



中國醫藥大學 藥學院
藥學系碩士班 碩士論文

斑蝥素對 COLO 205 結腸直腸癌細胞株生長抑制作用與
抗癌分子機制之探討

**Study of the cantharidin on anti-proliferation and
anti-cancer molecular mechanisms in COLO 205 cells**

指導教授： 蔡輝彥 教授

共同指導教授： 陳玉芳 副教授
陳鴻儀 助理教授

研究生：柯世薇
Shih-Wei Ko

中華民國九十七年六月

中國醫 大學 學院 學系碩士班
碩士學位論文考試

斑蝥素對 COLO 205 結腸直腸癌細胞株生長抑制作用與抗癌分子機
制之探討

Study of the cantharidin on anti-proliferation and anti-cancer
molecular mechanisms in COLO 205 cells

本論文係 柯世薇 同學於中國醫藥大學藥學院藥學系
碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此
證明。

論文口試委員審定書

學位考試委員： 陶宜鵬

楊永欣

李祥亭 (指導教授)

主 任： 吳介信

中華民國 97 年 7 月 2 日

中文摘要

近 26 年來，癌症一直為十大死因之首，目前尚無良好的對策來治療癌症。結腸直腸癌是常見且致命的癌症，在美國是癌症致死居第二位，於台灣癌症十大死因居第三位。臨床治療上以外科手術、化學治療及放射線治療為主。但治療之效果與預後都不盡理想，因此研發有效且副作用小的的抗癌藥物為當務之急，利用藥物誘發癌細胞凋亡，此為生物體維持體內平衡的機制之一。且發生凋亡時並不會引起發炎反應，對人體副作用較小，因此誘發細胞凋亡是目前抗癌治療策略及抗癌藥物發展的重要方向。

斑蝥素 (Cantharidin) 是斑蝥主要藥用成份，相關研究證實 Cantharidin 具有抗癌、免疫調節、抗菌與抗病毒等作用。本論文主要研究目的，在探討 Cantharidin 對結腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 生長抑制作用與抗癌機制。

我們以倒立式相位差顯微鏡檢測細胞型態變化，顯示經 Cantharidin 處理後細胞數有變少及皺縮的情形，且有似凋亡小體產生。以 MTT 方法檢測細胞存活率，實驗結果顯示 COLO 205 細胞經 Cantharidin 處理後，細胞存活率呈現劑量與時間依存性的抑制，其 IC_{50} 為 $20.53\mu M$ 。細胞週期分析顯示 Cantharidin 誘導 COLO 205 細胞停滯於 G2/M 期後，進而誘導細胞凋亡。以西方點墨法與 CDK1 活性檢測結果顯示，Cantharidin 會降低 cyclin B，CDK1 蛋白質的表現和活性，並促使 Chk1 及 p21 等蛋白質量增加。

利用 TUNEL、DAPI 及 Annexin-V 染色及流式細胞儀檢測結果顯示有細胞凋亡的現象。檢測細胞粒線體膜電位及超氧自由基，顯示粒線體膜電位降低及超氧自由基(ROS)增加，以西方點墨法及 caspase

活性檢測顯示 cytochrome *c*、Fas、Bax 和 Bad 表現量增加，Bcl-2 蛋白質表現量降低，caspase-3、-8 及-9 活性增加，以 Real time PCR 檢測 AIF、Caspase-3、-8 及-9 mRNA 量有明顯增加。

綜合以上結果，我們推論 Cantharidin 具有抑制細胞週期進行與活化粒腺體路徑和死亡受體接受體路徑而誘導細胞凋亡。



Abstract

The past 26 years, the cancer has been the first of ten major causes of the death all the time, and good countermeasure does not treat the cancer yet. Colorectal cancer (CRC) is a common and lethal malignant disease, it's the second most frequent cause of cancer-related death in the United States and occupy the third place in ten major causes of the death of the cancer in Taiwan. Surgical resection、chemotherapy and radiotherapy is the major treatment modality for CRC, but therapeutical effect and prognosis are not perfect. Therefore, investigate an effective and fewer side effect anticancer drug is the task of top priority. Apoptosis is one of the organism maintains the balanced and will not cause inflammation, it has fewer side effect for human body. Therefore the most important strategy of chemotherapy is utilize medicine to induce cancer cell apoptosis.

Cantharidin is the extract of the blister beetle, Mylabris, has been demonstrated to possess antitumor、Immune adjustment、antibiotic and antiviral effect. This thesis main research purpose to probe into that cantharidin can inhibit grow and anticancer mechanism for colorectal cell line (COLO 205).

We use the microscope detects the change of cell type and showing that COLO 205 cell line deal with cantharidin, reduce the cell number、shrink and look like has apoptosome. The MTT assay show that COLO 205 cell line deal with cantharidin, cell survival rate show a dose- and time-dependent manner, IC_{50} is $20.53\mu M$. Cell cycle analyze show cantharidin induced COLO 205 cell line that cell cycle arrest at G2/M phase then induce apoptosis. Western blot and CDK1 activity show cantharidin can reduce cyclin B and CDK1 activity, and can promote

chk1 and p21.

The TUNEL、DAPI and annexin-v assay is to display the apoptosis of cantharidin on COLO 205. The MMP and ROS assay show reduce the mitochondria membrane potential and increase reactive oxygen species. Western blot and caspase activity assay demonstrate that cytochrome *c*、Bax、Bad and Fas are increase, Bcl-2 is decrease, and promote caspase-3、-8 and -9 activity.

Comprehensive the above result, cantharidin can inhibited cell cycle and activity mitochondria/stress pathway、death receptor pathway then induced cell apoptosis.



致謝辭

回首這三年的研究生涯心中所想的唯有兩個字，就是感謝。首先感謝中國醫藥大學藥學院蔡輝彥院長指導研究，蔡教授學識極為豐富，跨越臨床及基礎研究，感謝蔡教授不嫌棄，願意擔任指導教授，同時亦感謝中藥所陳玉芳所長協助及提攜，並常主動關心、指導為我設想，使我獲益良多。本實驗之所以能順利進行，須感謝楊家欣助理教授、黃雯雯助理教授及實驗室所有學長、學弟、學妹們的協助。分子生物學是我之前未曾接觸過的學科，在楊老師及黃老師的指導才一窺分生的奧妙，但短時間的學習，僅僅一點點皮毛而已，非常感謝楊老師及黃老師接受我這門外漢且熱心指導。實驗的學習及進行要感謝實驗室一起奮鬥的啟誠學長、羿霖、長霖學弟、家珺、若華、好菁學妹及其他大學部的學弟妹們，感謝大家的幫助、關心，讓實驗室就像個小家庭一樣。還有一起學習的同學麗蟬、懷慶、建傑、弘偉、于菁、慈雲、鳳樟、碧純及孟宜等互相支持鼓勵。另外還要感謝陳鴻儀老師及成大神外李宜堅教授，帶領我進入學術研究的殿堂，和同學宜靜、學弟凱文及成大實驗室的助理學弟妹們的支持。

最關心我的父母及弟妹，真的很愛您們。因為您們的愛及支持，讓我在生活上、學業上得到許多支持無後顧之憂，讓我全力以赴。

接著我要感謝秀傳醫療體系總裁黃明和總裁及高專謝調楊先生（前藥局主任）推薦，使我有這機會進入研究所研讀。同時也感謝藥局主任林孟嬌小姐及各組長們的支持，還有同事們的配合，讓我有較多的時間到學校做實驗，真的很感謝他們的犧牲假日及配合來成就我的夢想，當然最感謝的是美月小姐的鼓勵及幫忙，讓我真的開始行動實踐自己的夢想。

一路走來深深感覺到，成就一件事，背後有多少人的配合、支持與幫助，真的非常感恩大家，願大家身體健康，心想事成。

2008 年

學生 柯世薇 謹誌



縮寫略字表

AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptosis activating factor-1
APS	Ammonium persulfate
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
Caspase	Cysteine asparate protease
CDK2	Cyclin-Dependent Kinase 2
CKI	Cyclin dependent kinase inhibitor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA-PK	DNA –dependent protein kinase
D.D.Water	Double Deionized Water
DioC6	3,3'-Dihexyloxacarboyanine iodide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Endo-G	Endonuclease G
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
HIF-1	Transcription factor Hypoxia-Inducible Factor 1
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
Indo-1-AM	[1-[2-amino-5(4-carboxylindol-2-yl)-phenoxy]-2-(2' amino-5-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
L-G	L-glutamate

LMA	Low-melting gel
MDM2	Murine double minute 2
MMP ($\Delta\psi_m$)	Mitochondrial membrane potential
MMPS	Matrix metalloproteinases
NAC	N-acetyl cysteine
NF- κ B(p65)	Nuclear factor-kappa B
NMA	Normal melting point agarose
PS	Penicillin / Streptomycin
PI	Propidium Iodide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPP	Phosphoprotein phosphatase
PPM	Mg ²⁺ -dependent PPases
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

總目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
誌謝辭	V
縮寫字表	VII
總目錄	IX
表目錄	XII
圖目錄	XIII
第一章 總論	1
第一節 緒言	1
第二節 研究背景	3
第三節 人類結腸直腸癌介紹	9
第四節 細胞週期	24
第五節 細胞凋亡	32
第六節 研究目的	42
第二章 研究方法	44
第一節 研究材料與儀器	44
一、細胞株	44
二、藥品試劑	46
三、設備與器材	49
第二節 研究方法	50
一、配製藥物	50
二、細胞培養	50
三、利用倒立式相位差顯微鏡檢測細胞型態	54
四、細胞存活率分析—MTT ASSAY	54

五、 流式細胞儀分析.....	55
1. 細胞週期及 sub-G1 的影響	55
2. Annexin-V 分析.....	57
3. 檢測細胞內粒線體膜電位的變化	58
4. 活性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 產生之檢測...59	
5. Caspase-3,- 8,- 9 活性分析.....	60
六、 細胞內分子螢光染色—TUNEL/DAPI 螢光染色法.....	61
1. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling) / DAPI (4-6-diamidino-2-phenyl indole) 染色...61	
七、 CDK1/Cdc2 之活性分析	62
八、 即時定量聚合酵素連鎖反應 (Real-time Polymerase Chain Reaction) (Real-time PCR)	62
九、 西方墨點法	65
第三節 統計方法.....	69
第三章 研究結果.....	70
第一節 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞 (colo 205) 細胞型態的影響.....	70
第二節 探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞存活率的影響.....	71
第三節 探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞之細胞週期 G2/M 與 Sub-G1 及相關蛋白質的影響	72
第四節 探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞誘導細胞凋亡的影響.....	74
一、 Annexin-V 染色.....	74
二、 TUNEL/DAPI 染色檢測細胞凋亡	74

第五節	Cantharidin 誘導人類結腸直腸癌細胞的細胞凋亡之路徑探討	76
一、	探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞粒線體膜電位之影響	76
二、	探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞產生活性氧物質 (ROS) 之影響.....	77
第六節	探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞其細胞凋亡路徑相關蛋白表現之變化	79
第四章	討論	103
第五章	結論	109
第六章	參考文獻	110



表目錄

表 一	常見斑蝥素類製劑的臨床應用.....	5
表 二	自然界的 Serine/Threonine Protein Phosphatase 抑制劑.....	7
表 三	96 年台灣省癌症十大死因.....	12
表 四	結腸直腸癌之美國癌症協會, 修正之 Astler-Coller (MAC), Duke's 及 TNM 分級系統與五年存活率.....	15
表 五	結腸直腸癌治療藥物辭彙表.....	23
表 六	偵測凋亡細胞的方法.....	35
表 七	Bcl 家族蛋白分類及功能.....	38
表 八	COLO 205 特性.....	45



圖目錄

圖 一	斑蝥素化學結構式.....	3
圖 二	同源的 Ser/thr protein phosphatases.....	8
圖 三	大腸直腸癌形成過程由正常粘膜經一系列致癌及抑癌基因變化累積演變而成	10
圖 四	結腸直腸癌與年齡發生率調查，統計於 1988 - 1992 年，包括所有種族之男性與女性	14
圖 五	細胞週期	26
圖 六	細胞週期的調節	29
圖 七	細胞 G2/M 期之調控機制.....	31
圖 八	細胞凋亡—程式性死亡.....	34
圖 九	ICE 家族成員.....	40
圖 十	實驗流程圖.....	43
圖 十一	細胞計數盤示意圖.....	53
圖 十二	黃色的 MTT 經由活的細胞的粒線體變為紫色的 formazan	54
圖 十三	進行流式細胞計數儀分析出來的細胞週期標準圖.....	56
圖 十四	Annexin-V 的作用示意圖	57
圖 十五	Cantharidin 對 COLO 205 細胞 24 及 48 小時的形態變化。	81
圖 十六	Cantharidin 對 COLO 205 細胞存活率之影響.....	82
圖 十七	Cantharidin 對 COLO 205 細胞存活率抑制之影響.....	83
圖 十八	Cantharidin 對 COLO 205 細胞存活率抑制之影響.....	84
圖 十九	Cantharidin 對細胞週期之影響.....	85

圖 二十	Cantharidin 對 COLO 205 細胞之細胞週期影響	86
圖 二十一	Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 G2/M 期相關蛋白質表現量與活性影響	87
圖 二十二	Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 G2/M 期相關蛋白質表現量與活性影響	88
圖 二十三	Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 G2/M 期相關蛋白質表現量與活性影響	89
圖 二十四	Cantharidin 對 COLO 205 細胞膜之 phosphatidylserine 外翻的影響	90
圖 二十五	Cantharidin 誘導 COLO 205 細胞 DNA 斷裂之情形 ...	91
圖 二十六	Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體膜電位的影響...	92
圖 二十七	Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體膜電位 (MMP) 百分比	93
圖 二十八	Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體活性氧化物(ROS) 的影響	94
圖 二十九	Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體活性氧化物 (ROS) 增加百分比	95
圖 三十	Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 cytochrome <i>c</i> 蛋白質表現量的影響	96
圖 三十一	Cantharidin 及 NAS 對 COLO 205 細胞粒線體活性氧化物 (ROS) 的影響	97
圖 三十二	Cantharidin 及 NAS 對 COLO 205 細胞存活率的影響	98
圖 三十三	Caspase 活性檢測分析	99
圖 三十四	Cantharidin 誘導 Fas 蛋白質之變化	100
圖 三十五	Cantharidin 誘導 Bcl-2 蛋白質家族之變化	101

圖 三十六 利用 Real-Time PCR 評估 AIF、Caspase-3、-8、-9 mRNA
變化102

圖 三十七 CTD 對 COLO 205 誘導細胞凋亡分子路徑示意圖...108



第一章 總論

第一節 緒言

自民國七十一年起至今，癌症躍居國人十大死因之首，佔全部死亡人數的 28.9%。在癌症中結腸直腸癌是常見及致命的疾病，佔癌症死因第三位，且死亡人數有逐年增加的趨勢。目前結腸直腸癌的治療仍以手術切除為主，而化療用藥所產生的副作用多且療效有限。病人在治療期間免疫功能差容易感染、生理機能失調等。因此若能研發出可提升患者的生活品質，增加存活率，低副作用，亦能對於癌症的治療效果與化療藥物有相同作用的天然中草藥時，是癌症醫學治療的一大福音。

斑蝥為中國傳統藥用動物。在國內外的研究中發現，斑蝥素具有抗癌、免疫調節、毛髮生長刺激劑、抑制革蘭氏菌生長、抗病毒與治療傳染性疣等作用。藥理的研究證實 Cantharidin 具有抑制 Protein Phosphatase 1 與 Protein Phosphatase 2 的酵素活性。根據文獻上的報告，Cantharidin 對人類 CCRE-CEM 與 U937 血癌細胞株具有誘導細胞凋亡 (apoptosis) 的作用是經由 p38 與 JNK 等 Kinase 的活化^(1,2)，為 p53-dependent 的機制。Cantharidin 對人類 Hep-3B 肝癌細胞株具有抑制細胞週期停止於 G2/M 期，並誘導細胞凋亡 (apoptosis)⁽³⁾。然而 Cantharidin 對其他癌細胞如結腸直腸癌細胞是否也具有相同的抗癌作用及相同的抗癌機制，到目前仍未清楚。

所以本實驗希望找出能誘導癌細胞凋亡，且對人體低副作用的有效藥物。所選用藥物為中國傳統用藥，利用先人的智慧，在前人已用

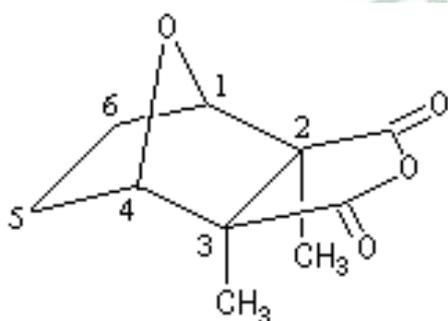
來治療腫瘤的藥物，是否對其他癌症有相同療效及其可能的抗癌機制。希望能發現及發展成有效且低副作用的抗癌藥物，期望能降低癌症導致人類死亡的比率，提升人類的生活品質，免於不治之症之威脅，希望藉由此研究帶給人類更進一步的福祉。



第二節 研究背景

一、斑蝥素(Cantharidin)理化特性

- 1.藥名：斑蝥素 (Cantharidin)
- 2.化學名：exo , exo-2,3-dimethyl-7-oxobicyclo [2 ,2 ,1] heptane-2 ,3-dicarboxylic acid anhydr-ide⁽⁴⁾
- 3.分子量：196.20
- 4.結構式(圖一)：



圖一 斑蝥素化學結構式

- 5.分子式： $C_{10}H_{12}O_4$
- 6.來源：節肢動物門，昆蟲綱，芫青科 (Meloidae) 昆蟲，南方大斑蝥 *Mylabris phalerata* Pallas 或黃黑小斑蝥 *Mylabris cichorii* L.的乾燥蟲體。
- 8.物理、化學性質：

無臭無色斜方形鱗狀晶體⁽⁵⁾，熔點為 218°C。不溶於冷水，溶於熱水、DMSO(10mg/ml)，難溶於丙酮、氯仿、乙醚及醋酸乙酯。

二、斑蝥素 (Cantharidin)作用

斑蝥 (mylabris)出自〈神農本草經〉，作為藥用為芫青科的南方大斑蝥(*Mylabris phalerate* Pallas)和黃黑小斑蝥 (*M. cichori* Linnaeus)兩類的乾燥蟲體，其有效成分為斑蝥素 (Cantharidin, $C_{10}H_{12}O_4$)，為皮膚潰爛發泡的毒劑，對腸胃道、泌尿道與腎臟等黏膜組織有強烈刺激性。歷代醫書如本草綱目、中藥大辭典中有治療腫瘤的描述⁽⁶⁾。在西方國家主要為皮膚科外用治療疣、軟疣等皮膚病⁽⁷⁾。

在中國傳統藥物中使用已有二千年的歷史。辛、熱、有大毒，歸肝、胃、腎經，主治破血消腫，攻毒蝕瘡，發炮冷灸，用於癥瘕癌腫、積年頑癬、癩瀝、贅疣、癰疽不潰、惡瘡死肌⁽⁸⁾，民間用藥於夏、秋二季捕捉，悶死或燙死，去頭、足、翅，曬乾生用火與糯米同炒至黃黑，去米，研磨用⁽⁹⁻¹¹⁾。外用適量，研末或浸酒醋，或製油膏塗敷患處，不宜大面積用，可治療神經性皮炎、顏面神經麻痺、斑禿、傳染性疣、頭痛、過敏性鼻炎，內服治療肝炎、肝癌等⁽¹²⁻¹⁴⁾(表一)，目前中國大陸方面已具實際應用於臨床治療癌症的經驗⁽¹⁴⁾。

國內外的研究中發現，Cantharidin具有抗癌作用⁽¹⁵⁾對子宮頸癌、鼻咽癌、皮膚癌、骨髓瘤、白血病、卵巢癌及肝癌細胞等具抑制作用和免疫調節⁽¹⁶⁾，此外亦可作為毛髮生長刺激劑⁽¹⁵⁾、抑制革蘭氏菌生長⁽¹⁷⁾、抗病毒與治療傳染性疣⁽¹⁸⁾等作用，其特色為刺激骨髓，使白血球升高^(19,20)。

表一 常見斑蝥素類製劑的臨床應用

藥物	商品名	適應症
斑蝥素糖衣錠	莞菁素	原發性肝癌、乳癌等
甲基斑蝥胺針劑	肝康靈	對原發性肝癌有一定療效
NCTD	依康	肝癌、食道癌、胃癌、賁門癌及白血球低下症
斑蝥酸納注射劑	奇寧注射液	原發性肝癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌
羥基斑蝥胺		原發性肝癌、胃癌、肺癌、結腸癌



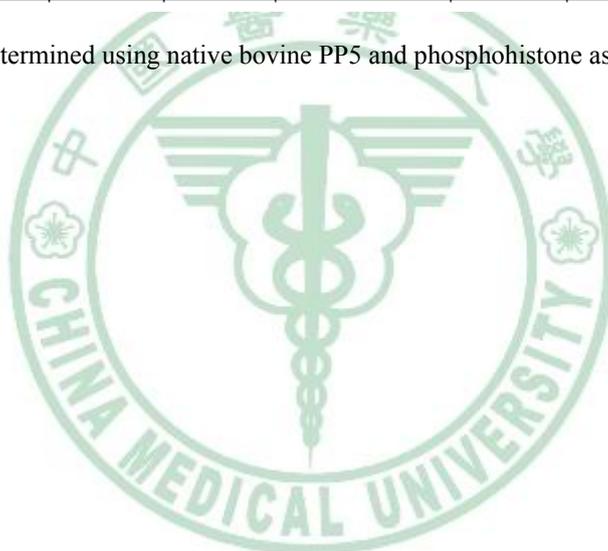
藥理研究證實 Cantharidin 為 Protein Phosphatase 1 (PP1)及 PP2A抑制劑，對PP1、PP2A、PP4和PP5有較強的抑制性，以PP2A選擇性最高，對PP2B有微弱的抑制 (表 二)。近幾年PP1及PP2A抑制劑，為抗癌藥研發的新目標^(15, 16)。Protein Phosphatase 在所有生物學中為主要的調節機制，PP1及PP2A屬 Serine/threonine protein phosphatase 中的PPP family(圖 二)⁽¹⁷⁾，在許多訊息傳導路徑中扮演著重要的調節角色，如細胞週期的運行、細胞生長控制、分化、細胞骨架動力(cytoskeleton dynamics)、調節訊號傳導、細胞移動、Glucose的代謝、鈣離子的運輸與細胞凋亡⁽¹⁸⁾，也是重要的腫瘤抑制蛋白(tumor-suppressor protein)⁽¹⁹⁾。

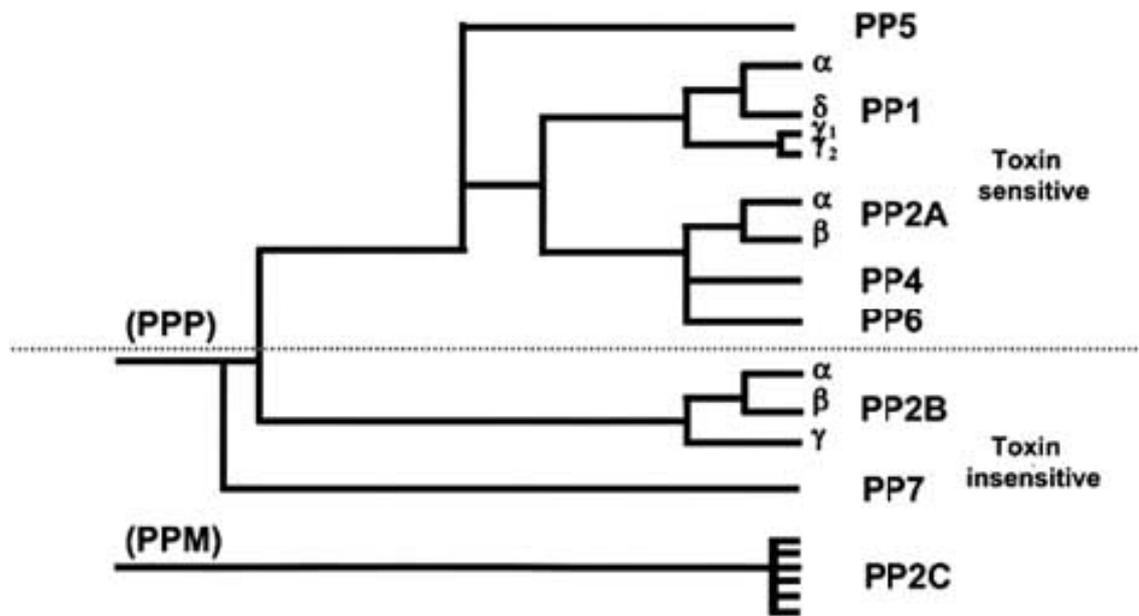
根據文獻上的研究報告，Cantharidin 對人類CCRE-CEM與 U937 血癌細胞株具有誘導細胞凋亡 (apoptosis) 的作用，是經由 p53-依賴型的機制，且主要是由 p38與JNK等 Kinase的活化^(1, 2)，而誘導細胞凋亡。Cantharidin 對人類Hep-3B肝癌細胞株具有抑制細胞週期停止於 G2/M期，並誘導細胞凋亡 (apoptosis)⁽³⁾。然而Cantharidin對其他癌細胞如結腸直腸癌細胞是否也具有相同的抗癌作用及相同的抗癌機制，到目前仍未清楚。

表二 自然界的 Serine/Threonine Protein Phosphatase 抑制劑⁽²⁰⁾

Compound	Inhibition of Ser/thr Protein Phosphatase activity (IC ₅₀ , nM)						Ref
	PP1	PP2A	PP2B (calcineurin)	PP4	PP5**	PP7	
Okadaic acid	20-50	0.1-0.3	~4 μM	0.1	3.5	>1 μM	27, 52, 55-57
Microcystin-LR Microcystin-RR	0.3-1	<0.1-1	~1 μM	0.15	1.0	>1 μM	27,51,63, 68,
Nodularin	2.4	0.3	>1 μM	ND	ND	>1 μM	71
Calyculin A	0.4	0.25	>1 μM	0.4	3	>1 μM	79-81
Tautomycin	23	7.5	>1 μM	0.2	10	ND	82-84
Cantharidin	1.1 μM	194	>10 μM	50	3.5 μM	ND	56, 95, 96,
Fostriecin	45-58 μM	1.5-5.5	>100 μM	3.0	70 μM	ND	56, 104, 116
inhibitor 1/ inhibitor 2	1-5 nM	NE	NE	NE	ND	ND	4

**PP5 values were determined using native bovine PP5 and phosphohistone as a substrate





圖二 同源的 Ser/thr protein phosphatases. 依據已知的蛋白質磷酸化酶的胺基酸序列所繪的系統樹. PP1-PP7 屬於一單一基因家族 (PPP) 結構上與 PP2C family (PPM) 有區別. 位於虛線上方的磷酸酶為對 okadaic acid, cantharidin, microcystin and calyculin A 抑制有高度敏感性.

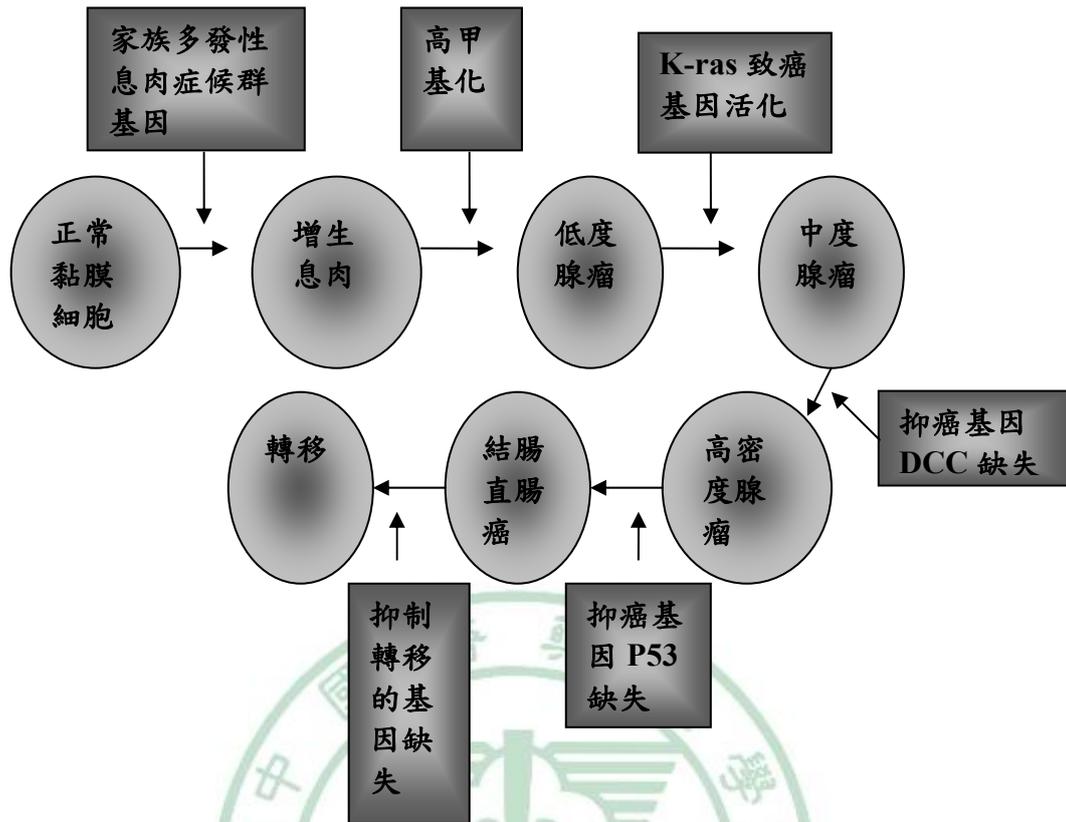
第三節 人類結腸直腸癌介紹

一、 癌症成因

「癌症」又叫“惡性腫瘤”，源出於古希臘文。一般的細胞會相互平衡，其增生和死亡會有平衡點，而癌症是一群不正常的細胞，其生長脫離控制，因而快速生長以致影響生物體內其他正常的細胞組織造成症狀，且會隨著血液或淋巴系統擴散到身體的其他部位，也就是腫瘤轉移（metastasis），進而危害生命安全。

癌症的發生是各種環境因素或是遺傳因素所衍生出來的。像是1、化學物質:譬如煙焦油、二手煙可能引起肺癌，某些染料可能引起膀胱癌，亞硝胺可能引起肝癌等。經過長時間地和大量的致癌物質接觸誘發產生癌症。2、輻射線:如 X 光射線，核爆等。輻射線要達到相當大的量，才會觸發細胞產生變化。3、其他:日光中的紫外線以及長期和高溫物質接觸，都可能和某些皮膚癌有關。長期的傷口潰瘍(如胃潰瘍、皮膚潰瘍等)，亦可能令附近的細胞發生變化，成為癌症。

癌細胞是由正常細胞蛻變過來的，涉及細胞的基因突變，癌症的形成往往由數種致癌基因的活化或數種抑癌基因的功能喪失所累積而成的。從正常細胞到演變成癌細胞可能需要十多年，所以當檢查發現癌症時，通常已醞釀多時，且常已發生轉移了(世界衛生組織癌症顧問委員會)(圖 三)。故對於高危險群的人，定期的癌症篩檢，是非常必要的。定期的健檢，可能可以找到癌前期病變，去除癌前期之病變，就可以避免癌症之發生。



圖三 大腸直腸癌形成過程由正常粘膜經一系列致癌及抑癌基因變化累積演變而成。

二、結腸直腸癌

人類結腸直腸癌為一常見且致死的疾病，在美國是第三常見的惡性疾病和第二高的癌症相關致死疾病，僅次於肺癌⁽²¹⁾，2007 年在美国約有 154,000 新病例被診斷出有大腸癌，其中 112,000 為結腸癌，其餘為直腸癌，約有 52,000 死於大腸癌，約佔所有癌症死亡的 10%⁽²²⁾。在全世界則是第四個常見的惡性疾病，每年約有 1,028,000 新病人及 529,000 死亡⁽²¹⁾。在台灣地區今年發布的統計資料(民國 96 年)(表 三)，去年十大死因之首為惡性腫瘤，近 26 年來都沒改變，佔全部死亡人數 28.9%，比前年(95 年)增加 5.6%，較第二大死因心臟血管疾病死亡人數多 3 倍多。在惡性腫瘤中前三大死因為肺癌、肝癌、結腸直腸癌，以男、女分開統計，結腸直腸癌亦各據第三。去年一年因結腸直腸癌死亡人數有 4470 人，佔全部癌症死亡人數的 11.1%，與歐美以開發國家相近，比前年增加 3.9%，顯見因結腸直腸癌死亡人數有增加的趨勢⁽²³⁾。

表三 96年台灣省癌症十大死因

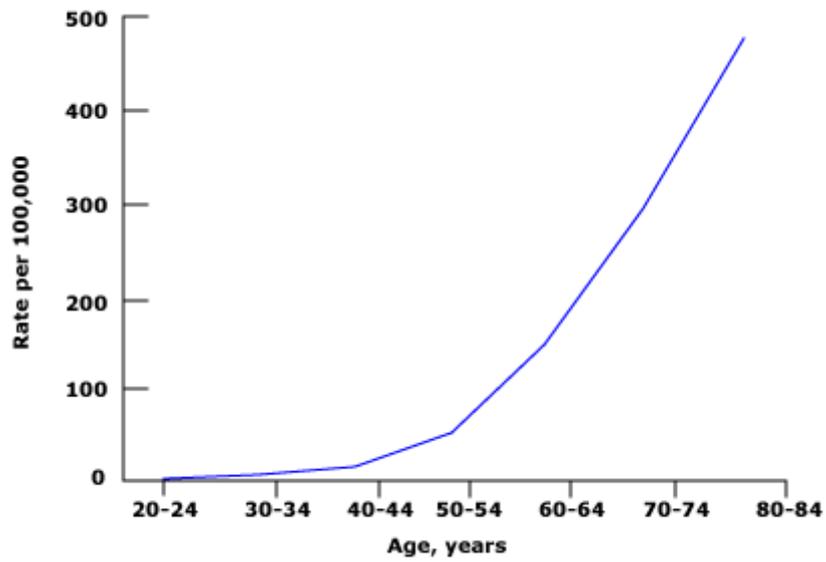
順位	癌症死亡原因	死亡人數	每十萬人口死亡率	死亡百分比%
1	肺癌	7,993	34.9	19.8
2	肝癌	7,809	34.1	19.4
3	結腸直腸癌	4,470	19.5	11.1
4	女性乳癌	1,552	13.7	3.9
5	胃癌	2,474	10.8	6.1
6	口腔癌	2,312	10.1	5.7
7	攝護腺癌	1,003	8.6	2.5
8	子宮頸癌	833	7.4	2.1
9	食道癌	1,438	6.3	3.6
10	胰臟癌	1,354	5.9	3.4

三、發生率

年齡是結腸直腸癌主要的危險因數，40 歲以下的人很少被診斷出結腸直腸癌，40~50 歲間發生率開始增加，20 歲以下極少，若發生在年輕人身上，則需懷疑是否有家族性息肉症或已先有潰瘍性大腸炎存在。平均一生有 5% 之機率會得到結腸直腸癌，90% 的病例發生在 50 歲以後(圖 四)。

從全世界來看，已開發國家如北美、澳洲和西及北歐的發生率較開發中國家如非洲和亞洲高，東方人較西方人少。地理位置的差異可歸因於飲食及暴露的環境不同。

大腸的任何部位都可能發生癌症，但以直腸得到癌症的機會最高約佔 43%，其他依次是乙狀結腸 25%、升結腸 15%、降結腸 5%、橫結腸 3%。結腸直腸癌 95% 為腺癌，1% 為鱗狀細胞癌。依結腸直腸癌症不同分期法其 5 年存活率如表 四。若患者在 Stage I 其五年存活率大於 90%，故早期發現早期治療，大部份有好的預後且可降低死亡率。



圖四 結腸直腸癌與年齡發生率調查，統計於 1988-1992 年，包括所有種族之男性與女性^(24, 25)。



表 四 結腸直腸癌之美國癌症協會，修正之 Astler-Coller (MAC), Duke's 及 TNM*分級系統與五年存活率

Stage	TNM Classification	Five-Year Survival %	MAC**	Ducke's
I	T1,N0,M0	>90	A	A
	T2,N0,M0		B1	A
IIA	T3,N0,M0	60-85	B2	B
IIB	T4,N0,M0		B3	
IIIA	T1-2,N1,M0	55-60	C1	C
IIIB	T3-4,N1,M0	35-42	C2/3	
IIIC	T(any),N2,M0	25-27	C1/2/3	
IV	T(any),N(any),M1	5-7	C	D
Primary tumor (T)				
TX: Primary tumor cannot be assessed				
Tis: Carcinoma in situ				
T1: Tumor invades submucosa				
T2: Tumor invades muscularis propria				
T3: Tumor penetrates muscularis propria and invades subserosa				
T4: Tumor directly invades other organs or structures or perforates visceral peritoneum				
Nodal status (N)				
NX: Regional lymph nodes cannot be assessed				
N0: No metastases in regional lymph nodes				
N1: Metastases in one to three regional lymph nodes				
N2: Metastases in four or more regional lymph nodes				
Distant metastases (M)				
MX: Presence or absence of distant metastases cannot be				

determined
M0: No distant metastases detected
M1: Distant metastases detected

* 資訊來自 Greene et al.⁽²⁶⁾

**A: 腫瘤細胞局限於腸黏膜。

B1: 腫瘤細胞局限於腸壁肌肉層內。

B2: 腫瘤細胞穿透腸壁肌肉層, 但並未侵犯到周圍組織。

B3: 腫瘤細胞穿透腸壁肌肉層, 且侵犯到周圍組織。

C1: 腫瘤細胞局限於腸壁肌肉層內且有局部淋巴結轉移。

C2: 腫瘤細胞穿透腸壁肌肉層, 但未侵犯到周圍組織有局部淋巴結轉移。

C3: 腫瘤細胞穿透腸壁肌肉層, 已侵犯到周圍組織有局部淋巴結轉移。

使用許可 American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois.^(21, 26)



四、 症狀

初期少有症狀，可能僅有出血或腹痛，一般症狀：有肛門出血、大便習慣改變、便血、便秘、大便變細、裡急後重（解完大便仍想再解）、貧血及體重減輕。末期時或可摸到腹部腫塊及淋巴腺腫大。

五、 病因

環境和遺傳基因都會影響發展成結腸直腸癌，雖然家族遺傳罹患率高於一般人，但主要罹病者以偶發型結腸直腸癌居多，佔 95% 以上。

1. 飲食--對於高動物蛋白、脂肪及精緻食物消耗量多的民族，統計上的調查有較高的大腸息肉、憩室、盲腸炎及大腸癌的發生率。

2. 潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis) 30 年後約有 50% 的病人惡化成大腸癌，克隆氏病(Crohn's Disease)有 20 倍的機會比正常人容易得到大腸直腸癌。

3. 家族性息肉(Familial adenomatous polyposis (FAP))及遺傳的非息肉性結腸直腸癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)) 年齡達到 40 歲時，約有 80% 的病患惡化為大腸直腸癌，癌狀家族症候群 (Cancer Family Syndrom) 家屬（第一近親）罹患大腸癌死亡的機會高於一般人約 3.2 倍，但這兩個症狀也佔全部患者不到 5%⁽²⁷⁻²⁹⁾。

六、 診斷

潛血檢查、內視鏡檢查(Endoscopic Exam)及放射學檢查篩選有助於疾病早期診斷，但順從篩選指導原則的人仍是相對少數，大部份病人是在有症狀時才檢查出來。另外還有肛門指診，大腸 X 光檢查(Barium Enema)，組織切片(Biopsy)及細胞鑑定(Cytology)，腫瘤記號蛋白(CEA)，電腦斷層，靜脈腎臟攝影，胸部 X 光照像，肝臟掃瞄，胸部超音波，血液尿液常規及血液生化檢驗等都是結腸直腸癌診斷所需做的檢查，有利於診斷及鑑別診斷。

七、 治療

病理學上的分期提供重要的預後預測，也提供治療方法的選擇。腫瘤侵犯的組織深度和區域的淋巴結影響牽涉等，為主要的預後預測及分類系統。治療以手術切除為根本治療方式，放射線療法及化學療法可當輔助治療，以降低死亡率及復發率，對於轉移的患者可延長存活時間。

1. 外科手術--外科手術切除為主要治療方式，以切除原發腫瘤及區域淋巴結為目標，切除後五年存活率介於 20-50%之間

a. 治本的方法：作根本切除，即開刀時，把病變的腸子及淋巴腺、血管儘量切除乾淨，此法適用於 A、B 及 C 期之病人。

b. 治標的方法：因為 D 期之病人已有鄰近器官的轉移，或廣泛蔓延而無法作根部切除，僅考慮減少病人痛苦，延長其壽命，解決排便問題的姑息手術。

在接受手術治療後，復發位置常見於局部、肝、肺、腹腔、腹腔

後淋巴腺，約有三分之一的患者合併有淋巴結轉移。同時具有病理形態分化不良及有淋巴結轉移之患者復發之機率很高，因此這兩種指標將助於決定哪一類的患者需接受手術後放射線或化學藥物治療。

2. 放射線療法--包含手術前、手術後，及手術中放射線治療

對C期或B期的病人，手術後作會陰或骨盤腔治療，可消除手術所無法去除之病灶進而減少復發率。

a. 手術前估計無法切除之腫瘤，經放射性療法使之變為可切除，也可減少手術中癌細胞之擴散，即謂術前放射性療法。

b. 對於局部廣泛之直腸腫瘤患者，手術中放射治療可以加強體外放射治療之效果

c. 於無法切除的癌或轉移的癌，為減輕病人之疼痛或肛門出血，可作放射性治療。

手術後放射線治療可以減少MAC分期(modified Astler-Coller stage)(表四)B2, B3以及C1-C3期患者約20%的復發機會。一般而言，術後放射線治療所引起之慢性副作用並不常見。接受4500cGy以下照射量之小腸因放射線引起之發炎，阻塞等腸道併發症十分少見。

3. 化學療法：用於B、C期手術後之輔助療法，或用於D期病人藉以延長生命和改善生活品質，其目的有三：

a. 防止或延緩遠處癌之轉移。

b. 防止或延緩局部癌之再發。

c. 對無法切除之病人減輕其痛苦，包括整體情況的改善，體重的增加和症狀的減輕和痛得舒緩，延長其生命。

一些前瞻性研究調查證明對於有轉移的患者使用化學療法相對於只用緩和性照護有較長的存活期且生活品質較好⁽³⁰⁻³³⁾。

fluorouracil (5-FU)在過去 35 年仍然是大腸直腸癌化學治療的主幹，平均存活約 11-12 個月，現在平均存活時間中位數是以前的二倍，患者一般可生活超過兩年，這主要歸因於有新的有效的藥物加入醫療。目前治療藥物有五種 Fluoropyrimidines (一般合併使用 leucovorin, capecitabine), Irinotecan, Oxaliplatin, Cetuximab and panitumumab, bevacizumab (表 五)。治療目標依患者個別情況而定，對大部份病人來說治療是為緩解症狀而不是治癒，治療藥物如下：

I. Fluoropyrimidines：fluorouracil (5-FU，以下簡稱 5-FU) 為結腸直腸癌的主要治療藥物，為 fluorinated pyrimidine 抑制 thymidylate synthase 此為 pyrimidine nucleotide synthesis 的速率限制酶(rate limiting enzyme)⁽³⁴⁾，一般與 leucovorin 合用，此可使 fluorouracil 與 thymidylate synthase 的結合穩定因此提高抑制 DNA 的合成⁽³⁵⁾。

Fluorouracil 的副作用與給藥方式有關，若以高劑量靜脈注射給藥，如每天打針連續 5 天每 4-5 星期一次，則嗜中性白血球減少和胃炎較常見。若每星期靜脈注射給藥則腹瀉較常見若是靜脈輸注則血液及胃腸道的毒性較少但常見(“hand-foot syndrome”) palmar-plantar erythrodysesthesia⁽³⁶⁻³⁸⁾。口服方式給藥則常見毒性為 hand-foot syndrome，其他不良反應為腹瀉、嘔吐、噁心和骨髓抑制等。

在 Stage III 手術切除的患者，術後以 5-FU 靜脈注射或口服當輔助用藥，其效果相當^(39, 40)，可使五年沒有腫瘤的再復發率從 42%增加到 58%，五年的整體存活率從 51%提升到 64%⁽⁴¹⁾。但在 Stage II 患者比較具爭議性，因不管有無使用輔助藥物治療，其五年存活率都約 80%⁽⁴¹⁾，所以不建議所有的 Stage II 患者常規的使用輔助藥物治療。

美國 NCI 1990 年的大腸直腸癌輔助性的化學治療共識會議，就把 5-FU+ Levamisole 的化學治療當作是有淋巴腺轉移(Stage III)的大腸

癌的標準輔助性治療，在直腸癌方面，穿透腸壁但沒有淋巴腺轉移和有淋巴腺轉移的直腸癌，化學治療加上骨盆腔放射線治療，可使五年的疾病不復發比例由 37% 提高到 59%。

II. Irinotecan—為喜樹鹼的半合成衍生物，作用於抑制 topoisomerase-1，導致 DNA 無法複製，造成細胞死亡。其常見毒性為腹瀉、骨髓抑制、噁心、嘔吐和禿頭。

III. Oxaliplatin—是第三代的鉑金衍生物，與 DNA 形成巨大的錯化合物，使 DNA 合成和 RNA 的轉錄受抑制並誘發細胞凋亡，Oxaliplatin 與 5-FU 有很高的協同作用⁽⁴²⁾。主要毒性為神經病變，特徵為末梢感覺異常，口部周圍與上呼吸消化道感覺異常，如在咽喉的痙攣性疼痛，但可自行恢復，另外還有手腳沒感覺或刺痛腹瀉等。

IV. Targeted therapies—在腫瘤組織上有些特殊分子構造，利用此特點研發特定的標靶，以利治療使用，主要目標是干擾細胞生長、存活和轉移，同時降低對其他正常細胞的毒性。目前可分成以下兩種：

a. Epidermal growth factor receptor (EGFR) antagonists—目前代表藥物為 Cetuximab 和 Panitumumab 為將人、鼠的片段基因合成的單株抗體 (monoclonal antibody)，可專一性地與上皮細胞生長因子接受器 (EGFR) 結合，競爭性的抑制上皮生長因子的功能，而使得癌細胞不能進行複製、繁殖、血管無法再生，並誘發癌細胞凋亡。

常見副作用中樞神經方面為不舒服 (Malaise) (49%)、發燒 (33%)、頭痛 (25%)；在皮膚方面為痤瘡樣紅疹 (acneform rash；90%，有 10% 為嚴重型態)，其他副作用如胃腸不適、噁心、嘔吐、呼吸困難、疲倦....等，輸注的過程當中，約有 3% 的患者會發生嚴重的輸注反應，如急性呼吸道收縮、支氣管痙攣、蕁麻疹及低血壓等症狀。

b. Angiogenesis inhibitors—目前已知癌細胞之血管新生現象，牽涉多種細胞激素之分泌，其中血管內皮細胞生長因子(vascular endothelial growth factor，簡稱 VEGF)為最主要之調控因子。因此，若能有效抑制癌細胞的血管新生，理論應可抑制癌細胞的生長，進而減少轉移發生的情況⁽⁴³⁾。

目前代表藥物為 Bevacizumab 是由美國 Genentech 公司所發展出來的新藥。它是將自老鼠身上所得對抗 VEGF 的單株抗體，利用基因工程的方式，將大部份的結構改造成人類蛋白質，將 Bevacizumab 注射到人體後，不會因為物種之不同而產生抗 Bevacizumab 之中和抗體。於 2004 年 2 月獲得美國食品藥品管理局(FDA)核准，合併使用以 Fluorouracil 為主之化學治療，第一線使用於治療轉移性大腸直腸癌病患。常見副作用為頭痛、噁心、嘔吐、厭食、口炎、便秘、上呼吸道感染、流鼻血、呼吸困難、蛋白尿等，嚴重之不良反應有高血壓危象、動脈血栓栓塞、腎病症候群、出血、胃腸道穿孔、傷口癒合困難、鬱血性心衰竭等。

現今結腸直腸癌的治療仍是以外科手術切除為主，對於治療藥物雖有新藥加入治療行列，但至目前為止這些藥物仍有一定程度的毒性，這使我們想從中草藥中找尋有效且副作用小或無的最適治療藥物，在毒殺癌細胞時直接誘發細胞凋亡，以避免發炎反應發生或影響正常細胞。

表 五 結腸直腸癌治療藥物辭彙表*

<p>FDA-approved drugs :</p> <p>Fluorouracil Capecitabine (Xeloda) Irinotecan (Camptosar) Oxaliplatin (Eloxatin) Cetuximab (Erbitux) Bevacizumab (Avastin)</p>
<p>FDA-approved combination regimens :</p> <p>IFL: Irinotecan, bolus fluorouracil, and leucovorin — first-line therapy FOLFIRI: Irinotecan, infusional fluorouracil, and leucovorin — first-line therapy† FOLFOX: Oxaliplatin, infusional fluorouracil, and leucovorin — first- and second-line therapy Intravenous fluorouracil and bevacizumab — first-line therapy Cetuximab and irinotecan — therapy for EGFR-positive,‡ irinotecan-refractory disease</p>

* FDA 為 Food and Drug Administration, EGFR 為 epidermal growth factor receptor.

† FOLFIRI, 引述自 Douillard et al.,較常用 FDA 認可的另一個併用方式 infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan.

‡ Immunohistochemistry testing is used to determine EGFR status.

第四節 細胞週期

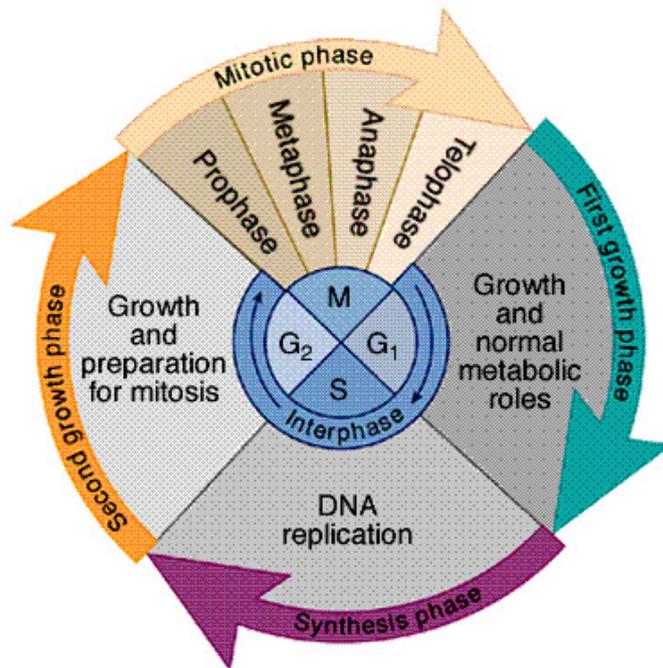
一、細胞週期分期

從親代細胞進行細胞分裂，分裂形成兩個子代細胞的過程，稱之為細胞週期 (cell cycle)。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。當中可分為三個時期：細胞生長期、DNA 複製期、細胞分裂期。細胞週期可分為五期 G0、G1、S 和 G2 (Interphase) 及 M 期 (Mitosis)⁽⁴⁴⁾(圖 五)。

- 1、G0 期：細胞可能經分化或複製完便處於靜止的狀態，可能是暫時休眠或者是永久的停止生長，需要有適當的訊息，才能使細胞進入細胞週期或分化 G1 期，亦稱休止期。
- 2、G1 期：細胞開始生長，並產生 RNA 及蛋白質，細胞體積會增加，此期的染色體數目是 2N。而在進入 S (synthesis) 期之前會檢查染色體 (chromosome) DNA 是否受到破壞以進行修補 (repair) 的工作，以準備開始複製兩個子細胞，此時期需要花十到十二小時。為合成前期，亦稱分裂後期。
- 3、S 期：細胞進行六到八小時 DNA 複製及合成，此時染色體數目介於 2N~4N 之間，為 DNA 合成期。
- 4、G2 期：細胞進入 G2 期需要花三到四小時，染色體數為 4N。除了繼續生長並且合成蛋白質之外，在細胞要進入 M 期之前會負責檢查染色體 DNA 的複製是否完整，為進行有絲分裂 (mitosis) 作準備，為分裂前期。

5、M 期：此時期只有一小時。會停止細胞生長及蛋白質合成，開始進行分裂，為有絲分裂期。主要分為 4 個時期--前期、中期、後期、末期。前期：中心粒形成並一分為二，各向細胞的兩極移動，紡錘絲出現，複製的染色體濃縮，核膜消失。中期：染色體附著在紡錘絲上，並排列在細胞中央。後期：紡錘絲收縮，染色體互相分離並移向兩極。末期：紡錘絲消失，新的核膜形成，分別包圍分離後的染色體，中央部位的細胞膜內陷，形成兩個子細胞，新細胞在此期完成。

在正常細胞週期的進行須受到精確的調控，才能維持細胞的數目及功能正常，所以在細胞週期的每個階段或時期交界都有所謂的『檢查點』（checkpoint），當 DNA 損害時，則細胞週期無法通過檢查點而造成停滯（arrest），此時會進行 DNA 修復，當修復完成時才得以進入下一個時期。G1 階段所監測為細胞的大小，在細胞成長過程中，細胞核遺傳物質若有受外界高能輻射線或化學物質的影響而突變，則啟動修復系統修復。S 階段則是進行 DNA 複製，G2 階段主要在檢查所有染色體 DNA 是否都被複製無誤且限複製一次，若一切都正常才能進入 M 階段細胞分裂。但若是遇到無法彌補的錯誤時，細胞則會走向計畫性凋亡（apoptosis）⁽⁴⁵⁾。



圖五 細胞週期⁽⁴⁶⁾



二、 胞週期調控因數

真核細胞的細胞週期中能使細胞正常規律的運行，維持一定的數量及功能，當中有個精密的調控系統在掌控。此調控系統由正向調節因子的依賴性蛋白激酶 CDKs (Cyclin dependent kinases) 及週期蛋白 (Cyclins) 調控因子，與負向調節因子如 CKI。於 DNA damage、分化和老化時，負向調控細胞週期，而抑制細胞增生⁽⁴⁷⁾。

1、 CDKs (Cyclin dependent kinases) 和 Cyclins (圖 六)

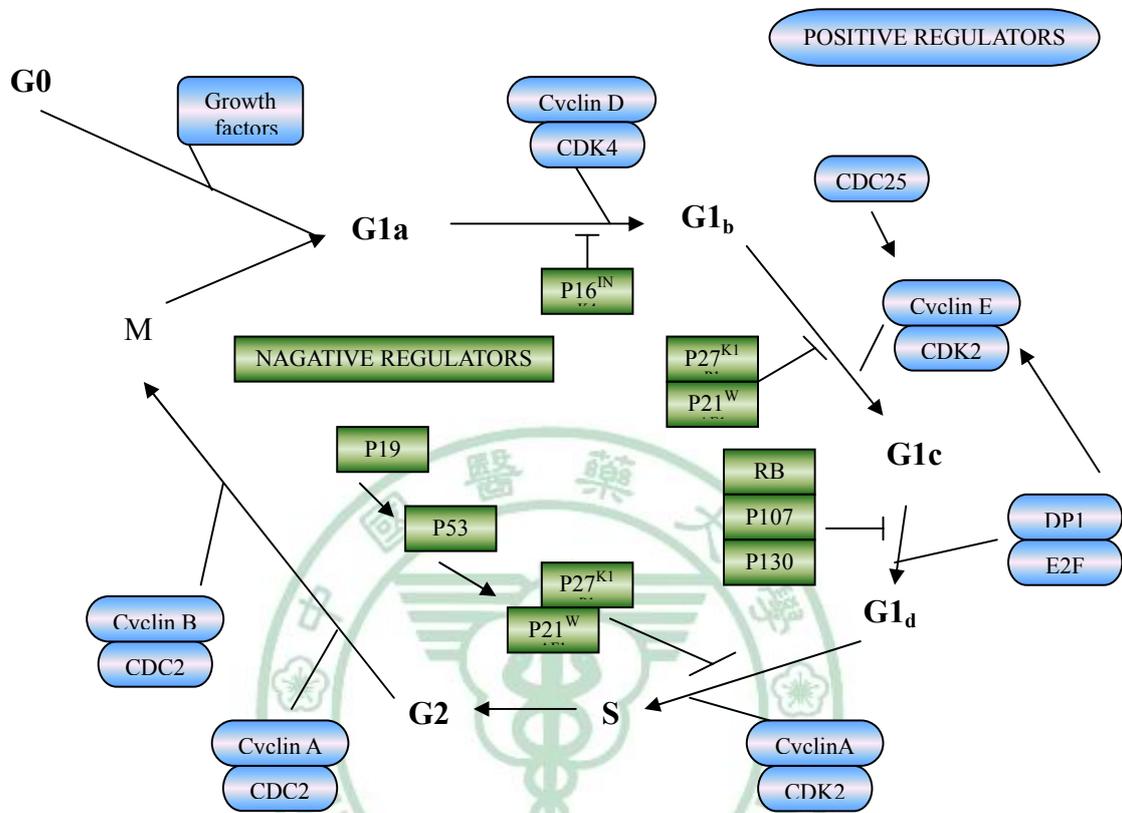
在細胞調控中 Cyclin 是主要調控週期的蛋白，但需要 CDKs 來活化 Cyclin，由於單獨的 CDKs 是無法使下游分子形成磷酸化，故兩者需結合形成複合物才具有活性，進行細胞週期的運轉⁽⁴⁴⁾。在 Cyclin 家族其成員已知有 20 種，Cyclin A~Cyclin T。而 CDK 家族的有 9 種，CDK1~CDK9，但並非每一種 CDK 或 Cyclin 的性質與功能都清楚⁽⁴⁸⁾。CDK 為一系列 serine/threonine kinase，結構包含調節區與催化區，細胞週期中的各時期都會有特定的 Cyclin-CDK complex⁽⁴⁹⁾：G1 phase 為 Cyclin D1~3 與 CDK4/6 complex 及 Cyclin E-CDK2 complex、S 為 Cyclin A-CDK2 complex、G2/M phase 為 Cyclin B-CDK1 complex⁽⁵⁰⁾。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⁽⁵¹⁾。

2、 CDKI (Cyclin dependent kinase inhibitors)

細胞週期運行時藉由 CKI 的負向調控抑制 CDK 活性，以防不正常運轉，分成兩個家族⁽⁵²⁾：(1) INK family: 主要成員有 p14、p15(INK4B)、p16(INK4A)、p18(INK4C)以及 p19(INK4D)，主要是競爭性抑制 Cyclin D 與 CDK4、CDK6 結合，而達 G1 期的控制使細胞無法進入 S 期⁽⁵³⁾。(2) KIP/CIP family: 主要成員有 p21(CIP1/WAF1/SDI1)、p27(KIP1)以及 p57(KIP2)，其作用可同時調控抑制 Cyclin E/CDK2、Cyclin D/CDK1、Cyclin D/CDK6、Cyclin A/CDK2 及 Cyclin B/CDK1 的活性，與 Cyclin-CDK 結合，形成 Cyclin-CDK-CDKI 的穩定形式，因此無法活化下游因子而抑制細胞週期^(54, 55)。

3、 p53、p21(圖 六)

p53 為轉錄因子(transcription factor)亦為抗癌基因。平時正常的 p53 會與 MDM2 結合形成不活化型態，當 DNA 受損時 p53 就會活化並且使產生的蛋白質量增加，其參與細胞修復、細胞週期停止及細胞凋亡等生物反應。受到活化的 p53 會使 p21 開始轉錄，p21 是 p53 的下游因子，可抑制 Cyclin-Cdk4 使細胞週期停滯在 G1/S 期並修復錯誤的 DNA 序列，若無法修復時則細胞會走向細胞凋亡⁽⁵⁶⁾。另一方面，p21 具有抑制細胞增生的功能與抑癌基因的角色很相似，亦可使細胞週期停滯走向細胞凋亡，故 p21 在細胞凋亡上的研究值得探討⁽⁵⁷⁾。

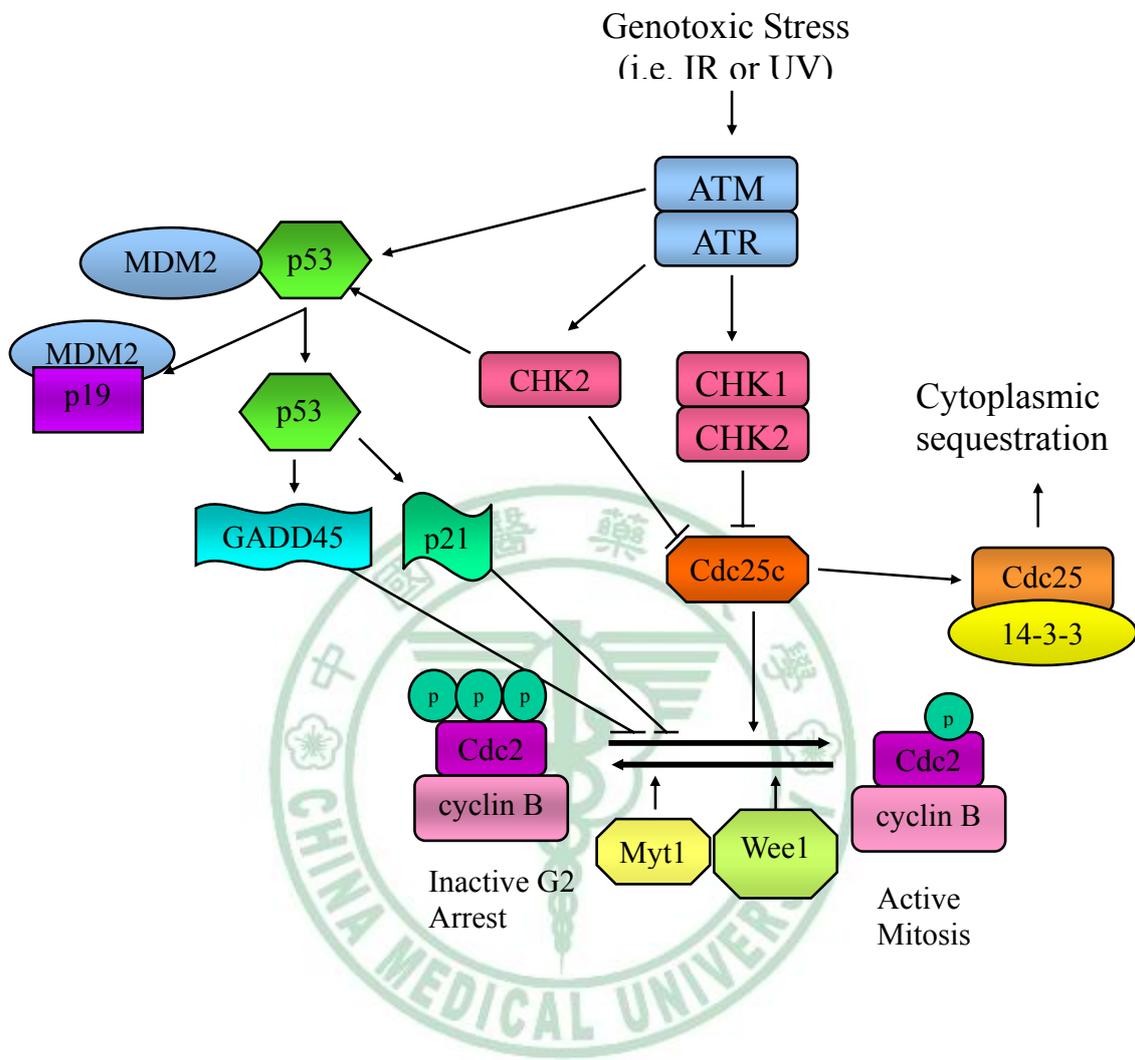


圖六 細胞週期的調節⁷¹

4、 G2/M 期之機制 (圖 七)

在細胞週期的研究發現，當細胞由 G2 要進入 M 期，Cdc2/CDK1 會藉由 Tyr-14 與 Tyr-15 的去磷酸化的修飾作用與 cyclin B 結合，使細胞進入 M 期⁽⁵⁸⁾。正向調節 cyclin B/CDK1 活性的蛋白質包含去磷酸化的 Cdc25c，而負向調節則包括 Cdc25c 的上遊 Chk1/2、14-3-3 與 Cdc2/CDK1 磷酸化的 Wee1 與 Myt Kinase 等。此外，CDK 的抑制蛋白如 p21 和 p53 亦為負向調節者。研究發現許多讓細胞受到 DNA 損害如 γ -射線等，細胞週期會被抑制於 G2/M 期，此時 Cdc2/CDK1 的活性扮演著調節細胞凋亡的重要角色，如活化 Bcl-2 或 Caspase-9 的過度磷酸化，而使細胞進行凋亡。所以 Cdc2/CDK1 的活性對細胞週期的運行和調節細胞凋亡是非常重要的⁽⁵⁹⁾。





圖七 細胞 G2/M 期之調控機制⁽⁶⁰⁾

第五節 細胞凋亡 (Apoptosis)

一、定義

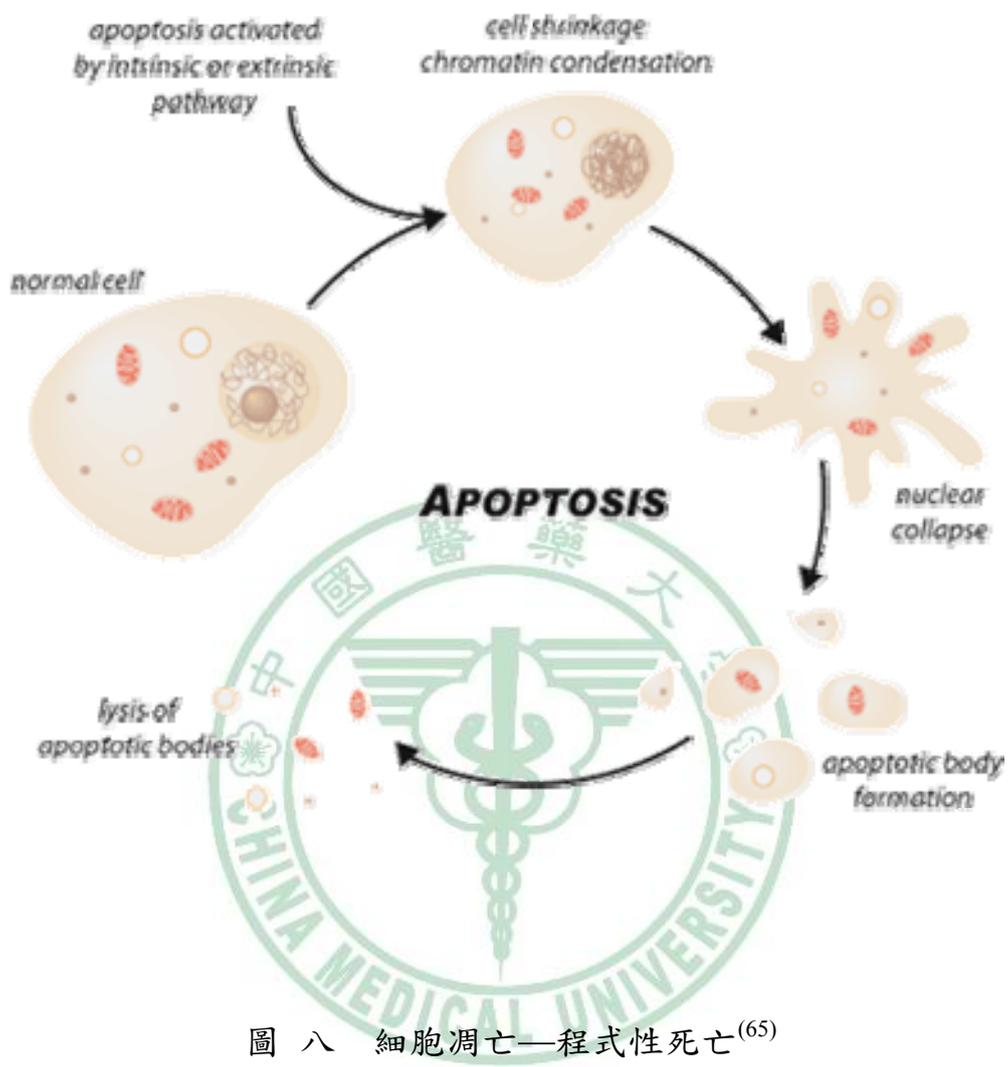
細胞凋亡又稱為生理上的細胞死亡 (Physiological cell death)或程式性死亡 (programmed cell death; PCD)。最早由 Kerr 與 Wyllie 等學者在觀察細胞之生理形態所提出。當正常細胞受到傷害無法修復時，會自動引起細胞凋亡的機轉，使細胞自行死亡⁽⁶¹⁾。在多細胞有機生物體中，細胞凋亡是一種調節及維持細胞數及功能的重要程式。如果細胞凋亡程式被抑制或其中調控的基因有損傷，則會造成細胞無法走向計畫性死亡，導致細胞循著錯誤的訊息繁衍下去，造成細胞增生，癌化的表現。

二、細胞凋亡特徵

細胞凋亡(圖 八)是初期常見的型態，包含著特定的生物反應變化。主要分為兩個時期 (1) 細胞凋亡早期：會出現細胞型態改變、細胞膜內層的 phosphatidylserine (PS)外翻⁽⁶²⁾至膜外表層，(2)中期是細胞內的 DNA 會被核酸酶(endonuclease)裂解成不同倍數的 180~200bp 的片段 (DNA fragmentation)形成染色質濃集 (chromatin condensation) (3) 晚期會出現細胞皺縮，而後細胞裂解為多個被細胞膜包覆的凋亡小體 (apoptotic bodies)，之後被吞噬細胞吞噬⁽⁶³⁾，但無發炎反應發生⁽⁶⁴⁾。因此認為誘導細胞進行細胞凋亡是一種較好的抗癌機制，可減少藥物所引發的併發症及副作用。

跟據細胞凋亡不同時期的特性，我們可以利用許多方法偵測凋亡細胞如表 六。





圖八 細胞凋亡—程式性死亡⁽⁶⁵⁾

表 六 偵測凋亡細胞的方法		
細胞結構	細胞凋亡特徵	測量法
細胞膜 (Plasma membrane)	Exposure of phosphatidylserine	Annexin-V binding
	Membrane blebbing	Microscopy
	Loss of integrity	PI Trypan blue
細胞質 (cytoplasm)	Loss of cytoplasmic volume	Microscopy
	Degradation of cytoskeletal protein	Microscopy Western
	Release of apoptotic proteins	Western
粒線體 (Mitochondria)	Rupture of outer membrane	Microscopy
	Swelling of matrix	Microscopy
	Release of apoptotic proteins	Western Microscopy
	Loss of transmembrane gradient	DiOC6 , JC-1
細胞核 (Nucleus)	Nuclear fragmentation	Microscopy
	Chromatin condensation	Microscopy
	DNA fragmentation	TUNEL Electrophoresis
	Release of apoptotic proteins	Western Microscopy

三、細胞凋亡的調控

調控細胞凋亡的蛋白質可分為促進細胞凋亡(pro-apoptosis)、抑制細胞凋亡(anti-apoptosis)與執行細胞凋亡的蛋白質。細胞凋亡的路徑早期(initiation)主要受細胞內或外訊息的刺激而啟動。作用期 (effector phase) 則受到促進及抑制細胞凋亡的蛋白質兩方調控，如 Bcl-2 家族蛋白質及 IAP 家族蛋白質等。分解期(degradation phase)則細胞受一系列活化的 caspase 等蛋白質執行細胞凋亡步驟⁽⁶⁶⁾。

細胞凋亡至少可以經由兩種方式將訊息傳遞至細胞核，傳遞路徑可分為內在及外在路徑，分別為粒線體傳遞路徑 (Mitochondrial/stress pathway)、死亡受體路徑 (death receptor pathway)⁽⁶⁷⁾。

1、內在路徑-粒線體路徑 (Mitochondrial/stress pathway)

當細胞受到細胞外或細胞內的壓力及傷害時，如放射性輻射、氧氣不足、藥物、DNA damage 等，會使細胞質的粒線體膜電位下降，促使 Cytochrome *c*，apoptosis-inducing factor (AIF)，及 Smac/DIABLO 等蛋白質從粒線體的 intermembrane space 釋放到細胞質中，與 Apaf-1 與 procaspase-9 結合形成 apoptosome，進而活化 Caspase-9 的複合物，Caspase-9 也促使下游的 caspase-3 活化，活化的 caspase-3 會切斷 DNA fragmentation factor45 (DFF45) / ICAD，最後誘導走向細胞凋亡⁽⁶⁸⁾。

2、 Bcl-2 家族蛋白

Bcl-2 family 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) 兩類⁽⁶⁹⁾(表 七)。說明。這兩大類的蛋白結構類似，皆含有四個類似的 BH (Bcl-2 homology)(BH1~4)，彼此會形成同質二元體 (homodimer) 或異質二元體 (heterodimer) 結構來調控細胞凋亡⁽⁷⁰⁾。抑制凋亡蛋白像是 Bcl-2 等，一般是在粒線體膜、核膜、內質網膜上，而促使凋亡蛋白 Bax、Bad、Bid 等則是在細胞質中。當受到凋亡訊號時就會轉位至粒線體膜上，影響粒線體膜電位的變化，造成膜的通透性改變⁽⁷¹⁾。像是細胞質的 pH 值上升或其他促凋亡蛋白影響時，Bax 可由細胞質轉移到粒線體膜上，而在膜上形成聚合體，進行傳遞凋亡訊號。而 Bad 受到凋亡訊息刺激時，則產生去磷酸化，移至粒線體上。以上作用會在粒線體上形成孔洞而促使讓粒線體膜內的蛋白，像是 Apaf-1、Cytochrome *c*、procaspase-9、procaspase-2、Smac/DIABLO 和 AIF (apoptosis-inducing factor) 等釋放至細胞質，或造成粒線體膜電位下降，而產生大量氧化自由基(reactive oxygen species ; ROS)，最後啟動 caspase 的活化因而產生凋亡^(72, 73)。

表 七 Bcl 家族蛋白分類及功能

類別	促使細胞凋亡蛋白分子 (pro-apoptotic protein)	抑制細胞凋亡蛋白分子 (anti-apoptotic protein)
分類	Bad、Bax、Bak、Bid、Bik、 Bim、Blk、Bok、Bcl-Xs、 Bcl-GL、Bcl-Gs、Bmf、Hrk、 Nip3、Nix、Noxa、MAP-1、 PUMA	Bcl-xL、Bcl-2、Bcl-w、Boo、 Mcl-1、A1/Bfl-1
功能	過量表現時會促進細胞凋亡	過量表現時會阻斷各種不同壓力所誘發的細胞凋亡

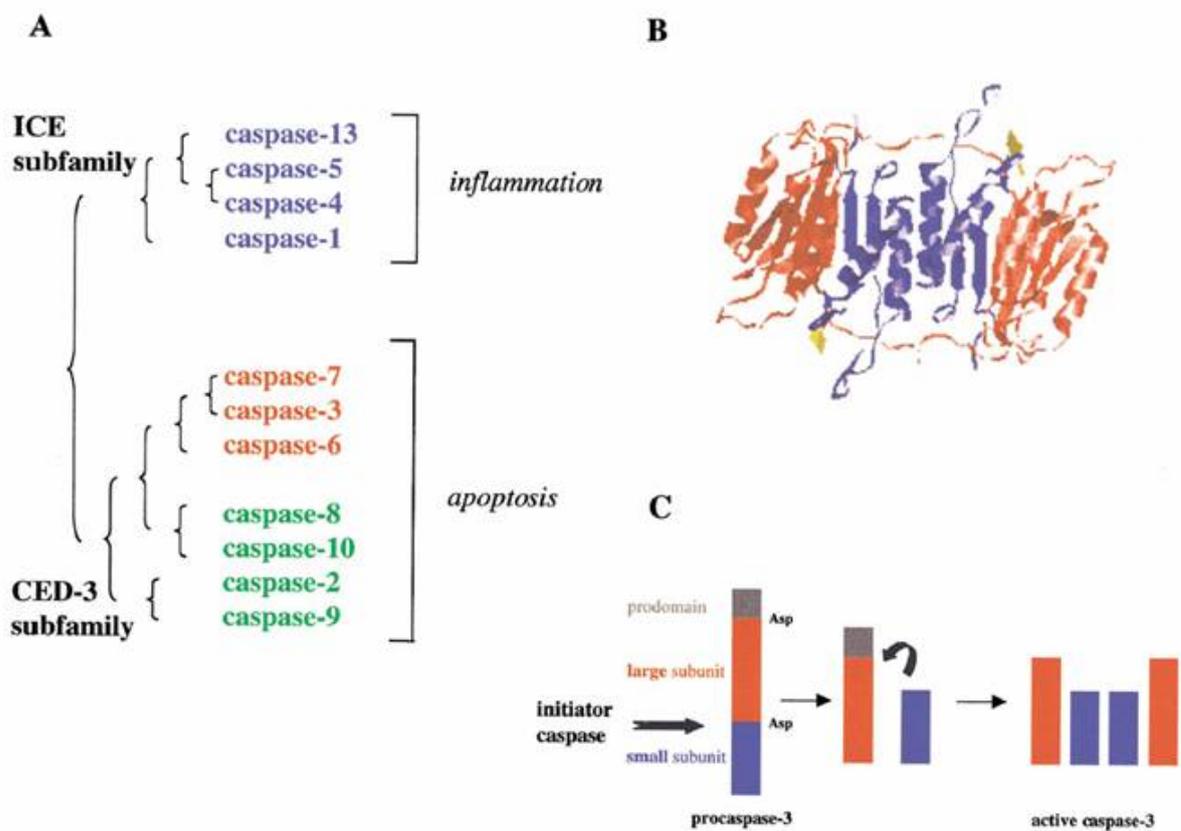


3、Caspase (Cysteine dependent aspartate specific protease)

Caspase 為一種有著 Cysteine 活化態殘基的蛋白酶，具有專一性。Caspase 活化後可在標的蛋白 N 端的 aspartate 殘基與 C 端的 small hydrophobic residue 間切割⁽⁷⁴⁾。未活化 caspase 有三個主要 domain：amino-terminal prodomain、large subunit (17-20 KDa)、small subunit (10-12 KDa)。這些未活化 caspase (precursor proenzyme)需要其他的 caspase 進行特定的蛋白分解作用，切割成大、小次單位，而形成四聚體模式，使這些 domain 形成活化態，另外 caspase 間具有自身催化或互相啟動的能力且有相似的催化部位⁽⁷⁵⁾。

未活化的 caspase 依作用分為 (1) The ICE-1/Nedd-2 subfamily of apoptotic initiators：有 caspase -2、-8、-9、-10，可啟動活化 apoptotic executioners 以執行 apoptosis，稱為 promoter。(2) The Ced-3/ CPP32 subfamily of apoptotic executioners：有 caspase:-3、-6 和-7，功能為執行細胞凋亡，裂解下游蛋白質。(3)The ICE subfamily of cytokine processors：有 caspase-1、-4、-5、-11、-12、-13 和-14 主要與發炎反應有關(圖 九)。

細胞凋亡發生時，在粒線體路徑中會有特定訊息 (Cytochrome *c* 釋出與 Apaf-1 結合) 會傳遞給 Caspase-9 使其活化，接著再活化下游的 Caspase-3,-6,-7。造成膜蛋白分解及具修復 DNA 作用的 PARP 裂解，失去修復功能。另外也切除 ICAD (inhibitor of CAD)釋出 CAD 導致 DNA fragmentation，誘導走向細胞凋亡⁽⁷⁶⁾。



圖九 ICE 家族成員

A：3 類 caspase：藍色參與發炎反應，紅色為執行者執行細胞凋亡，綠色為啟動者活化 apoptotic executuiners；B：caspase-3 的結構模型；C：caspase-3 的活化過程。⁽⁷⁷⁾

4、 外在路徑-死亡受體路徑 (death receptor pathway)

由死亡接受器[Fas / CD95、TNFR1、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)]與細胞膜上的表面接受體結合，將凋亡訊息傳遞至細胞內，釋放計畫性死亡訊號後會開啟細胞凋亡的受體。然後會活化 caspase cascade，經由 caspase 路徑所啟動的細胞凋亡是非常快速走向凋亡⁽⁷⁸⁾。

5、 Fas (CD95) / FasL

Fas 是細胞表面的糖基蛋白，屬於腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor ; TNF) receptor superfamily 中的第一型膜蛋白，分子量約 45 KDa。而 FasL (ligand)是第二型膜蛋白，分子量約 40 KDa。可維持細胞及 B 細胞的平衡，並有效清除有害的細胞 (如發炎細胞) 或其他癌化細胞。當 Fas 與 FasL 結合時會相互活化 Fas 接受器，並產生三聚化 (trimerization) 為活性的受體。接著促使下游的受體傳導蛋白質 Fas-associated death domain (FADD) 和 procaspase-8 結合，進而活化 procaspase-8，具活性的 Caspase-8 經由一連串的過程會直接活化下游的 Caspase-3、-7 與 Caspase-6 最終促使細胞凋亡⁽⁷⁹⁾。

第六節 研究目的

本研究目的為探討 Cantharidin 對人類大腸直腸癌細胞株(COLO 205 cell line) 是否可抑制其細胞增生及誘導產生細胞凋亡的抗癌作用。另外並探討其抑癌細胞的分子機轉(圖十)。可分為下列階段：

第一階段：探討 Cantharidin 對人類大腸直腸癌細胞(COLO 205)不同時間與濃度處理後，對其生長抑制之影響。

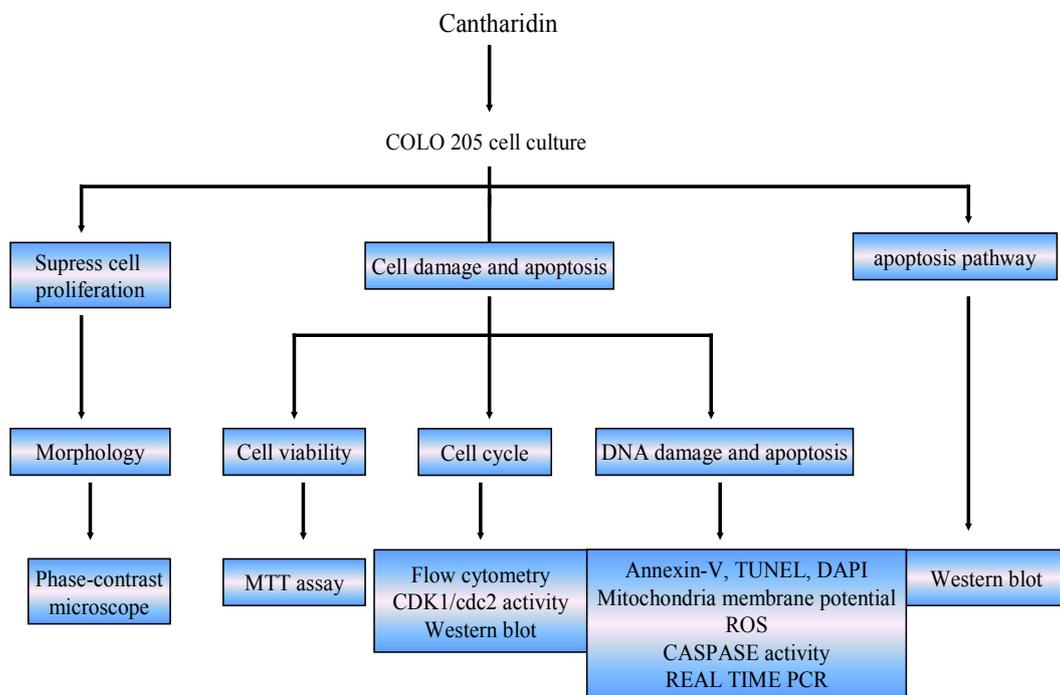
1. 利用倒立式相位差顯微鏡觀察，藥物對於細胞型態上的影響及增生抑制情況。
2. 利用 MTT assay 檢測藥物對於細胞存活率的影響。
3. 利用流式細胞儀分析藥物對細胞週期的影響。

第二階段：探討 Cantharidin 造成細胞損傷及細胞凋亡相關因子。

1. 利用流式細胞儀觀察細胞傷害之相關因子，如活性氧化物、細胞粒線體膜電位的改變。
2. 利用 DAPI/TUNEL，Annexin-V 染色來檢測藥物對細胞破壞、損傷與細胞凋亡之影響。

第三階段：探討 Cantharidin 誘導細胞凋亡之路徑。

將經由處理過之細胞蛋白，以西方點墨法檢測凋亡路徑。



圖十 實驗流程圖

第二章 研究方法

第一節 研究材料與儀器

一、 細胞株(表 八)

本研究之實驗細胞株為人類之結腸腺癌細胞 (Human colon adenocarcinoma; COLO 205)，由新竹食品工業研究所 (Food Industry Research and Development Institute) 菌種中心購得。



表八 COLO 205 特性

Name	COLO 205	Type	Human colo adenocarcinoma
Strain Ethnicity	Caucasian	Species	<i>Homo sapiens</i> (human)
Gender	Male	Age Stage	70 years
Morphology	epithelial	Tissue	Colon;adenocarcinoma; from metastatic site: ascites
Incubation Temp(°C)	37°C	Incubation Condition	5% CO ₂
Culture Medium	90% RPMI 1640 medium with 2mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10mM HEPES, and 1.0 mM sodium pyruvate+ 10% heat-inactivated fetal bovine serum	Growth Property	mixed, adherent and suspension, grow loosely attached and in suspension
SubCulture Procedure	collect floating cells by centrifugation; use trypsin-EDTA for attached cells	Freezed Medium	93%culture medium + 7% DMSO
Medium Renew	every 2 to 3 days		

二、 藥品試劑

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO): 購自 Sigma Chemical Co.
2. DMEM/F12 Medium:購自 GIBCO
3. Fetal Bovine serum (FBS; 胎牛血清):購自 GIBCO
4. L-glutamine (LG; 麩醯胺酸):購自 GIBCO
5. Penicillin-Streptomycin (PS):購自 GIBCO
6. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) :購自 Merck
7. Sodium chloride (NaCl) :購自 Merck
8. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) :購自 Merck
9. phiphiLux®-G₁D₂ kit : 購自 OncoImmunin
10. Potassium chloride (KCl) :購自 Merck
11. Trypan Blue:購自 Sigma chemical Co.
12. Trypsin-EDTA:購自 Amersco
13. Triton X-100:購自 Sigma chemical Co.
14. Propidium iodide (PI) :購自 Sigma chemical Co.
15. RNase A (Ribonuclease A) :購自 Sigma chemical Co.
16. Ethanol:購自 TEDIA
17. Formaldehyde:購自 Merck
18. 5X TBE buffer:購自 Amresco
19. Agarose I:購自 Amresco
20. 10X Blue Juice (Gel loading buffer):購自 Invitrogen
21. 核酸純化試劑組 (DNA purification kit) : 購自 Gene Mark

22. ROS 螢光染劑(2',7'- Dichlorodihydrofluorescein diacetate, H₂DCFDA)
23. MMP 螢光染劑 (3',3'-Dihexyloxacarboyanine iodide, DioC6) : 購自 Molecular Probes
24. Calcium 螢光染劑 (Indo-1-AM) : 購自 Molecular Probes
25. CaspaLux®9-M₁D₂ kit : 購自 OncoImmunit
26. CaspaLux®8-M₁D₂ kit : 購自 OncoImmunit
27. Bovine serum albumin (BSA):購自 Merck
28. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BISTM 29:1):購自 Amresco
29. APS (Ammonium persulfate):購自 Amresco
30. Protein assay-Dye reagent concentrate:購自 Bio-Rad
31. 10X SDS buffer (Sodium dodecyl sulfate):購自 Amresco
32. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine):購自 Amresco
33. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane):購自 Amresco
34. Glycine:購自 Amresco
35. Methanol:購自 TEDIA
36. Protein maker:購自 Upstate
37. Tween 20:購自 Amresco
38. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit):購自 Amersham
39. 顯影劑:購自 Kodak
40. 定影劑:購自 Kodak
41. BioMax Flim:購自 Kodak

42. 蛋白質萃取試劑 (PRO-PREP protein extraction solution):購自 iNtRON Biotechnology,INC
43. 10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer):購自 Amresco
44. 5X Protein loading dye:購自 Amresco
45. BCA protein assay reagent:購自 Pierce
46. Butylated hydroxytoluene(BHT):購自 Sigma
47. 一級抗體：
- (1) Anti β -actin：購自 sigma (1:5000)
 - (2) Anti-Cdk1/Cdc2：購自 oncogene (1:750)
 - (3) Anti-Cdk2：購自 upstate (1:1000)
 - (4) Anti-Cyclin A：購自 upstate (1:250)
 - (5) Anti-Cyclin B1：購自 upstate (1:1000)
 - (6) Anti-p21^{waf1}：購自 Calbiochem (1:1000)
 - (7) Anti-Bcl-2：購自 BD (1:500)
 - (8) Anti-Bid：購自 Chemicon (1:500)
 - (9) Anti-Bax：購自 Calbiochem (1:100)
 - (10)Anti-Fas：購自 BD (1:5000)
 - (11)Anti-Cytochrome *c*：購自 BD (1:1000)
 - (12)Anti-Chk1：購自 BD (1:250)
48. 二級抗體
- (a) goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody:購自 Chemicon
 - (b) goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish

peroxidase conjugated antibody: 購自 Chemicon

(c) goat anti-goat IgG (HRP) horseradish peroxidase
conjugated antibody: 購自 Chemicon

三、設備與器材

1. 細胞培養箱:購自 Nuaire
2. 細胞培養盤:購自 FALCON
3. 細胞培養皿:購自 FALCON
4. 無菌操作臺:購自 Lian Shen
5. 細胞計數器 (Haemocytometer): 購自 Boeco
6. 冷凍管: 購自 TPP
7. 倒立式位相差顯微鏡 (phase-contrast microscope):購自 Zeiss
8. 冷凍離心機: 購自 Appendorf
9. 冷凍高速離心機: 購自 HERMLE
10. 微量天平 (TE-200): 購自 MILLTER
11. 去離子水製造機: 購自 Millipore
12. 流式細胞儀 (Flow cytometry): 購自 Becton Dickinson
13. Dispensor:購自 TPP
14. DNA 電泳槽: 購自 Mupid-2
15. 酸鹼值測定計 (C831): 購自 Consort
16. 微量離心管: 購自 Orange
17. Pipetment:購自 Costar
18. PVDF membrane:購自 Millipore
19. SDS-PAGE 電泳槽套組: 購自 Bio-Rad

20. Mini-3D Shaker：購自 Boeco
21. Transfer Cell Blot 套組：購自 Bio-Rad
22. 加熱器：購自 Lab-Line
23. 分光光度計：購自 Beckman
24. 光學顯微鏡：購自 Nikon LABOPHOT-2
25. 酵素免疫分析儀 (anthos2020)：購自 Anthors Labtec, Australia
26. 乾浴槽 (Model 110001) :購自 Boekel
27. 雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡：購自進階生物科技股份有限公司。

第二節 研究方法

一、 配製藥物

Cantharidin 以 DMSO 為溶劑配製庫存液 (stock solution) 儲存於-20°C 冷凍庫中，溶液濃度為 5 mM。進行實驗操作時，細胞培養液固定毫升數，再依所須實驗藥物濃度，計算所須吸取 stock solution 毫升數。

二、 細胞培養

1. 配製細胞培養液 (RPMI MEDIUM-1640)

培養人類大腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 所使用的培養液為

RPMI MEDIUM-1640，另要再添加胎牛血清 (FBS)、抗生素 (Penicillin and Streptomycin)、麩胺酸 (L-glutamine)，因此培養液最終含有 10% FBS、100 μ /ml Penicillin and Streptomycin 及 1% L-Glutamine。細胞依實驗需要培養於 10 公分細胞培養皿、24-well 與 96-well 細胞培養皿及 75T 與 25T 細胞培養瓶中，並置於 37°C、5% CO₂、濕度 95% 的無菌培養箱中培養。細胞以 trypan blue 染色，用血球計數盤計算活細胞數目及存活率，並控制繼代的細胞數在 $2-5 \times 10^5$ cells/ml。

2. 細胞解凍

冷凍細胞之活化過程須把握快速解凍的原則，以避免重新結冰的冰晶和濃度過高之 DMSO 造成對細胞的傷害，導致細胞死亡。首先將新鮮的細胞培養液放入 37°C 水浴鍋中，讓培養液回溫至 37°C，接著將溫好的培養液 10 mL 加至滅菌的 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，盡量在 1-2 分鐘內融化，使冷凍管裡的細胞液急速解凍，融化至冰塊將解凍尚有些許小冰塊的狀態，在無菌操作檯中，再將冷凍管裡的細胞液取至含有回溫好的新鮮培養液的離心管中。搖勻後，以 1500 rpm 的速度離心 5 分鐘，後去除上清液，拍散細胞，加入 1 ml 的培養液，將之吸出加入含有新鮮的培養液 10 mL 的培養瓶(75T)，接著移入 37°C、5% CO₂、濕度 95% 的培養箱中培養，隔日更換新鮮的培養基。細胞活化後，約一星期後，或繼代一至二代，待其細胞生長或特性表現恢復正常（例如產生單株抗體或是其他蛋白質）才開始做實驗。

3. 人類結腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 的培養

首先將新鮮的培養液放水浴鍋回溫至 37 °C，使用 75% 的酒精擦拭無菌操作檯檯面。所有放入無菌操作檯的物品都要以 75% 的酒精擦拭，並帶無菌手套進行以下的實驗。人類結腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 培養在 RPM-1640 培養液中，其中含有 10% fetal bovine serum、100 μ/ml penicillin、100 μ/ml streptomycin 與 1% L-glutamine，置於 37°C、5% CO₂、濕度 95% 的培養箱中培養。定期更換新鮮的培養基，當其長到七八分滿或細胞數大於 1×10^7 時即繼代下來做實驗。

4. 冷凍細胞

COLO 205 細胞大量培養後可用液態氮冷凍保存細胞，欲保存細胞盡量是採用細胞處於生長旺盛且存活率高的狀態的細胞來進行冷凍。要將細胞冷凍保存時，冷凍的前一日更換半量或全量培養液，並注意細胞生長情形。先配製保存液，用 DMSO 加入 Fetal Bovine serum (FBS) 中，濃度為 5%，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 5% DMSO，使細胞數保持在 $1-5 \times 10^6$ cell/ml，混合均勻後分裝至冷凍保存管中 (1 ml/vial)，在管外標示名稱、數目、日期。冷凍順序冷凍管置於 4°C，10 分鐘 → -20°C，30 分鐘 → -80°C，16-18 小時 → 放入液態氮桶中 (-196°C) 長期儲存。另外取少量細胞懸浮液作污染檢測。

5. 細胞計數

計算細胞數目是用血球計數盤，一般有二 chambers，每個 chamber 中細刻 9 格的 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 。在 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為 $1.0 \times 10^{-4}\text{ ml}$ ($1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ ml}$)。使用時，計數大正方形內之細胞數目，再乘以稀釋倍數和乘以 10^4 ，即為每 ml 中之細胞數目。(如圖 十一 所示)

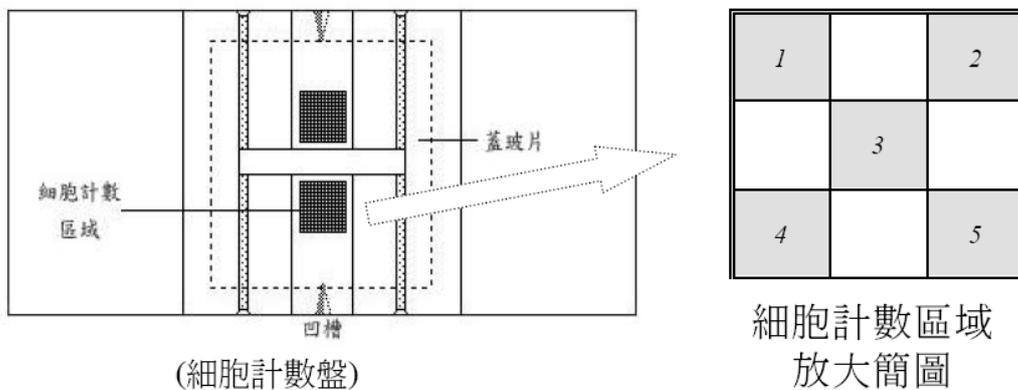


圖 十一 細胞計數盤示意圖

取 $10\mu\text{l}$ 細胞懸浮液與 trypan blue (0.4% w/v trypan blue) 混合液 (1:1) 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，活細胞因細胞膜完整而不會染色，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 (至少乘以 2，因與 trypan blue 等體積混合)，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 50 個細胞)，需再加入更多的培養液稀釋。

三、 利用倒立式相位差顯微鏡檢測細胞型態

給予 Cantharidin 濃度 20 μ M 加入有種入 COLO 205 細胞的 12 孔洞平盤，放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱培養，在培養 24 及 48 小時後，於倒立式位相差顯微鏡下觀察並照相。

四、 細胞存活率分析—MTT ASSAY⁽⁸⁰⁾

常見應用於分析細胞增生(cell proliferation)、存活率(percent of viable cells)和細胞毒性(cytotoxicity)的分析方法⁽⁸¹⁾。利用活細胞代謝物還原劑 3-(4,5)- dimethylthiazoliazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)。MTT 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒線體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環裂開，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比（死細胞中琥珀酸脫氫酶消失，不能將 MTT 還原）（圖 十二）。

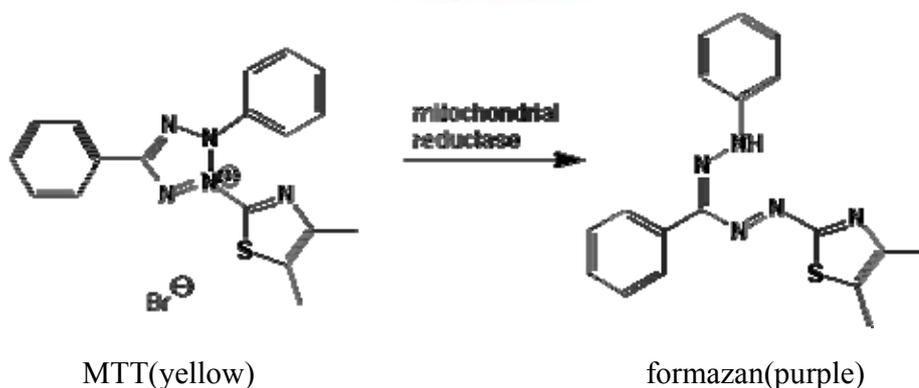


圖 十二 黃色的 MTT 經由活的細胞的粒線體變為紫色的 formazan

MTT ASSAY--將 COLO 205 培養於 96 well 的培養皿中(1×10^4 cells/mL)，加入 Cantharidin (濃度為 5、10、20、40 μ M) 處理，每個小槽之總體積為 100 μ l，細胞置於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、濕度 95% 的培養箱中培養 24-72 小時後，將培養基去除並於每一小槽加入 100 μ l 含 500 μ g / ml MTT 的培養基，再於 37 $^{\circ}$ C 反應 4 小時後，每小槽加入 100 μ l 之 0.04 N HCL / isopropanol，使細胞內藍紫色沉澱顆粒完全溶解，再用 ELISA reader 於波長 570 / 620nm 下測定吸光值。

五、 流式細胞儀分析

1. 細胞週期及 sub-G1 的影響⁽⁸²⁾

Propidium iodide (PI) 是核酸的螢光染劑，具專一性可與核酸鍵結。正常的情況下細胞膜是呈完整性，所以 PI 染劑是無法染進穿透細胞膜，而當利用酒精將細胞膜固定後，進入到細胞膜中的 PI 會與核酸鍵結，利用帶有正電荷的特性與 DNA 進行離子鍵的鍵結而嵌入雙股 DNA 上，在波長 488 nm 的雷射光激發下，可放出波長 636 nm 的紅色螢光。經由流式細胞儀偵測 PI 激發之螢光，則可反應細胞內 DNA 狀態或進行細胞週期分析 (圖 十三)。

流式細胞儀分析原理是藉由接收不同波長的螢光來區分及定量。當細胞死亡的時候，其細胞膜會呈現不完整狀態，利用 Propidium Iodide (PI) 染劑，使細胞核的 DNA 被 PI 染上。被染上 PI 的細胞再利用流式細胞計數儀可以在 488 nm 的位置激發出螢光，而死亡的細胞會有較高的紅色螢光，存活的細胞則有較弱的紅色螢光。再以 Cell Quest 軟體分

析計算。

細胞增值率計算公式：

$$(\text{實驗組存活細胞數} \div \text{對照組存活細胞數}) \times 100\%$$

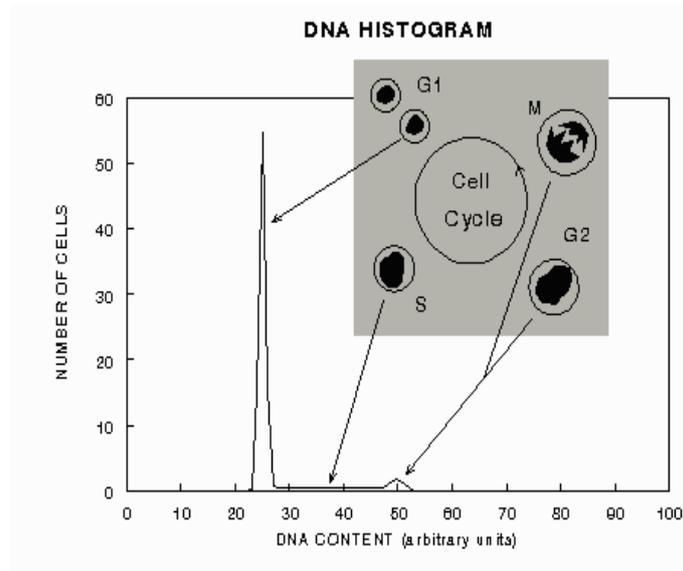


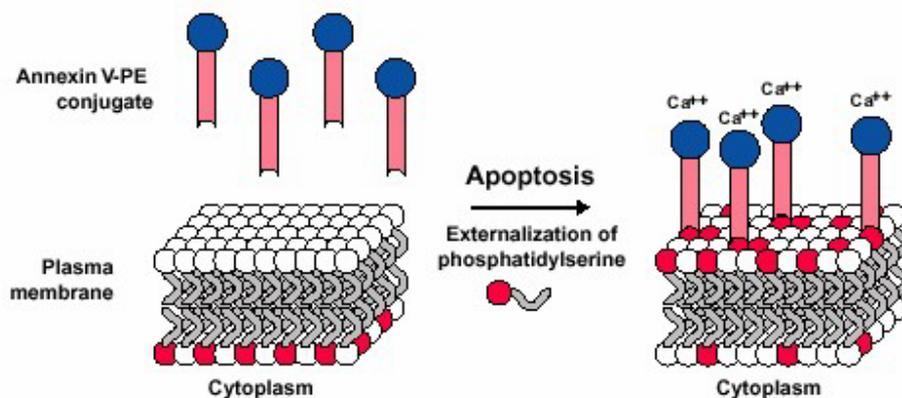
圖 十三 進行流式細胞計數儀分析出來的細胞週期標準圖。

COLO 205細胞使用6 well的培養盤，以 2×10^5 cells/well的密度培養實驗需要的時數，以DMSO為溶媒，加入Cantharidin（濃度為 $20 \mu\text{M}$ ）的最終濃度是1%，DMSO為control組。等培養時間（分別培養12、24、48小時）到之後，利用trypsin反應約3分鐘使細胞游離培養盤的表面，以1X PBS 清洗兩次，以1500 rpm離心5分鐘，去上清液，將細胞打散以 4°C 、70% 的酒精固定細胞，放入 -20°C 冰箱隔夜存放overnight。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1X PBS 清洗兩次之後，再離心去上清液，將細胞打散，加入 $400\sim 500 \mu\text{L}$ 的低張PI stain染劑(0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, $20 \mu\text{g/ml}$ PI)，避光30分鐘之後轉移到FACS專用小管，進行流式細胞計數儀檢測，以一秒細胞數不超過100顆細胞，每個數據收集10000顆細胞，數據以Modfit LT®軟

體進行處理分析⁽⁸³⁾。記錄G1、S、G2/M phase、sub-G1的比例。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

2. Annexin-V assay⁽⁸⁴⁾

細胞在凋亡時，首先DNA會斷裂，此部份可利用TUNEL assay來觀察，再來原本存在於細胞膜內的phosphatidylserine (PS)會外翻到細胞膜外側表面。Annexin-V是一種分子量約35-36KD的Ca⁺⁺依賴性磷脂結合蛋白，可與PS有高親和力，與PS結合會發出黃綠色螢光。然後用流式細胞儀分析凋亡細胞的百分率(圖十四)。



圖十四 Annexin-V的作用示意圖

COLO 205 經Cantharidin (20mM)處理6-12小時，離心收集細胞，用PBS清洗細胞兩次，加入1X binding buffer (0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂)，取出100 μL的溶液，加入Annexin-V-FITC，避光室溫靜置15分鐘，然後每個試管加入400 μL的1X binding buffer，在1小時內用流式細胞儀分析⁽⁸⁵⁾。

3. 檢測細胞內粒線體膜電位的變化⁽⁸⁶⁾

DiOC₆ (3-3'-dihexyloxacarbo-cyanine) 為對粒線體具專一性之親脂性陽離子螢光染劑，容易和帶有負電性之粒線體內膜結合，當粒線體受刺激去極化而失去內膜之負電荷時，內膜被標定 DiOC₆ 會減少，因此螢光強度也會降低，可作為偵測粒線體膜電位 (MMP) 之指標。在流式細胞儀中可由 488 nm 雷射激發出 525 nm 的螢光，以 FL1 之濾鏡偵測所放出的螢光強度，藉以分析 MMP。而粒線體的退極化 (mitochondria membranes depolarization) 伴隨早期的細胞凋亡發生，因此亦可做早期凋亡偵測上的指標。

培養細胞之細胞數約 2×10^5 /well，要有 1-2 個 well 做 blank。將人類大腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 種於 12 well 培養盤中，培養 24 小時，給予 Catharidine 藥物，分別培養 3 小時、6 小時、12 小時後收集細胞，PBS 清洗，離心後去除上清液，加入 MMP 試劑 (10 μ l DioC₆/500 μ l 之 1 倍的 PBS)，量視細胞數多寡而定，混合均勻，Blank 只加等量 1X PBS，放入水浴鍋 37°C 中，避光 30 分鐘，之後移置 FACS 管上流式細胞儀分析。將 blank (斜線的 peak) 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control (格線的 control) 調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，樣品上機後，分析 MMP (peak 往右移代表樣品的粒線體膜電位上升，表示藥物對粒線體沒影響。往左移代表粒線體膜電位下降，導致細胞凋亡)。

4. 活性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 產生之檢測⁽⁸⁷⁾

2',7'- Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), 為一種具有螢光性質可通過細胞膜並具特異性追蹤評估細胞內產生 ROS 的多寡, 進行細胞染色。當 H₂DCF-DA 細胞內的乙醯脂酶 (esterase) 去乙醯化 (deacetylate) 後會形成非螢光性的 DCFH, DCFH 會被細胞內的 H₂O 氧化成具螢光性質的 DCF, 並聚集在粒線體中, 在流式細胞儀中可由 488 nm 雷射激發出 525 nm 的螢光, 藉以分析細胞內的 ROS 含量。

培養細胞之細胞數約 2×10^5 /well, 要有 1-2 個 well 做 blank。將人類大腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 種於 12 well 培養盤中, 培養 24 小時, 給予 Cantharidin (20 μ M), 分別培養 3 小時、6 小時、12 小時後收集細胞, 1X PBS 清洗, 離心後去上清液, 加入 ROS 試劑 (每支離心管所需的量是 1 μ l H₂DCF-DA/500 μ l 之 1X PBS) 500 μ l, 混合均勻, Blank 只加等量 1X PBS。放入水浴鍋 37°C 中避光 30 分鐘, 之後上流式細胞儀分析。將 blank (斜線的 peak) 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間, control (格線的 control) 調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間, 樣品上機後, 分析 ROS (peak 往右移代表樣品的 ROS 增加, 往左移則代表 ROS 被清除(抗氧化))。

5. Caspase-3,-8,-9 活性分析⁽⁸⁸⁾

PhiPhiLux 是利用設計一段可供 Caspase-3 及 Caspase-3-like 蛋白辨識，且能主動被細胞嗜入，loop 結構兩端標有螢光的 peptide，此段 peptide 稱為 PhiPhiLux。當此 PhiPhiLux 與受到刺激而產生凋亡現象的細胞 (suspension / adherence) 共同培養時，會主動被這些已經 Induced Living Cell 大量噬入，由於此活細胞內部產生的 Caspase-3 結合到 PhiPhiLux 上的 GDEVDGI，加上序列 PNP 的輔助，造成 PhiPhiLux 結構上的斷裂，使 Loop 結構兩端的螢光物質結合，因而產生螢光。也因此設計原理，PhiPhiLux 有放大活細胞內 Caspase-3 與 Caspase-3-like 的訊號放大的功能，另外偵測 Caspase-8,-9 活性亦以相同原理，但用 CaspaLux 染劑來偵測。之後用流式細胞儀以 488 nm 激發光，偵測定量與定性，偵測到更早期、更完整、更準確的活細胞凋亡狀態。

培養細胞之細胞數約 2×10^5 /well。將人類大腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 種於 12 well 培養盤中，培養 24 小時，給予 Cantharidin (20 μ M) 藥物，收集細胞，離心到第二次，去上清液，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 CaspaLux M₁D₂ for Caspase-9])，於 37°C 中避光 60 分鐘。60 分鐘後，離心 1500 rpm、5 分鐘，先把染劑倒掉，再用 1X PBS 把殘留染劑洗 1~2 次後，每管加入 500 μ l 之 1X PBS，並移至 FACS 管，之後上流式細胞儀分析。Control (格線的 control) 調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，樣品上機後，分析 Caspase-3,-8,-9 活性 (peak 往右代表樣品的 Caspase-3,-8,-9 活性產生)。

六、細胞內分子螢光染色—TUNEL/DAPI 螢光染色法⁽⁸⁹⁾

1. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling) / DAPI (4-6-diamidino-2-phenyl indole) 染色

DNA 雙鏈斷裂或只要一條鏈上出現缺口而產生的一系列 DNA 的 3'-OH 末端可在脫氧核糖核酸末端轉移酶 (TdT) 的作用下，將脫氧核糖核酸和螢光素、過氧化物酶、鹼性磷酸化酶或生物 Living beings 素形成的衍生物 Living beings 標記到 DNA 的 3'-末端，從而可進行凋亡細胞的檢測，這類方法一般稱為脫氧核糖核酸末端轉移酶介導的缺口末端標記法 (TUNEL)。DAPI 是一種核酸螢光染劑，會專一性的結合在 DNA 雙螺旋之小溝上的 AT 區，當細胞產生凋亡時會有染色質皺縮、DNA 片段現象。因此當凋亡的現象越嚴重，DNA 斷裂越多，此時小溝上的 AT 區也會裸露出更多，使 DAPI 染劑染上結合更多，當在顯微鏡下觀察時，即可觀察到凋亡細胞所產生的螢光強度會比正常細胞來的強。

培養細胞之細胞數約 1×10^4 /well。將人類大腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 種於 6 well 培養盤中，培養 24 小時，給予 Cantharidin (20 μ M) 藥物，培養 24 小時，吸去上層液 (medium)，1X PBS 洗三次，加入 3% Formaldehyde / 1X PBS，固定 15 分鐘，吸掉 3% Formaldehyde，用 1X PBS 洗二次，加入 0.1% Triton X-100 / in 1X PBS (1 ml) 反應 15 分鐘，再用 1X PBS 洗二次，加入 In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL) 中提供的螢光染劑，在 37°C 下避光反應 60 分鐘後用 1X PBS 清洗細胞三次，再於避光環境加入加入 DAPI 染液 (1 μ g/1 ml) 約 300 μ l，在 37°C 避光 30 分鐘，吸掉染劑，用 1X PBS 洗三次，於倒立螢光顯微鏡 F = 200X

觀察細胞核與 DNA 斷裂之變化並照相。

七、 CDK1 / Cdc2 之活性分析⁽⁹⁰⁾

COLO 205 經 Cantharidin (20 μ M)處理 12-24 小時後離心收集細胞以 1X PBS 清洗三次將細胞加入 1ml sample buffer 後經超音波震碎細胞離心(10,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 1 小時)收上清液將含蛋白質之上清液 5 μ l 加 HCK-gel 20 μ l 於 4 $^{\circ}$ C 中反應 1 小時進行免疫沉澱後加入 5 μ l 10X CDK1 reaction buffer、5 μ l ATP (1mM)與 5 μ l biotinylated MV peptide 當受質於 30 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，再加入 200 μ l stop reagent 終止反應。然後離心(14,000 rpm, 15 秒)，將 100 μ l 的上清液移至經處理的 96-well 之培養皿中，於 25 $^{\circ}$ C 中避光反應 1 小時後，去上清液，以 1X PBS 清洗 5 次，再加入 100 μ l POD-streptavidin 於 25 $^{\circ}$ C 中避光反應 30 分鐘，以 1X PBS 清洗 5 次最後加入 POD substrate 於 25 $^{\circ}$ C 中避光反應 5 分鐘，用 ELISA reader 於波長 492 nm 下測吸光值。

八、 即時定量聚合酵素連鎖反應 (Real-time Polymerase Chain Reaction) (Real-time PCR) ⁽⁹¹⁾

係利用對雙股 DNA 具有特異性結合能力的螢光染料，加入 PCR 反應過程之中。利用螢光信號積累即時監測整個 PCR 反應過程，最後利用過程中的螢光信號及反應循環次數的數據，以數學計算分析得知未知標本的 DNA 的起始含量。每個標本的 Ct 值與該標本的起始拷貝數的

對數存在線性關係，起始拷貝數越多，Ct 值越小。

1. RNA 的萃取

收 COLO 205 細胞離心後打散，加入 REzol™ 使其搖晃均勻，待細胞完全溶解後，將其吸至 15ml 離心管中，室溫下靜置 5 分鐘。再加入 600 μ l 氯仿(chloroform)劇烈振盪 15 秒，在室溫下靜置 2 分鐘。將離心管在 4°C 12,000g 離心 15 分鐘。此時將 aqueous phase 0.5ml 吸至新的 1.7ml 離心管，再加入等量的 isopropanol 並溫和的混合，在室溫下靜置 10 分鐘後再於 4°C，12,000g 離心 10 分鐘。此時可見 RNA pellet 沉澱在離心管底部，小心地將上清液倒掉並加入 1ml 的 75%酒精，振盪 5 秒鐘再於 4°C，12,000g 離心 5 分鐘。

最後小心倒掉酒精，在室溫下風乾，再加入 20-100ml DEPC-H₂O 溶解 RNA，儲存於-80°C 冰箱。

利用 Gene Quant II (Pharmacia Biotech)測量 RNA 濃度及 A260/280 在 1.8~2.0 之間確保 RNA 的純度及品質。

2. 樣本螢光探針(probe)的製作⁽⁹²⁾

將加藥及控制組的 COLO 205 細胞株之 RNA 萃取出來後，各取 5 μ g 在 37°C 進行反轉錄以合成 cDNA。

先準備一個 0.6ml 的離心管，加入 10 μ l cDNA 及滅菌 2 次水 5 μ l，進行 Biotin 標記反應，將離心管加熱至 95°C，5 分鐘 denature DNA，然後馬上放冰上，然後加入 2 μ l 的 hexanucleotide mixture 及 2 μ l 的

biotin / dNTP mixture 和 1 μ l klenow enzyme (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 混合均勻並放入 37°C 水浴槽作用 20 小時。合成好的探針須放在 -20°C 保存。

4. Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 的分析

利用 LightCycler (Roche Applied science, Mannheim, Germany) 進行 Real-time PCR, 取 1 μ l 之 cDNA (約 50ng RNA), 加 1 μ l 之 LC Fast Start DNA Master SYBR Green Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 及 3-4mM MgCl₂ 和 0.5mM 待偵測基因 primers, 最後體積為 10 μ l。PCR 條件為 95°C, 5 秒, Anneal 溫度依 primer 而異, 時間為 5 秒, 最後 72°C (temperature ramp was 20 °C / sec), 8 秒, 進行 45 cycles。擴增產物的專一性由 Melting curve 來判定。以 GAPDH gene 當作 internal control 來校正相對的 mRNA concentrations, 為了要保證實驗的準確性及再現性, 在不同的時間點重覆實驗, Real-time PCR 之資料利用 LightCycler Software Version3.5 軟體內之 second derivative maximum method 來訂定 Ct, 最後再用 Δ Ct 方法來計算基因之表現量。

九、西方墨點法

1. 細胞總蛋白質的抽取⁽⁹³⁾

培養細胞之細胞數約 1×10^7 cells。將人類大腸直腸細胞癌細胞株(COLO 205)種於 75T 培養瓶中，培養 24 小時，給予 Cantharidin (20 μ M) 至培養液中，分別培養 6 小時、12 小時、18 小時、24 小時，分別以 trypin 處理，將細胞收集至離心管離心 1500 rpm、5 分鐘，離心後去除上清液，加入適量 1X PBS，將細胞收取下移至 1.5 ml 的 eppendorf tube，再離心一次，然後加入適量的 lysis buffer (pH 7.4 Tris-HCl 50 mM、EDTA 0.5 mM、EGTA 0.5 mM、5 μ g/ μ L Aprotinin 0.3% 2-Mercaptoethanol、0.2 mM PMSF、5 μ g/ μ l Leupeptin、)，置於 -80°C 冰箱放置 24 小時後，取出然後離心 12000 rpm、20 分鐘、4°C，取所有上清液此為總蛋白質，接著用 100°C 沸水煮 5~10 分鐘，即可置於 -20°C 冰箱保存備用，待所有時間點收齊再進行下面實驗。

2. 蛋白質定量

a. 檢量線的製作

以 Bradford 定量法，使用胎牛血清白蛋白(Bovine serum albumin; BSA)做為蛋白質標準品，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 O.D. 570 nm 測定蛋白質標準品吸光平均值來做檢量線 (standard

curve)，以計算蛋白質濃度，並求出趨勢線方程式及 r^2 值。

先取 Bradford reagent 染劑適量備用。取適量已配製好的標準品 (BSA 1mg/ml) 加等量的二次水調配最終濃度梯度為 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0 mg/ml，各取 10 μ l 加 100 μ l Bradford reagent 混合均勻，置於 96 well plate 中 (二重複)，靜置 5 分鐘後以 O.D. 570 nm 測量吸光值，測得標準品之吸光平均值，以 O.D. value (Y) 對蛋白質濃度 μ g/ml (X)，求出趨勢線方程式 $y=ax+b$ ， r^2 值趨近於 0.99。

b. 樣品定量

將待測蛋白稀釋 10 倍，取 10 μ l 已配製好的待測蛋白質加 100 μ l Bradford reagent 混和均勻，置於 96 well plate 中 (二重複)，靜置 5 分鐘後以 O.D. 570 nm 測量吸光值，所測得的 O.D. value (Y)，帶入趨勢線方程式 $y=ax+b$ ，求出該待測蛋白的蛋白質濃度 (μ g/ml)。

3. SDS-PAGE 凝膠電泳

a. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳：

電泳法是利用外加電場，對溶液中的帶電分子造成影響而使這些分子移動，進而分離不同分子量的蛋白質。先配製下層膠，然後注入膠台，緩緩用二次水去除氣泡並壓平下層膠的上緣，靜置一段時間待膠體凝固，二次水倒掉。隨後，配製上層膠並注入膠台後小心地插入

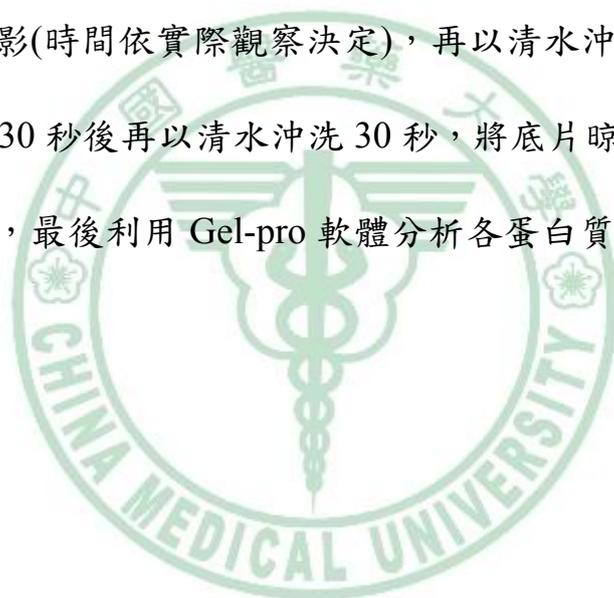
樣品槽梳子(comb)到未凝固的膠體中，避免氣泡產生。靜置一段時間，上層膠凝固後。將鑄好的膠體放入電泳槽中，加入電泳緩衝液 (Running buffer)，然後小心拔出樣品槽梳子。做好的膠體先以 110 V、預跑 20 分鐘。將抽取好的蛋白質先 denature 然後與 4 倍 protein loading dye 混合 (蛋白質濃度約為 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。取 5 μl 分子量標準品 (maker)和配製好的蛋白(30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)由左至右分別 loading 到槽中。以 90 V 開始電泳。

4. 轉漬 (Transfer)

電泳結束後，取下膠片將其放在 Gel transfer device 轉漬到 PVDF 膜上。然後取下 PVDF 膜用 5%脫脂牛奶 blocking 1 小時。然後置換一級抗體(溶於 5% 脫脂牛奶 in 0.05% Tween 20 in 1X PBS 中)，放在 4 °C 冰箱中 overnight。隔天取出 PVDF 膜後置於小盒中以 0.05% Tween 20 in 1X PBS 清洗 5 分鐘共 3 次。加入二級抗體溶於 5% 脫脂牛奶 in 0.05% Tween 20 in 1X PBS 中，震盪 1 小時，再取出 PVDF 膜後以 0.05% Tween 20 in 1X PBS 於小盒中清洗 5 分鐘共 3 次，即可入暗房壓片。

5. 壓片步驟：(暗房中進行)

將 ECL 試劑之混合液(每瓶各取適量等比例混合)均勻滴在 PVDF 膜上反應約一分鐘。壓片卡匣(Cassette)內先以投影片剪成兩半，再用膠帶黏合成卡片形式，PVDF 膜正面朝上、marker 放左邊置於壓片卡匣(Cassette)內。以 Hyperfilm 軟片(柯達)進行壓片，感光時間依 PVDF 膜上螢光亮度決定時間長短，約 5 秒至數小時不等。感光完成後放入顯影劑進行顯影(時間依實際觀察決定)，再以清水沖洗 30 秒後放入定影劑中，過 30 秒後再以清水沖洗 30 秒，將底片晾乾，最後在掃描到電腦中存檔，最後利用 Gel-pro 軟體分析各蛋白質的表現量。



第三節 統計方法

實驗數據結果採用 SPSS 電腦統計套裝軟體中之變異數分析 (one-way-ANOVA) 進行統計分析，以平均值標準差(mean ± 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 $p < 0.05$ 表示具統計學上有差異意義，以”*”代表。



第三章 研究結果

第一節 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞 (COLO 205) 細胞型態的影響

COLO 205細胞給予濃度20 μ M Cantharidin各培養24、48小時後，利用倒立式顯微鏡觀察細胞型態的變化(圖 十五)。結果可發現細胞於第24小時，其細胞型態皺縮不規則化，且伴隨有凋亡小體的產生。而在第48小時觀察發現皺縮不規則化狀況更加明顯，而且細胞質空泡化、有凋亡小體的產生、細胞數目明顯減少。結果推論Cantharidin會抑制COLO 205細胞增殖且有細胞凋亡的現象。

第二節 探討 Canthaeridin 對人類結腸直腸癌細胞存活率的影響

將人類結腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 加入不同濃度的 Cantharidin (濃度皆為 5、10、20、40 μM)。分別培養 24、48、72 小時之後，以 MTT assay 測試 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞存活率的影響，並利用 ELISA 分析。發現隨著 Cantharidin 的濃度增加 (5-40 μM) 及藥物處理的時間增長，人類大腸直腸癌細胞死亡越顯著，存活率下降(圖 十六)。在第 24 小時 Cantharidin 於不同濃度的抑制情形來看，可發現其有劑量依存的情形，劑量越高細胞死亡越多，抑制生長越明顯(圖 十七)。依分析統計計算出 Cantharidin 的 IC_{50} 為 20.53 μM 。依 Cantharidin 20 μM ，培養 24-96 小時，可發現細胞與藥物接觸時間越長，其細胞死亡越多，抑制其生長越明顯，具時間依存性關係(圖 十八)。結果推論 Cantharidin 對 COLO 205 細胞存活率影響具劑量及時間依存性的抑制。

第三節 探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞之細胞週期 G2/M 與 Sub-G1 及相關蛋白質的影響

由上述細胞存活率的結果得知 Cantharidin 具有抑制人類大腸直腸癌細胞 (COLO 205) 增殖之作用，在型態學上觀察有細胞凋亡的情形。細胞的生長及 DNA 的合成與否跟細胞週期有很大的關係性。因此利用 PI 核酸染劑將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀檢測各週期 DNA 含量，可知細胞滯留時期。

於人類大腸直腸癌細胞株 (COLO 205) 加入 Cantharidin(濃度 20 μ M)。分別培養 12、24、48 小時，以流式細胞儀檢測其細胞週期。發現隨著時間增加，G2/M 期百分比上升，sub-G1(Apo)亦上升。COLO 205 經 Cantharidin 處理，細胞週期停滯在 G2/M 期且有細胞凋亡的現象(圖 十九)。將細胞週期的分佈以百分比表示，可發現 COLO 205 經 Cantharidin 處理後，apoptosis(藍色)所佔的比例隨著藥物處理時間越長而增加，G2/M 期亦有增加之趨勢，而 G0/G1 期與 S 期所佔的比例則降低，由此可看出細胞經藥物處理後，COLO 205 的細胞週期停滯於 G2/M 期並誘導細胞凋亡(圖 二十)。

因此以 Cantharidin 處理 colo 205 細胞，並以 Western blotting 觀察和 G2/M 期相關蛋白質變化。colo 205 經 Cantharidin 處理 6-24 小時

後，CDK1、cyclin B 先增加(第 6 小時)後減少(圖 二十二)， cyclin A 亦降低，同時 CDK1 活性試驗偵測到 CDK1 的活性也降低(圖 二十一)。負向調節 cyclin B、CDK1 活性的蛋白質 Chk1 與 p21 的量，則隨藥物處理時間增長而增加(圖 二十三)。結果推論 Cantharidin 影響 COLO 205 細胞週期停滯在 G2/M 期。



第四節 探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞誘導細胞凋亡的影響

一、 Annexin-V 染色

COLO 205 細胞給予濃度 20 μ M Cantharidin 培養 24-48 小時後，利用倒立式顯微鏡觀察細胞型態的變化，發現給藥處理後細胞形狀有皺縮的現象，並伴隨有凋亡小體的產生。為要證明 Cantharidin 誘導 COLO 205 細胞凋亡，利用 Annexin-V-FITC 檢測細胞膜內的 phosphatidylserine (PS) 外翻到細胞膜外側表面的早期凋亡現象。在經藥物處理 6-12 小時，發現 phosphatidylserine 被染色的凋亡族群比例有明顯的增加，由 23.65% (6 小時) 增加到 44.22% (12 小時)(圖二十四)。結果推論 COLO 205 有細胞凋亡早期現象。

二、 TUNEL/DAPI 染色檢測細胞凋亡

由上述結果知細胞有早期細胞凋亡的現象，因此利用 TUNEL/DAPI 染色及倒立螢光顯微鏡觀察 DNA 斷裂及細胞核濃集現象。COLO 205 細胞給予濃度 20 μ M 的 Cantharidin 培養 24 小時後，收集細胞以 TUNEL/DAPI 染劑將細胞染色，利用倒立螢光顯微鏡，

觀察螢光強度。在螢光顯微鏡下觀察，與對照組比較，經 Cantharidint 處理過的細胞，可發現螢光強度有增加的現象，綠/白色螢光明顯比控制組亮，結果顯示細胞核內染色質有凝聚與細胞核濃縮及 DNA 斷裂現象（圖 二十五）。



第五節 Cantharidin 誘導人類結腸直腸癌細胞的細胞 凋亡之路徑探討

一、 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞粒線體膜電位之 影響

在細胞凋亡的過程中若是受粒線體途徑影響，則粒線體的膜電位會下降或粒線體會產生大量氧化自由基(ROS)，同時粒線體會釋放 cytochrome *c* 至細胞質中。因此利用 DiOC6 與 DCFDA 螢光染色，再以流式細胞儀分析粒線體膜電位的改變與氧化自由基產生情形。本實驗以 20 μ M 濃度之 Cantharidin，投予 COLO 205 細胞培養 3、6、12 小時後收集細胞，加入 DiOC6 染劑，利用流式細胞儀分析粒線體膜電位是否改變。結果顯示隨著藥物處理時間越久，peak 越往左移(圖 二十六)，粒線體膜電位下降越多。藥物處理時間越久，粒線體膜電位下降越明顯，在藥物處理 3 小時即與控制組(0 小時)有統計上的差異 ($p < 0.05$)，處理 6-12 小時亦有明顯差異 ($p < 0.001$)(圖 二十七)。結果顯示 cantharidin 會影響 COLO 205 細胞粒線體膜電位下降，顯示在細胞凋亡過程中會受粒線體途徑影響。

二、探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞產生活性氧化物 (ROS) 之影響

在產生活性氧化物方面，以 20 μ M 濃度之 Cantharidin，培養 3、6、12 小時後收集細胞，以流式細胞儀檢測染有 H₂DCF-DA 之 COLO 205 細胞，其 ROS 含量，結果發現隨著 Cantharidin 處理時間越久，其 peak 越往右移，ROS 含量越高(圖 二十八)。在藥物處理 3 小時 ROS 即有明顯增多(圖 二十九)，與藥物接觸的時間越久，則 ROS 含量越多。蒐集 Cantharidin 處理 6-24 小時後的 COLO 205 細胞萃取蛋白質經 Western blot 測試，其細胞質 cytochrome *c* 蛋白質量有顯著的增加(圖 三十)。

另外 COLO 205 分三組分別給與 Cantharidin、ROS 的抑制劑 NAS 及 Cantharidin + NAS 處理 24 小時，再以流式細胞儀檢測，發現只用 Cantharidine 處理的細胞 ROS 增加許多，而只用 NAS 處理其 ROS 的量和對照組差不多，而 Cantharidin + NAS 處理的細胞其 ROS 的量只有上升一些，與 Cantharidine 處理細胞的 ROS 量有明顯的差異(圖 三十一)。

依上述分組法以 MTT assay 來看細胞存活率可發現只用 Cantharidine 處理的細胞存活率下降許多，而只用 NAS 處理其細胞存

活率和對照組差不多，而 Cantharidin + NAS 處理的細胞其存活率亦和對照組差不多，與 Cantharidine 處理的細胞其存活率有明顯的差異 (圖 三十二)。

綜合上述，cantharidin 會使 COLO 205 細胞的粒線體膜電位下降、ROS 大量產生及細胞質 cytochrome *c* 蛋白質量增加，推論 Cantharidin 誘導 COLO 205 細胞凋亡可能與粒線體路徑有關。另外給與 ROS 抑制劑後，發現 ROS 的量和細胞存活率較不受 Cantharidin 影響，由此可推論 Cantharidin 影響細胞粒線體釋放 ROS 而導致細胞死亡。



第六節 探討 Cantharidin 對人類結腸直腸癌細胞其細胞凋亡路徑相關蛋白表現之變化

細胞凋亡有許多路徑，本研究中我們觀察到 Cantharidin 會誘導細胞粒線體膜電位下降及 ROS 增加，因此近一步以 Western blotting 分析粒線體凋亡途徑相關蛋白表現。此外亦探討細胞死亡受體路徑相關蛋白質表現，觀察其是否為影響細胞凋亡之原因。

COLO 205 細胞經 Cantharidin (20 μ M)處理 6-24 小時，以 Western blot 觀察相關蛋白質表現，發現 cytochrome *c* 增加，Pro-caspase-9、caspase-3 降低(圖 三十)。 Fas/CD95 蛋白質表現量增加而 Pro-caspase-8 則降低(圖 三十四)。

近一步來看 Caspase-3,-8,-9 活性之分析，以 20 μ M 之 Cantharidin，投予 COLO 205 細胞培養 24 小時後收集細胞，加入 PhiPhLux[®]-G₁D₂ 染劑，利用流式細胞儀分析 Caspase-3,-8,-9 活性測試。結果顯示(圖 三十三)，以 20 μ M 濃度之 Cantharidin 處理 COLO 205 細胞經藥物處理過的實驗組其 Caspase-8、Caspase-9 及 Caspase-3 的活性明顯的大於對照組且有統計上的差異($p < 0.001$)(圖 三十三)且 Cas-8 的活性大於 Cas-9 的活性，以 Real Time PCR 來測定其細胞凋亡的基因表現，觀察 AIF、Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 的 mRNA 的表現量，經

Cantharidin 處理過的 COLO 205 細胞，其 AIF、Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 的 mRNA 的表現量均高於對照組(圖 三十六)且有明顯的差異。

而 Bcl-2 家族蛋白質的變化，可發現 Bad 和 Bax 隨藥物處理越久其蛋白質表現量增加，而 Bcl-2 蛋白質量減少(圖 三十五)因此推論 Bad、Bax 及 Bcl-2 參與 Cantharidin 誘導 COLO 205 細胞凋亡。

綜合以上結果我們推論 Cantharidin 是透過死亡受體路徑、caspase 及 Bcl-2 家族蛋白質、粒線體路徑及非經由上述兩種路徑，可能誘發 AIF 表現誘導細胞凋亡。



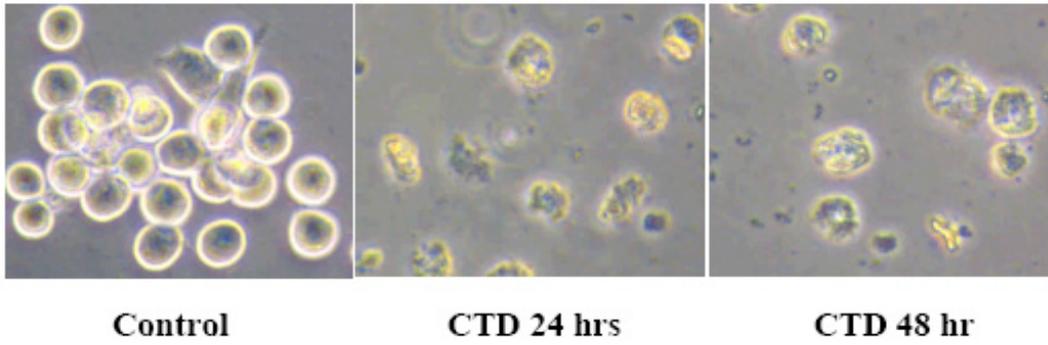


圖 十五 Cantharidin 對 COLO 205 細胞 24 及 48 小時的形態變化。

顯微觀察倍數 200X。



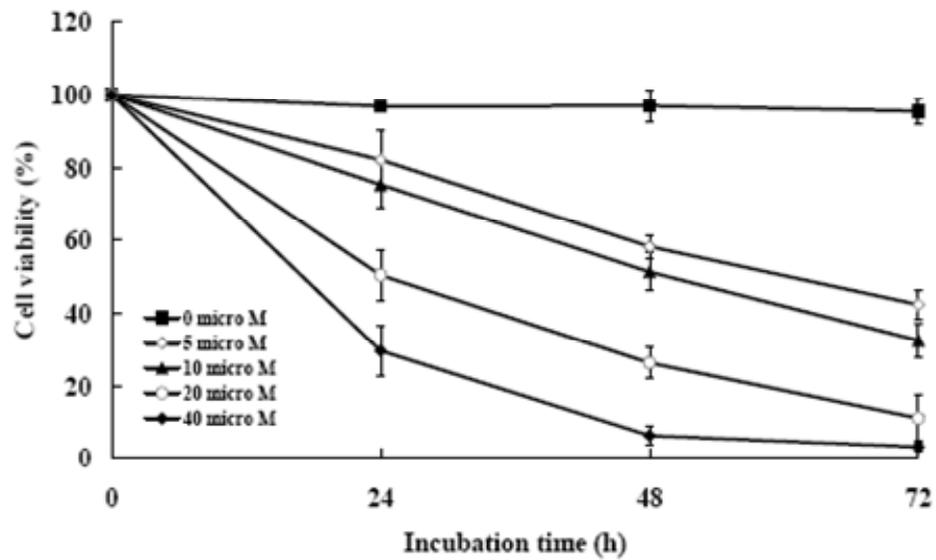


圖 十六 Cantharidin 對 COLO 205 細胞存活率之影響。 COLO 205 經 CTD 處理 24 至 72 小時，以 MTT assay 檢測細胞存活率，細胞存活率以 CTD 處理組與對照組於 570 nm 波長之吸光值百分比計算，並以平均值±標準差來表示(取樣數目為不同三重覆實驗)。

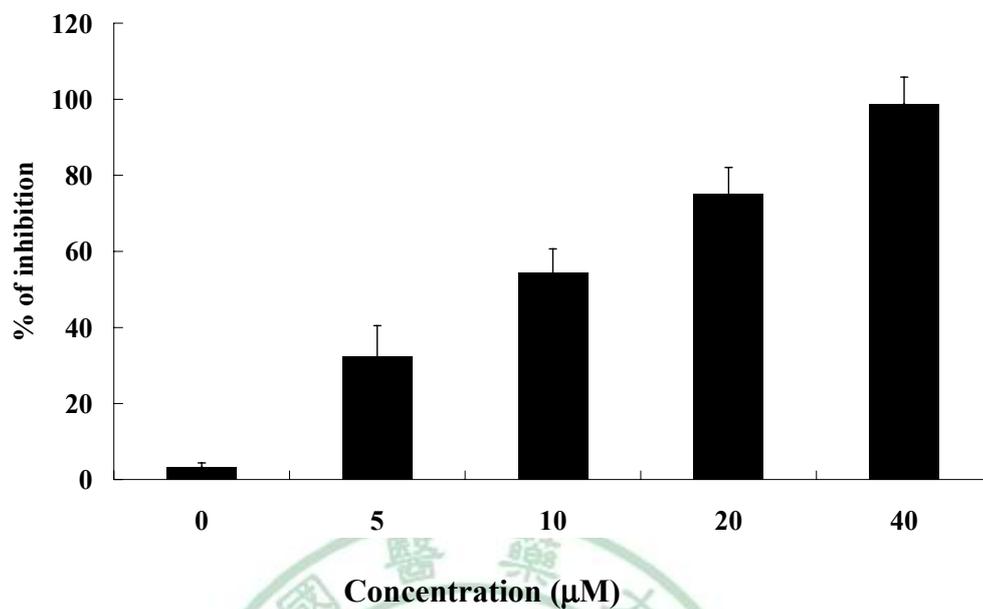


圖 十七 Cantharidin 對 COLO 205 細胞存活率抑制之影響。COLO 205 經 Cantharidin 5-40 μM 處理 24 小時，以 MTT assay 檢測細胞存活率，細胞存活率以 Cantharidin 處理組與對照組於 570 nm 波長之吸光值百分比計算。

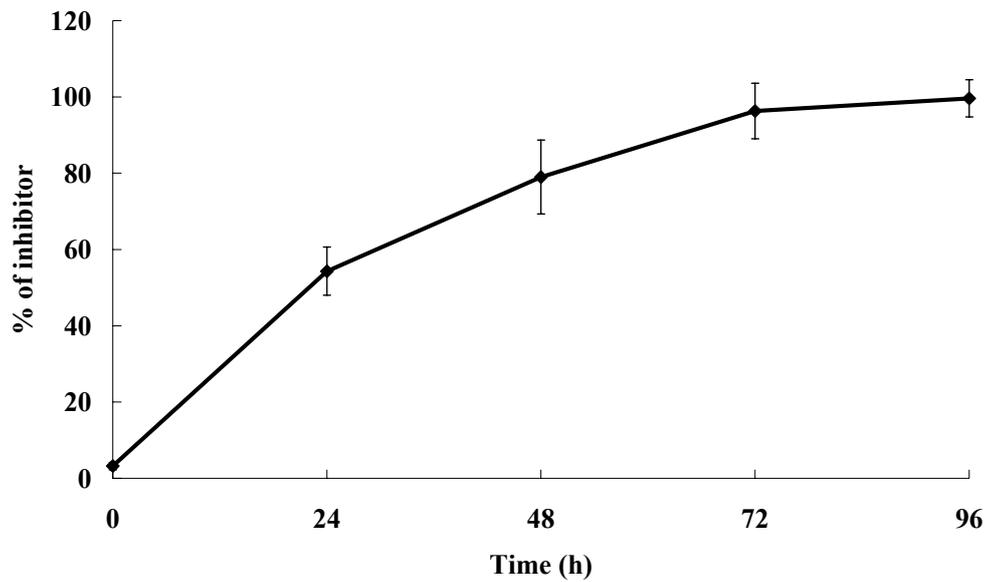


圖 十八 Cantharidin 對 COLO 205 細胞存活率抑制之影響。COLO 205 經 Cantharidin (20 μ M)處理 24 至 96 小時，以 MTT assay 檢測細胞存活率，細胞存活率以 Cantharidin 處理組與對照組於 570 nm 波長之吸光值百分比計算。

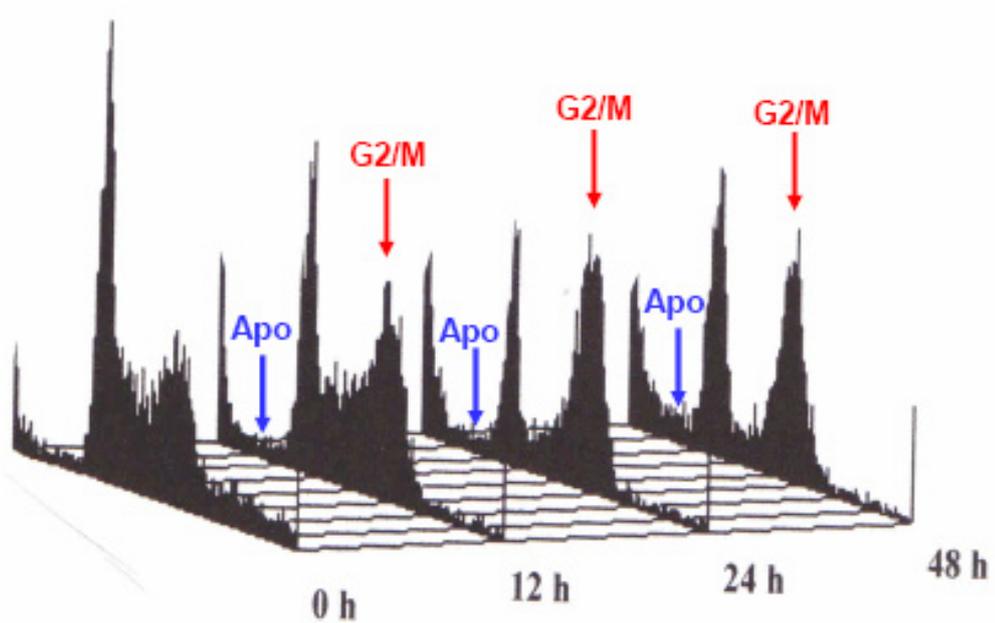
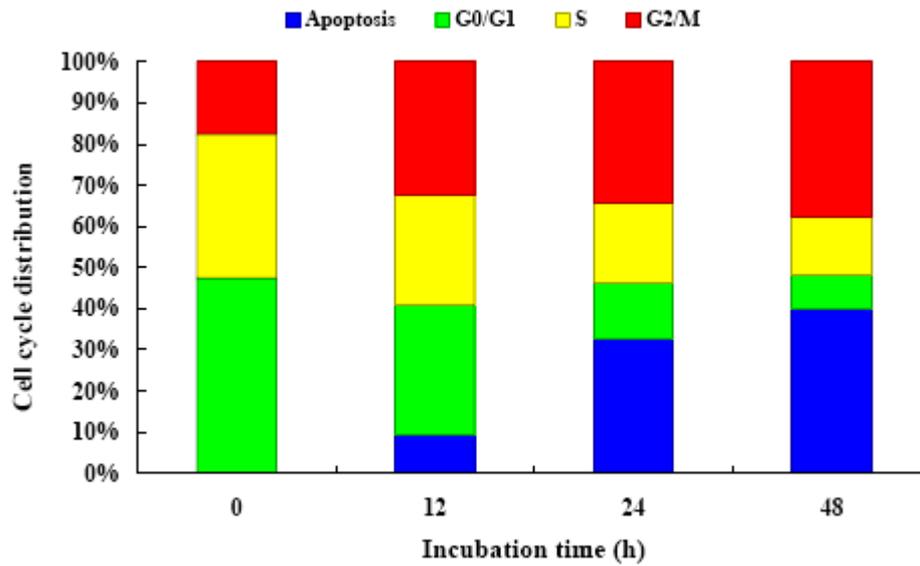
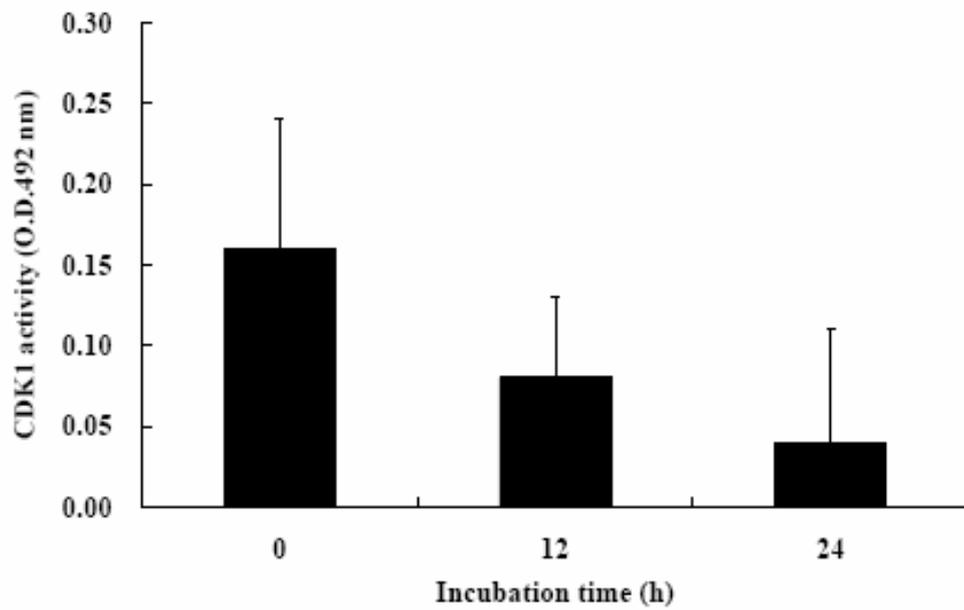


圖 十九 Cantharidin 對細胞週期之影響。Cantharidin 處理不同時間之細胞週期變化，以 PI 染色後經流式細胞儀分析。Apo 為不成套染色體的細胞族群(sub-G1)。取樣數目為不同三重覆實驗。



圖二十 Cantharidin 對 COLO 205 細胞之細胞週期影響。COLO 205 於不同時間點經 Cantharidin 處理後，以 PI 染色及流式細胞儀分析細胞週期之變化。



圖二十一 Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 G2/M 期相關蛋白質表現量與活性影響。Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 CDK1 活性的檢測。

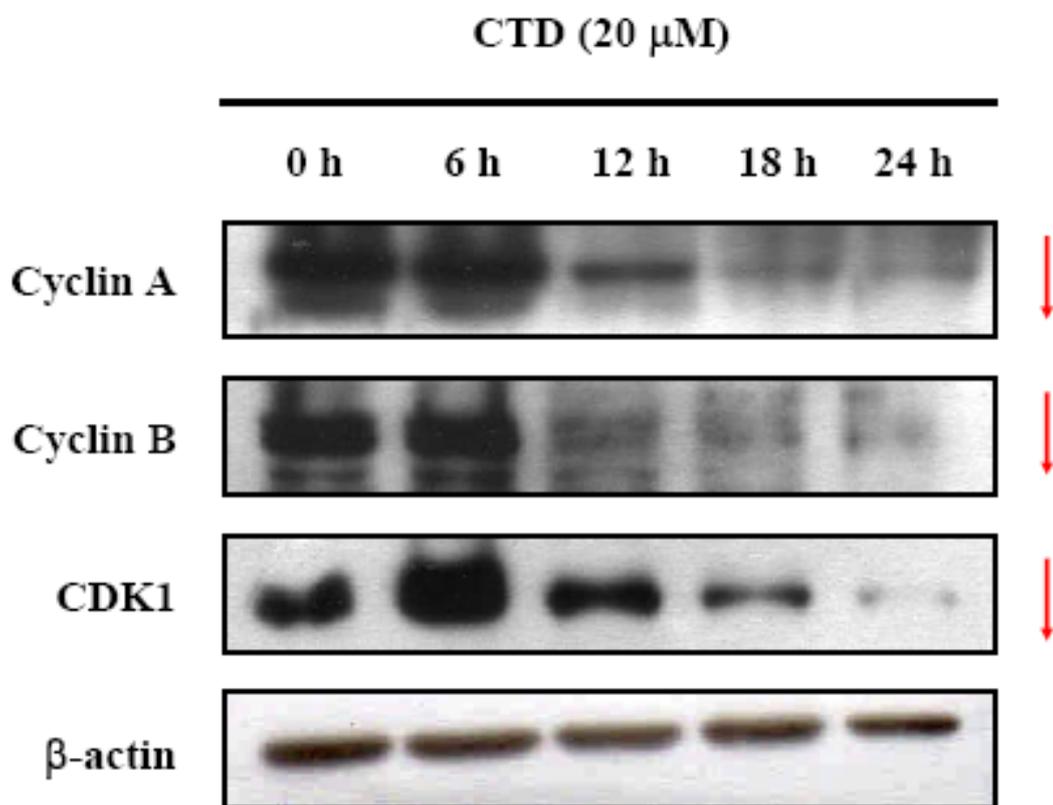
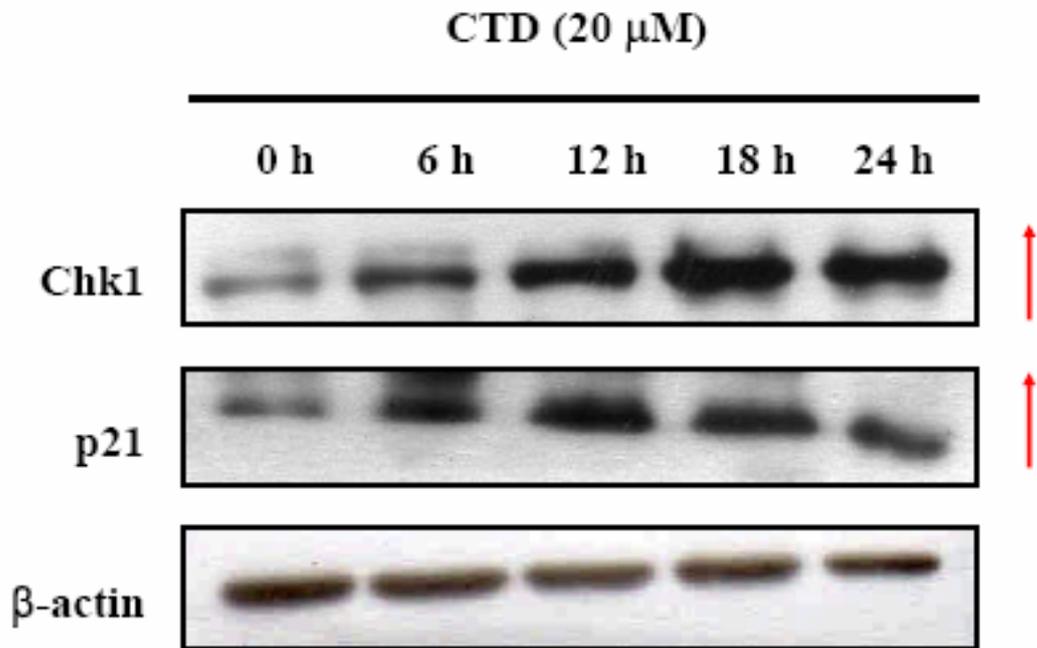


圖 二十二 Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 G2/M 期相關蛋白質表現量與活性影響。以 Western blot 分析細胞內 Cyclin A、Cyclin B 與 CDK1 的表現 (β -actin 為 internal control)。



圖二十三 Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 G2/M 期相關蛋白質表現量與活性影響。以 Western blot 分析細胞內 Chk1 與 P21 的表現 (β -actin 為 internal control)。

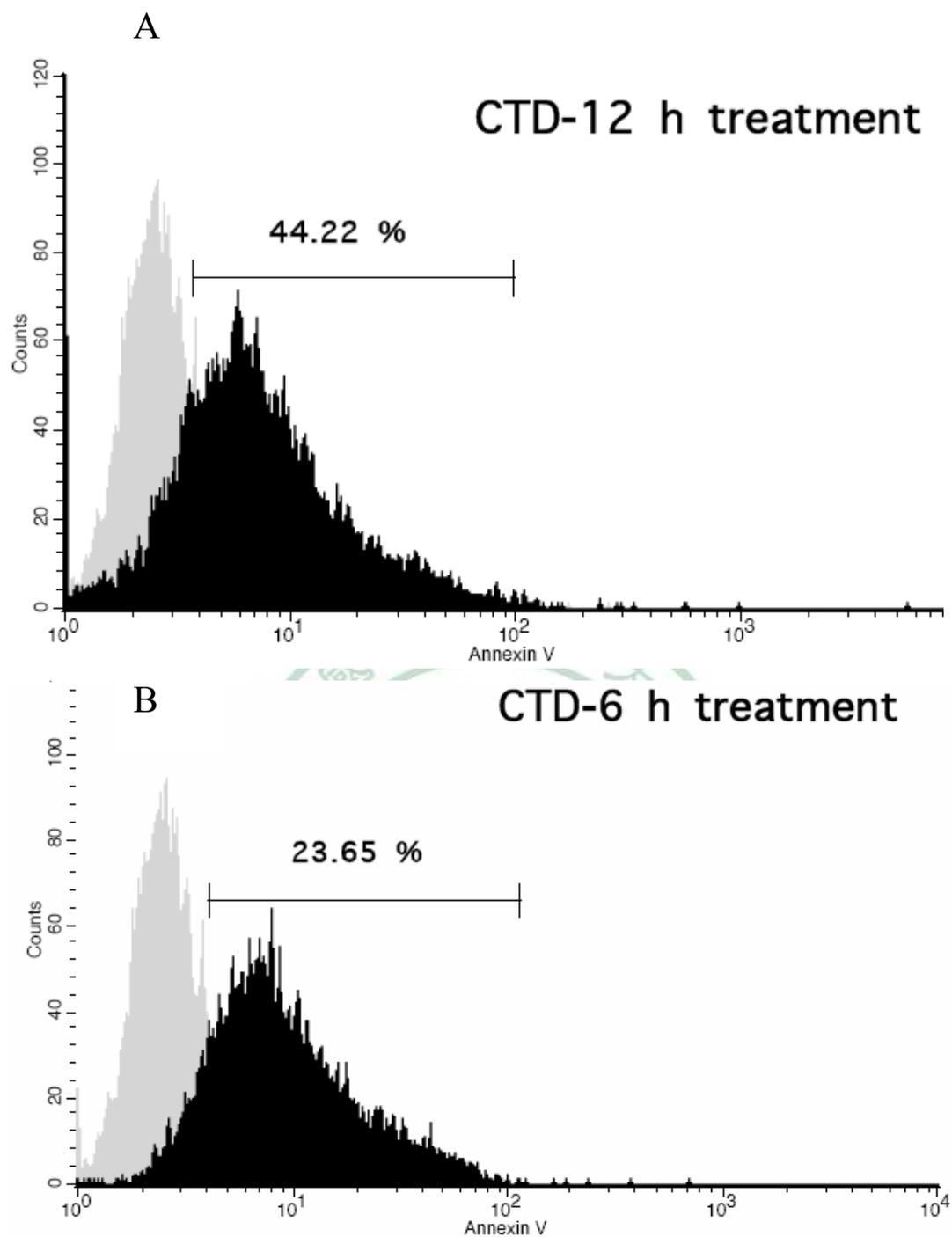


圖 二十四 Cantharidin 對 COLO 205 細胞膜之 phosphatidylserine 外翻的影響。COLO 205 細胞以 Cantharidin 處理 6-12 小時以後，以 Annexin-V-FITC 染色，並以流式細胞儀分析細胞膜上 phosphatidylserine 外翻之情形。

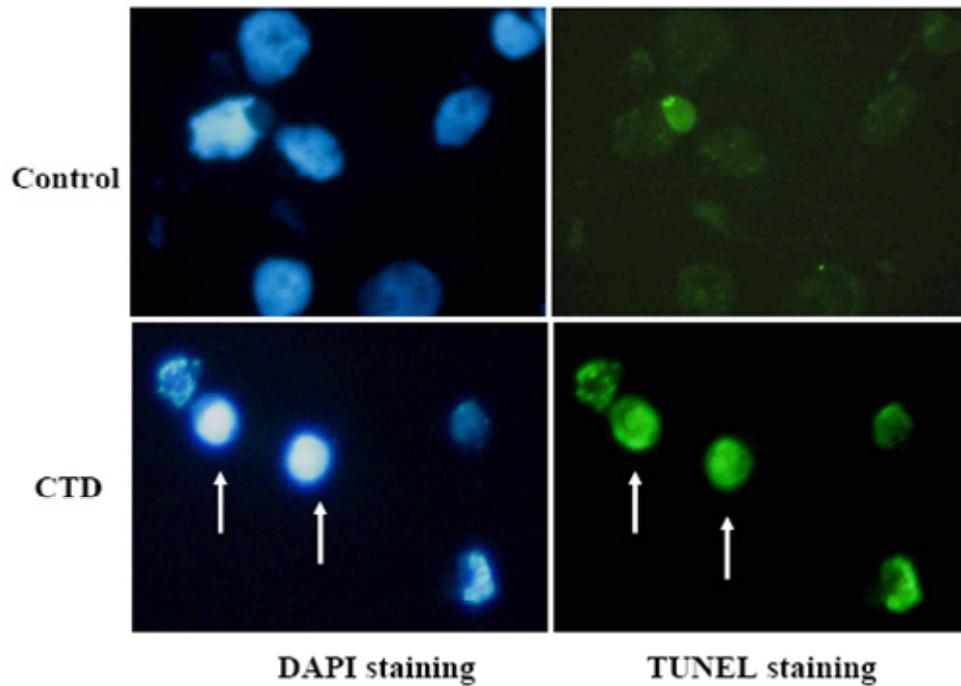


圖 二十五 Cantharidin 誘導 COLO 205 細胞 DNA 斷裂之情形。COLO 205 細胞以 Cantharidin 處理 24 小時後用 TUNEL/DAPI 雙染色，並以螢光顯微鏡觀察細胞內 DNA 斷裂與細胞核濃縮之情形，白色箭頭為 DNA 斷裂的凋亡細胞，顯微觀察倍數 600X。

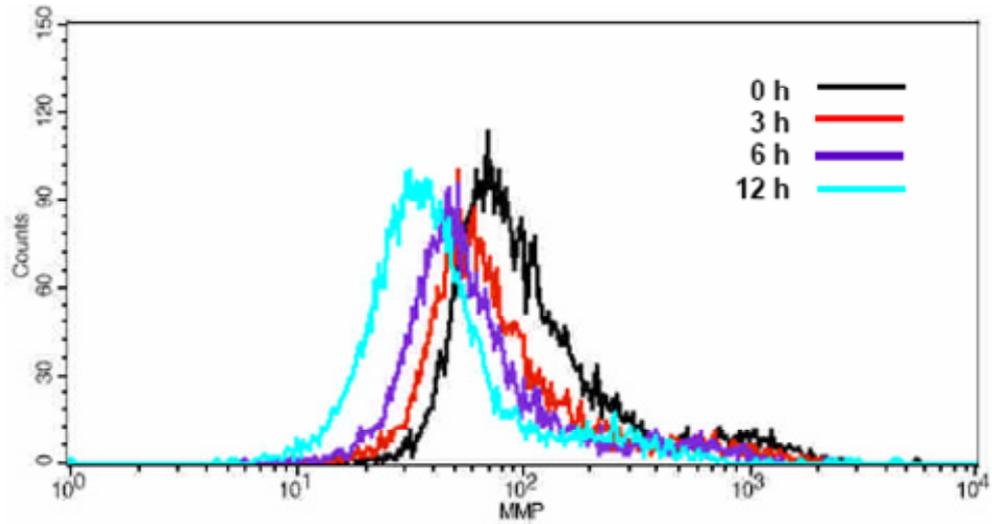


圖 二十六 Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體膜電位的影響。
COLO 205 經 Cantharidin 處理 3-12 小時，以 DiOC6 染色，經流式細胞儀分析粒線體膜電位改變。

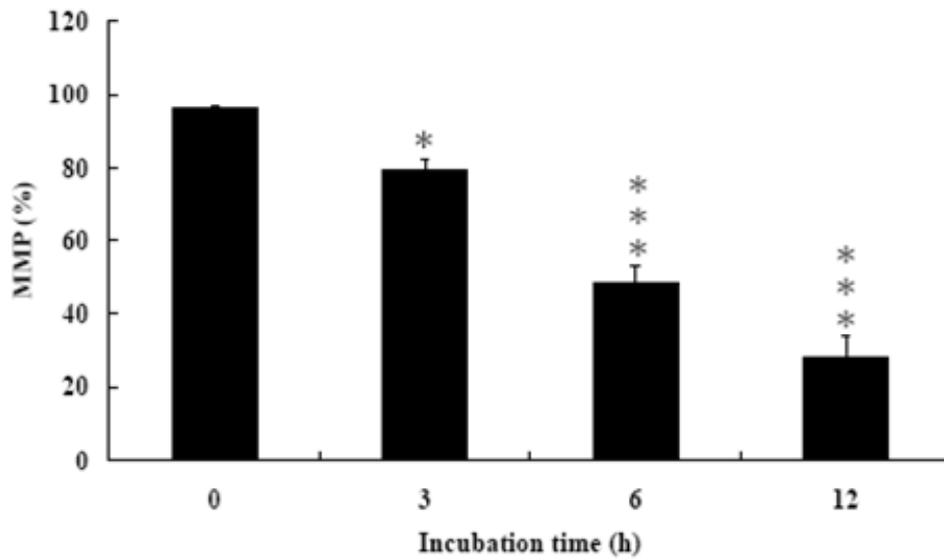
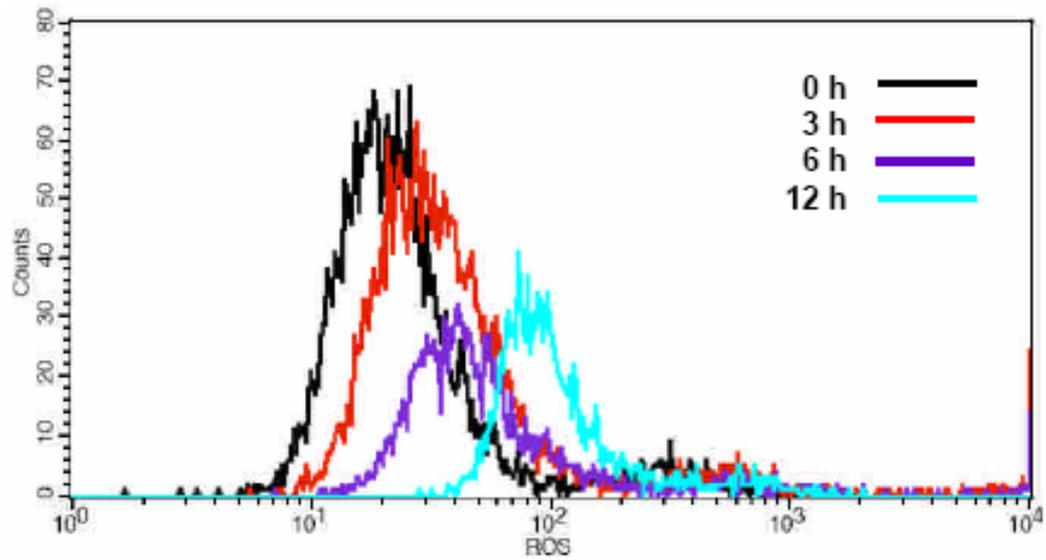


圖 二十七 Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體膜電位 (MMP) 百分比。COLO 205 經 Cantharidin 處理 3-12 小時，以 DiOC6 染色，經流式細胞儀分析，粒線體膜電位有明顯的下降。



圖二十八 Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體活性氧化物(ROS) 的影響。COLO 205 經 Cantharidin 處理 3-12 小時，以 DCFDA 染色， 經流式細胞儀分析粒線體 ROS 之變化。

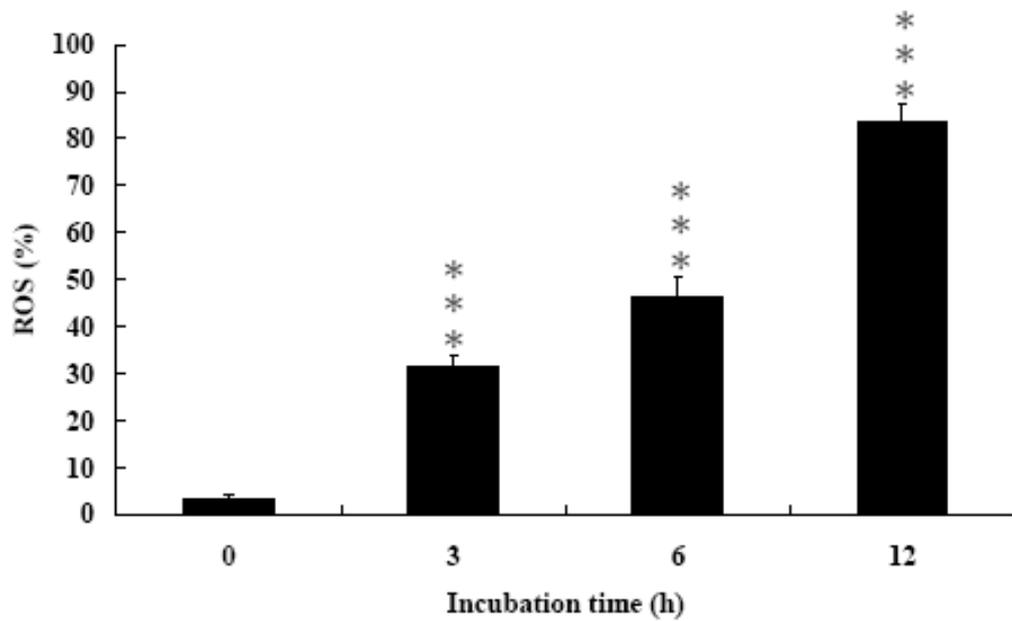
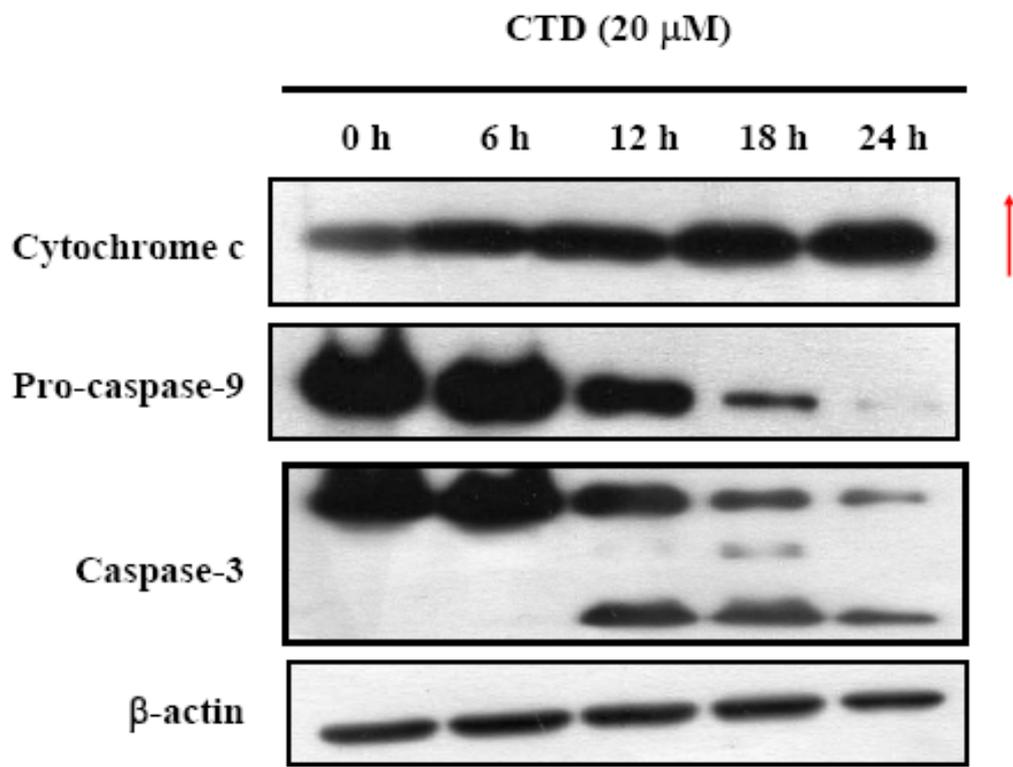


圖 二十九 Cantharidin 對 COLO 205 細胞粒線體活性氧化物 (ROS) 增加百分比。COLO 205 經 Cantharidin 處理 3-12 小時，以 DCFDA 染色，經流式細胞儀分析，粒線體 ROS 明顯的增加。



圖三十 Cantharidin 對 COLO 205 細胞之 cytochrome *c* 蛋白質表現量的影響。細胞經 Cantharidin 處理 6-24 小時，以 Western blot 分析細胞內 cytochrome *c*、procaspase-9 與 caspase-3 的表現 (β -actin 為 internal control)。

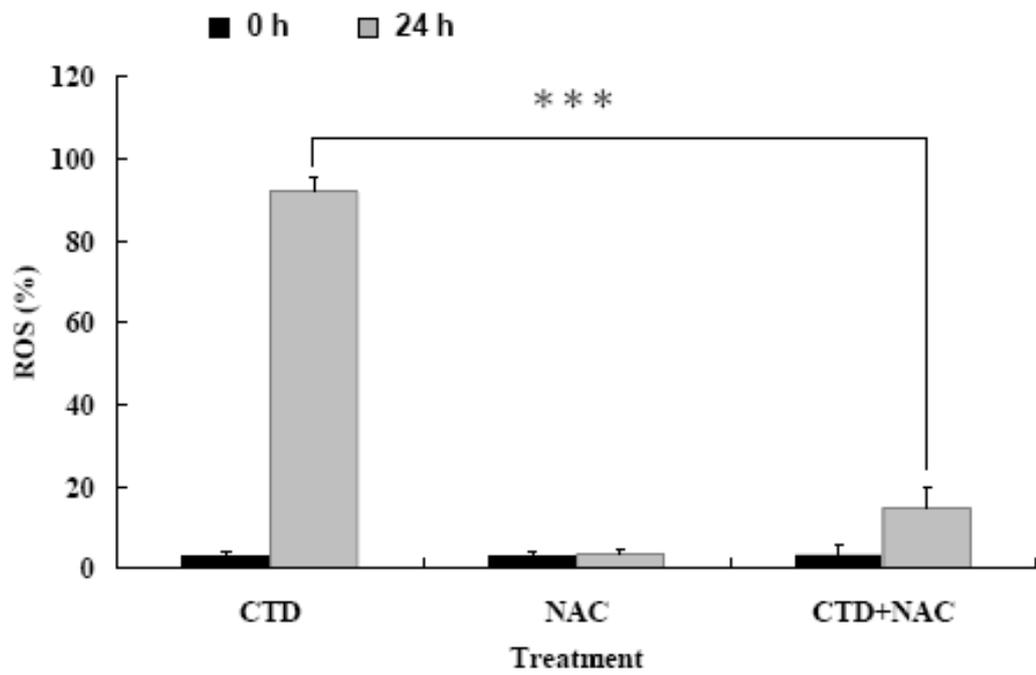


圖 三十一 Cantharidin 及 NAC 對 COLO 205 細胞粒線體活性氧化物 (ROS) 的影響。COLO 205 分三組各經 CTD、NAC、CTD + NAC 處理 24 小時，以 DCFDA 染色，經流式細胞儀分析粒線體 ROS 的變化。

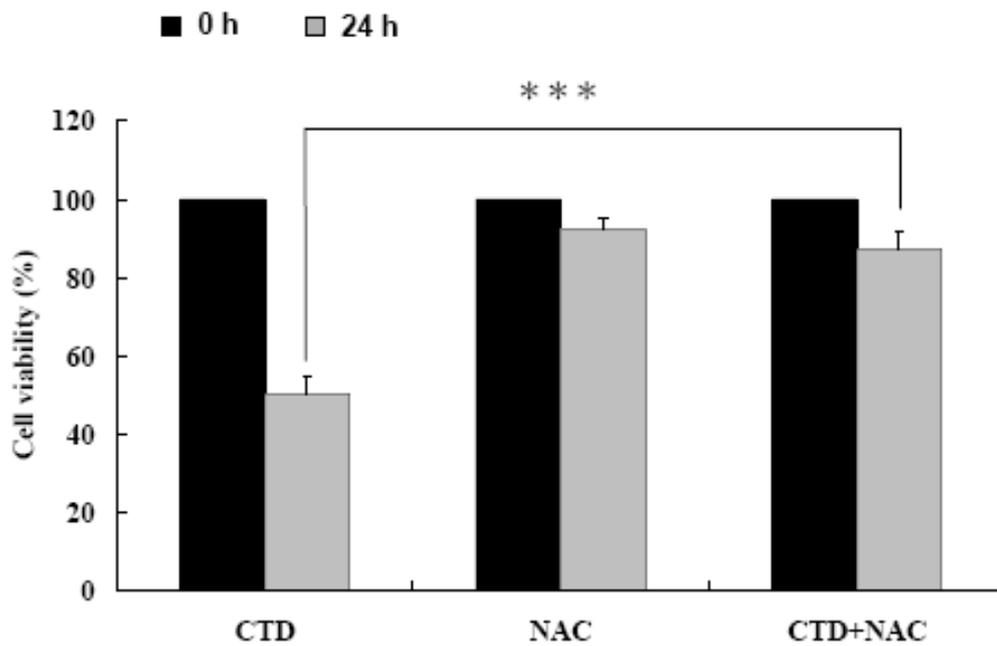


圖 三十二 Cantharidin 及 NAS 對 COLO 205 細胞存活率的影響。
 COLO 205 分三組各經 CTD、NAC、CTD + NAC 處理 24 小時，以
 PI 染色經流式細胞儀分析存活率影響。

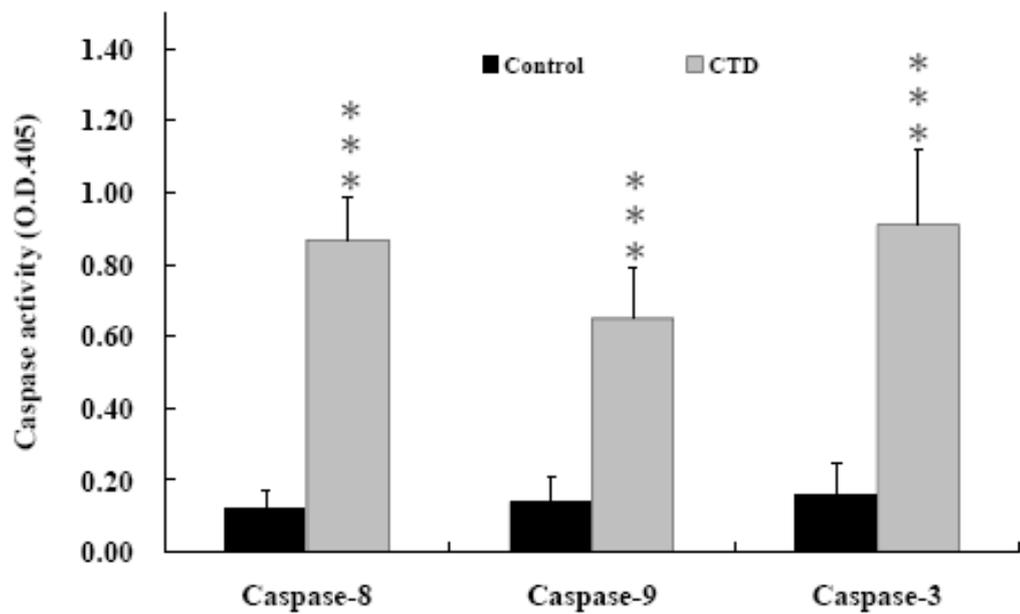


圖 三十三 Caspase 活性檢測分析。Cantharidin 對 COLO 205 細胞處理 24 小時後 caspase-8、caspase-9 與 caspase-3 活化態的變化。

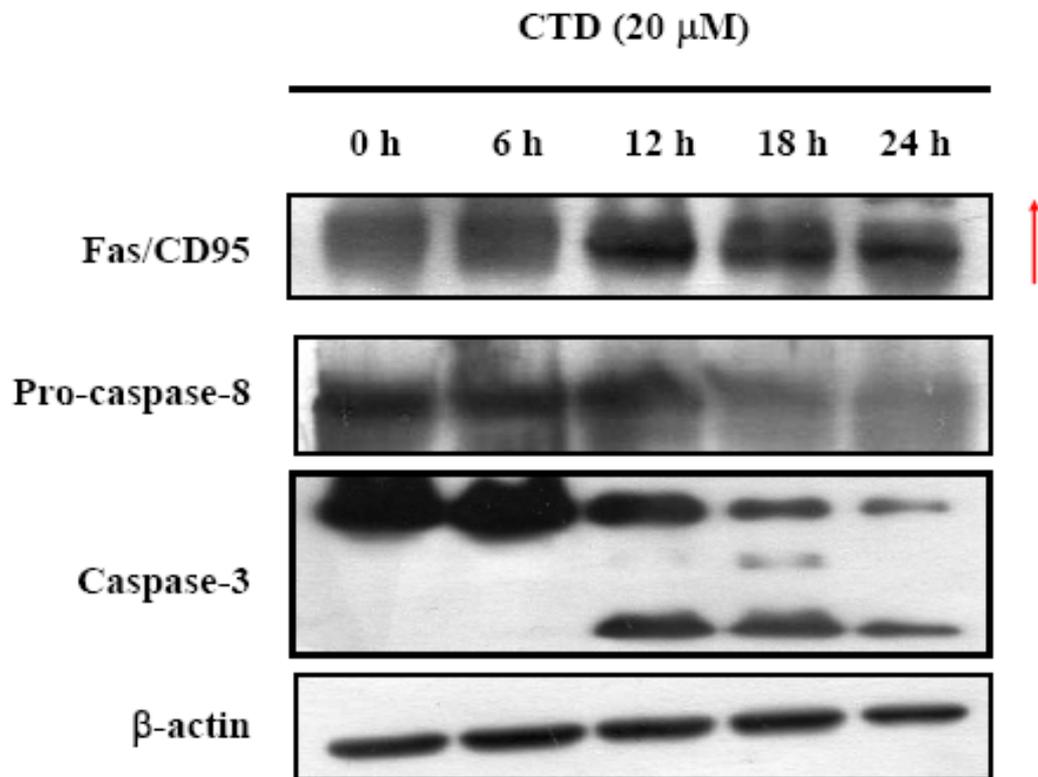


圖 三十四 Cantharidin 誘導 Fas 蛋白質之變化。COLO 205 細胞經 Cantharidin 處理不同時間點以後以 Western blot 檢測 Fas、pro-caspase-8 與 caspase-3 蛋白質之變化(β -actin 為 internal control)。

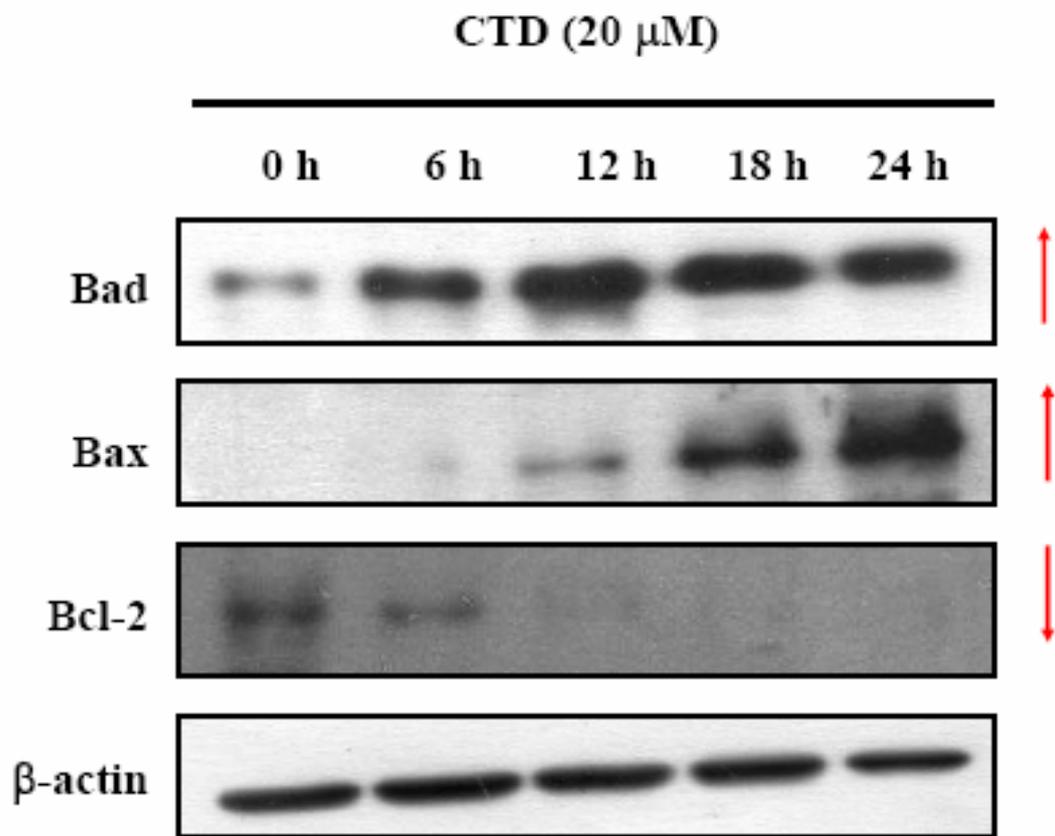


圖 三十五 Cantharidin 誘導 Bcl-2 蛋白質家族之變化。COLO 205 細胞經 Cantharidin 處理不同時間點以後以 Western blot 檢測 Bcl-2, Bad 與 Bax 蛋白質之變化。

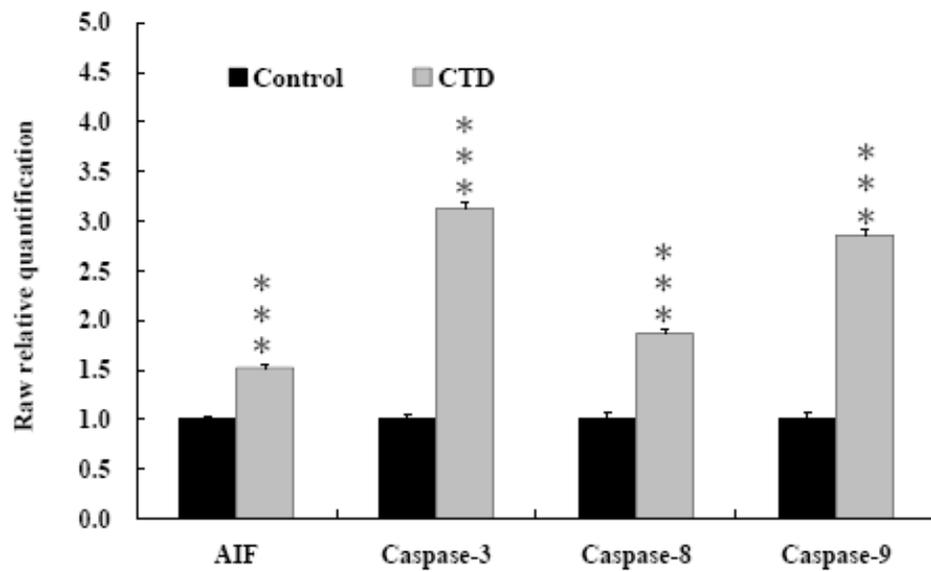


圖 三十六 利用 Real-Time PCR 評估 AIF、Caspase-3、-8、-9 mRNA 變化。以 Real-Time PCR 評估 Cantharidin (20 μ M) 處理 COLO 205 細胞株在第 24 小時之 AIF、Caspase-3、-8、-9 實驗組和對照組的 mRNA 變化。

第四章 討論

斑蝥是我國傳統用藥，斑蝥素(Cantharidin)是其主要藥用成份。在國內外的研究中發現，Cantharidin具有抗癌作用⁽⁹⁴⁾，於1264年首先應用於抗腫瘤治療，其特色是會刺激骨髓增加白血球數目⁽⁴⁾，但對黏膜組織及腎臟和膀胱有刺激性，因而限制其臨床用途。臨床上⁽¹⁴⁾應用於治療肝癌⁽⁹⁵⁾、B型肝炎、尖銳濕疣等⁽¹⁴⁾，對子宮頸癌、鼻咽癌、皮膚癌、骨髓瘤、白血病、卵巢癌及肝癌細胞等具抑制作用和免疫調節⁽⁹⁶⁾。

斑蝥素為Protein phosphatases 1 (PP1)及2A 抑制劑，對PP1、PP2、PP4和PP5有較強的抑制性，尤其是對PP2A選擇性最高，同時對PP2B具微弱的抑制。近幾年PP1及PP2A抑制劑，為抗癌藥研發的新目標，PP1和PP2A透過去磷酸化作用在許多訊息傳導路徑中扮演著重要的調節角色，如細胞週期的運行、有絲分裂、細胞生長控制、分化、細胞骨架動力(cytoskeleton dynamics)、調節訊號傳導、細胞移動、Glucose的代謝、神經傳導、肌肉收縮、肝醣合成、鈣離子的運輸與細胞凋亡⁽¹⁸⁾，也是重要的腫瘤抑制蛋白(tumor-suppressor protein)⁽¹⁹⁾等。抑制PP1及PP2A會影響S期最終停滯於G2/M期進而產生細胞凋亡⁽¹⁶⁾。我們在探討細胞週期及相關蛋白質的影響，經PI染色及流式細胞儀檢測，

發現Cantharidin會影響COLO 205細胞週期停滯在G2/M期，同時發現有細胞凋亡的現象(圖 十九、圖 二十)。在細胞週期的研究發現CDK1/cyclin B是主要影響細胞由G2期進入M期及調控細胞凋亡的主要蛋白質之一⁽⁹⁷⁾，而其受Chk1、p21等蛋白質調控使CDK1/cyclin B 活性改變而影響細胞分裂的進行^(58, 98)，以Western blot及CDK1活性試驗觀察影響細胞週期的蛋白質變化，結果顯示CDK1及cyclin B在第6小時先增加後明顯減少(圖 二十二)，其上游的調控蛋白Chk1及p21的蛋白質表現量增加(圖 二十三)，因此認為Chk1及p21參與Cantharidin所誘導的G2/M停滯的訊息傳遞調控。最近有許多研究證實CDK1活性的改變可能導致細胞凋亡⁽⁹⁹⁾，我們的結果顯示CDK1的活性降低(圖 二十三)，推論Cantharidin抑制CDK1的活性。

Cantharidin的作用，是在DNA複製後，延遲細胞週期而不影響G1-S或S-G2，細胞週期的停滯是發生在中期之後，後期之前，干擾染色體排列在中間，產生異常的紡錘體⁽¹⁰⁰⁾，同時開始進行細胞凋亡。細胞凋亡亦受蛋白質磷酸化(protein phosphorylation)的調節，PP2A調節磷酸化狀態及活化protooncogen產生Bcl-2，抑制PP2A會使Bcl-2過度磷酸化而抑制活性，因而增強細胞凋亡過程。

國內外研究顯示，Cantharidin 對人類 CCRE-CEM 與 U937 血癌細胞株具有誘導細胞凋亡 (apoptosis) 的作用，且是經由

p53-dependent 的機制，主要是由 p38 與 JNK 等 Kinase 的活化^(1,2)。Cantharidin 對肝癌細胞株(Hep 3B)及正常肝細胞(Chang)的 IC₅₀ 分別為 2.2 及 30.2 µg/ml (36 小時)，使細胞週期停滯在 G2/M 期但不會抑制其核酸生合成⁽¹⁰¹⁾，並誘導細胞凋亡 (apoptosis)⁽³⁾。對 HeLa 使細胞週期停滯於 G2/M 期，且為時間依賴型，進而細胞凋亡(IC₅₀ 為 3.2 µg/mL, 24HR)⁽¹⁰²⁾。我們從 MTT 分析可以發現 Cantharidin 造成的細胞毒性具有藥物劑量及作用時間上的依存性 (圖 十六、圖 十七、圖 十八)，具有抑制 COLO 205 細胞株之存活率，利用統計分析得 IC₅₀ 為 20.53 µM (24 小時)，略高於前二種細胞但亦遠低於正常肝細胞(Chang)的 IC₅₀。

細胞凋亡的主要路徑分為粒線體路徑及死亡受體路徑，而 Caspase cascade 為傳遞死亡訊息的主要機制⁽⁶⁷⁾。Caspase-9、caspase-8 及 caspase-3 的活性明顯的比對照組高(圖 三十三)，且細胞質的 cytochrome *c* 蛋白質明顯的提高(圖 三十)，同時亦影響粒線體釋放 ROS 同時使粒線體膜電位下降(圖 二十八，二十六)，實驗亦證實 Cantharidin 係經由 ROS 的產生而致使細胞死亡(圖 二十九、三十一、三十二)。

許多研究證實 Bcl-2 family 具有調節粒線體傳遞的細胞凋亡，如 Bad 和 Bax 會在粒線體外膜形成孔洞，致使通透性改變而使

cytochrome *c* 等釋放到細胞質及粒線體膜電位下降產生 ROS 增加^(72, 103)。釋放出的 cytochrome *c* 會與 Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) 結合活化 caspase-9，進一步活化 caspase-3。Cantharidin 誘導細胞凋亡時，會降低抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白質質量並提升促使凋亡的 Bax 及 Bad 蛋白質質量(圖 三十五)，procaspase-3、-9 的蛋白質裂解(圖 三十)而 caspase-3、-9 的活性增加(圖 三十三)，使 DNA 無法進行修復而走向凋亡。同時觀察到粒線體的膜電位下降及 ROS 量增加(圖 二十六、圖 二十八)。

細胞凋亡的另一路徑為死亡受體路徑 (death-receptor pathway) 又稱為外在路徑，Fas 是一種位於細胞表面的糖基化蛋白質，分子量約 42-52 KDa，屬於 TNF receptor superfamily 中 type I 膜蛋白，而 FasL 是屬於 type II 膜蛋白。當 FasL 結合至 Fas 活化 Fas 受體，並吸引 FADD (Fas-associated death domain; FADD) 結合至受體位於細胞質中的 domain。接著會影響到 initiator caspase (caspase-8、caspase-10)，使 procaspase-8 活化成具活性 caspase-8，此複合物稱為 death-inducing signaling complex (DISC)。由實驗結果發現 COLO 205 經 Cantharidin 處理後會誘發 Fas 蛋白質表現量增加(圖 三十四)，進一步活化裂解 procaspase-8 使 caspase-8 活化促進 caspase-3 表現，而造成細胞凋亡 (圖 三十四) 且 Cas-8 活性大於 Cas-9 活性。以 Real-time PCR 來檢

測 Caspase-3、-8、-9 及 AIF 的 mRNA 的表現量，也都比對照組有明顯的增加(圖 三十六)，因此可推論 Cantharidin 對 COLO 205 誘導細胞凋亡主要是經由死亡受體路，徑並活化 Caspase cascades。同時亦發現 AIF mRNA 的表現量增加，可推論 Cantharidin 可能活化非粒線體路徑而造成細胞凋亡。

綜合以上結果，我們將 Cantharidin 抑制 COLO 205 細胞存活之機制如圖 三十七表示，證實 Cantharidin 使 COLO 205 細胞停滯在 G2/M 期並活化粒線體路徑及死亡受體路徑誘發 Caspase cascades 產生細胞凋亡，具有抗癌的作用，因此認為 Cantharidin 可能是一個值得開發且具潛力之抗癌藥物。



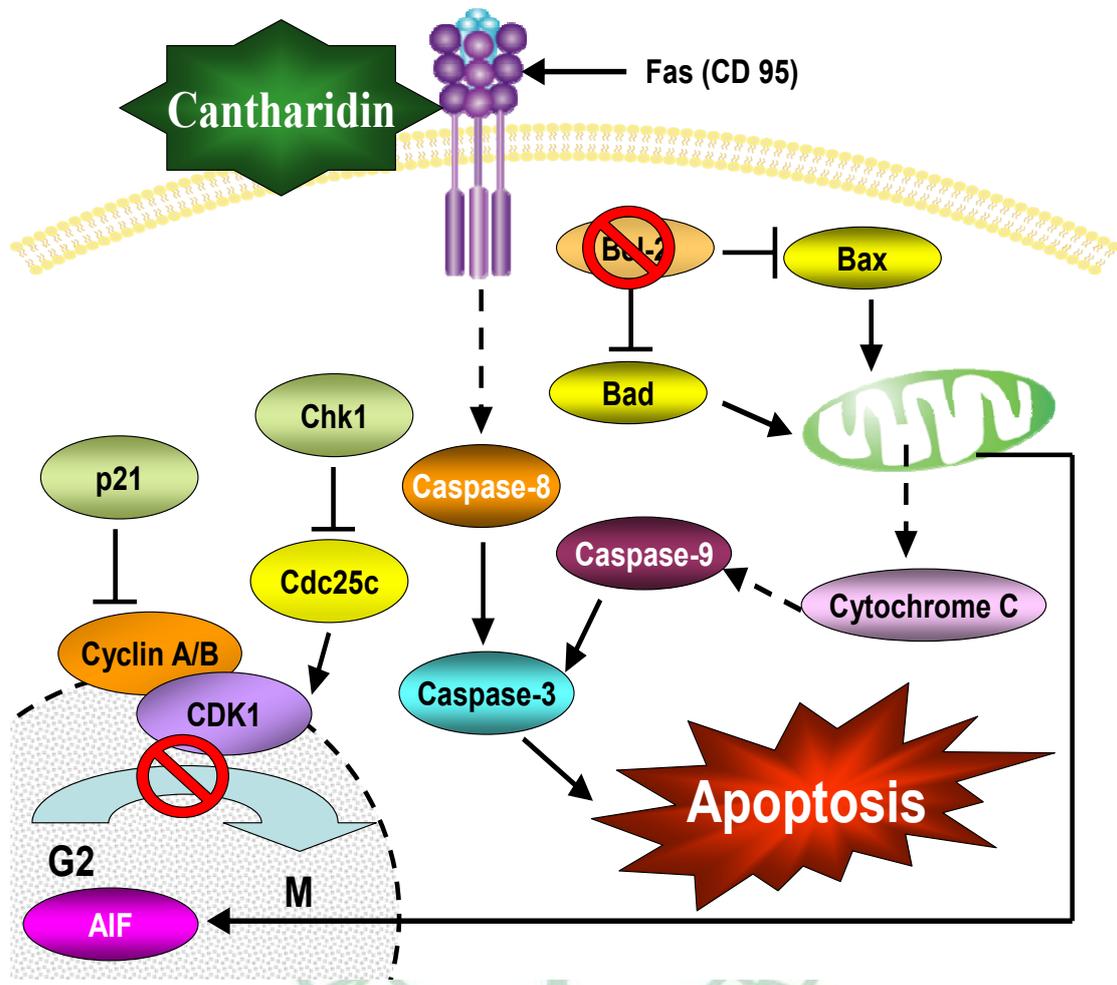


圖 三十七 CTD 對 COLO 205 誘導細胞凋亡分子路徑示意圖

第五章 結 論

本實驗結果顯示 Cantharidin 能抑制 COLO 205 細胞株的增生，並使細胞停滯在 G2/M 期。其機制可能經由細胞凋亡而來，包括 Fas，cytosome *c* 表現增加，caspase-3、-8、-9 的活性增加，同時 Cas-8 活性大於 Cas-9 活性。另外粒線體膜電位降低，ROS 增加，Bcl-2 family 中 Bad、Bax 表現增加，而 Bcl-2 表現量降低。實驗中亦發現 AIF mRNA 表現量增加，推論 Cantharidin 亦經由非粒線體路徑誘導粒線體凋亡。由上述可知，Cantharidin 使 COLO 205 細胞株細胞週期停滯 G2/M 期，且主要經由死亡受體路徑誘導細胞凋亡。

因此認為 Cantharidin 可能是一個值得往下開發且具潛力之抗癌藥物，未來可對 G2/M 期細胞週期停滯及細胞凋亡之間的互相作用關係作更深入探討，對抗癌作用強度和副作用程度及動物活體抗癌作用評估等，Cantharidin 在中國大陸已研發出針劑及口服藥，用來治療肝癌等，或許未來 Cantharidin 或其化合物，亦能實際應用於臨床治療結腸直腸癌或其他癌症治療。

第六章 參考文獻

1. Efferth T, Davey M, Olbrich A, et. a. Activity of drugs from traditional Chinese medicine toward sensitive and MDR1- or MRP1-overexpressing multidrug-resistant human CCRF-CEM leukemia cells. *Blood Cells Molecules & Diseases* 2002;28(2):160-8.
2. Huh JE, Kang KS, Chae C, Kim HM, Ahn KS, Kim SH. Roles of p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways during cantharidin-induced apoptosis in U937 cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67(10):1811-8.
3. Chen YN, Chen JC, Yin SC, *et al.* Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 2002;100(2):158-65.
4. SHI Qing-hua WY-l, SONG Hong-rui, CHENG Mao-sheng. Cantharidin and Its Analogues :Anticancer and SerPThr Protein Phosphatase Inhibitory Activities. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 2005;14(4):250-6.
5. Nickolls LC, Teare D. Poisoning by cantharidin. *Br Med J* 1954;2(4901):1384-6.
6. 王曉華，伊元琴，姜又紅. 斑蝥素對 A549 細胞增殖抑制作用的研究. *瀋陽藥科大學學報* 2006;23(9):598-600.
7. Lio P. Warts, molluscum and things that go bump on the skin: a practical guide. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2007;92(4):ep119-24.
8. 曹偉，陳許王. 斑蝥(mylabirs)其衍生物 Norcantharidin 與 Dehydronorcantharidin 對肝癌細胞株作用的探討. *臺灣中醫醫學雜誌* 民 91.09; 1:3:頁 42-55.
9. 李鐘文. 中藥師實用手冊. 中國大陸: 人民衛生出版社; 2004.
10. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 江蘇: 上海科學技術出版社; 1999.
11. 李時珍. 斑蝥. *本草綱目*. p. 130-1.
12. 楊素娟，楊紹俊. 斑蝥的臨床應用及研究進展. *中醫藥信息* 1992;1:31-2.
13. 張衛東，余秉治，王曉華，宗志紅，劉瑩. 斑蝥素通過 MAPK 途徑對肺癌 A549 細胞週期阻滯及其分子機制的研究. *中國醫科大學學報* 2006;35(4):382-84.
14. 周季藍，姚耀宗. 斑蝥素及其衍生物的研究進展. *Shanghai med j* 2007;30(4):294-6.
15. Baba Y, Hirukawa N, Sodeoka M. Optically active cantharidin analogues possessing selective inhibitory activity on Ser/Thr protein phosphatase 2B: implications for the binding mode. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005;13(17):5164-70.

16. Sakoff JA, Howitt IJ, Ackland SP, McCluskey A. Serine/threonine protein phosphatase inhibition enhances the effect of thymidylate synthase inhibition. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;53(3):225-32.
17. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 2001;353(Pt 3):417-39.
18. Zhang J, Ying K, Xiao Z, et. a. Analysis of gene expression profiles in human HL-60 cell exposed to cantharidin using cDNA microarray. *International Journal of Cancer* 2004;108(2):212-8.
19. Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(1):34-41.
20. Honkanen RE, Golden T. Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem* 2002;9(22):2055-75.
21. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;352(5):476-87.
22. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57(1):43-66.
23. 行政院衛生署民國 96 年死因統計記者會發布資料. 2008 [cited; Available from: <http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>
24. Srivastava S, Smart C, Marciniak TA, Derrick L. Accessing NCI's SEER cancer data base with SeerQuery and CD-ROM. *Public Health Rep* 1992;107(4):397-401.
25. Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1990;113(5):373-84.
26. Greene F, Balch C, Fleming I, et a. *AJCC cancer staging handbook*. 6th ed. New York: Springer; 2002.
27. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995;46:371-9.
28. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, *et al.* Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104(5):1535-49.
29. Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* 1993;71(11):3493-501.
30. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ* 1993;306(6880):752-5.
31. Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, *et al.* Randomised trial of irinotecan

- plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998;352(9138):1413-8.
32. Smyth JF, Hardcastle JD, Denton G, *et al.* Two phase III trials of tauromustine (TCNU) in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1995;6(9):948-9.
 33. Allen-Mersh TG, Earlam S, Fordy C, Abrams K, Houghton J. Quality of life and survival with continuous hepatic-artery floxuridine infusion for colorectal liver metastases. *Lancet* 1994;344(8932):1255-60.
 34. Sobrero A, Guglielmi A, Grossi F, Puglisi F, Aschele C. Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 2000;27(5 Suppl 10):72-7.
 35. Zhang ZG, Harstrick A, Rustum YM. Modulation of fluoropyrimidines: role of dose and schedule of leucovorin administration. *Semin Oncol* 1992;19(2 Suppl 3):10-5.
 36. Lokich JJ, Ahlgren JD, Gullo JJ, Philips JA, Fryer JG. A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study. *J Clin Oncol* 1989;7(4):425-32.
 37. de GA, Bosset JF, Milan C, *et a.* Randomized trial comparing monthly lowdose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* 1997;15:808-15.
 38. Weh HJ, Wilke HJ, Dierlamm J, *et al.* Weekly therapy with folinic acid (FA) and high-dose 5-fluorouracil (5-FU) 24-hour infusion in pretreated patients with metastatic colorectal carcinoma. A multicenter study by the Association of Medical Oncology of the German Cancer Society (AIO). *Ann Oncol* 1994;5(3):233-7.
 39. Wolmark N, Wieand S, Lembersky B, Colangelo L, Smith R, Pazdur R. A phase III trial comparing oral UFT in stage II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C06. *J Clin Oncol* 2004;22(SUPPL):3508.
 40. Cassidy J, Scheithauer W, McKendrick J, *et a.* Capecitabine vs bolus 5-FU/leucovorin as adjuvant therapy for colon cancer (the X-ACT study): positive efficacy results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2004;22(suppl):3509.
 41. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, *et al.* Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004;22(10):1797-806.
 42. Raymond E, Buquet-Fagot C, Djelloul S, *et al.* Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers. *Anticancer Drugs* 1997;8(9):876-85.

43. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407(6801):242-8.
44. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004;58(12):1134-41.
45. Niida H, Nakanish M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 2006 [cited 21; 3-9]. Available from:
46. <http://www.biologycorner.com/bio4/notes/mitosis.php>.
47. Wang CJ, Hsieh YJ, Chu CY, Lin YL, Tseng TH. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer Lett* 2002;183(2):163-8.
48. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004;116(2):221-34.
49. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* 2004;5(1):27-36.
50. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274(5293):1672-7.
51. Martinez AM, Afshar M, Martin F, Cavadore JC, Labbe JC, Doree M. Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J* 1997;16(2):343-54.
52. Dai Y, Grant S. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(4):362-70.
53. McConnell BB, Gregory FJ, Stott FJ, Hara E, Peters G. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassembly of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1981-9.
54. Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, *et al.* Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 1995;376(6538):313-20.
55. Becker EB, Bonni A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol* 2004;72(1):1-25.
56. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35(14):1886-94.
57. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1(8):639-49.
58. King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell* 1994;79(4):563-71.
59. Bouliskas T. Control of DNA replication by protein phosphorylation. *Anticancer Res* 1994;14(6B):2465-72.
60. Stewart ZA, Pietsenpol JA. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol* 2001;14(3):243-63.
61. Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*

- 1999;11(1):68-75.
62. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148(7):2207-16.
 63. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992;68(3):533-44.
 64. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000;53(2):55-63.
 65. Philips N, Burchill D, O'Donoghue D, Keller T, Gonzalez S. Identification of benzene metabolites in dermal fibroblasts as nonphenolic: regulation of cell viability, apoptosis, lipid peroxidation and expression of matrix metalloproteinase 1 and elastin by benzene metabolites. *Skin Pharmacol Physiol* 2004;17(3):147-52.
 66. Weber CH, Vincenz C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci* 2001;26(8):475-81.
 67. Turco MC, Romano MF, Petrella A, Bisogni R, Tassone P, Venuta S. NF-kappaB/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. *Leukemia* 2004;18(1):11-7.
 68. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
 69. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998;17(25):3225-36.
 70. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):4997-5002.
 71. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6(5):513-9.
 72. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2-3):95-105.
 73. Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6):691-9.
 74. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9(3):459-70.
 75. Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 2002;265(1-2):97-110.
 76. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(2):199-214.
 77. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin*

- Immunol 2001;108(4 Suppl):S99-103.
78. Derradji H, Baatout S. Apoptosis: a mechanism of cell suicide. *In Vivo* 2003;17(2):185-92.
 79. Fulda S, Debatin KM. Death receptor signaling in cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003;3(4):253-62.
 80. Wu B, Zhu JS, Zhang Y, Shen WM, Zhang Q. Predictive value of MTT assay as an in vitro chemosensitivity testing for gastric cancer: One institution's experience. *World J Gastroenterol* 2008;14(19):3064-8.
 81. Lee E, Surh YJ. Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids, [6]-gingerol and [6]-paradol. *Cancer Lett* 1998;134(2):163-8.
 82. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139(2):271-9.
 83. Radcliff G, Jaroszeski MJ. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1998;91:1-24.
 84. Mamani-Matsuda M, Rambert J, Malvy D, *et al.* Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(3):924-9.
 85. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184(1):39-51.
 86. Ko CH, Shen SC, Yang LY, Lin CW, Chen YC. Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007;121(8):1670-9.
 87. Kalbacova M, Vrbacky M, Drahota Z, Melkova Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry A* 2003;52(2):110-6.
 88. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87(2):171.
 89. Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, *et al.* Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *Am J Pathol* 2004;164(4):1233-41.
 90. Tsujimura K, Ogawara M, Takeuchi Y, Imajoh-Ohmi S, Ha MH, Inagaki M. Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis. *J Biol Chem* 1994;269(49):31097-106.
 91. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and

- limitations. *Trends Mol Med* 2002;8(6):257-60.
92. Chen JJ, Peck K, Hong TM, *et al.* Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model. *Cancer Res* 2001;61(13):5223-30.
 93. Chan HC, Kuo SC, Liu SC, Liu CH, Hsu SL. 4-Fluoro-N-butylphenylacetamide: a synthetic phenylacetate derivative that upregulates Bcl-X(S), activates caspase cascade and induces apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells. *Cancer Lett* 2002;186(2):211-21.
 94. Efferth T, Rauh R, Kahl S, *et al.* Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69(5):811-8.
 95. Wang G. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J Ethnopharmacol* 1989;26(2):147-62.
 96. Yagnik D, Evans B, Florey O, *et. a.* Macrophage release of transforming growth factor beta1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(7):2273-80.
 97. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 2002;9(12):1287-93.
 98. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 2002;181-182:475-81.
 99. DiPaola RS. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi *et al.*, Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. cancer res.*, 8: 3512-3519, 2002. *Clin Cancer Res* 2002;8(11):3311-4.
 100. Bonness K, Aragon IV, Rutland B, Ofori-Acquah S, Dean NM, Honkanen RE. Cantharidin-induced mitotic arrest is associated with the formation of aberrant mitotic spindles and lagging chromosomes resulting, in part, from the suppression of PP2Aalpha. *Mol Cancer Ther* 2006;5(11):2727-36.
 101. Wang CC, Wu CH, Hsieh KJ, Yen KY, Yang LL. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. *Toxicology* 2000;147(2):77-87.
 102. 王曉華, 伊元琴, 姜又紅. 斑蝥素抑制人類子宮頸癌 Hela 細胞增殖的研究. *中國醫科大學學報* 2007;36(2):201-02.
 103. Bossy-Wetzl E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6):706-16.