的培養基10 mL至滅菌的15 mL離心管中，再從液態氮中取出冷凍管，迅速的將冷凍管移至37°C水浴鍋中，使冷凍管裡的細胞液急速解凍，盡量使其在1-2分鐘內融化，融化之後將冷凍管裡的細胞液取至以含有回溫好的新鮮培養基中。使其混和均勻後，以1500 rpm的速度離心5分鐘後，去除上清液，再加入新鮮的培養基10 mL放入flask中，接著移入37°C、5% CO₂的培養箱中培養，隔日更換新

鮮的培養基。

(四)細胞計數⁽⁵⁸⁾

計算細胞數目是用血球計數盤，血球計數盤一般有二個 chambers，每個 chamber 中細刻 9 個 1 mm^2 大正方形，其中 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格，深度均為 0.1 mm 。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ ml}$ 。使用時，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每 ml 中之細胞數目。

(細胞計數盤)存活測試之原理為 dye exclusion，利用染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因細胞膜完整，染料無法滲入而不會呈色。一般使用藍色之 trypan blue 染料。步驟：取 $10\text{ }\mu\text{l}$ 細胞懸浮液與 $90\text{ }\mu\text{l}$ trypan blue (0.4% w/v trypan blue) 混合均勻於 1.5 ml 小離心管中。取少許混合液約 ($10\text{ }\mu\text{l}$) 自血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。計數四個大方格之細胞總數，再除 4，乘以稀釋倍數 (10 倍)，最後乘以 10^4 ，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。若細胞位於線上，只計上線與右線之細胞 (或計下線與左線之細胞)。如所含細胞密度過高，則算出的數目誤差較大 (每一大格過 100 個細胞)，需再加入更多的培養液稀釋。

(五) 冷凍細胞⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾

將人類前列腺癌細胞株 (DU-145) 大量培養後可用液態氮冷凍保存細胞，欲保存冷凍的細胞盡量是採用細胞處於生長旺盛且存活率高的細胞情況來進行冷凍。首先需配製冷凍保存液，將DMSO加入新鮮培養基中，最後濃度為5-10% (用7%) 混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞液來計數細胞。之後細胞離心後去上清液，加入事前配製好的保存液，使細胞數保持在 $1-5 \times 10^6$ cells/ml，混合均勻後分裝至冷凍保存管中(1 ml/vial)，在管外標示細胞名稱、數目以及日期。冷凍過程為冷凍管置於 4°C ；10分鐘→ -20°C ；30分鐘→ -80°C ；16-18小時→最後置入液態氮桶中 (-196°C) 長期儲存。

三、流式細胞儀的應用

流式細胞儀主要包括液流系統、光學系統、分選系統和電子系統。細胞經液流系統傳送單顆細胞的通過流式細胞儀中雷射照射區，細胞受到雷射的激發而產生訊號，被訊號接收器接受並放大，這些放大的訊號經過電腦的分析處理，並以圖表的形式顯示出來；而透過分選系統還可以將所需要的細胞群體篩選出來並量化。流式細胞儀產生並分析的訊號主要可分為光散射訊號和螢光訊號。光散射訊號的強弱可以反映細胞的大小、形態及胞漿顆粒化的程度等。依照螢光染劑的不同，利用不同波長的光激發，而發射出不同波長的螢

光被偵測，可顯示出不同的顏色。

(一) 細胞存活率的分析

本實驗主要是利用細胞死亡時其細胞膜會呈現不完整狀態的特性，而使染劑能夠進入細胞內，因此利用 Propidium Iodide (PI) 染劑，此染劑是可以染細胞核內的核酸，而細胞膜完整的細胞則不會被 PI 染上，因為細胞是處在正常健康狀態下，其細胞膜為完整的，但是如果細胞發生凋亡、壞死時，其細胞膜會呈現不完整、破裂等狀態，而使 PI 染劑會進入細胞內，而使細胞核內的 DNA 被 PI 染劑染上，被染上 PI 的細胞再利用流式細胞儀分析，可以在 488 nm 的位置激發出螢光，死亡的細胞會呈現出較高的紅色螢光，存活的細胞則有較弱的紅色螢光，再以 Cell Quest 軟體分析。

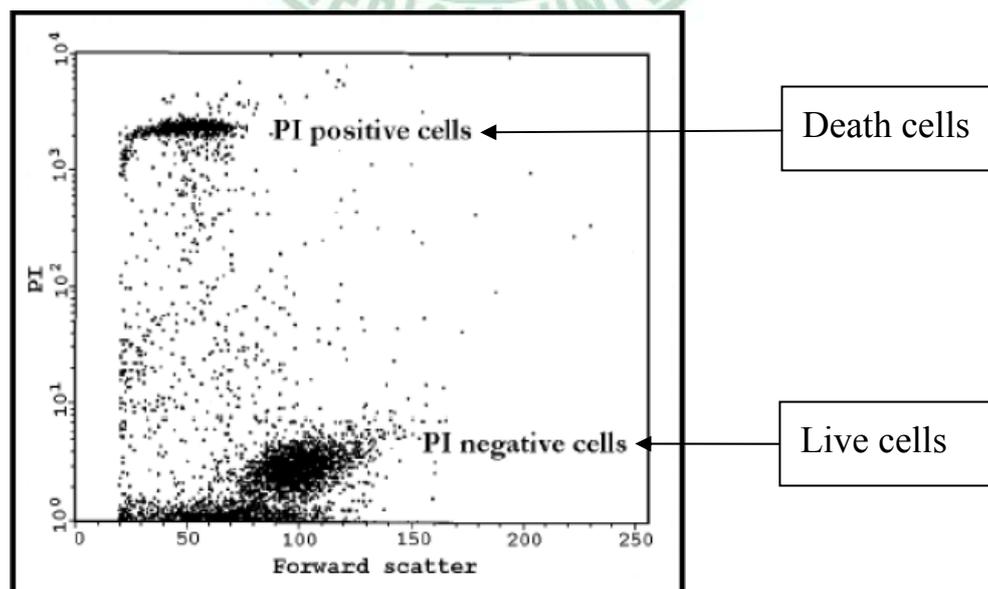


圖 2-1 流式細胞儀 PI 染色之細胞存活率分析圖

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞(DU-145)種入12 well 的培養盤，每一個 well種 1×10^5 的細胞，並加入2 mL的培養基培養至少24小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，並以1% DMSO為control組，確定DMSO不會影響細胞存活。分別培養24、48小時後，收取細胞，首先將well中的培養基吸取至15 mL離心管中，再以PBS清洗細胞表面殘留的培養基，然後用0.1% Trypsin作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至15 mL離心管中培養基以中和Trypsin的作用，再將其全部吸取至15 mL離心管中，以1500 rpm離心5分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入3 mL PBS清洗再離心並倒掉上清液，於避光環境下加入500 μ L PI (propidium iodine) solution混合均勻，轉移細胞液到FACS管中，接著利用流式細胞儀分析細胞存活率並紀錄結果。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

➤ PBS (Phosphate Buffer Saline) 的配置

先製備 10 倍的 PBS，秤取 NaCl 160 g; KCl 4 g; Na_2HPO_4 57.952 g; KH_2PO_4 4 g，加 D.D.Water (double deionized water) 至 2 公升，攪拌使完全溶解，再以 0.22 μ m 的濾膜過濾，使用時再加

D.D.Water 以稀釋成 1 倍的濃度。

➤ Propidium iodine 的配置

先配置出濃度為 20 mg PI/100 ml PBS 作為 PI stock 保存，等
要進行實驗時再利用 PBS 將 PI stock 稀釋 50 倍，最後是以 0.4
mg PI/100 ml PBS 作為實驗染劑所使用濃度。

(二) 細胞週期的分析

本實驗的原理是利用 Propidium iodine (PI) 為核酸的螢光染劑，可專
一的與核酸鍵結。正常的情況下的細胞細胞膜是完整的，所以 PI
染劑是無法穿透細胞膜而進入細胞內，當利用 70% 冰酒精將細胞
膜固定後，進入到細胞膜中的 PI 染劑會專一性的與核酸鍵結，利
用帶有正電荷的特性與帶負電的 DNA 鍵結而嵌入雙股 DNA 上，利
用波長 488 nm 的雷射光激發，可放出波長 636 nm 的螢光。最後再
利用流式細胞儀來偵測 PI 染劑所激發出的螢光，則得知細胞內
DNA 的狀態而進行細胞週期分析。

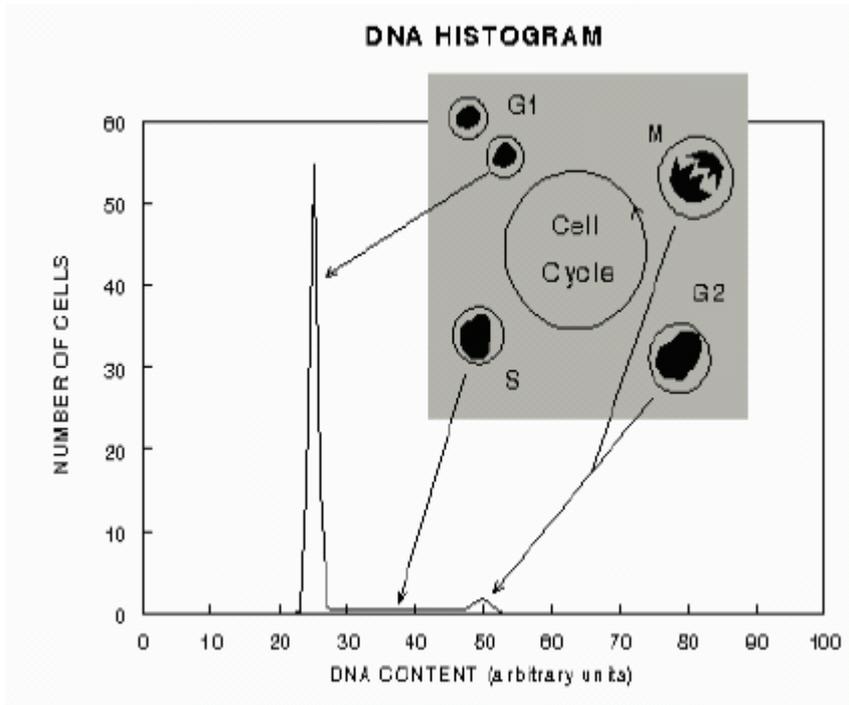


圖2-2 流式細胞儀PI染色之細胞週期分析圖

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞(DU-145)種入12 well的培養盤，每一個 well種 1×10^5 的細胞，並加入2 mL的培養基培養至少24小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，分別培養不同時間後，收取細胞，首先將well中的培養基吸取至15 mL離心管中，再以PBS清洗細胞表面殘留的培養基，然後用0.1% Trypsin作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至15 mL離心管中培養基以中和Trypsin的作用，再將其全部吸取至15 mL離心管中，以1500 rpm離

心5分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入3 mL PBS清洗再離心並倒掉上清液，加入4 °C、70%的酒精2 mL固定細胞形態，注意必須將酒精沿管壁一滴一滴緩慢滴入，否則會傷害細胞而影響細胞型態，然後蓋上蓋子，-20°C冰箱隔夜存放。隔天，將細胞懸浮液以1500 rpm、5分鐘離心去除酒精上清液，再以PBS清洗兩次之後，將細胞團刮散，加入500 µl的PI染劑，避光30分鐘之後轉移到FACS管，接著利用流式細胞儀偵測分析細胞週期，以每秒細胞數不超過200顆的流速，最後數據再以Modfit LT®軟體進行分析並記錄G0/G1、S、G2/M、Sub-G1各時期細胞的比例。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

➤ 細胞週期Propidium iodine的配置

Propidium iodine (20 mg/dl)取1 mL，加Triton (5%) 10 mL，再加RNase A (2 mg/ml) 2 mL，最後加入1XPBS至50 mL，溶液要避光。

(三) 細胞內粒線體膜電位 (Mitochondria Membrane Potential) 的分析

本實驗原理為利用DiOC6 (3,3'-dihexyloxacarbocyanine) 這種螢光染劑會專一性的結合在細胞中的粒線體中的特性，來偵測細胞膜內外的電位差，DiOC6是一種對粒線體具有專一性的親脂性陽離子螢光染劑，容易與帶有負電性的粒線體內膜結合，所以當粒線

體受到刺激而產生去極化反應，失去內膜之負電荷時，內膜被結合上的DiOC6會減少，螢光強度也降低，則可作為偵測粒線體膜電位（MMP）的指標⁽⁵⁹⁾。在流式細胞儀中可由488 nm的雷射激發DiOC6而放出525 nm的螢光，藉由偵測螢光的強度而來分析粒線體膜電位的改變。而粒線體的退極化（mitochondria membranes depolarization）會伴隨早期的細胞凋亡發生，因此可當做細胞早期凋亡辨別的依據。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞（DU-145）種入6 well的培養盤，每一個 well種 2×10^5 的細胞，並加入3 mL的培養基培養至少24小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，要留3個well當作blank，blank的細胞不加藥也不加染劑，以確定染劑是沒有問題。分別培養不同時間後，收取細胞，首先將well中的培養基吸取至15 mL離心管中，再以PBS清洗細胞表面殘留的培養基，然後用0.1% Trypsin作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至15 mL離心管中培養基以中和Trypsin的作用，再將其全部吸取至15 mL離心管中，以1500 rpm離心5分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入3 mL PBS清洗再離心並倒掉上清液，準備MMP試劑（每支離心管所

需的量是10 μ l MMP 試劑加500 μ l之1倍的PBS，染劑配置時注意要避光。) ，避光加入500 μ l MMP染劑，蓋上蓋子，於37 $^{\circ}$ C水浴中避光30分鐘，接著轉移到FACS管中，再利用流式細胞儀分析實驗結果。上機時，先將blank(紅色的peak)調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control(藍色的peak)調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1及M2其gate約等於50%(如下圖)，待control條件都調整好即可開始上機，peak往右代表樣品的膜電位上升，往左代表膜電位下降。

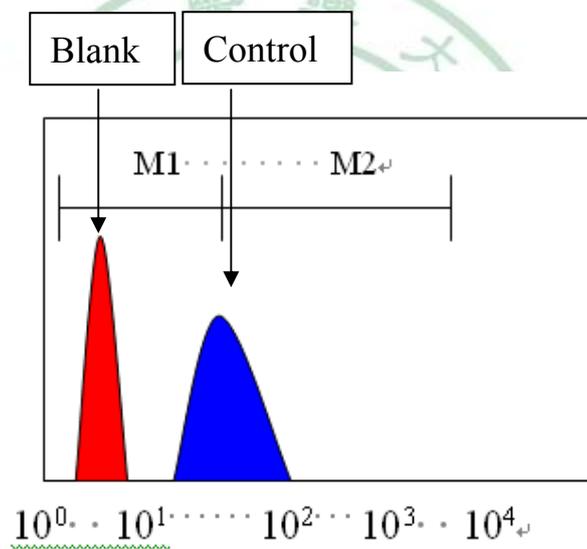


圖2-3 粒線體膜電位軟體分析圖

➤ MMP染劑的配置：10 μ l DiOC6 加 500 μ l的1X PBS /well

(四) 細胞內活性氧化物質的分析

本實驗原理為利用 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

〈H₂DCFDA〉為染劑，來偵測細胞內H₂O₂ 的含量，H₂DCFDA是

一種脂溶性的染劑，可通過細胞膜，當H₂DCF-DA 被細胞內的乙

醯脂酶 (esterase) 去乙醯化 (deacetylate) 後會形成非螢光性的 DCFH，而 DCFH 又會被細胞內的 H_2O_2 氧化成具螢光性質的 DCF，最後由流式細胞儀來偵測，DCF 可由 488 nm 雷射激發出 355 nm 的螢光，藉以分析細胞內活性氧化物的含量⁽⁶⁰⁾。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入 6 well 的培養盤，每一個 well 種 2×10^5 的細胞，並加入 3 mL 的培養基培養至少 24 小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，要留 3 個 well 當作 blank，blank 的細胞不加藥也不加染劑，以確定染劑是沒有問題。分別培養不同時間後，收取細胞，首先將 well 中的培養基吸取至 15 mL 離心管中，再以 PBS 清洗細胞表面殘留的培養基，然後用 0.1% Trypsin 作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至 15 mL 離心管中培養基以中和 Trypsin 的作用，再將其全部吸取至 15 mL 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入 3 mL PBS 清洗再離心並倒掉上清液，準備 ROS 試劑（每支離心管所需的量是 1 μ l H_2DCFDA 加 500 μ l 之 1 倍的 PBS，染劑配置時注意要避光。）），避光加入 500 μ l ROS 染劑，蓋上蓋子，於 37 $^{\circ}C$ 水浴中避光 30 分鐘，接著轉移到 FACS 管中，再利用流式細胞儀分析實

驗結果。上機時，先將blank(紅色的peak)調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control(藍色的peak)調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1及M2其gate約等於50%(如下圖)，待control條件都調整好即可開始上機，peak往右代表細胞內的活性氧化物增加，往左代表細胞內的活性氧化物減少。

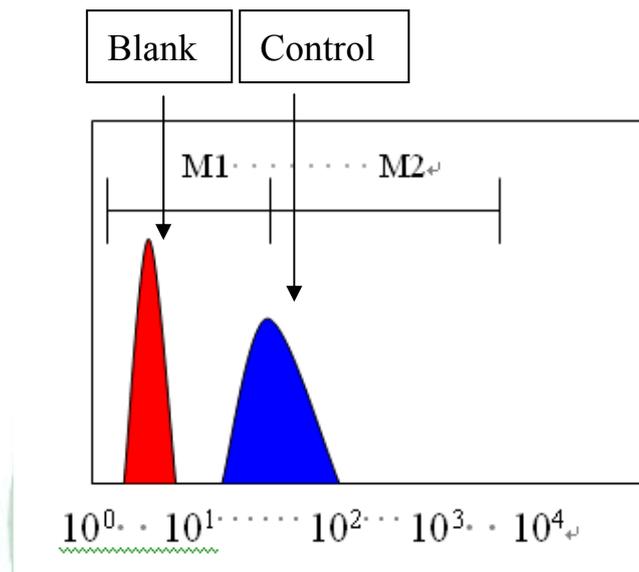


圖2-4 ROS軟體分析圖

- ROS染劑的配置：1 μl H₂DCF-DA/500 μl PBS，H₂DCF-DA stock sol'n：20 μM 。

(五) 細胞內鈣離子濃度的分析

主要實驗原理為利用 Fluo-3/AM 當作鈣離子的螢光染劑，當 Fluo-3/AM 通過乙醯甲酯 (AE) 進入細胞後，會與鈣離子特異性結合，由於 Fluo-3/AM 的結構類似鈣離子，所以可螯合住鈣離子，螯合住鈣離子的 Fluo-3/AM 會有光學特性上的改變，在紫外光的

激發下，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，藉此來偵測細胞內鈣離子的濃度變化⁽⁶¹⁾。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入6 well 的培養盤，每一個 well種 2×10^5 的細胞，並加入3 mL的培養基培養至少24小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，要留3個well當作blank，blank的細胞不加藥也不加染劑，以確定染劑是沒有問題的。分別培養不同時間後，收取細胞，首先將well中的培養基吸取至15 mL離心管中，再以PBS清洗細胞表面殘留的培養基，然後用0.1% Trypsin作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至15 mL離心管中培養基以中和Trypsin的作用，再將其全部吸取至15 mL離心管中，以1500 rpm離心5分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入3 mL PBS清洗再離心並倒掉上清液，避光加入配製好的Fluo-3/AM染劑，每管加入1 ml ($3 \mu\text{g}/1 \text{ ml}$)於 37°C 中避光30分鐘，每15分鐘拿出來上下搖動試管，避光30分鐘後，將試管取出離心1500rpm、5分鐘，PBS洗兩次，最後加入500 μl 1XPBS，再轉移到FACS管中，開始進行流式細胞儀分析。將blank (紅色的peak) 及control (藍色的control) 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，樣品上機後，分析鈣離子釋

放的情形 (peak往右表示細胞中的鈣離子濃度增加，peak往左表示細胞中的鈣離子濃度減少)。

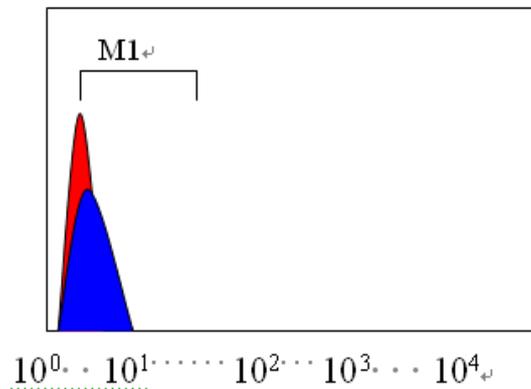


圖 2-5 鈣離子濃度軟體分析圖

➤ 鈣離子的染劑：Fluo-3/AM

(六) 細胞內 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 活性的分析

實驗主要原理是利用一個帶有loop形狀且兩端皆標有螢光的 peptide (PhiPhiLux)，它可以被Caspase-3及Caspase-3-like蛋白所辨識，並且可以被細胞主動噬入。當細胞受到刺激而產生凋亡作用時，此時若是加入PhiPhiLux，則會大量的被凋亡細胞所吞噬，而同時在細胞內部所誘發生成的Caspase-3也會與PhiPhiLux上的特定位置結合，造成PhiPhiLux結構斷裂，使得loop結構兩端上的螢光物質結合，因而產生螢光，而PhiPhiLux也具有放大細胞內Caspase-3及Caspase-3-like訊號的功能，因此利用流式細胞儀偵測

樣品中的螢光強度，便可推得知其Caspase-3的活性⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾⁽⁶⁴⁾。另外偵測Caspase-8和Caspase-9的活性也是利用此原理，但是卻是用 CaspaLux 染劑來偵測，最後再利用流式細胞儀以488 nm激發螢光，分析定量與定性，以偵測到更早期細胞的凋亡狀態。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入6 well 的培養盤，每一個 well種 2×10^5 的細胞，並加入3 mL的培養基培養至少24小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，要留3個well當作blank，blank的細胞不加藥也不加染劑，以確定染劑是沒有問題的。分別培養不同時間後，收取細胞，首先將well中的培養基吸取至15 mL離心管中，再以PBS清洗細胞表面殘留的培養基，然後用0.1% Trypsin作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至15 mL離心管中培養基以中和Trypsin的作用，再將其全部吸取至15 mL離心管中，以1500 rpm離心5分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入3 mL PBS清洗再離心並倒掉上清液，避光加入染劑，每管加25 μ l(10 μ M substrate Phiphilux for Caspase-3，CaspaLux L1D2 for Caspase-8)，於37 $^{\circ}$ C 中避光60分鐘，避光60分鐘後，再加入1 ml 1XPBS，以1500 rpm離心5分鐘，倒掉上清液，刮散細胞團塊，再

(minor groove) 上，當細胞產生凋亡時會有染色質濃縮、DNA斷裂的情形發生，因此當細胞凋亡的現象越嚴重，DNA斷裂的也就越多，而染劑也會結合上更多，所以當利用顯微鏡觀察時，則可觀察到凋亡細胞所產生的藍色螢光強度會比正常細胞來的強⁽⁶⁵⁾。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入6 well 的培養盤，每一個 well種 2×10^5 的細胞，並加入3 mL的培養基培養至少24小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，培養48小時後，先將細胞培養液吸掉，再取1 ml 3% Formaldehyde/PBS將細胞固定於well底部，作用15分鐘後，用PBS洗三次，再加入 0.1% Triton X-100/ PBS (1 ml) 作用15分鐘，再用PBS洗三次，最後避光加入DAPI 染劑 (1 μ g/1 ml) 約300 μ l，在 37°C incubater 避光 30分鐘，吸掉染劑，用PBS洗三次，於螢光顯微鏡 F=200X 照相。

(二) 彗星試驗 (Comet assay)

實驗原理主要是利用 Comet assay 觀察細胞拖尾的情形，拖尾情形越嚴重，表示細胞受損越嚴重。彗星試驗又稱為單細胞電泳分析 (single cell gel electrophoresis assay)，可用來分析及定量 DNA 損傷 (DNA damage) 程度。當細胞發生凋亡時，細胞內 DNA 會

產生斷裂，藉由電泳將斷裂的 DNA 拖出膜外，而形成彗星狀的拖尾，可藉由定量拖尾的長短而得知 DNA 的損傷程度⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入 6 well 的培養盤，每一個 well 種 2×10^5 的細胞，並加入 3 mL 的培養基培養至少 24 小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，培養 48 小時後，收取細胞，將細胞液移至 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，加入 100 μ l PBS (體積可依細胞數而定) 混合均勻，轉移細胞液至 eppendorf 中，放置在冰上，將上、下膠分別以微波溶解後放於 55 $^{\circ}$ C 水浴鍋中備用，在磨砂載玻片上以鉛筆標上號碼，滴加 0.5% normal-melting-point agarose (NMA) + 0.5%

low-melting-point agarose (LMA) 的混合液 70 μ l 於載玻片上，將蓋玻片以 45 度角蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，取 10 μ l 細胞液加 0.5% 的 LMA 70 μ l 混合均勻，加在下膠上，將蓋玻片以 45 $^{\circ}$ 角蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，配置 lysis buffer。將載玻片置於 lysis buffer 中 1 小時，目的在使細胞膜上的雙層磷脂 (phospholipids) 結構破壞，以利於斷裂的 DNA 被電泳拖出，再將載玻片移至 alkaline buffer 中浸泡 20 分鐘，其目的是使 DNA

雙股螺旋解開，將電泳槽置於冰上，以 alkaline buffer 為電泳液跑 30 分鐘 (25 V ; 300 mA) 。將膠移至 0.4 M 的 Tris buffer 使 pH 值回到中性，再將載玻片置於 methanol 中脫水，最後加入 PI 染劑 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 進行染色，再以螢光顯微鏡觀察並照相，接著利用 CometScore 軟體進行 DNA 拖尾的定量，進而評估其細胞 DNA 受損的情形。

lysis buffer (需新鮮配置)	pH=8~10
5 M NaCl	100 mL
1 M Tris-HCl	2 mL
0.5 M EDTA	40 mL
Triton	2 mL
D. D. Water	56 mL
Total	200 mL

表 2-1 彗星試驗之 Lysis buffer 的配置

alkaline buffer (pH=13)	
NaOH	12 g
EDTA	0.3724 g
D. D. Water	1000 mL

表 2-2 彗星試驗之 Alkaline buffer 的配置

0.4 M Tris buffer (以 HCl 調整 pH=7.5)	
Tris	48.456 g
D. D. Water	1000 mL

表 2-3 彗星試驗之 Tris buffer 的配置

(三) DNA 斷裂電泳分析

實驗主要原理是當細胞產生凋亡時，會有DNA斷裂的現象發生，細胞核內的DNA會裂解成180~200 bp大小的片段，藉由將細胞中的DNA萃取出，再利用電泳跑膠來觀察是否有DNA裂解的現象產生，當跑膠後用UV燈照相觀察時，有階梯形(ladder)的現象產生時，即表示DNA有裂解片段的產生⁽⁶⁸⁾。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入 10 cm² dish 的培養盤，每一個dish種 1×10^6 的細胞，並加入10 mL 的培養基培養至少24小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，培養不同時間後，收取細胞至15 ml離心管中，1500 rpm離心5分鐘後，加入200 μ l PBS，並將細胞液移至ependorf，離心14000 rpm、10秒，移去上清液，加入200 μ l PBS混和均勻，再加入20 μ l RNase(100 mg/ml in H₂O)，靜置室溫5分鐘。加入20 μ l proteinase K 及200 μ l Binding buffer，混和均勻，並加熱70°C、10分鐘，之後再加入200 μ l ethanol，混合均勻後移至spin column，離心14000 rpm、1分鐘，丟棄下面的液體，加入300 μ l Binding solution，離心14000 rpm、1分鐘，丟棄下面液體，加入700 μ l washing solution (此動作重複兩次)，最後離到乾

為止。丟棄下面的液體，在55°C烘箱3-5分鐘，丟棄下面的收集管，換上新的ependorf，加入Elution solution（要先預熱至70°C）每個樣品約加50-60 μ l，放置室溫1-2 分鐘，離心1分鐘，收集下面液體（內含DNA），之後進行DNA電泳跑膠。將處理好的DNA加入6X DNA loading dye混合，loading進含有0.5X的TBE buffer、2 %的 agarose gel中，以100V的電壓跑膠並以Eithidium Bromide染色，最後在UV light下照相。

五、西方點墨法

(一)細胞蛋白的抽取技術

將人類前列腺癌細胞株DU-145種於10 cm² dish中，細胞數約 1×10^6 cells，培養至少24小時後，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，分別培養6小時、12小時、24小時、48小時後收取細胞，將細胞收取下移至1.5 ml 的ependorf，加入Protein extraction solution（依細胞量來決定Protein extraction solution加入的量），將細胞和Protein extraction solution震盪混合均勻，置於-20°C，隔夜後，離心13000 rpm、20分鐘，最後取上清液至乾淨的ependorf，此為總蛋白質，即可置於-20 °C 冰箱保存備用。

(二)細胞蛋白濃度的定量

先配置標準檢量線(standard curve) ，以 Bradford 定量法，以胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin ; BSA) 當作蛋白質標準品，配置一序列稀釋濃度的蛋白質標準品，濃度為 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/ml，再利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 595 nm 波長的條件下測量蛋白質標準品吸光值做為標準檢量線 (standard curve) ，並求出趨勢線方程式 $Y=aX+b$ 及 r^2 value。

配置蛋白質標準品的步驟為先取bradford染劑2 mL加8 mL二次水等同於5倍稀釋，混合均勻後備用，取15 μ l配製好蛋白質標準品加735 μ l稀釋過的Bradford染劑混合均勻，取200 μ l加入96 well plate 中，每個濃度都要取三重複，再利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在595 nm波長的條件下測量蛋白質標準品的吸光值，將蛋白質標準品的吸光值求出平均值，以O.D. value (Y) 對蛋白濃度 μ g / mL (X)，求出趨勢線方程式： $Y = a X + b$ ， R^2 value要趨近於0.99。

蛋白質濃度 (μ g / mL)	100 mg / mL BSA (mL)	D.D.Water (mL)
100	500	0
80	400	100
60	300	200
40	200	300
20	100	400
0	0	500

表 2-4 蛋白質標準品的配置

配置標準檢量線完成後再繼續定量樣品蛋白質，取 15 μ l 樣品蛋白質與 5 倍稀釋的 Bradford 染劑 735 μ l 混合均勻，取 200 μ l 配置完成的樣品蛋白質加入 96 well plate 中，每個時間點的樣品蛋白質都要取三重複，再利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 595 nm 波長的條件下測量蛋白質標準品的吸光值，將三重複所得的吸光值求出平均值，帶入標準蛋白檢量線的趨勢線方程式： $Y = a X + b$ ，則可求出該樣品的蛋白質濃度 (μ g/ml)。

(三) SDS-PAGE 電泳分析

先配置 SDS-PAGE 的膠體，包含上層膠 (running gel) 和下層膠 (stacking gel)。

組成	10% separation gel (四片量)	12% separation gel (四片量)
40% acrylamide/Bis (29:1)	5 mL	6 mL
running buffer	5 mL	5 mL
10% SDS	0.2 mL	0.2 mL
10% APS	0.2 mL	0.2 mL
TEMED	20 μ L	10 μ L

表 2-5 下層膠的配置組成

組成	stacking gel (四片量)
D.D.Water	4.06 mL
40% acrylamide / Bis (29 : 1)	1.02 mL
stacking buffer	1.66 mL
10% SDS	66 μ L
10% APS	33.4 μ L
TEMED	10 μ L

表 2-6 上層膠的配置組成

組成	重量
Tris	36.3 g
D.D.Water	150 mL
HCl	調整至 pH 值為 8.8
加 D.D.Water 到總體積為 200 mL	

表 2-7 Running buffer(1.5 M Tris-HCl)的配置組成

組成	重量
Tris	3 g
D.D.Water	40 mL
HCl	調整至 pH 值為 6.8
加 D.D.Water 到總體積為 50 mL	

表 2-8 Stacking buffer (0.5 M Tris-HCl) 的配置組成

先將配製好的下層膠注入鑄膠台中，要預留一小段空間給上層膠，再以 isopropanol 去除氣泡並壓平下層膠，靜置一段時間等待下層膠凝固，可藉由觀察離心管中的剩餘下層膠是否凝固來辨別，約需 25 分鐘凝固後，將上層的 isopropanol 倒掉，注入上層膠並插上齒梳，要避免齒梳中有氣泡產生，靜置待上層膠凝固，約

需 15 分鐘。

當 SDS-PAGE 的膠體製作完成後，即可進行電泳，將製好的膠體放置於電泳槽中，加入電泳緩衝液（running buffer），預先將定量過的樣品蛋白質與 5X protein loading dye 和 1%SDS 混合均勻，並以 99°C 乾浴鍋加熱 10 分鐘後，放置在冰上冷卻，依序將標示標準分子量的 multimaker 4 μ l 及各時間點的樣品蛋白質 16 μ l 注入膠體的孔槽中，通以電壓 80 伏特（volts），待樣品通過 stacking gel 後，電壓調高為 110 伏特，繼續進行電泳，當 5X protein loading dye 跑到 SDS-PAGE 膠片底部後，即可停止電泳。

由於膠體不易保存，所以將 SDS-PAGE 膠體上的蛋白轉漬到 PVDF membrane 上，首先將 PVDF membrane 裁剪成合適膠體的大小，再以甲醇浸泡約 10 秒後，再浸入轉漬緩衝液中（transfer buffer；表 1-10），接著將事先裁剪好的 3M 濾紙以及海棉片先浸泡在 transfer buffer 中備用，將轉漬夾打開後，黑色面為底部並朝上，將海綿墊片鋪在黑夾上，再將 3M 濾紙鋪上，接下來將膠體由鑄膠玻璃中取下，將上層膠裁剪掉只留下下層膠區域後，將 SDS-PAGE gel 小心的鋪於 3M 濾紙上，可在 3M 濾紙上加入 transfer buffer，避免鋪上 SDS-PAGE gel 時中間產生氣泡，依序放上 PVDF membrane（同樣避免氣泡產生），及 3M 濾紙，最後放上一片海

綿墊片，再把整個轉漬夾夾好，形成類似三明治夾層狀之構造（圖 2-7）。將轉漬夾放入已裝有 transfer buffer 的電泳槽中將黑夾朝負極，白夾朝正極，注意在電泳槽外圍必須放置冰塊，以免在轉漬的過程中，因產生過高的溫度而熔化 SDS-PAGE gel。以 380 mA、90 分鐘的條件下進行蛋白質轉漬。轉漬完成後取出 PVDF membrane，裁去多餘的部分，PVDF membrane 以 0.1% 的 tween 20 / 1X PBS (PBST) 清洗 3 次，每次至少 5 分鐘。緊接將 PVDF membrane 以 2% 的 FBS 溶於 PBST 中配置的 blocking buffer 進行 blocking 的步驟，blocking 至少要在室溫進行 1 小時。blocking 之後以 PBST 清洗 PVDF membrane 3 次，每次至少 5 分鐘。最後倒掉清洗液，加入 10 mL 的一級抗體（溶於含 2% FBS 的 PBST 中，稀釋倍數依照不同抗體、不同廠牌而異），在 4 °C 下進行搖盪 overnight。隔天將一級抗體回收，再以 PBST 清洗 PVDF membrane 3 次，每次至少 5 分鐘。加入 10 mL 稀釋 5000 倍的 goat anti-IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody 二級抗體（溶於含 2% FBS 的 PBST 中），於室溫下搖盪至少 1 小時，最後取出 PVDF membrane，以 PBST 清洗 3 次，每次清洗 10 分鐘，最後加入少量 PBST 避免 PVDF membrane 乾掉，即可進行壓片。

組成	重量
Tris	6 g
glycin	28.8 mL
methanol	400 mL
加 D.D.Water 到總體積 2000 mL	

表 2-9 Transfer buffer 的組成

組成	重量
Tween 20	1 mL
PBS	1000 mL

表 2-10 0.1% PBS-Tween20 的組成

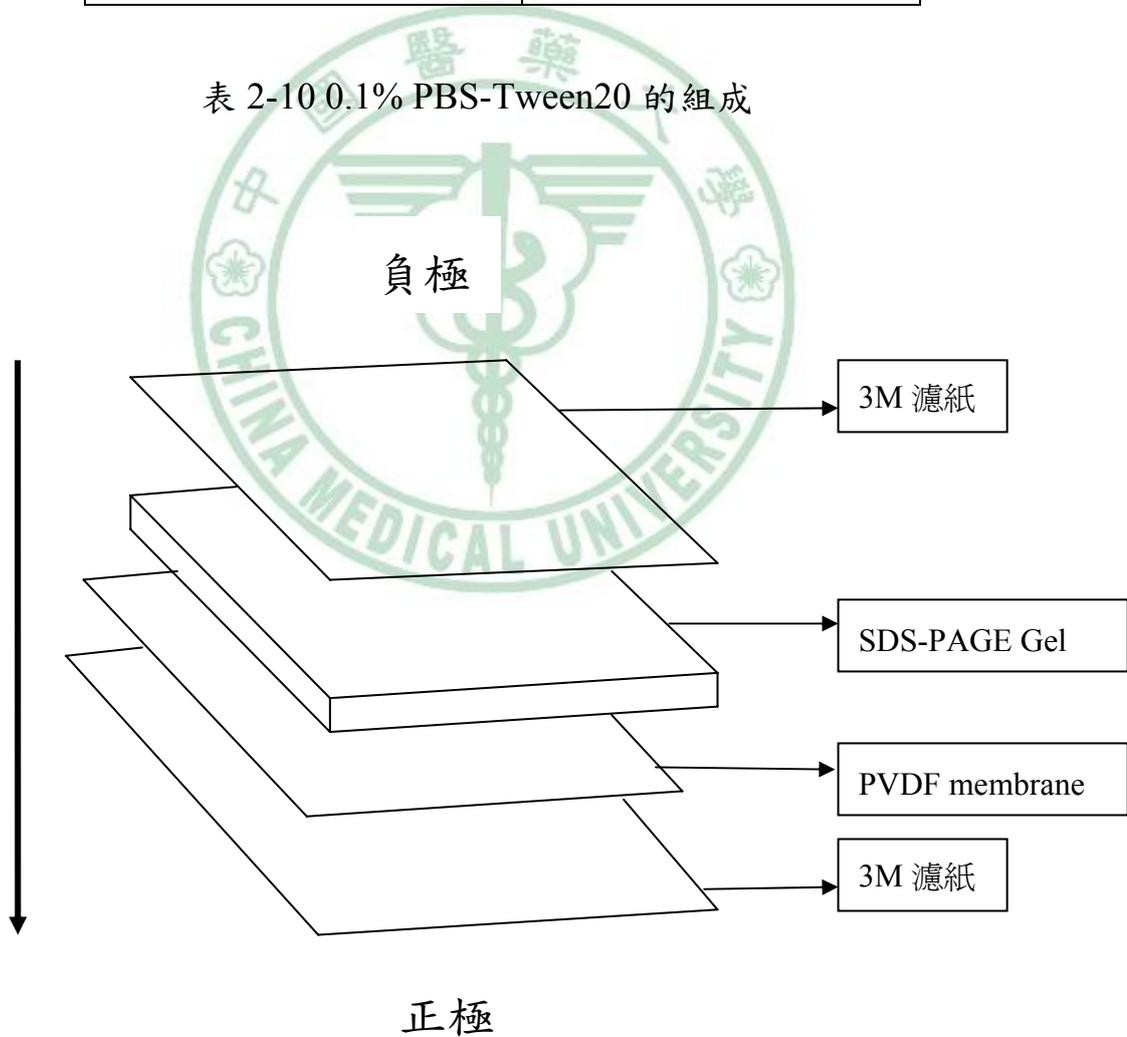


圖 2-7 轉漬夾的內部組成

壓片時，將PVDF membrane浸泡於ECL混合液中（每瓶各取3 mL等比例混合）1分鐘反應，等到肉眼可觀察到有螢光產生時，將PVDF membrane正面朝上放置於壓片卡匣（cassette）內的兩張透明投影片中間，裁剪適當大小的底片，將hyperfilm底片置於上層投影片上，對齊PVDF membrane進行壓片，感光時間依PVDF membrane上螢光亮度決定時間長短，約15秒至20分鐘不等。感光完後放入顯影劑進行顯影步驟（時間依實際觀察決定），再以清水沖洗後浸泡在定影劑中，過30秒後再浸泡清水沖洗，最後將底片晾乾，即完成壓片。

六、間接免疫螢光染色法(Indirect immunofluorescence)

免疫螢光染色法是利用接上螢光的抗體專一地與細胞中的特定蛋白質做結合，再利用共軛焦顯微鏡來觀察螢光的位置，則可得知特定在細胞中表現的多寡和位置。

將載玻片以無菌膠帶黏貼在 10 公分培養皿中，如下圖，

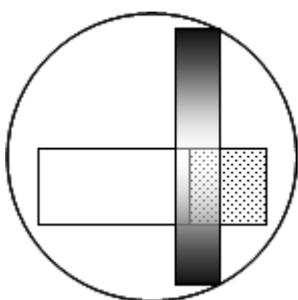


圖 2-8 無菌膠帶黏貼載玻片於培養皿中的示意圖

再將人類前列腺癌 DU-145 細胞種入，細胞數為 2×10^6 ，放入培養箱培養至少 24 小時，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，培養 24 小時後，將載玻片取下，並利用 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，把載玻片上殘留的培養液洗掉，接著利用甲醇作用 20 分鐘將細胞固定，再以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，接著利用 0.1% Triton-X100 作用 30 分鐘，再以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，接著利用拭鏡紙擦去多餘的細胞範圍，只留下中間一個區域的細胞，加入待測特定蛋白質的一級抗體(50~60 μ l)進行免疫螢光染色，以 parafilm 蓋住要染色的細胞區域，避免染劑乾掉，放入 4°C 冰箱作用 overnight。



圖 2-9 覆蓋 parafilm 於載玻片上細胞區域示意圖

隔天，將載玻片放在 PBS 中輕輕搖晃，使 parafilm 脫除。

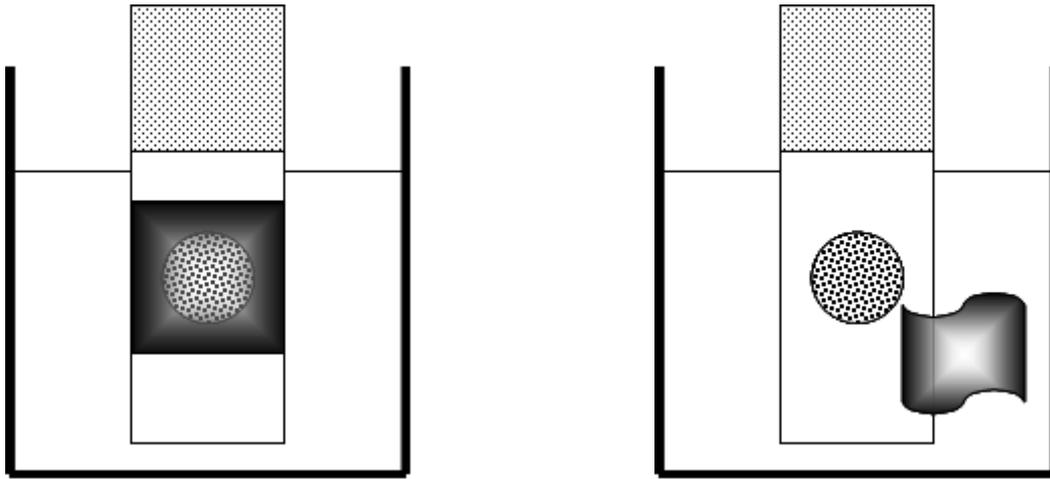


圖 2-10 脫除載玻片上覆蓋的 parafilm 示意圖

再以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，接著再加入二級抗體(50~60 μ l) ，也要以 parafilm 蓋住要染色的細胞區域，避免染劑乾掉，放置在 37°C 作用 2 小時，之後再以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入 Propidium Iodine 染細胞核以及 RNase，放置在 37°C 作用 1 小時，再以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，以 80% 甘油和蓋玻片將其封片，待甘油風乾後，就可以利用共軛焦顯微鏡觀察。

七、共軛焦顯微鏡觀察

雷射掃描共軛焦顯微鏡技術(Laser Scanning Confocal Microscopy)的原理就是以特定波長的雷射做為激發光源，將樣品中的螢光染劑激發，並經由針孔(pinhole)濾波的原理來成像，即二維影像(2D image)，除此之外更可利用雷射光對樣品做光學切片式的斷層掃描分析(optical section)，而後利用數據處理軟體系統將這些光學切片影像做排列重組，以對樣品作一個完整的立體影像(3D)甚至加上時間的四維

(4D)觀察。

八、細胞轉移偵測試驗

先將 transwell upper chamber 內底部 coating 一層 collagen(以 PBS 稀釋成十分之一)，每 well 加入 3 μl collagen+27 μl PBS，將 chamber 架在 24 孔盤上，置於 laminar flow 中等待凝固，collagen 凝固後，將細胞種入於每個 transwell chamber 中，每 well 細胞數約 4×10^4 ，在 transwell chamber 中加入無胎牛血清培養基 400 μl ，在 24 孔盤要加入含有胎牛血清的培養基 600 μl ，然後在 transwell 中加入不同濃度苯甲基異硫氰酸酯 4 μl ，於培養箱培養 24、48 小時。24 小時後先吸去培養基並用 PBS 洗兩次，用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的甲醇 600 μl 加入 transwell chamber 中以固定細胞，甲醇作用 15 分鐘後，再用 PBS 洗兩次。加入染劑 crystal violet 600 μl 蓋過細胞並靜置 5 分鐘後將染劑吸去，再用 PBS 洗 chamber，將 chamber 傾斜用 PBS 沖洗，直到沒有任何紫色的染劑流出為止，最後用棉花棒沾 PBS，將 chamber 裡多餘的染劑擦乾淨，最後在顯微鏡下觀察並且拍照。

九、活性氧化物抑制劑對於細胞存活率的影響

實驗原理為利用 N-乙醯基半胱胺酸(N-acetylcysteine；NAC)，NAC 為包含 thiol 的複合物且具有膜通透性，可以透過增加細胞內

glutathione 的濃度或直接作用在活性氧化物上清除細胞內過多的自由基 (free radical)，使細胞免於 ROS 所造成的傷害而達到抗氧化的能力⁽⁶⁹⁾，因此本實驗把 N-acetylcysteine (NAC)作為 ROS 的抑制劑。

實驗步驟是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入 12 well 的培養盤，每一個 well種 1×10^5 的細胞，並加入 2 mL 的培養基培養至少 24 小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，將細胞分為一組控制組 (不加藥)、一組只加 NAC、一組只加藥、一組先加 NAC 再加藥，NAC 必須提早 2 個小時作用細胞，才能達到保護細胞的效果，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，分別培養 24、48 小時後，收取細胞，首先將 well 中的培養基吸取至 15 mL 離心管中，再以 PBS 清洗細胞表面殘留的培養基，然後用 0.1% Trypsin 作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至 15 mL 離心管中培養基以中和 Trypsin 的作用，再將其全部吸取至 15 mL 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入 3 mL PBS 清洗再離心並倒掉上清液，於避光環境下加入 500 μ l PI (propidium iodine) solution 混合均勻，轉移細胞液到 FACS 管中，接著利用流式細胞儀分析細胞存活率並紀錄結果。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

十、Caspase 抑制劑對於細胞存活率的影響

實驗原理為利用 Z-DEVD-FMK 為 Caspases 抑制劑，通過細胞時會與 Caspases 氟甲烷酮 (FMK) 基因結合，此結合為不可逆反應，因此能抑制住 Caspases 的活性，而 Z-DEVD-FMK 具有專一性是 Caspase-3 的特異性抑制劑⁽⁷⁰⁾⁽⁷¹⁾，Z-IETD-FMK 具有專一性是 Caspase-8 的特異性抑制劑⁽⁷²⁾，Z-LETD-FMK 具有專一性是 Caspase-9 的特異性抑制劑。

實驗步驟為是將實驗細胞株人類前列腺癌細胞 (DU-145) 種入 12 well 的培養盤，每一個 well 種 1×10^5 的細胞，並加入 2 mL 的培養基培養至少 24 小時後，再用顯微鏡觀察細胞，待細胞貼壁完全且細胞分布密度適當，細胞型態也都正常，將細胞分為一組控制組 (不加藥)、一組只加 Caspases 抑制劑、一組只加藥、一組先加 Caspases 抑制劑再加藥，Caspases 抑制劑必須提早 2 個小時作用細胞，才能達到保護細胞的效果，再加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯或苯乙基異硫氰酸酯，分別培養 24 或 48 小時後，收取細胞，首先將 well 中的培養基吸取至 15 mL 離心管中，再以 PBS 清洗細胞表面殘留的培養基，然後用 0.1% Trypsin 作用細胞，使貼壁細胞脫落而呈懸浮狀，加入剛才吸取至 15 mL 離心管中培養基以中和 Trypsin 的作用，再將其全部吸取至 15 mL 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉細胞的上清液，將細胞刮散，並加入 3 mL PBS 清洗再離心並倒掉上清液，於避光環境下加入 500 μ l

PI (propidium iodine) solution 混合均勻，轉移細胞液到FACS管中，接著利用流式細胞儀分析細胞存活率並紀錄結果。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

十一、統計方法

實驗數據結果以平均值標準差 (mean \pm SD) 表示，實驗組與對照組間之數據以 Student-*t* test 進行統計比較。當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有顯著差異，以一個 (*) 代表，當 $p < 0.01$ ，以兩個 (*) 代表。

第三章 實驗結果

第一節 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞形態的影響

人類前列腺癌細胞株 DU-145 (2×10^5 cells/well) 給予不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯，經過 48 小時培養後，再以倒立式位相差顯微鏡觀察細胞形態，並與控制組(不加藥組)比較，由圖 3-1-A 發現苯甲基異硫氰酸酯對於 DU-145 細胞的增生有抑制效果，而且隨著藥物的濃度越高抑制的效果越明顯。在顯微鏡的視野下，經苯甲基異硫氰酸酯處理後的細胞在形態上跟控制組比較有明顯的不同，細胞產生皺縮，而且有大量死亡的細胞漂浮在培養液中。

第二節 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響

人類前列腺癌細胞株 DU-145 (1×10^5 cells / well) 給予不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯 (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 後，分別培養 24, 48 小時，利用顯微鏡觀察細胞形態後，再利用流式細胞儀偵測其存活率。流式細胞儀偵測的原理是以 PI (propidium iodine) 核酸染料作為染劑，當細胞死亡時，細胞膜的通透性會產生改變，此時 PI 會進入細胞內而與 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，經流式細胞儀的雷射光激發後，會產生 488 nm 波長的螢光，可由流式細胞儀的偵測器接收，細胞可以區分為經 PI 染色後的細胞螢光強度較高者為死的細胞，螢光強度較弱者為活的細胞，最後再由電腦統計分析出 DU-145 經苯甲基異硫氰酸酯作用後的存活率，並找出藥物抑制細胞存活率 50% 的濃度 (IC_{50})， IC_{50} 約為 5 μM 。

藥物抑制細胞存活率可依兩個方向來探討，分別為劑量性 (dose-dependent)，以及時間性 (time-dependent)。由圖 3-2-A 得知苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 在不同的時間點 (24, 48 小時) 具有顯著抑制細胞存活率的現象，藥物作用時間越長，細胞存活率也越低，並且隨著藥物濃度的增加，抑制 DU-145 細胞存活率的作用越強，由此可知苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞

株 DU-145 的抑制存活率呈現 time-dependent 和 dose-dependent。

第三節 苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響

由結果圖 3-3-A 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞經過不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯（0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM ）作用後，培養 24 小時，隨著藥物作用的濃度增加可明顯發現，細胞週期停滯於 G2/M 期且細胞有凋亡（apoptosis）的現象產生。而圖 3-3-B 則是人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞經過苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後（0, 12, 24, 36, 48 小時），隨著藥物作用時間的增加，一樣可以發現細胞週期停滯於 G2/M 期，而細胞凋亡的情形也隨著時間而增加。

第四節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 粒線體膜電位(MMP)的改變

粒線體能將所產生的能量以電化學位能儲存於粒線體內膜，稱之為粒線體膜電位 mitochondrial membrane potential (MMP)，粒線體上有一種由多種蛋白質所組成的特殊通透管道稱為粒線體過渡性通透孔—mitochondria permeability transition pore (MPTP)，它能夠誘發數種凋亡蛋白從粒線體內釋出，當粒線體裡有過多的鈣離子累積、氧化壓力增加、或粒線體膜電位改變時，都會導致 MPT 膜孔打開，進而

促使多種凋亡蛋白的釋放，例如：Cytochrome c（細胞色素），AIF（apoptosis inducing factor），和 endonuclease G 等蛋白，並活化下游 caspases 等一連串反應，誘導細胞走向細胞凋亡（apoptosis）。由圖 3-4-A 和 3-4-B 所示，以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯處理人類前列腺癌細胞株 DU-145，培養 12, 24, 48, 72 小時後，以流式細胞儀測其粒線體膜電位的變化，可以發現在 48 小時的時候產生粒線體膜電位下降的情形，而在 72 小時的時候下降的情形更為明顯。

第五節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 產生活性氧化物(Reactive Oxygen Species)

本實驗是藉由流式細胞儀來偵測細胞中活性氧化物質（ROS）的表現情形來了解 ROS 與 Apoptosis 之間的關係。由圖 3-5-A 和 3-5-B 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 經過 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯處理過後，在 12 小時即開始釋放 ROS，而在 24 小時仍持續大量釋放 ROS，直到 48 小時後才有些微回復的現象，在 72 小時則持續回復。

第六節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 鈣離子的釋放

由圖 3-6-A 和 3-6-B 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 經過 5 μ M 苯

甲基異硫氰酸酯處理過後，鈣離子的濃度在 30 分鐘時即大量上升，但是隨著時間上升釋放鈣離子的量也越少，表示細胞經過藥物刺激在短時間內即大量釋放出鈣離子。

第七節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145

Caspase-3、Caspase-9 活性的上升

由圖 3-7-A 和 3-7-B 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 在加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯處理過後，細胞內的 Caspase-3 在 24 小時後即大量增加，一直持續上升到 72 小時後。由圖 3-7-E 和 3-7-F 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 在加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯處理過後，細胞內的 Caspase-9 在 48 小時後也增加。由此可知，苯甲基異硫氰酸酯確實會影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 Caspase-3、Caspase-9 的活性，在作用不同時間後，確實會使細胞 Caspase-3、Caspase-9 的活性上升。

第八節 苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 DNA 的

損傷

(一) DNA Fragmentation

當細胞產生凋亡作用 (Apoptosis) 時，會有 DNA 斷裂現象發生，細

胞內的 DNase 會在核小體 (nucleosome) 兩側進行分解，可列解成 180-200 bp 的 DNA 片段，經電泳跑膠會出現階梯狀現象 (DNA ladder)，由圖 3-8-A 所示，將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯 (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 處理後，抽取細胞的 DNA 進行跑膠，在藥物濃度為 5 μM 時，即開始有明顯的 DNA ladder 現象產生，而圖 3-8-B 所示，將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (12, 24, 48, 72 小時)，一樣抽取細胞的 DNA 進行跑膠，在 48 小時的時候即有明顯的 DNA ladder 現象產生，由此可得知苯甲基異硫氰酸酯會造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 DNA 的受損斷裂。

(二) 利用 DAPI 染色法檢測

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯 (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 處理 48 小時後，再進行 DAPI 染色，由圖 3-8-E 所示，當藥物的濃度越高，螢光的強度也越強，表示細胞 DNA 的受損斷裂情形也越嚴重。

(三) 利用彗星試驗 (Comet assay) 檢測

彗星試驗 (Comet assay) 即為單細胞電泳分析法 (single cell gel

electrophoresis assay)，當細胞受到刺激而 DNA 遭受破壞時會形成不同片段的斷裂，可藉由電泳將斷裂的 DNA 片段拖出膜外，再利用 PI 染劑將其染色，便可用螢光顯微鏡觀察出拖尾的現象，可藉由拖尾的長短，判斷 DNA 損傷的情形，拖尾愈長則表示 DNA 斷裂情形愈嚴重。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯(2.5 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M, 15 μ M)處理 24 小時後，進行 Comet assay，由圖 3-8-G 和 3-8-H 所示，當藥物的濃度越高，細胞拖尾的情形也越明顯，表示細胞 DNA 的受損斷裂情形也越嚴重。

第九節 苯甲基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 凋亡相關蛋白的表現

(一) 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後(12, 24, 48, 72 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，G₂ 期進入 M 期需要 cyclin B-CDK 1 complex 與 cdc25C 等蛋白的作用，才能順利將細胞週期從 G₂ 期推向 M 期。由圖 3-9-A 所示，cyclin B 與 cdc25C 隨著藥物作用的時間增長，而使蛋白表現量逐漸降低，而抑制 cyclin B-CDK 1 complex 的 wee 1 蛋白，則是隨著藥物作用的

時間增加，而蛋白表現量增加。由此可推測苯甲基異硫氰酸酯和人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期調控相關蛋白作用相關，苯甲基異硫氰酸酯會導致細胞週期無法順利進行，使得細胞週期停滯在 G₂/M 期。

(二) 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞凋亡路徑蛋白的表現

1. 粒線體路徑相關蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察粒線體釋放的細胞凋亡因子及影響的下游蛋白來證實細胞凋亡路徑的活化。由圖 3-9-B 所示，Apoptosis induce factor (AIF) 是細胞凋亡誘導因子，隨著給藥作用時間的增加而 AIF 的表現量增加。而 Bid 為 Bcl-2 family 中屬於 pro-apoptotic，所以隨著給藥作用時間的增加而 Bid 的表現量增加。而下游的 PARP (poly ADP-ribose polymerase) 隨著給藥作用時間的增加而裂解使得表現量下降，裂解的 PARP 失去修復受損 DNA 的功能。而 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) 的表現量則會隨著給藥作用時間的增加而下降。這結果證實細胞粒線體膜電位改變，且凋亡因子被釋放而下游的 caspase 被活化，並且抑制 DNA 修復的功能，使細胞走向凋亡的命運。

2. 內質網壓力 (ER stress) 調控細胞凋亡路徑相關蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株DU-145加入5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察內質網壓力路徑的相關蛋白的表現來證實細胞凋亡路徑的活化。

由圖 3-9-C 所示，內質網上的感應蛋白 IRE-1 α (inositol requiring protein- 1 α)隨著給藥時間的增加而表現量增加，而內質網上的功能蛋白 GRP78 隨著給藥時間的增加而表現量也增加，而下游的 Caspase-12 也進一步被活化，隨著給藥時間的增加而表現量增加。這些結果證實內質網壓力的確因為給藥而增加，且啟動與細胞凋亡相關的蛋白表現。

3. 活性氧化物(ROS)相關蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株DU-145加入5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察細胞受到藥物的刺激後，是否會產生大量的ROS來誘導細胞走向凋亡。由圖3-9-D所示，Catalase和SOD(Mn)的表現量隨著給藥時間的增加而增加，表示細胞經過給藥確實會誘發大量的ROS產生，而進一步誘導細胞走向凋亡。

(三) 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞

株 DU-145 細胞轉移相關調控蛋白的表現:

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時), 以西方墨點法觀察蛋白相對表現量, 觀察給藥後是否有抑制細胞轉移的作用。由圖 3-9-E 所示, 細胞轉移調控蛋白 ROCK-1 和 MMP-2 的表現量隨著給藥時間的增加而下降。而腫瘤轉移促進蛋白 HIF1- α 的表現量也隨著給藥時間的增加而下降。這些結果顯示細胞的轉移作用確實有因為給藥而受到抑制。

第十節 利用共軛焦顯微鏡觀察苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌

細胞株 DU-145 凋亡相關蛋白的分布情形

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用 24 小時後, 加入 AIF、Endo G 及 GADD153 的抗體辨識這三種蛋白, 再以特定 FITC 之螢光抗體辨識各蛋白抗體, 最後在以 PI 染細胞核, 在共軛焦顯微鏡下觀察。由圖 3-10-A, 3-10-B, 3-10-C 所示, 發現 AIF, Endo-G, GADD153 的表現量皆上升, 且紅色和綠色螢光 merge 在一起產生橘色螢光, 表示蛋白有 translocate 到細胞核內。

第十一節 苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 轉移的影響

觀察細胞的轉移性是否會因為藥物的作用而受到影響，由圖 3-11-A 所示，將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 2.5 μM 和 5 μM 的苯甲基異硫氰酸酯後，細胞穿透 collagen 的數量比起控制組明顯降低了，而且當藥物的濃度越高，抑制細胞穿透 collagen 的效果也越明顯，由此可知，苯甲基異硫氰酸酯會影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 的轉移性，可以降低細胞的轉移性。

第十二節 苯甲基異硫氰酸酯加入 N-acetylcysteine 會抑制人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降

利用 N-乙酰基半胱氨酸(N-acetylcysteine ; NAC)作用於細胞 2 小時後，再加入苯甲基異硫氰酸酯，觀察其細胞內活性氧化物 (Reactive oxygen species ; ROS) 的上升被抑制後，其細胞的存活率是否會上升。人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 N-acetylcysteine (NAC) 1 mM 作用 2 小時之後，再加入 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯共同作用 24, 48 小時，由圖 3-12-A 所示，藥物作用 24 小時後，有事先加入 NAC 的細胞存活率比沒加入 NAC 的細胞還高，而圖 3-12-B 所示，藥物作用 48 小時後，有事先加入 NAC 的細胞存活率明顯比沒加入 NAC 的細胞還

高，且存活率的差距更為明顯，結果顯示加入 ROS 的抑制劑，降低了細胞因為藥物所產生的 ROS，而提升了細胞的存活率，表示 ROS 確實是影響細胞存活的關鍵。

第十三節 苯甲基異硫氰酸酯加入 caspase 抑制劑會抑制人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降

利用 caspase 抑制劑作用於細胞 2 小時後，再加入苯甲基異硫氰酸酯，觀察其細胞內 caspase 活性的上升被抑制後，其細胞的存活率是否會上升。人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 caspase 抑制劑 20 μ M 作用 2 小時之後，再加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯共同作用 24、48 小時，由圖 3-13-A 所示，藥物作用 24 小時後，有事先加入 caspase-3 抑制劑的細胞存活率比沒加入 caspase-3 抑制劑的細胞還高，而圖 3-13-B 所示，藥物作用 48 小時後，有事先加入 caspase-9 抑制劑的細胞存活率明顯比沒加入 caspase-9 抑制劑的細胞還高，且存活率的差距更為明顯，結果顯示加入 caspase-3, caspase-9 的抑制劑，降低了細胞因為藥物所活化的 caspase-3, caspase-9，而提升了細胞的存活率，表示 caspase-3, caspase-9 的活化確實是影響細胞存活的關鍵。

第十四節 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞型

態的影響

人類前列腺癌細胞株 DU-145 (2×10^5 cells / well) 給予不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μM)，經過 48 小時培養後，再以倒立式位相差顯微鏡觀察細胞型態，並與控制組(不加藥組)比較，由圖 3-1-B 發現苯乙基異硫氰酸酯對於 DU-145 細胞的增生有抑制效果，而且隨著藥物的濃度越高抑制的效果越明顯。在顯微鏡的視野下，經苯乙基異硫氰酸酯處理後的細胞在形態上跟控制組比較有明顯的不同，加藥組的細胞產生皺縮，而且有大量死亡的細胞漂浮在培養液中。

第十五節 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響

人類前列腺癌細胞株 DU-145 (1×10^5 cells / well) 給予不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 後，分別培養 24, 48 小時，利用顯微鏡觀察細胞形態後，再利用流式細胞儀偵測其存活率。流式細胞儀偵測的原理是以 PI (propidium iodide) 核酸染料作為染劑，當細胞死亡時，細胞膜的通透性會產生改變，此時 PI 會進入細胞內而與 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，經流式細胞儀的雷射光激發後，會產生 488 nm 波長的螢光，可由流式細胞儀的偵測器接收，細胞可以區分為經 PI 染色後的細胞螢光強度較高者為死的細胞，螢光強度較弱

者為活的細胞，最後再由電腦統計分析出 DU-145 經苯基異硫氰酸酯作用後的存活率，並找出藥物抑制細胞存活率 50% 的濃度 (IC_{50})， IC_{50} 約為 10 μ M。

藥物抑制細胞存活率可依兩個方向來探討，分別為劑量性 (dose-dependent)，以及時間性 (time-dependent)。由圖 3-2-B 得知苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 在不同的時間點 (24、48 小時) 具有顯著抑制細胞存活率的現象，藥物作用時間越長，細胞存活率也越低，並且隨著藥物濃度的增加，抑制 DU-145 細胞存活率的作用越強，由此可知苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 的抑制存活率呈現 time-dependent 和 dose-dependent。

第十六節 苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響

由結果圖 3-3-C 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞經過不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μ M) 作用後，培養 24 小時，隨著藥物作用的濃度增加可明顯發現，細胞週期停滯於 G2/M 期且細胞有凋亡 (apoptosis) 的現象產生。而圖 3-3-D 則是人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞經過苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後 (0, 6, 12, 24, 36 小時)，隨著藥物作用時間的增加，一樣可以發現細胞週

期停滯於 G2/M 期，而細胞凋亡的情形也隨著時間而增加。

第十七節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 粒線

體膜電位的改變

圖 3-4-C 和 3-4-D 所示，以 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯處理人類前列腺癌細胞株 DU-145，培養 12, 24, 48, 72 小時後，以流式細胞儀測其粒線體膜電位的變化，可以發現在 48 小時的時候產生粒線體膜電位下降的情形，而在 72 小時的時候下降的情形更為明顯。

第十八節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 產生

活性氧化物(Reactive Oxygen Species)

由圖 3-5-C 和 3-5-D 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 經過 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯處理過後，在 6 小時即開始大量釋放 ROS，而在 12 小時仍持續大量釋放 ROS，直到 24 小時後才有些微回復的現象，在 48 小時則持續回復。

第十九節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 鈣離

子的釋放

由圖 3-6-C 和 3-6-D 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 經過 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯處理過後，鈣離子的濃度在 30 分鐘時即大量上

升，一直持續到 6 小時仍然在釋放，表示細胞經過藥物刺激在短時間內即大量釋放出鈣離子。

第二十節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145

Caspase-3, Caspase-8 和 Caspase-9 活性的上升

由圖 3-7-C 和 3-7-D 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 在加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯處理過後，細胞內的 Caspase-3 在 24 小時後即開始有些微增加，一直持續上升到 72 小時後才開始大量上升。由圖 3-7-G 和 3-7-H 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 在加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯處理過後，細胞內的 Caspase-8 在 48 小時後才開始大量增加。由圖 3-7-I 和 3-7-J 所示，人類前列腺癌細胞株 DU-145 在加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯處理過後，細胞內的 Caspase-9 在 24 小時即大量增加，而在長時間 48 小時則有回復的現象。由此可知，苯乙基異硫氰酸酯確實會影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 的 Caspase-3, Caspase-8 和 Caspase-9 活性，在作用不同時間後，確實會使細胞 Caspase-3, Caspase-8 和 Caspase-9 的活性上升。

第二十一節 苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145

DNA 的損傷

(一) DNA Fragmentation

由圖 3-8-C 所示，將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (1 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM) 處理後，抽取細胞的 DNA 進行跑膠，在藥物濃度為 10 μM 時，即開始有明顯的 DNA ladder 現象產生，而圖 3-8-D 所示，將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後(12, 24, 48, 72 小時)，一樣抽取細胞的 DNA 進行跑膠，在 48 小時的時候即有明顯的 DNA ladder 現象產生，由此可得知苯乙基異硫氰酸酯會造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 DNA 的受損斷裂。

(二) 利用 DAPI 染色法檢測

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯(1 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM)處理 48 小時後，再進行 DAPI 染色，由圖 3-8-F 所示，當藥物的濃度越高，DAPI 螢光的強度也越強，表示細胞 DNA 的受損斷裂情形也越嚴重。

(三) 利用彗星試驗 (Comet assay) 檢測

彗星試驗 (Comet assay) 即為單細胞電泳分析法 (single cell gel electrophoresis assay)，當細胞受到刺激而 DNA 遭受破壞時會形成不

同片段的斷裂，可藉由電泳將斷裂的 DNA 片段拖出膜外，再利用 PI 染劑將其染色，便可用螢光顯微鏡觀察出拖尾的現象，可藉由拖尾的長短，判斷 DNA 損傷的情形，拖尾愈長則表示 DNA 斷裂情形愈嚴重。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M) 處理 24 小時後，進行 Comet assay，由圖 3-8-I 和 3-8-J 所示，當藥物的濃度越高，細胞拖尾的情形也越明顯，表示細胞 DNA 的受損斷裂情形也越嚴重。

第二十二節 苯乙基異硫氰酸酯影響人類前列腺癌細胞株 DU-145 凋亡相關蛋白的表現

(一) 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，G₂ 期進入 M 期需要 cyclin B-CDK 1 complex 與 cdc25C 等蛋白的作用，才能順利將細胞週期從 G₂ 期推向 M 期。由圖 3-9-F 所示，cdc25C 隨著藥物作用的時間增加，而使蛋白表現量逐漸降低，而抑制 cyclin B-CDK 1 complex 的 wee 1 蛋白，則是隨著藥物作用的時間增加，而蛋白表現量增加。而 p53 的表現量則是隨著藥物作用的時間增加而增

加。由此可推測苯乙基異硫氰酸酯和人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期調控相關蛋白作用相關，苯乙基異硫氰酸酯會導致細胞週期無法順利進行，使得細胞週期停滯在 G₂/M 期。

(二) 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株

DU-145 細胞凋亡路徑蛋白的表現

1. 粒線體路徑相關蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察粒線體釋放的細胞凋亡因子及影響的下游蛋白來證實細胞凋亡路徑的活化。由圖 3-9-G 所示，Apoptosis induce factor (AIF) 是細胞凋亡誘導因子，隨著給藥作用時間的增加而 AIF 的表現量增加。

Cytochrome c 也是一種細胞凋亡的因子，同樣隨著給藥作用時間的增加而表現量增加。而 Bcl-2 為 Bcl-2 family 中屬於 anti-apoptotic，所以隨著給藥作用時間的增加而 Bcl-2 的表現量下降，Bak 為 Bcl-2 family 中屬於 pro-apoptotic，所以隨著給藥作用時間的增加 Bak 的表現量增加。而下游的蛋白 caspase-3 則隨著給藥時間的增加而被裂解活化。PARP (poly ADP-ribose polymerase) 隨著給藥作用時間的增加而裂解使得表現量下降，裂解的 PARP 失去修復受損 DNA 的功能。

這些結果證實細胞粒線體膜電位改變，且凋亡因子被釋放而下游的 caspase-3 被活化，並且抑制 DNA 修復的功能，最後使細胞走向凋亡。

2. 死亡接受器路徑相關蛋白的表現量

將人類前列腺癌細胞株DU-145加入10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察死亡接受器路徑的相關蛋白的表現來證實細胞凋亡路徑的活化。由圖 3-9-H 所示，死亡接受器 Fas 和 Fas ligand 的表現量隨著給藥時間的增加而增加，而下游的 Bid 則會裂解為 t-Bid，Bid 的表現量會隨著給藥時間的增加而下降。這些結果顯示苯乙基異硫氰酸酯確實會誘導細胞走向死亡接受器路徑，而使細胞凋亡。

3. 內質網壓力（ER stress）調控細胞凋亡路徑相關蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株DU-145加入10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察內質網壓力路徑的相關蛋白的表現來證實細胞凋亡路徑的活化。由圖 3-9-I 所示，內質網上的功能蛋白 GRP78 和 GADD153 隨著給藥時間的增加而表現量增加，這結果證實內質網壓力的確因為給藥而增加。

4. 活性氧化物(ROS)相關蛋白的表現

將人類前列腺癌細胞株DU-145加入10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察細胞受到藥物的刺激後，是否會產生大量的ROS來誘導細胞走向凋亡。由圖3-9-J所示，Catalase和SOD(Mn)的表現量隨著給藥時間的增加而增加，表示細胞經過給藥確實會誘發大量的ROS產生，而進一步誘導細胞走向凋亡。

(三) 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞

株 DU-145 細胞增生相關調控蛋白的表現:

將人類前列腺癌細胞株DU-145加入10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48 小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量，觀察給藥後是否有抑制細胞增生的作用。由圖 3-9-K 所示，PI3K、NF- κ B (p65)和 GRB2 的表現量隨著給藥時間的增加而下降，而 PKC (Protein kinase C)的表現量隨著給藥時間的增加而增加，這些結果顯示細胞的增生作用確實有因為給藥而受到抑制。

第二十三節 利用共軛焦顯微鏡觀察苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列

腺癌細胞株 DU-145 凋亡相關蛋白的細胞分布情形

將人類前列腺癌細胞株 DU-145 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用 24 小時後，加入 Endo G 和 GADD153 的抗體辨識這兩種蛋白，再以特定 FITC 之螢光抗體辨識各蛋白抗體，最後在以 PI 染細胞核，在共軛焦顯微鏡下觀察。由圖 3-10-D, 3-10-E 所示，發現 Endo-G 和 GADD153 的表現量皆上升，且紅色和綠色螢光 merge 在一起產生橘色螢光，表示蛋白有 translocate 到細胞核內。

第二十四節 苯乙基異硫氰酸酯加入 N-acetylcysteine 會抑制人類前列

腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降

利用 N-乙酰基半胱氨酸(N-acetylcysteine ; NAC)作用於細胞 2 小時後，再加入苯乙基異硫氰酸酯，觀察其細胞內活性氧化物 (Reactive oxygen species ; ROS) 的上升被抑制後，其細胞的存活率是否會上升。人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 N-acetylcysteine (NAC) 1 mM 作用 2 小時之後，再加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯共同作用 24, 48 小時，由圖 3-11-C 所示，藥物作用 24 小時後，有事先加入 NAC 的細胞存活率比沒加入 NAC 的細胞存活率還高，而圖 3-11-D 所示，藥物作用 48 小時後，有事先加入 NAC 的細胞存活率明顯比沒加入 NAC 的細胞存活率還高，且存活率的差距更為明顯，結果顯示加入 ROS 的抑

制劑，降低了細胞因為藥物所產生的 ROS，而提升了細胞的存活率，表示 ROS 確實是影響細胞存活的關鍵。

第二十五節 苯乙基異硫氰酸酯加入 caspase 抑制劑會抑制人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的下降

利用 caspase 抑制劑作用於細胞 2 小時後，再加入苯乙基異硫氰酸酯，觀察其細胞內 caspase 活性的上升被抑制後，其細胞的存活率是否會上升。人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 caspase 抑制劑 20 μ M 作用 2 小時之後，再加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯共同作用 24, 48 小時，由圖 3-13-C 所示，藥物作用 24 小時後，有事先加入 caspase-3 抑制劑的細胞存活率比沒加入 caspase-3 抑制劑的細胞還高，由圖 3-13-D 所示，藥物作用 24 小時後，有事先加入 caspase-8 抑制劑的細胞存活率比沒加入 caspase-8 抑制劑的細胞還高，由圖 3-13-E 所示，藥物作用 24 小時後，有事先加入 caspase-9 抑制劑的細胞存活率比沒加入 caspase-9 抑制劑的細胞還高，結果顯示加入 caspase 的抑制劑，降低了細胞因為藥物所活化的 caspase，而提升了細胞的存活率，表示 caspase 的活化確實是影響細胞存活的關鍵。

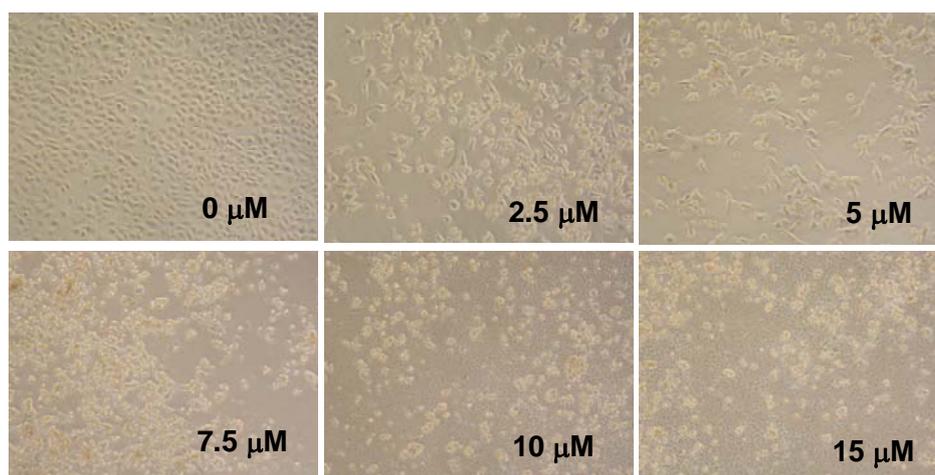


圖3-1-A 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株DU-145細胞形態上的影響。用不同濃度（2.5~15 μM ）的苯甲基異硫氰酸酯處理人類前列腺癌細胞株DU-145細胞48小時後之形態變化（200 X）。

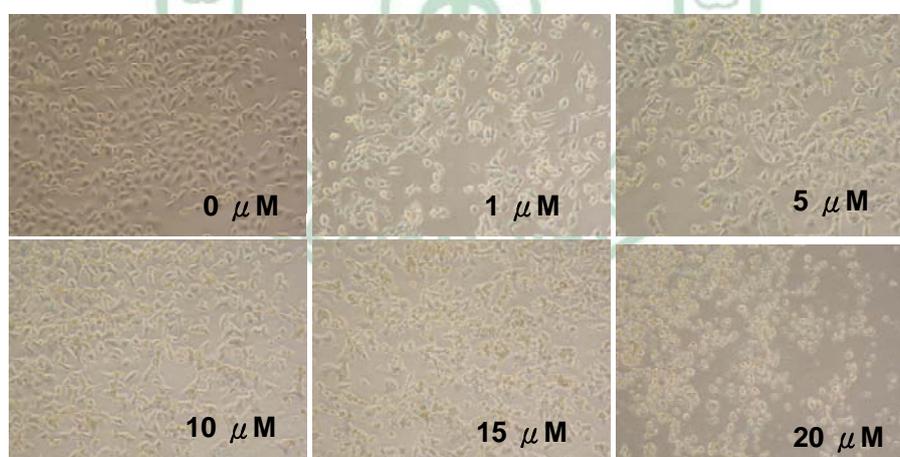


圖3-1-B 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株DU-145細胞形態上的影響。用不同濃度（1~20 μM ）的苯乙基異硫氰酸酯處理人類前列腺癌細胞株DU-145細胞48小時後之形態變化（200 X）。

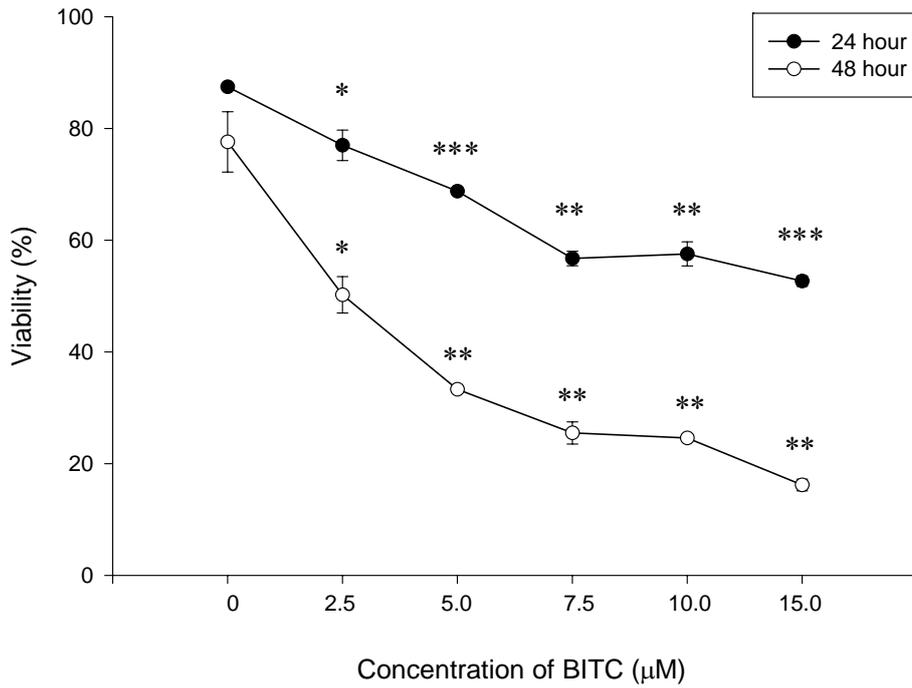


圖 3-2-A 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞存活率的影響。以不同濃度苯甲基異硫氰酸酯(0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 處理人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 24、48 小時存活率結果曲線圖 (n = 3; *表示與控制組比較 p < 0.05; **表示與控制組比較 p < 0.01; ***表示與控制組比較 p < 0.001)。

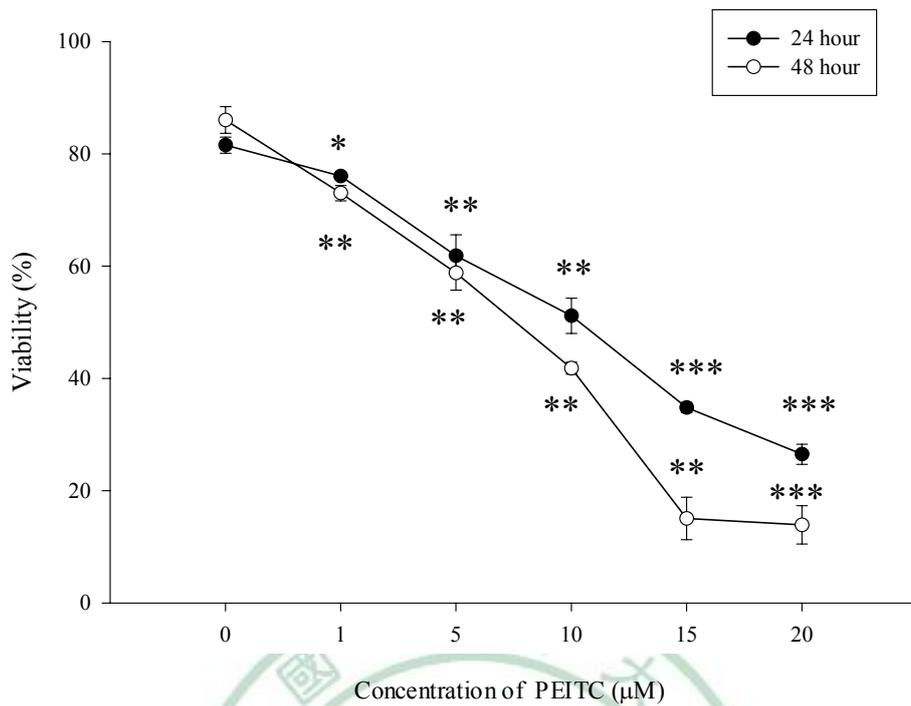


圖 3-2-B 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞存活率的影響。以不同濃度苯甲基異硫氰酸酯(0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 處理人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 24, 48 小時存活率結果曲線圖 (n = 3; *表示與控制組比較 $p < 0.05$; **表示與控制組比較 $p < 0.01$; ***表示與控制組比較 $p < 0.001$)。

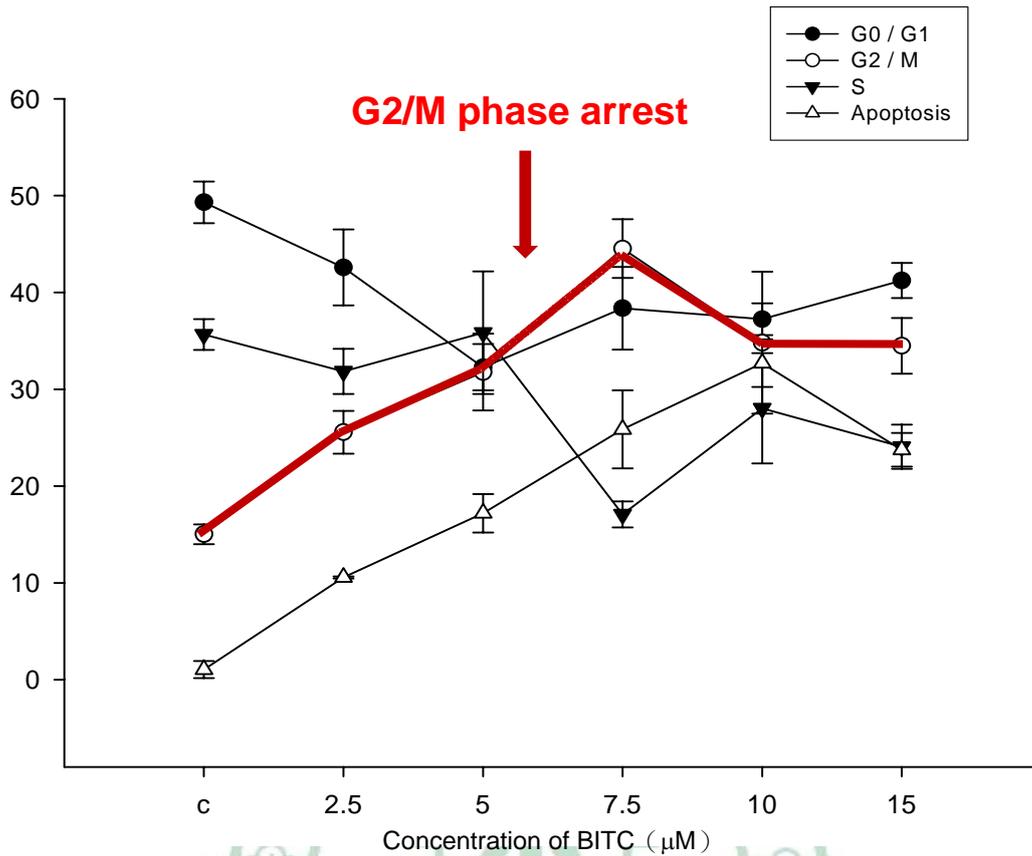


圖 3-3-A 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響。不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯(0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，以流式細胞儀分析對細胞週期的影響 ($n = 3$)，觀察細胞週期間各期細胞比例變化。圖中顯示隨著藥物濃度越高， G_0 / G_1 期減少， G_2 / M 期增加，S 期的比例也是減少，Apoptosis 的細胞比例則逐漸增高。

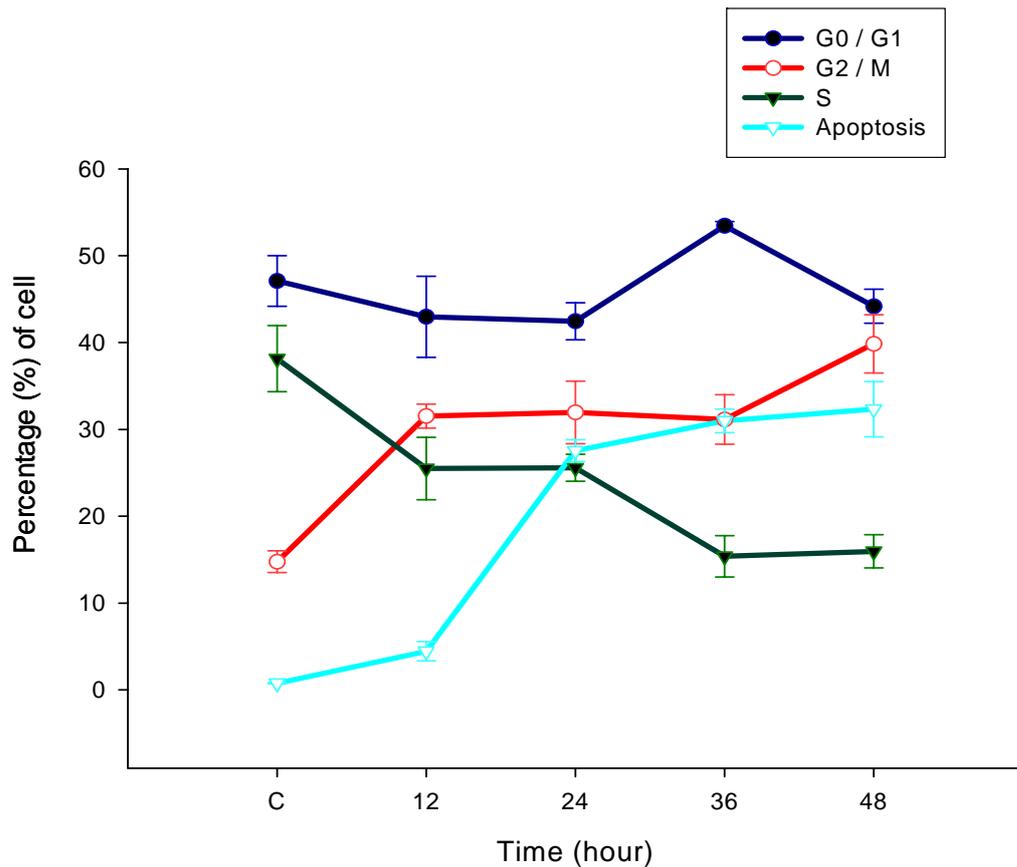


圖 3-3-B 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響。5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後 (0, 12, 24, 36, 48 小時)，以流式細胞儀分析對細胞週期的影響 (n = 3)，觀察細胞週期間各期細胞比例變化。圖中顯示隨著藥物作用時間越長，G₀ / G₁ 期無明顯變化，G₂ / M 期增加，S 期逐漸下降，Apoptosis 的細胞比例則逐漸增高。

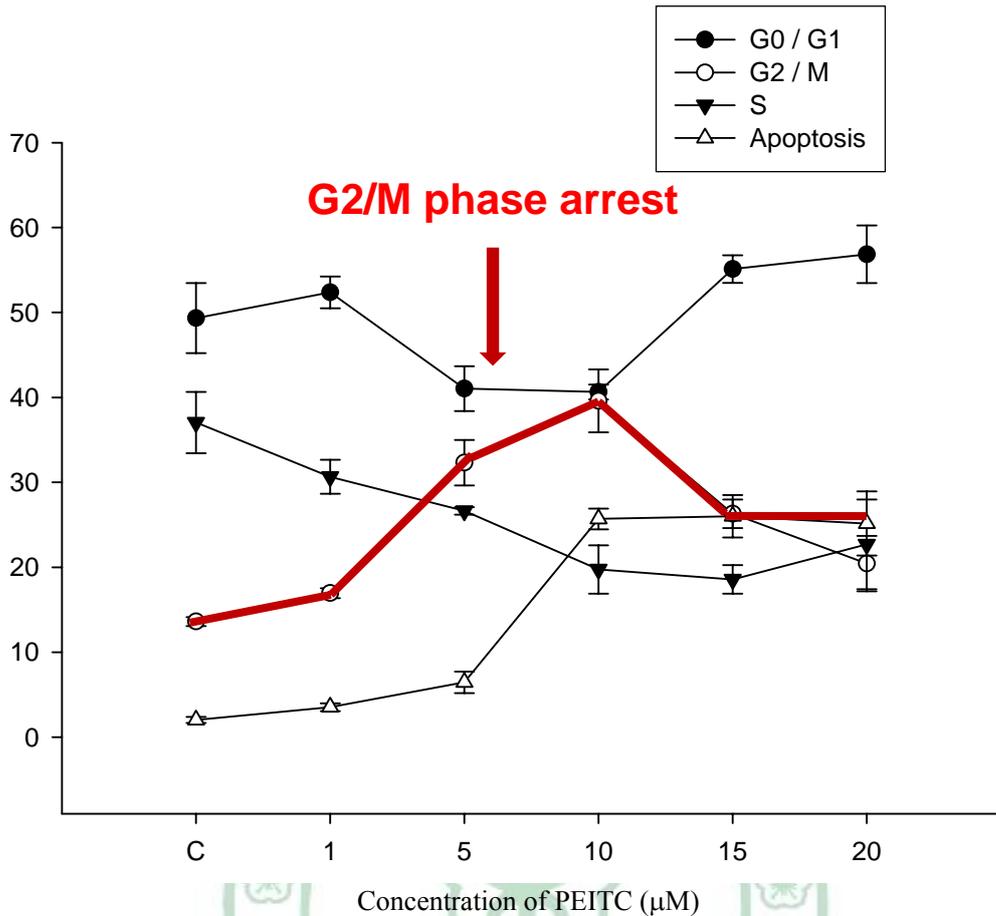


圖 3-3-C 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響。不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，以流式細胞儀分析對細胞週期的影響 ($n=3$)，觀察細胞週期間各期細胞比例變化。圖中顯示隨著藥物濃度越高， G_0 / G_1 期無明顯變化， G_2 / M 期增加，S 期逐漸減少，Apoptosis 的細胞比例則逐漸增高。

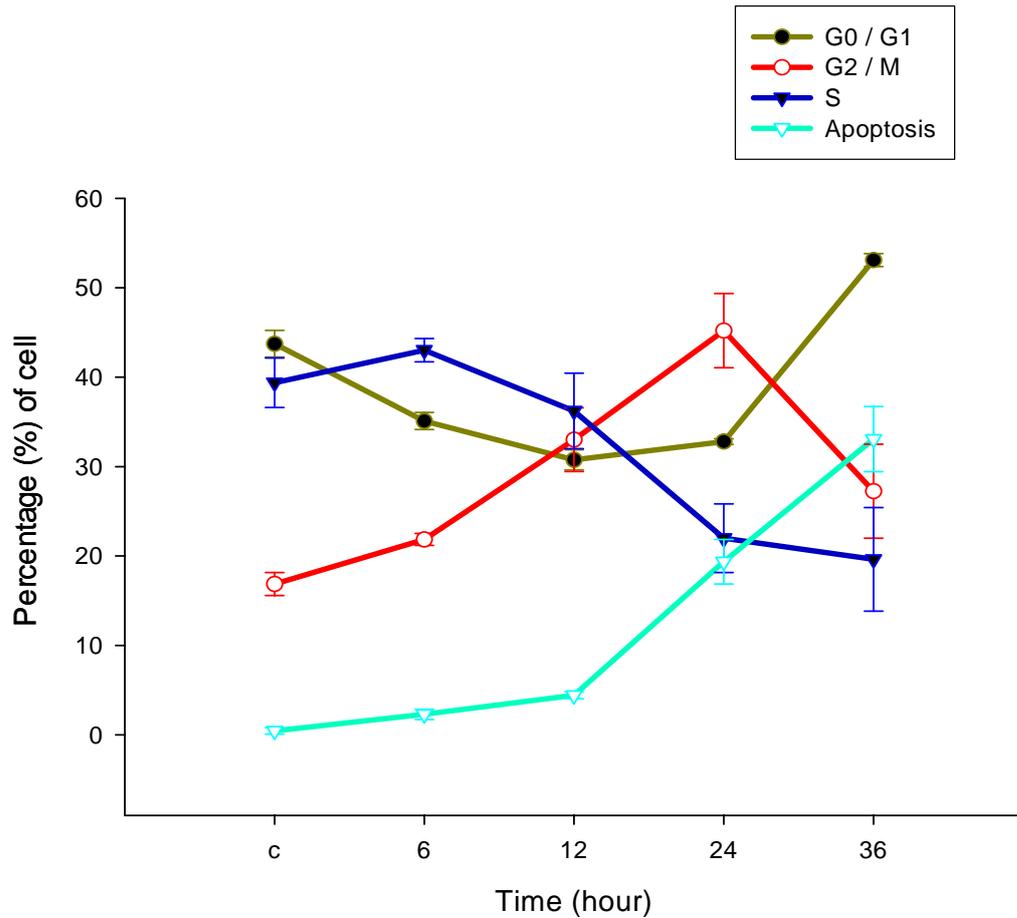


圖 3-3-D 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期的影響。10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後 (0, 6, 12, 24, 36 小時)，以流式細胞儀分析對細胞週期的影響 (n = 3)，觀察細胞週期間各期細胞比例變化。圖中顯示隨著藥物作用時間越長，G₀ / G₁ 期無明顯變化，G₂ / M 期增加，S 期逐漸下降，Apoptosis 的細胞比例則逐漸增高。

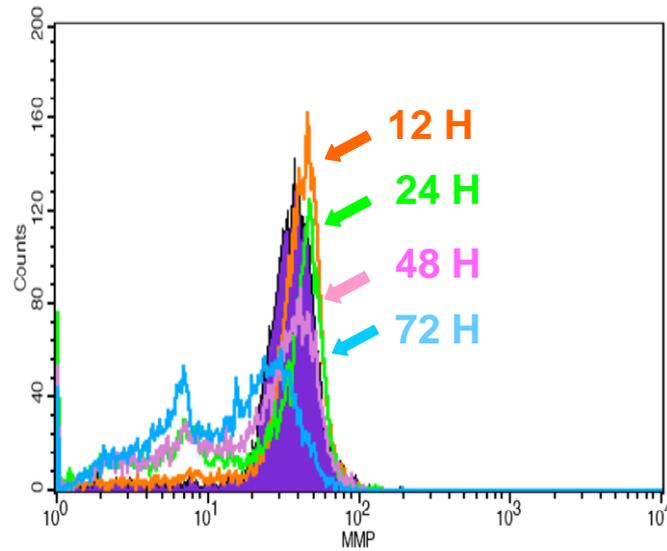


圖 3-4-A 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後 (0, 12, 24, 48, 72 小時)，以流式細胞儀分析細胞粒線體膜電位的改變，此為電腦分析結果的重疊圖。

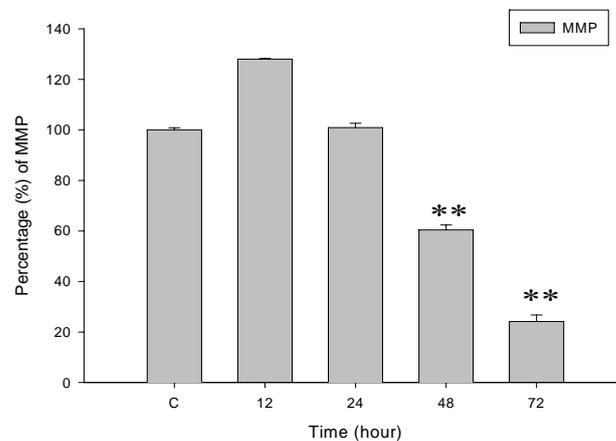


圖 3-4-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後 (0, 12, 24, 48, 72 小時)，以流式細胞儀分析細胞粒線體膜電位的改變，此為粒線體膜電位相對量之統計圖 (n = 3; * 表示與控制組比較 $p < 0.05$; ** 表示

與控制組比較 $p < 0.01$; c 組為控制組)。

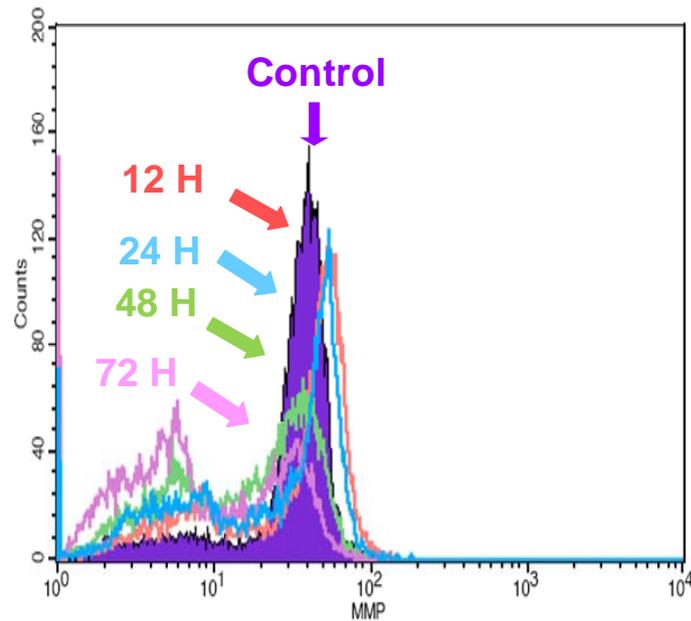


圖 3-4-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後 (0, 12, 24, 48, 72 小時)，以流式細胞儀分析細胞粒線體膜電位的改變，此為電腦分析結果的重疊圖。

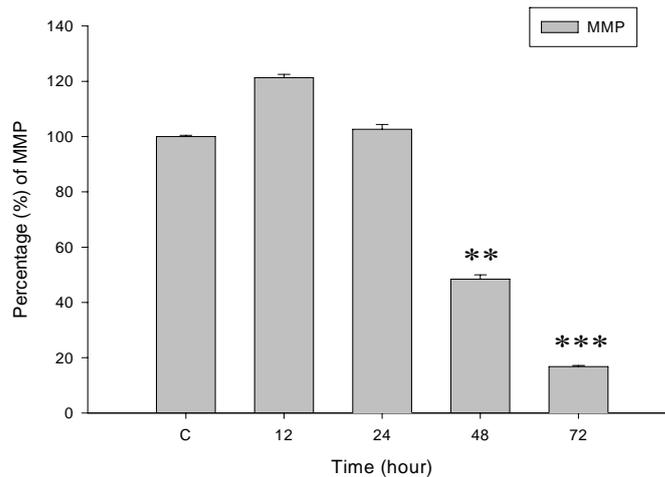


圖 3-4-D 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間後 (0, 12, 24, 48, 72 小時)，以流式細胞儀

分析細胞粒線體膜電位的改變，此為粒線體膜電位相對量之統計圖（ $n = 3$ ；*表示與控制組比較 $p < 0.05$ ；**表示與控制組比較 $p < 0.01$ ；c 組為控制組）。

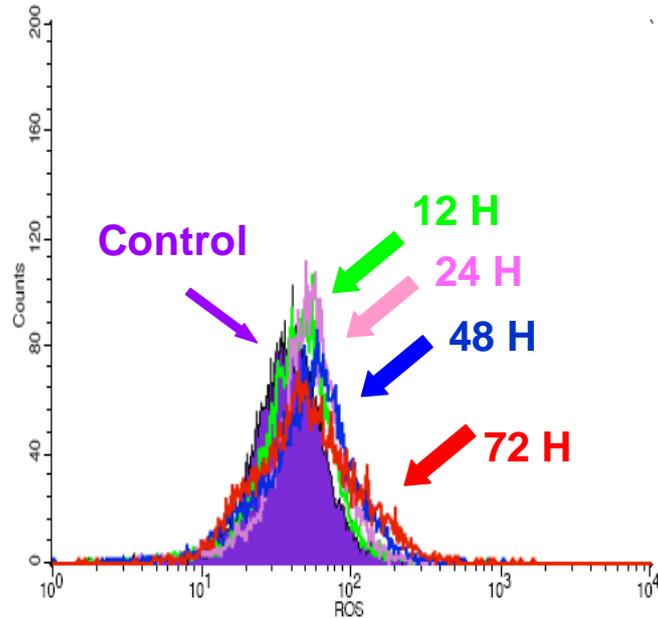


圖 3-5-A 以 $5 \mu\text{M}$ 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間（0, 12, 24, 48, 72 小時）後，以流式細胞儀分析細胞內 ROS 的產生，此為電腦分析結果的重疊圖。

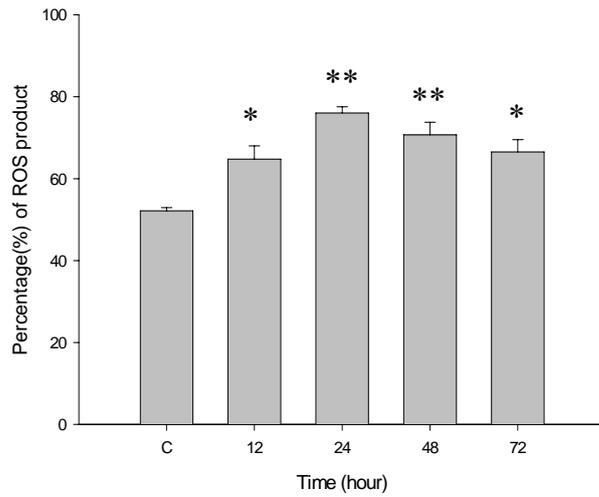


圖 3-5-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48, 72 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 ROS 的產生，此為 ROS 相對表現量之統計圖 (n = 3；* 表示與控制組比較 p < 0.05；** 表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

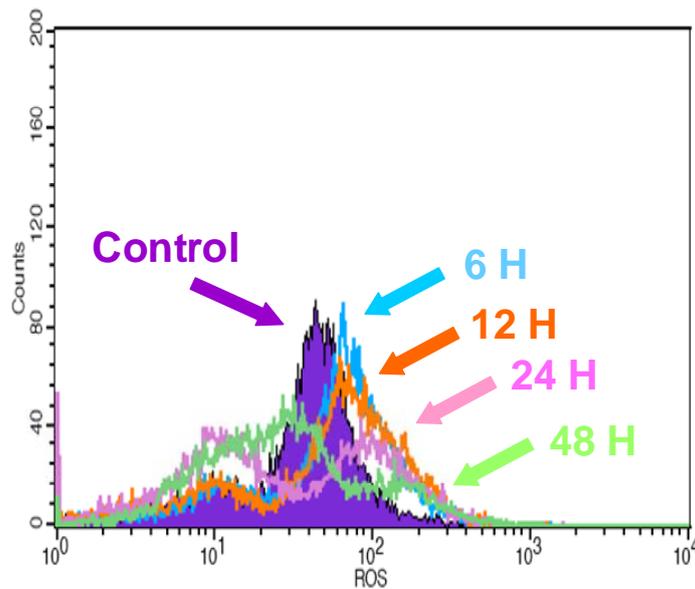


圖 3-5-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株

DU-145 作用不同時間 (0, 6, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 ROS 的產生，此為電腦分析結果的重疊圖。

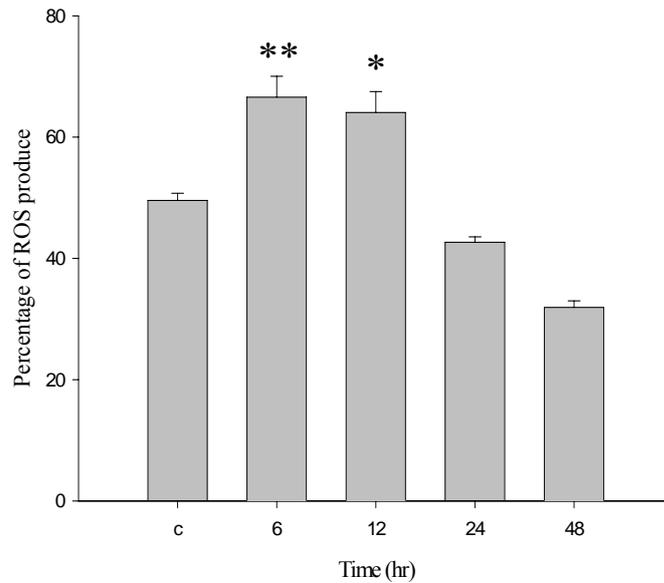


圖 3-5-D 以 10 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 6, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 ROS 的產生，此為 ROS 相對表現量之統計圖 (n = 3; * 表示與控制組比較 $p < 0.05$; ** 表示與控制組比較 $p < 0.01$; c 組為控制組)。

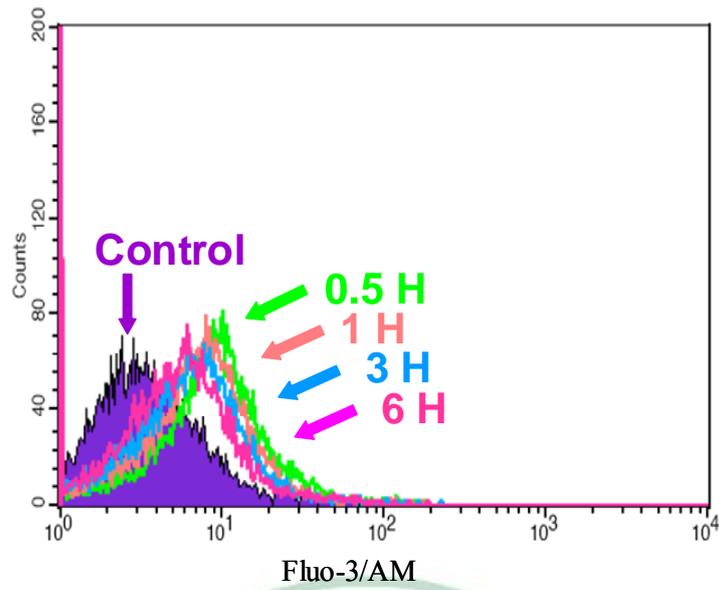


圖 3-6-A 以 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 0.5, 1, 3, 6 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內鈣離子的產生，此為電腦分析結果的重疊圖。

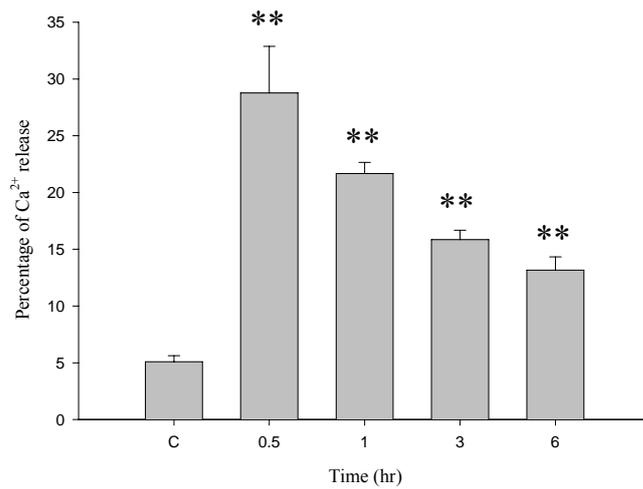


圖 3-6-B 以 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 0.5, 1, 3, 6 小時) 後，以流式

細胞儀分析細胞內鈣離子的產生，此為鈣離子相對表現量之統計圖 (n=3；*表示與控制組比較 p < 0.05；**表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

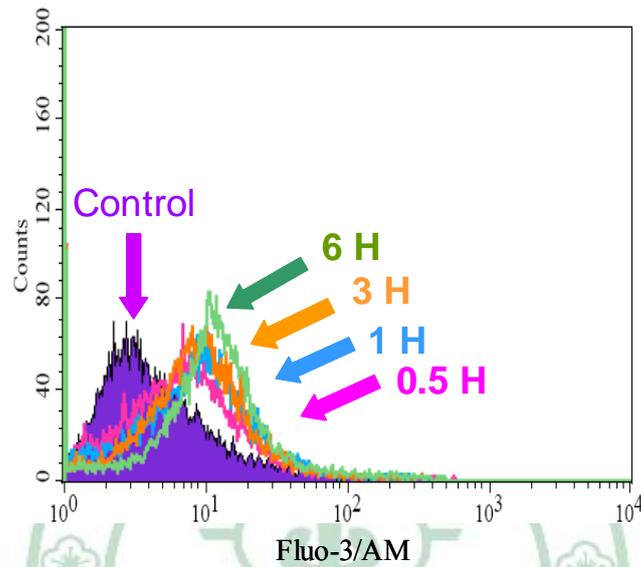


圖 3-6-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 0.5, 1, 3, 6 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內鈣離子的產生，此為電腦分析結果的重疊圖。

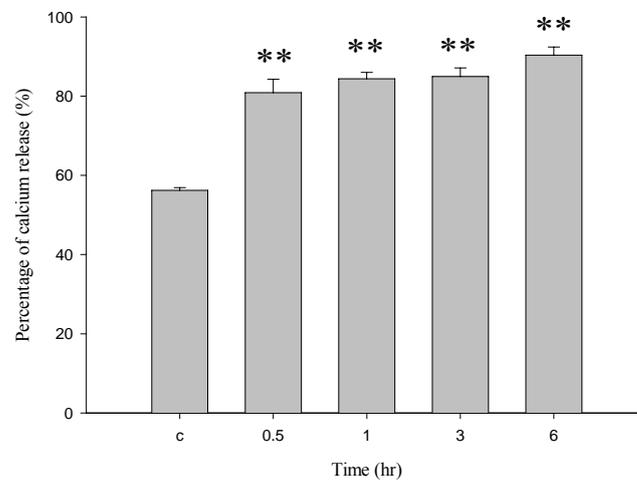


圖 3-6-D 以 10 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 0.5, 1, 3, 6 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內鈣離子的產生，此為鈣離子相對表現量之統計圖 (n = 3; * 表示與控制組比較 p < 0.05; ** 表示與控制組比較 p < 0.01; c 組為控制組)。

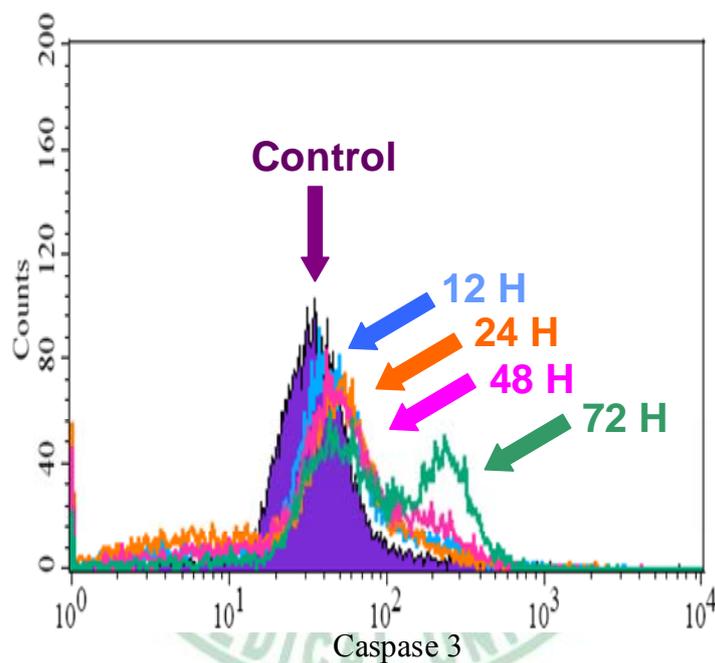


圖 3-7-A 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48, 72 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-3 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖。

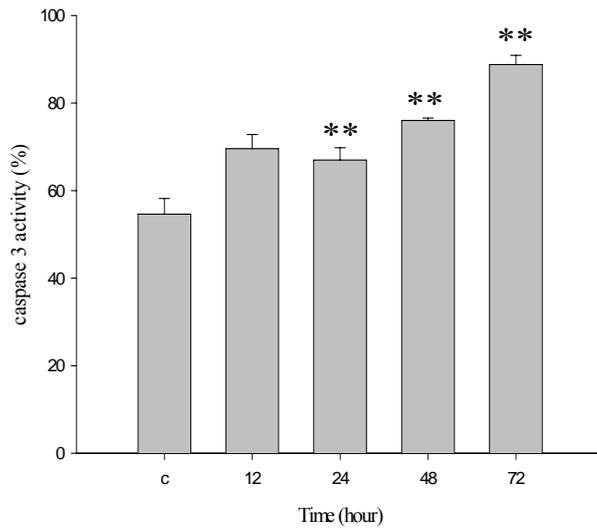


圖 3-7-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48, 72 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-3 的活性，此為 caspase-3 的活性相對表現量之統計圖 (n = 3；* 表示與控制組比較 $p < 0.05$ ；** 表示與控制組比較 $p < 0.01$ ；c 組為控制組)。

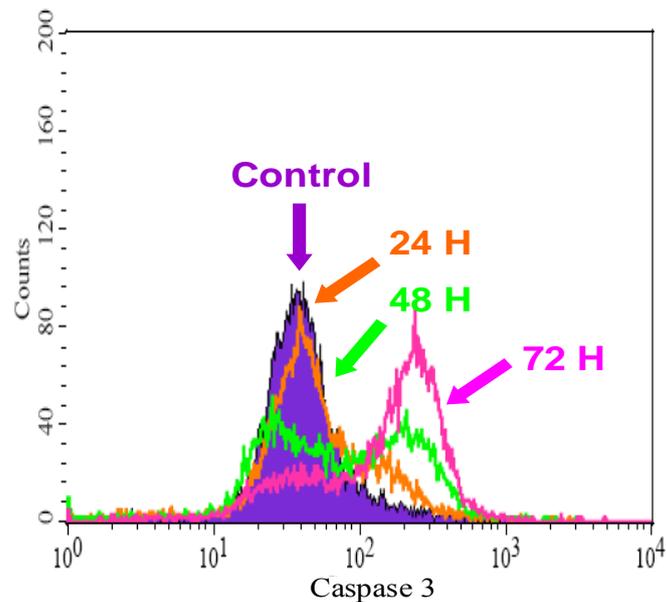


圖 3-7-C 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 24, 48, 72 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-3 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖。

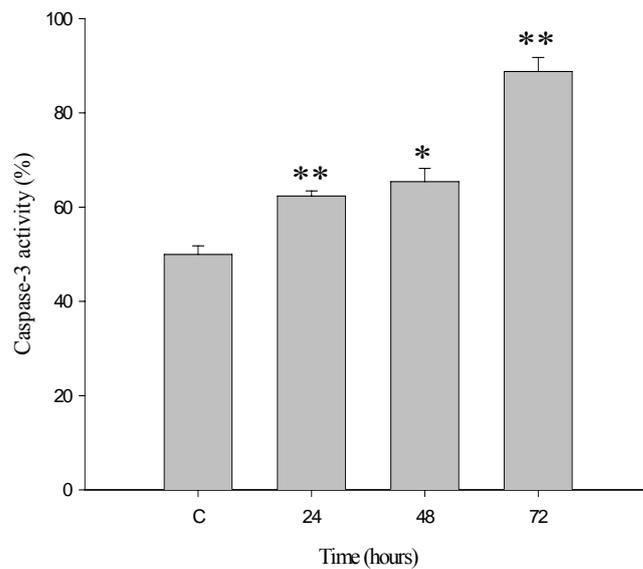


圖 3-7-D 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 24, 48, 72 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-3 的活性，此為 caspase-3 的活性相對表現量之統計圖 (n = 3; * 表示與控制組比較 $p < 0.05$; ** 表示與控制組比較 $p < 0.01$; c 組為控制組)。

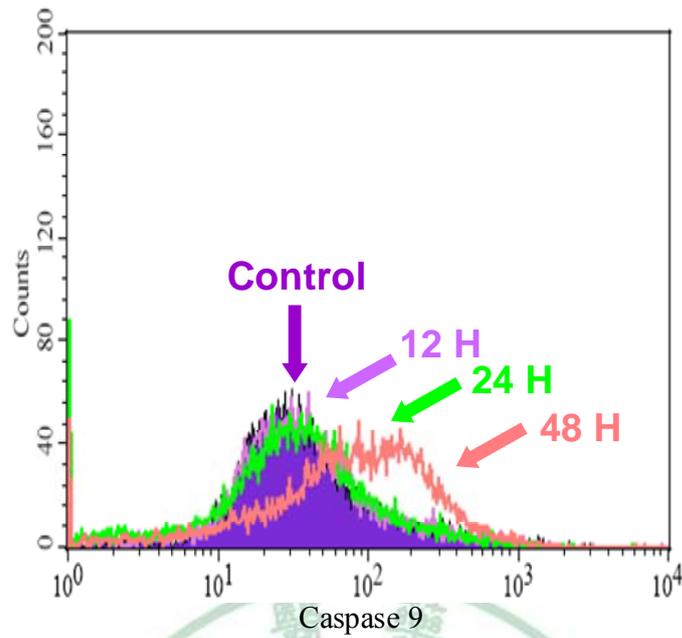


圖 3-7-E 以 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-9 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖。

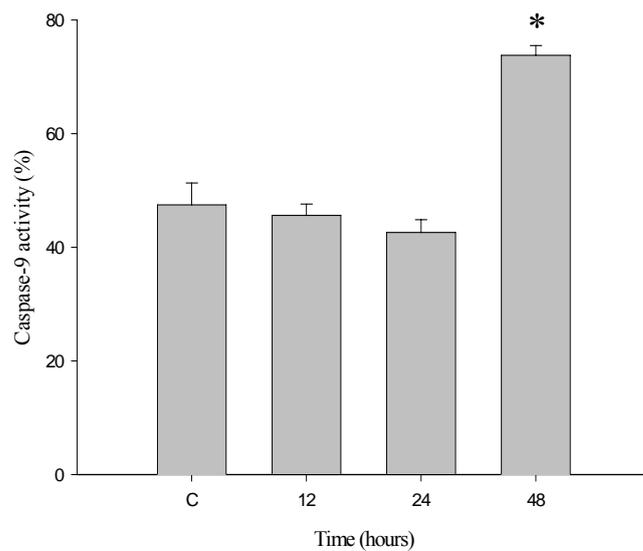


圖 3-7-F 以 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株

DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-9 的活性，此為 caspase-9 的活性相對表現量之統計圖 (n = 3；* 表示與控制組比較 p < 0.05；** 表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

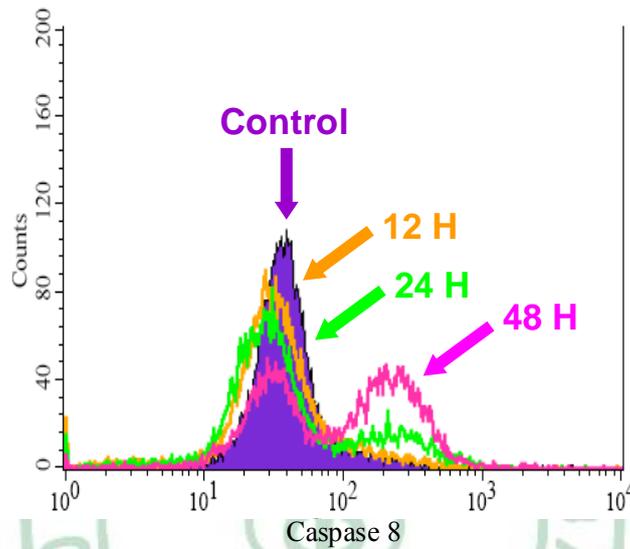


圖 3-7-G 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-8 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖。

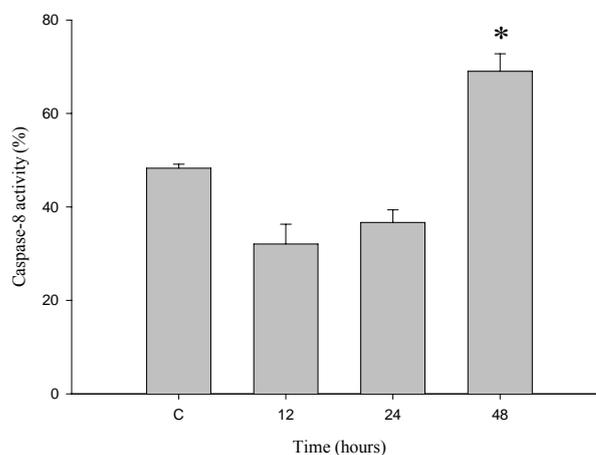


圖 3-7-H 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-8 的活性，此為 caspase-8 的活性相對表現量之統計圖 (n = 3；* 表示與控制組比較 p < 0.05；** 表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

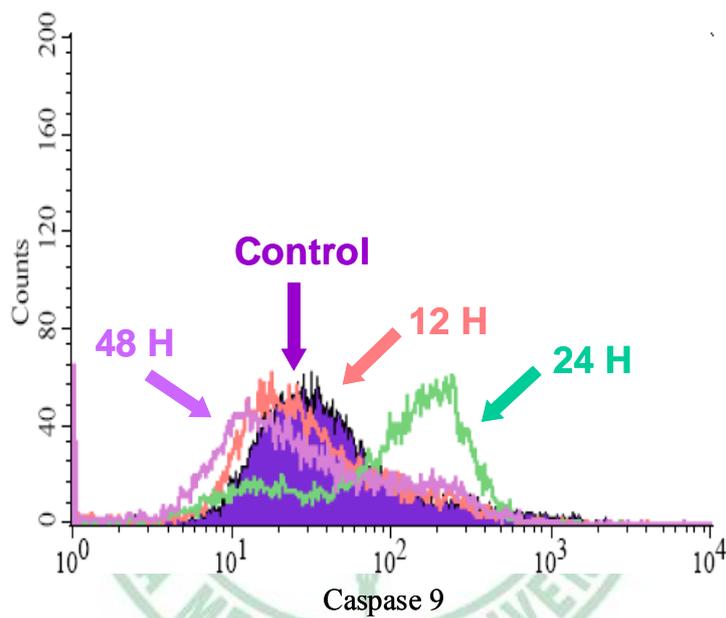


圖 3-7-I 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-9 的活性，此為電腦分析結果的重疊圖。

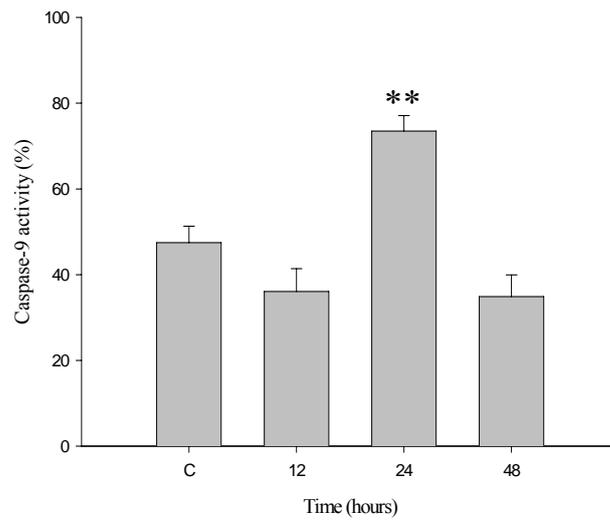


圖 3-7-J 以 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48 小時) 後，以流式細胞儀分析細胞內 caspase-9 的活性，此為 caspase-9 的活性相對表現量之統計圖 (n = 3；* 表示與控制組比較 $p < 0.05$ ；** 表示與控制組比較 $p < 0.01$ ；c 組為控制組)。

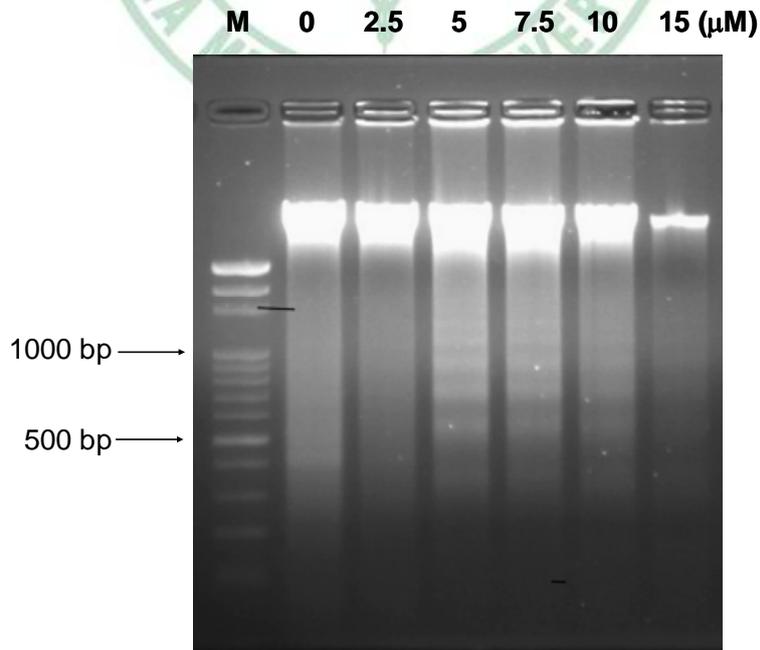


圖 3-8-A 苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯 (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

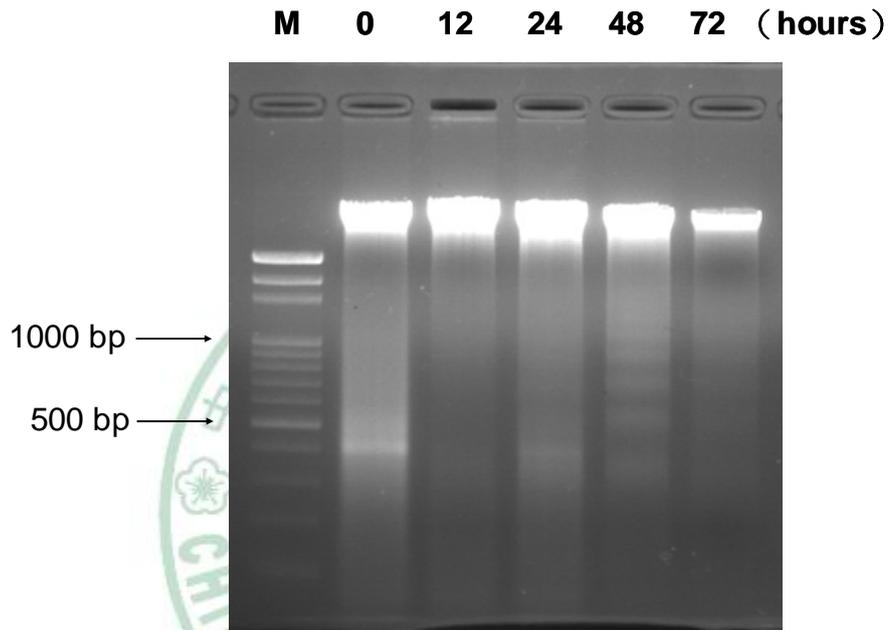


圖 3-8-B 苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。以 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48, 72 小時) 後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

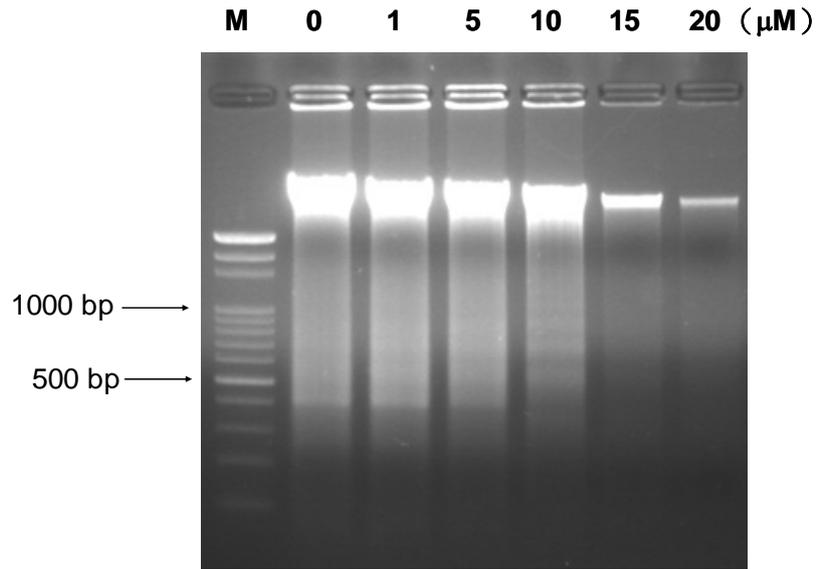


圖 3-8-C 苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯(0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

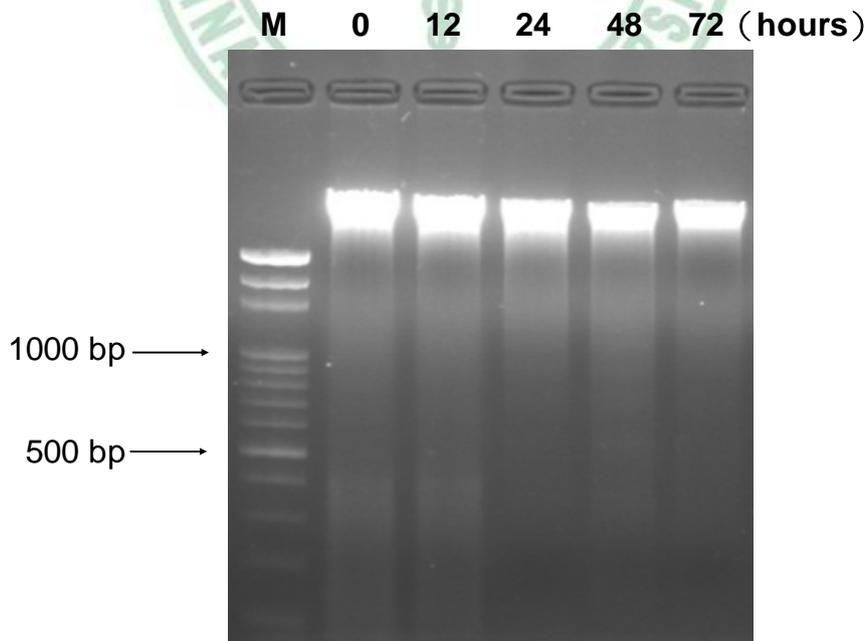


圖 3-8-D 苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。以 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯對人類前

列腺癌細胞株 DU-145 作用不同時間 (0, 12, 24, 48, 72 小時) 後，利用 DNA 電泳來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

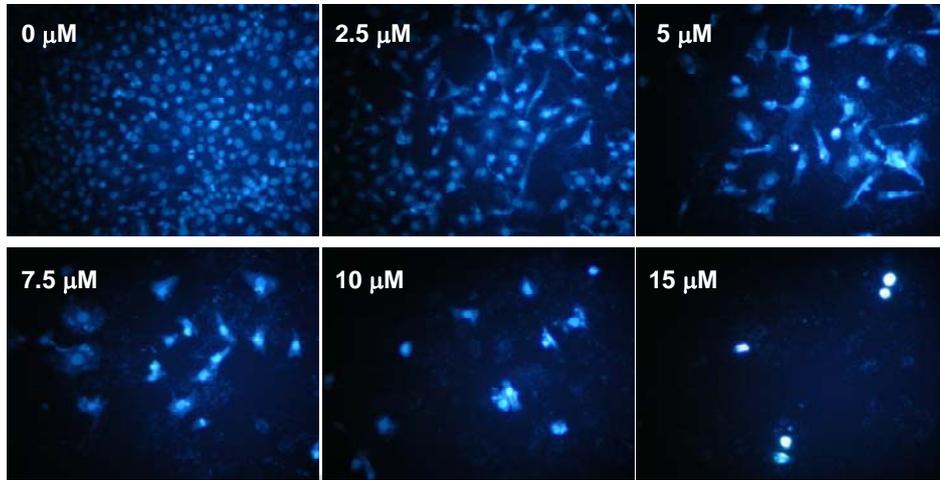


圖 3-8-E 苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯 (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 48 小時後，利用 DAPI 染色來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

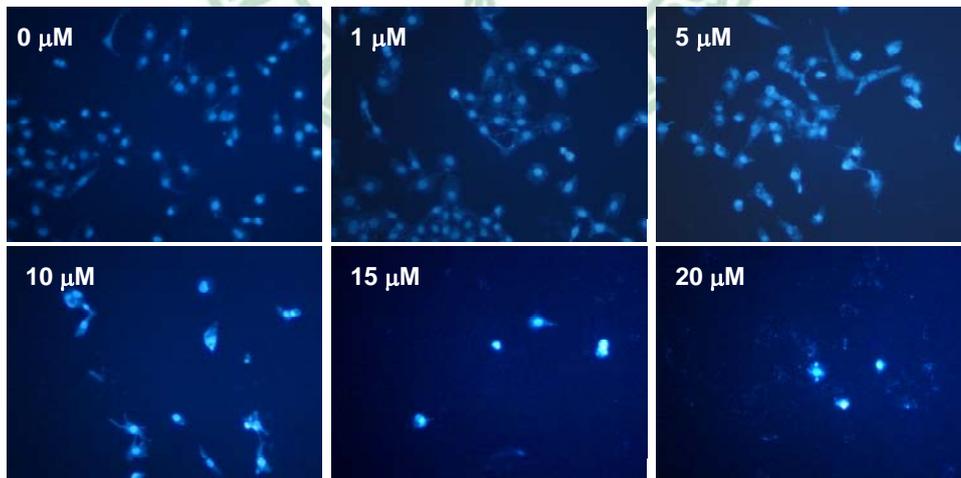


圖 3-8-F 苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 48

小時後，利用 DAPI 染色來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

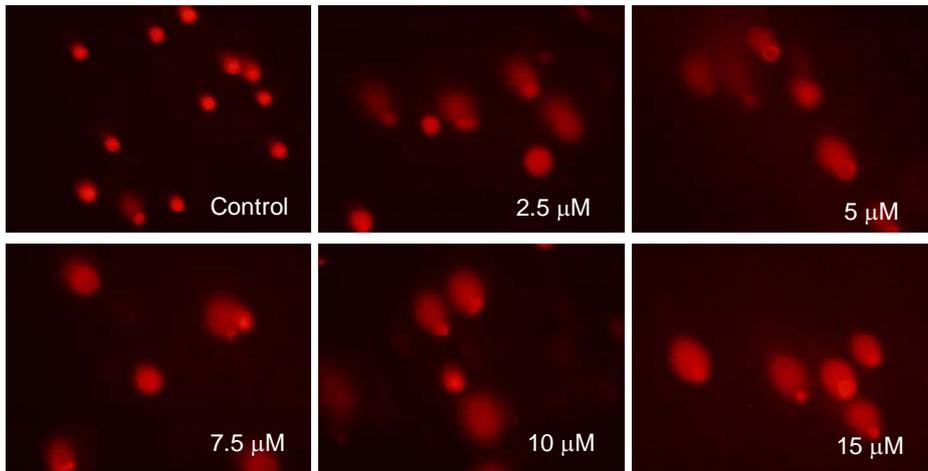


圖 3-8-G 苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯 (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

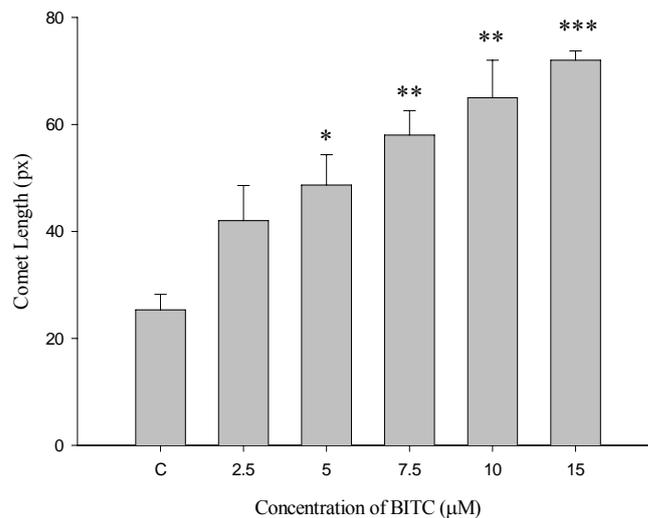


圖 3-8-H 苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯甲基異硫氰酸酯(0, 2.5, 5,

7.5, 10, 15 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形，此為利用 CometScore 量化後的統計圖 ($n = 3$ ；* 表示與控制組比較 $p < 0.05$ ；** 表示與控制組比較 $p < 0.01$ ；c 組為控制組)。

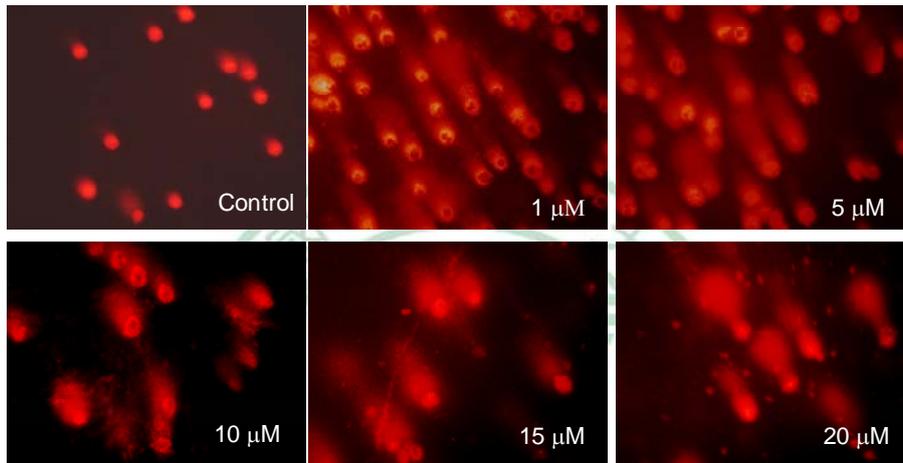


圖 3-8-I 苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形。

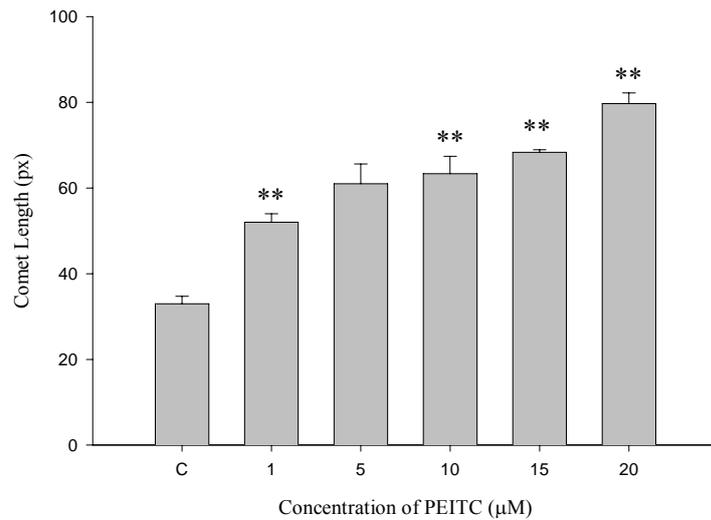


圖 3-8-J 苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞 DNA 損傷的情形。不同濃度的苯乙基異硫氰酸酯 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時後，利用彗星試驗(Comet assay)來觀察 DNA 斷裂受損的情形，此為利用 CometScore 量化後的統計圖 (n = 3；*表示與控制組比較 $p < 0.05$ ；**表示與控制組比較 $p < 0.01$ ；c 組為控制組)。

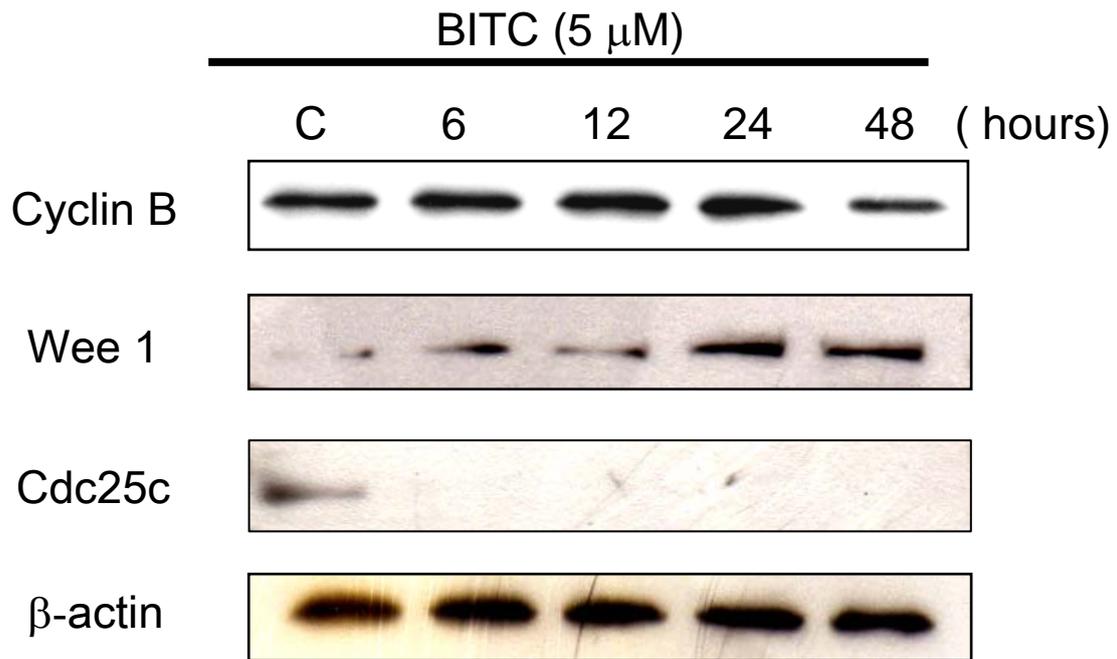


圖 3-9-A 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

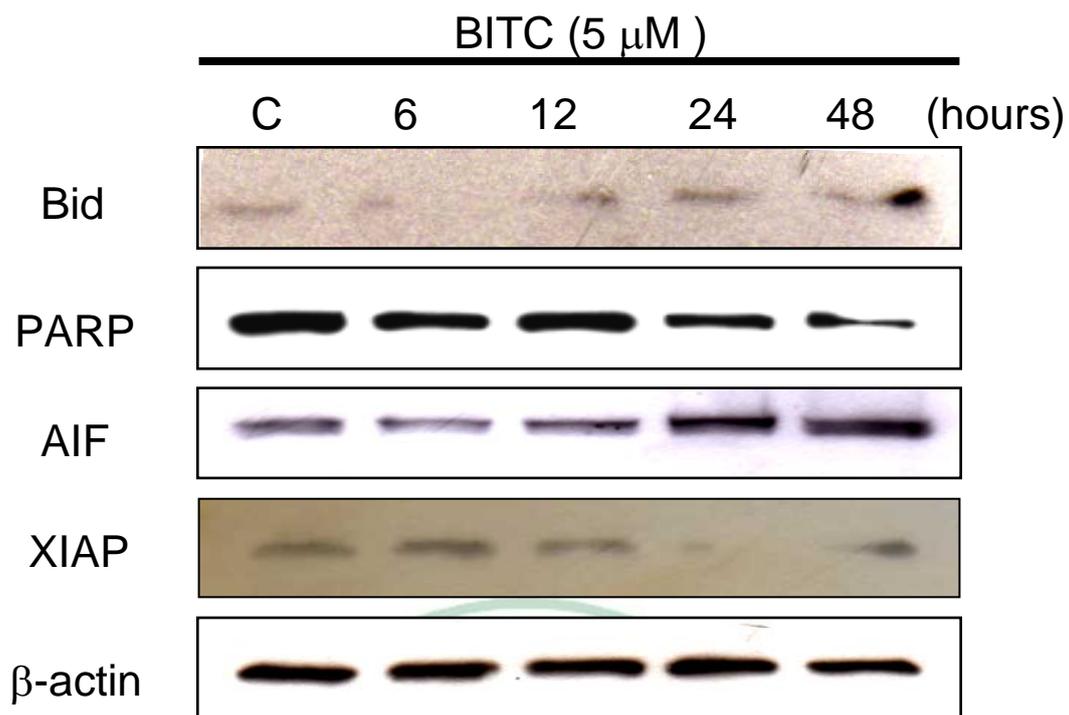


圖 3-9-B 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 粒線體路徑相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

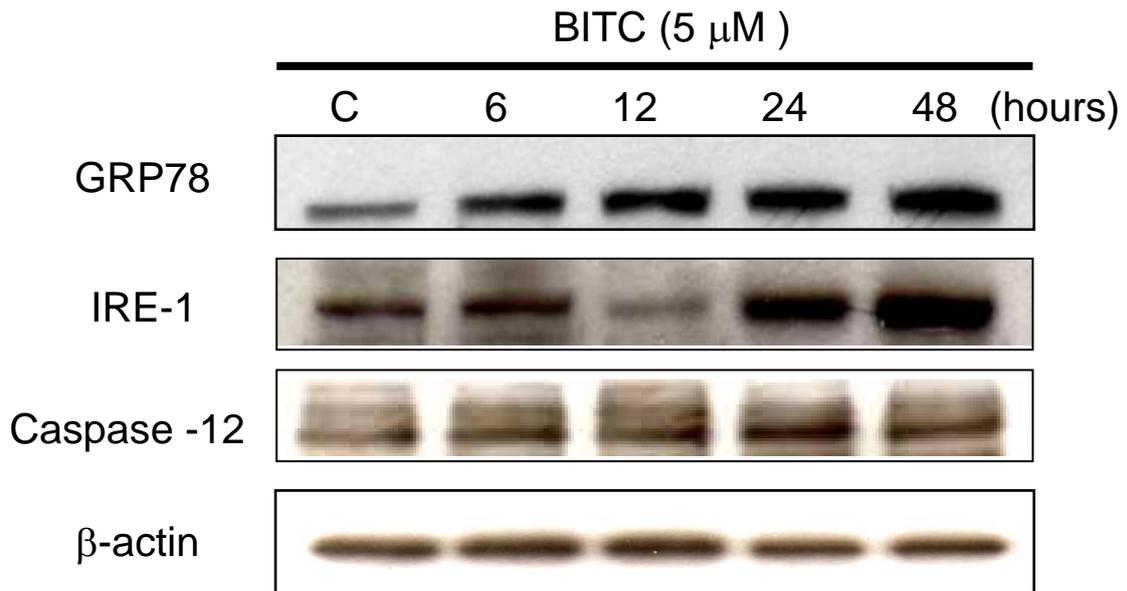


圖 3-9-C 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 內質網壓力路徑相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

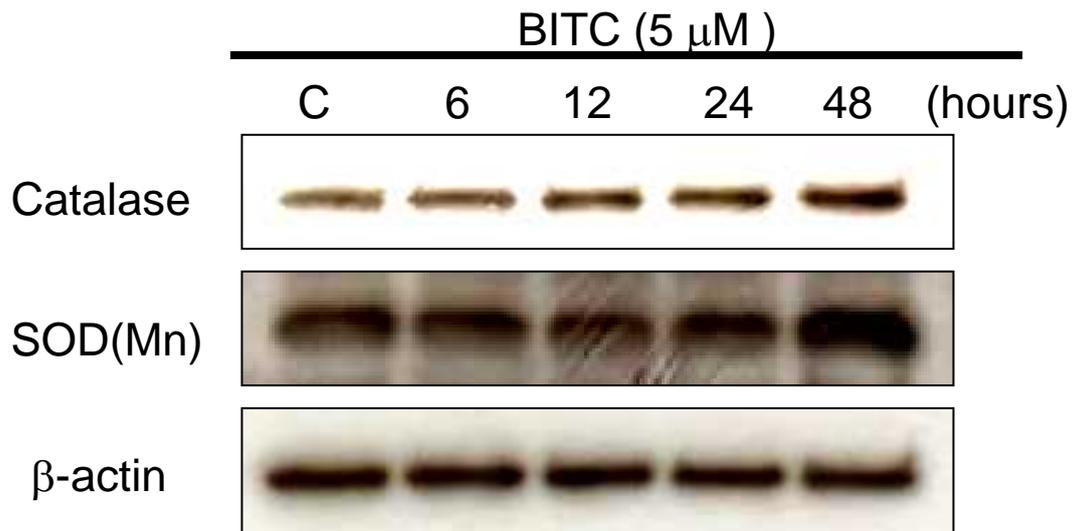


圖 3-9-D 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 活性氧化物相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

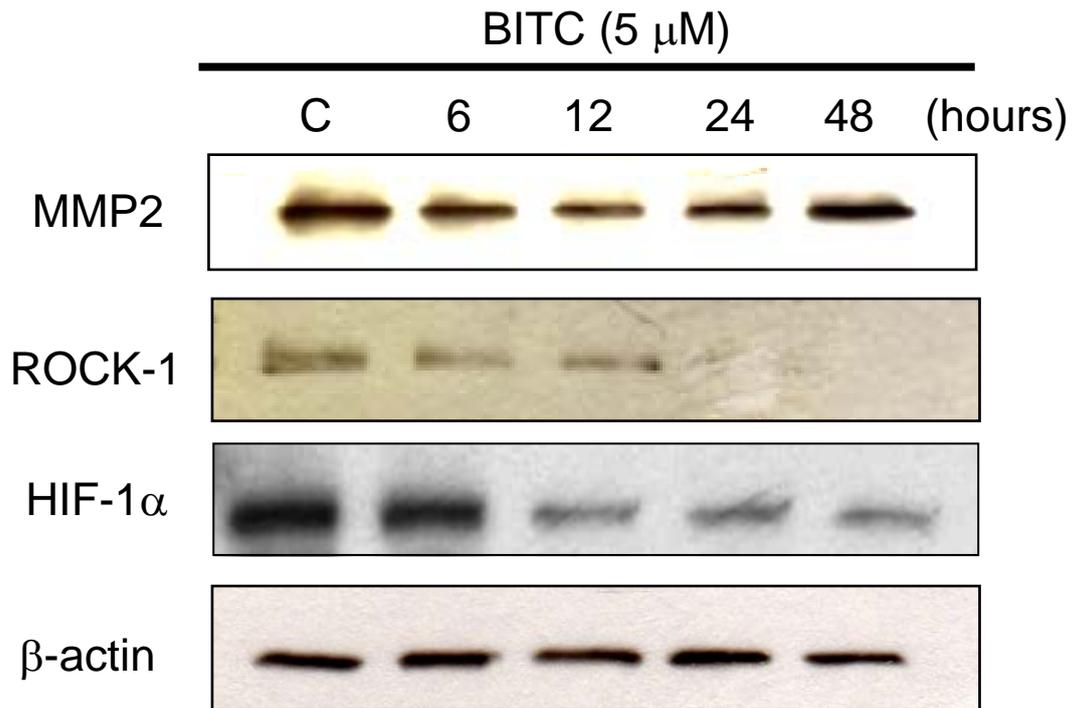


圖 3-9-E 利用西方墨點法探討苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞轉移相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

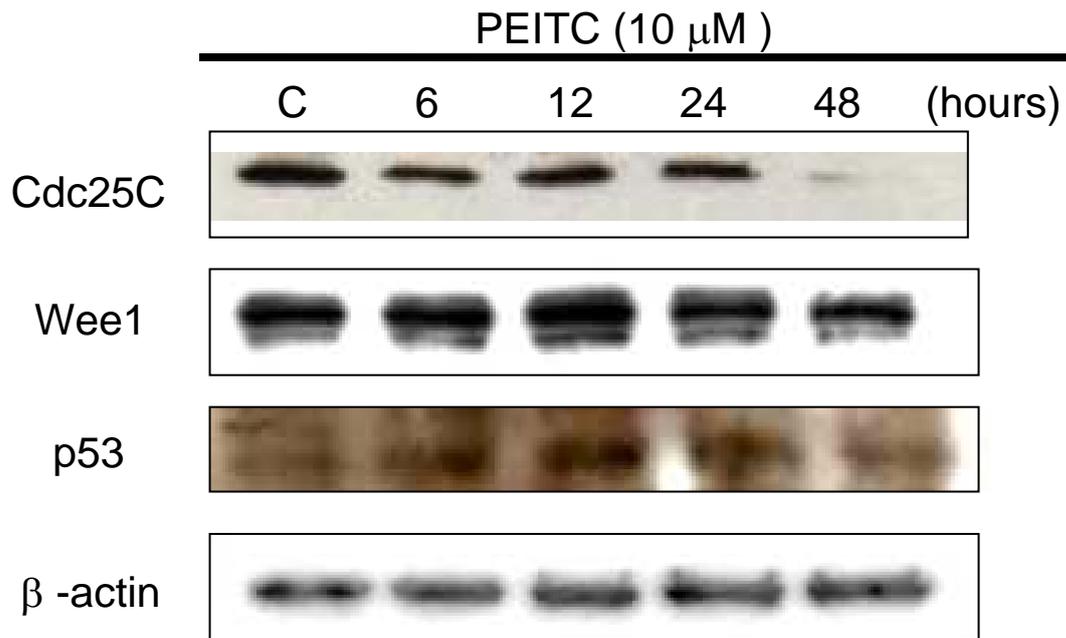


圖 3-9-F 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 調控細胞週期蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48 小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

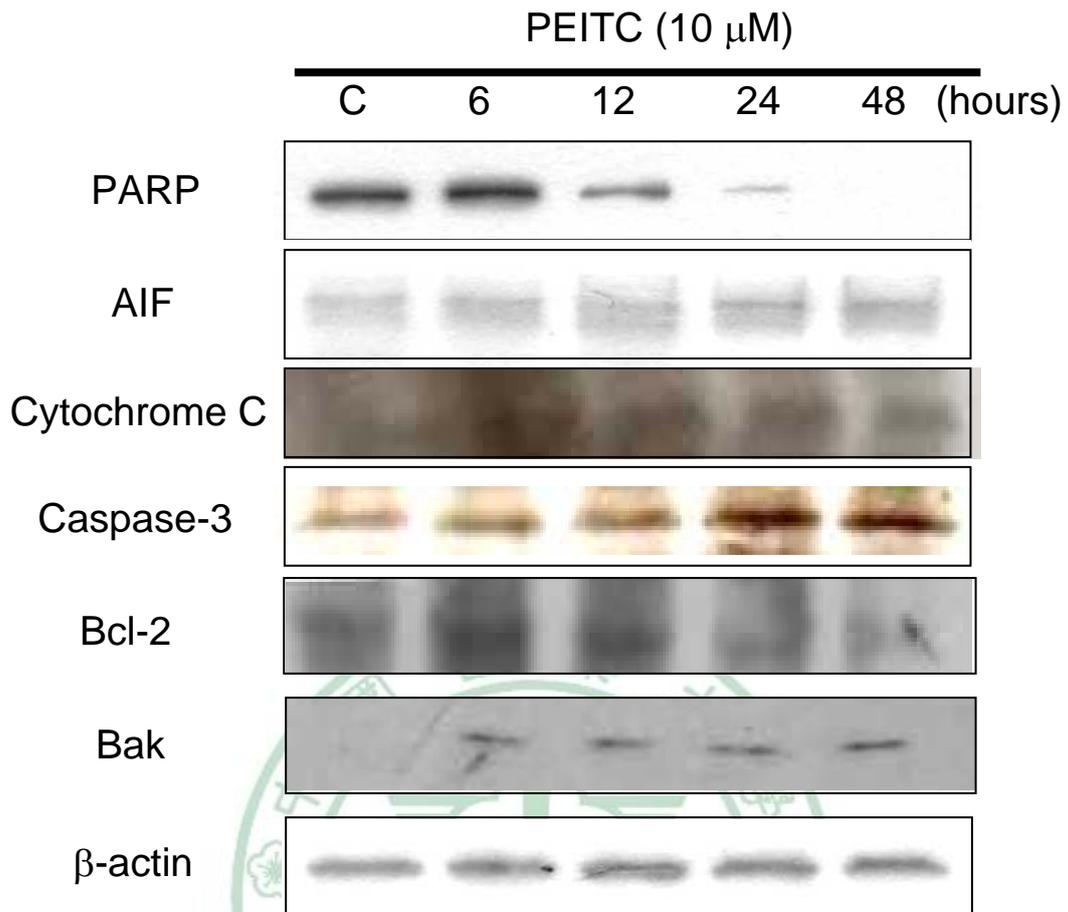


圖 3-9-G 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 粒線體路徑相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48 小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

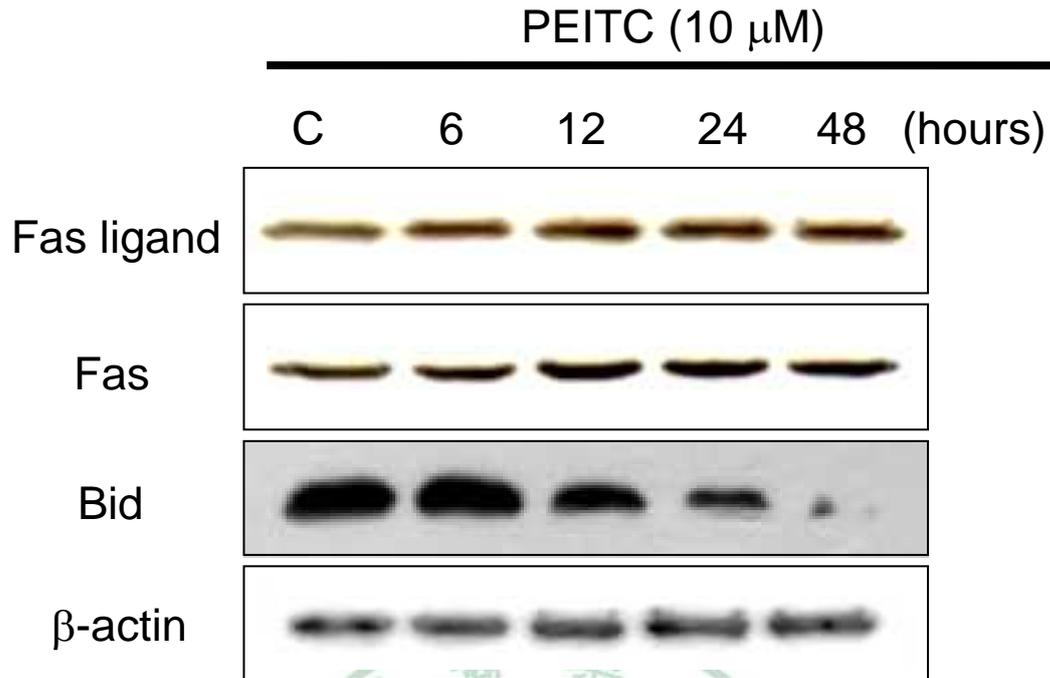


圖 3-9-H 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 死亡接受器路徑相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

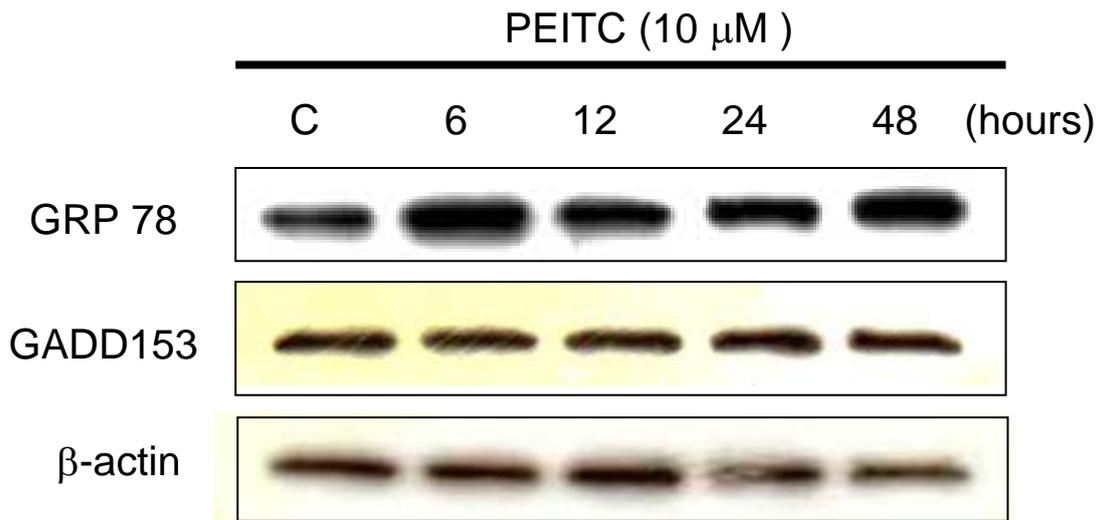


圖 3-9-I 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 內質網壓力路徑相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後 (6, 12, 24, 48 小時)，以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

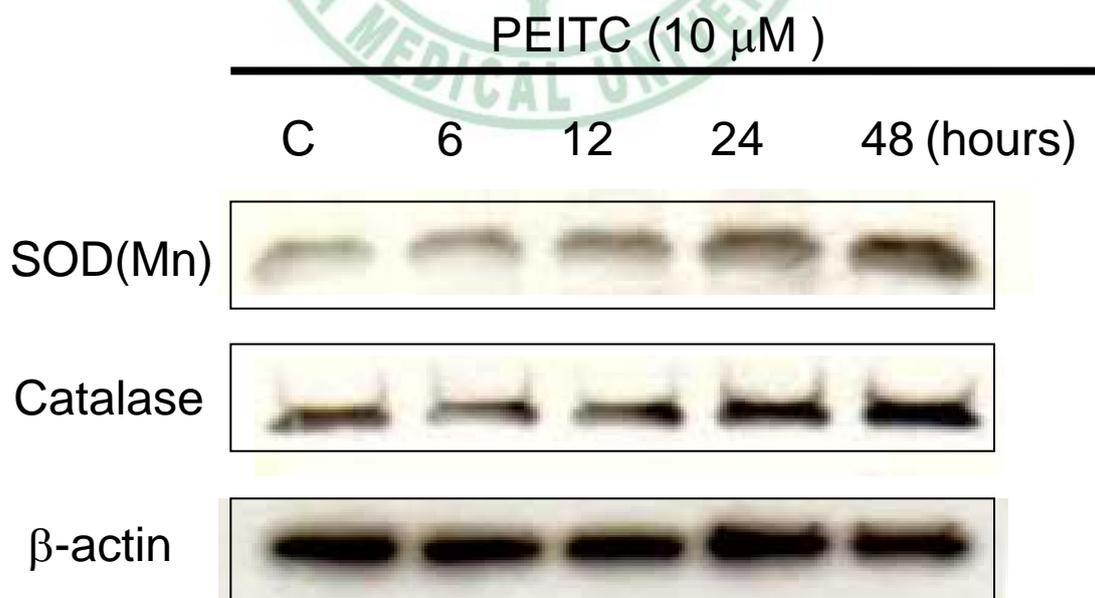


圖 3-9-J 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 活性氧化物相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48 小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

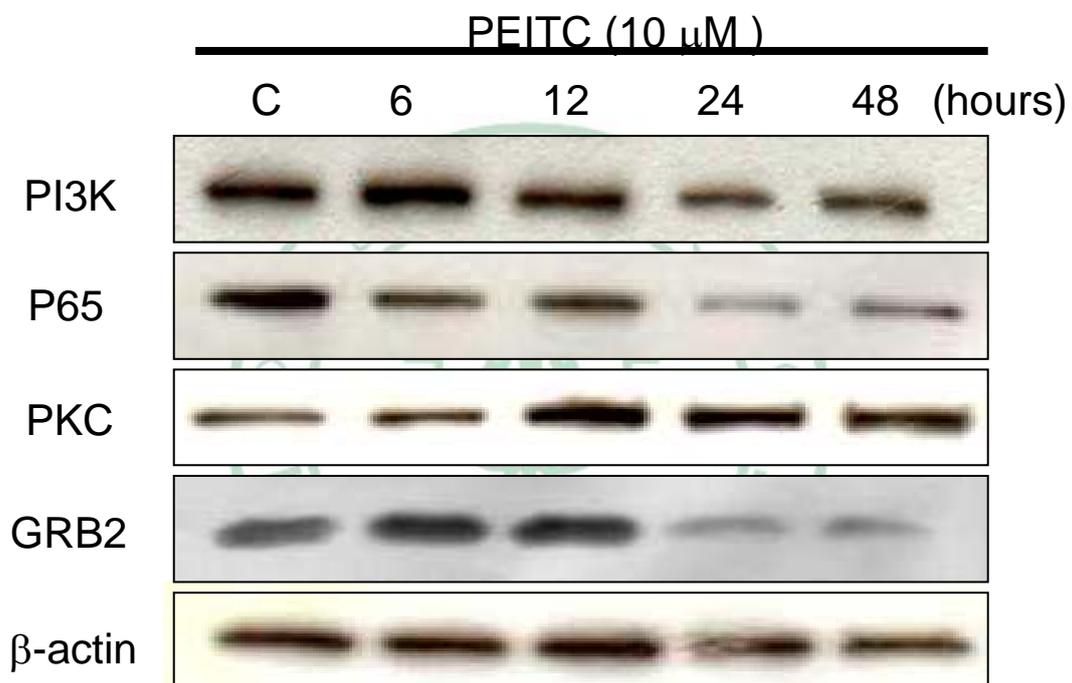


圖 3-9-K 利用西方墨點法探討苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞增生相關蛋白的表現。將人類前列腺癌細胞株 DU-145 加入 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯作用不同時間後（6, 12, 24, 48 小時），以西方墨點法觀察蛋白相對表現量。

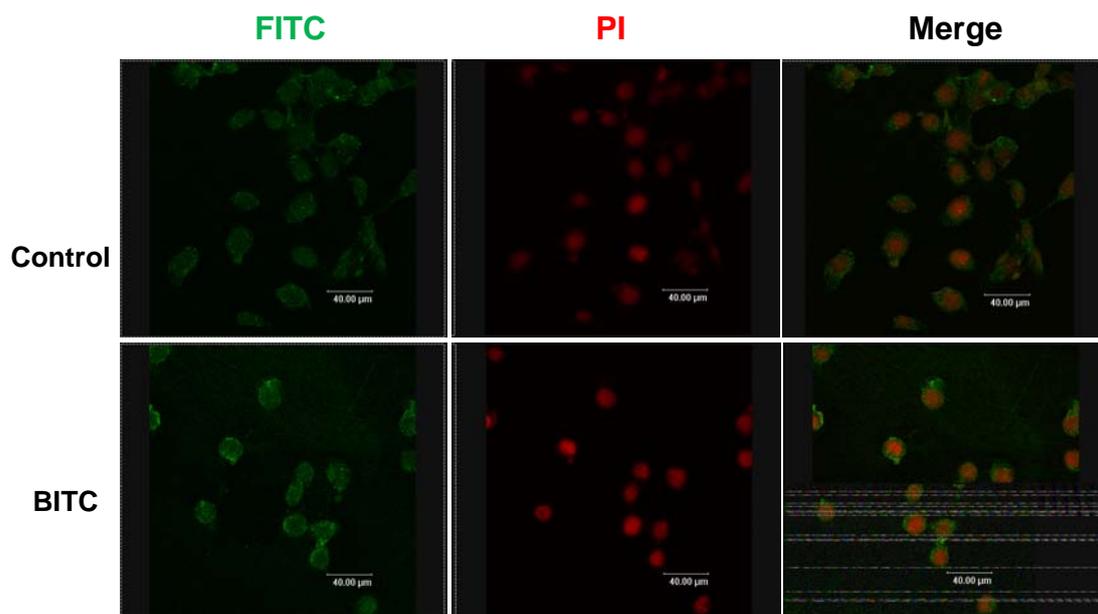


圖 3-10-A 以 5 μM 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 AIF 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量。綠色螢光為 AIF 蛋白，紅色螢光為染上 PI 的細胞核。經過加藥培養後顯示 AIF 蛋白量產生變化以及位置分佈的改變。

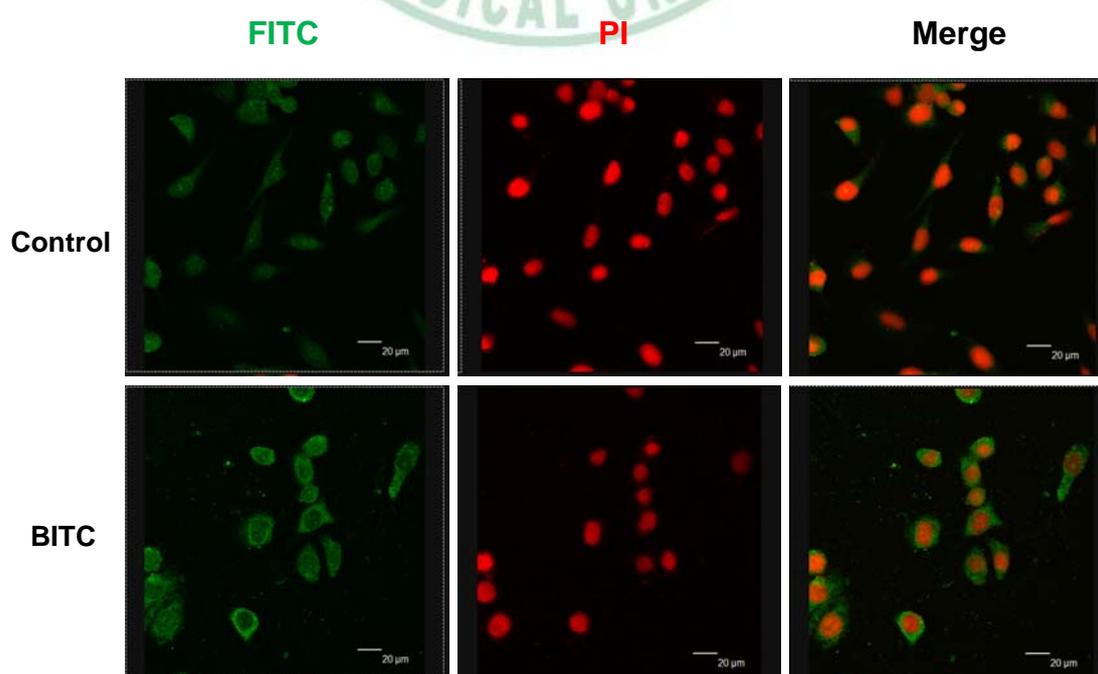


圖 3-10-B 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 Endo G 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量。綠色螢光為 Endo G 蛋白，紅色螢光為染上 PI 的細胞核。經過加藥培養後顯示 Endo G 蛋白量產生變化以及位置分佈的改變。

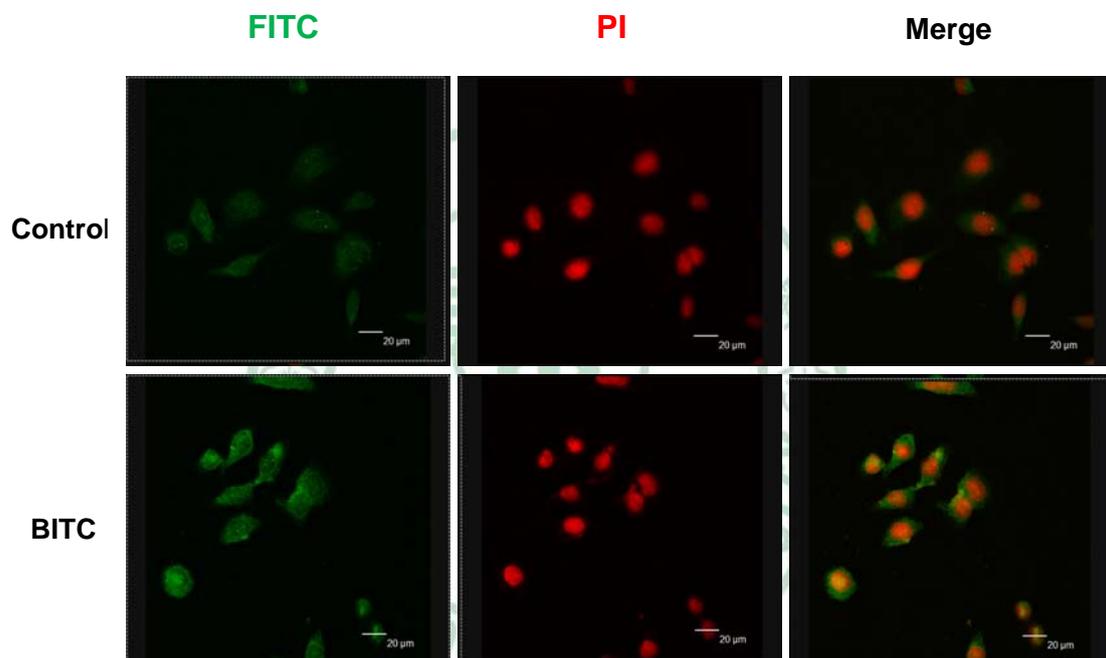


圖 3-10-C 以 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 GADD153 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量。綠色螢光為 GADD153 蛋白，紅色螢光為染上 PI 的細胞核。經過加藥培養後顯示 GADD153 蛋白量產生變化以及位置分佈的改變。

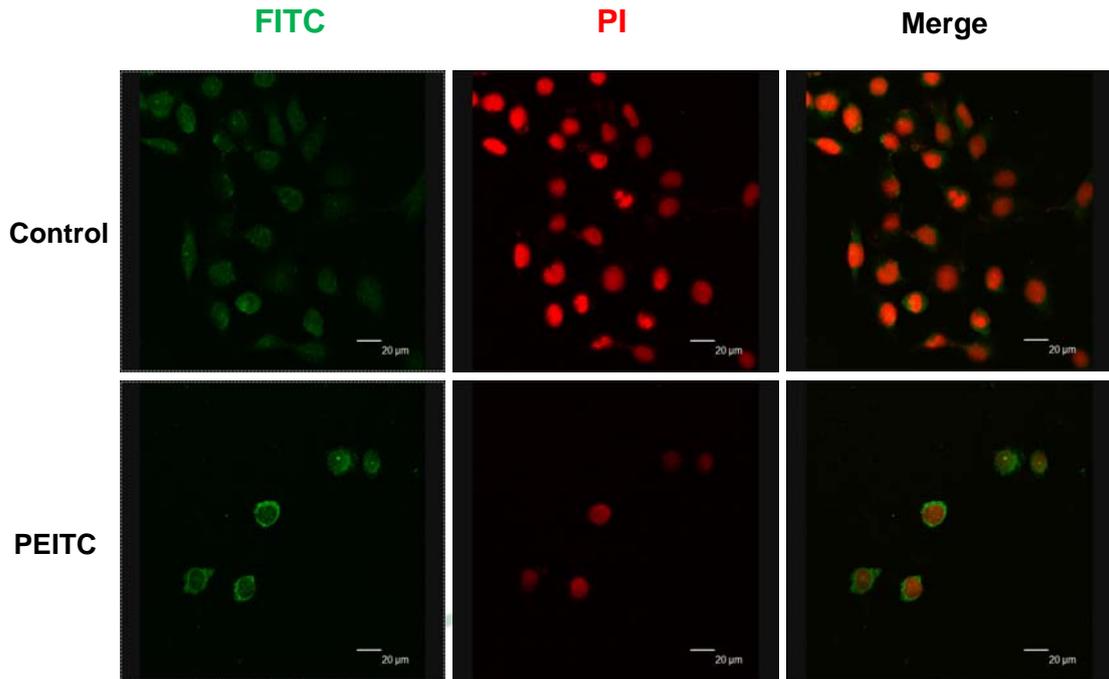


圖 3-10-D 以 10 μ M 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 Endo G 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量。綠色螢光為 Endo G 蛋白，紅色螢光為染上 PI 的細胞核。經過加藥培養後顯示 Endo G 蛋白量產生變化以及位置分佈的改變。

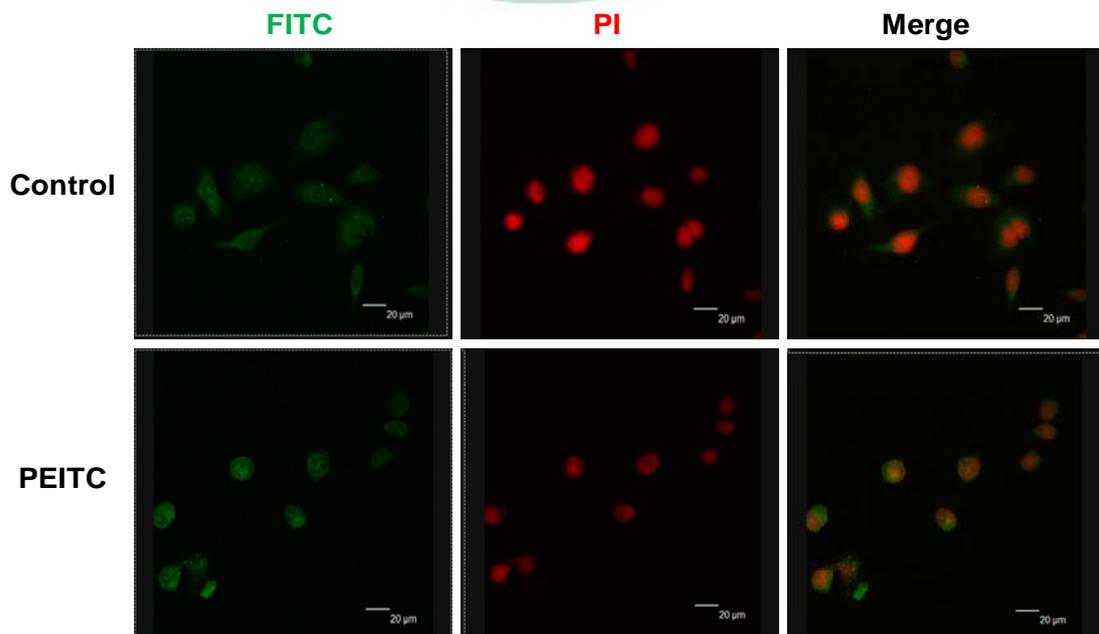


圖 3-10-E 以 10 μM 苯乙基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用後，以共軛焦顯微鏡觀察 GADD153 在 DU-145 細胞中的分佈及表現量。綠色螢光為 GADD153 蛋白，紅色螢光為染上 PI 的細胞核。經過加藥培養後顯示 GADD153 蛋白量產生變化以及位置分佈的改變。

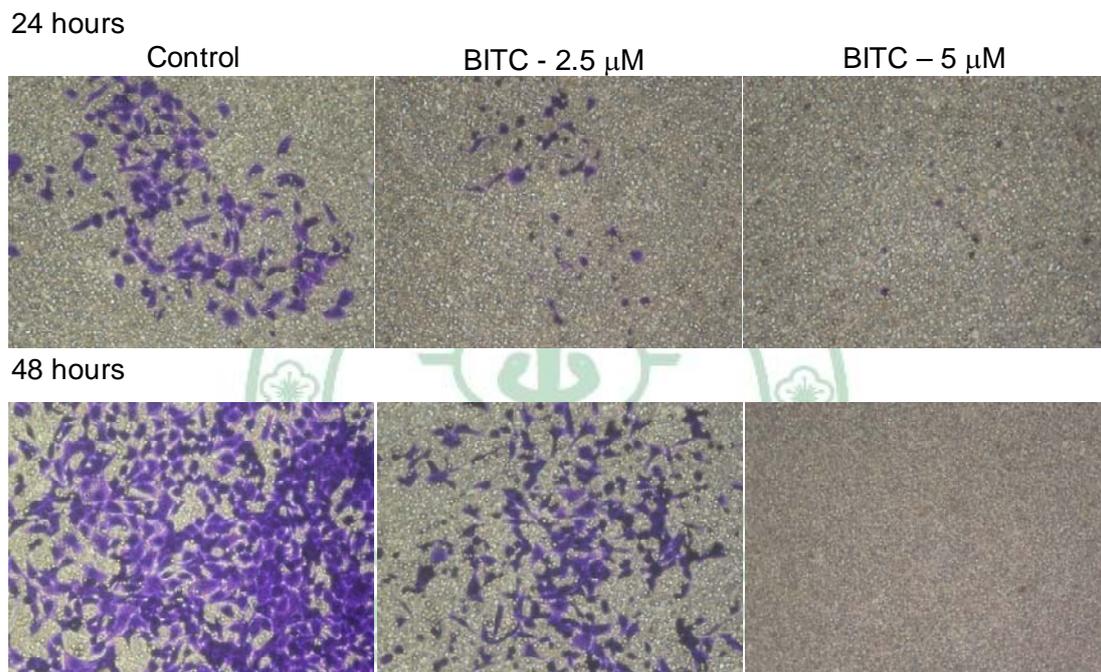


圖 3-11-A 以 2.5 μM 、5 μM 苯甲基異硫氰酸酯對人類前列腺癌細胞株 DU-145 作用 24 小時和 48 小時後，藥物對細胞轉移抑制的情形(200X)。

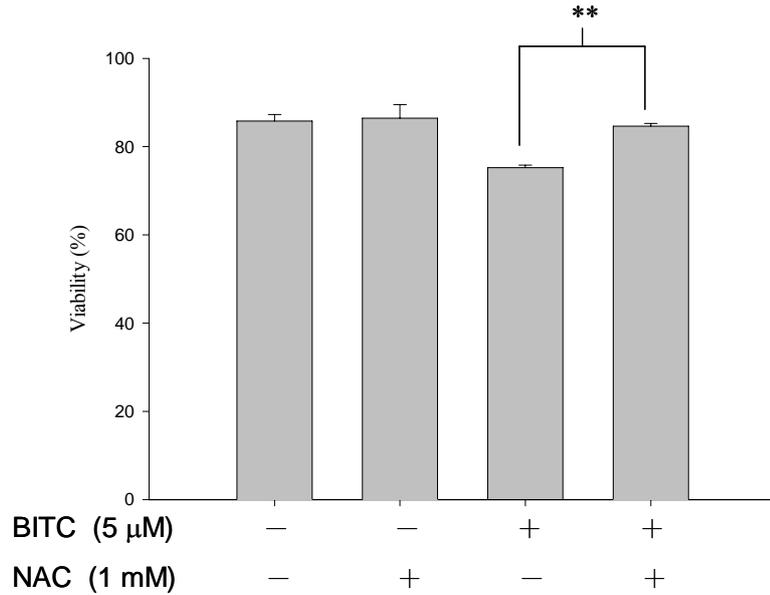


圖 3-12-A 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後測其存活率。(n=3；*表示與控制組比較 p < 0.05；**表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

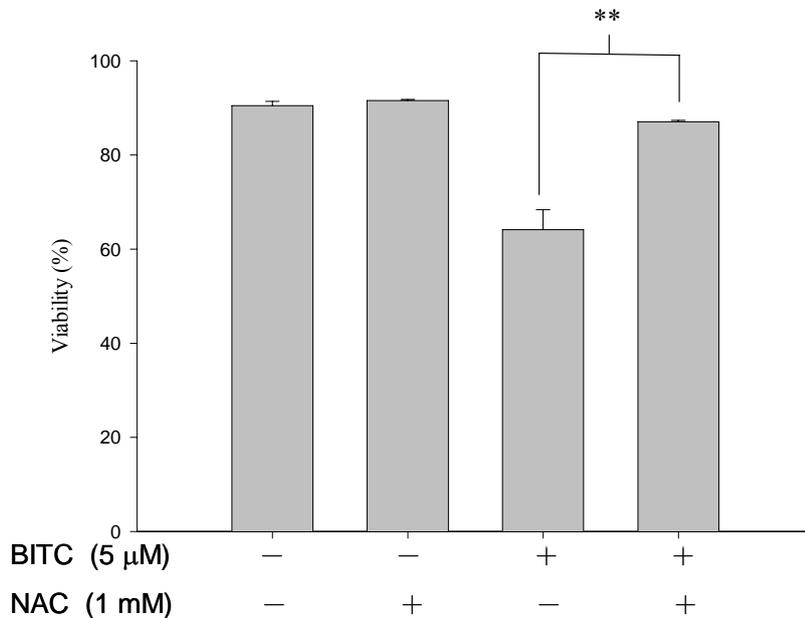


圖 3-12-B 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 48 小時後

測其存活率。(n=3; *表示與控制組比較 p<0.05; **表示與控制組比較 p<0.01; c 組為控制組)。

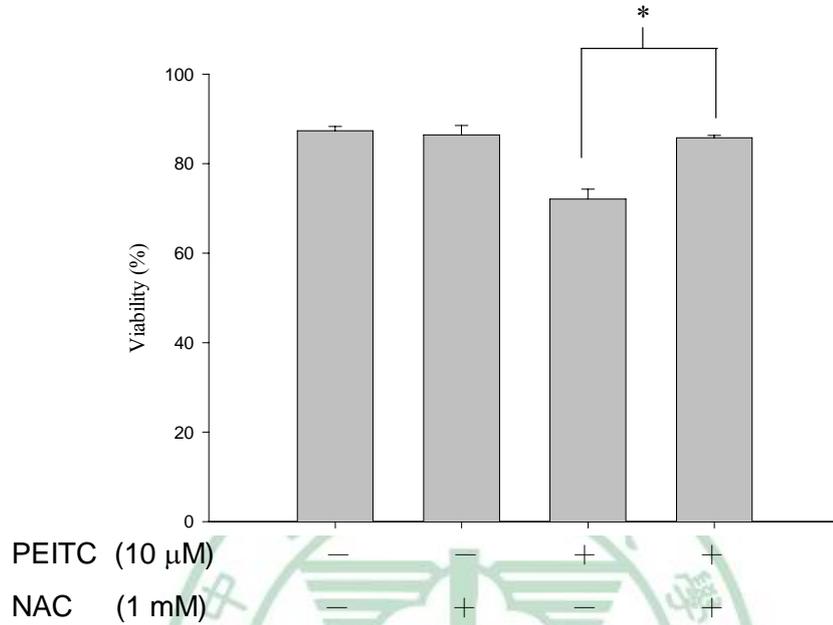


圖 3-12-C 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後測其存活率。(n=3; *表示與控制組比較 p<0.05; **表示與控制組比較 p<0.01; c 組為控制組)。

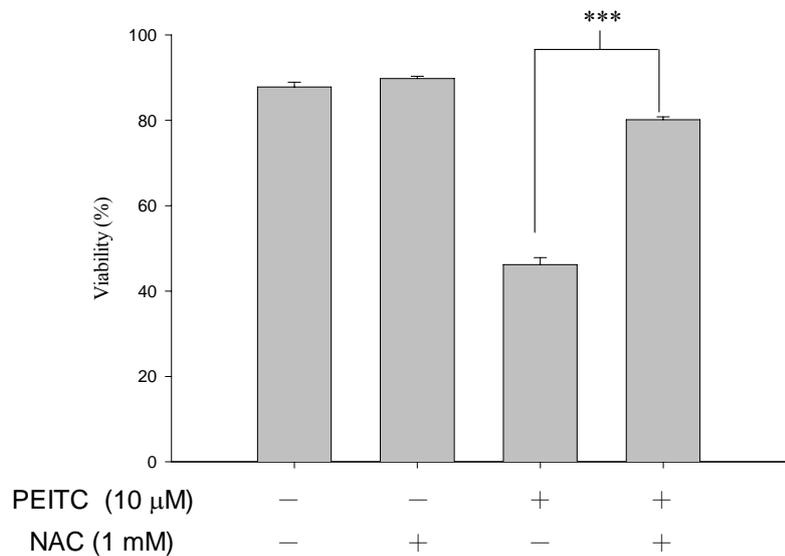


圖 3-12-D 加入 N-acetylcysteine 能夠抑制苯乙基異硫氰酸酯對於人類

前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 48 小時後測其存活率。(n = 3；* 表示與控制組比較 p < 0.05；** 表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

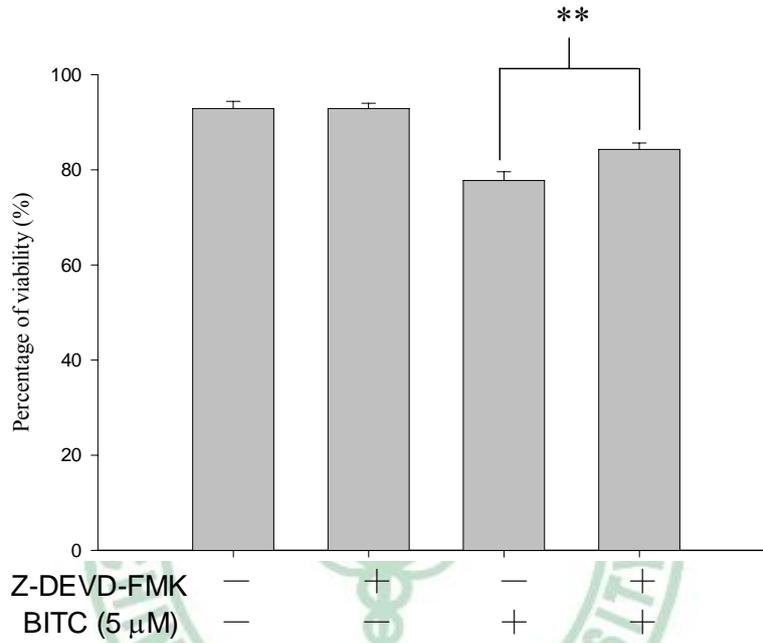


圖 3-13-A 加入 caspase-3 抑制劑能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類

前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後測其存活率。(n = 3；* 表示與控制組比較 p < 0.05；** 表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

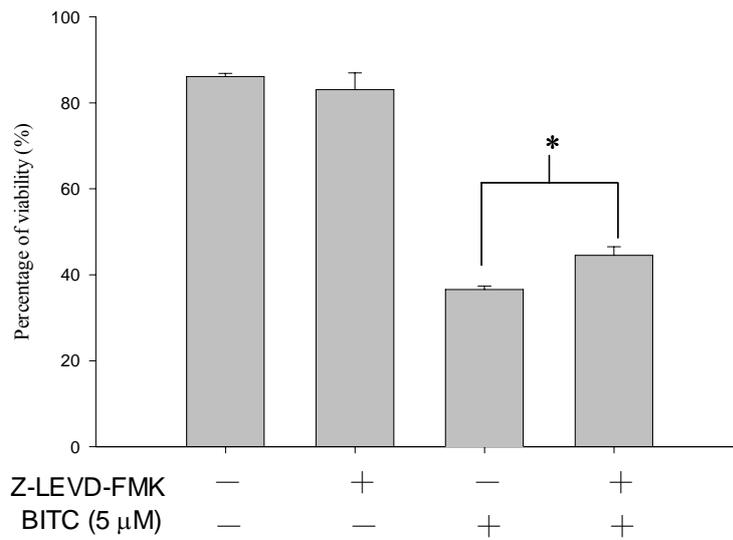


圖 3-13-B 加入 caspase-9 抑制劑能夠抑制苯甲基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 48 小時後測其存活率。(n=3；*表示與控制組比較 p<0.05；**表示與控制組比較 p<0.01；c 組為控制組)。

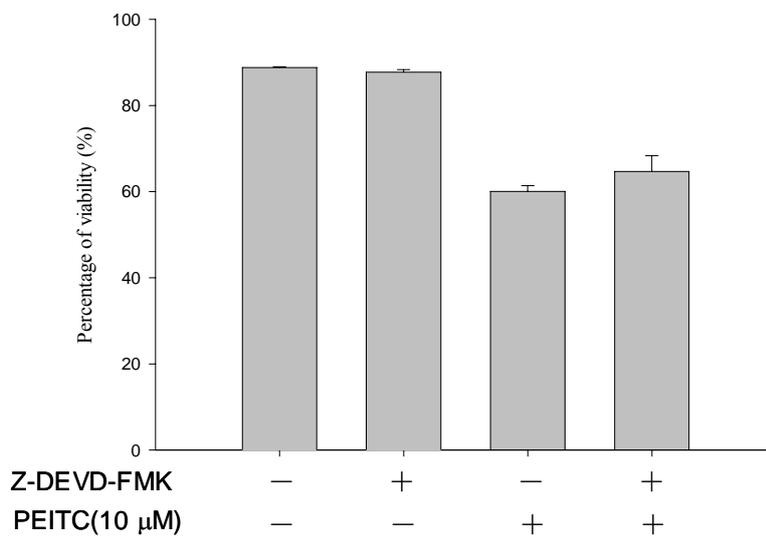


圖 3-13-C 加入 caspase-3 抑制劑能夠抑制苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後

測其存活率。

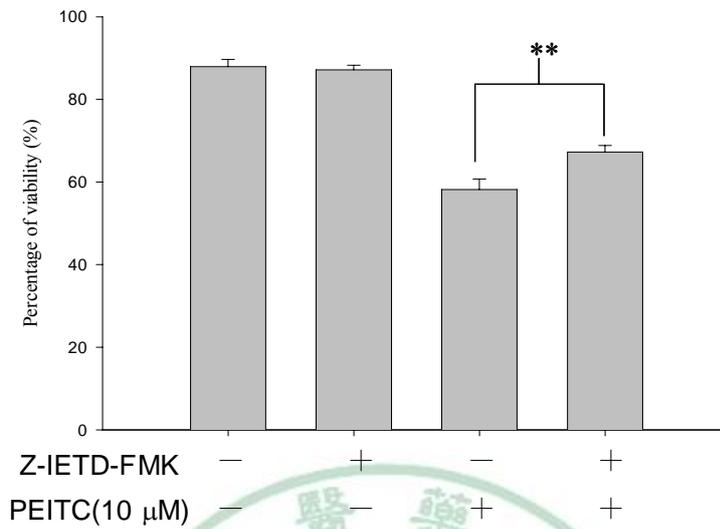


圖 3-13-D 加入 caspase-8 抑制劑能夠抑制苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後測其存活率。(n = 3；* 表示與控制組比較 p < 0.05；** 表示與控制組比較 p < 0.01；c 組為控制組)。

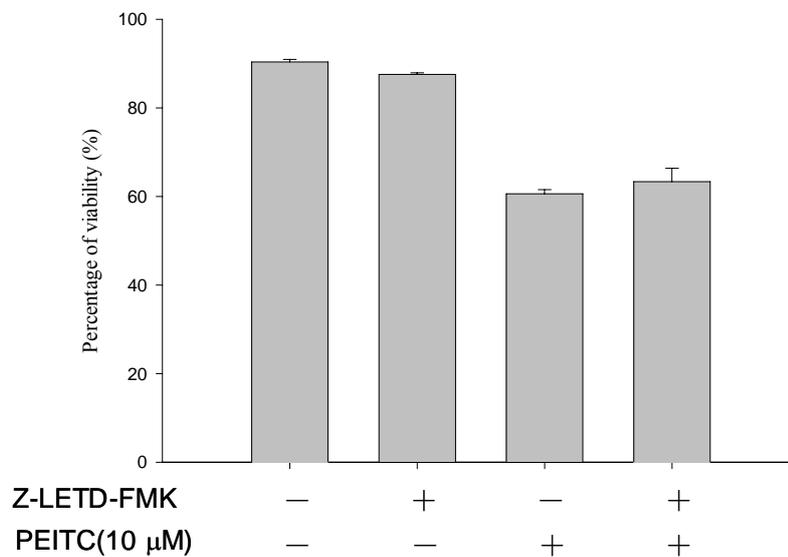


圖 3-13-E 加入 caspase-9 抑制劑能夠抑制苯乙基異硫氰酸酯對於人類
前列腺癌細胞株 DU-145 存活率的影響，藥物作用 24 小時後
測其存活率。



第四章 討論

已有文獻證實含有 ITCs 的食物能夠降低許多癌症的發生率⁽⁸²⁾，苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯的主要結構 ITCs 是來自十字花科蔬菜的衍生物，已有多篇的論文研究指出它們具有抗癌的活性，能夠誘導人類癌細胞的凋亡，而且也有動物實驗的證實⁽⁷⁵⁾⁽⁸⁴⁾。例如：苯甲基異硫氰酸酯會造成人類乳癌細胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 的凋亡⁽⁷³⁾，還有人類胰臟癌細胞 BxPC-3⁽⁷⁴⁾ 和 Capan-2⁽⁷⁵⁾ 的凋亡；而苯乙基異硫氰酸酯則會造成人類乳癌細胞 MCF-7⁽⁷⁶⁾ 和人類前列腺癌細胞 PC-3⁽⁷⁷⁾ 的凋亡。

而本篇則是在探討苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞凋亡的機轉。本篇的結果顯示，苯甲基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞凋亡的機轉主要是由於細胞 ROS 的大量產生，使細胞週期停滯在 G2/M phase，粒線體膜電位下降，使粒線體釋出凋亡蛋白，進而活化 caspase-9, caspase-3，而使細胞走向凋亡。而在其他篇文獻中，苯甲基異硫氰酸酯則是透過多路徑引起人類乳癌細胞株凋亡，會大量產生 ROS，使細胞週期停滯在 G2/M phase，會活化 caspase-9, caspase-8 和 caspase-3⁽⁷³⁾，表示會一起活化凋亡的內在路徑和外在路徑。而又有另外一篇文獻也有指出，苯甲基異硫氰酸酯是透過多路徑引起人類前列腺癌細胞株和人類

胰臟癌細胞株凋亡，會一起活化凋亡的內在路徑和外在路徑⁽⁷⁸⁾。

本篇研究苯甲基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞凋亡的機轉，認為細胞內 ROS 的大量產生是造成凋亡的重要關鍵，因為利用流式細胞儀偵測 ROS 的產生相當明顯之外，還加做 ROS 的抑制劑-NAC，結果發現加入 ROS 的抑制劑後，再加入 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯，經過 24、48 小時後測其存活率，發現跟只單獨加 5 μ M 苯甲基異硫氰酸酯的組別比較，有事先加入 ROS 的抑制劑的細胞存活率較高，甚至跟完全不加藥組(控制組)的存活率一樣高，由此可知，當抑制掉 ROS 的產生，細胞的存活率就可以回復，表示 ROS 是造成細胞凋亡的主因，而也有相關文獻可以佐證 ROS 的產生確實是苯甲基異硫氰酸酯造成細胞凋亡的主要因素⁽⁷³⁾⁽⁷⁹⁾，而由西方點墨法來看細胞內 ROS 相關蛋白質的表現，例如：catalase 和 SOD(superoxide dismutase)的表現，則可發現 catalase 和 SOD 的表現也都明顯上升，由此可知，經由苯甲基異硫氰酸酯的作用後，ROS 確實會在細胞內大量產生，也和細胞的存活有相當大的關係。前面的研究背景中有提到，ROS 誘導細胞凋亡有幾種主要路徑，第一，ROS 會活化 Fas/CD95，再繼續活化 caspase-8 使細胞凋亡進行；第二，ROS 攻擊內質網或粒腺體，誘導凋亡因子釋出讓細胞凋亡路徑產生；第三，ROS 攻擊 DNA，讓 DNA 損害造成細胞週期停滯，誘導產生細胞凋

亡。ROS 會造成細胞內 DNA 的損傷進而誘導凋亡訊息的傳遞，ROS 的產生也可能會造成粒線體的通透性改變，而導致粒線體膜電位下降⁽⁵⁵⁾，促使粒線體路徑的發生。

而苯乙基異硫氰酸酯造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞凋亡的機轉主要也是由於細胞 ROS 的大量產生，使細胞週期停滯在 G2/M phase，粒線體膜電位下降，使粒線體釋出凋亡蛋白，進而活化 caspase-9, caspase-3，而使細胞走向凋亡，跟苯甲基異硫氰酸酯比較不一樣的是，苯乙基異硫氰酸酯還會刺激活化 Fas/FasL，進而活化 caspase-8，最後也會使細胞走向凋亡。而在其他篇文獻中，苯乙基異硫氰酸酯也是透過多路徑引起人類前列腺癌細胞株 PC-3 的凋亡⁽⁸⁰⁾，以及人類肝癌細胞的凋亡⁽⁸¹⁾，但是也有文獻提出苯乙基異硫氰酸酯造成人類乳癌細胞凋亡是透過粒線體凋亡路徑⁽⁷⁶⁾，而非多路徑引起細胞凋亡的。

本篇實驗使用苯甲基異硫氰酸酯的 IC₅₀ 濃度為 5 μM，而其他相關文獻中使用苯甲基異硫氰酸酯的 IC₅₀ 濃度約為 5~20 μM⁽⁷⁴⁾⁽⁷⁵⁾⁽⁸⁵⁾⁽⁸⁶⁾，本篇所使用苯甲基異硫氰酸酯的濃度在其他相關文獻中是屬於較低的，屬於人體一天能夠攝食十字花科蔬菜量的範圍中⁽⁷⁴⁾，所以可以有機會開發成為抗癌用藥。而且也有相關文獻指出，高濃度的苯甲基異硫氰酸酯會使細胞走向 Necrotic cell death，而不是走原本的細胞凋亡

路徑⁽⁸³⁾⁽⁸⁶⁾。

而本篇實驗使用苯乙基異硫氰酸酯的 IC_{50} 濃度為 $10 \mu M$ ，而其他相關文獻中使用苯甲基異硫氰酸酯的 IC_{50} 濃度約為 $12 \mu M$ ⁽⁷⁷⁾，本篇所使用苯乙基異硫氰酸酯的濃度在其他相關文獻中也是屬於較低的，而苯甲基異硫氰酸酯跟苯乙基異硫氰酸酯的 IC_{50} 濃度相比較下，人類前列腺癌細胞株 DU-145 對於苯甲基異硫氰酸酯較敏感，所需的 IC_{50} 濃度較低。但是苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯都能夠導致人類前列腺癌細胞株 DU-145 走向細胞凋亡，而且透過多路徑引起凋亡，更重要的是有文獻證實苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯不會抑制正常細胞生長，不會使其走向凋亡⁽⁷³⁾⁽⁷⁶⁾⁽⁸³⁾，所以苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯都有機會發展成為抗癌藥物，對於治療癌症具有相當大的潛力。

第五章 結論

本篇研究目的就是要探討苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 誘導細胞凋亡的機轉。由實驗的結果可得知，苯甲基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 產生凋亡的機轉，主要是使細胞週期停滯在 G2/M phase，並且使細胞 DNA 損傷而無法修復，細胞大量釋放 ROS 和鈣離子，造成細胞的粒線體膜電位下降，使粒線體釋放出凋亡因子，以及造成內質網的氧化壓力，以及 caspase-3 和 caspase-9 的活性上升，最後誘導細胞走向凋亡。而苯乙基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 產生凋亡的機轉，則有些微不同，主要也是使細胞週期停滯在 G2/M phase，並且使細胞 DNA 損傷而無法修復，使細胞大量釋放 ROS 和鈣離子，會造成細胞的粒線體膜電位下降，使粒線體釋放出凋亡因子，以及造成內質網的氧化壓力，以及活化 Fas 和 Fas ligand，造成 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的活性上升，最後誘導細胞產生凋亡。

苯甲基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 產生凋亡的機轉，主要是透過 ROS 的大量產生，造成內質網壓力，以及粒線體膜電位的下降，使細胞走向粒線體凋亡路徑。而苯乙基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 產生凋亡的機轉，則是透過 ROS 的大量產生，造成內質網壓力，活化死亡接受器 Fas 和 Fas ligand，使細

胞走向死亡接受器凋亡路徑，以及粒線體膜電位的下降，使細胞走向粒線體凋亡路徑。

總結以上的結論，苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯會造成人類前列腺癌細胞株 DU-145 細胞週期停滯，並且走向凋亡，證實苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯對於人類前列腺癌細胞株 DU-145 有抗癌的效果，因此苯甲基異硫氰酸酯和苯乙基異硫氰酸酯在未來應用在癌症患者的治療上具有無限的潛力。



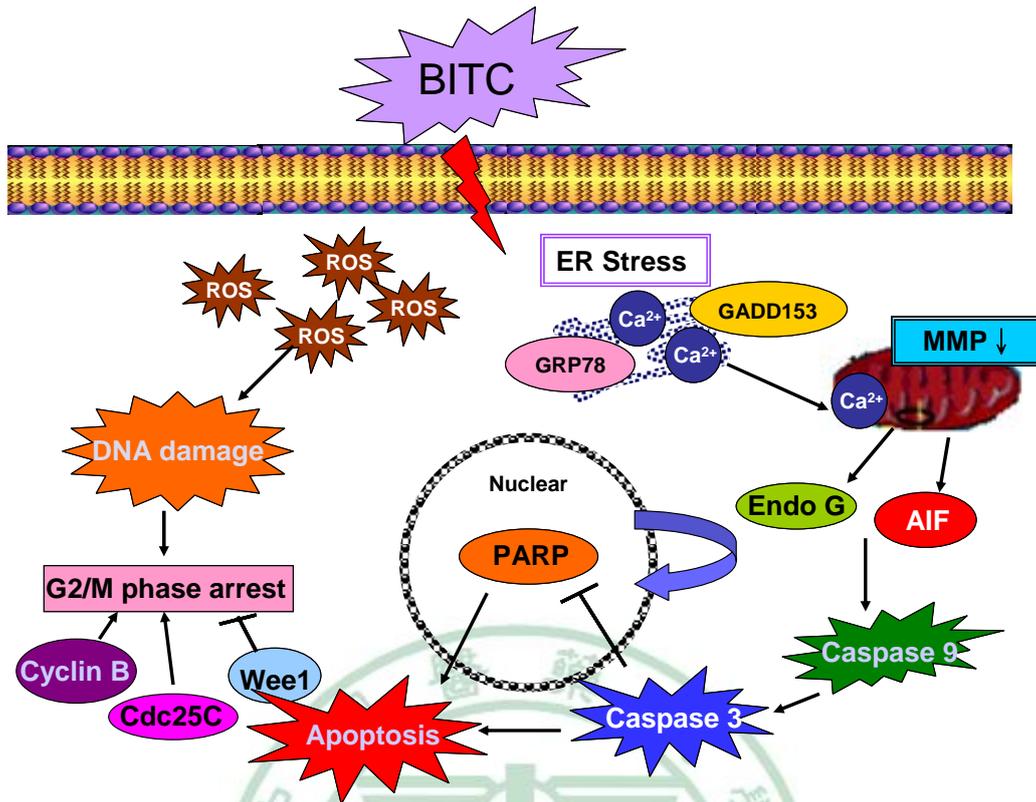


圖 5-1 苯甲基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 走向細胞
凋亡的機轉

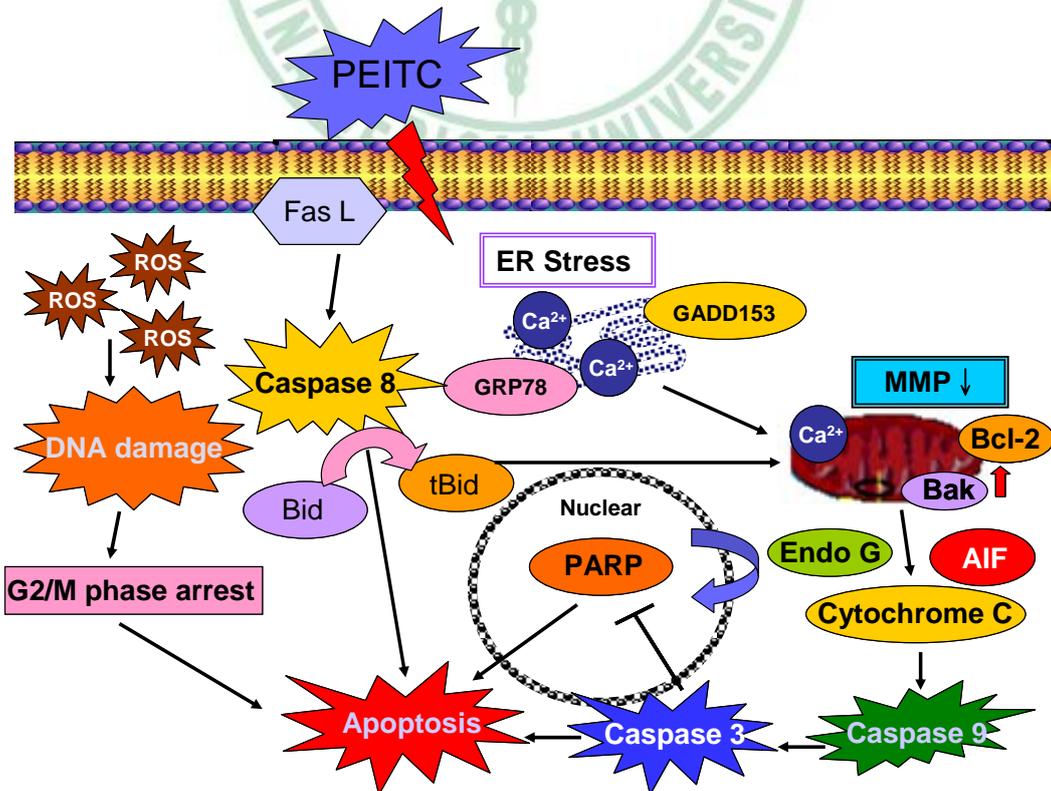


圖 5-2 苯乙基異硫氰酸酯誘導人類前列腺癌細胞株 DU-145 走向細胞

凋亡的機轉



第六章 參考文獻

1. 行政院衛生署公佈民國 96 年十大死因排行榜
<http://www.doh.gov.tw/>
2. American Cancer Society
3. Hayes, J.D., Kelleher, M.O., and Eggleston, I.M., The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur.J.Nutr.*, 47 Suppl 2, 73-88, 2008.
4. Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5–51, 2001.
5. Zhang R, Loganathan S, Humphreys I, Srivastava SK. Benzyl isothiocyanate-induced DNA damage causes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Nutr.*, 136(11): 2728-34, 2006.
6. Xiao D, Powolny AA, Singh SV., Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem.*, 284(44): 30151-63, 2008.
7. Mi L, Wang X, Govind S, Hood BL, Veenstra TD, Conrads TP, Saha DT, Goldman R, Chung FL. The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells. *Cancer Res.*, 67(13): 6409-16, 2007.
8. Xu, K. and Thornalley, P.J. Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 60, 221–231, 2000.
9. Yu, R., Mandlekar, S., Harvey, K.J., Ucker, D.S. and Kong, A.N. Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Res.*, 58, 402–408, 1998.
10. Ji Won Lee and Min Kyung Cho. Phenethyl isothiocyanate induced apoptosis via down regulation of Bcl-2/XIAP and triggering of the mitochondrial pathway in MCF-7 cells. *Arch Pharm Res Vol 31, No 12*, 1604-1612, 2008.
11. KingNet 國家網路醫院 <http://hospital.kingnet.com.tw/>
12. 基隆市衛生局，基隆市 e 化健康博物館

13. 維基百科 <http://zh.wikipedia.org/>
14. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, New York, 2002; 878-880, 983-1022, 1027-1036.
15. Senderowicz, A. M. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 670-678, 2004.
16. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control. *Int J Clin Pract*. 2004; 58: 1134-41.
17. Darzynkiewicz Z, Juan G, Bedner E. Determining cell cycle stages by flow cytometry. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001; Chapter 8: Unit 8.4.
18. Lundberg AS and Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*. 1999; 35: 1886-1894.
19. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*. 1995 Jun; 17(6): 471-80.
20. Adrian MS, Edward AS. Preclinical and clinical development of Cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute* . 2000; 92: 376-387.
21. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 1994 Nov 18; 79(4): 573-82.
22. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and cellular biology*. 1995 May; 15(5): 2612-24.
23. Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular and cellular biology*. 1996 Mar; 16(3): 1047-57.
24. Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes & development*. 1993 Aug; 7(8): 1572-83.
25. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment. *Trends in cell biology*. 2003 Feb; 13(2): 65-70.
26. Xiong , Y., Hannon, G.J.,Zhang, H.,Casso, D., Kobayashi, R.,and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366: 701-704, 1993.
27. Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. Separate domains of

- p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*. 1995 Mar 23; 374(6520): 386-8.
28. Tsuboi K, Moritake T, Tsuchida Y, Tokuyue K, Matsumura A, Ando K. Cell cycle checkpoint and apoptosis induction in glioblastoma cells and fibroblasts irradiated with carbon beam. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2007 Jun 5.
 29. McConnell, B. B., Gregory, F. J., Stott, F. J., Hara, E., and Peters, G.. Induced expression of p16 (INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*, 19: 1981-1989, 1999.
 30. 黃啟瑞、楊繼江，細胞死亡，醫檢會報
 31. Nguyen, J. T., and Wells, J. A. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7533-7538, 2003.
 32. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88:55-65.
 33. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281: 1305-1308.
 34. Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*, 7: 1003-1006, 1997.
 35. Bratton, S. B., MacFarlane, M., Cain, K., and Cohen, G. M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 256: 27-33, 2000.
 36. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 269-290, 1999.
 37. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776, 2000.
 38. Packham G and Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2005;114:441-449.
 39. Smith P, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Prorenzano MD, Droga Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V, Turk B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of Bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem*. 2008.

40. Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: The sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life*. 2008; 60: 390-397.
41. Kelekar, A. and Thompson, C. B. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 8: 324-330, 1998.
42. Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J*, 9: 1277-1287, 1995.
43. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001; 412: 95-99.
44. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25: 259-64.
45. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27: 199-214.
46. Beyersmann, D. W., and Hechtenberg, S. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 144: 247-261, 1997.
47. Lemarie, A., Lagadic-Gossman, D., Morzadec, C., Allain, N., Fardel, O., and Vernhet, L. Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic Biol Med*, 36: 1517-1531, 2004.
48. Dale E, Bredesen, Rammohan VR, Patrick M. Cell death in the nervous system. *Nature*. 2006; 443: 796-802.
49. Romisch K. Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2005; 21: 435-456.
50. Egger L, Madden DT, Rhême C, Rao RV, Bredesen DE. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death mediated by the proteasome. *Cell Death Differ*. 2007; 14: 1172-80.
51. Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci*. 2006; 119: 3958-66.
52. David G Breckenridge, Marc Germain, Jaigi P Mathai, Mai Nguyen and Gordon C Shore. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* .2003; 22, 8608-8618.

53. Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J. L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84: 131-141, 2002.
54. Simizu, S., Takada, M., Umezawa, K., and Imoto, M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem*, 273: 26900-26907, 1998.
55. Xia, Z., Lundgren, B., Bergstrand, A., DePierre, J. W., and Nassberger, L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochem Pharmacol*, 57: 1199-1208, 1999.
56. Ryan H. Engel, and Andrew M. Evens. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Frontiers in Bioscience* 2006 January 1.11, 300-312.
57. 財團法人食品工業發展研究所著.細胞株目錄. 食品工業發展研究所 2002; 2nd ed.
58. R. Ian Freshney. *Culture of animals cells a manual of basic technique*. Wiley. 5th ed.
59. Petit PX, O'Connor JE, Grunwald D and Brown SC, Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur. J. Biochem*. 1990; 194: 389-397.
60. Royall JA, Schiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 1993; 302: 348-355.
61. Kruman II, Mattson MP. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem*. 1999; 72: 529-540.
62. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del-Bino G, Gorczyca W, Hotz MA., Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992; 13: 795-808.
63. Givan AL. *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley-Liss. 2001; 2nd ed.
64. Fox R, Aubert M. Flow cytometric detection of activated caspase-3.

- Methods Mol Biol. 2008; 414: 47-56.
65. Shono M, Shimizu I, Omoya T, Hiasa A, Honda H, Tomita Y, Ito S. Differences in ethidium bromide and 4'-6-diamidino-2-phenylindole staining profiles with regard to DNA fragmentation during apoptosis. *Biochem Mol Biol Int.* 1998; 46: 1055-61.
 66. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 2008; 23: 143-51.
 67. Jha AN. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 2008; 23: 207-21.
 68. Lombardi L, Ceccarelli N, Picciarelli P, Lorenzi R. DNA degradation during programmed cell death in *Phaseolus coccineus* suspensor. *Plant Physiol Biochem.* 2007; 45: 221-227.
 69. Vanderbist F, Maes P, Nève J. In vitro comparative assessment of the antioxidant activity of nacystelyn against three reactive oxygen species. *Arzneimittelforschung.* 1996; 46: 783-8.
 70. Yang JN, Liu CX, Xu H, Pan QC. Caspases promoted DADAG-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2002; 23: 461-6.
 71. Yang JN, Liu JY, Xu H, Liu XL, Qin Y. Apoptosis induced by diacetyldianhydrogalactitol and its mechanism in HL-60 leukemia cells. *Yao Xue Xue Bao.* 2002; 37: 691-5.
 72. Xia L, Chen D, Han R, Fang Q, Waxman S, Jing Y. Boswellic acid acetate induces apoptosis through caspase-mediated pathways in myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 381-8.
 73. Xiao D, Vogel V, Singh SV. Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Mol Cancer Ther.* 2006 Nov; 5(11): 2931-45.
 74. Srivastava SK, Singh SV. Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004 Sep; 25(9): 1701-9.
 75. Zhang R, Loganathan S, Humphreys I, Srivastava SK. Benzyl isothiocyanate-induced DNA damage causes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Nutr.* 2006 Nov; 136(11): 2728-34.

76. Lee JW, Cho MK. Phenethyl isothiocyanate induced apoptosis via down regulation of Bcl-2/XIAP and triggering of the mitochondrial pathway in MCF-7 cells. *Arch Pharm Res.* 2008 Dec; 31(12): 1604-12.
77. Xiao D, Lew KL, Zeng Y, Xiao H, Marynowski SW, Dhir R, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis.* 2006 Nov; 27(11): 2223-34.
78. Basu A, Haldar S. Dietary isothiocyanate mediated apoptosis of human cancer cells is associated with Bcl-xL phosphorylation. *Int J Oncol.* 2008 Oct; 33(4): 657-63.
79. Xiao D, Powolny AA, Singh SV. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008 Oct 31; 283(44): 30151-63.
80. Xiao D, Johnson CS, Trump DL, Singh SV. Proteasome-mediated degradation of cell division cycle 25C and cyclin-dependent kinase 1 in phenethyl isothiocyanate-induced G2-M-phase cell cycle arrest in PC-3 human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2004 May; 3(5): 567-75.
81. Wu SJ, Ng LT, Lin CC. Effects of antioxidants and caspase-3 inhibitor on the phenylethyl isothiocyanate-induced apoptotic signaling pathways in human PLC/PRF/5 cells. *Eur J Pharmacol.* 2005 Aug 22; 518(2-3): 96-106.
82. Nakamura Y. Chemoprevention by isothiocyanates: molecular basis of apoptosis induction. *Forum Nutr.* 2009; 61: 170-181.
83. Sahu RP, Srivastava SK. The role of STAT-3 in the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by benzyl isothiocyanate. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Feb 4; 101(3): 176-93.
84. Tsou MF, Peng CT, Shih MC, Yang JS, Lu CC, Chiang JH, Wu CL, Lin JP, Lo C, Fan MJ, Chung JG. Benzyl isothiocyanate inhibits murine WEHI-3 leukemia cells in vitro and promotes phagocytosis in BALB/c mice in vivo. *Leuk Res.* 2009 Feb 26.
85. Vivian W.Y.Lui¹, Abbey L.Wentzell¹, Dong Xiao, KarenL.Lew, Shivendra V.Singh and Jennifer R.Grandis, Requirement of a carbon spacer in benzyl isothiocyanate-mediated cytotoxicity and MAPK activation in head and neck squamous cell carcinoma.

- Carcinogenesis vol.24 no.10 pp.1705-1712, 2003.
86. Yoshimasa Nakamura, Makiko Kawakami, Akira Yoshihiro, Noriyuki Miyoshi, Hajime Ohigashi, Kiyoshi Kawai, Toshihiko Osawa, and Koji Uchida. Involvement of the mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. *J Biol Chem.* Vol. 277, No. 10, Issue of March 8, 8492–8499, 2002.
87. <http://www.pherobase.com/pherobase/gif/>
88. <http://www.chemicalbook.com/StructureFile%5CChemBook>
89. <http://zh.wikipedia.org/wiki/>
90. <http://www.immunityageing.com/content/3/1/5/figure/F1>

