

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授：趙偉廷 博士，袁小雲 博士

Wei-Ting Chao, Ph.D.; Sheau-Yun Yuan, Ph.D.

評估合併 escin 與 cisplatin 在膀胱癌細胞之抗癌效果
及作用機制

The synergistic antitumor effect of escin and cisplatin in
human bladder cancer cells

研究生：黎喻暄

Yu-Hsuan Li

中華民國 106 年 7 月

東海大學生命科學系碩士論文

評估合併 escin 與 cisplatin 在膀胱癌細胞之抗癌效果
及作用機制

The synergistic antitumor effect of escin and cisplatin in
human bladder cancer cells

研究生：黎喻暄

Yu-Hsuan Li

指導教授：趙偉廷 博士，袁小雲 博士

Wei-Ting Chao, Ph.D.; Sheau-Yun Yuan, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

東海大學生命科學系
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 黎喻暄 君所撰寫之論文

(中文)

評估合併 Escin 與 Cisplatin 在膀胱癌細胞之抗癌效果及作用機制

(英文)

The synergistic antitumor effect of Escin and Cisplatin in human bladder cancer cells

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

蔣之真

(簽名)

委員

趙傳廷

袁小雲

中華民國 106 年 7 月 7 日

致謝

從大四加入實驗室時就受到許多學長姐以及老師的幫忙及照顧。首先感謝我的指導老師趙偉廷老師，幫助及教導我了解實驗的架構以及帶領我解決實驗上的問題，也感謝我的共同指導老師袁小雲博士，袁姐對於我碩班生涯的實驗給予了很大的幫助，協助我了解實驗的意義，感謝兩位指導老師的教導都讓我受益良多。接著要感謝蔡玉真老師，感謝蔡老師在學業上耐心且細心的教導與指正，以及給予我在論文上的建議使我的論文能更加完整。另外，也要感謝實驗室的學長姐魏婉貞、洪佳濃、高綾憶、吳巧倫、曾玉惠、張芷瑄、駱哲民、李依庭以及幫助過我的所有學長姐們，讓我能對於實驗有更深的了解，還有感謝我在碩士班的夥伴們侯欣雨、吳政諺，一起在這兩年中奮鬥並鼓勵我，以及實驗室的學弟廖振群給予我實驗上很大的協助，還有邱湘齡、林秉叡、Peter學弟妹們的陪伴讓我的碩班生活充實又精彩。最後當然要感謝我的家人給予我最大的支持，讓我能無後顧之憂完成學業，讓我能順利的度過碩班這兩年，且有一個精彩的碩班生活。很感謝大家給予了我這三年豐富且開心的實驗室生活，謝謝大家。

目錄

英文摘要.....	1
中文摘要.....	3
一、 前言	5
膀胱泌尿上皮細胞癌	5
膀胱癌分期與治療	5
Cisplatin.....	6
Escin.....	7
細胞凋亡	8
研究目的	10
研究策略	10
二、 材料與方法	12
細胞株培養	12
藥物處理	12
周邊血液單核細胞 (PBMC)分離培養	13
細胞存活率分析	13
合併藥物效果	14

細胞週期分析	14
細胞凋亡分析-Annexin V-FITC 及 PI 染色	15
西方點墨法分析	15
異體移植	16
三、 結果	18
β-escin 與 cisplatin 以及合併處理可抑制 TCCSUP 細胞的生長.....	18
β-escin 與 cisplatin 以及合併處理在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上誘發早期凋亡	19
β-escin 與 cisplatin 以及合併處理在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上對細胞週期的影響	19
β-escin 與 cisplatin 以及合併處理比較 TCCSUP 膀胱癌細胞、SV-HUC-1 正常膀胱細胞株以及病人周邊血液單核球的影響	20
β-escin 與 cisplatin 以及合併處理對於調控膀胱癌細胞週期相關蛋白在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞株上的表現.....	21
β-escin 與 cisplatin 以及合併處理對於凋亡調控蛋白在人類膀胱癌細胞 TCCSUP 上的影響	22
β-escin 與 cisplatin 以及合併處理對於 NF-κB 路徑的調控.....	23

β-escin 與 cisplatin 以及合併處理對裸鼠腫瘤的影響.....	24
四、 討論	25
五、 參考文獻	29
六、 圖表	35
圖一、藥物的化學結構	35
圖二、在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上不同濃度的 β-escin (escin)和 cisplatin 的效果.....	37
圖三、在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上固定 β-escin (escin)濃度和不 同濃度的 cisplatin 合併之效果.....	39
圖四、β-escin 與 cisplatin 兩種藥物合併會誘發早期凋亡的產生...41	
圖五、在人類膀胱癌細胞施加合併藥物 β-escin (escin)和 cisplatin 對 細胞週期的影響	43
圖六、β-escin (escin)與 cisplatin 兩種藥物合併在正常膀胱上皮細胞 株 (SV-HUC-1)的影響	45
圖七、β-escin (escin)與 cisplatin 藥物合併對於周邊血液 (PBMC)單 核球的影響	46
圖八、β-escin 與 cisplatin 藥物合併施加後對於 SV-HUC-1 細胞以及 TCCSUP 膀胱癌細胞的影響	47

圖九、在處理 2.5 μ M 的 β -escin (escin)以及 8 μ M 的 cisplatin 下，利用 Western blot 分析與細胞週期 G0/G1 期相關的蛋白.....	48
圖十、在人類膀胱癌細胞 (TCCSUP)上處理 β -escin (escin)與 cisplatin 藥物合併誘發凋亡產生.....	50
圖十一、處理 β -escin (escin)與 cisplatin 藥物合併於人類膀胱癌細胞上對 NF- κ B 路徑的影響	51
圖十二、 β -escin (escin)與 cisplatin 藥物合併對於裸鼠腫瘤的影響	53
圖十三、Cisplatin 對於老鼠腎臟的影響.....	54
圖十四、Cisplatin 以及合併藥物(escin 加上 cisplatin)調控路徑的比較	56

Abstract

Bladder cancer is the fourth most common cancer in men. Cisplatin affects the cell cycle and cell apoptosis of cancer cells and is the first line chemotherapy drug to treat the type of muscle invasive tumor, and the combination treatment of methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin (MVAC) are also widely adopted. However, cisplatin has lots of side effects and highly nephrotoxicity. Thus, it is urgent to find out a better therapeutic strategy. Previous reports showed that the natural compound can inhibit the growth of cancer cells, and β -escin extracted from the *Aesculus hippocastanum* seeds is proved that can inhibit the growth of cancer cells by regulating the NF- κ B pathway. In this study, the synergistic antitumor efficacy of β -escin combined with cisplatin was examined in bladder cancer cells. In the cell biology experiments, according to the combination index, 2.5 μ M β -escin combined with 8 μ M cisplatin were used for the study. When cells were treated with the combined drug for 16 h, the early cell apoptosis was significantly increased. After drug treatment for 24 h, cells were arrested in G0/G1 phase. In the protein level, the activated caspase 9 of intrinsic pathway and caspase 8 of extrinsic pathway are both cleaved after combined drug treatment. And the cell cycle related protein like p-p53 and Rb were upregulated and the NF- κ B pathway also were down-regulated by the combined treatment. The synergistic effect of drug combination was also carried out in mouse animal model. Subcutaneous injection of human bladder carcinoma cells were performed in nu/nu mice, and followed by drug treatment. The result showed β -escin

and cisplatin combined treatment reduced tumor growth efficiently. This study suggests β -escin and cisplatin combination is the potential treatment for bladder cancer in the future.

摘要

膀胱癌在男性常見癌症中排名第四，而 cisplatin 在膀胱癌晚期及擴散的腫瘤為第一線化療藥物，methotrexate vinblastine doxorubicin cisplatin (MVAC) 為目前治療膀胱癌的標準治療，其會調控細胞週期以及細胞的凋亡，但 cisplatin 毒性強且易傷害人體器官，尤其是腎毒性，因此找出新的策略治療膀胱癌為癌症研究中重要的一環。先前文獻顯示天然的植物萃取物或是天然化合物能達到抑癌的效果，七葉樹種子的萃取物 β -escin 可藉由 NF- κ B 路徑調控及抑制癌細胞生長之效果。因此本研究選用 β -escin 與 cisplatin 進行藥物合併治療，評估對膀胱癌抗癌的效果以及作用的機制。在細胞實驗中，利用人類轉形上皮膀胱癌細胞分析合併藥物對細胞毒性，根據結合係數將 2.5 μ M 的 β -escin 與 8 μ M 的 cisplatin 結合並進行實驗。在早期細胞凋亡實驗中可以觀察到，加藥 16 h 後 β -escin 與 cisplatin 合併的組別早期凋亡的細胞明顯多於其他單一藥物組別。而合併藥物也對細胞週期產生的影響，使細胞在細胞週期 G0/G1 期發生停滯的情況。在調控細胞凋亡內在及外在路徑的相關蛋白，例如活化態 caspase 9 和 caspase 8 的表達比起無加藥處理組別有顯著的上升，細胞凋亡蛋白調控方面，p-p53 及 Rb 在合併藥物處理後表現量皆有上升的趨勢。而合併藥物也會抑制

NF- κ B 路徑進。在動物實驗方面，將利用 nu/nu mice 以皮下注射的方式打入人類轉形上皮膀胱癌細胞，結果顯示 β -escin 和 cisplatin 合併治療能有效抑制腫瘤細胞生長。綜合本研究成果， β -escin 和 cisplatin 的合併治療在未來極有潛力成為膀胱癌的治疗方式。

一、前言

膀胱泌尿上皮細胞癌

在 2016 年全球癌症發生率的統計下，膀胱癌排名於好發癌症第九名，在泌尿系統癌中膀胱癌為第一名 (Siegel et al., 2016)。在台灣，根據衛生福利部 103 年的統計，台灣男生罹患膀胱癌的患者高出女生約 3 倍之多，在男性罹患十大癌症中膀胱癌排名第九名，原因在於膀胱癌的成因是與環境有高度相關的疾病，像是工作環境長期接觸染料，或是橡膠工人長期暴露於苯胺、芳香胺等化學物質環境中 (Carreon et al., 2014; Talaska et al., 2012)，以及抽菸增加罹患膀胱癌的機率 (Chu et al., 2013)，或是使用含有馬兜鈴酸成分的中草藥 (Chen et al., 2013; Yang et al., 2011)，以及處於砷汙染的環境 (Chung et al., 2013)，這些原因皆為導致膀胱癌十大常見原因之一。

膀胱癌分期與治療

膀胱癌在臨床上可分為非侵犯型膀胱癌和肌肉侵犯型膀胱癌 (Montironi and Lopez-Beltran, 2005)，可再根據 TNM 系統 (Tumor-Node-Metastasis system) 將腫瘤分成七個階段 (Knowles and Hurst, 2015)：

1. Tis：原位癌，位於膀胱上皮的黏膜上癌化的細胞
2. Ta：乳突腫瘤位於膀胱上皮黏膜上
3. T1：腫瘤侵犯至上皮下的結締組織 (lamina propria)
4. T2a：腫瘤侵犯至淺層肌肉層
5. T2b：腫瘤侵犯至深層肌肉層
6. T3：腫瘤侵犯至膀胱周圍組織像是脂肪層
7. T4：腫瘤侵犯至鄰近組織或是器官像是子宮、攝護腺、陰道或是腹腔壁

而 Ta-T1 屬於非侵犯型膀胱癌；T2-T4 屬於肌肉侵犯型膀胱癌 (Montironi and Lopez-Beltran, 2005)。膀胱癌早期的症狀會有血尿發生，因此大多數患者可以在早期即時發現，早期膀胱癌屬於非侵犯型的膀胱癌治療方式會利用經尿道手術(TURBT)將腫瘤刮除，但大約三至六成的患者會有復發的可能性，且會變成肌肉侵犯型的膀胱癌 (Pillai et al., 2011)，而肌肉侵犯型的膀胱癌患者需要接受膀胱全切除術以及利用化學藥物進行輔助治療，在化學藥物治療上以使用含鉑金的 cisplatin 最為主要 (Hung et al., 2017)。

Cisplatin

為治療膀胱癌的第一線化療藥物，其為順式的鉑金類藥物 (圖一，A)，

許多癌症皆有利用 cisplatin 進行化學藥物治療，像是卵巢癌、膀胱癌、肺癌以及大腸癌 (Hagen et al., 2013)。Cisplatin 為烷化劑，鍵結在 DNA 鳥糞嘌呤 (guanine) 的第七號氮上，形成 DNA adduct，阻止 DNA 解螺旋進行複製，干擾 DNA 的合成以達到抑制細胞分裂的作用 (Dasari and Tchounwou, 2014; Pujol et al., 2000)。Cisplatin 調控的機制會透過 Fas/Fas-L 調控下游的 p53，進一步活化 caspase 3, 8, 9 導致細胞凋亡產生，或是透過 p53 調控 p21 導致細胞週期 G1, S, G2 期停滯 (Siddik, 2003)。在臨床上治療膀胱癌時，cisplatin 會與 methotrexate, vinblastine, doxorubicin (MVAC) 或是與 gemcitabine (GC) 合併使用 (Hung et al., 2017)，然而 cisplatin 在臨床上所造成的副作用像是噁心、嘔吐、外週神經病變、耳毒性、低鎂血症，甚至會造成腎功能衰竭 (Ciarimboli, 2014; Mukhopadhyay et al., 2012)，限制了 cisplatin 的用藥，而且在台灣罹患膀胱癌之患者多為腎功能障礙者，而 cisplatin 其最大副作用為腎毒性 (Chen et al., 1995)，使 cisplatin 在臨床用藥上出現困難。

Escin

Escin 萃取自七葉樹 (*Aesculus hippocastanum*, horse chestnut) 的種子，其有兩種異構物為 α form 及 β form， β -escin 為七葉樹種子萃取物中主要有活性的組成 (Wei et al., 2005)，其結構為五環三萜 (pentacyclic

triterpene，圖二，B)，廣泛分布於世界各地，像是伊朗、北印度、東南歐及中國等國家 (Hardin, 1957; Patlolla and Rao, 2015)，在臨床治療已使用於慢性靜脈功能不全 (CVI)、抗發炎、痔瘡、抗肥胖以及術後水腫 (Sirtori, 2001)，對於治療 HIV-1 還在臨床試驗階段 (Grases et al., 2004)。近期研究也指出 β -escin 有抑制癌症的效果，像是在腎臟癌、膠質細胞瘤以及甲狀腺癌等癌症上皆顯示可以抑制癌細胞的生長 (Harford-Wright et al., 2016; Mei et al., 2017; Yuan et al., 2017)。 β -escin 在臨床上已被用於治療慢性發炎的症狀，而慢性發炎會增加罹患癌症的風險以及促進癌症的形成，最近研究顯示 NF- κ B 訊號傳遞路徑在慢性發炎中會持續的被活化 (Grivennikov et al., 2010; Maier et al., 2010)，而 β -escin 可以降低 NF- κ B 的活性 (Harikumar et al., 2010; Wang et al., 2012)，進一步降低罹癌的風險，且 β -escin 其優點為在臨床用藥上沒有嚴重的副作用 (Zhou et al., 2009)。

細胞凋亡

細胞凋亡被認為是細胞的漸進式死亡 (programmed cell death)，為了消除過量及損傷的細胞 (Kam and Ferch, 2000; Li et al., 2016)。細胞在早期凋亡產生時，細胞會開始皺縮並且形成馬蹄鐵狀 (horse shoes) 且和相鄰的細胞分離，細胞核也會被分解成小片段，以及細胞膜中的磷

脂質絲氨酸 (phosphatidylserine, PS)會從雙層磷脂質的膜內外翻至膜外；而到細胞凋亡至晚期時，細胞核的碎片以及胞器會凝聚被包在囊泡中並胞吐至細胞外被旁邊的細胞所吸收，細胞膜才會失去完整性，相較於細胞壞死 (Necrosis)，在早期即會失去細胞膜的完整性，因此到晚期細胞凋亡其細胞核才會與染核之染劑結合 (Kam and Ferch, 2000)。

在細胞凋亡的基因調控，p53 以及 Bcl-2 這兩種基因扮演重要的角色 (Kam and Ferch, 2000)，分別調控細胞凋亡的兩條路徑，外在路徑 (extrinsic apoptosis pathway)以及內在路徑 (intrinsic apoptosis pathway)。而 p53 則主要調控外在路徑的蛋白，其為核磷酸蛋白 (nuclear phosphor-protein)會與 DNA 結合作為轉錄因子，控制細胞增殖所以同時 p53 也是腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene)，以進行 DNA 的修復 (Liao et al., 2016)，當 p53 啟動外在凋亡路徑時，死亡受體 (death ligand)會接上對應的死亡受器 (death receptor)，例如 Fas 會與 FADD 結合啟動 caspase 8 及下游 caspase 3 蛋白導致凋亡的產生 (Vee May Dianne Kua et al., 2017)；而 Bcl-2 位於粒線體膜上，調控內質網上的鈣離子通道，以抑制細胞凋亡的產生，其會調控粒線體路徑，當鈣離子經由內質網釋放至細胞質中，會促使粒線體釋放 cytochrome c 並且和 Apaf-1 蛋白形成凋亡體 (apoptosome)，進一步啟動 caspase 9 上游

調控，活化下游 caspase 3 並切割細胞核內的 PARP 造成細胞凋亡產生 (Kam and Ferch, 2000)。

研究目的

可以由先前文獻得知，cisplatin 的副作用使藥物在使用上受到了限制，造成了嚴重的腎毒性產生，因此 cisplatin 較適用於腎功能無損害的患者，但目前臨床上治療肌肉侵犯型的膀胱癌，cisplatin 仍屬於第一線的化療藥物，常以合併藥物的方式進行治療，像是 MVAC 或是 GC 的合併方式進行。而 β -escin 為天然中草藥七葉樹種子萃取出化合物，目前研究也顯示並無嚴重的副作用產生，因此本研究探討合併 cisplatin 與 β -escin 兩種藥物，降低 cisplatin 的用藥濃度並加入 β -escin 輔助加強其藥效，並進一步研究 cisplatin 與 β -escin 兩種藥物的協同作用是否會減緩 cisplatin 造成的腎毒性，並且有效的抑制癌細胞的生長，以及研究其作用的相關機制。

研究策略

首先在離體實驗，選定 TCCSUP 膀胱癌細胞做為測試細胞，先測試兩種藥物對於細胞的毒殺效果，比較與單一藥物處理下細胞存活率是否有差異，以及 combination index (CI) 是否有意義。接著利用 Annexin

V-FITC/PI 染色觀察是否有細胞凋亡的產生，以及後續導致凋亡的原因是否與細胞週期調控有關，會利用 PI 染劑觀察 DNA 量的變化。接下來會利用 Western blot 分析蛋白的表現量，找出合併藥物調控的路徑以及機制。

在動物實驗的部分，利用裸鼠 (NU/NU mice) 在腿部兩側皮下打入人類膀胱上皮癌細胞 (TCCSUP cells)，並觀察在合併藥物處理下腫瘤的大小及體重是否會受到影響，且腫瘤小於單一藥物處理。以及利用 HE stain 將肝、腎進行組織包埋切片，觀察合併藥物是否對肝腎造成毒性，確認藥效不會對老鼠造成傷害。

二、 材料與方法

細胞株培養

培養 TCCSUP 在含有 10% 小牛血清 FBS (Fetal Bovine Serum, gibco) 與抗生素的 RPMI 1640 培養液 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, gibco)；SV-HUC-1 細胞株培養在 7% 小牛血清與 100 unit/ml 抗生素的 F-12 培養液 (Ham's F-12 Nutrient Mixture, gibco) 中，培養箱內維持 5% 的二氧化碳濃度及 37°C 的環境進行細胞培養。TCCSUP 為第四期侵入型人類腫瘤膀胱上皮細胞，有 p53 突變的細胞株；SV-HUC-1 為尿路上皮細胞，利用 SV40 病毒的轉型使其得以寄代培養。

藥物處理

Escin (Sigma-Aldrich) 粉末溶於 DMSO (dimethyl sulfoxide) 中，配置成濃度 100 mM 保存於 -20°C 冰箱，使用時再利用培養液稀釋至所需的濃度；cisplatin (由台中榮總化療中心提供) 利用培養液稀釋至所需濃度，處理合併藥物組別時， β -escin 濃度為 2.5 μ M 需前處理 2 個小時，再加入 cisplatin 濃度為 8 μ M。

周邊血液單核細胞 (PBMC)分離培養

將密度為 1.077 g/ml 的等張溶液 (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich) 以 1:1 的比例加入病人血液，離心 1600 rpm、25 分鐘使血液分層，移除上層血清後吸取中間白色的 buffy coat，加入不含 FBS 的 RPMI 培養液以 1500 rpm、5 分鐘清洗一次，再將單核球細胞加入 RPMI 培養液中，並以 1:1000 的比例加入濃度為 5 µg/ml phytohaemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich) 刺激單核球的生長。

細胞存活率分析

為測試單一藥物 β -escin 和 cisplatin，以及合併兩種藥物 β -escin/cisplatin 作用在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞的毒殺效果，利用 MTT (3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) 方法進行比色分析。在 24 well 中種入 4×10^4 cell/well，加藥處理 24 小時後，將細胞的培養液移除，再利用 PBS 100 µl 清洗 2 次。利用培養液 (serum free) 將 MTT 溶液 (MTT 溶液: 濃度為 5 mg/ml 於 PBS 中) 稀釋 5 倍為 1 mg/ml，取 200 µl 加入至每格細胞中，放入含有 5% 的二氧化碳濃度及 37°C 的環境培養 4 小時待 MTT 完全反應，移除 MTT 培養液加入 600 µl DMSO 溶解 MTT 產生的紫色結晶，接著每格取 150 µl 於 96 well，利用 ELISA reader 在波長 540 nm 下測其吸

光值。

合併藥物效果

Combination Index (CI)被用於檢驗兩種藥物合併所產生的效果，會利用公式： $CI_{A+B} = \frac{S_A \times S_B}{S_C} \div 100$ (Drewinko et al., 1976)， S_A 為處理 A 藥物細胞的存活率， S_B 為處理 B 藥物細胞的存活率， S_C 為處理合併藥物細胞存活率， CI 的值定義為協同作用($CI > 1$)，加成作用($CI = 1$)，以及拮抗作用($CI < 1$)。

細胞週期分析

為了偵測細胞週期的分布，先將 1.5×10^5 個細胞種入 6 公分盤子中，控制組為加入 0.1% 的 DMSO，加藥組別處理分別是單一藥物 β -escin 及 cisplatin，和合併藥物(β -escin + cisplatin)， β -escin 需前處理 2 小時。24 小時後移除培養液，將細胞蒐集後以 PBS 清洗一次，再利用冰的 70% 酒精進行固定 (1×10^6 cells/ml)，放入 -20°C 冰箱備用。第二天以冰的 PBS 將殘留的 70% 酒精以 1500 rpm、五分鐘離心後去除，加入 PI (Propidium Iodine) 染劑 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of RNase, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PI and 0.1% Triton X-100) 量為 1×10^6 cells/ml 室溫避光作用 30 分鐘。離心 1500 rpm、五分鐘將染劑去除後加入 PBS，利用流式細胞儀進行分析

sub-G1, G0/G1, S 及 G2/M 期的分佈。

細胞凋亡分析-Annexin V-FITC 及 PI 染色

利用 Annexin V-FITC 凋亡偵測套組 (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Strong Biotech) 觀察加藥後早期凋亡的現象。在 24 well 中，每格種入 6×10^4 個細胞，處理藥物 β -escin 2.5 μ M, cisplatin 8 μ M 以及合併藥物 β -escin/cisplatin 2.5/8 μ M，16 小時後移除孔盤中的培養液，以冰的 PBS 清洗一次，再進行染色。將 4 μ l 的 Annexin V-FITC 及 4 μ l 的 PI 染劑配製於 200 μ l 的 binding buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4; 0.14 M NaCl; 2.5 mM CaCl_2) 中，再加入每格細胞中，室溫避光染色 15-20 分鐘，染色結束後再以 binding buffer 清洗 2 次，並加入 200 μ l 的 binding buffer 利用倒立式螢光顯微鏡進行拍照。

西方點墨法分析

使用 RIPA lysis buffer (25 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5% Glycerol, 1 mM EDTA, 100 μ M sodium orthovanadate, 200 μ M PMSF, protease inhibitor cocktail) 萃取細胞的蛋白，並注入含有 50 μ g 蛋白的 RIPA lysis buffer 使用 SDS-PAGE 電泳進行跑膠。跑膠結束後利用濕式轉漬方法將蛋白轉漬至 PVDF 膜上，使用含有 5% 的脫脂牛奶配製

於一倍的 PBST 中室溫 blocking 一個小時，清洗完後加入一級抗體 Fas, FasL, FADD, caspase 8 p18, BID, GAPDH 和 β -actin (1:1000, Santa Cruz), Bcl-2, Bax, caspase 9, PARP, I κ B α (1:1000, Cell Signaling Technology), caspase 3, NF κ B (1:1000, Genetex), 配於含有 1% 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室溫作用一個小時或是 4°C overnight, 再使用與 HRP 結合的二級抗體 anti-mouse 或是 anti-rabbit (1:10000, Jackson) 室溫作用一個小時。利用 ECL 系統 (enhanced chemiluminescence, Millipore) 化學冷光反應進行顯色, 再利用 Multi gauge version 2.2 (Fuji) 偵測冷光訊號, 再以 GAPDH 或是 β -actin 定量其表現。

異體移植

選用 5-8 週大的裸鼠 (NU/NU mice) 進行皮下注射, 以 TCCSUP 人類膀胱癌細胞株計數 5×10^6 個細胞懸浮於 100 μ l 的 PBS 中, 再以 1:1 的比例和 Matrigel 混合均勻, 使用胰島素針筒將細胞注入至老鼠背部兩側的皮下, 待腫瘤長出時每兩天測量一次腫瘤大小, 當腫瘤長至 100 mm^3 大小即開始施打藥物, 以腹腔注射藥物 β -escin 2 mg/kg 溶於 DMSO 中以及 cisplatin 2 mg/kg 溶於 PBS 中, 合併藥物處理組別 β -escin 需先提前兩個小時進行施打, 以一週兩次的頻率進行給藥, 並

且每兩天記錄一次腫瘤大小及體重，持續一個月完成一個療程。腫瘤

大小換算公式： $\frac{l \times s^2}{2}$ (mm³) (Tomayko and Reynolds, 1989)， l 為腫瘤的

長邊， s 為腫瘤的短邊，透過此公式估算出腫瘤的大小。

三、 結果

β -escin 與 cisplatin 以及合併處理可抑制 TCCSUP 細胞的生長

首先進行不同藥物濃度對細胞的存活測試，單一藥物濃度設定為 β -escin 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 μ M，cisplatin 濃度為 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M，以及不同濃度的 β -escin 和 cisplatin 依序組合，可以看到在合併處理 24 小時後其細胞存活率明顯低於單獨藥物處理 (圖二、A)；而另一種組合，合併藥物處理則為固定濃度 2.5 μ M 的 β -escin 與 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M 的 cisplatin 作為搭配，加藥 24 小時後發現合併處理可以有效的抑制 TCCSUP 膀胱癌細胞的生長 (圖三，A)。在將得到的存活率帶入 CI 公式運算，第一種組合的處理下， CI 值雖然皆大於 1，但隨著濃度的增加 CI 並沒有依照濃度效應而增加，也就是其協同效果在此組合下並沒有明顯的劑量依賴性(圖二，B)；而另一種組合，利用固定 2.5 μ M 的 β -escin 存活率為 79.5 套入公式運算，結果顯示在與不同的 cisplatin 濃度搭配下，所運算出的 CI 值皆大於 1，在與最高濃度 8 μ M 的 cisplatin 合併 CI 值為 1.3， $CI > 1$ 表示 β -escin 與 Cisplatin 的合併為協同作用，且隨著 cisplatin 的濃度升高，協同效果也跟著上升 (圖三，B)，後續實驗濃度會以 2.5 μ M 的 β -escin 和 8 μ M 的 cisplatin 合併進行實驗，探討相關機制。

β-escin 與 cisplatin 以及合併處理在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上誘發

早期凋亡

由前述結果實驗得知 β-escin 與 cisplatin 合併會誘發 TCCSUP 人類膀胱癌細胞的死亡 (圖四, A), 進一步利用 Annexin V-FITC/PI 進行染色, 確認細胞死亡是否經由凋亡的路徑。結果顯示在單一藥物 2.5 μM 的 β-escin 和 8 μM 的 cisplatin 以及合併處理 2.5/8 μM 的 β-escin/cisplatin, 作用 16 小時後利用 Annexin V-FITC/PI 進行染色, 可以看到 (圖四) 綠色螢光為 Annexin V-FITC 當螢光表現時, 代表有早期凋亡的發生, 細胞膜磷脂絲氨酸會外翻至膜外; 紅色螢光為 PI 染劑會與 DNA 作用進行細胞核的標定, 當有紅色螢光表現時, 代表凋亡較嚴重趨向壞死, 細胞膜已不完整使 PI 染劑得以進入細胞中標定細胞核。在合併藥物處理 (圖四, A, combine) 下, 可以觀察到較多綠螢光 (Annexin V) 及紅螢光 (PI) 表現的細胞, 統計結果 (圖四, B) 也顯示單一藥物 β-escin 與 cisplatin 處理下, 相較於控制組, 表現綠螢光即發生早期凋亡的細胞較多; 而在合併藥物處理下與單一藥物處理組別相比, 合併藥物組別發生早期凋亡的細胞顯著多於其他三個組別 (* $p < 0.05$)。

β-escin 與 cisplatin 以及合併處理在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上對細

胞週期的影響

進一步證實 β -escin 與 cisplatin 對 TCCSUP 人類膀胱癌細胞造成凋亡是否與細胞週期有關，給予單一藥物 2.5 μ M 的 β -escin 和 8 μ M 的 cisplatin 以及合併處理 2.5/8 μ M 的 β -escin/cisplatin，作用 24 小時後，先利用 PI 染劑標定 DNA 再使用流式細胞儀進行 PI 螢光的偵測，分辨出處在不同細胞週期的細胞，再統計出每個週期細胞佔全部細胞的比例 (圖五, A)，由結果可以得知在合併藥物處理下，sub-G1 期族群的比例顯著高於單一藥物處理組以及控制組，代表合併藥物會誘發凋亡的產生。在合併藥物處理下，位於 G0/G1 期的細胞比例也高於控制組別。統計結果 (圖五, B) 顯示 sub-G1 族群的細胞數量確實顯著高於單一藥物處理組及控制組，細胞在合併藥物處理下，G0/G1 期所佔的比例也顯著高於控制組，代表細胞週期停滯於細胞週期 G0/G1 期。

β -escin 與 cisplatin 以及合併處理比較 TCCSUP 膀胱癌細胞、SV-

HUC-1 正常膀胱細胞株以及病人周邊血液單核球的影響

從上述的實驗可以得知 β -escin 與 cisplatin 合併會誘發 TCCSUP 人類膀胱癌細胞的死亡 (圖三, A)，且會誘發早期凋亡 (圖四) 的產生。由於化療藥物並無專一性，因此 β -escin 和 cisplatin 的合併效果將進一

步處理在正常的膀胱上皮細胞株 SV-HUC-1 中，評估細胞的生長是否也會有影響。結果顯示利用 MTT 檢測細胞的存活率，發現不管是利用不同濃度的 β -escin 和 cisplatin，或是固定 2.5 μ M 的 β -escin 和 8 μ M 的 cisplatin 的合併處理，對於 SV-HUC-1 細胞生長並沒有造成顯著的影響 (圖六，A，B)。我們也透過醫院取得病人血液檢體，分離出單核球進行培養，在加藥處理後利用 MTT 檢測藥物對人體其他細胞是否也不會造成影響，結果顯示出 2.5 μ M 的 β -escin 與 8 μ M 的 cisplatin 以及合併處理 24, 48 及 72 小時下，對於病人周邊血單核球細胞生長並沒有造成顯著的影響 (圖七)。再利用 Western blot 進行蛋白層面的分析 (圖八)，在 2.5 μ M 的 β -escin 和 8 μ M 的 cisplatin 以及合併處理作用 24 小時後，收集 SV-HUC-1 以及 TCCSUP 的蛋白，凋亡蛋白 caspase 3 以及 PARP 在 SV-HUC-1 細胞上的表現少於在 TCCSUP 細胞上的表現，此結果顯示 β -escin 與 cisplatin 以及合併處理比起在正常膀胱上皮細胞，在癌細胞上會造成較嚴重的細胞凋亡現象。

β -escin 與 cisplatin 以及合併處理對於調控膀胱癌細胞週期相關蛋白

在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞株上的表現

從前述結果已得知藥物處理後細胞凋亡與細胞週期 G0/G1 期停滯相

關 (圖五, B), 因此進一步探討調控 G0/G1 期相關蛋白的表現, 包括 p53, Rb, cyclin E1 以及 CDK2, CDK2/cyclin E1 主要調控晚期 G1 細胞週期, CDK2/cyclin E1 會使 Rb 磷酸化, 促使細胞週期進入 S 期。當啟動 p53 抑癌基因其會調控 CDK2/cyclinE1, 使細胞週期停滯於 G1 期。實驗結果顯示在 β -escin 與 cisplatin 以及合併處理 24 小時後, p-p53, Rb 及 cyclin E1 蛋白的表現在合併藥物處理下顯著多於單一藥物處理組別 ($*p<0.05$), CDK2 的蛋白表現相較於控制組在合併藥物處理下是較少的 (圖九), 由結果可以得出造成細胞 G0/G1 期停滯的現象由 p53, Rb 及 cyclin E1 表現上升以及 CDK2 表現下降所調控。

β -escin 與 cisplatin 以及合併處理對於凋亡調控蛋白在人類膀胱癌細胞 TCCSUP 上的影響

由前述的結果證實合併藥物處理會產生早期細胞凋亡的現象 (圖四), 進一步探討凋亡蛋白在藥物處理後是如何被調控。凋亡路徑分成外源性與內源性的細胞凋亡, 外源性的細胞凋亡透過 Fas-L (death receptor) 與死亡受體 (Fas receptor) 結合 進一步調控 caspase 8, BID, caspase 3 及 PARP; 而內源性的細胞凋亡, 為經由粒線體路徑調控細胞凋亡, 也會受 Bcl-2 家族蛋白調控, 例如 Bax, Bcl-2, caspase 9, caspase 3 以及 PARP, 再利用 Western blot 分析蛋白的表現。結果顯示在外源性

的凋亡路徑中，給予合併藥物 24 小時後，下游的凋亡蛋白會受到 Fas-L 的調控其表現量顯著高於其他單一藥物處理組 (* $p < 0.05$)，Fas-L 活化下游的 caspase 8, caspase 3 及 PARP，三者的表現量皆明顯高於控制組，被切割的 BID 蛋白，在合併藥物處理下表現量也少於單一藥物處理組 (圖十，A)；而在內源性的凋亡路徑，BID 會進一步調控 Bax，在合併藥物處理下 Bax 的表現量也高於控制組 (圖十，B)。Bcl-2 會去抑制粒線體膜上的通透性，使 cytochrome c 無法被釋放進一步 caspase 9 就無法被活化，由 (圖十，B) 結果可以看到在合併藥物處理後，Bcl-2 的表現量為下降，進一步活化的 caspase 9 其被切割的片段量也顯著高於單一藥物處理組 (* $p < 0.05$)，最後活化 caspase 3 以及 PARP，造成細胞凋亡的產生。

β -escin 與 cisplatin 以及合併處理對於 NF- κ B 路徑的調控

β -escin 於先前研究顯示透過 NF- κ B 路徑抑制癌症的發展，NF- κ B 與 I κ B 為一複合體，當 I κ B 被 IKK 磷酸化的時，NF- κ B 與 I κ B 複合體會分離，NF- κ B 會進核調控癌細胞的增殖、侵入、血管新生或是轉移等。由結果可以看出，當加入合併藥物處理後，I κ B 的表現量對於控制組來說相對較低，也進一步影響 NF- κ B 使其表現量下降 (圖十一)，使癌細胞的增殖或是轉移等受到抑制。

β-escin 與 cisplatin 以及合併處理對裸鼠腫瘤的影響

測試藥物在動物模式上是否達到抑制腫瘤的效果，選用 5-8 週大的裸鼠 (NU/NU mice)，在其腿部兩側以皮下注射 5×10^5 個 TCCSUP 人類膀胱癌細胞，利用計算腫瘤大小公式 $\frac{l \times s^2}{2}$ 算出腫瘤大小，待腫瘤長至 100 mm^3 時即開始以皮下注射施打藥物，藥物濃度為 2 mg/kg β-escin 以及 2 mg/kg 的 cisplatin，β-escin 須先給藥兩個小時後，再給予第二劑 cisplatin 藥物，以一週兩次的頻率進行給藥，持續一個月完成一個療程。結果顯示給藥 18 天後 (圖十二，A)，給予合併藥物的小鼠腫瘤大小相較於其他組別是較小的，也就說合併藥物能夠有效抑制人類膀胱癌的生長，但小鼠的體重在打藥 6 天後逐漸下降 (圖十二，B)，最後給予合併藥物五隻老鼠有 3 隻死亡，給藥的頻率以及藥物濃度的部分需再修正。

四、 討論

Cisplatin 是一種以鉑金為基底的化療藥物，其透過烷化 DNA 結構，使 DNA 無法解螺旋進而進行複製，促使凋亡現象的產生。且 Cisplatin 也被使用於多種癌症上，像是卵巢癌、膀胱癌、肺癌以及大腸癌 (Hagen et al., 2013)。然而在台灣罹患膀胱癌之患者多為腎功能障礙者，而 Cisplatin 其最大副作用為腎毒性 (Chen et al., 1995)，因此合併藥物治療使兩種藥物的協同作用來降低 cisplatin 所帶來的腎毒性。最近許多研究顯示在細胞實驗以及動物實驗上，將藥物與天然化合物結合，其協同作用產生抑制癌症的效果 (Ho et al., 2015; Zhao et al., 2014)，Ho 等人在 2015 年的研究顯示 cisplatin 與 triptolide 的協同效果在人類的膀胱癌細胞上具有抑制其生長以及促使細胞凋亡的現象 (Ho et al., 2015; Zhao et al., 2014)。而將 cisplatin 和 etoposide 兩種化療藥物與天然化合物 epi-gallocatechin-3-gallate 結合，在非小細胞肺癌上，其協同效果於第一期臨床測試為安全且有效的 (Ho et al., 2015; Zhao et al., 2014)。

β -escin 在臨床用藥上沒有嚴重的副作用 (Zhou et al., 2009)，其可透過抑制 NF- κ B 路徑在人類的腎癌、慢性骨髓癌、肺腺癌以及胰腺癌細胞上增加對化療藥物的敏感，在神經膠質瘤細胞和肺細胞也會誘發細

胞凋亡的產生 (Ciftci et al., 2015; Harikumar et al., 2010; Rimmon et al., 2013)。文獻顯示 β -escin 與化療藥物的結合，像是 5-fluorouracil 以及 gemcitabine 分別於人類肝細胞癌以及胰腺癌，說明兩種化療藥物與 β -escin 結合皆有協同的抗癌效果 (Ming et al., 2010; Wang et al., 2012)。所以根據先前的研究，我們會對於 β -escin 與 cisplatin 的協同效果探討對於凋亡路徑或是對於 NF- κ B 路徑的影響。

結果顯示在處理合併藥物 2.5 μ M 的 β -escin 以及 8 μ M 的 cisplatin 於人類移型上皮膀胱癌上，會藉由調控 p53，造成早期凋亡的產生使細胞週期停滯於 G0/G1 期(圖四、圖五)，與 cisplatin 調控的凋亡路徑相同 (Siddik, 2003)，主要凋亡機制的影響 cisplatin 為主要調控， β -escin 則為輔助效果。而細胞週期 G0/G1 期的停滯受到 CDK2 以及 cyclin E1，合併處理下 CDK2 的表現量下降，cyclin E1 的量反而上升 (圖九)，有文獻指出 cyclin E1 在調控細胞週期上具有雙重角色，文獻中提到乳癌細胞 MCF-7 過度表達 cyclin E1 會增加 Fas, TRAIL 和 TNF- α 誘導凋亡的敏感性 (Dhillon and Mudryj, 2003; Mazumder et al., 2004)，因此可以看到在我們的結果中 cyclin E1 的表現量反而上升。

Cisplatin 會透過許多分子誘導凋亡，像是透過外源性的死亡受體 (death receptor)路徑或是內源性的粒線體路徑 (Wu et al., 2012; Yadav

and Chandra, 2014), 因此我們會在處理合併藥物 β -escin 及 cisplatin 後分析活化態的 caspase 3, 8, 9 以及 PARP。結果顯示當人類的膀胱癌細胞處理合併藥物 2.5 μ M 的 β -escin 以及 8 μ M 的 cisplatin 時, 合併藥物會透過 Fas-L 的活化啟動下游的 caspase 3, 8, 9 以及 PARP (Zhang et al., 2017), 而活化態的 caspase 3, 8, 9 及 PARP 的表現量也會高於單一處理組別 (圖十)。在 Rimmon 等人的研究也顯示, β -escin 與 cisplatin 於人類的胰腺癌細胞上確實有抑制其生長的效果, 產生凋亡增加的現象 (Rimmon et al., 2013)。此外抗凋亡基因 Bcl-2 家族會去抑制凋亡路徑訊號的傳遞 (Yadav and Chandra, 2014) 而我們的結果也顯示在 Bcl-2 的表達量在合併處理下是下降的, 而活化的 Bax 的表達量為上升 (圖十, B)。

先前文獻也顯示 NF- κ B 會藉由 Bcl3 或是 IKK β 進一步正調控 MDM2 的表現量達到抑制 p53 的表現 (Kashatus et al., 2006), 因此我們分析 NF- κ B 的路徑是否會受到合併藥物 2.5 μ M 的 β -escin 以及 8 μ M 的 cisplatin 的調控。結果顯示 NF- κ B 及 I κ B α 的表現量在合併藥物處理後皆下降 (圖十一), 顯示可能 p53 會受到 NF- κ B 的調控, 需再利用後續實驗再證明。

由結果可以顯示合併藥物處理其調控凋亡路徑雖與 cisplatin 相似, 但

由蛋白表現可以得出 cisplatin 主要調控 Fas 路徑 (BID, Bax 及 caspase 8)，而合併藥物主要活化 Fas-L，進一步調控 Fas 路徑 (BID, Bax 及 caspase 8)、粒線體路徑 (Bcl-2 及 caspase 9)，以及細胞週期 (p53, Rb, CDK2 和 cyclin E1) 這三條路徑，造成細胞凋亡以及細胞週期 G0/G1 期停滯 (圖十四)。

最後我們利用動物模式呈現藥物的療效，投藥合併藥物 2 mg/kg 的 β -escin 以及 2 mg/kg 的 cisplatin 於裸鼠上，結果顯示合併藥物達到抑制人類膀胱腫瘤 (圖十二，A)，根據先前文獻也顯示天然化合物與 cisplatin 或是 gemcitabine 合併對於小鼠腫瘤有抑制的效果 (Ho et al., 2015; Lee and Wu, 2015; Wang et al., 2012)。但實驗結果在投藥第 18 天後，合併藥物的小鼠因為體重過輕而死亡 (圖十二，B)，可能藥物濃度 cisplatin 的濃度太高對於老鼠的腎臟造成腎毒性的產生 (圖十三)，以及給藥頻率造成小鼠負荷，後續會利用 Balb/c 小鼠測試投藥濃度與頻率。

五、 參考文獻

Carreon, T., Hein, M.J., Hanley, K.W., Viet, S.M., and Ruder, A.M. (2014). Bladder cancer incidence among workers exposed to o-toluidine, aniline and nitrobenzene at a rubber chemical manufacturing plant. *Occup Environ Med* 71, 175-182.

Chen, C.H., Dickman, K.G., Huang, C.Y., Moriya, M., Shun, C.T., Tai, H.C., Huang, K.H., Wang, S.M., Lee, Y.J., Grollman, A.P., *et al.* (2013). Aristolochic acid-induced upper tract urothelial carcinoma in Taiwan: clinical characteristics and outcomes. *Int J Cancer* 133, 14-20.

Chen, K.S., Lai, M.K., Huang, C.C., Chu, S.H., and Leu, M.L. (1995). Urologic cancers in uremic patients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 25, 694-700.

Chu, H., Wang, M., and Zhang, Z. (2013). Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility. *J Biomed Res* 27, 170-178.

Chung, C.J., Huang, Y.L., Huang, Y.K., Wu, M.M., Chen, S.Y., Hsueh, Y.M., and Chen, C.J. (2013). Urinary arsenic profiles and the risks of cancer mortality: a population-based 20-year follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *Environ Res* 122, 25-30.

Ciarimboli, G. (2014). Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Side-effects. *ANTICANCER RESEARCH* 34, 547-550.

Ciftci, G.A., Iscan, A., and Kutlu, M. (2015). Escin reduces cell proliferation and induces apoptosis on glioma and lung adenocarcinoma cell lines. *Cytotechnology* 67, 893-904.

Dasari, S., and Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740, 364-378.

Dhillon, N.K., and Mudryj, M. (2003). Cyclin E overexpression enhances cytokine-mediated apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Genes Immun* 4, 336-342.

Drewinko, B., Loo, T.L., Brown, B., Gottlieb, J.A., and Freireich, E.J. (1976). Combination chemotherapy in vitro with adriamycin. Observations of additive, antagonistic, and synergistic effects when used in two-drug combinations on cultured human lymphoma cells. *Cancer biochemistry biophysics 1*, 187-195.

Grases, F., Garcia-Gonzalez, R., Redondo, E., Costa-Bauza, A., Simonet, B.M., Sartini, R.P., Bassa, A., Gallegos, C., Payeras, A., Saro, D., *et al.* (2004). Effects of escin on indinavir crystallization time in the urine of patients with HIV-I infection: a multicenter, randomized, open-label, controlled, four-period crossover trial. *Clinical therapeutics 26*, 2045-2055.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell 140*, 883-899.

Hagen, R.M., Chedea, V.S., Mintoff, C.P., Bowler, E., Morse, H.R., and Ladomery, M.R. (2013). Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis and expression of the caspase 9a splice variant in PC3 prostate cancer cells. *Int J Oncol 43*, 194-200.

Hardin, J.W. (1957). A revision of the American Hippocastanaceae. *Brittonia 9*, 145.

Harford-Wright, E., Bidère, N., and Gavard, J. (2016). β -escin selectively targets the glioblastoma-initiating cell population and reduces cell viability. *Oncotarget 7*, 41.

Harikumar, K.B., Sung, B., Pandey, M.K., Guha, S., Krishnan, S., and Aggarwal, B.B. (2010). Escin, a pentacyclic triterpene, chemosensitizes human tumor cells through inhibition of nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Mol Pharmacol 77*, 818-827.

Ho, J.N., Byun, S.S., Lee, S., Oh, J.J., Hong, S.K., Lee, S.E., and Yeon, J.S. (2015). Synergistic antitumor effect of triptolide and cisplatin in cisplatin resistant human bladder cancer cells. *J Urol 193*, 1016-1022.

Hung, S.C., Wang, S.S., Yang, C.K., Li, J.R., Cheng, C.L., Ou, Y.C., Ho, H.C., Chiu, K.Y., and Chen, C.S. (2017). Comparison of Efficacy of

Adjuvant MEC (Methotrexate, Epirubicin and Cisplatin) and GC (Gemcitabine and Cisplatin) in Advanced Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Anticancer Res* 37, 1875-1883.

Kam, P.C.A., and Ferch, N.I. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55.

Kashatus, D., Cogswell, P., and Baldwin, A.S. (2006). Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes Dev* 20, 225-235.
Knowles, M.A., and Hurst, C.D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 15, 25-41.

Lee, J.G., and Wu, R. (2015). Erlotinib-cisplatin combination inhibits growth and angiogenesis through c-MYC and HIF-1alpha in EGFR-mutated lung cancer in vitro and in vivo. *Neoplasia* 17, 190-200.

Li, J., Yang, Z., Li, Y., Xia, J., Li, D., Li, H., Ren, M., Liao, Y., Yu, S., Chen, Y., *et al.* (2016). Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment. *Oncotarget* 7, 44763-44778.

Liao, J.M., Cao, B., Deng, J., Zhou, X., Strong, M., Zeng, S., Xiong, J., Flemington, E., and Lu, H. (2016). TFIIS.h, a new target of p53, regulates transcription efficiency of pro-apoptotic bax gene. *Sci Rep* 6, 23542.

Maier, H.J., Schmidt-Strassburger, U., Huber, M.A., Wiedemann, E.M., Beug, H., and Wirth, T. (2010). NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer letters* 295, 214-228.

Mazumder, S., DuPree, E.L., and Almasan, A. (2004). A Dual Role of Cyclin E in Cell Proliferation and Apoptosis May provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 65-75.

Mei, J.Y., Zhang, M.J., Wang, Y.Y., and Liu, Y.H. (2017). The positive clinical therapeutically effects of Escin on advanced thyroid cancer. *Cancer Med* 6, 937-943.

Ming, Z.J., Hu, Y., Qiu, Y.H., Cao, L., and Zhang, X.G. (2010). Synergistic effects of beta-aescin and 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* *17*, 575-580.

Montironi, R., and Lopez-Beltran, A. (2005). The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *International journal of surgical pathology* *13*, 143-153.

Mukhopadhyay, P., Horvath, B., Zsengeller, Z., Zielonka, J., Tanchian, G., Holovac, E., Kechrid, M., Patel, V., Stillman, I.E., Parikh, S.M., *et al.* (2012). Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. *Free Radic Biol Med* *52*, 497-506.

Patlolla, J.M.R., and Rao, C.V. (2015). Anti-inflammatory and Anti-cancer Properties of β -Escin, a Triterpene Saponin. *Current Pharmacology Reports* *1*, 170-178.

Pillai, R., Wang, D., Mayer, E.K., and Abel, P. (2011). Do standardised prognostic algorithms reflect local practice? Application of EORTC risk tables for non-muscle invasive (pTa/pT1) bladder cancer recurrence and progression in a local cohort. *ScientificWorldJournal* *11*, 751-759.

Pujol, J.-L., Carestia, and Daurès, J.-P. (2000). Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *British Journal of Cancer* *83*, 8-15.

Rimmon, A., Vexler, A., Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., and Lev-Ari, S. (2013). Escin Chemosensitizes Human Pancreatic Cancer Cells and Inhibits the Nuclear Factor-kappaB Signaling Pathway. *Biochem Res Int* *2013*, 251752.

Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* *22*, 7265-7279.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016). *Cancer statistics, 2016*.

CA Cancer J Clin 66, 7-30.

Sirtori, C.R. (2001). Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res* 44, 183-193.

Talaska, G., Gaultney, B., Peters, S., Succop, P., and Vermeulen, R. (2012). 2-Naphthol levels and genotoxicity in rubber workers. *Toxicology letters* 213, 45-48.

Tomayko, M.M., and Reynolds, C.P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic(nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 24, 148-154.

Ve May Dianne Kua, Woei Kean Ng, Sasidharan Sreenivasan, and Lai, N.S. (2017). Opioids in Inducing Cell Apoptosis_ A Mini Review. *J of Biomed & Clin Sci* 2, 53-61.

Wang, Y.W., Wang, S.J., Zhou, Y.N., Pan, S.H., and Sun, B. (2012). Escin augments the efficacy of gemcitabine through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in pancreatic cancer both in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 138, 785-797.

Wei, F., Ma, L.Y., Cheng, X.L., Lin, R.C., Jin, W.T., Khan, I.A., and Lu, J.Q. (2005). Preparative HPLC for Purification of Four Isomeric Bioactive Saponins from the Seeds of *Aesculus chinensis*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28, 763-773.

Wu, C.S., Chen, Y.J., Chen, J.J., Shieh, J.J., Huang, C.H., Lin, P.S., Chang, G.C., Chang, J.T., and Lin, C.C. (2012). Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 818261.

Yadav, N., and Chandra, D. (2014). Mitochondrial and postmitochondrial survival signaling in cancer. *Mitochondrion* 16, 18-25.

Yang, H.-Y., Wang, J.-D., Lo, T.-C., and Chen, P.-C. (2011). Increased Risks of Upper Tract Urothelial Carcinoma in Male and Female Chinese

Herbalists. *Journal of the Formosan Medical Association* 110, 161-168.

Yuan, S.Y., Cheng, C.L., Wang, S.S., Ho, H.C., Chiu, K.Y., Chen, C.S., Chen, C.C., Shiau, M.Y., and Ou, Y.C. (2017). Escin induces apoptosis in human renal cancer cells through G2/M arrest and reactive oxygen species-modulated mitochondrial pathways. *Oncology reports* 37, 1002-1010.

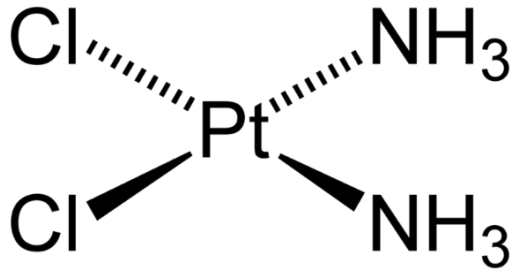
Zhang, Z., Zhao, J., Pang, Q., Wang, A., Chen, M., and Wei, X. (2017). An in vitro study on the effects of the combination of salinomycin with cisplatin on human gastric cancer cells. *Mol Med Rep*.

Zhao, H., Zhu, W., Xie, P., Li, H., Zhang, X., Sun, X., Yu, J., and Xing, L. (2014). A phase I study of concurrent chemotherapy and thoracic radiotherapy with oral epigallocatechin-3-gallate protection in patients with locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 110, 132-136.

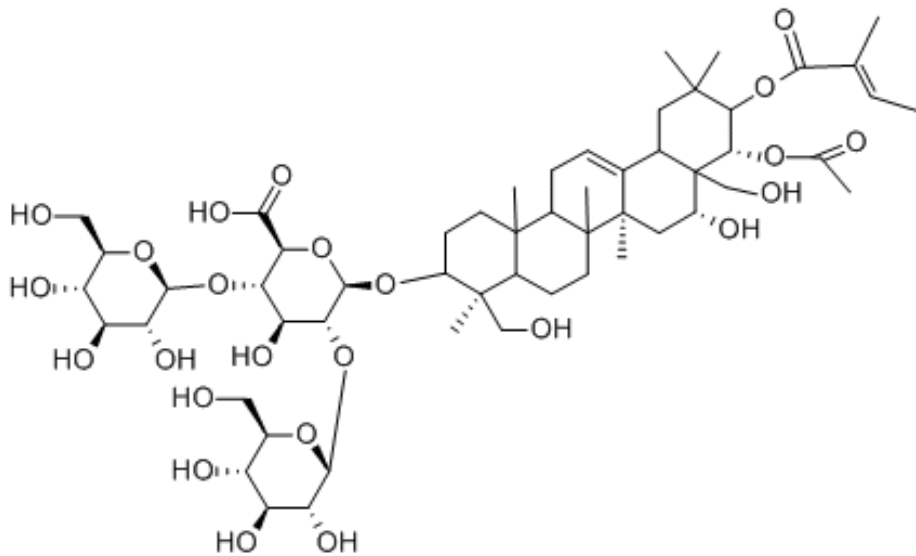
Zhou, X.Y., Fu, F.H., Li, Z., Dong, Q.J., He, J., and Wang, C.H. (2009). Escin, a natural mixture of triterpene saponins, exhibits antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Planta medica* 75, 1580-1585.

六、圖表

(A)



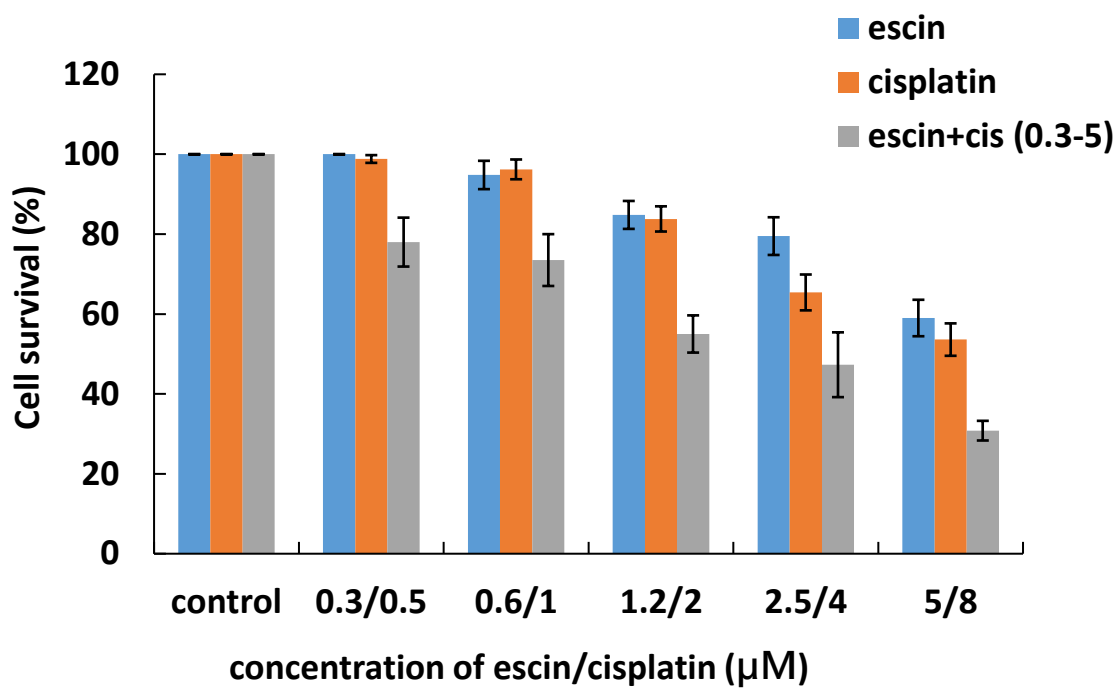
(B)



圖一、藥物的化學結構

(A) Cisplatin 為順式的鉑金藥物 (B) β -escin 為五環三萜 (pentacyclic triterpene) 的結構。

(A)



(B)

	control	0.3/0.5	0.6/1	1.2/2	2.5/4	5/8
escin	100.0	100.0	94.8	84.8	79.5	59.0
cisplatin	100.0	98.8	96.2	83.8	65.4	53.6
escin+cis (0.3-5)	100.0	78.0	73.5	55.0	47.3	30.8
CI		1.3	1.2	1.3	1.1	1.0

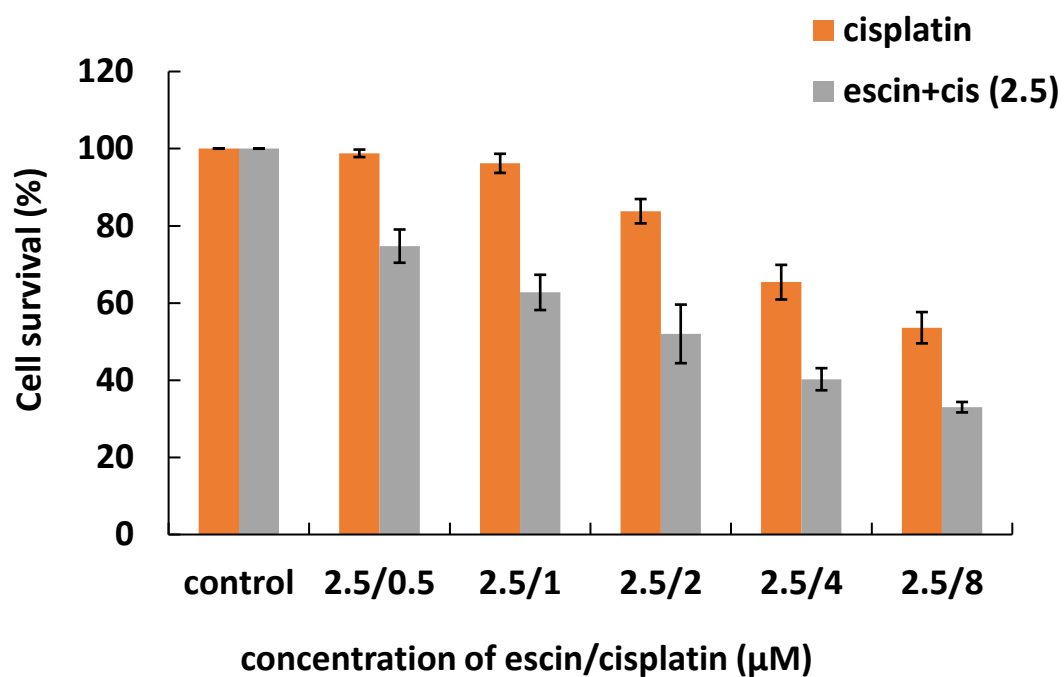
(Unit: %)

圖二、在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上不同濃度的 β -escin (escin)和

cisplatin 的效果

(A) 施加單獨藥物 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 μ M 的 β -escin 以及 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M 的 cisplatin，合併藥物處理則為不同濃度的 β -escin 與 cisplatin 依序組合，利用 MTT 方法測其細胞存活率，在合併處理組別上存活率明顯低於單獨藥物處理組別。(B) 再利用細胞存活率算出 Combination Index (CI)，結果顯示最高濃度組合之外，其他處理組別 $CI > 1$ ，表示 β -escin 加上 cisplatin 兩種藥物合併在人類膀胱癌細胞上具有協同作用。

(A)



(B)

	control	2.5/0.5	2.5/1	2.5/2	2.5/4	2.5/8
escin	100.0	100.0	94.8	84.8	79.5	59.0
cisplatin	100.0	98.8	96.2	83.8	65.4	53.6
escin+cis (2.5)	100.0	74.8	62.8	52.0	40.3	33.0
CI		1.1	1.2	1.3	1.3	1.3

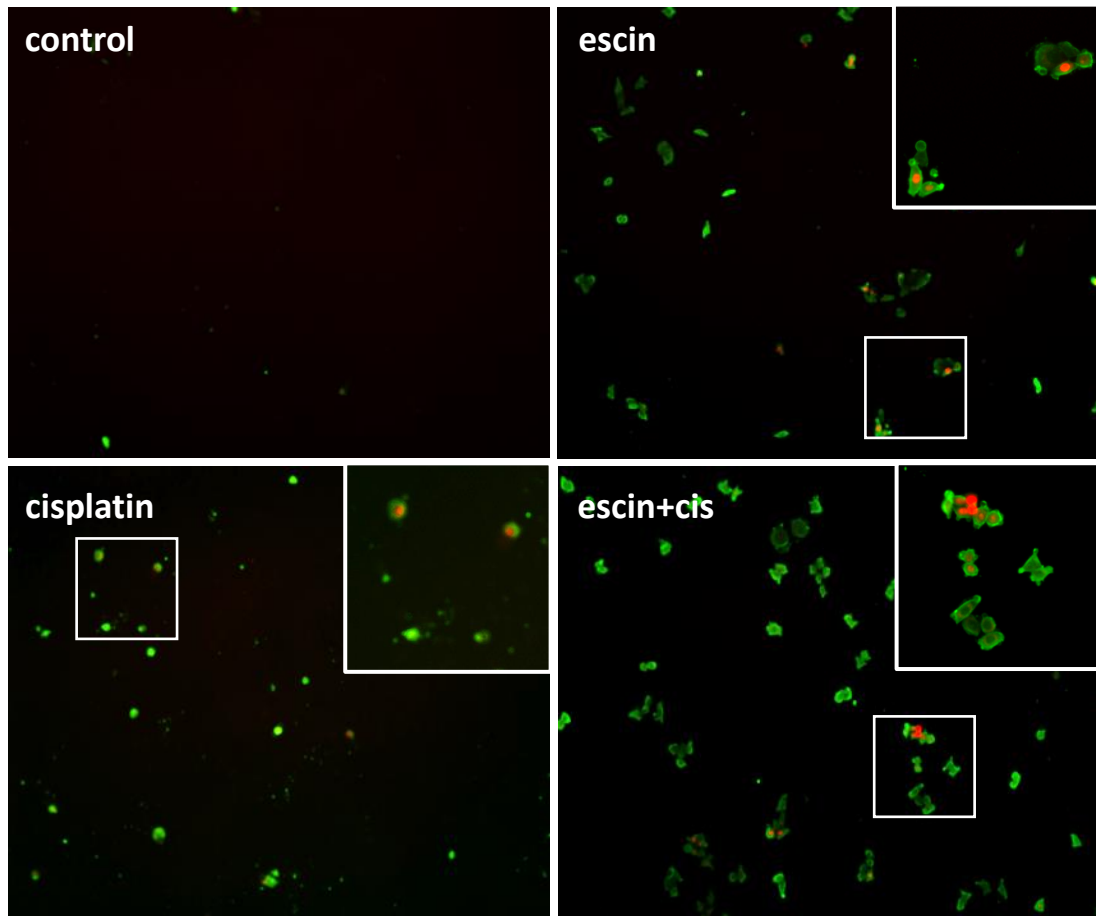
(Unit: %)

圖三、在 TCCSUP 人類膀胱癌細胞上固定 β -escin (escin)濃度和不

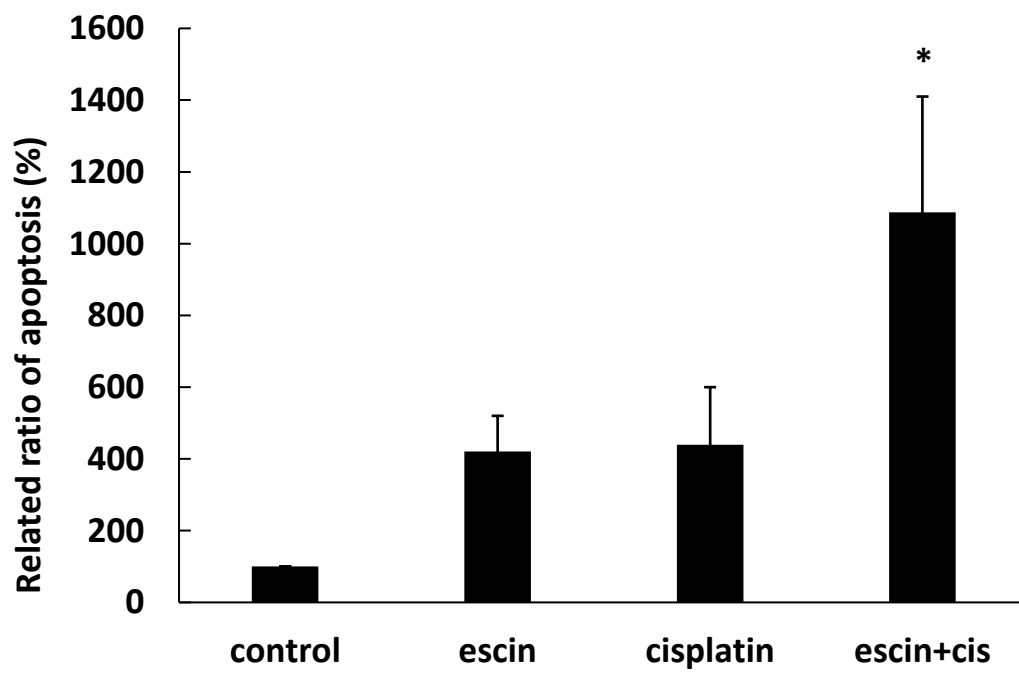
同濃度的 cisplatin 合併之效果

(A) 施加單獨藥物 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 μ M 的 β -escin 以及 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M 的 cisplatin，合併藥物處理則固定 β -escin 於濃度 2.5 μ M 搭配 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M 五種不同濃度的 cisplatin，利用 MTT 方法測其細胞存活率，在合併處理組別上存活率明顯低於單獨藥物處理組別。(B) 再利用細胞存活率算出 Combination Index (CI)，結果顯示 $CI > 1$ ，表示 β -escin 加上 cisplatin 兩種藥物合併在人類膀胱癌細胞上具有協同作用。

(A)



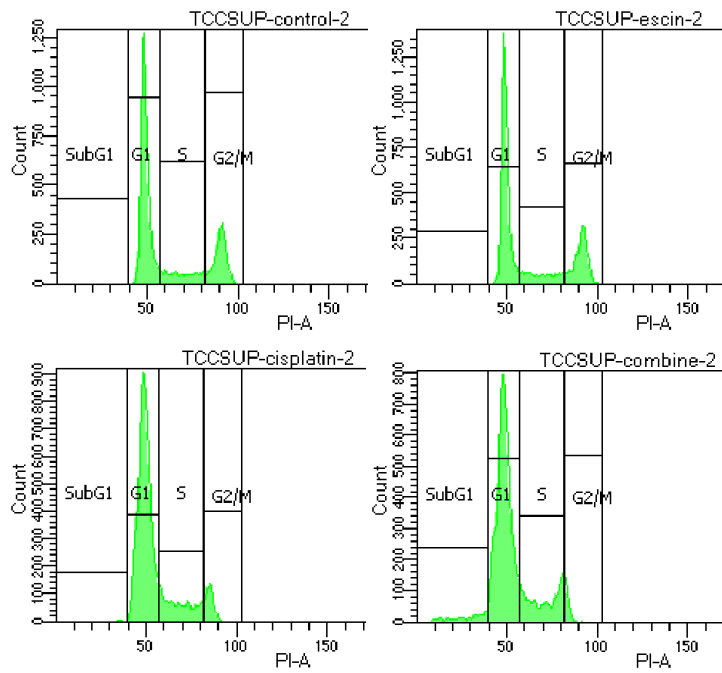
(B)



圖四、 β -escin 與 cisplatin 兩種藥物合併會誘發早期凋亡的產生

利用 Annexin V-FITC/PI 染色，綠色螢光為 Annexin V-FITC，紅色螢光為 PI。在四種處理下，(A) 控制組施加 0.1% DMSO，單一藥物處理為 β -escin 2.5 μ M 和 cisplatin 8 μ M，以及合併藥物處理 2.5 μ M 的 β -escin 以及 8 μ M 的 cisplatin，(B) 統計結果顯示在合併處理下發生早期凋亡的細胞數量顯著多於單一藥物處理的組別。白色框內的細胞放大圖在右上角，可以看到紅色為核染上 PI 染劑，綠色為 Annexin V-FITC 染上膜上的 phosphatidylserine。

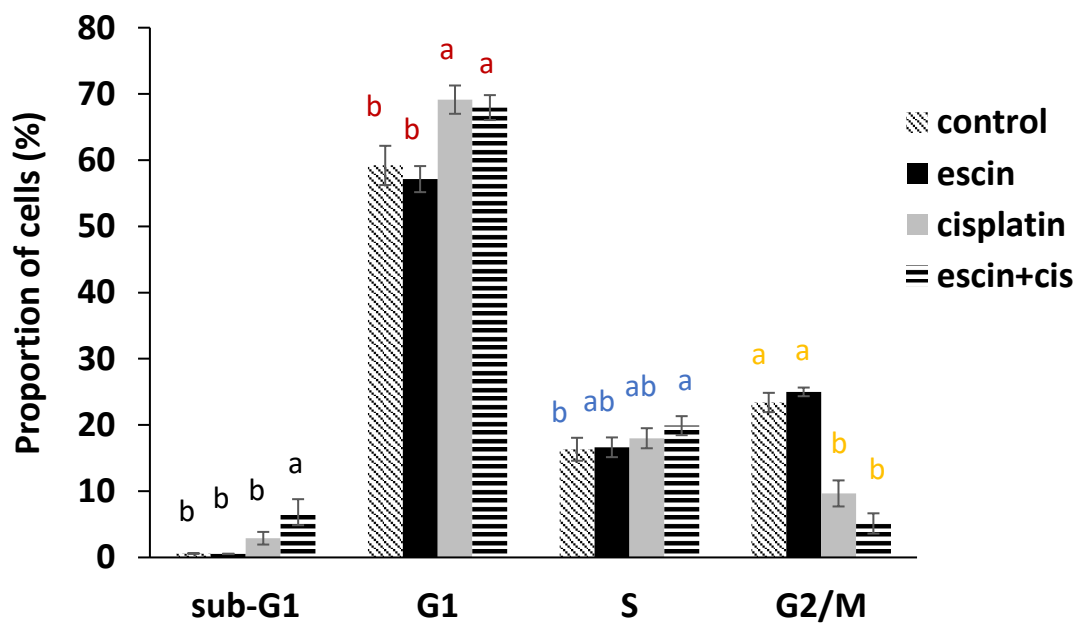
(A)



	sub-G1	G1	S	G2/M
control	0.6	59.2	16.3	23.4
escin	0.5	57.1	16.6	25.0
cisplatin	2.9	69.1	18.0	9.7
combine (escin+cis)	6.8	67.9	19.9	5.1

(Unit: %)

(B)

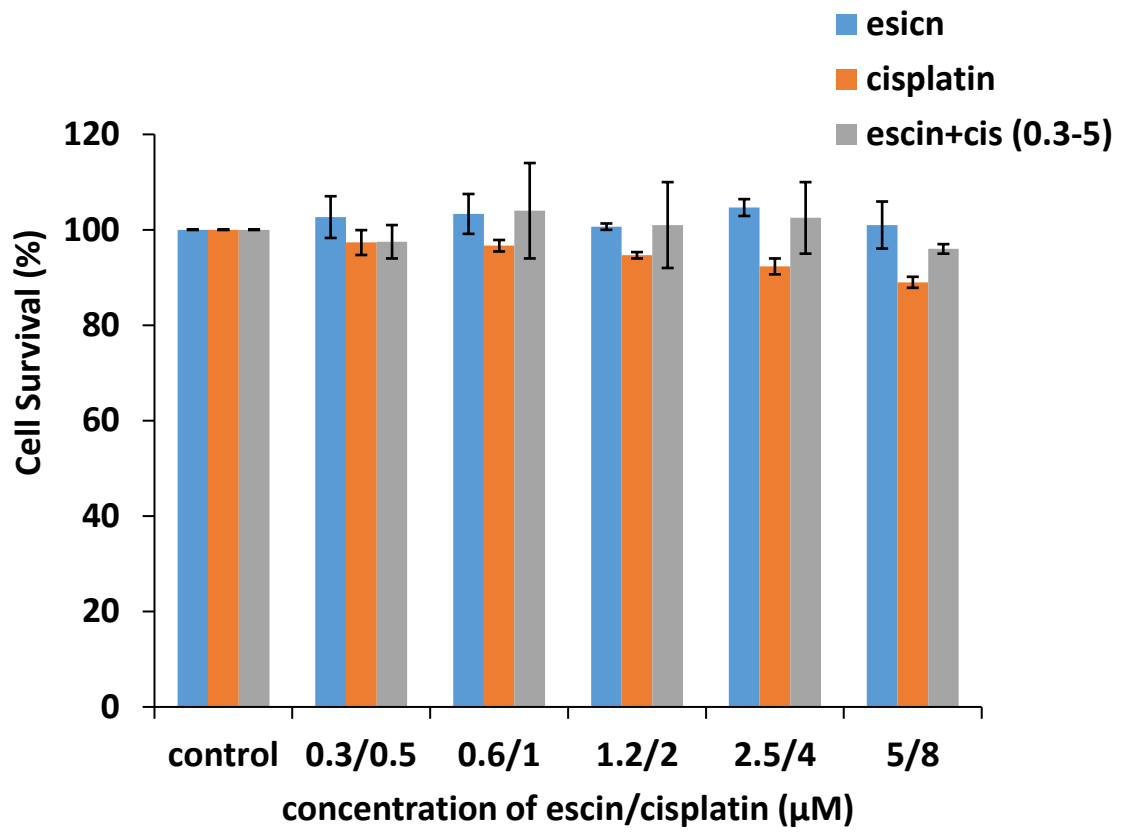


圖五、在人類膀胱癌細胞施加合併藥物 β -escin (escin)和 cisplatin 對

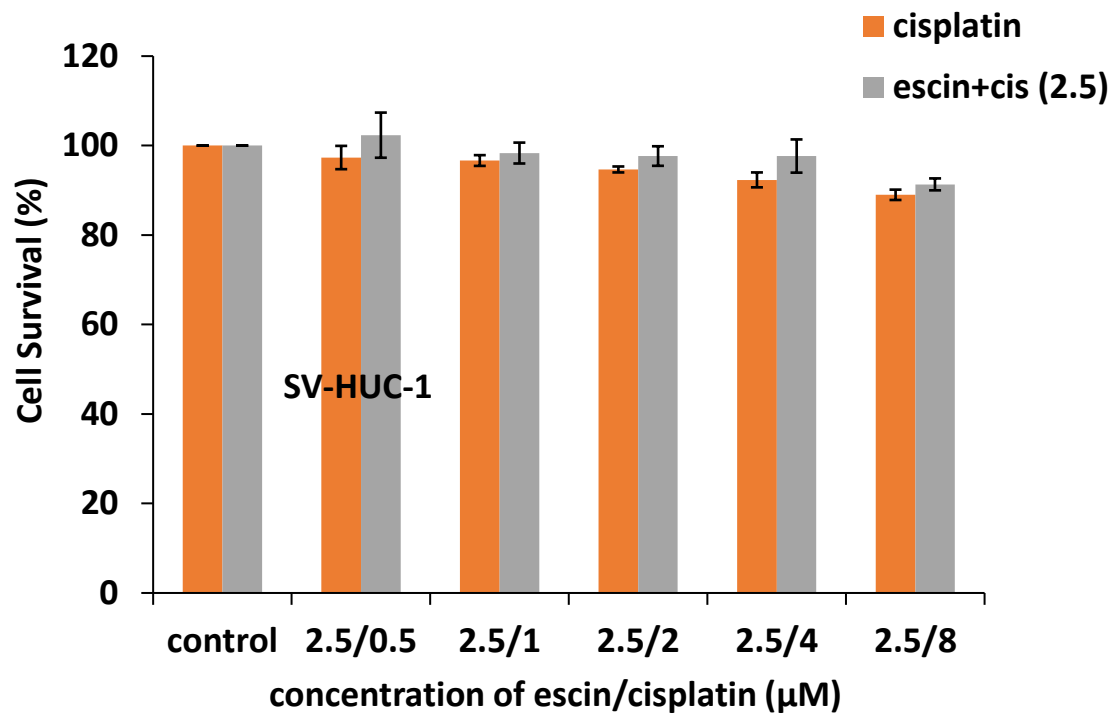
細胞週期的影響

在處理 2.5 μ M 的 β -escin 以及 8 μ M 的 cisplatin 下，利用 PI 染劑標記 DNA 分析細胞週期的分佈，由(A) 結果顯示在加入合併藥物處理後，凋亡的細胞 (sub-G1)所佔的比例高於其他單一藥物處理，統計結果也顯示(B) sub-G1 的族群在合併藥物處理下顯著高於其他處理組，在 G0/G1 期的比例也高於控制組，統計結果顯示(B) 合併藥物處理對於控制組 G0/G1 族群比例也有顯著高於單一藥物的表現，表示細胞週期停滯於 G0/G1 時期。

(A)



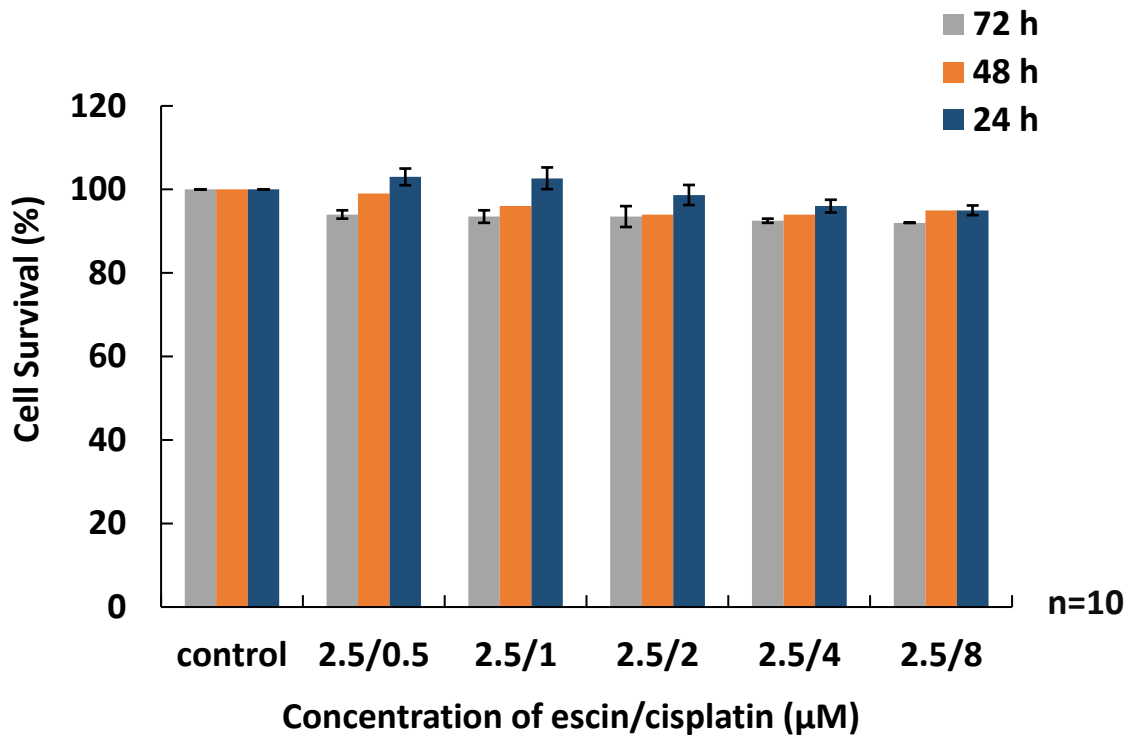
(B)



圖六、 β -escin (escin)與 cisplatin 兩種藥物合併在正常膀胱上皮細胞株

(SV-HUC-1)的影響

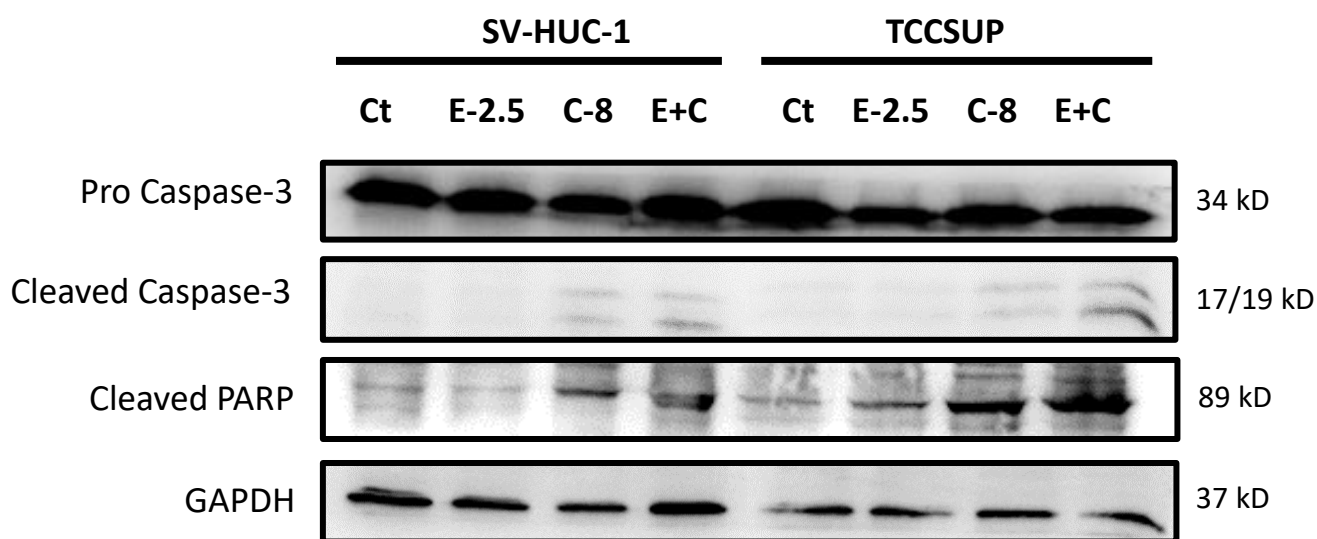
利用 MTT 方法測試細胞存活率，在正常膀胱上皮細胞株 (SV-HUC-1)施加單一藥物以及合併藥物，(A) 施加不同濃度 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 μ M 的 β -escin 以及 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M 的 cisplatin 以及(B) 固定 β -escin 濃度 2.5 μ M 皆對於正常的膀胱上皮細胞株的存活率沒有顯著的影響。



圖七、 β -escin (escin)與 cisplatin 藥物合併對於周邊血液 (PBMC)單

核球的影響

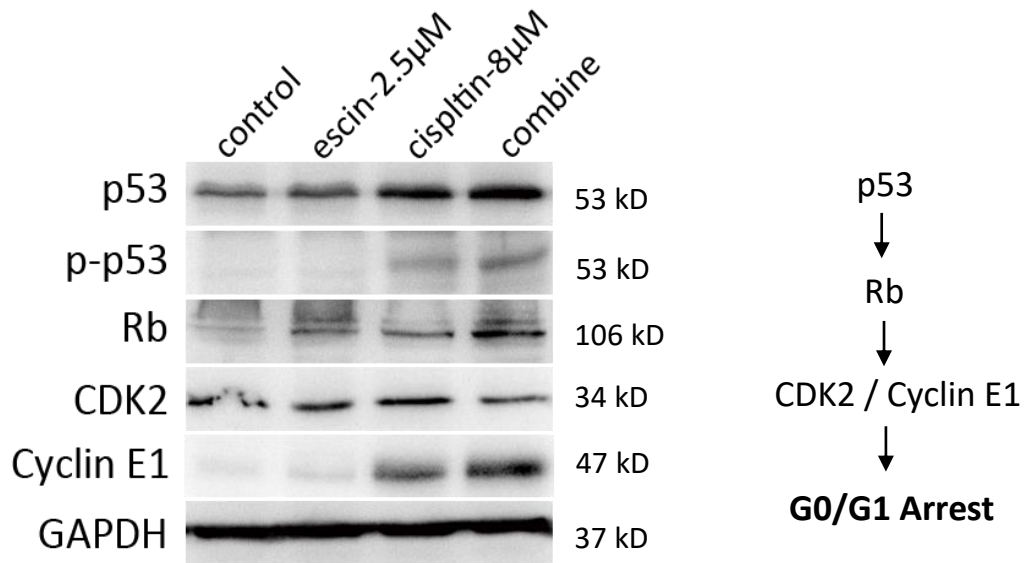
處理合併藥物固定 β -escin 濃度及不同濃度 cisplatin 藥物，在 24, 48 及 72 小時後，利用 MTT 方法測試病人周邊血單核球的存活率，結果顯示合併藥物對於淋巴球的存活率並沒有造成影響。



圖八、 β -escin 與 cisplatin 藥物合併施加後對於 SV-HUC-1 細胞以及

TCCSUP 膀胱癌細胞的影響

處理藥物 escin 2.5 μ M 以及 8 μ M 的 cisplatin 24 小時後，利用 Western blot 檢測藥物對於凋亡蛋白表達的影響，顯示在凋亡蛋白 caspase 3 及 PARP 在 SV-HUC-1 正常細胞株上的表現比起在膀胱癌細胞株 (TCCSUP) 上的表現還要少，代表合併藥物對於正常的膀胱上皮細胞是沒有造成嚴重的細胞凋亡產生。

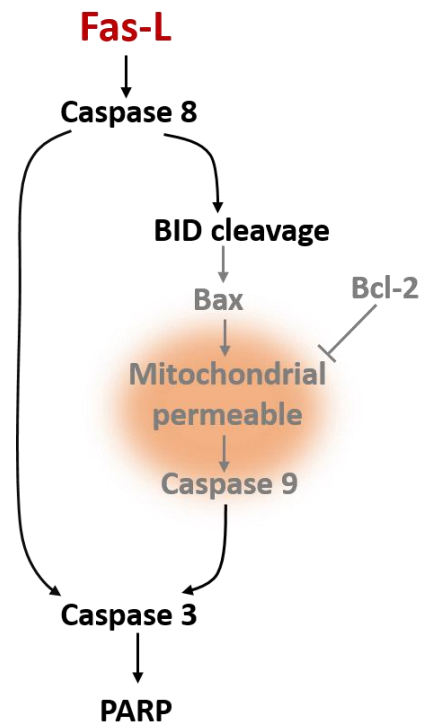
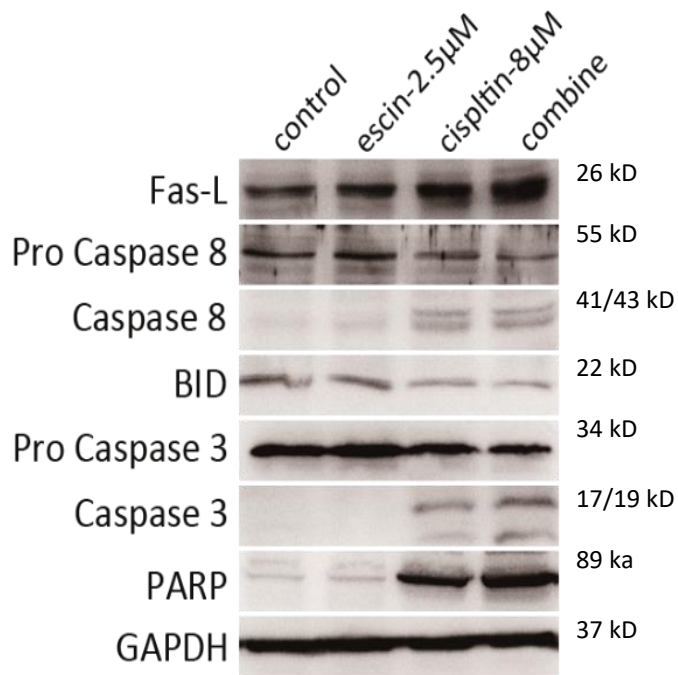


圖九、在處理 2.5 µM 的 β-escin (escin)以及 8 µM 的 cisplatin 下，利

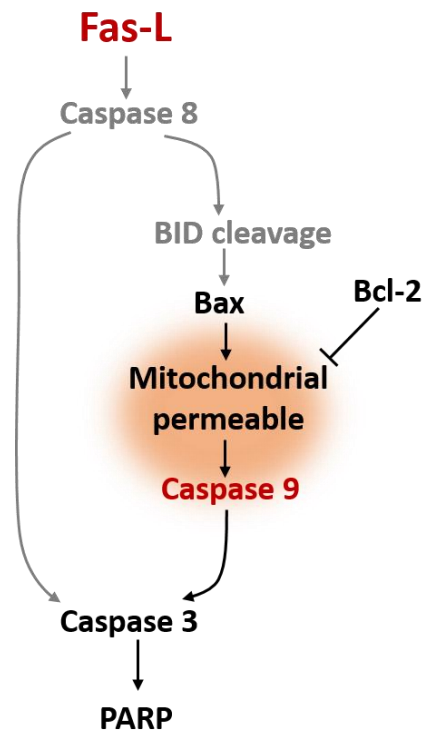
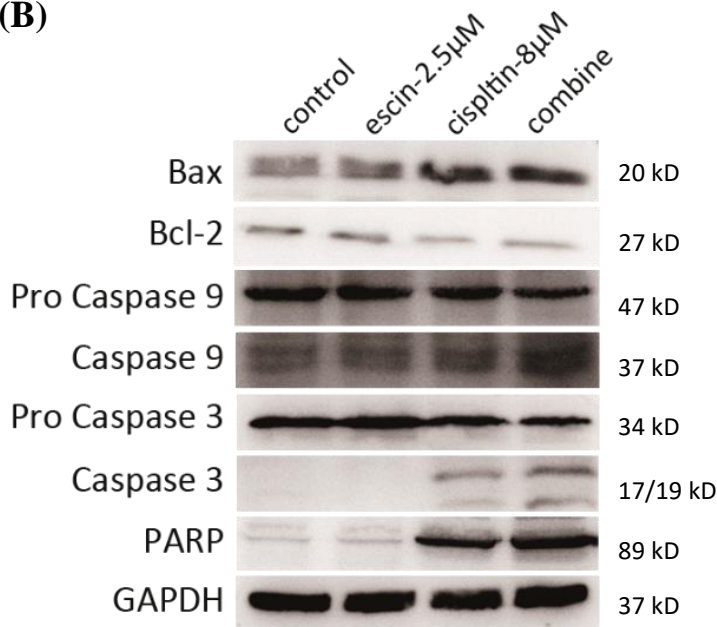
用 Western blot 分析與細胞週期 G0/G1 期相關的蛋白

G0/G1 期停滯是受到 p53、Rb 和 cyclin E1 蛋白表現上調以及 CDK2 表現下降所調控，結果顯示在合併藥物處理下 p-p53、Rb 和 cyclin E1 的表現顯著高於單一處理組別(* $p < 0.05$)，CDK2 的表現量在合併藥物處理下則會下降，使細胞週期停滯在 G0/G1 期。

(A)



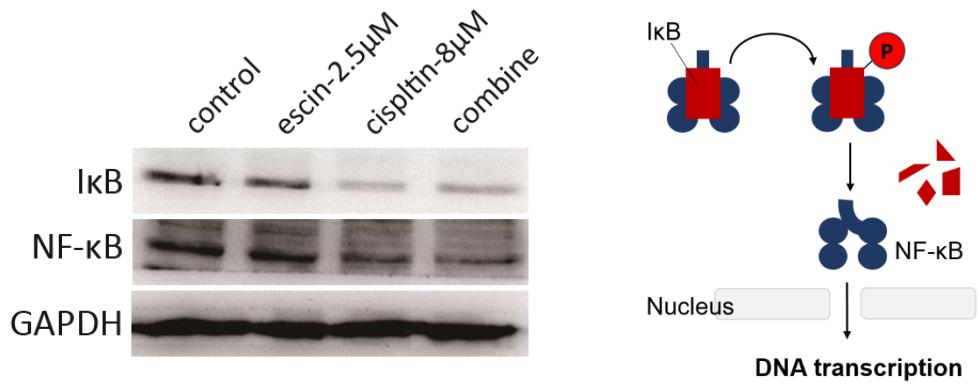
(B)



圖十、在人類膀胱癌細胞 (TCCSUP)上處理 β -escin (escin)與 cisplatin

藥物合併誘發凋亡產生

處理單一藥物 2.5 μ M 的 β -escin (escin)和 8 μ M 的 cisplatin 以及合併藥物 2.5/8 μ M 的 β -escin/cisplatin 處理 24 小時後，(A) 外源性的細胞凋亡會透過上調 Fas-L 的表現，進而調控 caspase 8 以及 BID 凋亡蛋白，使 caspase 8 以及 BID 的表現量上升，而(B) 內源性的凋亡路徑透過 Bcl-2 家族蛋白進行調控，結果顯示 Bax 在合併藥物處理下透過 BID 調控其表現量會上升，抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表現量則會下降，進而調控 caspase 9 蛋白使表現量上升，最後外源性及內源性細胞凋亡路徑會一起透過調控下游的 caspase 3 及 PARP 蛋白，使 caspase 3 及 PARP 的表現量上升，最後造成細胞凋亡的產生。

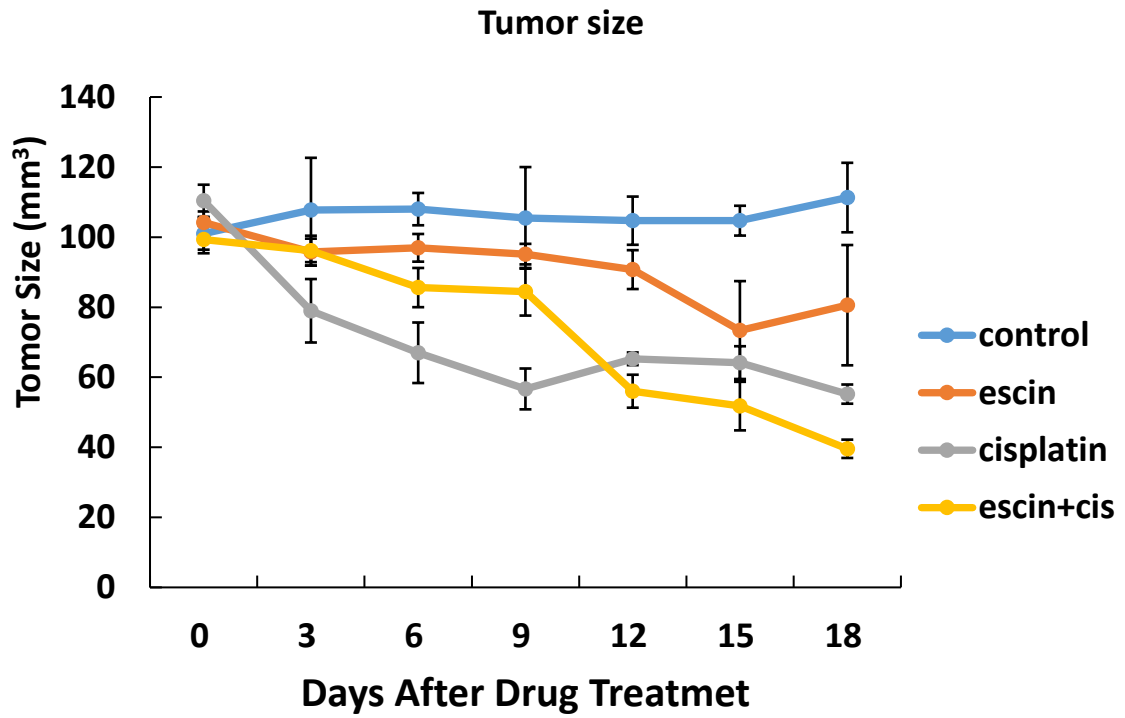


圖十一、處理 β -escin (escin)與 cisplatin 藥物合併於人類膀胱癌細胞

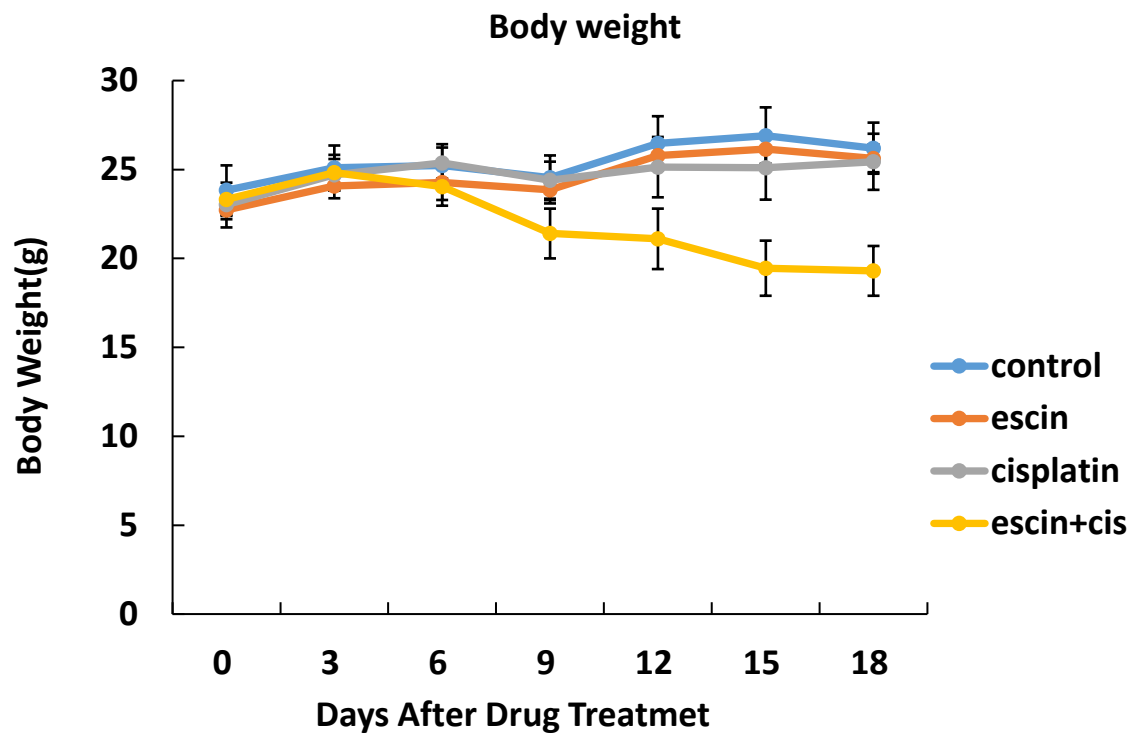
上對 NF- κ B 路徑的影響

結果顯示在合併藥物處理後，比起控制組及單一藥物組別，I κ B 的表現會減少，I κ B 進一步調控 NF- κ B 的表現，合併藥物處理組別的表現量相較於控制組也較低。

(A)



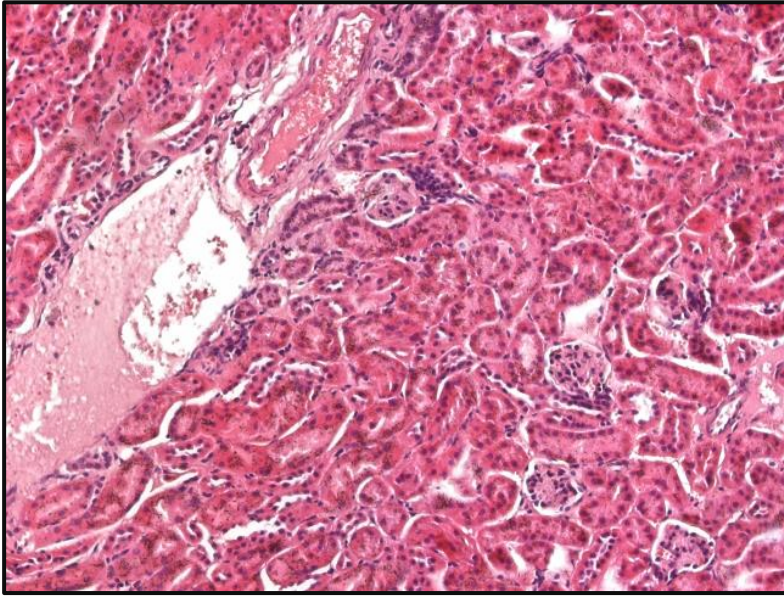
(B)



圖十二、 β -escin (escin)與 cisplatin 藥物合併對於裸鼠腫瘤的影響

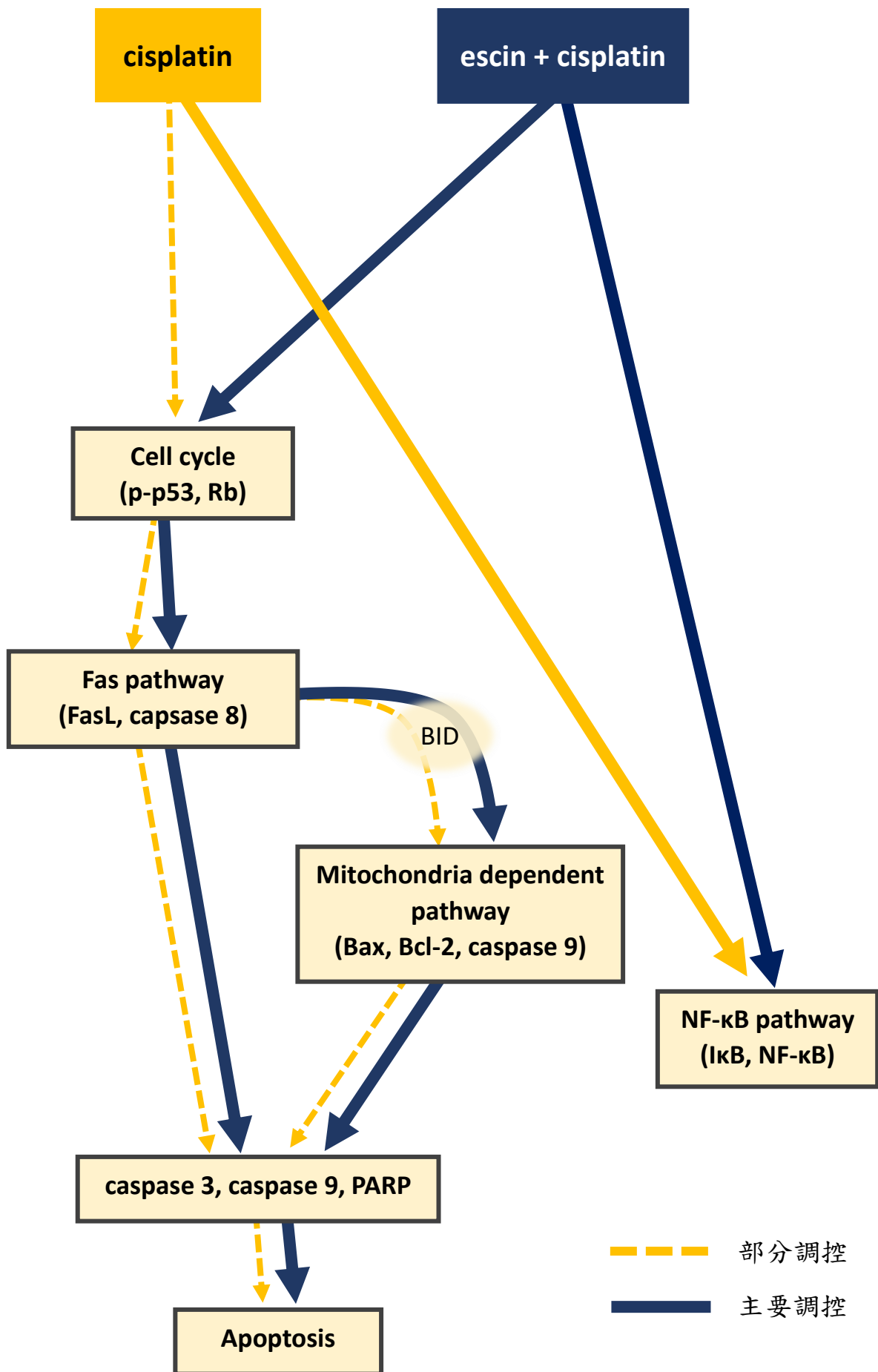
選用 5-8 週大的裸鼠，在腿部兩側進行皮下注射 5×10^5 個 TCCSUP 人類膀胱癌上皮細胞，在腫瘤長至 100 mm^3 大小時，進行一週兩次的給藥療程並持續一個月，以腹腔注射 2 mg/kg 的 β -escin 以及 2 mg/kg 的 cisplatin，(A) 由結果可以得知在給藥第 18 天之後，給予合併藥物的小鼠腫瘤小於給予單一藥物以及控制組小鼠的腫瘤，顯示合併藥物 β -escin 及 cisplatin 兩種藥物可以抑制膀胱癌腫瘤的生長。(B) 為小鼠的體重，由結果也可以發現在給藥的 18 天中，給予合併藥物的小鼠體重也逐漸下降，給予單一藥物的小鼠在 18 天後體重並無顯著的改變。

Cisplatin



圖十三、Cisplatin 對於老鼠腎臟的影響

老鼠在處理藥物 cisplatin 3mg/kg，犧牲後進行腎臟組織切片，在藉由 H&E 染色，觀察細胞型態的改變，可以看到老鼠的腎臟組織有較為鬆散空洞的現象，顯示有些微的腎毒性產生。



圖十四、Cisplatin 以及合併藥物(escin 加上 cisplatin)調控路徑的比較

較

實線為主要調控，虛線為部分調控。在蛋白分析結果中顯示，cisplatin 與合併藥物的調控路徑的差異在於，合併藥物主要會對四條路徑產生影響，分別是 Fas, mitochondria apoptosis, cell cycle 及 NF- κ B 路徑，而 cisplatin 則主要參與調控 Fas 路徑。