

中國醫藥大學 藥學院
藥學系碩士班 碩士論文

真菌二級代謝物 Cephalochromin 抑制鼻咽癌
細胞相關機制之探討

**Study on the Mechanisms of Anticancer Activity
of a Fungal Secondary Metabolite,
Cephalochromin, in Nasopharyngeal Carcinoma
Cells**

指導教授：莊聲宏 副教授

Advisor : Shin-Hun Juang

研究生：林振邦

Graduate student : Cheng-Pan Lin

中 華 民 國 九 十 八 年 七 月

目錄

目錄.....	I
附表目錄.....	IV
附圖目錄.....	V
中文摘要.....	VII
英文摘要.....	IX
略字表.....	XI
第一章 緒言.....	1
第二章 總論.....	3
第一節 文獻回顧.....	3
第二節 實驗設計.....	9
第三章 實驗之材料與方法.....	10
第一節 實驗材料及儀器.....	10
一、實驗材料.....	10
二、儀器設備.....	16
第二節 實驗方法.....	17
一、LTH1-116-1 (cephalochromin) 的配置.....	17

二、細胞株培養.....	18
三、生長抑制試驗.....	21
四、細胞凋亡分析方法 I - Annexin V / PI 染色分析法.....	22
五、細胞凋亡分析方法 II - Hoechst 33258 / Propidium Iodide 雙染法..	23
六、細胞週期分析.....	24
七、蛋白質萃取.....	25
八、蛋白質定量.....	26
九、西方墨點法.....	27
十、RNA 萃取.....	32
十一、反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR).....	33
第四章 結果.....	36
一、抑制鼻咽癌細胞的增殖.....	36
二、G ₁ /S 細胞週期停滯.....	36
三、細胞型態學變化.....	38
四、凋亡現象的偵測.....	38
五、Caspase 系列蛋白質表現情形.....	40
六、Fas / FasL 蛋白質表現情形.....	41
七、p53 基因以及蛋白質表現情形.....	42

八、p53 下游蛋白質 p21 的表現情形.....	43
九、p53-independent G ₁ arrest 相關蛋白質表現.....	43
第五章 討論.....	45
第六章 結論.....	54
參考文獻.....	57
附表.....	60
附圖.....	64



附表目錄

Tab. 1	
Primer information.....	60
Tab. 2	
IC ₅₀ values of cephalochromin against human cancer cell lines.....	61
Tab. 3	
The cell cycle distribution of cephalochromin treated HONE-1 cell.....	62
Tab. 4	
The time & dosage studies of cephalochromin-induced apoptotic population distribution of HONE-1 cell.....	63



附圖目錄

Fig. 1	
Chemical structure of cephalochromin.....	64
Fig. 2	
Cephalochromin-induced growth inhibition in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells.....	65
Fig. 3	
Cephalochromin-induced growth inhibition in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells.....	65
Fig. 4	
Time effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells at 1 μ M cephalochromin.....	67
Fig. 5	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells for 24 h.....	68
Fig. 6	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells for 24 h.....	70
Fig. 7	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells for 48 h.....	72
Fig. 8	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells for 48 h.....	74
Fig. 9	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells for 72 h.....	76
Fig. 10	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells for 72 h.....	78
Fig. 11	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells for 96 h.....	80
Fig. 12	
Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells for 120 h.....	82
Fig. 13	
Induction of chromosome condensation by cephalochromin in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells.....	83

Fig. 14	
The theory of Annexin-V detection method.....	84
Fig. 15	
Cephalochromin induced apoptosis population detected by Annexin-V.....	85
Fig. 16	
Two major apoptosis pathway.....	86
Fig. 17	
The caspase expression level of cephalochromin treated HONE-1 cell.....	87
Fig. 18	
The m-RNA level of caspase9 of cephalochromin treated HONE-1 cell line....	89
Fig. 19	
The Fas / FasL status of cephalochromin treated NPC cell lines.....	90
Fig. 20	
P53 signaling pathway.....	92
Fig. 21	
The mRNA level of p53 of cephalochromin treated NPC cell lines.....	93
Fig. 22	
The p53 expression level of cephalochromin treated HONE-1.....	94
Fig. 23	
The p21 expression level of cephalochromin treated NPC cell lines.....	95
Fig. 24	
The p53 dependent and independent G1 arrest in response to stress.....	96
Fig. 25	
The Cdc25A status of cephalochromin treated NPC cell lines.....	97
Fig. 26	
The Chk2 status of cephalochromin treated HONE-1 cell.....	98

摘要

根據行政院衛生署 97 年國人主要死因統計，惡性腫瘤連續 27 年蟬聯首位。面對腫瘤病例逐年增加的趨勢，但在治療面上抗腫瘤藥物逐漸產生抗藥性而導致療效不佳，所以新的抗腫瘤藥物的研發顯得刻不容緩。目前抗腫瘤藥物的研發除從植物，動物中純化分離，甚至可以由真菌為來源得到有效具抗腫瘤活性的化合物。我們先前由真菌 *Cosmospora vivior* (株系名稱 89051501) 中分離出數個純化物，其中，cephalochromin 對多種癌細胞都有良好的抑制效果。為了進一步探討其抗腫瘤之機轉，我們選擇了對 cephalochromin 較敏感的 HONE-1 及 NPC-TW01 人類鼻咽癌細胞株進行抗癌機轉的研究。流式細胞分析的結果發現 cephalochromin 會造成細胞週期停滯在細胞週期中 G_1 期，此停滯的現象不但和化合物濃度有依從關係，甚至和化合物處理細胞株的時間有依從關係。同時，我們也發現當化合物處理細胞 72 小時，會有 sub- G_1 期的產生。我們利用 Hoechst 33258 / propidium iodide 的雙染實驗和 Annexin V-FITC apoptosis detection kit 的偵測，發現 cephalochromin 產生/造成細胞死亡的特徵是經由細胞凋亡路徑所引發。由於 Fas 是一個 p53 的調節蛋白，進一步的研究結果也顯示 p53 及其下游蛋白，也受到 cephalochromin 的作用而活化。因此，我們推斷，cephalochromin 可以藉由活化 Fas / FasL，進而啟始 p53 及 caspase-8 依附

的訊息路徑而造成鼻咽癌細胞凋亡。綜此，cephalochromin 為一極具潛力的新穎抗癌物質，值得進一步發展。

關鍵詞：

惡性腫瘤；抗腫瘤藥物；真菌；鼻咽癌；細胞週期停滯；細胞凋亡；caspase-8。



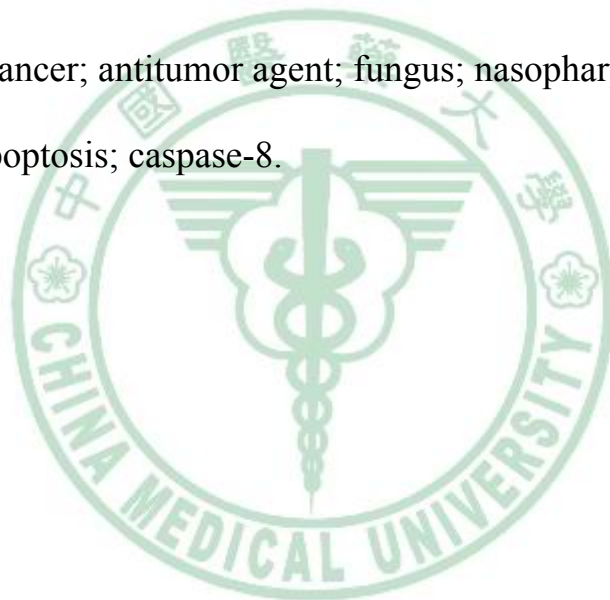
Abstract

According to the recently information release from the Department of Health, the malignant tumor is the number 1 cause of death in Taiwan for the last 27 years. Although, several great improvement have been established for treating cancer, developing the drug resistance by the cancer cells causes the curative effect generally not good. Therefore, the new antitumor medicine's research and development appear urgent. At present the source of antitumor agents is major isolated or derivatives from the plant or the animal, but recently, several studies demonstrated that the fungus also obtain the effective anti-tumor active compounds. In this study, we identified a fungal secondary metabolite, cephalochromin, which possesses a strong antitumoral activity against several human cancer cell lines. Since cephalochromin exerts comparably great anti-proliferative effect toward human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 and NPC-TW01 cells, we therefore investigated the mechanisms of action of anticancer efficacy of cephalochromin in this type of cancer. Results demonstrated that cephalochromin induces cells arrest in the G₁ phase in the time- and dosage-dependent manner. Significant appearance of sub-G₁ population and Annexin V-positive cells indicates that cephalochromin-induced cell death proceeded through an apoptotic pathway. Furthermore, we found that cephalochromin only activate the caspase-8, but not caspase-9. The finding that

cephalochromin-induced apoptosis through a membrane-mediated mechanism was supported by up-regulated expression of Fas and FasL. Furthermore, up-regulation of p53 was found after cephalochromin exposure. Above results indicated that cephalochromin is an effective anticancer agent which could induce cancer cell apoptosis through a p53-mediated caspase-8 / Fas-FasL-dependent pathway and worth for further development.

Key word :

malignant tumor; cancer; antitumor agent; fungus; nasopharyngeal carcinoma; cell cycle arrest; apoptosis; caspase-8.



略字表檢索

ACP : enoyl-acyl carrier protein

ATCC : American Type Culture Collection

BCA : bicinchoninic acid

Cdc25A : cell division cycle 25 homolog A

Cdk : cyclin dependent kinase

DEPC : diethylpyrocarbonate

D₂-H₂O : double distilled H₂O

DMF : dimethyl formaldehyde

DMSO : dimethyl sulfoxide

DTT : dithiothreitol

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FACS : fluorescence activated cell sorting

FabI : bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase

HPLC : high performance liquid chromatography

NPC : nasopharyngeal carcinoma

IC₅₀ : the concentration of drug that inhibited 50 % of cell growth

MTT : methylthiazole tetrazolium

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PARP : poly ADP ribose polymerase

PBS : phosphate-buffer saline

PDE : phosphodiesterase

PMSF : phenylmethylsulphonyl fluoride

PS : phosphatidyl serine

PVDF : Polyvinylidene fluoride

RT-PCR : reverse transcription and polymerase chain reaction

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate – poly acrylamide gel electrophoresis

TLC : thin layer chromatography

T_m : melting temperature

TEMED : N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

Tris Base : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

Tris HCl : Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride



第一章 緒言

近五十年來不論中外，惡性腫瘤一直是人類的頭號殺手，對於腫瘤的致病原因、腫瘤治療方式演進、腫瘤藥物開發的研究正如火如荼的進行當中。雖然同屬人類的腫瘤，但每一部位的腫瘤所形成的病因並不相同，因此治療的藥物無法達到全面性治療各部位腫瘤的效果。再加上腫瘤細胞本源自自體的細胞癌化的結果，在治療的過程中常遇到的問題不外是抗腫瘤藥物專一性不足，副作用大，連自體的細胞都遭波及；否則就是抗腫瘤藥物造成了抗藥性，無法有效控制腫瘤細胞的生長、轉移，因此造成病人死亡。所以找尋新的，有效的抗腫瘤藥物的研發是刻不容緩。

鼻咽癌好發於中國東南沿海居民、香港、台灣、新加坡、亞裔美洲人和阿拉斯加的愛斯基摩人，屬於頭頸部癌症的一種，其好發的原因據研究指出與人種、病毒感染、飲食習慣、抽菸以及嚼食檳榔有關。因此也有廣東癌的暱稱。

在鼻咽癌的臨床治療上由於頭頸部的構造複雜不易手術，所以首選治療方式為放射線治療。有效率約為 70% 以上，但是經過第一次放射治療後，仍有很高比例的復發的機率。此時化學治療的導入和放射線治療合併將可有效的控制疾病的進程，可以幫助病人增加其 5 年內的生存率。

如果腫瘤已發生轉移頸部淋巴之情形，就目前臨床的統計結果其 5 年存活率將急遽下降僅剩 10%~40%。表示腫瘤對藥物產生了耐受性或抗藥性，而以目前的藥物已無法控制腫瘤。因此對抗鼻咽癌新藥的發展更形重要，以彌補現今藥物的不足。

LTH1-116-1 (cephalochromin) 是一種從真菌中萃取而得的化合物。根據我們的體外細胞株實驗結果發現，它對於鼻咽癌細胞株生長抑制的效果優於其他的細胞株，顯示它具有成為鼻咽癌治療藥物的可能。因此本篇論文將針對 cephalochromin 對抗鼻咽癌之抗癌機轉做首次與初步的研究。



第二章 總論

第一節 文獻回顧

一、 惡性腫瘤

根據中華民國行政院衛生署九十八年度歷年主要死因統計，惡性腫瘤 (malignant tumor) 的死亡率從西元 1982 至 2008 年止，連續 27 年高居首位，而且逐年增加。惡性腫瘤致病的原因很多，包括生活作息不正常，飲食習慣的偏差，生理因素的引發，心理壓力無法調適，環境因子的誘導...等等，都會造成致癌的危險因子。而且每一部位的腫瘤發生的原因也不盡相同，因此治療的藥物無法達到全面性治療各部位腫瘤的效果。

二、 鼻咽癌

鼻咽癌屬於頭頸部癌症的一種，其發生的位置位於人體咽喉上端及鼻腔正後方之區域。就流行病學的分析，鼻咽癌流行以中國人的罹病率最高，根據行政院衛生署統計，西元 1982 年惡性腫瘤首度成為國人十大死因之首，當時十大癌症死因中鼻咽癌的排行為第六名。雖然於西元 1998 年台灣鼻咽癌的死亡率已退出十大癌症死因排行，但台灣鼻咽癌患者好發的比例依舊高於

其他歐美日等國家。其原因可能為人種因素[1, 2]、Epstein-Barr virus 感染引發[3-5]、或是食用高鹽、刺激性食物所引起[6]。初期的鼻咽癌一般是以放射線療法予以治療，其 5 年的存活率可達 70 % 以上，但是如果腫瘤已發生轉移頸部淋巴之情形，則其 5 年存活率僅有 10 % ~ 40 %。另一方面，化學治療在頭頸部癌的治療上相對較其他癌症有較高的敏感性，因此化學治療的輔助顯得更具意義。不過，經常因為癌細胞對於化學治療藥物產生抗藥性而失去療效，所以必須找尋可以替代的新藥以預防治療失敗。

三、 抗癌藥物介紹

事實上抗腫瘤藥物的來源相當的多樣，大部分來自動植物的生物萃植物，以動物為例的抗腫瘤藥物如近年來發現的抗腫瘤藥物 discodermolide[7] 就被證明具有很好的抑制腫瘤細胞生長作用，甚至它的抗腫瘤效果比 Taxol[®] 來的好，它的來源則是從海中的一種海綿 *Discodermia dissoluta* 中所分離出來的化合物。另外，自古以來人類常從中草藥中找尋治病的藥方，當然許多植物中也含有抗腫瘤活性的成分，例如長春花 (*Catharanthus roseus* (L.) G. DON) 即含有多達 70 種以上生物鹼，有長春鹼 (vinblastine)、長春新鹼 (leurocristine)、四氫雞腳木鹼 (tetrahydroalstonine)、派利文鹼 (perivine)、長春花鹼 (catharanthine)、lochneridine、lochnericine、carharosin 等，其中亦含

有多種有效抗腫瘤成分。近年來，抗腫瘤藥物更將觸角延伸展至真菌界的領域來尋找有效的抗癌成分，很多真菌的萃取物例如真菌類的多醣體成分 (polysaccharide)[8, 9]，或是二級代謝產物 clavarinic acid[10]，都被證明具有有效的抗腫瘤的活性，並且深具成為未來抗腫瘤新藥的潛力。因此對於真菌萃取化合物的抗癌活性研究亦逐漸的發展當中。

四、 抗癌藥物作用機轉

目前臨床上治療鼻咽癌的方法有：

(一) 放射線治療：

由於頭頸部癌的解剖位置特殊，因此頭頸部癌的治療一般首選治療方式為放射性治療。一般而言，放射線治療的局部控制率 > 85 %。其治癒率直接與腫瘤大小和腫瘤範圍有關係。

(二) 手術治療：

頭頸部在人體扮演呼吸、吞嚥、發聲等重要的生理功能，而其立體構造複雜，且相鄰的孔竅又互有關聯，因此鼻咽癌不易以手術方式來治療處理。癌症的手術治療不只是切除癌化的部位，還要一併切除部分正常組織，以防止肉眼不可見的癌細胞殘留在體內。如果只將表面的腫瘤切除，卻將黏膜下層的癌細胞殘留在體內，造成日後復發的問題。所

以頭頸癌的手術治療，一定要兼顧腫瘤切除以及保留重要的功能。綜此，除非在鼻咽癌有復發或轉移之情況時，某些病人才有可能考慮施行拯救性手術切除。

(三) 化學治療

採用單一的化學治療法，藥物治療的反應率約為 15~30%。不過如果使用合併化學治療其中包括兩種傳統鼻咽癌化學治療劑 cisplatin 和 5-fluorouracil (5-FU)，其腫瘤反應率可達 75%。這也顯示化學治療所扮演的重要角色。雖然同步給予放射線及化學藥物治療所導致口腔黏膜毒性、骨髓造血機能抑制等副作用。然而研究顯示，cisplatin 可以與放射線同步進行，提高病人的腫瘤細胞毒殺效果，加上白血球生長素、良效止吐藥的上市、以及優良的放射線技術，因此出現了藥物與放射線同步使用的臨床應用。因為採取同步放射線及化學治療、以及輔助性的化學治療，所有各期病人五年的平均存活率可達70%。

(四) 免疫治療

最近對於鼻咽癌的研究也朝向免疫治療，因為研究發現大部分的鼻咽癌患者為 Epstein-Barr virus 感染 (+)，被感染的細胞會出現專一的 latency II phenotype of latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 表面

抗原，於是發展對抗此抗原的細胞毒殺型 T 細胞，亦成為對抗鼻咽癌的治療方針之一[11]。

五、開發新穎的真菌萃取化合物

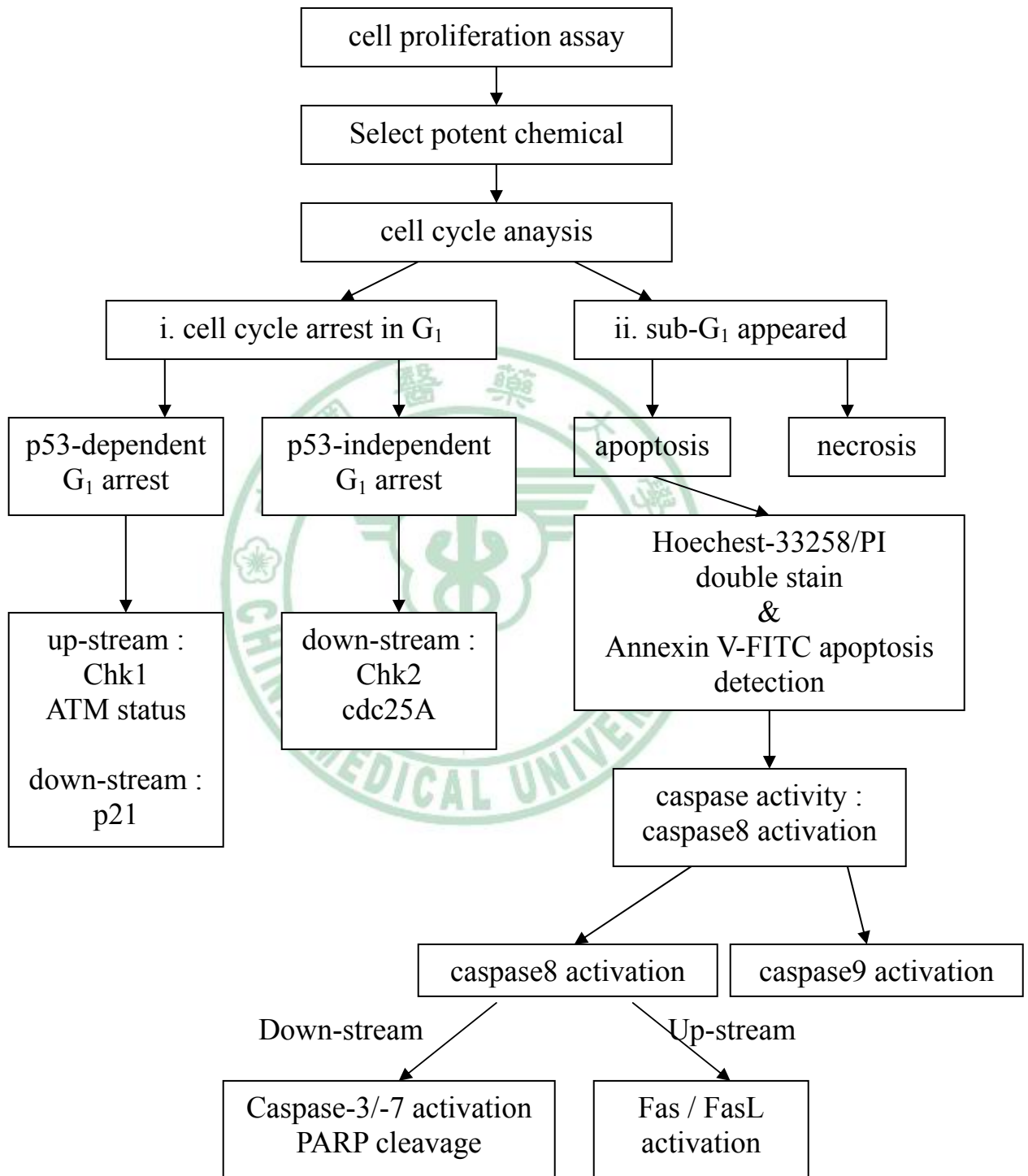
本實驗室所研究的真菌萃取物 LTH1-116-1 (cephalochromin) 來自台北醫學大學李宗徽老師慷慨的提供。其化合物的結構屬於 phenolic dimmer. Bis (naphtha- γ -pyrone) 的衍生物。這類衍生物的化合物目前仍很少被研究。根據以前學者的研究，cephalochromin 對人類口腔上皮癌 KB cells 有抑制的效果，其 IC_{50} 為 154.4 nM，證明其具有抗癌的能力[12]。另外，cephalochromin 亦被證實為強效的 calmodulin-sensitive phosphodiesterase (PDE) 抑制劑，其抑制 calmodulin-sensitive PDE 的 IC_{50} 約在 40 ~ 47 nM，對 calmodulin-independent PDE 的 IC_{50} 約在 2 ~ 40 μ M [13]。另外，在老鼠的類巨噬細胞株，以 lipopolysaccharide 和 interferon- γ 引導一氧化氮 (nitric oxide) 的合成將會被 cephalochromin 所抑制[14]。最近的研究發現，cephalochromin 也可直接作用於 enoyl-ACP reductase，以抑制細菌脂肪酸 (fatty acid) 鏈結延長而達到抑菌的效果，尤其是 FabI 表現旺盛的細菌如 *Staphylococcus aureus* 和 *Escherichia coli*， IC_{50} 分別是 1.9 μ M 和 1.8 μ M，而且這個研究指出 cephalochromin 是一個新穎的 FabI-directed 的抗生素，

對於日後抗生素的研發提供新的機轉與方向[15]。

本實驗室針對 cephalochromin 的抗癌活性、機轉，以鼻咽癌細胞株模式檢測此化合物造成細胞死亡的原因為何?同時也追蹤造成細胞死亡相關的蛋白質變化，以確定其造成死亡相關的路徑為何?我們呈現了初步的研究結果，這也是第一次有關 cephalochromin 對於抑制 NPC carcinoma 機轉的研究。



第二節 實驗設計



第三章 實驗之材料與方法

第一節 實驗材料及儀器

一、實驗材料

(一)、實驗用化合物

LTH1-116-1 (cephalochromin)，來自台北醫學大學生藥研究所李宗徽教授。

(二)、實驗用細胞

1. Colon carcinoma (HCT-116 : from ATCC).
2. Leukemia (Jurkat, CCRE-CEM : from ATCC).
3. Lung carcinoma (NCI-H6611 : from ATCC).
4. Nasal pharyngeal carcinoma (HONE-1 : from ATCC, NPC-TW01 : from FIRDI in Taiwan).
5. Renal carcinoma (A498 : from ATCC).

(三)、一級抗體

1. Actin (I-19): sc-1616 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2. ATR Antibody : Cell Signaling Technology[®].
3. Caspase-3 Antibody : 610323 : BD Transduction Laboratories[™].
4. Caspase-7 Antibody : #9492 : Cell Signaling Technology[®].
5. Caspase-8 (1C12) Mouse mAb : Cell Signaling Technology[®].
6. Caspase-8 p18 (D-8): sc-5263 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
7. Caspase-9 Antibody (Human Specific) : Cell Signaling Technology[®].
8. Caspase-9 Antibody : ab25758 : abcam[®]
9. Cdc2 p34 (17) : sc-54 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
10. Cdc25A (144): sc-97 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
11. Chk1 (FL-476): sc-7898 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
12. Chk2 (Thr68) antibody : #2661 : Cell Signaling Technology[®].
13. Cyclin E (C-19) : sc-198 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
14. Fas (C-20): sc-715 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
15. FasL (C-178) : sc-6237 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
16. PARP Antibody C2-10 Cat # : 4338-MC-50 : Trevigen, Inc.
17. PARP (46D11) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology[®].
18. p21^{Cip1} : BD Transduction Laboratories[™].
19. p53 (Ser15) Antibody : #9284 : Cell Signaling Technology[®].
20. p53 (Ser20) Antibody : #9532 : Cell Signaling Technology[®].
21. p53 (DO-1): sc-126 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.

(四)、二級抗體

1. donkey anti-goat IgG-HRP : sc-2020 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
2. goat anti-mouse IgG-HRP : sc-2005 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
3. goat anti-rabbit IgG-HRP : sc-2004 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.
4. rabbit anti-goat IgG-HRP : sc-2768 : Santa Cruz Biotechnology, Inc.

(五)、細胞培養用培養基

1. 細胞培養用血清：Fetal bovine serum 購自 Biological Industries (ISRAEL).
2. 細胞培養用培養基：
HyQ[®] MEM / EBSS，購自 HyClone Laboratories (Logan, Utah).
RPMI Medium 1640，購自 Invitrogen Corporation.
3. Glutamax-1 100x：購自 GIBCO[™] Invitrogen Corporation.
4. Penicillin-Streptomycin-Glutamine：購自 GIBCO[™] Invitrogen Corporation.

(六)、實驗用 primer set (Tab. 1-1), purchased from Blossom Biotechnology Inc.

1. Caspase-9 primer set
2. GAPDH primer set
3. p53 primer set[16]

(七)、實驗用藥品及試劑

1. ALBUMIN, FRACTION V (source : bovine blood) : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).
2. APS (Ammonium persulfate) (Ultrapure, ACS Reagent Grade) : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).
3. 30% Acrylamide/Bis Solution 37.5 : 1 (26.5%) : 購自 BIO-RAD.
4. Bromophenol blue (purity reagent) : 購自 BIO-RAD.
5. 冷光顯影劑 chemiluminescent HRP substrate (Immobilon Western®) : 購自 MILLIPORE company.
6. DMF (dimethyl formaldehyde) : 購自 SIGMA-ALDRICH, Inc. product of Germany.
7. Glycerol (Ultrapure) : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).

8. Glycin (Ultrapure, MB Grade) : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).
9. Hoechest 33258 : 購自 SIGMA-ALDRICH, Inc. product of Germany.
10. paraformaldehyde (Reagent Grade) : 購自 SIGMA-ALDRICH, Inc. product of Germany.
11. prestain marker : PageRuler™, #SM0671, 購自 Fermentas Life Science.
12. propidium iodide : 購自 SIGMA-ALDRICH, Inc. product of Germany.
13. SDS (sodium dodecyl sulfate) : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).
14. sodium chloride (Ultrapure, ACS Reagent Grade) : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).
15. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Ultrapure) : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).
16. Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (Ultrapure, MB Grade) : 購自 usb® USB Corporation (Cleveland, USA).
17. TRITON® X-100 : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).

18. TWEEN[®] 20 : 購自 USB Corporation (Cleveland, USA).

19. TRIzol[®] reagent : 購自 Invitrogen[™] life technology.

(八)、實驗用 Kit

1. Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II (Cat No.:51-6710AK

(556570)) : 購自 BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA 92121.

2. BCA[™] Protein Assay Kit (Prod # 23225) : 購自 Thermo Scientific,
Rockford, USA.

3. RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1622) : 購自
Fermentas Life Sciences, EU.

(九)、實驗用耗材

1. VacuCap[®] 60 Filter Unit w/ 0.2 μm Supor[®] Membrane, Pall
Corporation.

二、儀器設備

1. 酸檢測定儀 pH-V pH-mV meter : UltraBASIC, Denver Instrument.
2. 分析天平 : TB-214, Denver Instrument.
3. 微量冷凍型離心機 : KUBOTA-3740, Kubota Corporation.
4. 細胞恆溫培養箱 : ASTEC SCA-165DS.
5. 核酸蛋白質計算儀 : GeneQuant pro, Amersham Pharmacia.
6. 電源供應器 : Power Station 300, Labnet International, Inc.
7. 製膠台 : Multiple Gel Caster, Amersham Biosciences.
8. 垂直電泳槽 : GHE330-A, GENEPURE.
9. ELISA reader : MULTISKAN ASCENT , Thermo Electron Corporation , manufactured in Shanghai, China.
10. FACScan : BD company.
11. Transblot[®] SD semi-dry transfer cell.
12. Thermal cycler : My Cycler[™], Bio Rad.

第二節 實驗方法

一、LTH1-116-1 (cephalochromin) 的配製

乃利用一種台灣產的真菌 *Cosmospora vilior* Strain # 89051501，進行發酵技術大量增殖後抽提純化而得。發酵過程如下：先將取得的芽孢植入 1 公升的 Erlenmeyer flasks 中，並在其中加入 10 g Bacto™ Malt Extract (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) 和 500 毫升的去離子水。整個發酵的過程將在 25~30 °C 下持續進行 30 天。發酵收成後的菌絲離心收集使用甲醇進行抽提，利用回收的甲醇反覆進行 3 次抽提。甲醇抽提液最後進入真空濃縮至乾燥。接著，乾燥的殘餘物再用甲醇溶解後使用 Sephadex LH-20 column (3 cm i.d. × 65 cm) 跑 HPLC，以甲醇當溶媒在流速 2.5 ml/min 下沖提。每一個區分物 (約 18 ml) 均使用 EtOAc / acetic acid / H₂O (85 : 10 : 10, v/v/v) 作為展開液利用 TLC 檢查其成分，並用波長為 254 nm 的紫外光照射檢查具相似呈色基團的化合物。最後分離純化出 LTH1-116-1 (purity > 95%)。此化合物結構上屬於 phenolic dimmer. Bis (naphtha-γ-pyrone) 衍生物。從先前學者的研究報告指出，cephalochromin 是從 *Cephalosporium* sp.

(PRL 2070) 被分離純化出來，並因此命名為 cephalochromin[17-19]。其分子式、結構式以及分子量圖示如 (Fig. 1)。

純化乾燥的藥品，精秤至小數點後兩位。將重量 (gram) 除以該藥品的分子量 518，得到純化所得的莫耳數 (mol)。再根據所得莫耳數以適當體積的 DMSO 稀釋，調配成 20 mM 的 stock solution 後分裝置於 -20 °C 冰箱儲存備用。

二、細胞株培養

鼻咽癌細胞株 (HONE-1, NPC-TW01)，腸癌細胞株 (HCT-116)，腎癌細胞株 (A498) 皆培養在 MEM / EBSS medium 添加 10 % fetal calf serum 和 1 % penicillin-streptomycin-glutamine 中。血癌細胞株 (CCRE-CEM, Jurkat)，肺癌細胞株 (NCI-H661) 培養在 RPMI medium 1640 添加 10 % fetal bovine serum 和 1 % penicillin-streptomycin-glutamine 中。所有細胞株皆培養在 37 °C 飽和水氣且含有 5 % CO₂ 的培養箱中。

(一)、培養液的配製

每配製 1 公升的 medium 分別需在 MEM / EBSS medium 和 RPMI medium 中添加 2.2 gm 和 2.0 gm 的 sodium bicarbonate。並調整 pH 至 7.2。配製好的 medium solution 需以 0.2 μm 的 VacuCap[®] 過濾分瓶後，室溫靜置 3 週後移入 4 °C 冰箱備用。

(二)、EDTA-trypsin 的配製

Component	Weight
NaCl	8 gm
KCl	0.4 gm
Glucose	1 gm
NaHCO ₃	0.35 gm
Phenol red	0.005 gm
Trypsin	0.5 gm
EDTA	0.2 g
Dissolve in D ₂ -H ₂ O to 1 L	

pH 需調整至 7.2~7.3 之間。以 0.2 μm 的 VacuCap[®] 過濾，並置於 -20 °C 儲存備用。

(三)、PBS 的配製

Component	Weight
NaCl	80 gm
KH ₂ PO ₄	2.4 gm
Na ₂ HPO ₄	14.4 gm
KCl	2 gm
Dissolve in D ₂ -H ₂ O to 10 L	

調整 pH 值至 7.4，分瓶後，使用高溫高壓滅菌鍋，40 分鐘滅菌。待冷卻即可使用。



三、生長抑制試驗

在 96 孔盤中分別種入 100 μ l 培養基中內含 HONE-1 (4,000 細胞 / 孔)，NPC-TW01 (2,500 細胞 / 孔)，CCRE-CEM (20,000 細胞 / 孔)，Jurkat (20,000 細胞 / 孔)，HCT-116 (4,000 細胞 / 孔)，NCI-H661 (4,000 細胞 / 孔)，A498 (4,000 細胞 / 孔)。37 $^{\circ}$ C 下培養隔夜貼盤後，再加入 50 μ l 不同濃度之測試藥物的處理。待 72 h 後以 methylthiazoletetrazolium (MTT) 分析方法測定細胞活性。

MTT assay 是一種實驗室中常用的偵測目標細胞活性和增殖效果的方法。在活的細胞粒腺體中，MTT 會被代謝還原成 formazan。Formazan 是一種藍紫色的不溶性物質。待欲檢測的時間點時，每個 well 中加入 15 μ l MTT stock solution (5 mg / ml)，37 $^{\circ}$ C 培養 4 小時，讓細胞吸收 MTT 並在粒腺體中將之代謝還原，由於 formazan 是不溶性的物質，於是 4 小時後再加入 75 μ l MTT – lysis buffer，此緩衝液將會把不溶性 formazan 溶解並形成紫色的溶液。再經過 8 小時 37 $^{\circ}$ C 的培養後，以 ELISA reader 在 570 nm 的光源下測量吸光值。根據所測得吸光值扣除背景值後，將欲分析的數值除以控制組的吸光值即可得知細胞活性的關係。

MTT - lysis buffer 的組成如下：

Component	Weight
DMF (dimethyl formamide)	400 ml
SDS (sodium dodecyl sulfate)	2.4 gm
Dissolve in D ₂ -H ₂ O to 1 L	

四、細胞凋亡分析方法 I - Annexin V / PI 染色分析法

細胞的偵測，本研究使用購自 BD Biosciences Pharmingen 的產品 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II。實驗的步驟根據廠商之使用者手冊。在六孔盤中種約 1×10^5 的細胞。待檢查的時間點，收集所有的細胞。先將 medium 及懸浮的細胞移至新的 5 ml 離心管中，以 PBS 清洗細胞 1 次。再將清洗後的 PBS transfer 到剛剛的離心管中，然後以 1 ml EDTA-trypsin 處理，培養 37 °C 約 1 分鐘，使細胞懸浮並 transfer 收集到同一個離心管。在 4 °C 下離心 (200 X g) 10 分鐘。傾倒出上清液留下管底的細胞團塊。加入 100 μ l 1 X binding buffer 使再次懸浮，同時加入 5 μ l FITC Annexin V and 5 μ l 50 μ g / ml propidium iodide。輕輕振搖，避光室溫中靜置 15 分鐘。再加入 400 μ l 1 X binding buffer，一小時內以流式細胞儀分析。

五、細胞凋亡分析方法 II - Hoechst 33258 / Propidium Iodide 雙染法

六孔盤中先放入一片用酒精燈過火之無菌蓋玻片，種入少量的細胞，37 °C 隔夜靜置貼壁後再視實驗設計加入藥品處理。待預定時間到達時，先吸乾六孔盤中的培養基，加入 2 ml propidium iodide 5 µg / ml，37 °C 培養 1 小時。除去 propidium iodide 溶液，用 PBS 清洗一次，吸乾。再以新鮮培養基配製的 Hoechst 33258 (20 µg / ml) 的溶液 2 ml 加入培養皿中 37 °C 培養 15 分鐘。接著吸乾 Hoechst 33258 溶液，並再以 PBS (2 ml) 清洗一次，吸乾。最後以 4 % para-formaldehyde (2 ml) 在室溫下進行固定 30 分鐘。然後夾出蓋玻片置於載玻片之上，蓋玻片周圍塗上指甲油風乾加以固定。然後再以螢光顯微鏡觀察之。

觀察 propidium iodide 和 Hoechst 33258 染色時，所需的激發光各有所不同。以 propidium iodide 來說，要以綠光激發螢光，所放射的螢光為紅光，波長為 620 nm。而對 Hoechst 33258 而言，要以 UV 紫外光來激發，所放射的螢光為藍光，波長為 510 ~ 540 nm。

六、細胞週期分析

我們實驗所用的鼻咽癌細胞株皆為貼壁細胞，因此要進行細胞週期分析前要收集所有的細胞，先用 2 ml PBS 清洗細胞。再加入 1 ml EDTA-trypsin，搖晃培養皿將細胞浸潤後，吸除多餘 EDTA-trypsin。然後將培養皿放入 37 °C 恆溫培養箱培養 2 - 3 分鐘，待細胞成懸浮狀，輕敲培養皿並加入培養液中中止 EDTA-trypsin 的作用。此時的細胞處於非貼盤狀態，將細胞液收集至 5 ml 離心管中，在 4 °C 下以 300 X g 離心 10 分鐘。傾倒出上清液留下離心管底部的細胞團塊，輕敲試管底部使細胞團塊散開。最後加入 1 ml -20 °C 預冷凍的 75 % 酒精隔夜固定。

在樣品上流式細胞儀前，酒精固定之樣品需先加入 3 ml PBS，4 °C 下 300 X g 離心 10 分鐘，傾倒出上清液留下離心管底下的細胞團塊。輕敲離心管底部使團塊散開，再以 1 ml 之 0.1 % Triton-X 使其再懸浮，靜置避光 20 分鐘。使用 Triton-X 的目的在於在細胞壁上打洞以利後續的染劑可以進入細胞內。然後在 4 °C 下 300 X g 再離心一次，10 分鐘。同樣離心後去除上清液，輕敲管壁散開細胞團塊，加入 0.5 ml propidium iodide 25 µg / ml 和 RNase A 0.25 % (w / v) 處理並避光 30 分鐘。最後將細胞溶液過 35 號篩網，即可以流式細胞儀分析。

從流式細胞儀 CellQuest pro 偵測所得的數據，我們使用 ModFit LT™ for MAC 分析細胞週期分佈的變化。

七、蛋白質萃取

種約 1×10^5 的細胞於六孔盤中，經過隔夜 37°C 的靜置貼盤培養後，移除培養液。再加入預先配好濃度的藥品溶液培養液。待設定細胞收集的時間，先用冰 PBS 沖洗細胞 2 次。再加入 0.3 ml protein lysis buffer。Protein lysis buffer 參考了之前研究者的配方[20-22]，我們實驗室做了一些修正，其成分為：

Component and final concentration	Stock concentration	Volume
150 mM NaCl	4 M	375 μl
50 mM Tris-HCl (pH 7.4)	1 M	500 μl
1 % SDS	10 %	1000 μl
1 % Triton X-100	100 %	100 μl
1 mM PMSF	100 mM	100 μl
D ₂ -H ₂ O Dissolve to 10 ml		

要注意的是 PMSF 是一種不可逆轉的 serine protease 抑制劑，必需溶於 100 % DMSO。或無水的 methanol 或 isopropanol 中，否則容易在含水溶液中水解。因此在需要溶解細胞之前，才加入 PMSF 以防止其抑制蛋白酶的效果失效。

加入 protein lysis buffer 的細胞在冰溫中先靜置 5~10 分鐘。接著用 rubber policeman 將細胞輕輕刮下，然後收集裝進 eppendorf 中。插冰靜置 1 小時。以超音波震盪，目的是將 genomic DNA 打斷，在插冰的狀態先震盪 5 秒後靜置 20 秒，再震盪 5 秒，接著放入離心機以 12,000 X g 的轉速在 4 °C 下離心 15 分鐘後，收集上清液。 -20 °C 儲存備用。

八、蛋白質定量

抽取細胞蛋白質後，我們使用 bicinchoninic acid (BCA) 方法來分析並定出細胞液中溶出蛋白質的含量。所使用的工具是從 Thermo Scientific company 採購而得。定量的步驟根據 Thermo Scientific company 的使用者手冊。

檢量線的製作：取標準品白蛋白 1 mg/ml，取 0 μ l，5 μ l，10 μ l，15 μ l，20 μ l，25 μ l 入 96 孔盤，分別再加入 25 μ l，20 μ l，15 μ l，10 μ l，5 μ l，0 μ l 的二次蒸餾水。最後每孔再加入 BCA reagent 200 μ l，在 37 °C 烘箱中靜置 30 分鐘，再以 ELISA reader 測量 570 nm 光源下的吸光值，並做出檢量線。根據檢量線我們定量出抽取檢品中所含的蛋白質含量。

九、西方墨點法

取出欲分析量之蛋白溶液後，加入 1/3 體積之 4 X sample buffer，然後放入 100 °C 水浴 5 分鐘，再移至室溫冷卻後進行 SDS-PAGE 分析。水浴的主要目的是將蛋白質藉由加熱使其變性。

4 X sample buffer 成分含量如下：

Component	Content	Final concentration
glycerol	4 ml	40 %
bromophenol blue	0.5 mg	0.4 %
0.5 M Tris pH 6.8	5 ml	250 mM
SDS	400 mg	4 %
β -mercaptoethonal	1 ml	10 %
Total D ₂ -H ₂ O	10 ml	

蛋白質分離，SDS-PAGE 分為上膠（stacking gel）和下膠

（separating gel）兩個部份。分別為 stacking gel 和的 separating gel。

Separating gel (pH 8.8)	Total 12 ml			
	8 %	10 %	12.5 %	15 %
40 % Acrylamide / bis solution 37.5 : 1	2.4 ml	3.0 ml	3.75 ml	4.5 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml
APS (0.1 g / 10 ml)	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml
10 % SDS	120 μ l	120 μ l	120 μ l	120 μ l
----- 混合均勻 -----				
TEMED	5.0 μ l	5.0 μ l	5.0 μ l	5.0 μ l
D ₂ -H ₂ O dissolve to 12 ml				

4 % Stacking gel (pH 6.8)	2.5 ml	5.0 ml	9.0 ml
40 % Acrylamide / bis solution 37.5 : 1	0.25 ml	0.5 ml	0.9 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.65 ml	1.3 ml	2.34 ml
APS (0.1 g / 10 ml)	125 μ l	250 μ l	450 μ l
10 % SDS	25 μ l	50 μ l	90 μ l
----- 混合均勻 -----			
TEMED	4.0 μ l	8.0 μ l	15.0 μ l
D ₂ H ₂ O dissolve to	2.5 ml	5.0 ml	9.0 ml

一旦膠片已經聚合完畢，取出膠片並以 1 X Lamellae tank buffer 清洗膠片以及已製型的 well，以便去除未聚合完全的 acrylamide。

將製備好的膠片架上跑膠台後，上層 stacking 端接上負電，下層靠近 separating 端接上正電。以 1 X Lamellae tank buffer 淹沒覆蓋電極。

Running buffer 的製備，先配製 10 X Lamellae tank buffer 當做 stock solution，配製的成分比例如下：

10 X Lamellae tank buffer	
Tris	30.285 g
Glycine	187.675 g
D ₂ -H ₂ O	To 1 L (pH 8.3)

pH 需調整為 8.3，置 4 °C 備用。

1 X lamellae tank buffer for use :

	Volume (ml)	Volume (ml)	Volume (ml)
10 x lamellae tank buffer	20	40	50
10 % SDS	2	4	5
D ₂ -H ₂ O	178	356	445
Total	200	400	500

啟動電泳槽，70 V 約 40 分鐘做為 stacking stage，至 dye 被壓平同在一樣的水平時，更換電壓 100 V 約 100 分鐘做為 separating stage，要注意 dye front 不可跑出膠片的下緣。

同時，先準備新鮮配製的 transfer buffer，其配方如下：

Tris base	0.582 g
Glycine	0.292 g
SDS	0.1 g
D ₂ -H ₂ O	70 ml
Dissolve well	
Methanol	30 ml

PVDF 膜要先以 100 % methanol 浸潤約 30 秒後浸泡於 transfer buffer 中備用。

濾紙亦先以 transfer buffer 浸泡 5~10 分鐘。

待 dye front 跑至接近膠片下緣時，停止電源。接著在 Transblot[®] SD semi-dry transfer cell 上先鋪上 4 層事先以 transfer buffer 潤濕好的濾紙，避免濾紙間有氣泡的產生，再鋪上 transfer buffer 浸潤的 PVDF 膜，再將膠片置於 PVDF 膜的上方，過程中仍要避面氣泡的產生，然後在膠片上方再依序放上 4 層濾紙。輕蓋上 transfer cell 的蓋子，設定電源供應器在 250 mA 下進行 40 分鐘的轉漬。

轉漬後的 PVDF 膜以含 5 % 脫脂奶粉的 TTBS 溶液阻絕膜上非特異區域，室溫中振搖約 30 分鐘。接著將 PVDF 膜浸潤在含一級抗體（一級抗體的稀釋比例從 1:250~1:1,000）及 5 % 脫脂奶粉的

TTBS 溶液中，4 °C 振搖約 4 小時後，以 TTBS-membrane washing solution 清洗，每 10 分鐘更換一次清洗液，連續 3 次。PVDF 膜清洗完後，接著將之浸泡在含二級抗體的溶液中（二級抗體的稀釋比例從 1 : 5,000 ~ 1 : 10,000），同樣 4 °C 振搖 2 小時後，再用 TTBS 清洗 30 分鐘，每 10 分鐘換一次清洗液。

TTBS-membrane washing solution 的配製：

Stock concentration	Working concentration	Working Volume
1 M Tris (pH 7.5)	20 mM	10 ml
4 M NaCl	500 mM	62.5 ml
Tween 20	0.1 %	500 µl
D ₂ -H ₂ O		427.5 ml
Total		500 ml

待最後一次清洗完畢後，加入新鮮配製冷光顯影劑 chemiluminescent HRP substrate (Immobilon Western[®] MILLIPORE)，使用冷光激發照相拍攝蛋白表現情形 (FUJI-LAS-4000)，並使用 Multi Gauge (Fugifilm company) 的影像處理軟體進行分析。

十、RNA 萃取

我們從 NPC-TW01 和 HONE-1 兩株細胞株中分離出 total RNA；所使用的方法是根據 Invitrogen™ life technology 公司所生產的 TRIzol® reagent 使用手冊。

首先，先種約 1×10^5 的細胞於六孔盤中，待收集的時間確認細胞的 confluence 約 80% 以下避免細胞間接觸性抑制生長，而造成 mRNA 表達的影響，每個 well 約加 0.5 ml 的 TRIzol® reagent，靜置 5 分鐘後以 scrapper 輕輕將細胞刮下並收集於 1.5 ml 微量離心管中。加入 chloroform (0.2 ml / 1ml TRIzol® reagent)，振搖混合均勻，室溫靜置 15 分鐘，然後置於 4°C 下 12000 X g 離心 15 分鐘。離心完後主要會分成 3 層，上層為水層，下層為 phenol 層，中間薄層含 genomic DNA。收集上層的溶液至新的微量離心管中，以非極性溶媒 isopropyl alcohol (0.5 ml / 1ml TRIzol® reagent) 進行沉澱，靜置室溫 10 分鐘。於 4°C 下 12,000 X g 離心 10 分鐘，傾倒出上清液，可以發現 RNA 在離心管底部形成膠狀團塊。使用 75% 酒精約 1:1 (TRIzol® reagent) 清洗團塊，然後 4°C 下以 7,500 X g 離心 5 分鐘，傾倒出上清液，風乾團塊。最後以 50 μ l DEPC H₂O 復溶。

取約 1 μl RNA extract 產物加入 49 μl DEPC H_2O 做 50 倍稀釋，先以 50 μl DEPC H_2O 使用核酸蛋白質計算儀進行校正。然後連續 3 次每次 50 μl 的 50 倍稀釋溶液，測量 OD 值。一般而言，核酸的濃度評估是以吸光值在 260 nm 和 280 nm 的比值作為依據。當 $A_{260} = 1$ 時，表示 RNA 核酸的濃度為 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 。測蛋白質則以 A_{280} 為準。測核酸濃度時， A_{260} / A_{280} 比值最好在 1.8~2 之間。

十一、反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

所謂 RT-PCR 包含兩個步驟，首先先進行反轉錄反應將 RNA 反轉錄成 cDNA 後，再進行聚合酶鏈反應使 cDNA 經過多次的聚合反應增加 cDNA 的量。

反轉錄的方法是先取 2~4 μg RNA，1 μl oligo-dT primer，1 μl 10 mM dNTP 和 DEPC- $\text{D}_2\text{H}_2\text{O}$ 總共 13 μl ，加熱 65 $^\circ\text{C}$ 15 分鐘使 RNA 伸展開後，馬上冰浴 5 分鐘。接著短暫且溫和的振搖和離心以確保混合均勻。再加入 4 μl 5 x first strand buffer，2 μl 0.1 M DTT 以 42 $^\circ\text{C}$ 加熱 2 分鐘後迅速加入 1 μl superscript III (Invitrogen®) 持續 42 $^\circ\text{C}$ 加熱 50 分鐘，然後 72 $^\circ\text{C}$ 加熱 15 分鐘。

聚合酶鏈反應，取反轉錄反應後的產物 0.5~2 μl ，18.5 μl D_2

-H₂O, 2.5 μl 10 X viogen PCR buffer, 0.5 μl 10 mM dNTP, 0.5 μl forward primer (10 μM), 0.5 μl reverse primer (10 μM), 最後加 0.5 μl Taq DNA polymerase。先加熱至 94 °C 4 分鐘，酶鏈反應的條件是 94 °C 30 秒，annealing 45 秒 (annealing 溫度會依使用的 primer 不同而有所改變)，72 °C 30 秒 (extension 的時間會依照最終產物的鹼基對大小而有所改變，一般而言，Taq polymerase 的效率是 1000 bp / min)。依此條件實行 30 個循環後，72 °C 10 分鐘，靜置於 4 °C。

短暫且溫和離心後，取 10 μl sample 利用 2 % agrose gel 分離與分析。

Primer 的設計，可以是查閱先前研究的期刊論文尋找適用且可以作用的 primer set 或是由網路資料庫搜尋設計 (Tab. 1)。

首先先尋找 NCBI Sequence Viewer v2.0

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，找到人類的目標基因的 full-length cDNA sequence 後，接著使用 Integrated DNA Technologies 所開發的 IDT SciTools Primer QuestSM 將 full sequence 貼上搜尋設計。

Primer 設計的選擇：

1. G + C content 最好要大於 50 %。
2. 設計的 primer 會有兩條，一是 forward primer，另一是 reverse

primer。兩條 primer 的 annealing temperature (T_m) 差距不可太大，最好是在 $2 \sim 4^\circ\text{C}$ 以下。

3. 最後 6 mer 內，不要多於 4 個 G or C。
4. 3' 端最好 2~3 個連續 G or C。
5. 設計的 primer 最少要 18 mer 以上，一般在 18~25 之間。

選擇好要使用的 primer set 後，上網 Blossom Biotechnology Inc.

(<http://www.blossombio.com.tw/c-inner0.html>) 訂購。



第四章 結果

一、抑制鼻咽癌細胞的增殖

實驗的結果顯示，cephalochromin 對許多腫瘤細胞株都有抑制細胞增生的效果，尤其是鼻咽癌細胞株 (HONE-1 和 NPC-TW01)。根據抑制細胞增殖實驗，我們利用 MTT assay 的方法測量殘存細胞的粒腺體功能，在 570 nm 光源下偵測 formazan 的吸光值，定量藥物處理 72 h 後抑制 50% 細胞增生 (IC_{50}) 的有效濃度。得到其各別的 IC_{50} 如 Tab. 2。其中 cephalochromin 對 NPC-TW01 的 IC_{50} 是 $0.77 \pm 0.41 \mu M$ (Fig. 2)，對 HONE-1 的 IC_{50} 是 $1.18 \pm 0.37 \mu M$ (Fig. 3)。在我們實驗的所有細胞中，這兩株 NPC 細胞株亦是對 cephalochromin 處理後反應相對最敏感者。因此我們特別選用此兩株鼻咽癌細胞株做為實驗的細胞模式，對於 cephalochromin 的抗腫瘤機轉做進一步探討。

二、 G_1/S 細胞週期停滯

由 cell-proliferation assay 的結果顯示，cephalochromin 的確會造成抑制細胞增生的作用。至於這個化合物是透過什麼方法，什麼機制達成細胞增生抑制的作用？首先，我們想要了解腫瘤細胞抑制作用是否會經由影響細胞週期的運作來促成細胞停止增生？如果的確造成了影響，此化合物究竟會造成

哪一個細胞週期停滯？因此我們利用 propidium iodide 染色來偵測細胞週期 DNA 改變的狀態，接著使用流式細胞儀進行實驗數據的收集。根據我們的數據顯示 HONE-1 細胞株分別經 cephalochromin 1 μ M 藥物處理 24 ~ 72 小時後，細胞週期 G_1 的堆積比例從 40.46 % 增加到 64.48 %，同時，S 期的比例從 46.75 % 下降至 31.86 %， $G_2 \sim M$ 期的比例亦從 12.77 % 下降至 3.66 % (Fig. 4)。這說明 cephalochromin 會造成細胞有時間依賴性的 G_1 停滯趨勢。同時我們發現在 1 μ M 的化合物處理濃度下，HONE-1 細胞株在 72 小時後出現了 sub- G_1 的情形。意指細胞產生死亡的現象。不過，對 NPC-TW01 而言，產生 sub- G_1 的情形則較 HONE-1 來的晚，需經過 96 小時的化合物處理後，隨化合物處理濃度增加才會逐漸出現比例增加的 sub- G_1 (Fig. 11)，這樣的情形到了 120 h 的藥物處理後的增加比例更加明顯 (Fig. 12)。

更進一步，我們測試藥物是否跟產生細胞毒性而造成細胞停滯有任何劑量上的關聯性？

我們使用不同濃度的 cephalochromin 來處理細胞株 HONE-1 和 NPC-TW01。經過 24 h 後，從分析的數據得到細胞週期 G_1 的分佈比例分別從 40.46 % 升高至 51.39 % 和 45.41 % 升高至 57.7 %，而 S phase 也同樣有少部分的減低 (Fig. 5-6)。同樣情形在 48 h (Fig. 7-8) 和 72 h (Fig. 9-10)

經不同藥物濃度處理的細胞也同樣呈現 G_1 堆積的情形 (Tab. 3)。這也證明了 cephalochromin 同時造成藥物劑量依從性的 G_1 停滯。

三、細胞型態學變化

為了確認 cell-proliferation assay 細胞增生受到抑制的情形是由於凋亡路徑的引發或是壞死作用的引導。我們使用 Hoechst 33258 和 propidium iodide 兩種染劑進行細胞雙染的實驗。兩種染劑均可標記細胞的 DNA，其中的差異在於 Hoechst 33258 可以通過健康細胞的細胞膜進入細胞當中對細胞核和粒線體 DNA 進行標記，而 propidium iodide 則無法穿透健康細胞之細胞膜。

根據實驗的結果，發現 HONE-1 經過 cephalochromin 2 μ M 處理 24 h 後，在電子顯微鏡下呈現了典型 chromosome condensation 的情形 (Fig. 13)。這個結果顯示 cephalochromin 的處理讓細胞出現了凋亡的徵兆，也意味著細胞的死亡可能由於凋亡的路徑而來。

四、凋亡現象的偵測

隨著凋亡徵兆的出現，利用偵測凋亡的工具 Annexin V-FITC apoptosis detection kit II 來評估細胞經由凋亡路徑造成細胞死亡的比例是否隨著化合物處理的時間與劑量而有所增加。

Annexin V 是一種細胞內蛋白質，和 apoptotic cell 翻轉細胞膜上的 PS (phosphatidylserine) 有很強的結合特性 (Fig. 14)，在 Annexin V 上接了一個 fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光基團。因此當細胞膜產生翻轉 phosphatidylserine 與 Annexin V 結合時，利用適當的雷射激發即可在流式細胞儀上偵測到螢光的波長約 521 nm (FL1)。

同時添加染劑 propidium iodide，它會與 DNA 結合。對一般正常的細胞而言，propidium iodide 無法穿透細胞膜進入細胞中與核糖核酸結合，只有在進行死亡中的細胞，其細胞膜的功能已失去，因此 propidium iodide 可以容易進到細胞中與核糖核酸結合。一旦 propidium iodide 和核糖核酸結合，它的螢光的強度可提高 20~30 倍，因此只要經過適當的雷射激發，即可在流式細胞儀上偵測到 562~588 nm (FL2) 的螢光。

因此我們處理 Annexin V-FITC 和 propidium iodide 雙染的細胞，經由流式細胞儀的偵測，一般正常的細胞呈現 Annexin V-FITC (-)、propidium iodide (-)，early apoptotic 細胞呈現 Annexin V-FITC (+)、propidium iodide (-)，late apoptotic 細胞呈現 Annexin V-FITC (+)、propidium iodide (+)。

經過 Annexin V-FITC / propidium iodide 雙染偵測凋亡現象的實驗結果發現，不同劑量的 cephalochromin 造成了細胞染色 Annexin V-FITC (+)，propidium iodide (-) 比例增加的現象，分別從 24 h 的 2.14% 增加到 5.21

%，48 h 的 1.04 % 到 15.63 %，72 的 4.75 % 到 32.86 % (Tab. 4)。同樣的，以同一濃度的藥物處理的細胞，經過 24 h、48 h、和 72 h，Annexin V-FITC (+)，propidium iodide (-) 比例亦隨時間增加而增加，以 8 μ M 處理的細胞為例，其增加的比例由 24 h 的 5.21 % 升高到 72 h 的 32.86 %。

由實驗的數據發現，cephalochromin 所引起的細胞死亡是經由凋亡路徑的引發而來。

五、Caspase 系列蛋白質表現情形

根據細胞週期分析的結果，我們看到經過 HONE-1 和 NPC-TW01 分別經 72 小時 1 倍 IC_{50} 藥品濃度和 96 小時藥物處理後，出現 sub- G_1 。經由 Hoechst 33258 / propidium iodide 雙染，看到細胞形態上出現 chromosome condensation 的情形。p53 蛋白質表現在實驗數據上有被提升的情形。顯示出可能有某些凋亡的路徑牽涉其中，因此我們抽取不同時間處理的細胞碎片中的蛋白質，使用西方墨點法檢視影響細胞凋亡路徑的 caspase 訊號傳遞鏈是否有被啟動，進而研究何種 caspase 受到影響 (Fig. 16)。

首先我們看到經過不同藥物濃度處理後的細胞，caspase 8 的蛋白質表現量。我們發現隨著藥物濃度的增加，斷鏈的 caspase-8，也就是被活化的 caspase-8 有被啟動的情形 (Fig. 17A)。這說明 cephalochromin 造成細胞凋

亡的路徑可能是經由 caspase-8 的活化所造成。

另外，caspase-9 蛋白質的表現，我們發現有被引導上升的趨勢，但是經斷裂活化的 caspase-9 並沒有相對的增加 (Fig. 17B)。這是一個有趣的現象，所以我們用 RT-PCR 來檢測 caspase-9 的基因層次是否有被提升。從 RT-PCR 實驗結果上看來 (Fig. 18)，caspase-9 的基因在加藥組中反而較控制組的來的少，顯示有被消耗的情形。

由 caspase-8 和 caspase-9 的蛋白質表現比較，我們推斷，cephalochromin 導致細胞凋亡的路徑是經由 caspase-8 的活化而來。

進一步，我們也要來研究 caspase 8 活化後的下游蛋白質表現情形，caspase-3 / -7 以及 PARP 是否有被活化，如此一來才能確認 caspase-8 所引發的一連串訊號傳遞鏈引導凋亡的路徑。

從 caspase-7 的西方墨點法的實驗結果 (Fig. 17C)，發現 full length 的 caspase-7 雖然在有加藥的情況下減少表現，不過，被切斷的 cleavage caspase-7 並未看到明顯得提升。因此這個部分的結果需再做確認。

六、Fas / FasL 蛋白質表現情形

從 caspase-8 的活化情形，推測其活化結果可能是由上游的訊號傳遞而來 (Fig. 16)，因此我們追蹤 caspase-8 上游的蛋白質 FAS / FasL 表現。結

果發現不論是 Fas 或者是 FasL 的蛋白質表現在兩株細胞株上均有被觀察到提升的情形 (Fig. 19)。

七、P53 基因以及蛋白質表現情形

因為從細胞週期實驗的分析，cephalochromin 造成了 G₁ 細胞週期的停滯，因此細胞停止的增殖。因此更進一步研究何種蛋白與 G₁/S 停滯有關。從很多研究報告發現，p53 可以調控細胞週期而影響腫瘤細胞的生長。因此，我們針對 p53 蛋白質的變化做研究是否細胞週期的停滯與 p53 的參與有關？

我們利用西方墨點法來研究 p53 蛋白質的表現情形，發現隨著藥物處理時間增加，p53 表現的濃度有呈現增加的趨勢 (Fig. 22A)。所以 cell cycle arrest 可能是經由調控 p53，進而活化 p53-mediated cell signaling pathway 的結果。我們也使用 RT-PCR 檢查 p53 m-RNA 的變化。結果顯示經過處理的細胞其 p53 的 m-RNA 的表現也將會被提升 (Fig. 21)。這個結果指出 p53 的引導不但在蛋白質層次被提升，而且在基因層次也被提升，而更可以確認，p53 有被誘導增加的情形。

p53 的表現被提升的同時，活化的 p53 是否也被提升也是個重要的問題？也就是磷酸化的 p53 是否有增加？p53 可被磷酸化的位置很多[23] (Fig. 20)，藉由西方墨點法，偵測 p53 (ser15) 和 p53 (ser20) 不同的磷酸化位

置中，是經由那個位置被磷酸活化。將有助於判斷 p53 的活化在訊號傳遞中所扮演的角色。結果發現，p53 磷酸化的位置，主要在 ser20 的位置 (Fig. 22B)。

八、p53 下游蛋白質 p21 的表現情形

從 p53 在 ser20 的位置上被磷酸化而啟動的情形，推測 p53 下游的 p21 Cdk inhibitor gene 也會被活化而造成細胞的停滯。

因此利用西方墨點法來偵測 p21 的表現情形 (Fig. 23)。由結果發現經過 cephalochromin 4 μM 處理 24 h 後的細胞其 p21 的表現與控制組比較是有差異性的提升，但是 48 h、72 h p21 的表現就逐漸的下降了，這和 p53 ser20 磷酸化的表現是有出入的。

九、p53-independent G_1 arrest 相關蛋白質表現

同時檢測了 p53-independent G_1 arrest 的相關蛋白質 Cdc25A。Cdc25A 是一種 dual-specific phosphatase，其作用為活化 Cyclin / CDK complex，造成複合體的解離，使細胞週期繼續進行。實驗結果顯示 Cdc25A 經過化合物處理後，其蛋白表現量降低 (Fig. 25)。

另外我們也追蹤 Cdc25A 的上游蛋白 Chk2 的表現情形，由實驗結果顯

示 Chk2 的蛋白表現也下降 (Fig. 26)。



第五章 討論

我們的實驗從藥物的篩選開始，首先會進行初步的篩選，使用 0 μM ，20 μM ，50 μM 濃度的藥物進行初步的篩選，處理 A498 (renal carcinoma)，HCT116-1 (colon carcinoma)，Hep3B (hepatoma)，H661 (lung carcinoma)，NPC-TW01 (nasalpharyngeal carcinoma) 等 5 株不同部位的細胞株。每個濃度都進行三重覆的實驗。初篩的結果算出的 IC_{50} 如果有小於 10 μM 才會更進一步縮小 dosing range。更進一步的 50% 細胞抑制藥物濃度的實驗，起始處理濃度降為 40 μM ，並進行四倍的 serial dilution 依次稀釋為 10 μM ，2.5 μM ，0.625 μM ，0.156 μM 等五個濃度加上 0 μM 總共六個濃度梯度，經過 MTT 處理後，由 ELISA reader 偵測 570 nm 的吸光值。扣除 blank 的吸光值後，將無加藥的控制組當成 100% 無抑制的狀態再去比較加藥後減少吸光值達 50% 以上者，使用內插的方式計算出抑制 50% 相對應的濃度，即是所謂的 IC_{50} 。

根據 MTT 實驗，我們得到 cephalochromin 對各個細胞株的 IC_{50} 分別是 $0.77 \pm 0.41 \mu\text{M}$ (NPC-TW01)， $1.18 \pm 0.37 \mu\text{M}$ (HONE-1)， $1.37 \pm 0.69 \mu\text{M}$ (CCRE-CEM)， $1.77 \pm 0.07 \mu\text{M}$ (Jurkat)， $2.21 \pm 1.39 \mu\text{M}$ (HCT-116)， $2.51 \pm 1.20 \mu\text{M}$ (NCI-H661)， $12.01 \pm 2.79 \mu\text{M}$ (A498) (Tab. 2)。每個細胞株的 IC_{50} 亦重覆三次的實驗，並兩兩 IC_{50} 的差距在兩倍之內。從實驗的結

果，鼻咽癌細胞株對 cephalochromin 比較敏感，因此比較低的藥物濃度即可達到細胞生長抑制的效果。故以下的藥物細胞作用的機轉均以鼻咽癌細胞株作為實驗的細胞株模式。

細胞增殖試驗的 MTT 實驗結果可能代表的結果有二：一是藥物引起了細胞的死亡，也就是藥物對於細胞有毒殺的作用 (cytotoxicity)；二是藥物造成細胞停止增生，也就是藥物對細胞生長產生抑制作用 (cytostatic)。

細胞週期的分析，是藉由 propidium iodide 專門與細胞內的 DNA 結合的特性，然後以流式細胞儀的雷射激發呈色，再由偵測其專屬散射波長 (562 ~ 588 nm) 的 detector FL2 收集數據。2N 的位置認定為細胞週期的 G₁ phase, 4N (約 2 倍 2N 距離) 的位置認定為細胞週期的 G₂ ~ M phase, 2N 到 4N 的區域認定為 S phase, 而小於 2N 的區域認定是細胞碎片 sub-G₁。

從實驗中，至少需要 1×10^4 的細胞才能進行分析和判讀，所以分析的細胞數量不能過少，否則無法分析。但也不能過多，因為過多細胞與細胞互相接觸的話，會造成細胞間的 contact inhibition。Contact inhibition 的產生將使細胞生長停滯，在流式細胞儀的偵測之下會發現有 G₁ accumulation 的情形。

經過 24 h, 48 h, 72 h 不同濃度 cephalochromin 化合物處理 NPC cell。我們發現正常增殖中的細胞株 G₁ 的分佈約在 35 ~ 45%，而經過藥物

處理過的細胞其 G_1 分佈的比例有隨著劑量增加而增加的趨勢，例如 HONE-1 細胞經過 24 h 不同藥物濃度處理後， G_1 分佈的比例從控制組的 40.46 % 增加到 16 μM 處理後的 51.39 % (Fig. 5)。不過，從數據中也發現，濃度在 1 μM 和 2 μM 處理之下，藥物處理 24 h 對於 cell cycle 並沒有太大的影響，到了 4 μM 的加藥組才和控制組的 G_1 產生了些微升高的差距，不過經過 48 h，72 h 後加藥組都出現了 G_1 accumulaion 的情形，到了 72 h，所有的加藥組都出現 sub- G_1 。為了有比較好的表現，往後的實驗都以 4 μM 和 8 μM 作為藥物理的濃度（約相當於 4 倍和 8 倍的 IC_{50} ）。

從 cell cycle 分析除了發現有細胞週期 G_1 phase 的停滯外，在 72 h 藥物處理的細胞組，在分析圖上都出現明顯 sub- G_1 。Sub- G_1 的產生透露了一個重要的訊息，就是細胞死亡。

細胞的死亡，可以分為壞死和凋亡[24]。兩者最主要的差別在於壞死的細胞通常起因於組織的傷害，其特徵為細胞腫脹並爆裂，釋放出他們的細胞內容物並造成周遭細胞的壞死反應通常在生物體內伴隨發炎反應的發生。而凋亡的細胞則經由計畫性的細胞死亡，初期一連串的細胞型態學上的改變引發細胞凋亡訊號的傳遞，瀕死的細胞會呈現細胞皺縮，DNA 濃聚並接著斷裂的情形。最重要的是，細胞內容物並不會被釋放是細胞外間質中，它們將形成凋亡小體（apoptosome）並經由吞食作用將之回收消化。而這樣的結果

並不會造成周邊細胞的大規模死亡引發發炎反應。因此經過 cephalochromin 處理的細胞所造成的死亡，我們檢測凋亡的特徵以便趨分細胞的死亡是由凋亡或壞死所造成。

所以在實驗的設計上，我們使用了 Hoechst 33258 / propidium iodide 雙染的方法以便檢測是否產生了凋亡的情形。另外，也使用 Annexin V-FITC apoptosis detection kit 來比較未處理藥物的控制組和加藥後的處理組在同時間藥物濃度不同，產生 early apoptosis 的比例有何不同；同劑量不同時間下又有何差異的表現。

從實驗的數據發現 (Fig. 9)，細胞株 HONE-1 在 cephalochromin 2 μ M 濃度處理 24 h。Propidium iodide 在未加藥的控制組和加藥組的圖上看來並沒有辦法進入細胞中 (Fig. 9-a, d)，雖然在綠色螢光激發下仍無法呈現鮮紅色螢光，所以細胞膜功能還在，表示細胞並未壞死。而 Hoechst 33258 則在細胞膜功能還在時即可進入細胞中並和細胞中的 DNA 結合，所以經 UV 激發產生藍色螢光 (Fig. 9-b, e)，此時稍可看見左上方的幾顆細胞的 chromosome 已有濃聚的情形產生。而最後疊圖 (Fig. 9-c, f) 更加確定 Hoechst 33258 (+)，propidium iodide (-)，所以 cephalochromin 將造成具有 apoptotic feature 的 chromosome condensation。

另外，從 Annexin V-FITC apoptosis detection 的實驗中發現，藥物處理 24 h 後，未加藥的 Annexin V-FITC (+)，propidium iodide (-) early apoptosis 比例從控制組的 2.14 % 升高至 8 μ M 處理的 5.21 % (Tab. 3)，雖然 24 h 4 μ M 的比例只有 3.01 %，不過和控制組相較之下還是增加了 50 %。同樣的情形在 48 h 時也是一樣，但在 8 μ M 處理的這組則從 24 h 的 5.21 % 升高到 15.63 % (Tab. 3)。到了 72 h 更升高至 32.86 % (Tab. 3)。從藥物處理濃度增加的情形和 early apoptosis 比例增加的情形看來，兩者似乎有正向的相關關係。也就是 cephalochromin 處理的濃度越高，造成細胞 early apoptosis 的比例就越明顯增加。此外，從處理藥物時間和 early apoptosis 比例的關係來看，2 μ M 的藥物處理和控制組相比雖然會造成細胞的死亡，但效果並不明顯。4 μ M 的藥物處理在前 48 h 也有一樣的結果，不過 72 h 後其早期凋亡的比例明顯的增高，顯示較低劑量的 cephalochromin 對細胞死亡有 late response 的情形。而到了 8 μ M 細胞 early apoptosis 的比例則呈倍數的增加 (Tab. 3)。

從實驗中發現了一個問題，在每個控制組的 FL1 / FL2 中 (Fig. 11)，右上角都有出現的 late apoptosis 的情形，判斷是由於我們使用的是貼盤的細胞，因此在上流式細胞儀時，須以 EDTA-trypsin 處理讓細胞懸浮，但也有可能因為如此造成細胞膜傷害不完整，所以在添加染劑時，propidium iodide

滲入細胞當中所造成的結果。曾以 CellQuest pro 的軟體調整 FL1 和 FL2 的 compensation 仍得不到滿意的改善。

從 apoptosis detection 的實驗既然發現了藥物造成細胞死亡經由凋亡所造成，接下來我們要研究凋亡的路徑為何？以及參予凋亡的蛋白質的表現情形。目前有 2 個熟知的凋亡訊號傳遞鏈 (Fig. 16)，一是死亡受體路徑 (the death receptor pathway)，又稱為外始路徑 (extrinsic pathway)；另一是粒線體路徑 (the mitochondria pathway)，又稱為內始路徑 (intrinsic pathway)。

所以為了確認 cephalochromin 是經由內始或外始路徑造成細胞凋亡，我們檢測了 NPC 細胞株蛋白質 caspase-8 和 caspase-9。結果發現 caspase-8 在 24 h 4 μ M 的處理下有明顯的被啟動斷鏈的情形，反之，caspase-9 則看不到這樣被斷鏈的情形。因為一般情形下，caspase activity 是不活化的，所以一般是以 procaspase 的形式存在，當有訊號啟動，procaspase 就會被切斷而活化。因此我們認為 cephalochromin 會啟動 caspase-8 而活化經由外始路徑產生的凋亡。

為了確認這點，同時我們也檢測了 Fas / FasL 的表現。發現 Fas / FasL 的表現在控制組與藥物處理組有差異的表現 (Fig. 19)，也就是 cephalochromin 可能先與細胞外的 Fas / FasL 先結合，引導 Fas / FasL 的蛋

白質表現提升，然後啟動了 death receptor 下游的訊號傳遞鏈，因而觸動了 procaspase-8 活化斷鏈。

接著，我們預期活化後的 caspase-8 將會活化下游的 executioner procaspase-3 / -7，所以也用 caspase-7 antibody 來偵測 caspase-7 活化的情形。在 full length caspase-7 的蛋白表現上有下降的情形，不過 cleavage form 的 caspase-7 並無太大的變化 (Fig. 17-c)，這點或許我們還需持續再做確認。如果能確認 caspase-3 / -7 是可以活化的，還要進一步檢測 late apoptosis marker : PARP 是否被活化斷鏈?這樣 cephalochromin 引導 apoptosis 的機轉就可更完整。

從 cell cycle analysis 的數據說明了，經過 cephalochromin 的處理，會造成鼻咽癌細胞株 G₁ phase accumulation，也就是造成所謂的 G₁ arrest。從文獻上發現[25, 26]，會導致 G₁ arrest 的機轉主要分為 p53-dependent 和 p53-independent。因此，p53 的表現與否，可以決定是否是 p53-mediate G₁ arrest 而引起的細胞凋亡。這個部份我們採用了西方墨點法，觀察經過化合物處理過的細胞，其 p53 的表現量是否和未處理藥物的表現量有無差異。另外，p53 的表現情形也和 Fas 有關[27, 28]，

但是，有文獻提到腫瘤細胞的 p53 基因常被突變。首先文獻上曾指出，蛋白質 p53 accumulation 在癌化的細胞中是很常見的[29, 30]，所以控制組

p53 具有較高表現是屬於常見的情形。也有文獻指出 NPC 的細胞株可能為了生存的關係，在 p53 基因上的 codon 280 有 G → C 產生 transversions 的情形，所以造成 p53 的異變[31]，這或許是 p53 表現量高的原因。有文獻指出 NPC-TW01 的 p53 功能是正常的[32]，不過也另有文獻研究指出 HONE-1 和 NPC-TW01 細胞株上的 p53 是突變的[33]，p53 突變將造成轉錄因子的功能受到干擾抑制。p53 存在細胞質中是沒有作用的，當 p53 要有作用時需型成四聚體。因此當這四聚體的 p53 都是 mutant type 時，p53 即失去其轉錄的功能，但如果有二個以上的 p53 是完整的，則 p53 會呈現部分的轉錄功能[34]。有文獻提到內生的突變 p53 和外生完整的 p53 同時在於細胞質中時，p53 失去的轉錄功能會被反轉回來[35]。從實驗的結果發現，雖然 p53 在控制組有高表現，不過經過化合物處理後的仍有明顯被提升的情形 (Fig. 14a)。綜此，後續我們會再針對實驗室所使用的細胞株 p53 狀態做檢測，以便確認 p53 轉錄的報導基因是否可以活化而執行其轉錄的功能。

事實上除了檢查了 p53 蛋白質的部分，我們也檢查了 p53 independent G₁ arrest 相關的蛋白質 Cdc25A，結果如 (Fig. 24)。我們發現 Cdc25A 呈現被 down-regulated。Cdc25A 是一種 dual-specific phosphatase，它的負調控機轉一般是經由磷酸化的 Chk2 所抑制。不過我們從磷酸化的 Chk2 表現上看不到 Chk2 有被活化的情形 (Fig. 25)。磷酸化後的 Chk2 即可抑制

Cdc25A 的去磷酸化作用因此始的下游的 cyclin E / Cdk2 複合體無法解離，細胞無法從 G₁ phase 進入 S phase。所以造成所謂的 p53 independent G1 arrest (Fig. 20)。近期的研究發現[36]，Cdc25A 的負調控也可來自 p53，不過這樣的調控是間接的，中間的機轉還未明確。因此我們推測 Cdc25A 的 downregulation 可能是由 p53 活化的原因，但這也解釋了磷酸化的 Chk2 未被提升的結果。除了 p53 蛋白質表現被提升，同時在基因層次的 p53 mRNA 經過 RT-PCR 的實驗也發現被提升的情形 (Fig. 13)。因此在蛋白質層次和基因層次兩方面來說，p53 都有被啟動的情形。

p53 蛋白質既然被提升了，我們再利用西方墨點法偵測 p53 ser15 和 ser20 是經由哪個位置的胺基酸磷酸化所造成活化，發現 p53 在 ser20 的位置上有明顯的提升，由此，cephalochromin 造成 NPC cell line 的 p53 堆積以及活化，進而可能由此活化下游阻斷細胞週期進行的相關蛋白質，因此在 p53 的下游部分，我們利用 p21 的抗體來偵測未處理藥物的細胞株和經過藥物處理後的細胞株是否有差異。結果發現控制組的 p21 蛋白表現是比較低的，而處理組細胞的 p21 則有被引導提升的現象，不過提升的程度和劑量或時間沒有成比例關係。

第六章 結論

從抗癌藥物的研發而言，從生物界中採集粹取分離出對抗癌症細胞的化合物是相當困難的一件事，例如從太平洋紫杉中提煉紫杉醇 (Taxol[®])。而要利用本地的資源去發展抗腫瘤的藥物，那也需要相當的人物力投資再加上十足的幸運才能找到具抗腫瘤活性的化合物。事實上，從自然中取法治療惡性腫瘤研究從以前就持續在進行[37]，多是從植物中去粹取。我們的研究則是從真菌中分離純化異於植物的化合物，而此真菌屬於台灣的特有種，在來源的取得上較方便，進而研究相關有效抗腫瘤的抑癌機轉，並從中研究腫瘤細胞特性與藥物之間關係。從 cephalochromin 的經驗，建立本實驗室抗腫瘤藥物篩檢的方法和抗腫瘤機轉研究的方法。

Cephalochromin 是具有抗癌活性的藥品[12]，從一系列的真菌提取物中，我們也發現了它擁有比其它化合物還好的抗腫瘤效果，尤其對於抑制 NPC 的效果優於其他部位的腫瘤細胞株。其 72 h 達 50% 細胞抑制的有效濃度可達 $0.77 \pm 0.41 \mu\text{M}$ (NPC-TW01) (Fig. 2)， $1.18 \pm 0.37 \mu\text{M}$ (HONE-1) (Fig. 3)。

從細胞週期分析，我們發現 cephalochromin 會造成 NPC 細胞株的生長停滯在 G₁ phase。這樣的停滯顯示 cephalochromin 是屬於具標靶專一性的抑制細胞週期的藥物。同時在實驗中發現，這樣的停滯於 72 小時後所有的

治療組逐漸都出現了 sub G₁，也就是細胞的死亡。

經由凋亡實驗的檢測，我們證實 cephalochromin 造成這樣的細胞死亡是經由凋亡路徑所引發。其特徵包括了 Hoechst 33258 / propidium iodide 雙染實驗在螢光顯微鏡下看到了 chromosome condensation 的情形和 Annexin V-FITC apoptosis detection kit 實驗發現細胞膜翻轉呈現 PS 的比例增加，而這些都是 early apoptosis 的特徵，因此也是日後造成細胞走向凋亡的原因。

G₁ 週期的 arrest，不論從 mRNA 層次或由 p53 西方墨點法的表現上看，p53 被提升的情形。同時也伴隨著 p53 在 ser20 的位置上磷酸化的程度明顯增加，所以 p53 的狀態是有被活化。p53 的下游 p21 蛋白質亦有被活化的情形，因此導致細胞停滯在 G₁ phase 的機轉是屬於 p53 dependent 的 G₁ arrest。另外，由於 Cdc25A 亦有被負調控的情形，雖然可能是屬於 p53 independent G₁ arrest 路徑被啟動，不過在 Chk2 的活化上我們並未看到明顯的變化，所以推測這是 p53 間接調控 Cdc25A 的結果。這個結果和前人的研究結果是一致的[36]。

cephalochromin 引發細胞產生凋亡，其凋亡路徑我們檢測了 caspase 一系列的蛋白質表現，發現 caspase-8 有被啟動的情形。因此推測這應該是與 caspase-8 相關的外始凋亡路徑有關。

從 Fas / FasL 的表現發現這個 caspase 的上游被啟動活化的蛋白表現

增加，我們可以確定 death receptor 被啟動。不過從 caspase-7 的表現，caspase-7 被啟動的情形並不明顯。這個部分需再做確認。

檢驗結果雖可以證實 cephalochromin 抗腫瘤的效果及其可能的原因，但 cephalochromin 抗腫瘤的機轉及訊息傳遞的影響仍有很多地方還未進行研究。這只是部分的研究成果，尚須更進一步實驗包括動物，臨床實驗證明是否 cephalochromin 可以成為一個成功的抗癌新藥。



參考文獻

1. Luo, J., et al., *Secular trends of nasopharyngeal carcinoma incidence in Singapore, Hong Kong and Los Angeles Chinese populations, 1973-1997*. Eur J Epidemiol, 2007. **22**(8): p. 513-21.
2. Hu, S.P., et al., *Genetic link between Chaoshan and other Chinese Han populations: Evidence from HLA-A and HLA-B allele frequency distribution*. Am J Phys Anthropol, 2007. **132**(1): p. 140-50.
3. Ho, C.H., et al., *Decoy receptor 3, upregulated by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1, enhances nasopharyngeal carcinoma cell migration and invasion*. Carcinogenesis, 2009.
4. Li, D.J., et al., *The dominance of China 1 in the spectrum of Epstein-Barr virus strains from Cantonese patients with nasopharyngeal carcinoma*. J Med Virol, 2009. **81**(7): p. 1253-60.
5. Fachiroh, J., et al., *Molecular diversity of Epstein-Barr virus IgG and IgA antibody responses in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of Indonesian, Chinese, and European subjects*. J Infect Dis, 2004. **190**(1): p. 53-62.
6. Yu, K.J., et al., *Cancer patterns in nasopharyngeal carcinoma multiplex families in Taiwan*. Int J Cancer, 2008.
7. ter Haar, E., et al., *Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol*. Biochemistry, 1996. **35**(1): p. 243-50.
8. Fullerton, S.A., et al., *Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide)*. Mol Urol, 2000. **4**(1): p. 7-13.
9. Zaidman, B.Z., et al., *Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005. **67**(4): p. 453-68.
10. Godio, R.P. and J.F. Martin, *Modified oxidosqualene cyclases in the formation of bioactive secondary metabolites: biosynthesis of the antitumor clavatic acid*. Fungal Genet Biol, 2009. **46**(3): p. 232-42.
11. Lutzky, V.P., et al., *Optimization of LMP-specific CTL expansion for potential adoptive immunotherapy in NPC patients*. Immunol Cell Biol, 2009.
12. Koyama, K., et al., *Cytotoxicity and antitumor activities of fungal bis(naphtho-gamma-pyrone) derivatives*. J Pharmacobiodyn, 1988. **11**(9): p. 630-5.

13. Hegde, V.R., et al., *SCH 45752--an inhibitor of calmodulin-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterase activity*. J Antibiot (Tokyo), 1993. **46**(2): p. 207-13.
14. Ishii, R., et al., *Inhibitory effects of fungal bis(naphtho-gamma-pyrone) derivatives on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon-gamma*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(5): p. 786-90.
15. Zheng, C.J., et al., *Cephalochromin, a FabI-directed antibacterial of microbial origin*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(4): p. 1107-12.
16. Chang, J.T., et al., *Induction of tubulin by docetaxel is associated with p53 status in human non small cell lung cancer cell lines*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 317-25.
17. Haskins, R.H. and C. Knapp, *Cephalosporium sp. (PRL 2070) and the production of cephalochromin*. Can J Microbiol, 1969. **15**(5): p. 435-7.
18. Carey, S.T. and M.S. Nair, *Metabolites of Pyrenomyces V. Identification of an antibiotic from two species of Nectria, as cephalochromin*. Lloydia, 1975. **38**(5): p. 448-9.
19. Matsumoto, M., et al., *Cephalochromin, dihydroisoustilaginoidin A, and iso-ustilaginoidin A from Verticillium sp. K-113*. J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(8): p. 602-4.
20. Martinez-Estrada, O.M., et al., *Association of junctional adhesion molecule with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK/LIN-2) in human epithelial caco-2 cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9291-6.
21. Ebert, B., A. Seidel, and A. Lampen, *Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists*. Carcinogenesis, 2005. **26**(10): p. 1754-63.
22. Xia, C.Q., et al., *Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(5): p. 637-43.
23. Yamauchi, M., et al., *Stabilization of alanine substituted p53 protein at Ser15, Thr18, and Ser20 in response to ionizing radiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(3): p. 906-11.
24. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 663-9.
25. Yonish-Rouach, E., *The p53 tumour suppressor gene: a mediator of a G1 growth arrest and of apoptosis*. Experientia, 1996. **52**(10-11): p. 1001-7.
26. Shao, Z., et al., *p53 independent G1 arrest and apoptosis induced by adriamycin*. Chin Med Sci J, 1997. **12**(2): p. 71-5.

27. Kim, J.M., Y.D. Yoon, and B.K. Tsang, *Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia*. *Endocrinology*, 1999. **140**(5): p. 2307-17.
28. Waring, P. and A. Mullbacher, *Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology*. *Immunol Cell Biol*, 1999. **77**(4): p. 312-7.
29. Niedobitek, G., et al., *P53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas*. *J Pathol*, 1993. **170**(4): p. 457-61.
30. Agaoglu, F.Y., et al., *P53 overexpression in nasopharyngeal carcinoma*. *In Vivo*, 2004. **18**(5): p. 555-60.
31. Spruck, C.H., 3rd, et al., *Absence of p53 gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas*. *Cancer Res*, 1992. **52**(17): p. 4787-90.
32. Chen, Y.R., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses DNA repair through the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in human epithelial cells*. *J Virol*, 2008. **82**(16): p. 8124-37.
33. Hoe, S.L. and C.K. Sam, *Mutational analysis of p53 and RB2/p130 genes in Malaysian nasopharyngeal carcinoma samples: a preliminary report*. *Malays J Pathol*, 2006. **28**(1): p. 35-9.
34. Sun, Y., et al., *Dosage-dependent dominance over wild-type p53 of a mutant p53 isolated from nasopharyngeal carcinoma*. *FASEB J*, 1993. **7**(10): p. 944-50.
35. Hwang, J.K. and C.T. Lin, *Co-localization of endogenous and exogenous p53 proteins in nasopharyngeal carcinoma cells*. *J Histochem Cytochem*, 1997. **45**(7): p. 991-1003.
36. Rother, K., et al., *p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A*. *Oncogene*, 2007. **26**(13): p. 1949-53.
37. Pezzuto, J.M., *Plant-derived anticancer agents*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **53**(2): p. 121-33.

Tab. 1 Primer information

name	Primer sequence	Yield bp
p53	forward primer 5'- GCGTGTGGAGTATTTGGA reverse primer 5'- GAGAGGAGCTGGTGTGTT	372 bp
Caspase 9	forward primer 5'- TGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA reverse primer 5'- AGAGTGAGCCCACTGCTCAAAGAT	146 bp
GAPDH	forward primer 5'- CCCATCACCATCTTCCAG reverse primer 5'- CAGTCTTCTGGGTGGCAGT	345 bp

Primer sets used in the experiment.



Tab. 2 IC₅₀ values of cephalochromin against human cancer cell lines.

Cell line	Cell Type	IC ₅₀ (μM)
NPC-TW01	nasopharyngeal carcinoma	0.77 ± 0.41
HONE-1	nasopharyngeal carcinoma	1.18 ± 0.35
CCRE-CEM	leukemia	1.37 ± 0.69
Jurkat	leukemia	1.77 ± 0.07
HCT-116	colon carcinoma	2.21 ± 1.39
NCI-H661	lung carcinoma	2.51 ± 1.2
A498	renal carcinoma	12.01 ± 2.79

Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 72 h. Cell survival were determined by MTT assay. The IC₅₀ value resulting from 50 % inhibition of cell growth was calculated graphically as comparison with control growth. Each value represents the mean ± S.D. of three independent experiments.

Tab. 3 The cell cycle distribution of cephalochromin treated HONE-1 cell

HONE-1	Conc.	G ₁ %	Site	G ₂ %	Site	S %	Debris %
24 h	0 μM	40.46	74.08	12.79	143.22	46.75	0.06
	1 μM	38.29	75.47	14.57	146.12	47.14	0.05
	2 μM	39.85	75.04	14.19	144.85	45.96	0.07
	4 μM	42.42	74.88	12.07	144.68	45.51	0.16
	8 μM	47.42	74.3	9.44	144.11	43.14	0.31
	16 μM	51.39	74.62	14.48	144.46	34.13	1.24
48 h	0 μM	58.05	73.3	12.93	142.72	29.02	0.06
	1 μM	58	73.73	12.41	143.01	30.03	0.77
	2 μM	57.39	73.17	11.45	142.38	31.16	0.18
	4 μM	61.64	73.09	7.05	142.55	31.3	0.37
	8 μM	69.44	73.19	7.41	141.19	23.09	1.8
	16 μM	64.49	73.45	12.55	142.1	22.97	10.06
72 h	0 μM	70.68	70.28	5.11	136.69	24.21	1.23
	1 μM	64.48	73.69	3.66	143.33	31.86	6.35
	2 μM	59.79	72.42	7.88	143.5	32.33	6.09
	4 μM	62.84	74.72	7.32	148.81	29.83	16.35
	8 μM	74.17	74.62	8.2	136.2	17.63	29.34
	16 μM	73.4	66.28	0.2	132.58	26.4	30.62

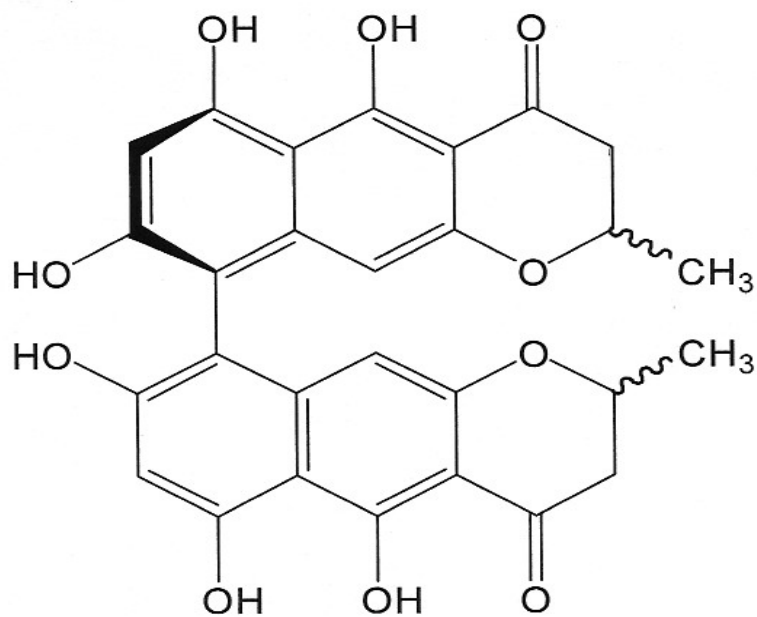
Cell cycle analysis data. HONE-1 treated without / with cephalochromin from 0 to 16 μM after 24 h, 48 h, and 72 h.

Tab. 4 The time & dosage studies of cephalochromin-induced apoptotic population distribution of HONE-1 cell

Time	Conc. uM	UL (necrosis)	UR (late apoptosis)	LL (normal cell)	LR (early apoptosis)
24 h	0	7.66 %	8.11 %	82.09 %	2.14 %
	2	6.14 %	9.29 %	80.09 %	4.48 %
	4	3.41 %	5.07 %	88.51 %	3.01 %
	8	4.39 %	3.54 %	86.85 %	5.21 %
48 h	0	2.6 %	5.84 %	90.52 %	1.04 %
	2	2.41 %	7.38 %	85.58 %	4.63 %
	4	2.26 %	6.58 %	88.74 %	2.42 %
	8	1.36 %	7.5 %	75.51 %	15.63 %
72 h	0	1.46 %	12.08 %	81.71 %	4.75 %
	2	1.26 %	9.4 %	82.39 %	6.95 %
	4	3.07 %	13.73 %	74.47 %	8.73 %
	8	0.74 %	5.32 %	61.08 %	32.86 %

UL : upper left UR : upper right LL : low left LR : low right

Partition data of HONE-1 treated without / with cephalochromin, after 24 h, 48 h, and 72 h, double stained with Annexin V-FITC and propidium iodide, detected by FACScan, analyzed by CellQuest pro.



LTH1-116-1

(Cephalochromin)

分子式： $C_{28}H_{22}O_{10}$

分子量：518

Fig. 1 Chemical structure of cephalochromin



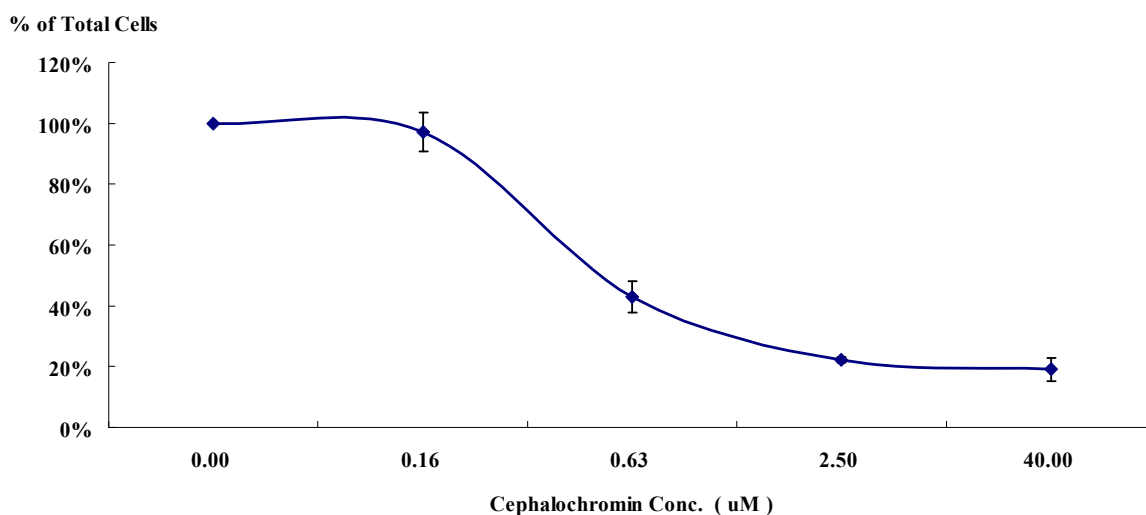


Fig. 2 Cephalochromin-induced growth inhibition in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 72 h. Cell survival were determined by MTT assay.

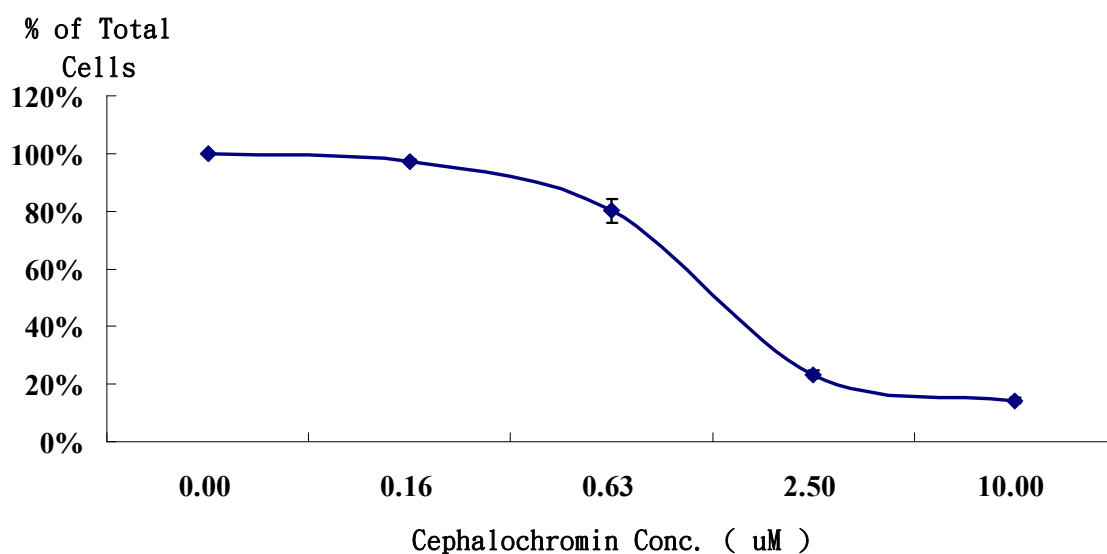
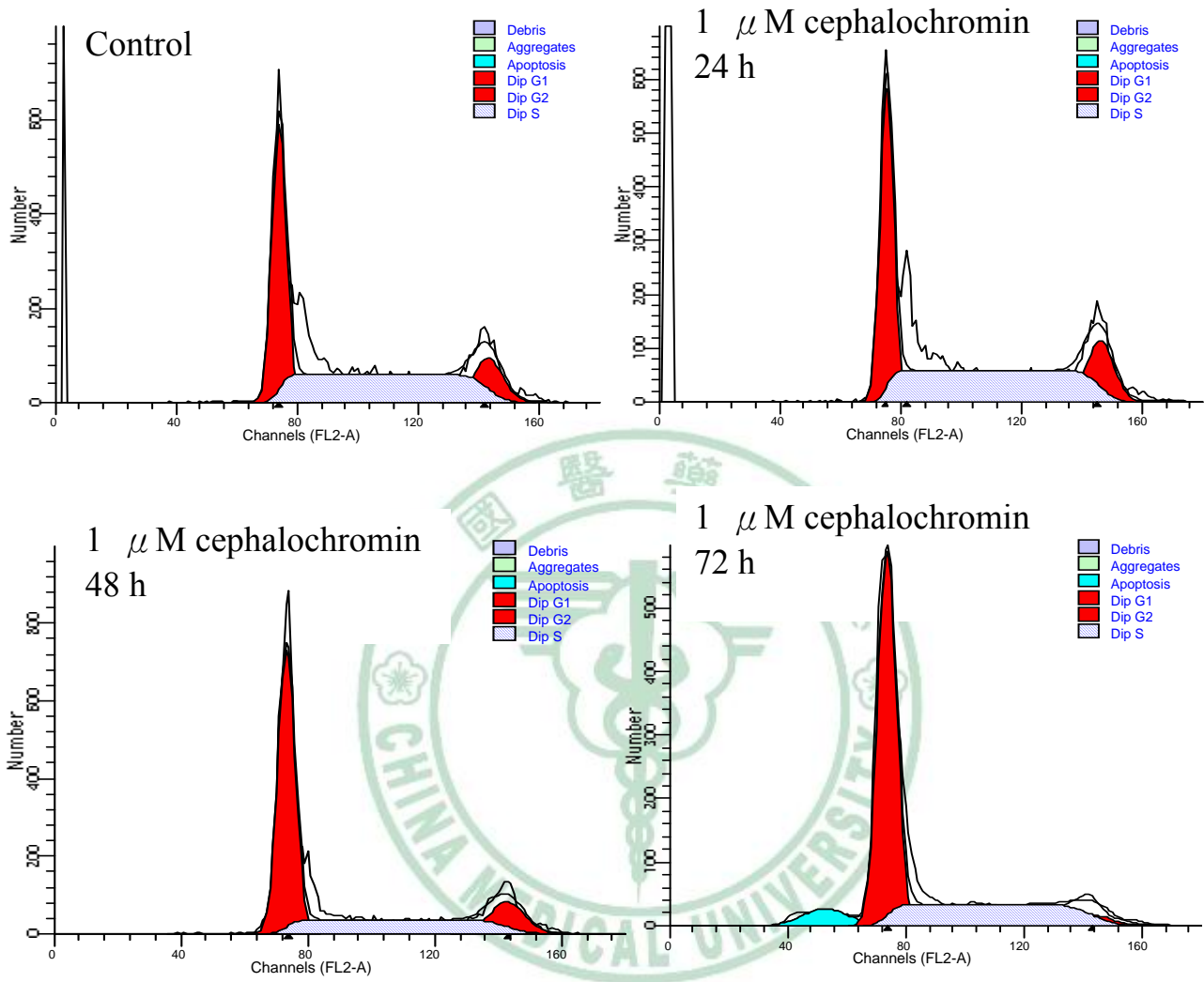


Fig. 3 Cephalochromin-induced growth inhibition in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 72 h. Cell survival were determined by MTT assay.

(A)



(B)

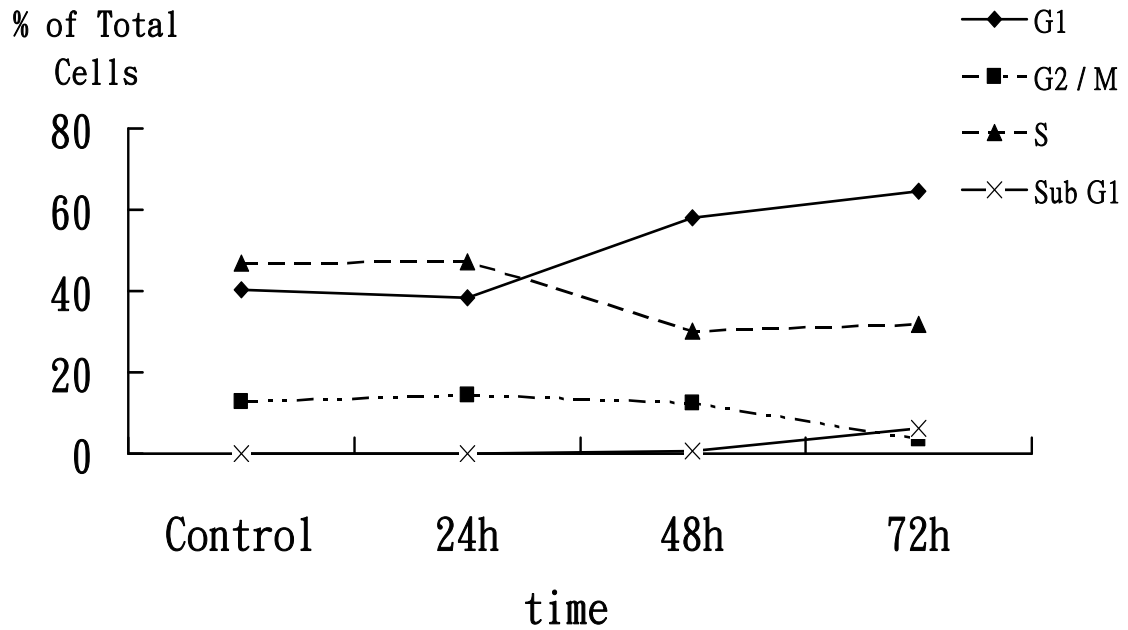
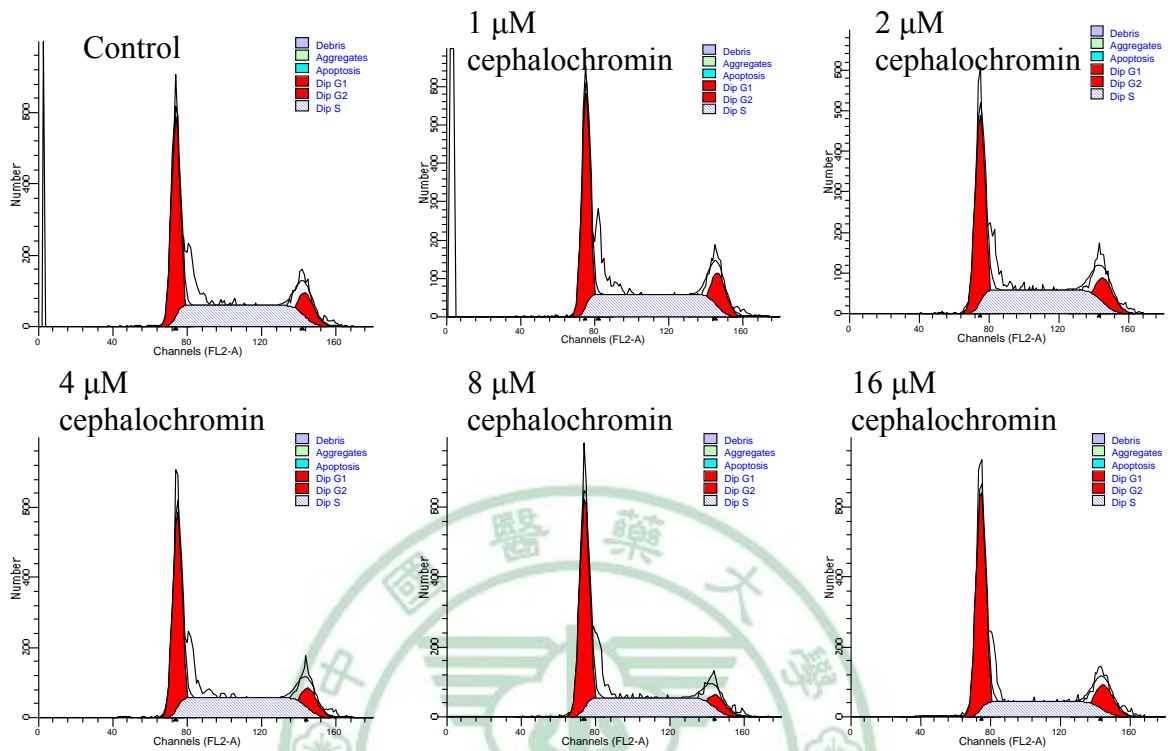


Fig. 4 Time effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with 1 X IC_{50} of test compound for the indicated time analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phased of cell cycle.

(A)



(B)

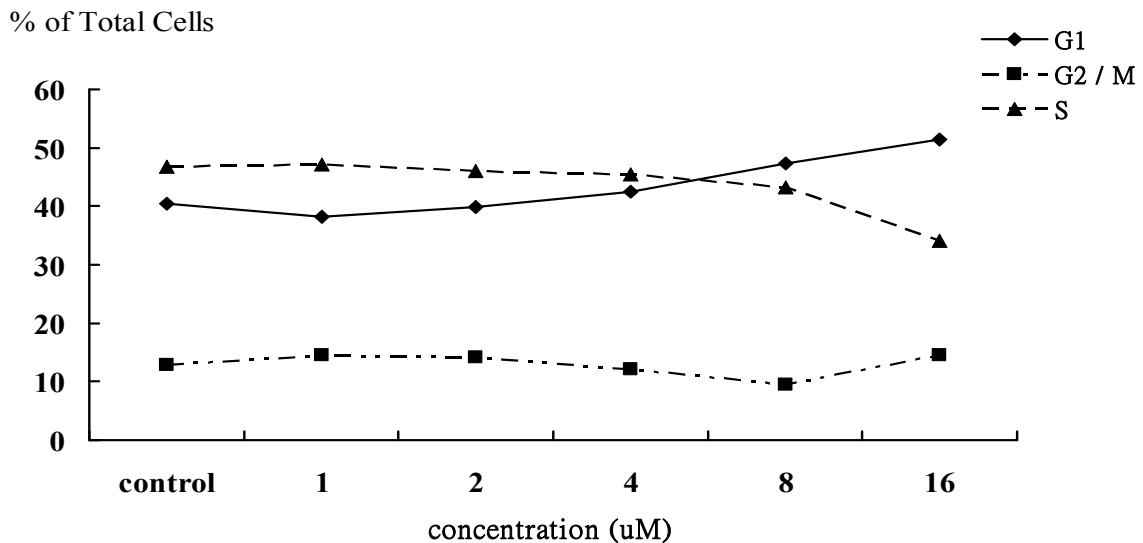
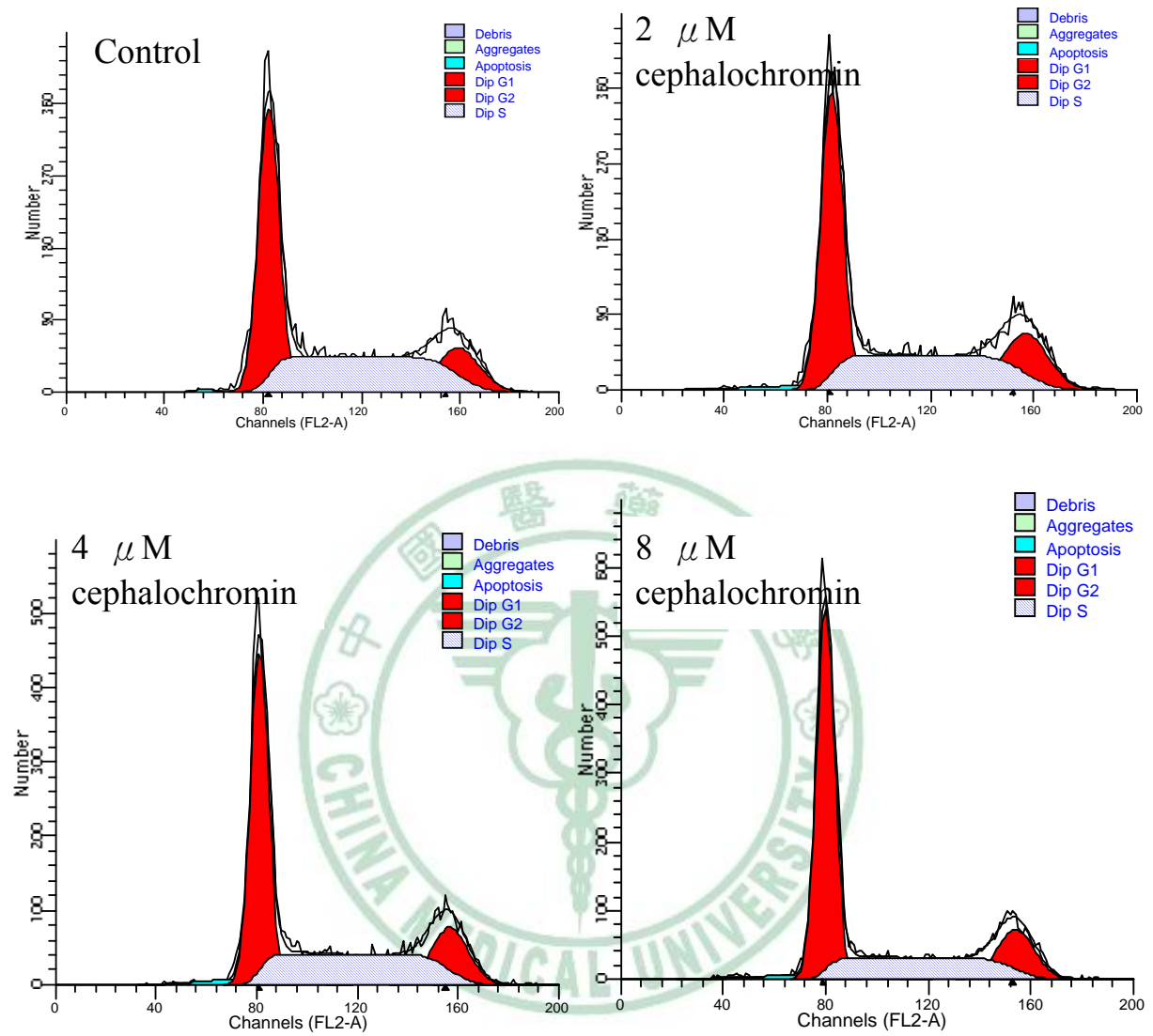


Fig. 5 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 24 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

(A)



(B)

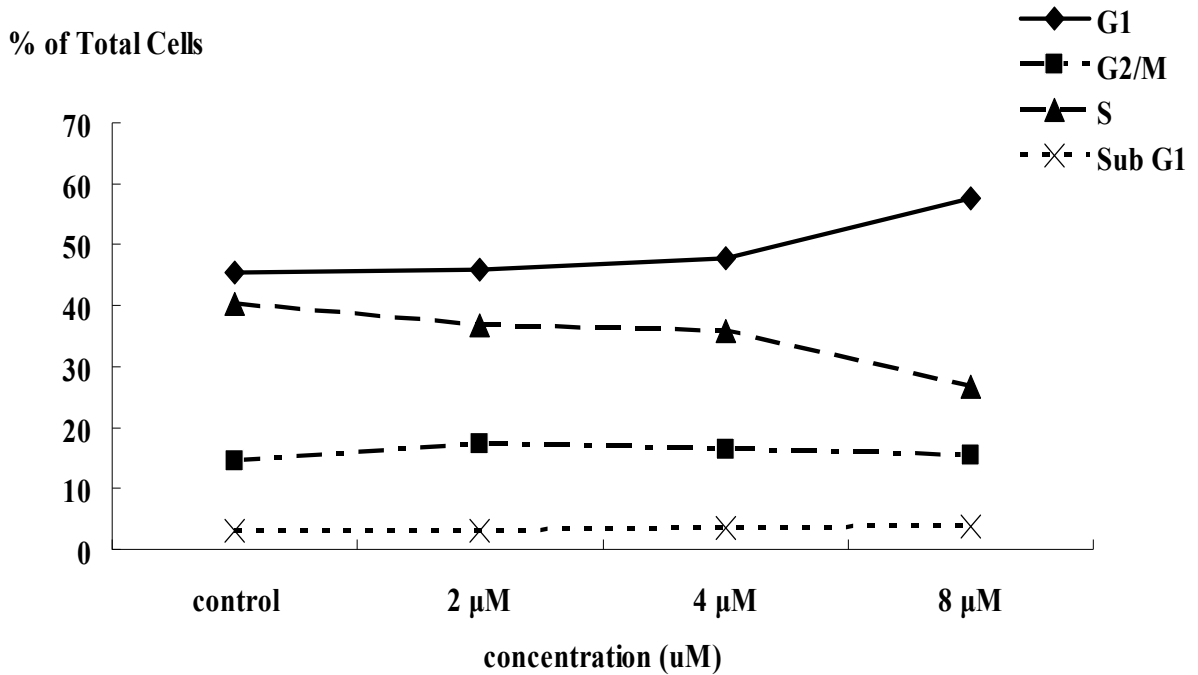
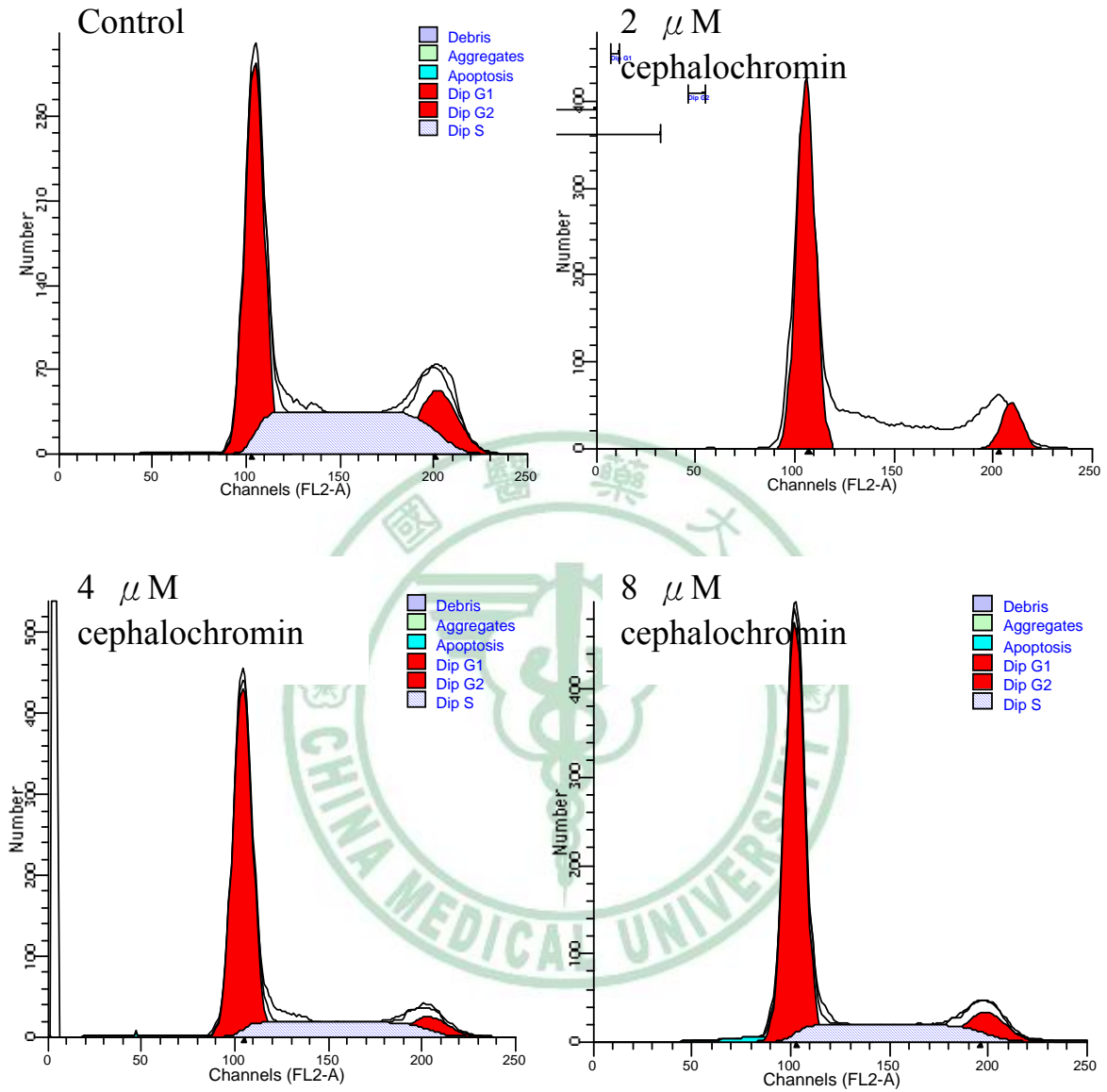


Fig. 6 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 24 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

(A)



(B)

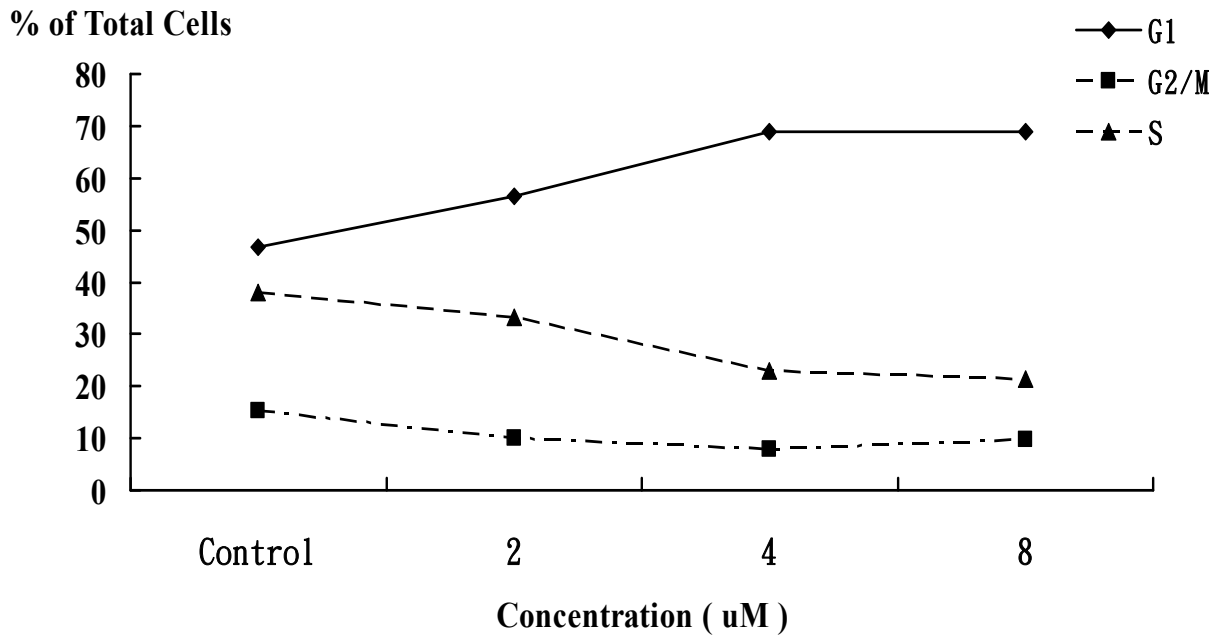
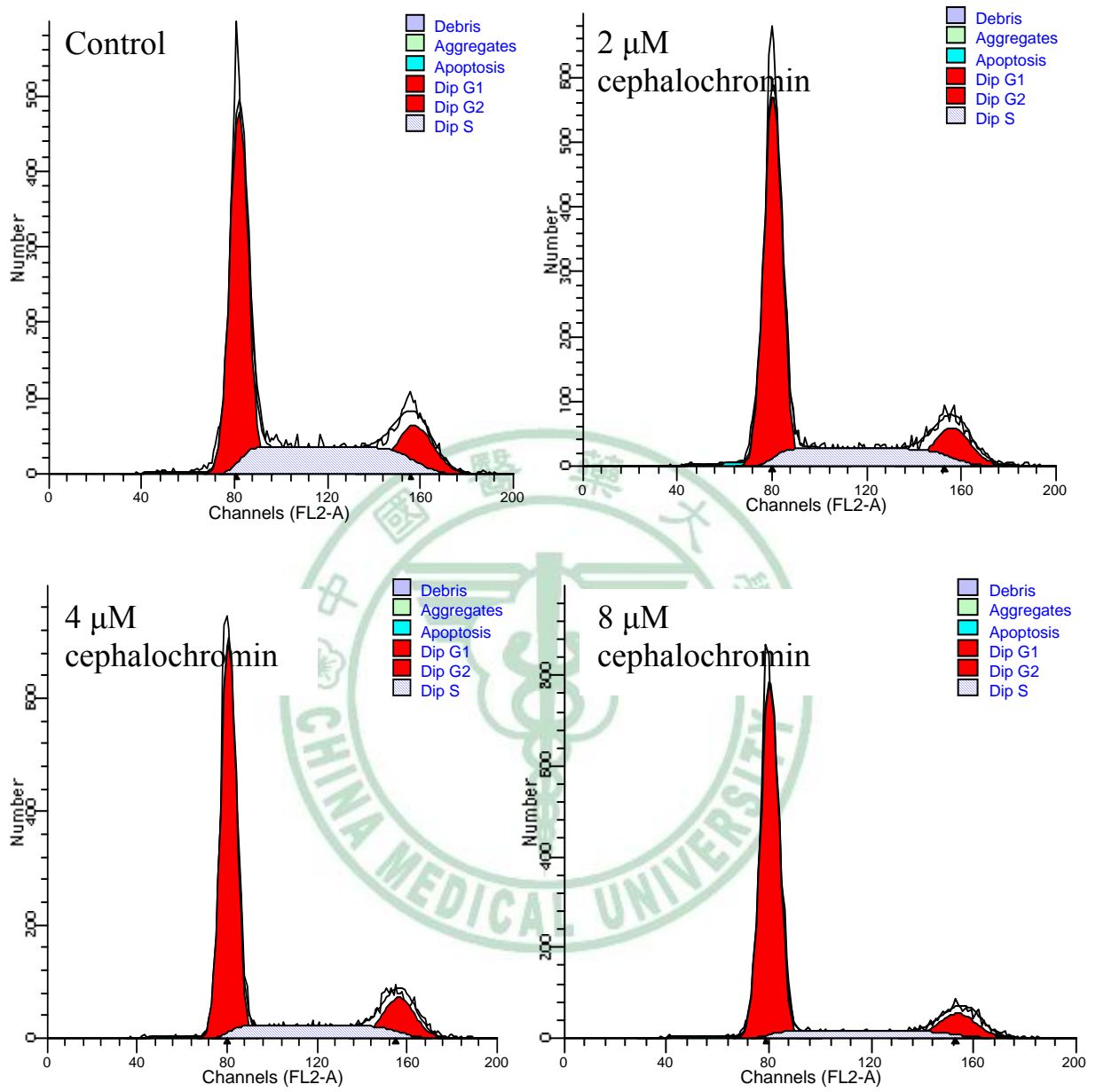


Fig. 7 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 48 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

(A)



(B)

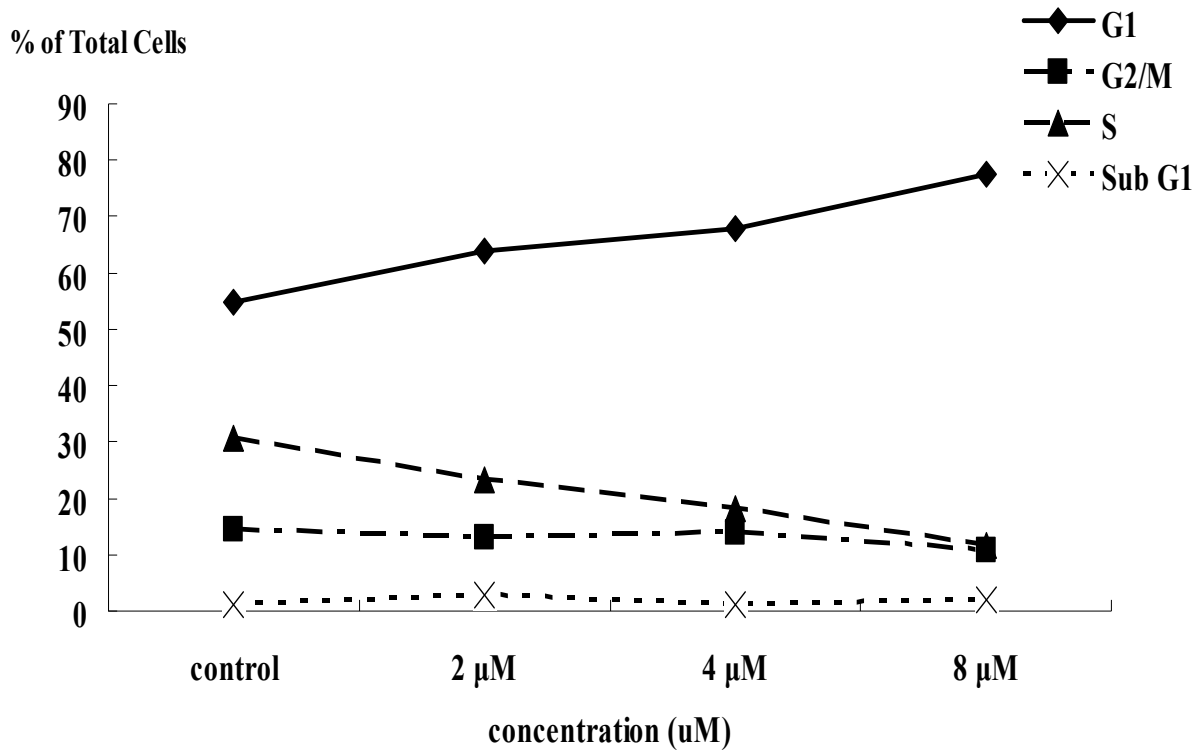
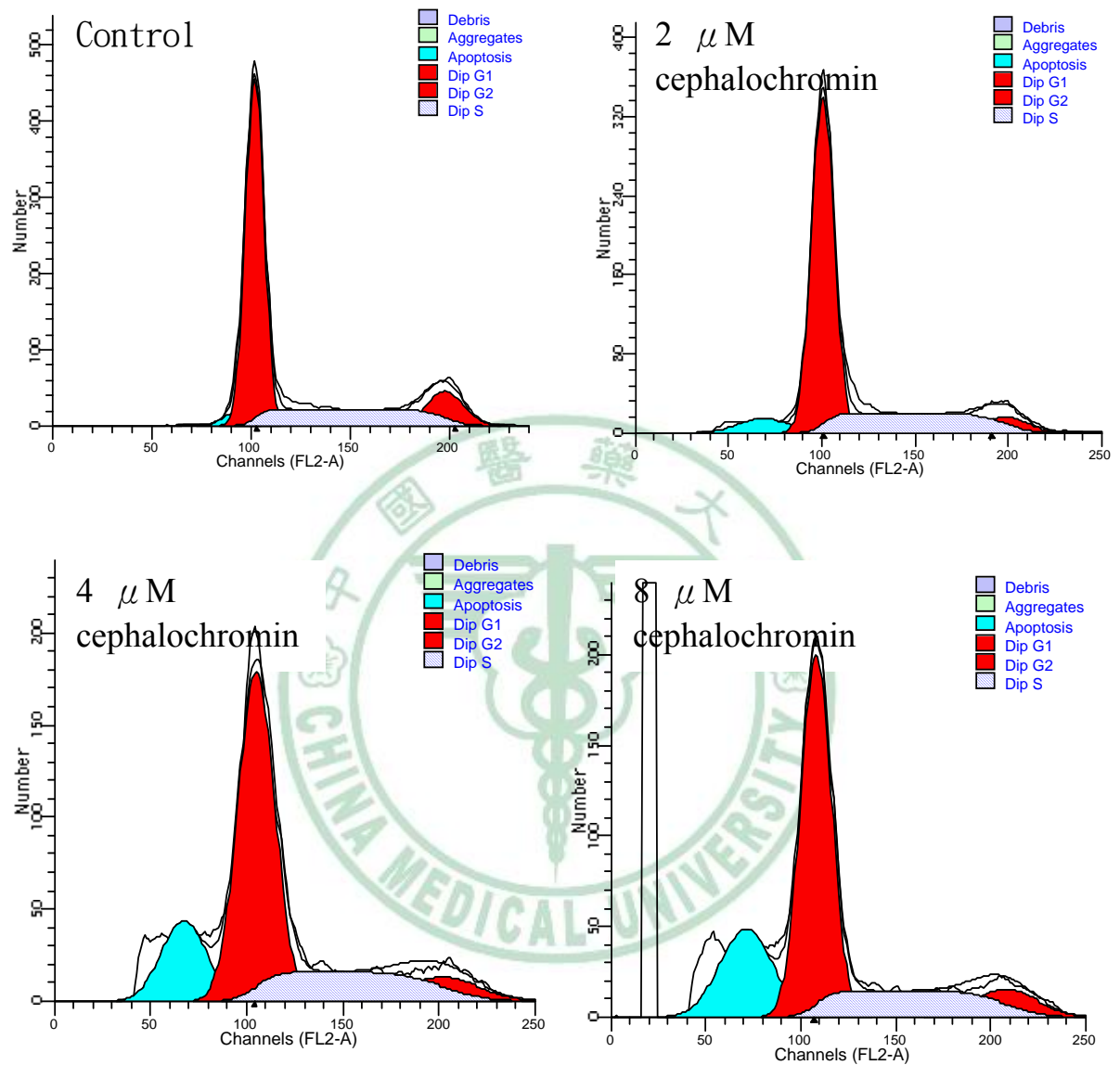


Fig. 8 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 48 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

(A)



(B)

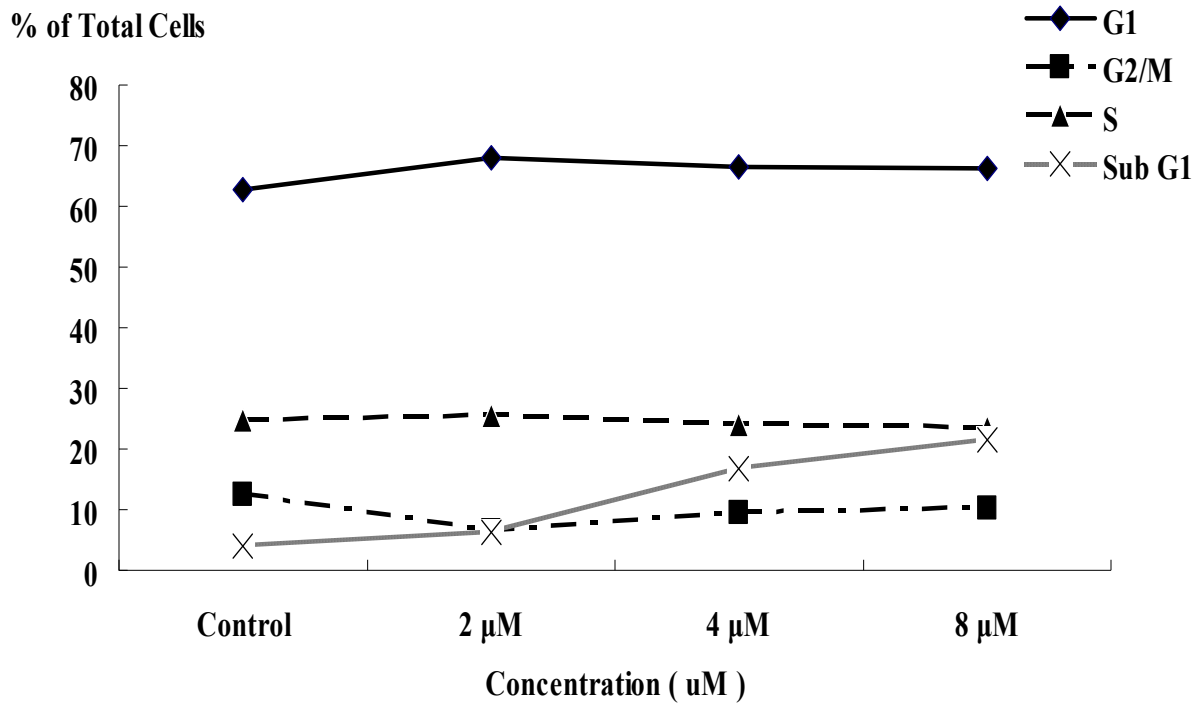
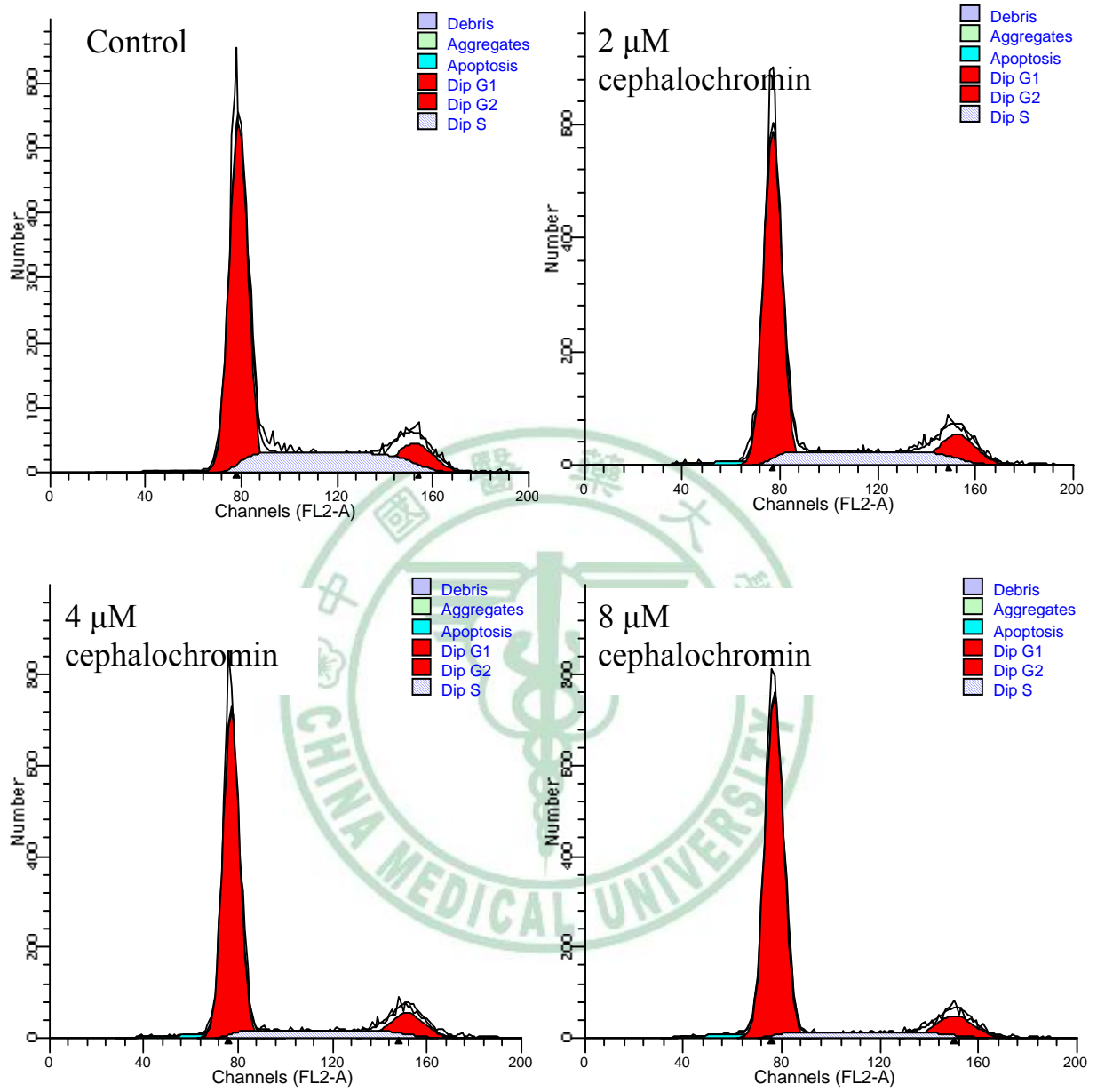


Fig. 9 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 72 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

(A)



(B)

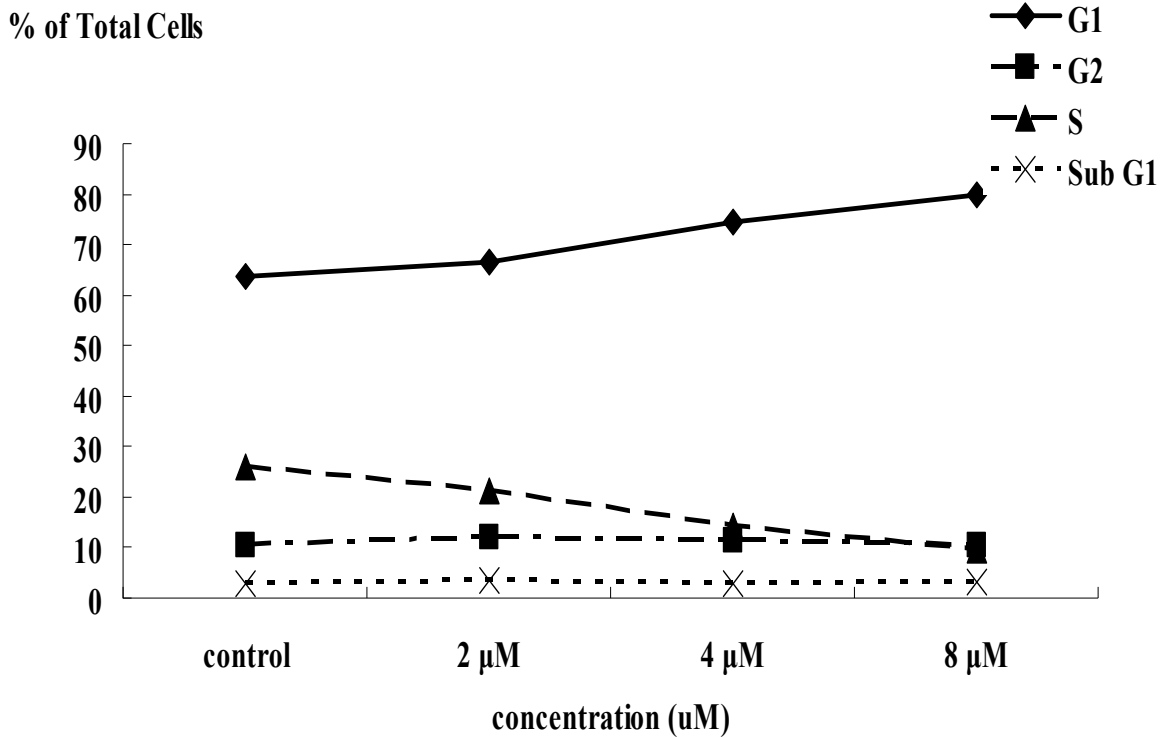
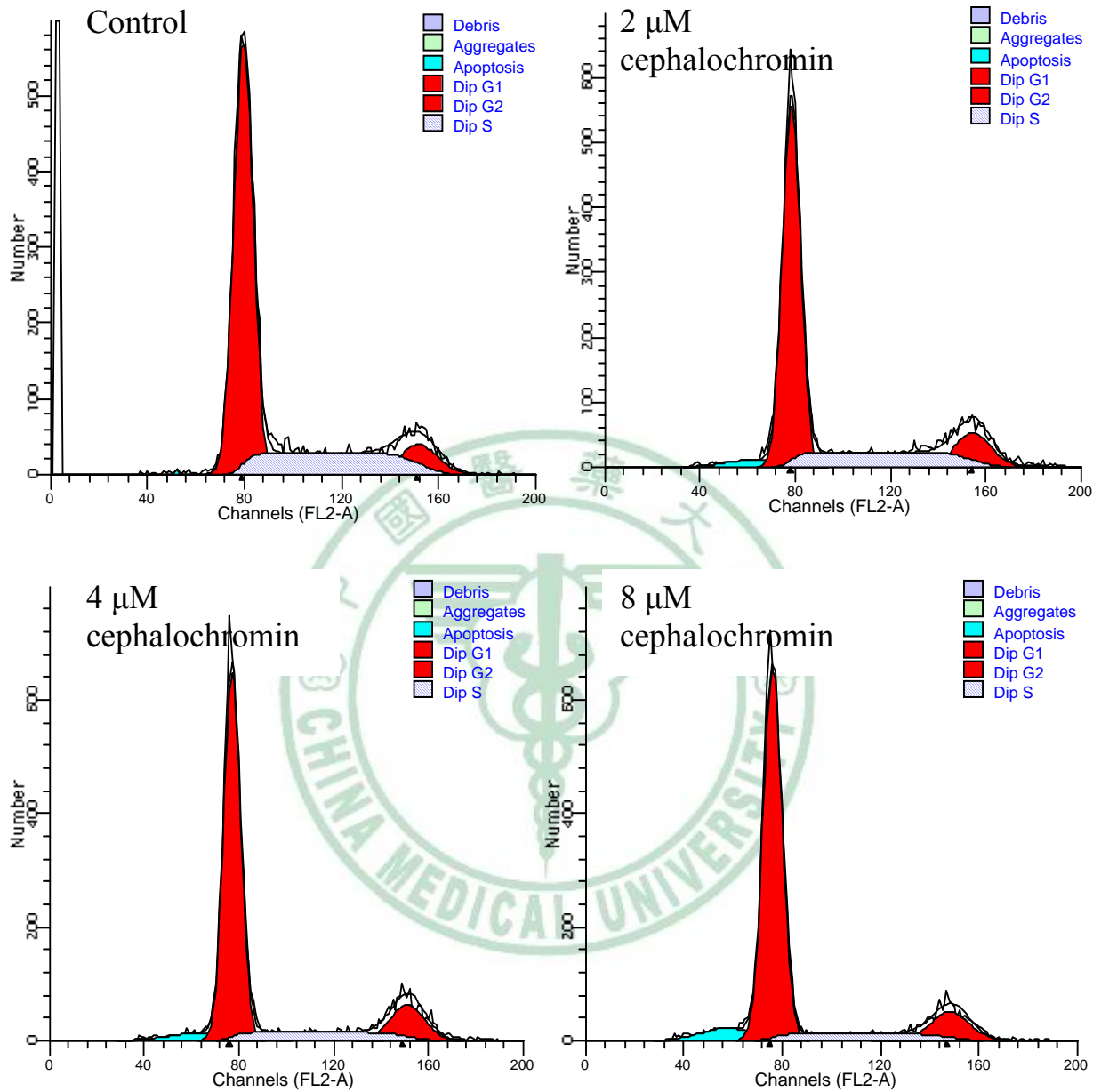


Fig. 10 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 72 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

(A)



(B)

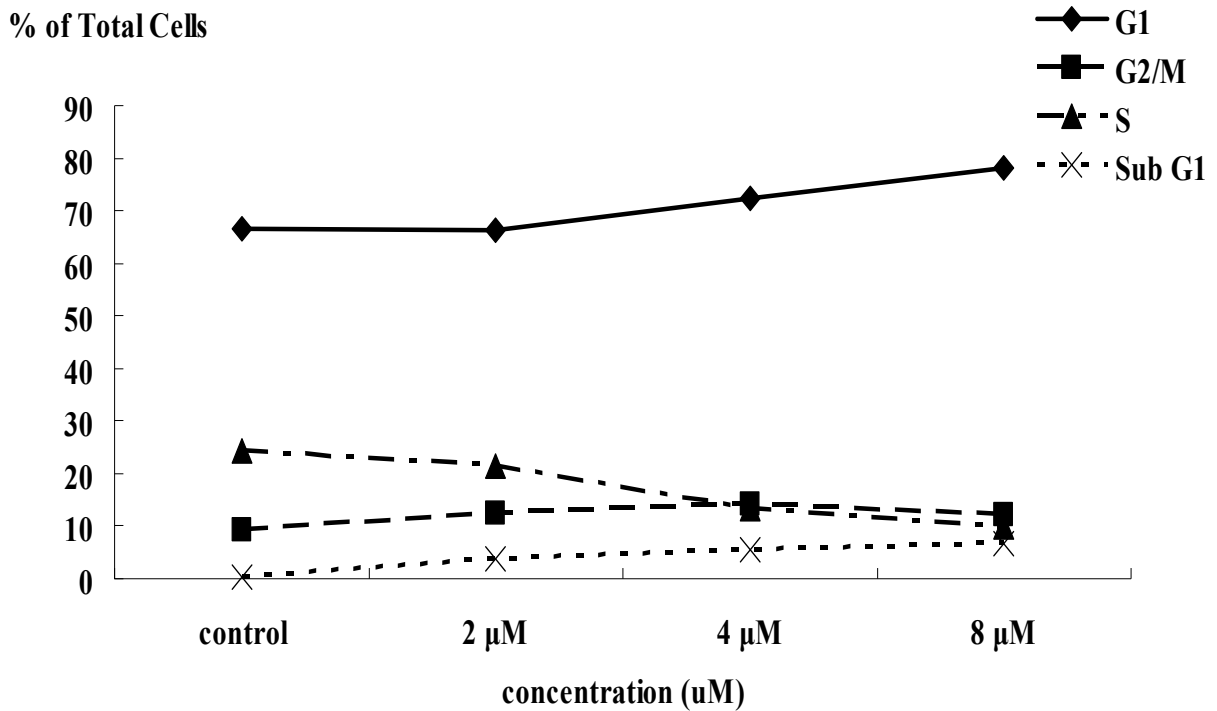
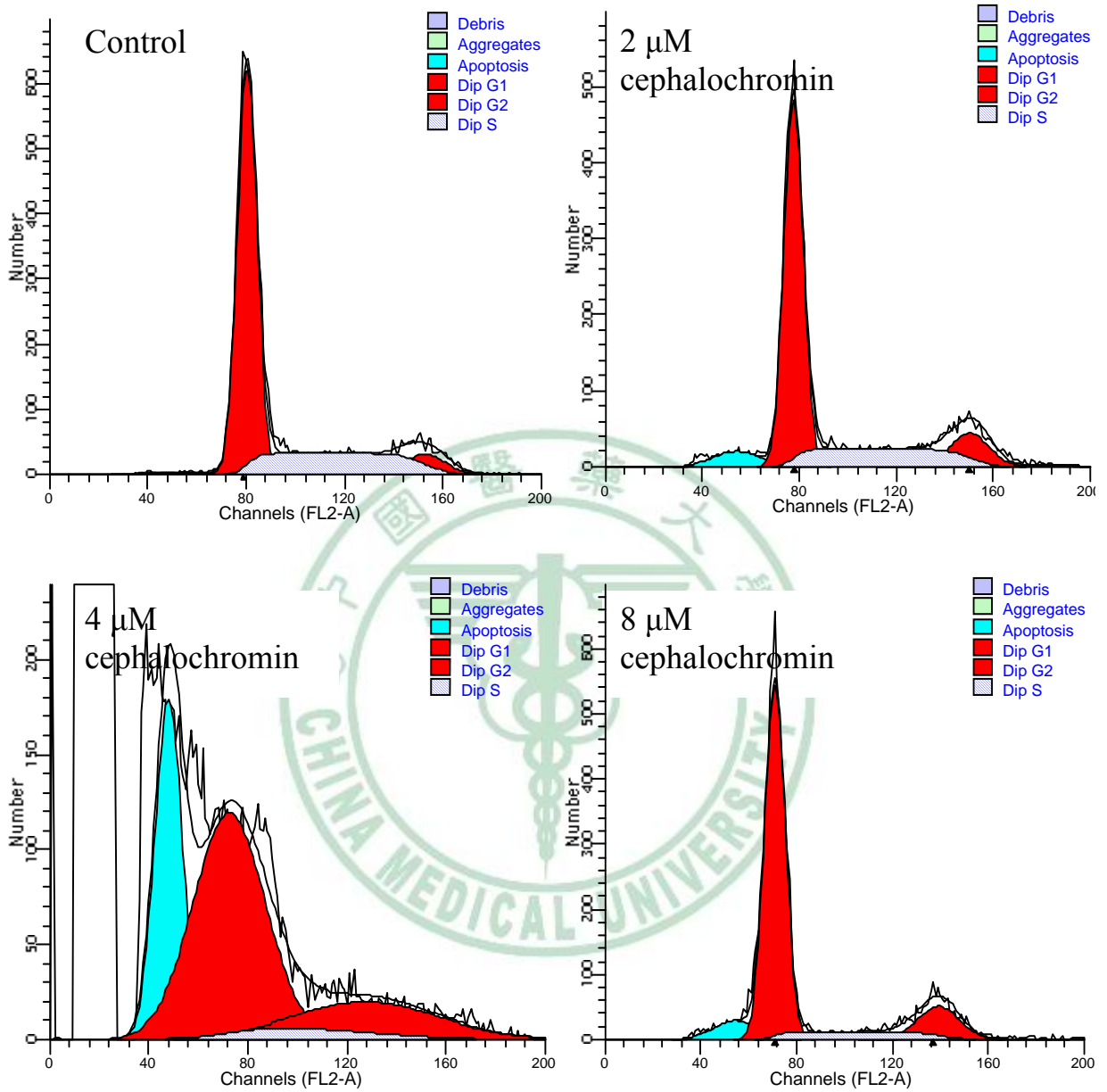


Fig. 11 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 96 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

(A)



(B)

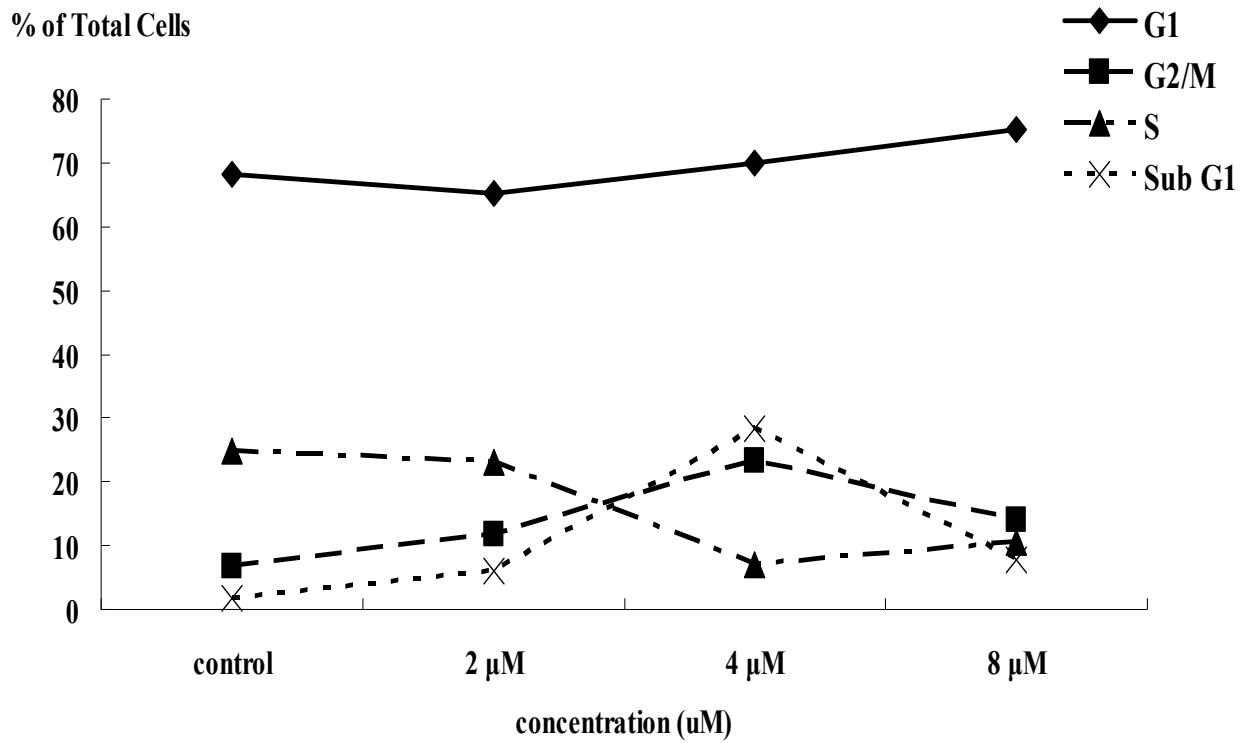


Fig. 12 Dosage effect of cephalochromin on cell cycle progression in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells. (A) Histogram of cell cycle distribution. Cells were treated with various concentrations of cephalochromin for 120 h analyzed for PI-stained DNA content by flow cytometry. (B) Quantification of the phases of cell cycle.

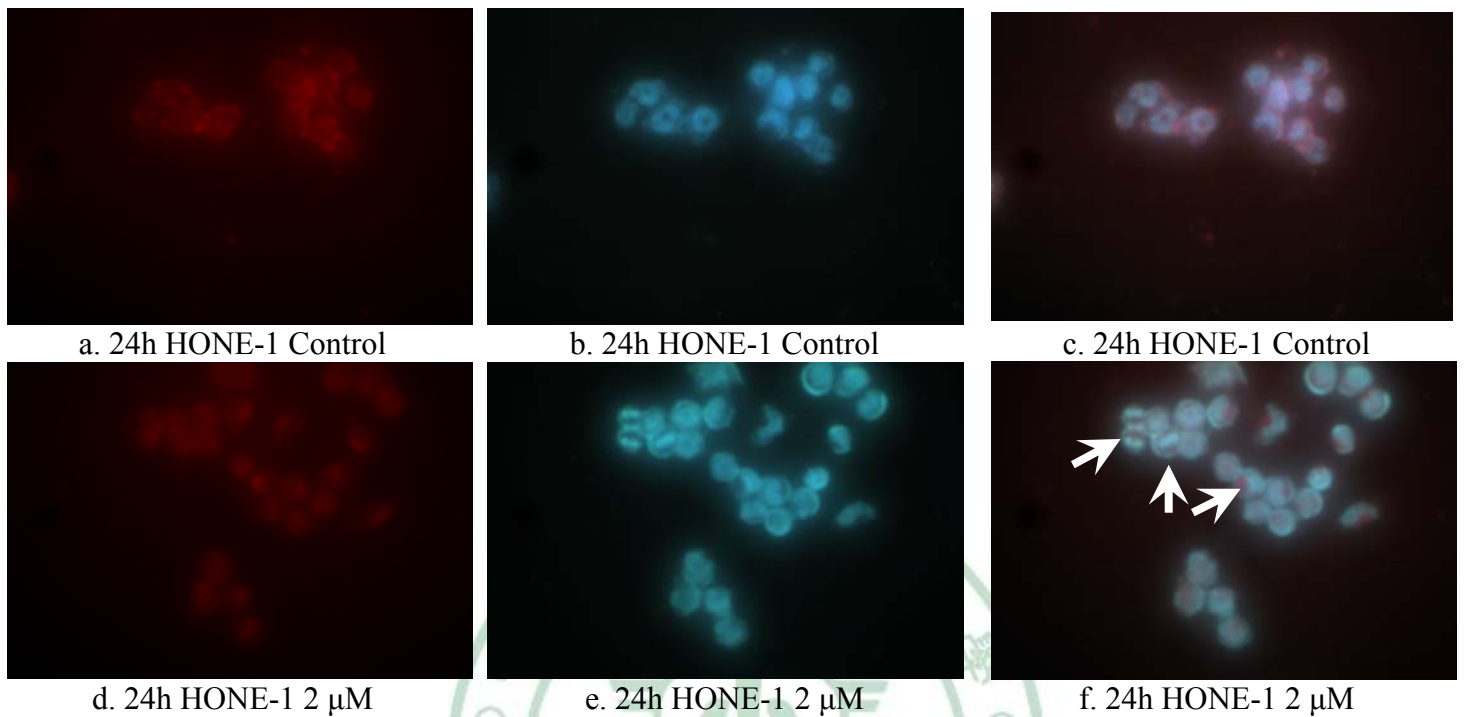


Fig. 13 Induction of chromosome condensation by cephalochromin in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. HONE-1 cells were treated without/with cephalochromin 2 μ M after 24 h, double stained with Hoechst 33258 and propidium iodide, the morphology change. a, d were propidium iodide stained, exited by green light emission red light. b, e were Hoechst 33258 stained, exited by UV radiation emission blue light. c, f were emerged pictures.

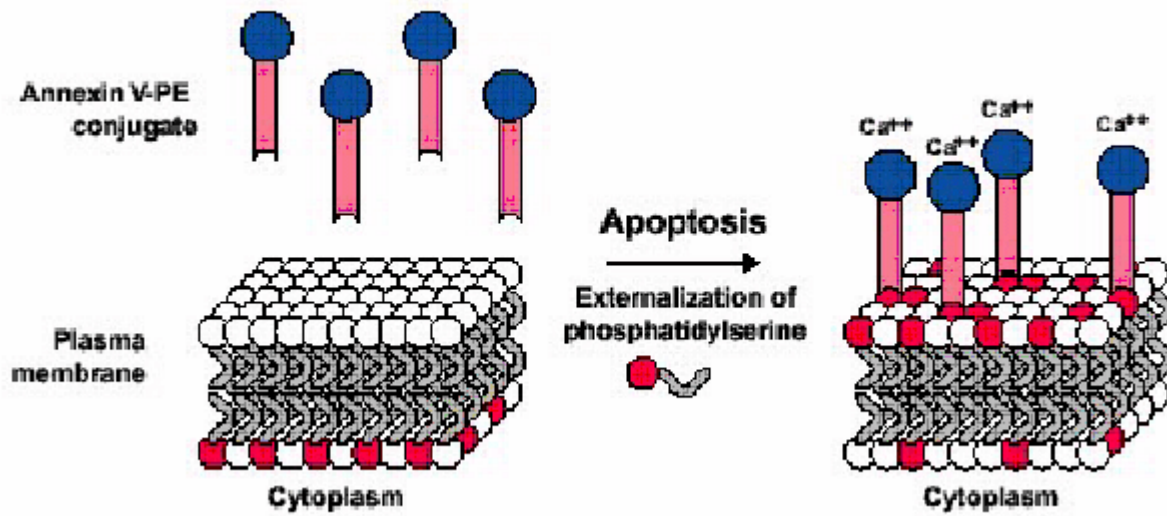
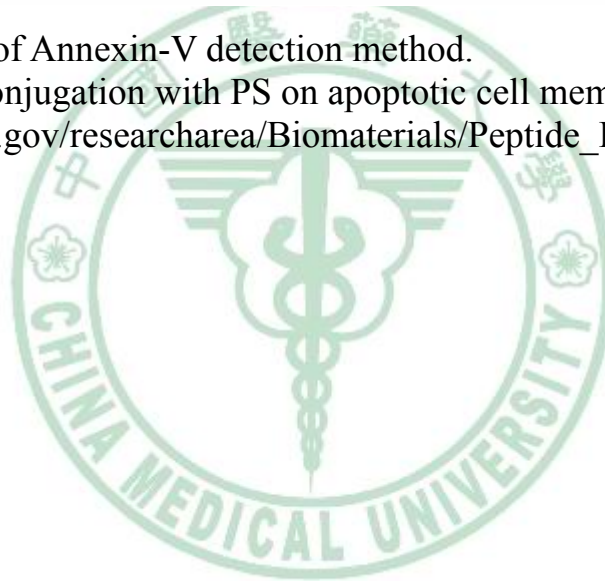


Fig. 14 The theory of Annexin-V detection method. FITC-Annexin V conjugation with PS on apoptotic cell membrane. Adapted from http://polymers.nist.gov/researcharea/Biomaterials/Peptide_Derivatized_SCK_Nanoparticles.cfm



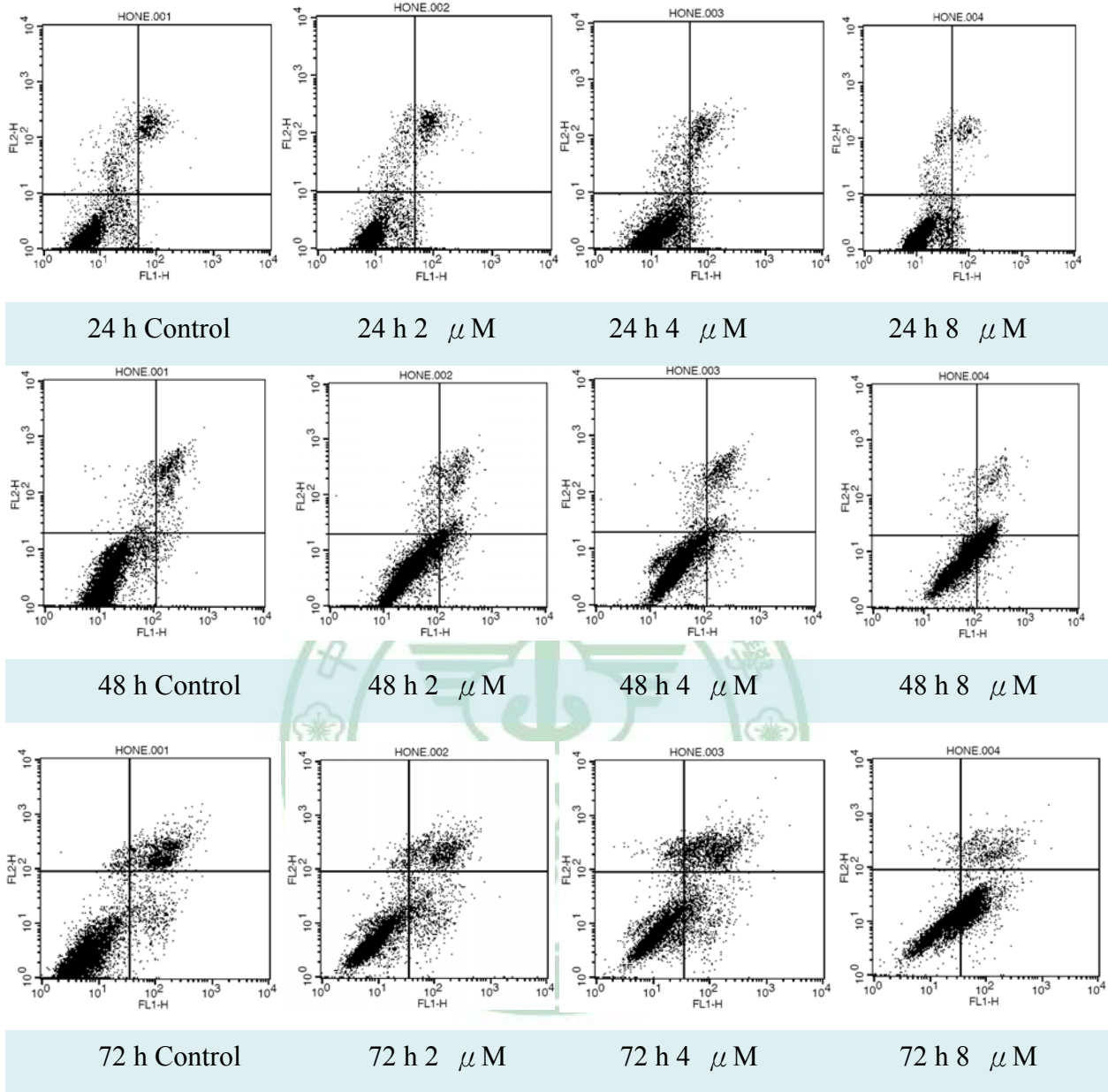


Fig. 15 Cephalochromin induced apoptosis population detected by Annexin-V. Dot plot of HONE-1 treated without / with LTH1-116-1 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M, after 24 h, 48 h, 72 h respectively, then double stained with Annexin V-FITC and propidium iodide. Fluorescence was detected by FACSscan, analyzed by CellQuest pro.

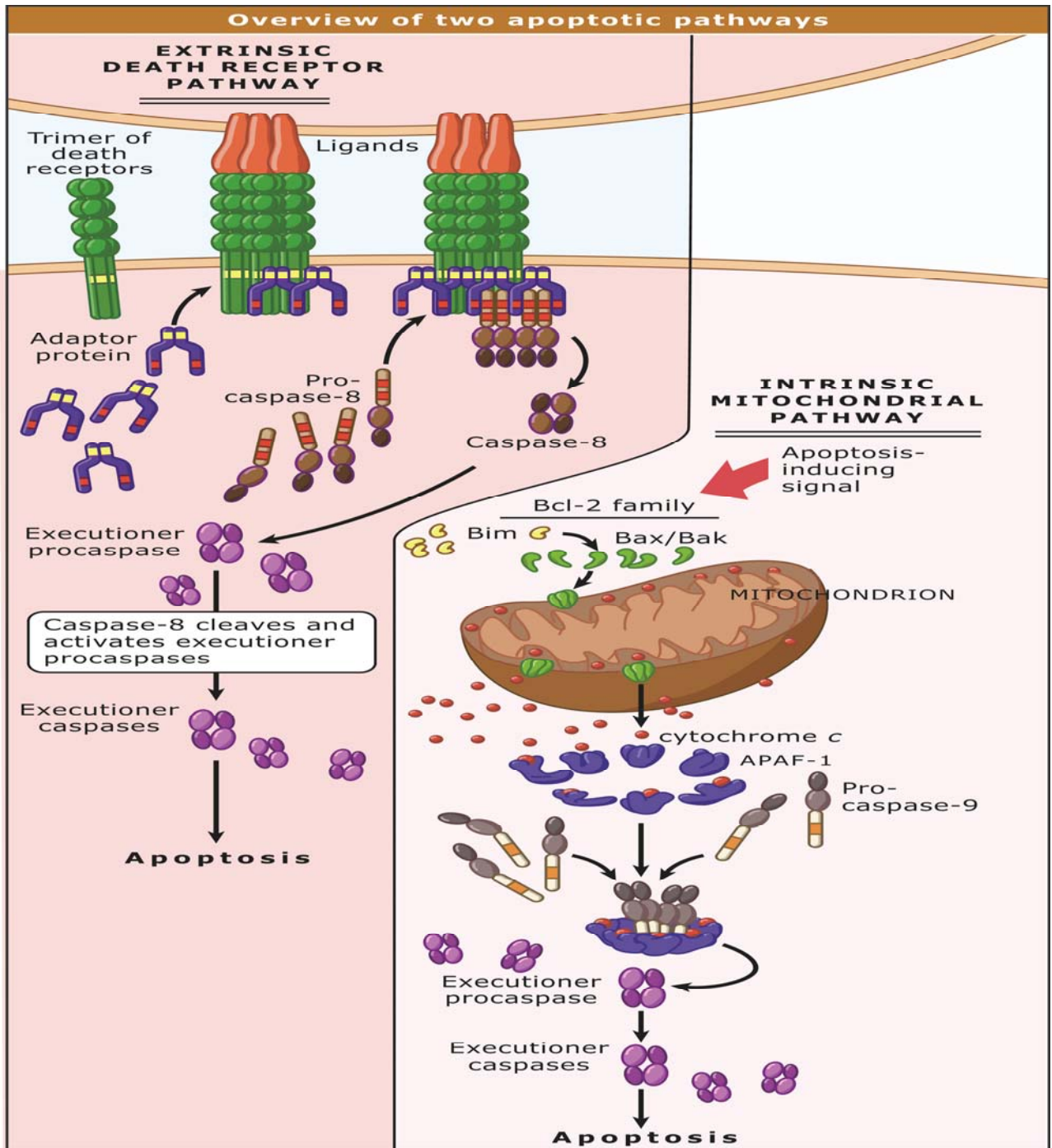


Fig. 16 Two major apoptosis pathway. Overview of two apoptotic pathways. Adapted from 2007 Johns and Bartlett publishers.

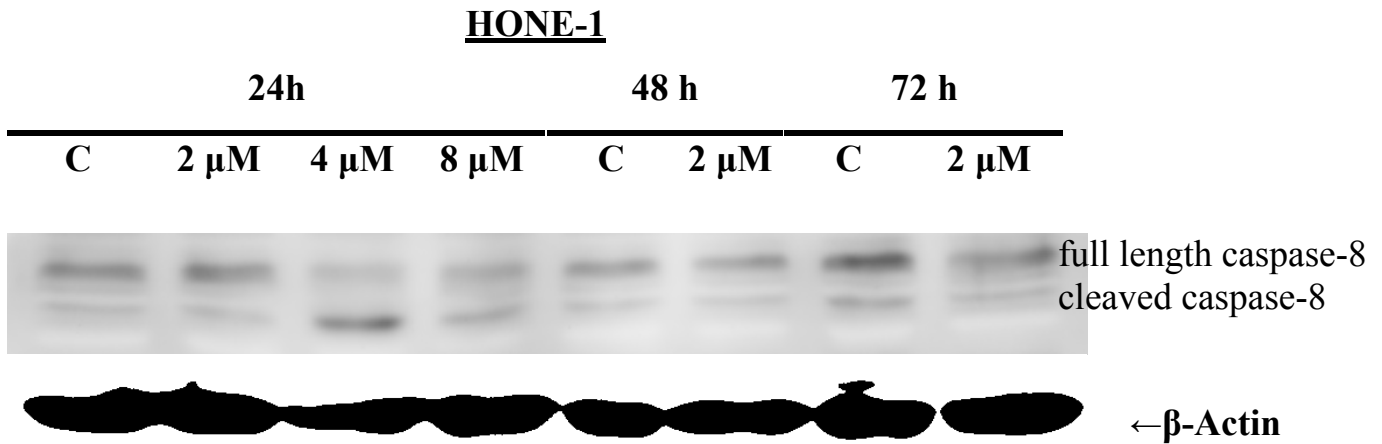


Fig. 17A The caspase expression level of cephalochromin treated HONE-1 cell. HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, caspase-8 expression by western blot. β -Actin as internal control.

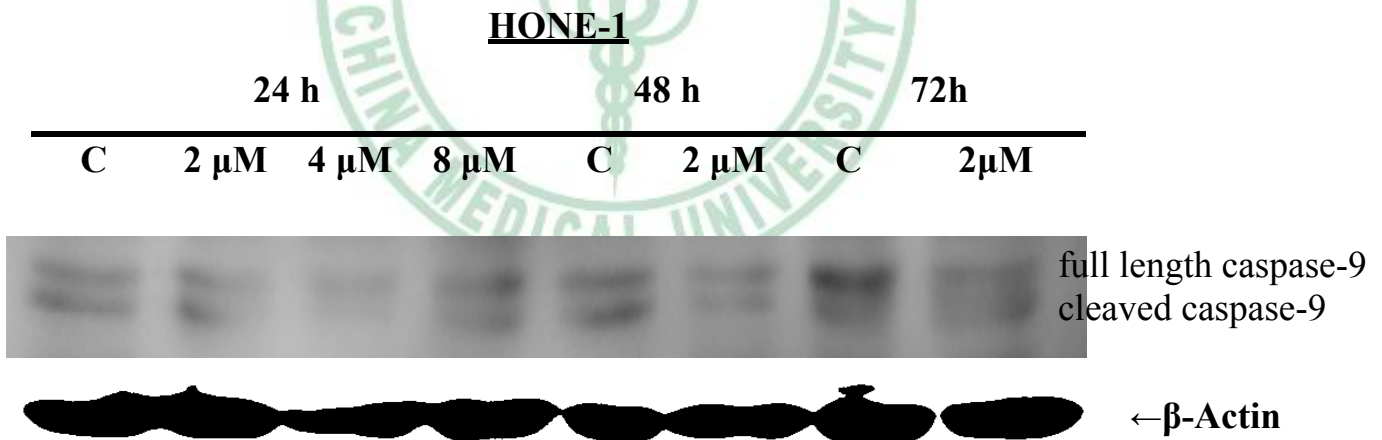


Fig. 17B HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, caspase-9 expression by western blot. β -Actin as internal control.

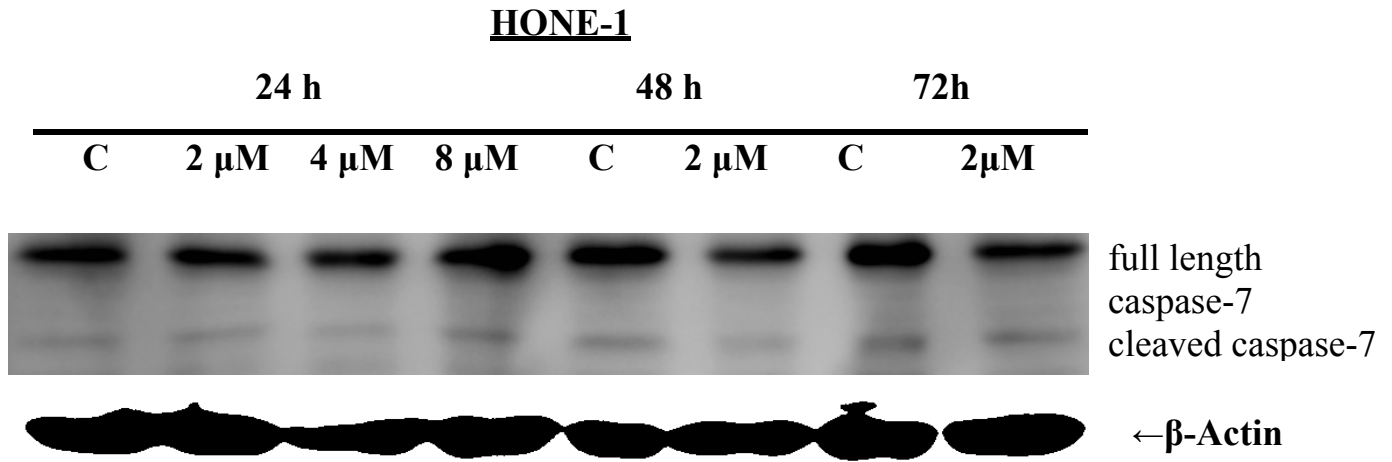
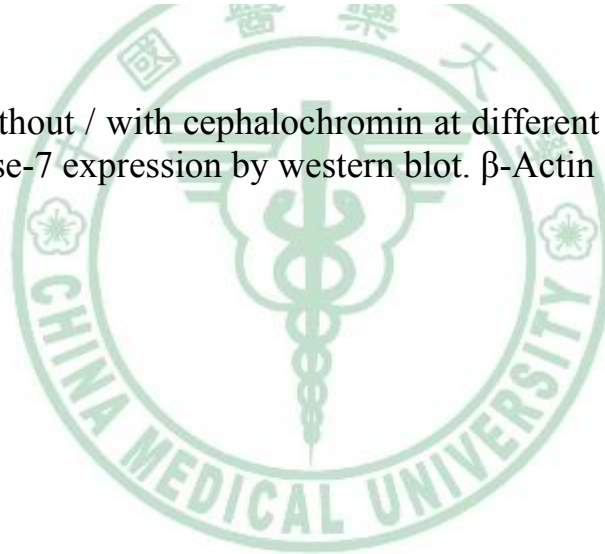


Fig. 17C

HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, caspase-7 expression by western blot. β -Actin as internal control.



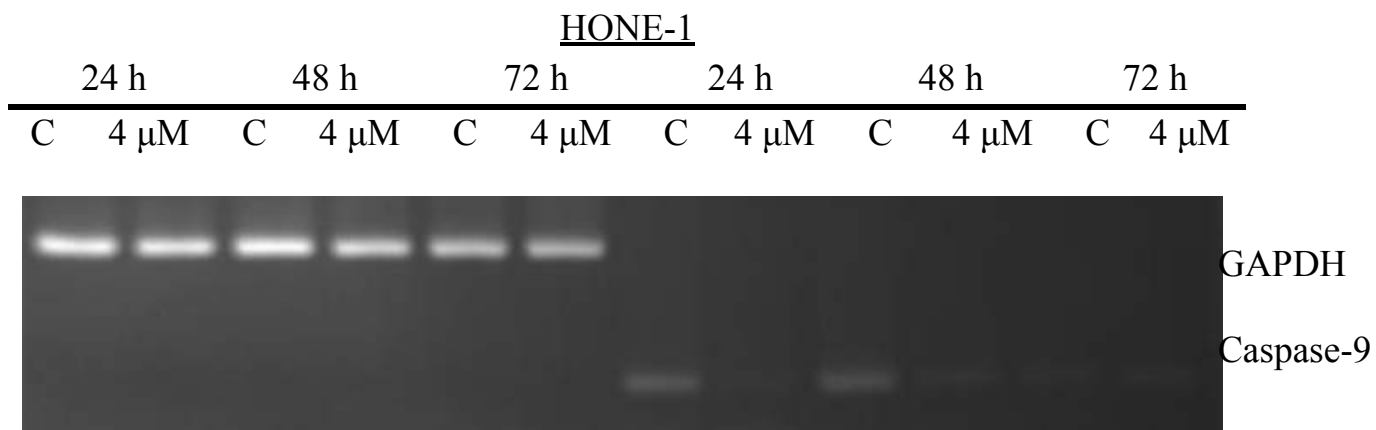
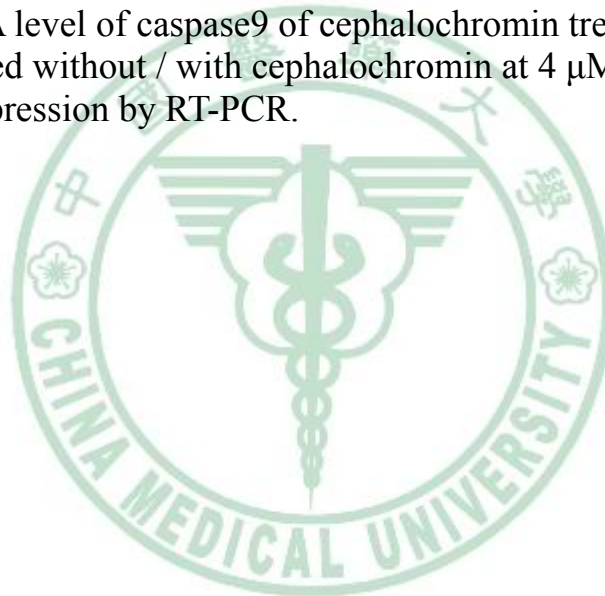


Fig. 18 The m-RNA level of caspase9 of cephalochromin treated HONE-1 cell line. HONE-1 treated without / with cephalochromin at 4 μ M after 24 h, 48 h, 72 h, caspase9 cDNA expression by RT-PCR.



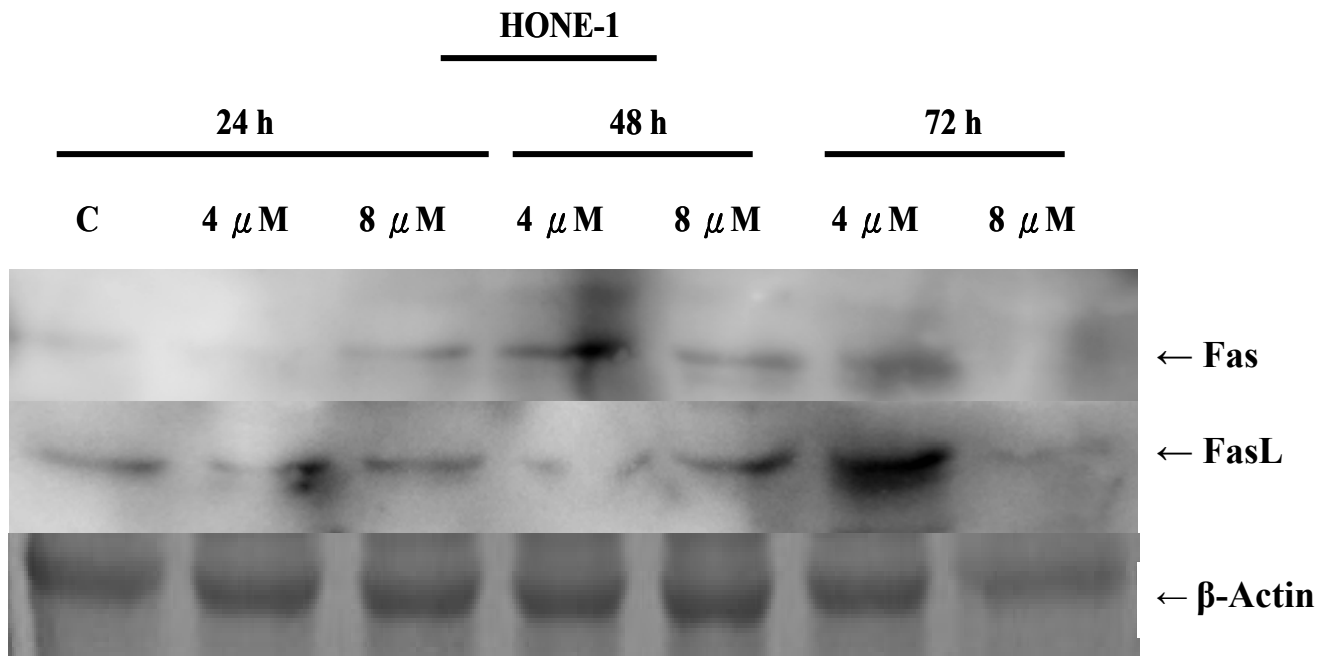


Fig. 19A The Fas / FasL status of cephalochromin treated NPC cell lines. HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, Fas / FasL expression by western blot. β -Actin as internal control.

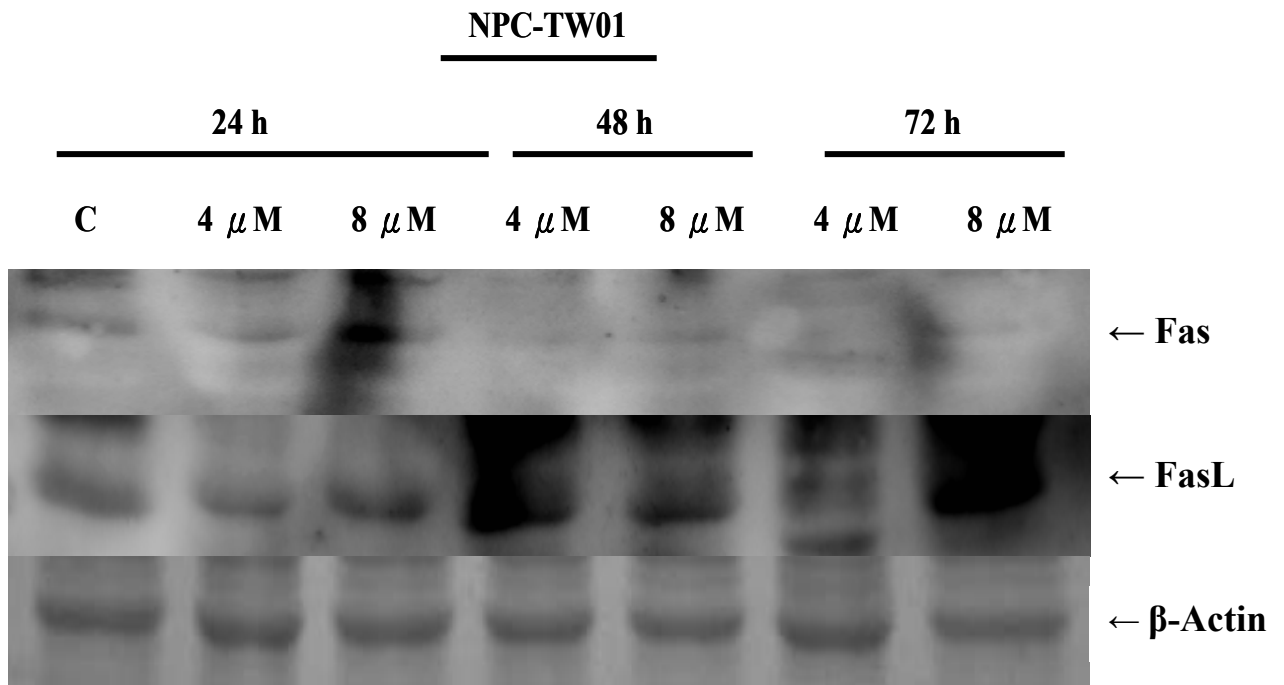


Fig. 19B

NPC-TW01 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, Fas / FasL expression by western blot. β -Actin as internal control.

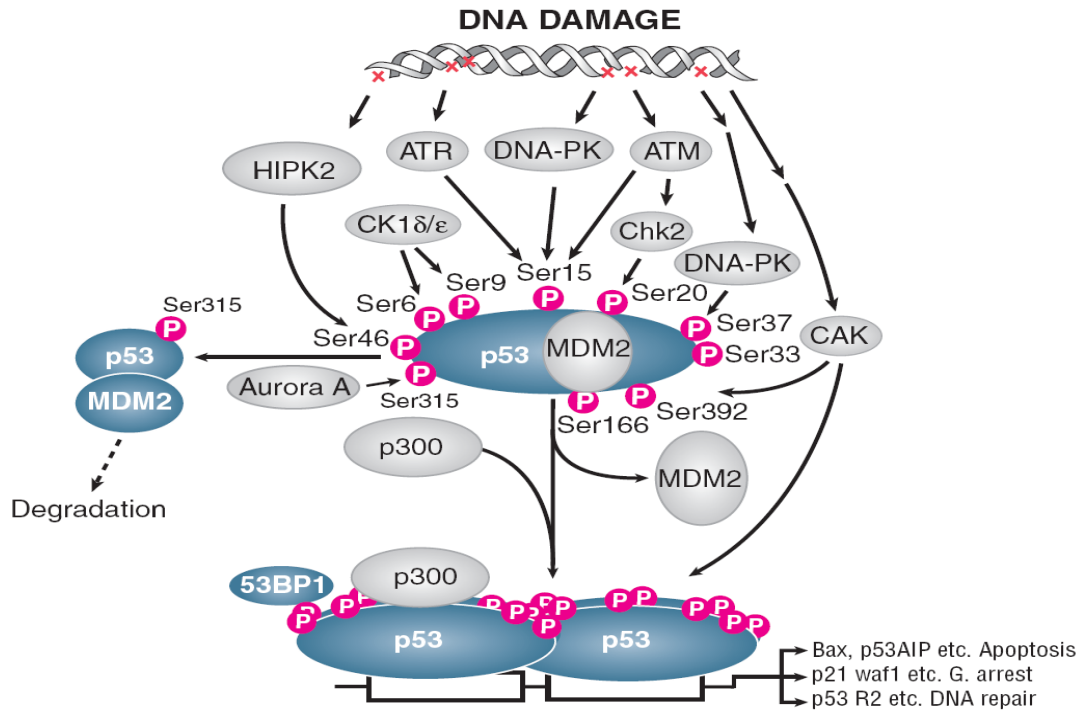


Fig. 20 P53 signaling pathway. Different phosphorylation site on p53. The fig. is adapted from <http://www.cellsignal.com/pdf/9284.pdf>



Fig. 21 The mRNA level of p53 of cephalochromin treated NPC cell lines. NPC-TW01 and HONE-1 were treated without / with LTH1-116-1 at 4 μ M after 24 h, 48 h, 72 h, p53 cDNA expression by RT-PCR.



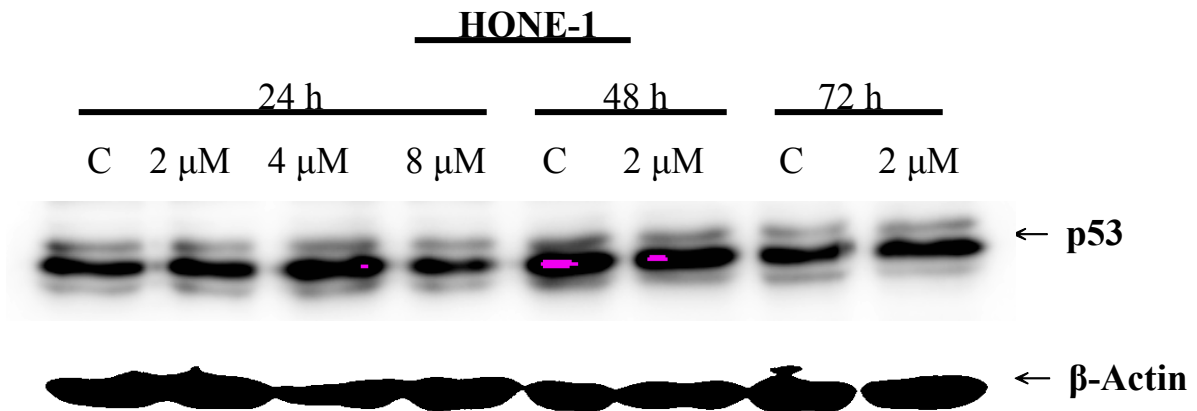


Fig. 22A The p53 expression level of cephalochromin treated HONE-1. HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, p53 expression by western blot. β -Actin as internal control.

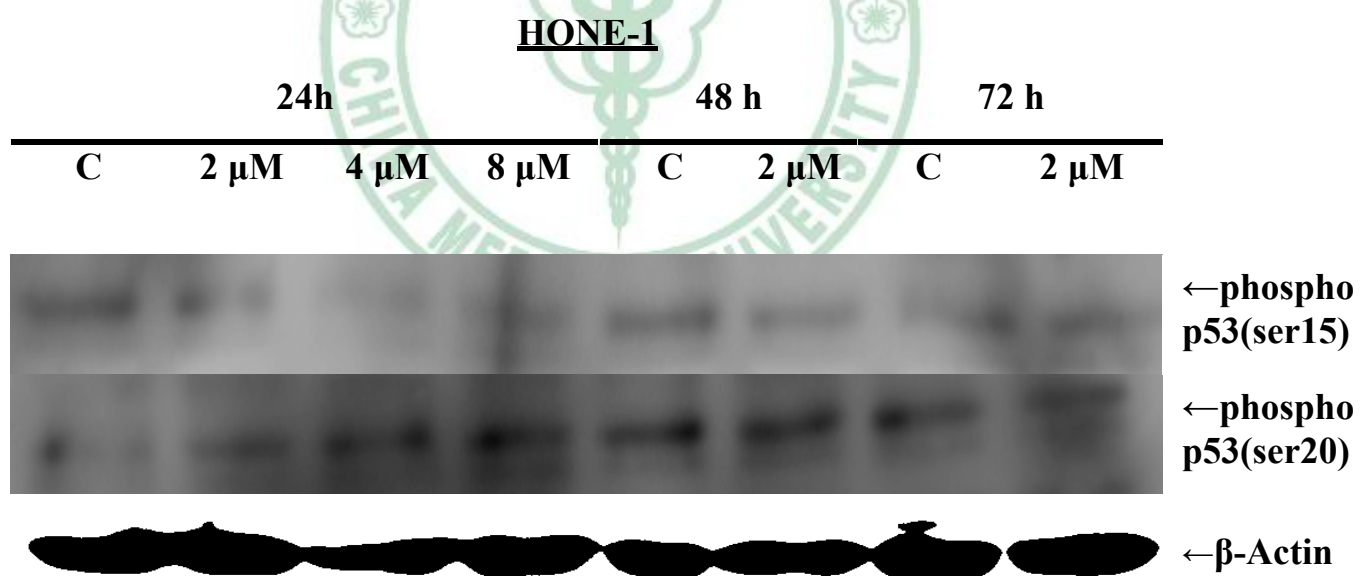


Fig. 22B HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, phospho p53 expression by western blot. β -Actin as internal control.

HONE-1

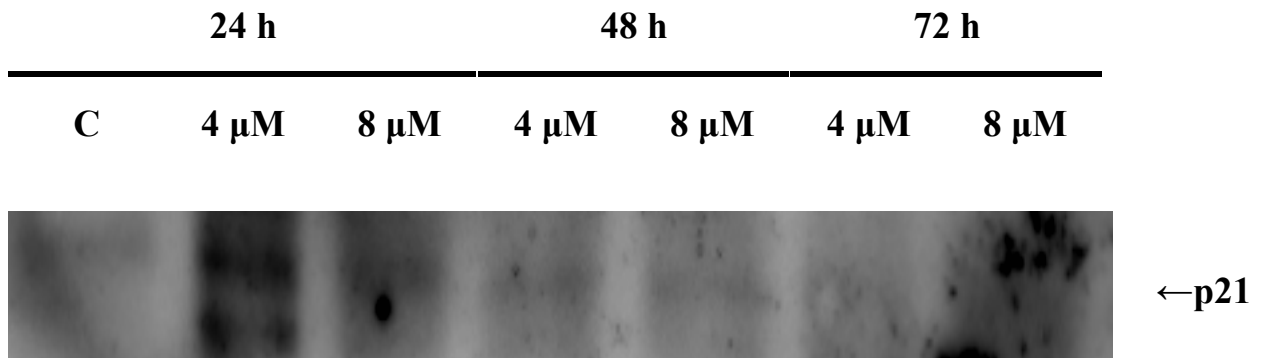


Fig. 23A The p21 expression level of cephalochromin treated NPC cell lines. HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, p21 expression by western blot.

NPC-TW01

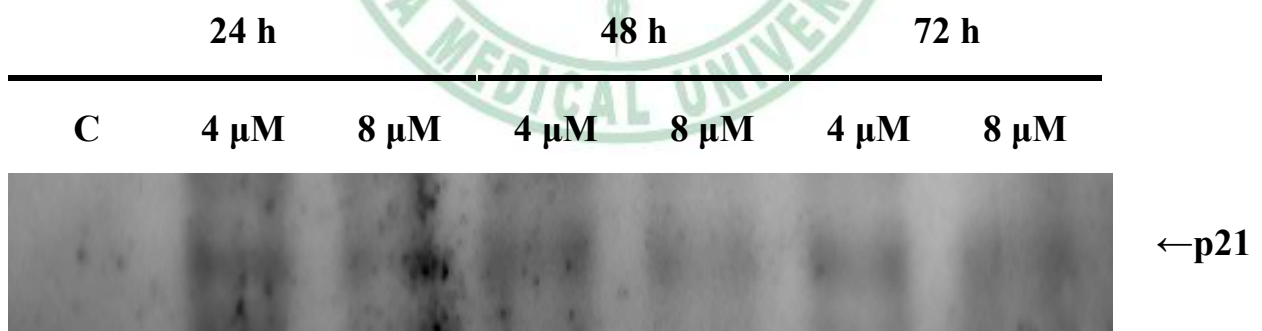


Fig. 23B NPC-TW01 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, p21 expression by western blot.

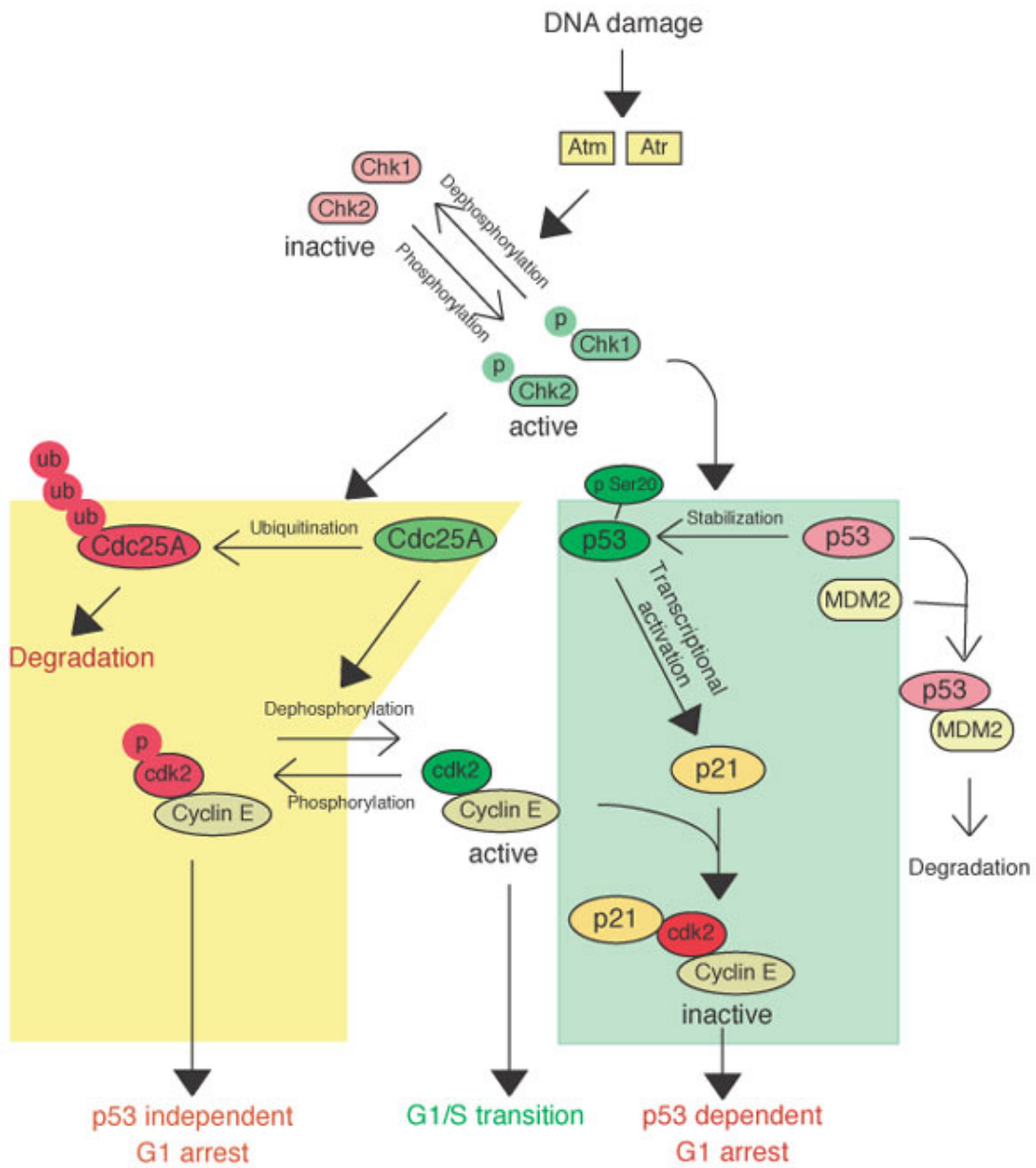


Fig. 24 The p53 dependent and independent G1 arrest in response to stress. Adapted from www.bion.com.

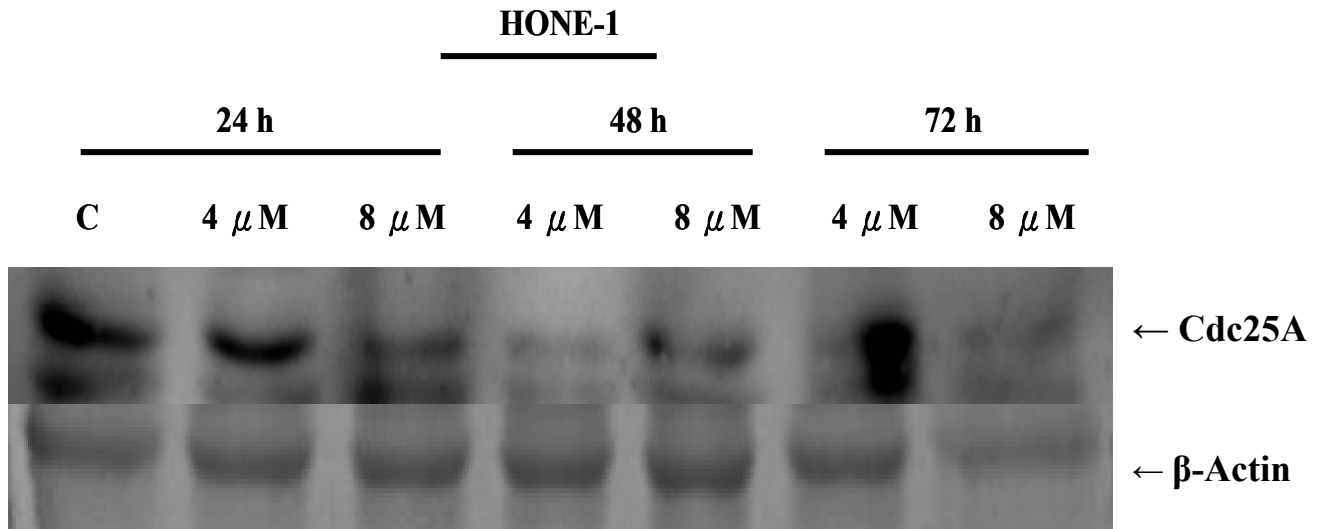


Fig. 25A The Cdc25A status of cephalochromin treated NPC cell lines. HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, Cdc25A expression by western blot. β -Actin as internal control.

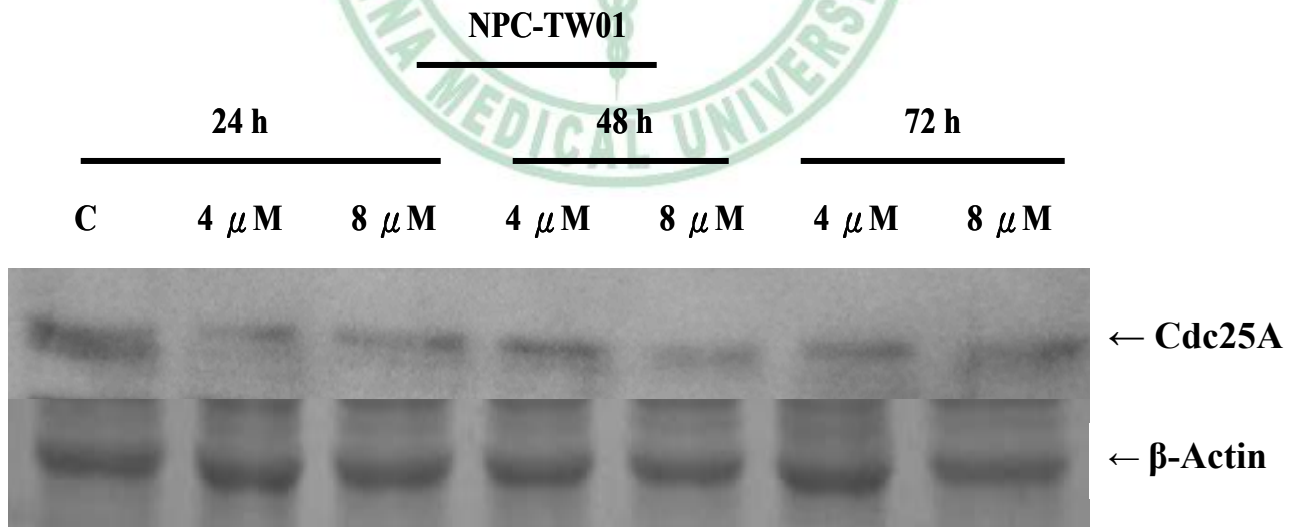


Fig. 25B NPC-TW01 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, Cdc25A expression by western blot. β -Actin as internal control.

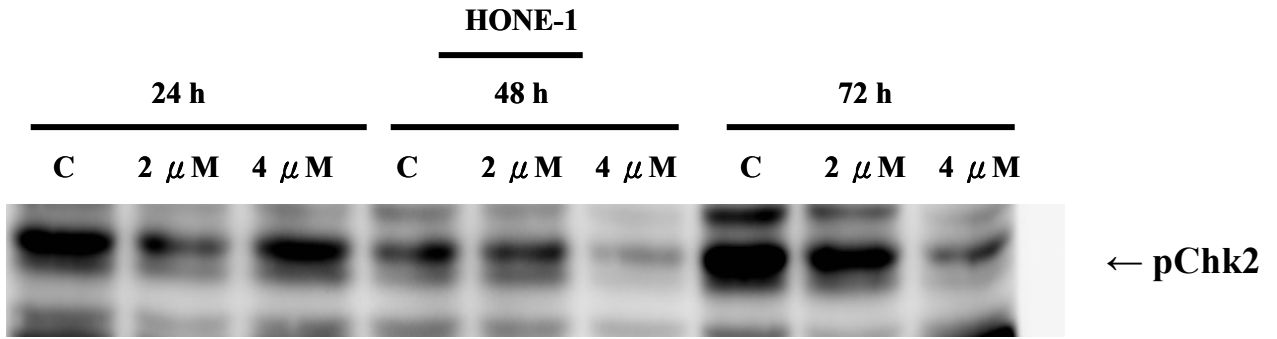


Fig. 26 The Chk2 status of cephalochromin treated HONE-1 cell. HONE-1 treated without / with cephalochromin at different concentration after 24 h, 48 h, 72 h, pChk2 expression by western blot. β -Actin as internal control.

