

東海大學化學系研究所

碩士論文

指導教授：許員豪 教授

Analysis of the effect of chemotherapeutic drugs on  
mitochondria and eicosanoids by UPLC-MS

利用高效能液相層析質譜分析化療藥物對粒線  
體與類花生酸的影響

研究生：賴冠霖

中華民國一〇七年一月

東海大學碩士班研究生

論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 賴冠霖 君所提之論文

利用高效能液相層析質譜分析化療藥物對粒線體  
與類花生酸的影響

Analysis of the effect of chemotherapeutic drugs on  
mitochondria and eicosanoids by UPLC-MS

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 許貴銘 (簽章)

107 年 1 月 15 日

東海大學碩士班研究生  
論文口試委員審定書

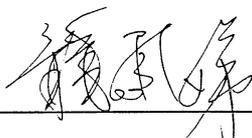
化學系 碩士班 賴冠霖 君所提之論文

利用高效能液相層析質譜分析化療藥物對粒線體  
與類花生酸的影響

Analysis of the effect of chemotherapeutic drugs on  
mitochondria and eicosanoids by UPLC-MS

論文口試委員會

召集人



(簽章)

委

員



中華民國 107 年 1 月 15 日

東海大學化學系研究所

碩士論文

指導教授：許員豪 教授

Analysis of the effect of chemotherapeutic drugs on  
mitochondria and eicosanoids by UPLC-MS

利用高效能液相層析質譜分析化療藥物對粒線  
體與類花生酸的影響

研究生：賴冠霖

中華民國一〇七年一月

# 致謝

本論文得以完成，首先要感謝指導教授許員豪老師。感謝老師這段時間為學生在論文指導上所花費的精力與時間，謝謝您孜孜不倦的教導，也給予很多鼓勵，使我有動力繼續往前邁進，至此之後，也會繼續努力的遵循和實踐老師所給予的教誨。感謝口委龍鳳娣教授、黃廣慈助理教授特地撥冗於論文口試時給予指正與建議，使本論文能夠更加完善，同時也給我許多啟發與收穫，也感謝老師們對學生論文的肯定，學生於此衷心感謝。

感謝老師，提供學生們一個完善便利的實驗以及學習環境，近來雖事務繁忙，但也給予學生在論文上寶貴的建議，讓我受益良多。在此謹致上十二萬分的謝意。

另外感謝各位同學們一路上的相伴，尤其是吳庭遠和朱怡，感謝你們的陪伴與鼓勵，還有實驗室的各位，大家一起共同分擔實驗室的事情，一起出遊去玩，真的很歡樂。另外，在畢業的前夕，和我一起實驗的夥伴們，有你們的幫忙，使得實驗以及撰寫論文一切都很順利，謝謝你們。

在台中的日子裡，有摯愛的家人們、以及大學的朋友們，大家給予無盡的關愛與溫暖，讓我有放鬆及傾訴的管道，謝謝你們那麼單純的愛，讓我感覺到溫暖。

在求學過程中，感謝學長趙昱任得幫忙，除了在實驗的幫忙更感謝在生活上的幫助，學弟陳映志給我的幫助以及學妹陳力慈在實驗上的幫忙，同學朱怡、吳庭遠、程俊益給我的鼓勵，最後感謝我的家人，因為有你們的關懷與支持，讓我全新全意的完成我的學業，由衷的感謝你們。

最後僅將這篇論文獻給最關心我的家人及朋友，願你們一起與我分享這份喜悅與榮耀、雖然不是文辭並茂的感謝詞，但因為有你們，研究生活才得以充滿活力，在寫論文的夜裡才得以不孤單寂寞，由衷感謝一路上陪伴的人們。最後，僅將此論文與各位分享。

賴冠霖 謹致 中華民國 107 年 1 月

# 目錄

目錄.....	I
摘要.....	IV
Abstract.....	V
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
第一章、緒論.....	1
1.1 癌症及發炎反應.....	1
1.2 類花生酸 Eicosanoids.....	3
1.3 化療及化療藥物.....	4
1.4 化療藥物及粒線體.....	6
1.5 癌症及粒線體.....	6
1.6 心磷脂 Cardiolipin( CL).....	8
1.7 研究目的.....	9
第二章、實驗材料與方法.....	10
2.1 HT-1080 細胞培養.....	10
2.2 化療藥物調控.....	10
2.3 NAO 螢光染色.....	11
2.4 MS 樣品處理.....	11

2.4.1 液相萃取-脂質萃取 Bligh Dyer.....	11
2.4.2 固相萃取 Solid-Phase Extraction(SPE).....	12
2.5 脂質分析.....	12
2.6 類花生酸 Eicosanoids 分析.....	13
2.6.1 類花生酸 Eicosanoids 定量公式.....	14
2.7 細胞 mRNA 萃取.....	14
2.7.1 mRNA 轉 cDNA.....	15
2.8 連鎖聚合酶連鎖反應 RT-qPCR.....	15
2.9 海馬能量測定儀與粒線體活性測定.....	16
2.9.1 HT-1080 細胞蛋白質定量.....	17
第三章、結果與探討.....	19
3.1 單水解心磷脂 MLCL 的鑑定.....	19
3.2 類花生酸 Eicosanoids 的鑑定.....	20
3.3 UPLC-Q-TOF 偵測細胞株中類花生酸 Eicosanoids 種類.....	23
3.4 UPLC-Q-TOF 偵測 HT-1080 細胞的類花生酸 Eicosanoids 種類.....	26
3.5 添加 Mitomycin C(MMC)對 HT1080 細胞造成的影響.....	28
3.6 海馬能量測定儀及粒線體活性.....	30
3.7 UPLC-Q-TOF HT-1080 細胞類花生酸 eicosanoids 的變化.....	30
3.7.1 細胞經化療藥物 Mitomycin C(MMC)刺激後前列腺素 PG 變化.....	31
3.7.2 細胞經化療藥物 Mitomycin C(MMC)刺激後其他類花生酸變化.....	34

3.8 RT-qPCR 分析細胞添加化療藥物 Mitomycin C 的 mRNA 表達量.....	35
3.8.1 發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量.....	36
3.8.2 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量.....	37
3.8.3 CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量.....	38
3.8.4 細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量.....	39
3.8.5 粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量.....	40
3.9 添加 Methotrexate (MTX) 對 HT1080 細胞造成的影響.....	41
3.9.1 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後前列腺素 PG 變化.....	42
3.9.2 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後其他類花生酸變化.....	45
4.0 RT-qPCR 分析細胞添加化療藥物 Methotrexate 的 mRNA 表現量.....	47
4.0.1 發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量.....	48
4.0.2 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量.....	49
4.0.3 CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量.....	50
4.0.4 細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量.....	50
4.0.5 粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量.....	51
第四章、討論.....	53
參考文獻.....	57

## 摘要

在現今的癌症治療主要仰賴化學治療，化學治療大多會伴隨許多發炎、噁心等副作用。化學治療會造成粒線體的變異使粒線體中 Reactive oxygen species(ROS) 升高以及粒線體中心磷脂的變異進而促使發炎反應產生。發炎反應的過程中會產生許多由二十個碳所組成的類花生酸 (Eicosanoids)，促使細胞發炎。在先前實驗中，利用化療藥物來抑制癌細胞的生長週期，使癌細胞停滯在不同細胞週期。發現當細胞停滯在不同細胞週期時，粒線體產生變異並導致心磷脂總量會呈現倍數的累積以及其碳鏈數的改變。我們利用 NAO 染色配合共軛聚焦顯微鏡檢測經化療藥物刺激過後的細胞，發現心磷脂在細胞核的周圍大量累積。當以海馬能量測定儀測定粒線體活性，發現經過化療藥物刺激過後，在心磷脂濃度變高的情況下，亦造成粒線體運作效率提高。在化療中常會伴隨著許多的發炎反應，因此本實驗利用極致高效能液相質譜儀(UPLC/Q-TOF/MS)來分析化療藥物刺激過後，細胞中的類花生酸反應。發現測得的常見類花生酸 PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、LTB<sub>4</sub> 及 5-HETE 皆在化療藥物調控後，有呈現上升的趨勢。利用 RT-qPCR 檢測後發現，促進發炎反應蛋白 COX 及 LOX 的基因表達量也相對上升，因此確定化療中的細胞呈現發炎的狀態。另外，調控心磷脂的相關蛋白在因 MMC 以及 MTX 引發之細胞週期而產生不同的變化，並間接影響粒線體的融合及分裂。

# Abstract

Chemotherapy is a main treatment for cancer. Most of the chemotherapies are accompanied with many side effects, such as inflammation, nausea. Chemotherapy can induce mitochondria to make Reactive oxygen species (ROS) and the accumulation and oxidation of cardiolipin in mitochondria can promote formation of inflammasome. Inflammation will produce a lot of 20-carbon eicosanoids. In previous experiments, chemotherapy drugs inhibited the cell cycle and the cardiolipin in the mitochondria accumulated and exhibited changes in CL species. After chemotherapy drug treatments, the cells were stained by NAO and then observed by the conjugated microscopy. Cardiolipin was significantly accumulated surrounding nucleus. The analysis by Seahorse XFe extracellular flux analyzer showed that the increased CL concentration also stimulates the mitochondrial activity. We further performed UPLC/Q-TOF/MS analysis on eicosanoid and found that the increases of most eicosanoids after chemotherapy. The pro-inflammatory genes were up-regulated, which was detected by RT-qPCR. Therefore, we confirmed that the chemotherapy treated cells were in an inflamed state. In addition, MMC and MTX triggered cell cycle arrest induced gene expression changes on the cardiolipin regulation related genes, and also indirectly affect the gene expression of the mitochondrial fusion and division regulating genes.

# 圖目錄

圖一、類花生酸代謝途徑.....	2
圖二、MMC 與鳥糞嘌呤鍵結形式.....	5
圖三、Dihydrofolic acid 與 MTX 結構圖.....	6
圖四、心磷脂結構圖.....	8
圖五、粒線體產能耗氧率作用圖.....	17
圖六、HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後心磷脂總量圖.....	19
圖七、HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後 CL 的組成比率圖.....	20
圖八、類花生酸 Eicosanoids 標準品之 TIC 質譜圖.....	22
圖九、類花生酸標準品 MS/MS 裂解模式.....	22
圖十、添加 Mitomycin C 於 HT 1080 細胞以 NAO 染色螢光訊號圖.....	28
圖十一、海馬能量測定儀測定化 MMC 對 HT-1080 刺激後粒線體耗氧率變化圖.....	30
圖十二、HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後前列腺素變化圖.....	31
圖十三、HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後前列腺素變化圖.....	32
圖十四、HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後前列腺素變化圖.....	33
圖十五、HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後類花生酸變化圖.....	34
圖十六、HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後類花生酸變化圖.....	35
圖十七、RT-qPCR 相對定量發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量.....	37
圖十八、RT-qPCR 相對定量 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量.....	38

圖十九、RT-qPCR 相對定量 CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量.....	39
圖二十、RT-qPCR 相對定量細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量.....	40
圖二十一、RT-qPCR 相對定量粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量.....	41
圖二十二、添加 Methotrexate MTX 於 HT 1080 細胞以 NAO 染色螢光訊號圖...	42
圖二十三、HT-1080 細胞經化療藥物 MTX 刺激後前列腺素變化圖.....	43
圖二十四、HT-1080 細胞經化療藥物 MTX 刺激後前列腺素變化圖.....	44
圖二十五、HT-1080 細胞經化療藥物 MTX 刺激後前列腺素變化圖.....	45
圖二十六、HT-1080 細胞經化療藥物 MTX 刺激後類花生酸變化圖.....	46
圖二十七、HT-1080 細胞經化療藥物 MTX 刺激後類花生酸變化圖.....	47
圖二十八、RT-qPCR 相對定量發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量.....	48
圖二十九、RT-qPCR 相對定量 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量.....	49
圖三十、RT-qPCR 相對定量 CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量.....	50
圖三十一、RT-qPCR 相對定量細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量.....	51
圖三十二、RT-qPCR 相對定量粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量.....	52

# 表目錄

表一、Ion Trap 質譜儀參數設定.....	13
表二、Q-TOF 質譜儀參數設定.....	14
表三、細胞株中可測定的類花生酸 Eicosanoids 種類.....	24
表四、HT-1080 細胞中類花生酸 Eicosanoids 種類.....	27
表五、Real-time quantitative PCR 引子設計.....	36

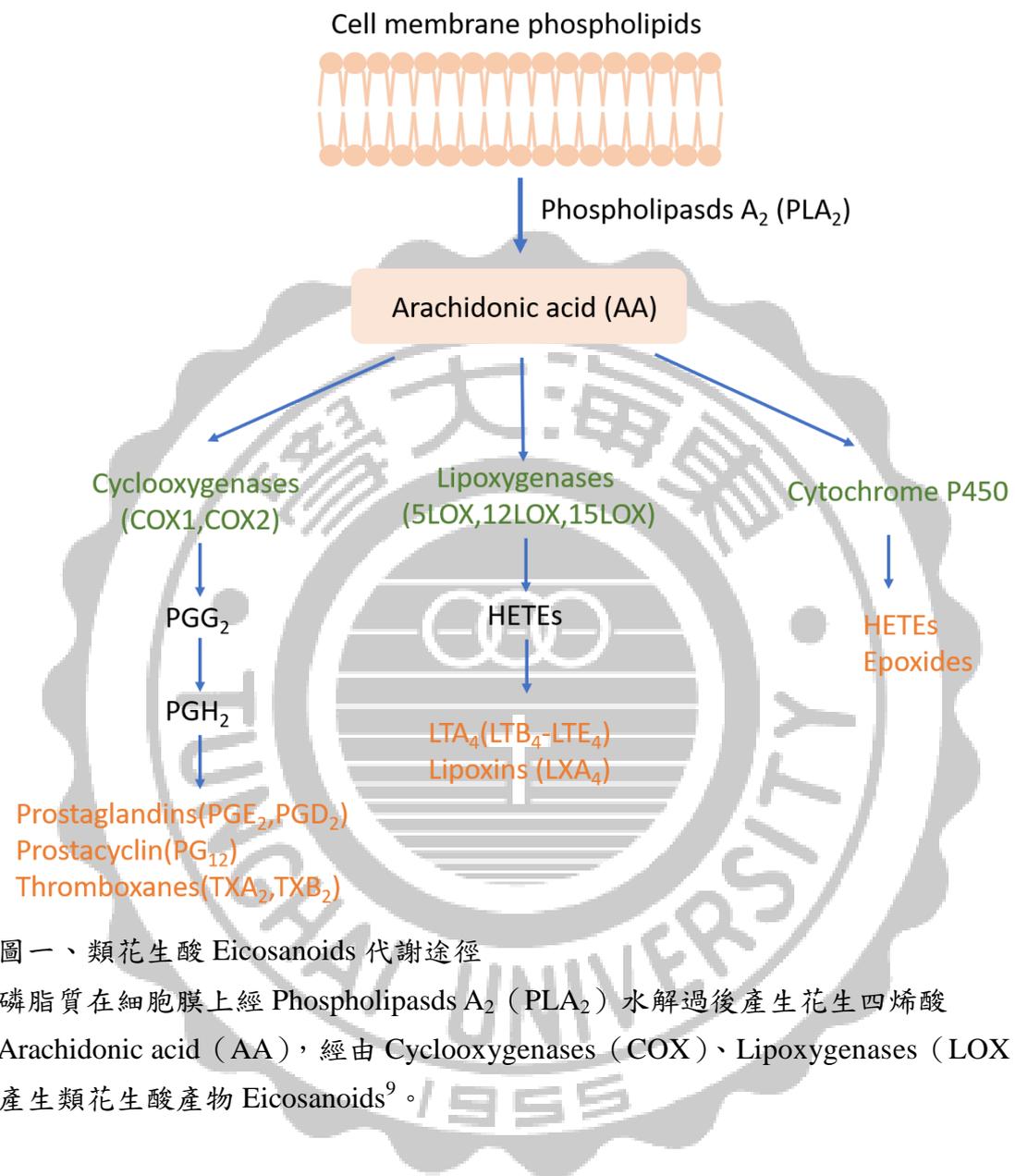


# 第一章、緒論

## 1.1 癌症及發炎反應

癌症是現代人高死亡率的疾病之一，又稱為惡性腫瘤。細胞突變而不正常的複製增生形成腫塊，影響正常組織器官引起疼痛潰爛，最後使人死亡。癌細胞有著與一般細胞不同的特性，它可以自身活化促進細胞生長，避免抑制生長蛋白的作用，接著形成腫瘤侵犯組織，強行複製，促進血管新生，最後抵抗自身凋亡<sup>1</sup>。在許多癌症研究中發炎反應已是癌症研究中的重要指標，發炎反應是人體自身的防禦機制，全世界每五個癌症患者就有一個患有慢性發炎與慢性病，現今研究中慢性發炎組織患者罹癌機率極高<sup>2,3</sup>。在臨床研究中常使用抗炎藥抑制腫瘤生長，並降低癌症發病率<sup>4,5</sup>。儘管許多實驗證實發炎跟癌症有關的，但是發炎反應與癌症的分子機制與途徑尚未明確。在發炎反應中常見的類花生水解酶，環氧核酶-2 (COX2)、5-酯氧核酶 (5LOX)，在現今研究中癌症病患者有高濃度的表達<sup>6</sup>。發炎反應過程中會先活化 Cyclooxygenase (COX) 及 Lipoxygenase (LOX) 將脂肪酸代謝成引起發炎或是抗發炎的前列腺素 (Prostaglandin) 或白三烯素 (Leukotrienes)<sup>7</sup>。COX 又分為 COX1 及 COX2 兩大類，在功能、結構和表達位子不同。COX1 存在於大多數組織中，COX2 則需要被誘導產生，誘導物質如細胞激素、生長因子或外來刺激等。COX2 在正常組織幾乎沒有表達，大多都充斥在發炎組織中，常見的發炎代謝物主要經由 Arachidonic acid (AA) 經由 COX1 及 COX2 代謝出前列腺素前驅物 PGG<sub>2</sub>，在經酵素反應成常見的前列腺素 PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub> 及血栓素 TXA<sub>2</sub>、TXB<sub>2</sub> 等(圖一)。LOX 主要分為 5LOX、12LOX 及 15LOX，其中 5LOX 研究最為廣泛，主要會存在於細胞膜上，與膜上蛋白交互作用後會將花生四烯酸 Arachidonic acid (AA) 轉換成白三烯素 LTB<sub>4</sub> 及環氧化物 Lipoxins

(圖一) 來產生發炎反應<sup>8</sup>。



圖一、類花生酸 Eicosanoids 代謝途徑

磷脂質在細胞膜上經 Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 水解過後產生花生四烯酸 Arachidonic acid (AA)，經由 Cyclooxygenases (COX)、Lipoxygenases (LOX) 產生類花生酸產物 Eicosanoids<sup>9</sup>。

## 1.2 類花生酸 Eicosanoids

花生四烯酸 (AA) 代謝是一個重要的生物過程，參與許多生理效應，包括血管調節和發炎過程，主要為 20 個碳所組成。通過環氧化酶 (COX)，脂氧化酶 (LOX) 和細胞色素 P-450 的反應，AA 可以轉化為多種代謝物，統稱為類花生酸類。如前列腺素 PGs，血栓素，白三烯 LTS 和單氧代謝物是由這些代謝酶

產生的花生四烯酸代謝物的主要類別。類花生酸是參與生物體中病理以及生理的重要物質，他們主要參與的反應是促進發炎以及抗發炎。AA 衍生的類花生酸包括 P-450 環氧化酶產生的羥基二十碳四烯酸 (HETEs) 和環氧化物，脂氧合酶 (LOX) 產生的氫過氧化二十碳四烯酸 (HPETEs)，脂氧素 (LXs) 和白三烯 (LTs) 和環加氧酶 (COX) 產生的前列腺素，包括前列腺素 (PGs)  $PGD_2$ 、 $PGE_2$ 、 $PGF2\alpha$  以及前列環素 (PC /  $PGI_2$ ) 和血栓素 ( $TXA_2$ )。

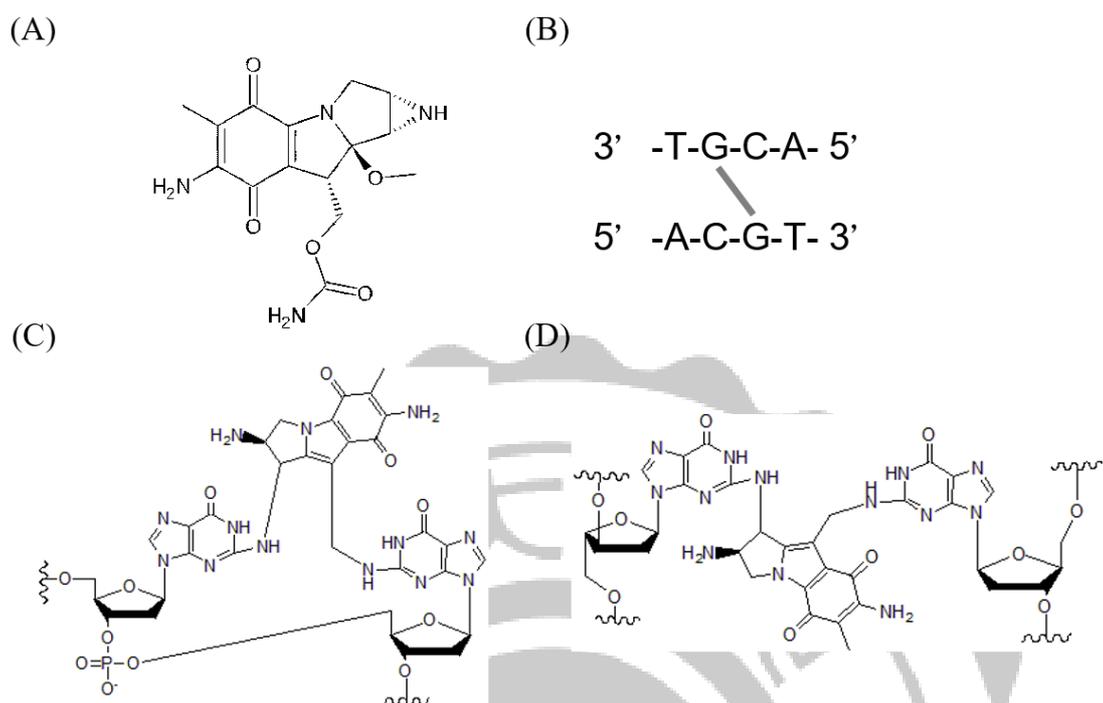
發炎細胞或組織經由 COX 代謝出前列腺素以及血栓素。前列腺素在生物體中也產生出不同的生理反應，例如  $PGE_1$  類似於類固醇具有抗發炎作用， $PGE_2$  則是會促使發炎。 $PGE_2$  為 COX2 所代謝出之前列腺素，在不同組織裡會呈現不同反應，在上皮細胞中會刺激細胞增生，使傷口癒合，也會增加血管通透性<sup>10</sup>，但在癌細胞中，特別是結直腸癌和肺癌中大量存在，研究中顯示  $PGE_2$  會抑制細胞凋亡，誘導癌細胞轉移，使癌細胞侵入和血管增生來刺激腫瘤生長<sup>11,12</sup>。血栓素  $TXA_2$ ，是一種促炎因子，半衰期較短會較快水解成  $TXB_2$ ，具有強力血管收縮作用，促進血小板凝集<sup>13</sup>。

發炎細胞或組織經另一條路徑代謝 LOX 會產生  $HPET_5$ 、HETEs 以及  $LTA_4$ 。 $LTA_4$  在嗜中性白血球以及巨噬細胞中會再進一步代謝成  $LTB_4$ ， $LTA_4$  在與 glutathione 作用生成  $LTC_4$ 、 $LTD_4$  及  $LTE_4$ ，皆會造成氣管及呼吸道的強烈收縮和增加血管通透性<sup>14</sup>。 $LTB_4$  可造成白血球聚集以及黏附在小靜脈內皮上，會吸引嗜中性白血球及單核球細胞，使細胞組織呈現發炎症狀<sup>15</sup>。

### 1.3 化療及化療藥物

面對癌症的治療，有放射治療、外科治療、標靶治療以及常見的化學治療。化學治療主要是利用抗癌藥物抑制癌細胞複製增生的能力的特點進行，主要的目的為治療，控制以及減輕症狀。目前化療藥物的分類有烷基化合物（Alkylating agents），抗代謝劑（Antimetabolites），抗腫瘤抗生素（Antitumor antibiotics），有絲分裂微小管抑制劑（Antimicrotubule agents）。其作用是損傷 DNA、抑制 DNA 的合成或者是干擾有絲分裂的過程等機制，來抑制癌細胞的增生。抗癌藥物不僅抑制癌細胞的增生，正常細胞也會受到抑制並處在發炎狀態，導致化療藥物會有一些副作用如骨髓細胞的抑制、口腔及胃腸道潰爛、掉髮、不孕、噁心、厭食等作用<sup>16</sup>。在接受化療期間患者體內的物質 P（Substance P）會增加，物質 P 是一種神經傳導物質，與神經接受器結合之後，會造成黏膜發炎，導致患者口腔出現疼痛、口乾、難以吞嚥、言語困難等症狀。嚴重時舌頭和口腔都可能出現潰瘍甚至化膿，呈現發炎的狀態<sup>17</sup>。現今的化療藥物，大多以粒線體作為標靶來治療，當化療藥物刺激細胞時，會造成粒線體的變異使粒線體中 Reactive oxygen species（ROS）上升以及粒線體中心磷脂的變異進而促使發炎反應產生<sup>18</sup>。

Mitomycin C（MMC）又名絲裂黴素，作用機制主要是與雙股 DNA 小凹槽（minor groove）裡的鳥糞嘧呤（Guanine）間做共價性的鍵結，使 DNA 時期無法順利進行複製，進而無法前進至有絲分裂期，可把細胞週期停滯在 G2/M 時期<sup>19,20</sup>。臨床上主要用於胃癌、膀胱癌、肺癌、白血病、肉瘤等癌症疾病。MMC 於鳥糞嘧呤上形成的共價性交聯除了於雙股 DNA 間也可於單個鹼基間進行交聯，並且對於 CpG（5'-3'）或單股 GpG 序列上的鳥糞嘧呤具有專一的鍵結特性（圖二）<sup>21</sup>。

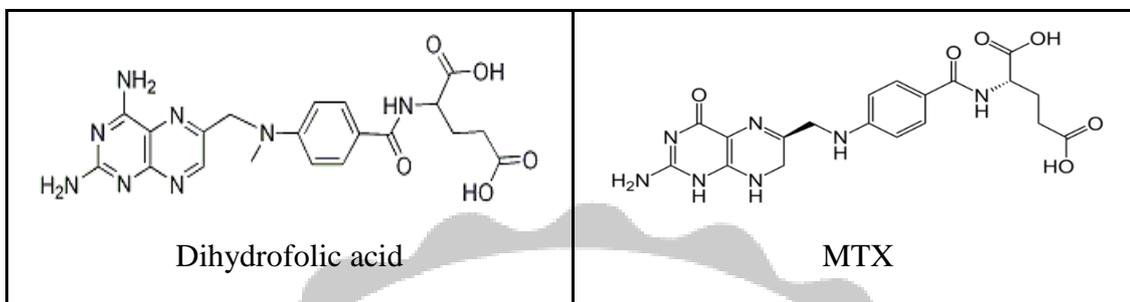


圖二、MMC 與鳥糞嘌呤鍵結形式

MMC 分子結構式 (A)。MMC 於 DNA 序列中 CpG (5'-3') 的 Guanine 具有選擇性的交聯結合 (B)。MMC 於單股序列間 GpG 鍵結形式 (C)。MMC 於 DNA 雙股 CpG 序列中與 Guanine 的鍵結形式 (D)。

Methotrexate (MTX) 主要可以把細胞週期停滯在 S 時期，其作用機制是結構與二氫葉酸相近，因此產生競爭型的抑制，讓細胞無法進入 DNA 合成期而達到抑制細胞生長的效果<sup>22,23</sup>。MTX 可競爭抑制二氫葉酸還原酶(DHFR)(圖三)<sup>24</sup>。而二氫葉酸還原酶為負責將二氫葉酸 (DHF) 轉成四氫葉酸 (THF) 的還原酶，若二氫葉酸還原酶被抑制則使合成 dTMP (Thymidine monophosphate) 的 5,10-亞甲基四氫葉酸 (5,10-MTHF) 含量減少。相對的，dTMP 的量也會下降導致細胞無法進入 DNA 合成期而達到抑制細胞生長的效果。而亞甲基四氫葉酸還原酶 (MTHFR) 可將 5,10-MTHF 轉成 5-甲基四氫葉酸 (5-MTHF)，在經由甲

硫氨酸合成酶 (MS) 的催化轉化為甲硫氨酸 (methionine) 與四氫葉酸。MTX 主要醫學上用於乳癌等癌症。



圖三、Dihydrofolic acid 與 MTX 結構圖

MTX 的分子結構與 Dihydrofolic acid 分子結構相似，產生競爭型抑制。

#### 1.4 化療藥物及粒線體

現在的化療藥物常常針對粒線體來做治療。化療藥物會抑制粒線體電子傳遞鏈複合蛋白 I 活性，間接的切斷粒線體對癌細胞能量的供應，減少癌細胞增生<sup>25</sup>。藥物亦會對粒線體有毒性，小分子藥物會與電子傳遞鏈複合蛋白 II 跨膜蛋白產生競爭進而產生抑制效果，提升 ROS 活性氧影響了粒線體對癌細胞的能量提供<sup>26</sup>。間接影響粒線體內的熱休克蛋白-90 (HSP-90)，會使粒線體內膜去極化，導致粒線體失衡釋放出細胞色素 C，最後使細胞凋亡<sup>25</sup>。

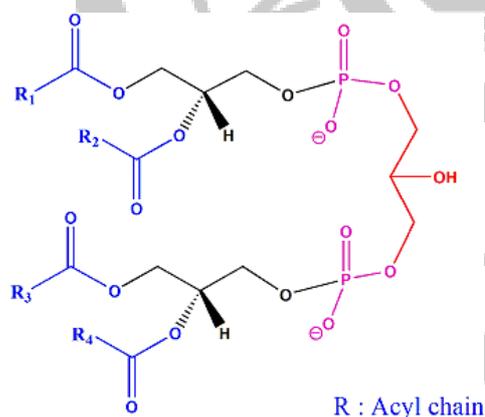
#### 1.5 癌症及粒線體

由於癌症快速的複製生長，癌細胞必須在短時間提供能量給細胞快速生長所需。在癌症細胞中某些突變可能會改變粒線體的生化特性，粒線體主要參與了各種代謝功能以及細胞調節及產生能量。在癌細胞的粒線體中有幾個重要的現象，活化氧 Reactive oxygen species (ROS) 的產生以及氧化磷酸化下降，以及醣解

作用上升。提高活性氧分子 ROS，增加癌細胞的生長的優勢<sup>27,28</sup>。在 1924 年 Otto Heinrich Warburg 提出 Warburg 理論，發現癌症細胞在產生能量的地方形成，癌症細胞比一般細胞具有較容易突變的粒線體，此異常能幫助癌細胞提高醱解作用來提供所需能量來維持癌細胞生長<sup>29</sup>。後來有部分研究顯示，癌細胞仍然具有呼吸作用，產生能量提供細胞來代謝<sup>30,31</sup>。所以癌細胞即使在正常氧氣濃度下還是具有高醱解作用，這現在稱為 Warburg effect。也有研究發現，在人類的腫瘤組織中有發現到粒線體 DNA 的突變 (Point mutation) 或缺失 (Deletion) 以及粒線體 DNA 複製數目的改變，這些粒線體的改變，都可能影響粒線體的呼吸作用，進而影響 ROS 以及 ATP 的形成，ROS 提高可能會降低粒線體活性影響能量形成，一旦能量降低癌細胞將會依賴醱解作用來產生所需要的能量 ATP<sup>32,33</sup>。發炎反應中產生的 ROS 可能會破壞粒線體呼吸作用酵素，使癌細胞轉換成醱解作用來提供能量。因此呼吸作用造成的氧濃度對細胞有很大的關係，在正常生理狀態下，正常粒線體呼吸傳遞鏈會造成活化氧 ROS 以及 superoxide anions、hydrogen peroxide、hydroxyl radicals<sup>34</sup>。粒線體在正常代謝過程中會持續產生活化氧 ROS 和一些自由基，ROS 會促使 DNA 斷裂及氧化性的修飾 DNA 與癌症的產生。當細胞被化療藥物調控時，癌細胞粒線體可能會大量運作或是複製來提供被抑制的狀態，細胞會因為粒線體週期產生大量的 ATP 來提供能量代謝調節細胞週期來自我修復<sup>35</sup>。粒線體膜上磷脂質的組成會影響粒線體的形態與功能，相對會涉及到 ATP 的產生<sup>36</sup>，其中心磷脂為一個獨特的磷脂質，它存在於粒線體內膜上，心磷脂獨特結構產生的靜電吸引力以及疏水作用力子穩定粒線體的複合蛋白以及 ATP 的產生<sup>37</sup>。

## 1.6 心磷脂

心磷脂 CL (Cardiolipin)，IUPAC 命名為 1,3-bis (*sn*-3'-phosphatidyl) -*sn*-glycerol 在 1942 年由 Mary Pangborn 於哺乳類牛心臟中分離出來的磷脂質，含量約種磷脂質的 15%~20%，動物細胞的粒線體內膜中發現含有大量的心磷脂<sup>38</sup>。心磷脂也是粒線體內膜中很重要的合成物質，存在於微生物、植物與高等動物界中。而心磷脂主要是由粒線體自行產生，心磷脂它有一個甘油基團為頭端，分別在兩端接上磷酸根以及兩個甘油骨架在分別接上不同疏水性的脂肪酸鏈，一般磷脂有兩條醯基鏈，心磷脂有別於一般磷脂主要因為它有四條醯基鏈，有著陰電性的頭端以及疏水性的結構（圖四），使心磷脂在粒線體內膜上可以藉由靜電吸引力以及疏水性的作用來穩定蛋白複合體的結構<sup>39,40</sup>。如電子傳遞鏈上的蛋白複合體與 ATP 合成酶等，主要因為心磷脂結構使粒線體內膜維持特殊的皺褶狀，維持粒線體的健康。



圖四、心磷脂結構圖

結構中有兩個甘油骨架 (Glycerol backbones，黑色) 與帶有負電的磷酸基團和具有疏水性醯基鏈 (Acyl chains、藍色)。接上不同脂肪酸鏈會呈現出多種的心磷脂。

## 1.7 研究目的

我們利用高效能液相層析質譜儀 Ultra Performance Liquid Chromatography Quadrupole-time-of-flight mass spectrometers (UPLC/Q-TOF/MS) 分析抗癌藥物對癌細胞的影響。先前學長的實驗中，利用高效能液相層析質譜儀 HPLC/Iron trap/MS 分析，癌細胞受到三種化療藥物 (Chemotherapy drugs) 抑制細胞生長，觀察到粒線體 (Mitochondrion) 的異常以及心磷脂結構的改變，而這時候發現用三種藥物培養的細胞內心磷脂的總量呈現倍數的增長，碳鏈組成則是時期的不同而造成獨特的結果，代表當癌細胞受到藥物抑制生長，心磷脂的組成會有所改變。由於用化療藥物調控細胞會使細胞停滯，細胞數不會增生代表每顆細胞內產生的心磷脂是相對增加的而累積在細胞中。心磷脂的含量與其功能結構對粒線體以及細胞有很大的關係，當抗癌藥物對生物體做刺激治療時，藥物對生物體上的細胞，不管正常或癌細胞都會加以影響以及控制它生長的狀況，而心磷脂還在增生，或許粒線體還在作用生產心磷脂，因此造成大量心磷脂在細胞內堆積。然而當細胞受到不正常的抑制，也代表著當粒線體在製造心磷脂 Cardiolipin (CL) 時會透過單水解心磷脂 Monolysocardiolipin (MLCL) 加入或置換脂肪酸來形成心磷脂 Cardiolipin (CL)，在癌細胞被藥物刺激時，單水解心磷脂含量尚未被分析，因此本實驗使用高效能液相層析質譜儀 HPLC/Ion trap/MS 來分析未分析的 MLCL，以及利用極致效能液相層析質譜儀 UPLC/Q-TOF/MS 測量細胞中類花生酸含量，UPLC/Q-TOF/MS 有高鑑別度，靈敏度，以及偵測的質量範圍。實驗所使用的細胞株為人類纖維肉瘤細胞 (HT-1080)，來建立生物體中類花生酸 (Eicosanoid) 的鑑定，以及觀察細胞中心磷脂含量以及組成的變化，以及其發炎物質類花生酸對粒線體的影響，進而研究關於癌症與化學治療的生物醫療作用。

## 第二章、實驗材料與方法

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、Fetal Bovine Serum (FBS)、1M HEPES、Penicillin-Streptomycin、Dulbecco's Modified Eagle Medium (powder) 購自 Gibco (USA)。Tetramyristoyl cardiolipin (C14:0) 標準品購自 Avanti Polar Lipids (USA)。RIPA Buffer 購自 Thermo。Bradford protein-binding assay 購自 BioRad。Methotrexate (powder)、Mitomycin C (powder) 購自 Merck。SYBR Green system Super Mix 購自 Bio-RAD。DNA 模板購自 ZGene Biotech Inc. 台灣。0.1% Triton 購自 OmniPur (Germany)。Prostaglandin E<sub>2</sub>-D<sub>4</sub>、Prostaglandin D<sub>2</sub>-D<sub>4</sub>、Leukotriene B<sub>4</sub>-D<sub>4</sub>、(±) 14 (15) -EET-D<sub>11</sub>、5 (S) -HETE-D<sub>8</sub> 購自 Cayman (USA)

### 2.1 HT-1080 細胞培養

本實驗使用細胞株為 HT-1080 人類纖維腫瘤細胞，培養在含有 5%CO<sub>2</sub>，溫度 37°C 環境中。培養液以 90% 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、10% FBS (Fetal Bovine Serine)、25mmole 1M HEPES buffer solution、0.005% Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)。繼代使用 1X PBS+1mM EDTA 沖洗細胞後，再用蛋白水解酶 (Trypsin) 使細胞鍵斷裂，再以培養液停止蛋白水解酶作用，再分盤繼代。

### 2.2 化療藥物調控

將 10cm dish HT-1080 細胞培養至大約 80%-90% 盤面密度，分盤時先用 3mL 培養液分盤 6cm dish 三盤，細胞數約 4.0x10<sup>5</sup> 顆，並等待半小時至細胞半貼附盤面後，以滴入方式加入 2 μM Mitomycin C (MMC)、50nM Methotrexate (MTX)

配置於培養液中，置於 5% CO<sub>2</sub>，溫度 37°C 細胞培養箱 24 小時及 48 小時後。分別在 0 小時、24 小時、48 小時收取細胞，先將原培養液收起存放在 -80°C 用於萃取 Eicosanoids，細胞再以 PBS 沖洗把殘餘培養液洗淨，再以蛋白水解酶將細胞，放入 medium 停止蛋白水解酶作用，以 1000xg (3000rpm) 離心 5 分鐘，將上清液去除，細胞存放於 -20°C 用於液相脂質萃取。

### 2.3 螢光染色

先以 1x PBS 將蓋玻片固定於 3.5 cm dish，放置 UV 下 24 小時。將細胞分盤至 3.5cm dish 盤面密度控制約 25% ( $2 \times 10^5$  顆細胞)，等待半小時後使細胞半貼附於盤面，以滴入方式加入 2  $\mu$ M Mitomycin C (MMC)、50 nM Methotrexate (MTX)，置於 5% CO<sub>2</sub>，溫度 37°C 細胞培養箱 24 小時以及 48 小時。分別在 0 小時、24 小時、48 小時將加入 1mM NAO (Acridine Orange 10-Nonyl Bromide) 染劑，在置於培養箱內 15 分鐘。取出細胞後，使用 1x PBS 清洗 5 分鐘三次，洗掉多餘染劑，再用 4% 福馬林 (Formaldehyde 配置於 1x PBS) 固定細胞，再以 1x PBS 清洗 5 分鐘 3 次。最後將玻片取出，固定於載玻片上，封片後，細胞樣品使用藍光波長 488nm 放射，再用綠色 Ch2-T1 濾片，以共軛焦顯微鏡 Zeiss LSM510 觀察拍照。

### 2.4 MS 樣品處理

#### 2.4.1 液相萃取-脂質萃取 Bligh Dyer

細胞經培養後，用 1000xg (3000rpm) 離心，將細胞和培養液分離，取細胞利用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (1 : 1) 進行分層，下層有機層即為全脂質樣品。收細胞後

加入 1 ml 1x PBS 沖散細胞清洗殘留培養液，在以 1000xg (3000rpm) 離心，去除上清液，取 2ml Methanol (MeOH) 至細胞樣品內混合均勻後取至玻璃試管內，加入 2ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，加入 5μl 的 Cardiolipin (CL) 標準品 (14:0, 25μg/ml)，試管放入冰水浴中，sonication 破細胞，使用功率為 80% 瓦，2 分鐘。離心 (3000rpm, 5 分鐘)。用玻璃滴管吸取下層到小樣品瓶中，用氮氣將樣品瓶內溶液吹至快乾。並加入 400μl 回溶液 Acetonitrile/2-Propanol/H<sub>2</sub>O (65:30:5) 回溶，使用 LC-MS 分析。

#### 2.4.2 固相萃取 Solid-Phase Extraction (SPE)

細胞樣品培養後，取培養液 Medium 2mL 為萃取 Eicosanoids，萃取樣品前先以 1000xg (3000rpm) 離心，將殘餘的細胞碎片去除。樣品萃取使用固相萃取管柱 (Phenomenex Strata-X 8B-S100-UBJ) 進行萃取，先用 3.5mL MeOH 沖洗 column，再以 3.5mL DDW 沖洗，再放入培養液樣品，再以 10% MeOH 沖洗，最後用 1mL MeOH 將樣品洗脫出至樣品瓶，存放於 -80°C，之後使用氮氣吹乾回溶於 Buffer A: DDW: ACN: acetic acid (70:30:0.02;v/v/v)

#### 2.5 脂質分析

細胞萃取樣品經 HPLC/Ion Trap/MS 進行 Cardiolipin (CL) 分析 UPLC 移動相系統: Mobile phase A 分別為 ACN: DDW (60:40)、10 mM Ammonium formate (AF)、0.1% Formic acid (FA)。Mobile phase B 為 IPA: ACN (90:10)、10 mM Ammonium formate (FA)、0.1% Formic acid (FA)。移動相梯度: 0-25 分鐘為 60% A, 40% B 到 100% B，並保持 100% B 到 40 分鐘後，在 5 分鐘內反至 60%

A，40%B，並保持 60% A，40%B 至 60 分鐘。使用負電模式，使用分離管柱為 Acclaim RSLC 120 C18 2.1mm x 100 mm 2.2  $\mu$ m column (Thermo)，UPLC 分析流速為 0.2 mL/min，管柱溫度為 55 $^{\circ}$ C，平衡壓力約為 2200psi。取質量訊號之 EIC (Extracted ion chromatogram) 面積來做半定量分析。

表一、Ion Trap 質譜儀參數設定

Iron trap ms 設定	
Charge mode	Negative mode
Nebulizer	25 psi
Dry gas	8 L/min
Dry temp.	325 $^{\circ}$ C
Mass range	1000-1600 $m/z$

## 2.6 類花生酸 Eicosanoids 分析

培養液萃取樣品經 UPLC/Q-TOF/MS 進行 Eicosanoids 分析 UPLC 移動相系統 Mobile phase A 分別為 DDW：ACN：Acetic acid (70：30：0.02;v/v/v)，Mobile phase B 為 ACN：IPA (50：50;v/v)。移動相梯度：1 分鐘為 100%A，0%B，3 分鐘為 75%A，25%B，11 分鐘為 55%A，45%B，13 分鐘為 40%A，60%B，18 分鐘為 25%A，75%B，20 分鐘為 10%A，90%B，21 分鐘變為 100%A，0%B，維持至 30 分鐘。使用負電模式，使用分離管柱為 Acclaim RSLC 120 C18 2.1mm x 100 mm 2.2  $\mu$ m column (Thermo)，UPLC 分析流速為 0.2 mL/min、管柱溫度為

40°C。取質量訊號之 EIC (Extracted ion chromatogram) 面積來做半定量分析。

表二、Q-TOF 質譜儀參數設定

Source 設定參數	
Chargemode	Negative mode
Nebulizer	1 Bar
Drygas	9 L/min
Drytemp	200°C
Massrange	100-500 <i>m/z</i>

### 2.6.1 類花生酸 Eicosanoids 定量公式

計算控制組及實驗組的類花生酸 Eicosanoids 濃度，細胞中類花生酸 Eicosanoids 半定量計算公式如下：

每個細胞的類花生酸 Eicosanoids 總含量(fmole)=

$$\frac{\text{類花生酸 Eicosanoids 的 EIC 積分面積}}{\text{內標準品 EIC 積分面積}} \times \text{內標準品含量}(0.28 \text{ nmole}) \div \text{細胞數}$$

### 2.7 細胞 mRNA 萃取

將 10cm dish HT-1080 細胞培養至大約 80%-90% 盤面密度，分盤時先用 3mL 培養液培養 6cm dish 三盤，細胞數約  $4.0 \times 10^5$  顆，並等待半小時細胞半貼附盤面以滴入方式加入 1mL 含有 2  $\mu$ M Mitomycin C (MMC)、50 nM Methotrexate (MTX)

溶液（配置於培養液中），置於 5% CO<sub>2</sub>，溫度 37°C 細胞培養箱 24 小時及 48 小時後。分別在 0 小時、24 小時、48 小時收取細胞，將細胞至於冰上吸除培養液，加入 500μL PBS 清洗細胞後吸除，再加入 1 mL TRIzol，將細胞刮起至 Eppendorf 中，室溫靜置 5 分鐘，加入氯仿 (Chloroform) 搖晃出現至粉紅色分層，並以 12000 rpm 於 4°C 低溫離心 15 分鐘，取上清液至新的 Eppendorf，並加入 500 μL 異丙醇 (Isopropanol) 輕輕搖晃。置於 -20°C 冰箱 20 分鐘後，室溫靜置 10 分鐘，再以 12000 rpm 4°C 低溫離心 15 分鐘，去除上清液留下 pellet，加入 75% 乙醇 (EtOH)，再以 9000 rpm 4°C 低溫離心 5 分鐘) 再去除上清液，加入 20 μL DEPC 水，將 pellet 沖散，放置 50 °C 水浴 5 分鐘，室溫靜置 5 分鐘後，得到 RNA 於 -20°C 冰箱保存。

### 2.7.1 mRNA 轉 cDNA

使用 iScript cDNA Synthesis Kit。依序加入 Nuclease-free water (DEPC 水)、RNA template (1 μg total RNA)、4 μL 5x iScript reaction mix 和 1 μL iScript reverse transcriptase，配製總體積為 20 μL，置於室溫 5 分鐘。水浴溫度設定為 46°C 恆溫 20 分鐘，再放置水浴 95°C 恆溫 1 分鐘，置於 -20°C 冰箱保存 cDNA。

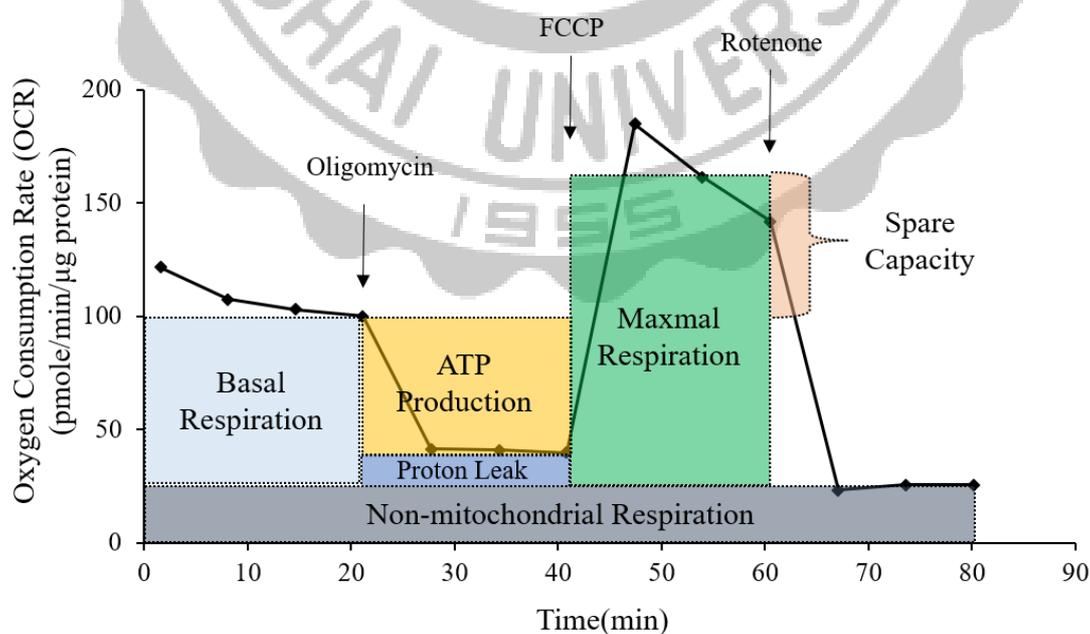
### 2.8 連鎖聚合酶連鎖反應 RT-PCR

將 RNA 反轉錄成較穩定的 cDNA 後，使用 iScript™ cDNA Synthesis Kit，由於該 kit 的每一個 reaction 可將 1 μg 的 RNA 反轉錄成 2 μg 之 cDNA，故需準備 1 μg 的 RNA 供反轉錄使用。RT-PCR 使用「探針型」SYBR Green system Super Mix，DNA 模板，儀器的激發波長介於 470-505 nm，條件設定為 95 °C 3 分鐘使 DNA 模板雙股打開，95 °C 15 秒，Tm 60 °C 30 秒，使 primer 黏上後開始循環進

行 40 cycle，接著升溫 65 °C ~ 95 °C 以取得 Melting curve。

## 2.9 海馬能量測定與粒線體活性測定

取 100ml 滅菌二次水，加入 DMEM 粉末 1.35 g，攪拌至完全溶解，加入 2% 血清，以 1N HCl 及 1N NaOH 將培養液 pH 值調至 7.4，以 0.2  $\mu\text{m}$  Syringe Filter 過濾培養液至血清瓶中，再分裝至 50 mL 離心管於 4 °C 冰箱保存。將細胞至於 96 well 孔盤，分別在 0 小時、24 小時、48 小時加入化療藥物 MMC (Mitomycin C)，盤面密度控制在當天是滿盤狀態。培養置含有 5%  $\text{CO}_2$ ，溫度 37 °C 環境中，將探針浸泡標準液 24 小時活化探針，上機前先需先將探針進行校正後，以海馬能量測定儀分析 (Seahorse XFe Extracellular Flux Analyzer) 其細胞耗氧率 (oxygen consumption rate, OCR)，之後設定條件於細胞孔盤上的孔洞分別加入粒線體抑制藥物為 1  $\mu\text{M}$  FCCP、1  $\mu\text{M}$  Oligomycin 和 1  $\mu\text{M}$  Rotenone，使用蛋白質定量以校正細胞數。



圖五、粒線體產能耗氧率作用圖

整體耗氧率扣除非粒線體呼吸作用即為粒線體基礎耗氧率 (Basal respiration)。當加入 Oligomycin 停止 ATP 合成後，耗氧率下降測得 ATP 合成耗氧率(ATP production)。粒線體中非合成 ATP 用途的質子滲漏耗氧率(Proton leak)為粒線體基礎耗氧扣除 ATP 合成耗氧率。加入 FCCP 的最大耗氧率扣除非粒線體耗氧的呼吸作用極限為最大呼吸作用耗氧率 (Maximal respiration)，作為呼吸作用潛力的指標，最大呼吸作用耗氧扣除基礎呼吸作用耗氧率即為呼吸作用備用耗氧率 (Spare capacity)，添加 Rotenone 以停止粒線體呼吸作用。細胞中電子傳遞鏈產生 ATP 作為能量的來源，產生的  $O_2$  為電子傳遞中電子的最終接受者，因此可以藉由耗氧率推測粒線體產能的速率，得到非粒線體呼吸作用耗氧率 (non-mitochondrial respiration)。

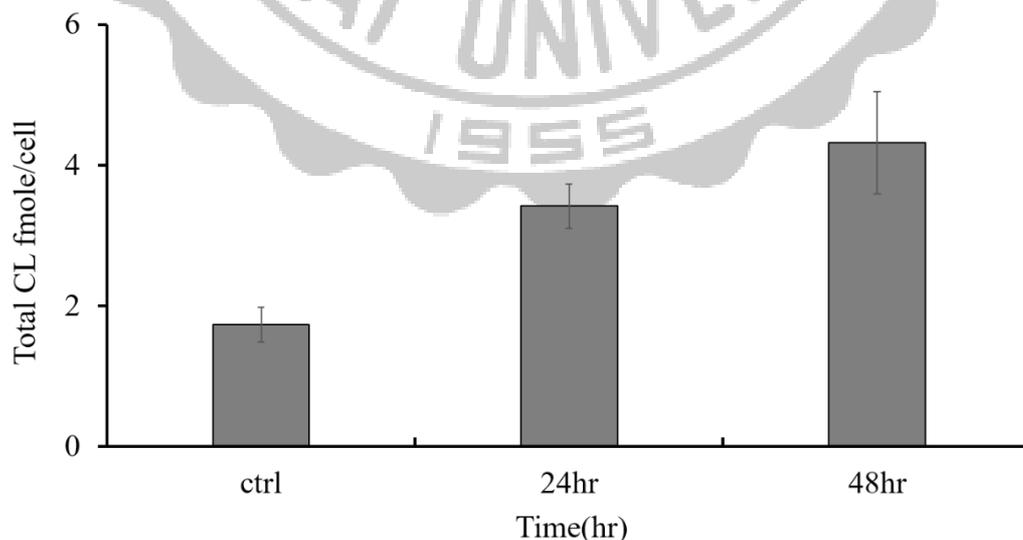
### 2.9.1 細胞蛋白質定量

海馬能量測定儀 XF24 cell culture microplate 細胞微孔盤中加入 50 $\mu$ L 0.2% triton in PBS 破細胞，利用 BSA (bovine serum albumin) 做標準曲線，測量波長為 595nm，以 BIO-RAD Bradford protein assay 測定，定量後以蛋白質濃度來做為海馬能量測定儀標準化參數。

## 第三章、結果與探討

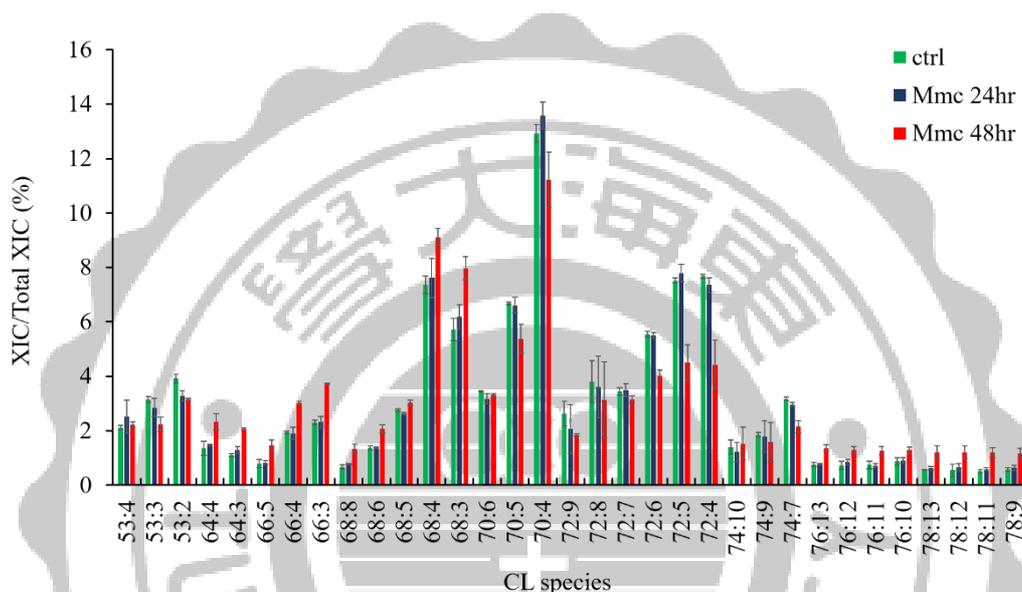
### 3.1 心磷脂 CL 測定及單水解心磷脂 MLCL 的鑑定

基於先前建立心磷脂的鑑定平台，可以鑑定出細胞中心磷脂 CL 的分布種類，因此在本實驗中測定單水解心磷脂 (MLCL)，MLCL 在滯留時間 26 分鐘到 30 分鐘可以被質譜偵測，CL 滯留時間為 30 分鐘到 36 分鐘。在樣品中加入心磷脂 CL 標準品 125  $\mu\text{g}$ ，進行半定量。在先前實驗中加入化療藥物 MMC、MTX 刺激 24 小時、48 小時後偵測，測得心磷脂總量隨著時間增加有累積的現象 (圖六)。在單水解心磷脂的分析，質譜儀分析時間中 MLCL 滯留的時間沒有偵測到明顯的訊號，因此判斷在本實驗中的單水解心磷脂 MLCL 是沒有變化的，再心磷脂 species 變化中，在碳數總和較低的心磷脂群落 (C66、C68)，隨著進入細胞停滯而含量上升，而碳數較高的心磷脂群落 (C72、C74) 含量則下降 (圖七)。整體而言，在細胞停滯時的心磷脂變化符合先前實驗結果，在單水解心磷脂則沒有變化。



圖六、細胞經化療藥物 MMC 刺激後的心磷脂總量圖

HT-1080 細胞經化療藥物刺激後，加入定量內標準品 CL(14:0)使用 Bligh & Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品以標準品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，得細胞 CL 總含量圖。



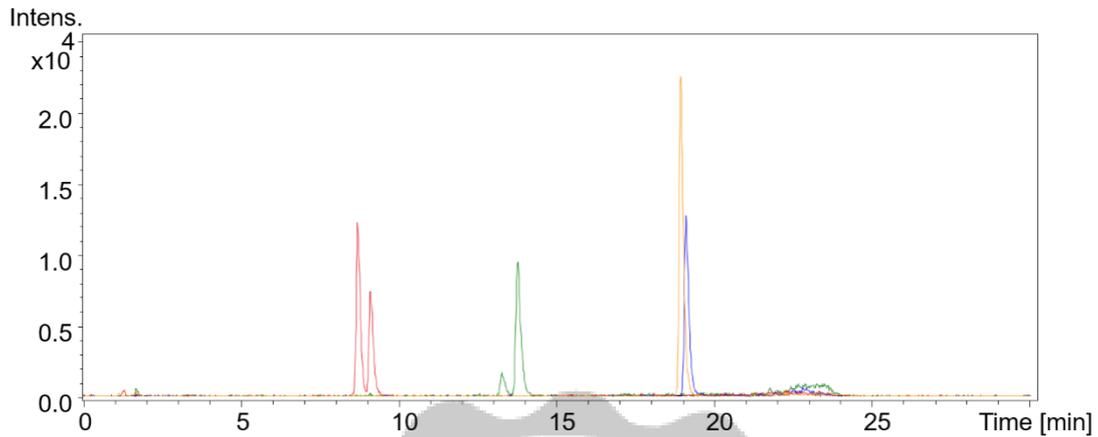
圖七、細胞經化療藥物 Mitomycin C (MMC) 刺激後 CL 的組成比率圖

HT-1080 細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，加入定量內標準品 CL (14:0) 使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測定與標準化並藉由 Species extracted-ion chromatogram (EIC) /Total extracted-ion chromatogram (EIC)，所得總細胞 CL species 含量圖。

### 3.2 類花生酸 Eicosanoids 的鑑定

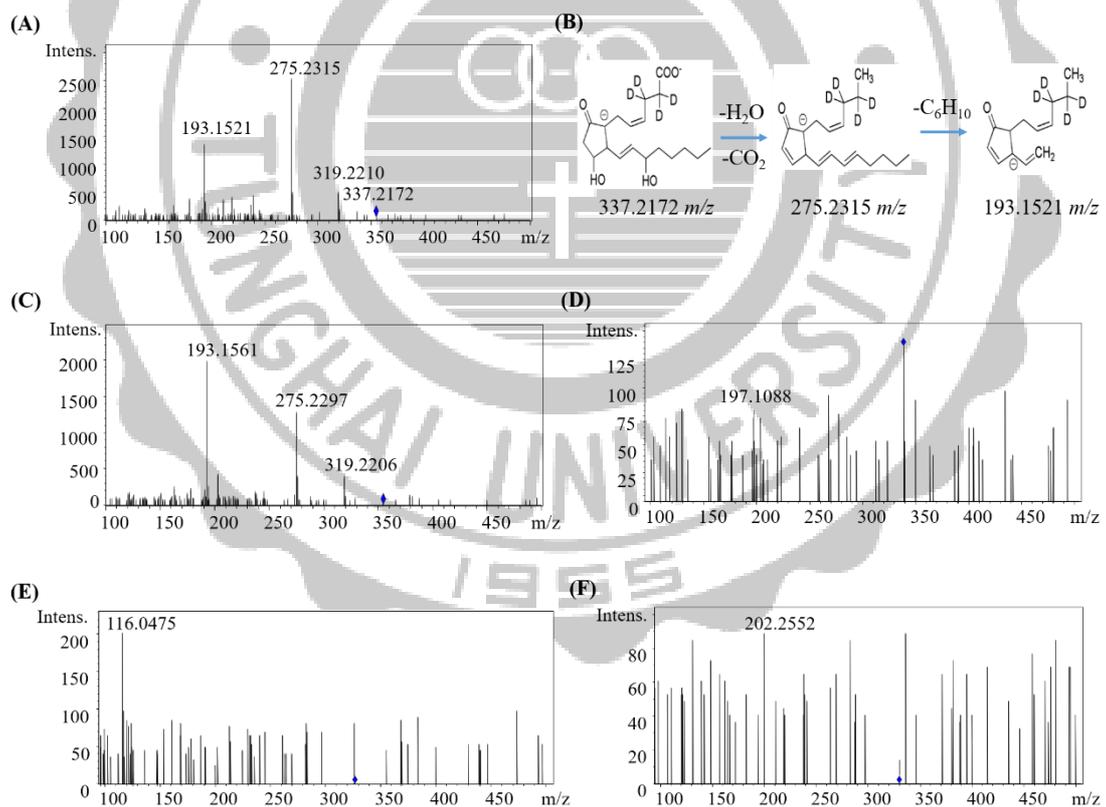
基於常見的類花生酸 Eicosanoids，利用實驗室現有的細胞株 HT-1080、RAW cell 264.7、Hep G2，從細胞培養液利用固相萃取 (SPE) 萃取出類花生酸 Eicosanoids 後經極致效能逆向層析質譜分析，所呈現的 TIC (Total ion

chromatogram) 圖譜中，所使用的五種不同種類標準品 PGE<sub>2</sub>-D<sub>4</sub>、PGD<sub>2</sub>-D<sub>4</sub>、LTB<sub>4</sub>-D<sub>4</sub>、14,15-EET-d<sub>11</sub>、(5S)-HETE-d<sub>8</sub>，分別會在 8.5 分鐘、9.2 分鐘、14.2 分鐘、18.8 分鐘、19.0 分鐘被沖提出來。其分子量為 355m/z、355m/z、339 m/z、330 m/z、327 m/z 因有氬化之標準品會與原生生物樣品中的種類相差所氬化的數量，以類花生酸 Eicosanoids 標準品為基準點 (圖八)。生物樣品中的 Eicosanoids 因雙鍵位置及數量的不同，使親疏水性不同，因此會落在滯留時間 3 分鐘到 20 分鐘。類花生酸 Eicosanoids 在質譜儀當中以負電價模式偵測，分子量約落在 300m/z 到 400m/z 之間。使用高效能液相層析儀分析其類花生酸 Eicosanoids 的分子量訊息不足以確定其種類。由於類花生酸 Eicosanoids 主要都是由 20 個碳所組成，因此分子量會非常相似。為了幫助分析複雜生物樣品中的類花生酸 Eicosanoids，因此使用串聯式質譜 (MS/MS) 子離子模式，鑑定細胞中的類花生酸種類。以標準品 PGE<sub>2</sub>-D<sub>4</sub> 355 m/z 為例，裂解方式為 355 m/z 脫去一個水得 337 m/z，再脫去一個水及二氧化碳得 275 m/z，脫去 C<sub>6</sub>H<sub>10</sub> 得 193 m/z (圖九、B)。雙鍵的位置及數量會使裂解的碎片離子強度不一樣，藉此可以判斷及確定其種類。以標準品 PGE<sub>2</sub>-D<sub>4</sub> 和 PGD<sub>2</sub>-D<sub>4</sub> 為例，兩個所偵測分子量皆是 355m/z，裂解片段也很相似，裂解後會出現 337 m/z、319 m/z、275 m/z 及 193 m/z，但是兩個相較之下裂解碎片強度會因為雙鍵的位子不同會有所差異。PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 裂解出的碎片強度最高為 275 m/z (圖九、A)，相對的 PGD<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 最高為 193 m/z (圖九、C)。PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 在碎片離子中會出現 337 m/z (圖九、A)，而 PGD<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 則沒有 337 m/z 碎片離子訊號 (圖九、C)，因此可以利用滯留時間以及碎片離子來鑑定不同總類的類花生酸。將破裂片段數據化，使用 Mzcloud MS database 確認種類。



圖八、類花生酸 Eicosanoids 標準品之 TIC 質譜圖

標準品 PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 及 PGD<sub>2</sub>-D<sub>4</sub> (紅色)、標準品 LTB<sub>4</sub>-D<sub>4</sub> (綠色)、標準品 14,15-EET-d<sub>11</sub> (橘色)、標準品 5S-HETE-d<sub>8</sub> (藍色)。



圖九、類花生酸標準品 MS/MS 裂解模式。

標準品 PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 經串聯質譜鑑定的裂解片段(A)、PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 在質譜儀裂解模式(B)、PGD<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> 經串聯質譜鑑定後的裂解片段 (C)、LTB<sub>4</sub>-D<sub>4</sub> 經串聯質譜鑑定後的裂解

片段 (D)、14,15-EET-d<sub>11</sub> 經串聯質譜鑑定後的裂解片段 (E)、(5S)-HETE-d<sub>8</sub> 經串聯質譜鑑定後的裂解片段 (F)。

### 3.3 UPLC-Q-TOF-MS 偵測細胞株中類花生酸 Eicosanoids 種類

測定細胞中類花生酸 Eicosanoids，需要建立一個類花生酸 Eicosanoids 偵測平台。利用 HT-1080、Hep G2、RAW264.7 以及添加脂肪酸 EPA、AA 後培養至 90% 盤面密度時，細胞樣品經固相萃取法 (SPE)，由 UPLC-Q-TOF-MS 分析細胞釋放至培養液中的類花生酸 Eicosanoids 組成，經篩選鑑定後，全部可以被偵測出來的類花生酸 Eicosanoids 共有 10 種分子量包含 45 種的類花生酸 Eicosanoids 包含 5 種類花生酸 Eicosanoids 標準品 (表三)。(所有種類經 Mzcloud MS database 鑑定)。

表三、細胞株中可測定的類花生酸 Eicosanoids 種類

Pathway	Name	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Retention time (min)
Standard	PGD <sub>2</sub> -D <sub>4</sub>	355	275	9.0
	PGE <sub>2</sub> -D <sub>4</sub>	355	275	8.5
	14,15-EET-D <sub>11</sub>	330	202	18.8
	LTB <sub>4</sub> -D <sub>4</sub>	339	197	14.5
	5 (s) -HETE-D <sub>8</sub>	327	116	19.0
COX	15d-PGJ <sub>2</sub>	315	255	19.7-20.6
	11-HETE	319	167	18.3-18.6
	11S-HETE	319	167	18.5-19.1
	PGA <sub>2</sub>	333	271	11.8
	13-HDoHE	343	220	4.6-4.7
	PGE <sub>3</sub>	349	269	4.7-4.9
	PGD <sub>2</sub>	351	271	7.7-8.0
	PGD <sub>1</sub>	353	273	7.7-8.0
	PGE <sub>1</sub>	353	273	5.6-6.7
	dhPGF <sub>2</sub> α	355	275	9.0-9.2
	PGF <sub>1</sub> α	355	273	2.3-3.8
	TXB <sub>3</sub>	367	163	6.8-7.0
	17,6-ketoPGF <sub>1</sub> α	367	203	6.8
	20-hydroxyPGE <sub>2</sub>	367	129	7.3
	6k-PGE <sub>1</sub>	367	145	8.3-8.6
	20-hydroxyPGF <sub>2</sub> α	369	127	7.8
	19 (R) -hydroxyPGE <sub>1</sub>	369	209	8.3-9.0
	6k-PGF <sub>1</sub> α	369	207	12.6-13.2
	19 (R) -hydroxyPGE <sub>1</sub> α	371	353	2.6-3.7
	11-Deoxy PGF <sub>2</sub> β	337	275	9.2-9.4
	13,14-Dihydro-15ketoPGA <sub>2</sub>	333	192	5.6-6.2
	PGI <sub>1</sub>	353	271	2.5-4.0
	8-Iso-15-keto-PGF <sub>2</sub> β	355	275	9.0-9.2
	11-deoxy-PGE <sub>1</sub>	337	275	8.9-9.2
	6α-PGI <sub>1</sub>	353	273	2.9-3.5

Pathway	Name	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Retention time (min)
LOX	15-HETE	319	113	17.8-18.2
	5-HETE	319	115	19.2-19.6
	5 (S) -HETrE	321	115	8.2-8.5
	15-HETrE	321	221	18.7-19
	8,15-diHETE	335	127	13.2-13.5
	5,15-diHETE	335	201	13.5-13.8
	(±) 5,6-diHETrE	337	145	17.6-18
	20ohLTB4	351	195	4.4
	Tetranor-12 (R) -HETE	265	203	14.4-15
	12R-HETE	319	115	19.5-20
	PGF3 $\alpha$	351	287	3.7
	11 $\beta$ -PGE2	351	271	7.3
	13-HoTre-g	293	220	12.2-12.7
	5,6-DHET	337	145	17
	15 (s) -HETE	319	301	18.1-18.5

### 3.4 UPLC-Q-TOF 偵測 HT-1080 細胞的類花生酸 Eicosanoids 種類

在本實驗 HT-1080 細胞株，培養至盤面密度 90% 時，細胞樣品經固相萃取法(SPE)，由 UPLC/Q-TOF/MS 分析細胞釋放至培養液中的類花生酸 Eicosanoids 組成，經篩選鑑定後，可以被偵測出來的類花生酸 Eicosanoids 共 11 種分子量包含 21 種的類花生酸 Eicosanoids 包含 5 種類花生酸標準品(表四)。(所有種類經 Mzcloud MS database 鑑定)。

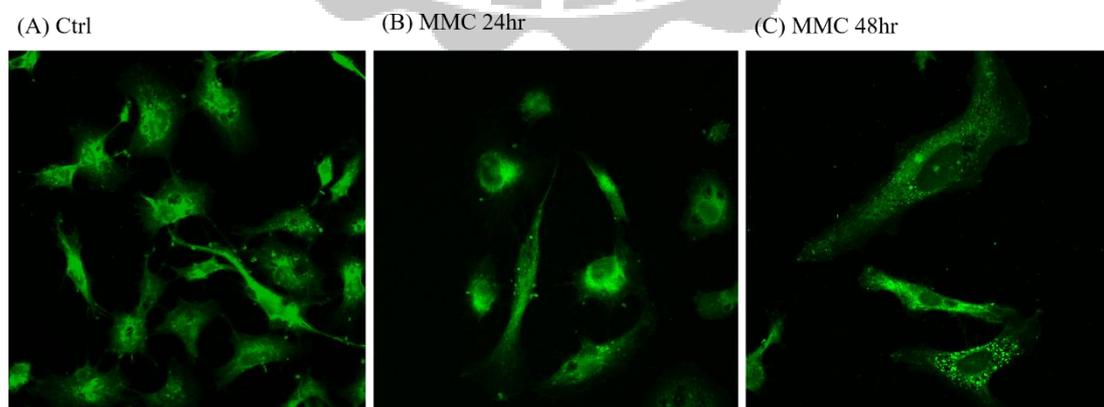


表四、HT-1080 細胞中類花生酸 Eicosanoids 種類

Pathway	Name	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Retention time (min)
Standard	PGD <sub>2</sub> -D <sub>4</sub>	355	275	8.5
	PGE <sub>2</sub> -D <sub>4</sub>	355	275	9.0
	14,15-EET-D <sub>11</sub>	330	202	18.8
	LTB <sub>4</sub> -D <sub>4</sub>	339	197	14.5
	5 (s) -HETE-D <sub>8</sub>	327	116	19.0
COX	15d-PGJ <sub>2</sub>	315	255	19.7-20.6
	11-HETE	319	167	18.3-18.6
	13-HDoHE	343	220	4.6-4.7
	PGE <sub>3</sub>	349	269	4.7-4.9
	PGD <sub>2</sub>	351	271	7.7-8.0
	PGD <sub>1</sub>	353	273	7.7-8.0
	PGE <sub>1</sub>	353	273	5.6-6.7
	PGE <sub>2</sub>	351	271	8.5-9.0
	dhPGF <sub>2</sub> α	355	275	9.0-9.2
	PGF <sub>1</sub> α	355	273	2.3-3.8
	TXB <sub>3</sub>	367	163	6.8-7.0
	19 (R) -hydroxyPGE <sub>1</sub> α	371	353	2.6-3.7
	13,14-Dihydro-15ketoPGA <sub>2</sub>	333	192	5.6-6.2
	PGI <sub>1</sub>	353	271	2.5-4.0
LOX	5-HETE	319	115	19.2-19.6
	15-HETrE	321	221	18.7-19
	20ohLTB <sub>4</sub>	351	195	4.4

### 3.5 添加 Mitomycin C (MMC) 對 HT1080 細胞造成的影響

將人類纖維肉瘤細胞 (HT-1080 細胞) 分盤至 25% 盤面密度 (細胞數約為  $2.0 \times 10^5$  顆, 3cm dish) 並等待半小時細胞貼覆盤面。細胞貼盤後添加化療藥物  $2 \mu\text{M}$  Mitomycin C, 經過分別於 24 小時、48 小時收成, 並將未添加化療藥物 0 小時收成當作控制組。透過螢光 NAO 試劑 (Acridine Orange 10-Nonyl Bromide) 染色, 利用 Zeiss LSM510 共軛焦顯微鏡在 40X 的物鏡下, 分別以藍光波長 488nm 放射, 再用綠色 Ch2-T1 濾片下得到螢光位置, 與白光照得到細胞位置, 再用 ZEN 2009 軟體疊圖 (圖十)。以共軛焦顯微鏡 40X 觀察, HT 1080 細胞以 Mitomycin C (MMC) 調控, 控制組經 NAO 染色後, 因 NAO 會染到所有帶負電的 Lipid, 所以呈現的是比較平均的螢光訊號 (圖十、A), 經 24 小時後, 會有明顯的螢光訊號產生, 而慢慢地聚集在細胞核的周圍 (圖十、B)。經 48 小時後, 螢光訊號會更加明顯並開始呈現點狀聚集到細胞核周圍, 相較於控制組 0 小時的 Cardiolipin 形態及分佈上有顯著的變化。HT 1080 經 MMC 培養 48 小時的螢光訊號分佈較於控制組聚集 (圖十、C)。整體而言, 當細胞受到藥物刺激後, 細胞心磷脂會向細胞核聚集並呈現較明顯的螢光訊號, 間接證實在細胞內心磷脂有累積的情況。

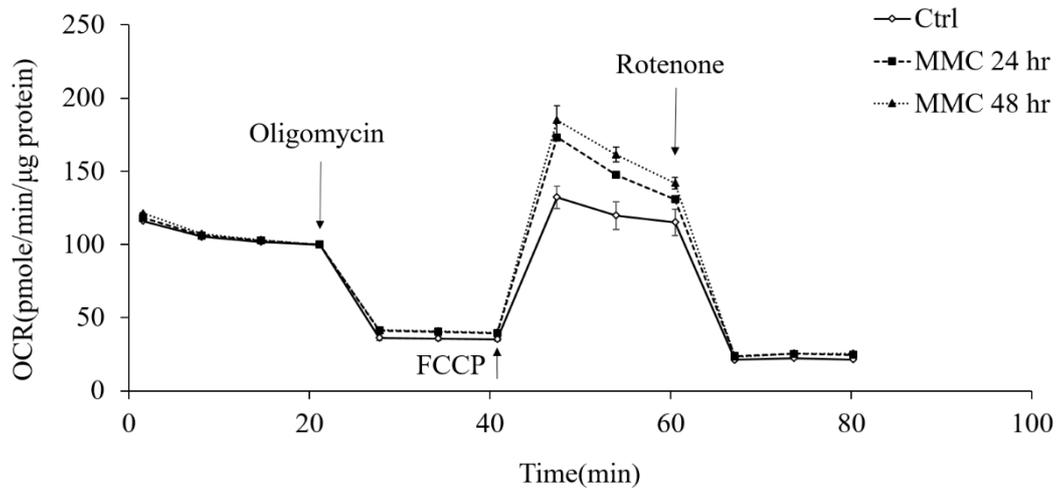


圖十、添加  $2 \mu\text{M}$  Mitomycin C 於 HT 1080 細胞以 NAO 染色螢光圖

分別調控不同時間點 Ctrl (A)、24 小時 (B)、48 小時 (C)，經 NAO 染色以共軛焦顯微鏡在 40X 下觀察。

### 3.6 海馬能量測定儀及粒線體活性

當細胞 HT-1080 細胞經化療藥物 Mitomycin C (MMC) 刺激後，會使細胞停滯生長，停滯期間細胞會進行修復或能量的保存，其中相對會影響到粒線體的活性與 ATP 的生成。使用海馬生物能量測定儀檢測 HT-1080 細胞與實驗組細胞耗氧率 (pmole/min)，藉由添加 Oligomycin、FCCP、Rotenone 粒線體抑制劑，細胞數除以蛋白質定量作定量標準化得到細胞標準耗氧率 (pmole/min/ $\mu$ g protein)。HT-1080 控制組以及添加化療藥物 MMC 實驗組，經蛋白質定量標準化後，基礎耗氧率皆在 100 (pmole/min)。在 20 分鐘加入粒線體抑制劑 Oligomycin 阻斷  $H^+$  回內膜，並停止複合蛋白 IV 的運作來抑制 ATP 的合成，皆使得耗氧率降至為 30 (pmole/min)。在 40 分鐘加入粒線體抑制劑 FCCP，使粒線體內膜兩側的  $H^+$  濃度得到平衡，並增加  $H^+$  以及  $Na^+$  在內膜的穿透性，使得電子傳遞鏈在極限狀態下空轉運作，在控制組以及加入化療藥物 MMC 得到極限運作耗氧率 OCR，控制組的極限耗氧率升至 110 (pmole/min)，在加入化療藥物培養 24 小時後，極限耗氧率升高至 170 (pmole/min)，加入化療藥物 48 小時後，極限耗氧率升高至 180 (pmole/min)。在 60 分鐘時，加入粒線體抑制劑 Rotenone 來中止電子傳遞鏈複合蛋白 I 的運作，使得控制組以及化療藥物實驗組耗氧率 OCR 皆降至 20 (pmole/min)。利用化療藥物來抑制 HT-1080 細胞的生長，並測得耗氧率顯示，在使用化療藥物刺激細胞 48 小時後，極限耗氧率升高至 180 (pmole/min)，相較於控制組的極限耗氧率為 110 (pmole/min)，升高 60% (圖十一)。整體而言，因藥物刺激後的粒線體活性會隨著藥物時間刺激越長使得粒線體活性增加。



圖十一、海馬能量測定儀測定化 MMC 對 HT-1080 刺激後粒線體耗氧率變化圖

控制組（黑實線）、MMC 24 小時（方框虛線）、MMC 48 小時（三角虛線）。實驗皆為三重覆並以蛋白質定量校正。

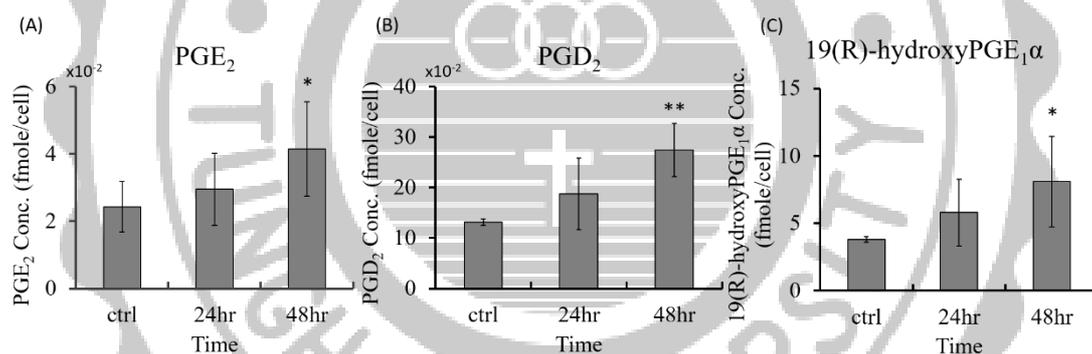
### 3.7 UPLC-Q-TOF-MS 分析 HT-1080 細胞類花生酸 Eicosanoids 的變化

利用所建立的 UPLC-Q-TOF 偵測平台，在 HT-1080 細胞中，加入化療藥物 Mitomycin C 來刺激，所測得的類花生酸 Eicosanoids 為 16 種（表四）。（實驗皆為三重覆，種類經 Mzcloud MS database 鑑定）。

當 HT-1080 細胞經化療藥物 Mitomycin C（MMC）調控下，經 UPLC-Q-TOF-MS 分析出類花生酸大致分成前列腺素（Prostaglandin, PG）、白三烯（Leukotriene, LTs）、血栓素（Thromboxane）及 HETEs。

### 3.7.1 HT-1080 細胞經化療藥物 Mitomycin (MMC) 刺激後前列腺素變化

HT-1080 細胞經 Mitomycin C 刺激培養，偵測 3 個時間點分別為 0 小時、24 小時、48 小時。經固相萃取 SPE 後，以 UPLC-Q-TOF-MS 偵測所測得 10 種前列腺素 (表四)，所有實驗皆為三重覆。發炎反應中常見的前列腺素 PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub> 在經化療藥物刺激 48 小時後，PGE<sub>2</sub> 相較於控制組的濃度變化呈現升高的趨，升高約有 1.5 倍 (圖十二、A)。PGD<sub>2</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度比控制組上升了 2.5 倍 (圖十二、B)。PGE<sub>1</sub>α 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度比控制組上升了 2 倍 (圖十二、C)。整體而言在 COX2 所產生常見的前列腺素皆因為藥物刺激皆呈現上升趨勢。

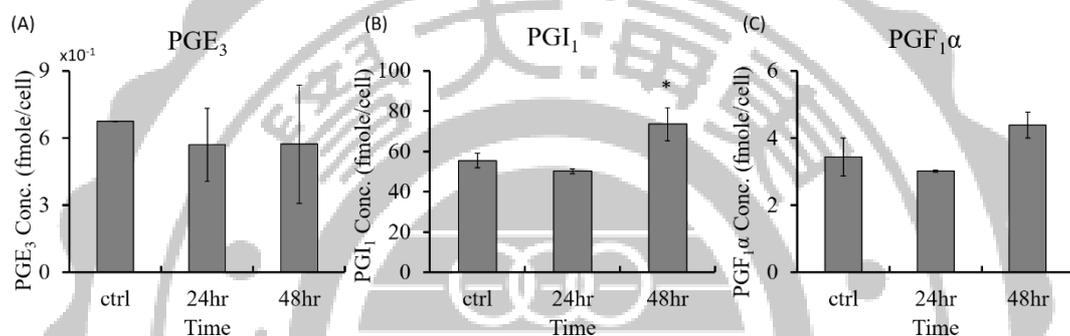


圖十二、HT-1080 細胞經化療藥物 mitomycin C (MMC) 刺激後前列腺素變化圖

細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時時間點測定，前列腺素 PGE<sub>2</sub> 濃度變化圖 (A)、PGD<sub>2</sub> 濃度變化圖 (B)、19 (R) -hydroxyPGE<sub>1</sub>α 濃度變化圖 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* ≤ 0.05, \*\* ≤ 0.01, \*\*\* ≤ 0.001)。

細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，分析細胞中

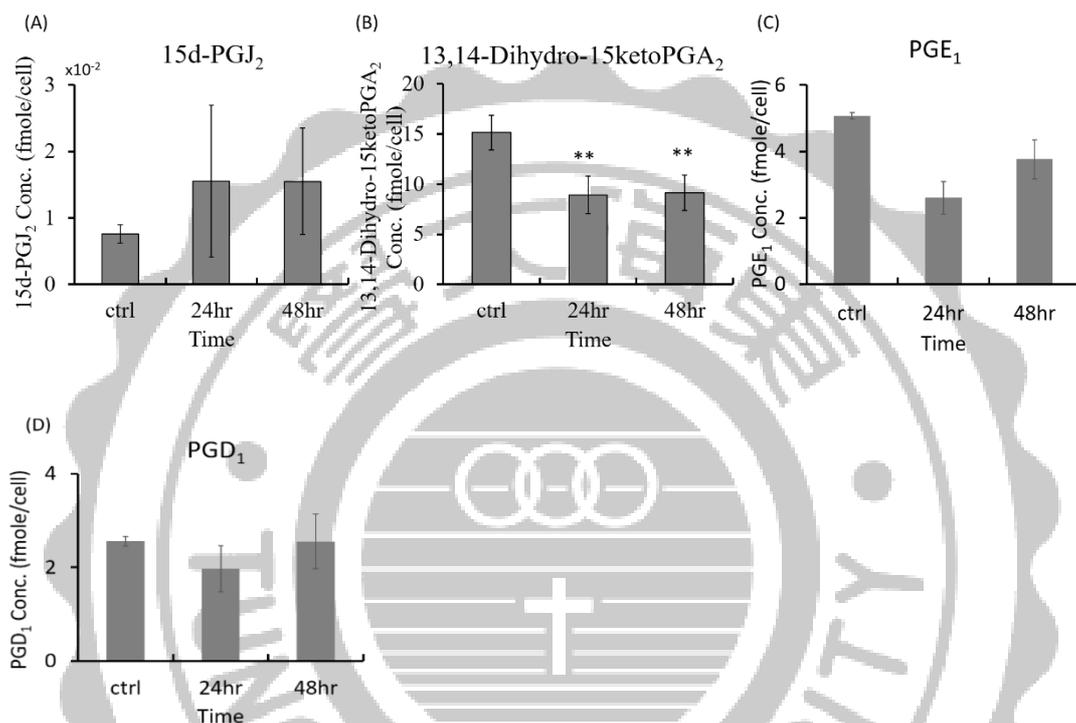
前列腺素 PGE<sub>3</sub> 濃度變化，由於經化療藥物刺激 48 小時濃度變化誤差值增加，與控制組比較並無明顯變化（圖十三、A）。PGI<sub>2</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度比控制組上升了 1.4 倍（圖十三、B）。PGF<sub>1</sub>α 濃度變化量，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則沒有明顯變化（圖十三、C）。在 PGE<sub>3</sub>、PGF<sub>1</sub>α 中，經化療藥物刺激過後皆無明顯變化，僅 PGI<sub>1</sub> 經過藥物刺激 48 小時，有增加的趨勢，推測細胞經藥物刺激過後發炎反應路徑 COX 會被活化。



圖十三、HT-1080 細胞經化療藥物 mitomycin C (MMC) 刺激後前列腺素變化圖  
細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，前列腺素 PGE<sub>3</sub>  
濃度變化圖 (A)、PGI<sub>1</sub> 濃度變化圖 (B)、PGF<sub>1</sub>α 濃度變化圖 (C)。(實驗為三  
重覆，統計皆以 T-test 計算，\* ≤ 0.05，\*\* ≤ 0.01，\*\*\* ≤ 0.001)。

細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，分析細胞中  
前列腺素 PGJ<sub>2</sub> 濃度變化，由於經化療藥物刺激 48 小時濃度變化誤差值增加，與  
控制組比較並無明顯變化（圖十四、A）。PGA<sub>2</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48  
小時濃度比控制組下降了 2.5 倍（圖十四、B）。PGE<sub>1</sub> 濃度變化量，經化療藥物  
刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則沒有明顯變化（圖十四、C）。PGD<sub>1</sub> 濃度  
變化量，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則沒有明顯變化（圖十

四、D)。整體而言，在前列腺素的變化中經化療藥物刺激過後，COX 路徑引發發炎的前列腺素皆有明顯上升，因此推測再經藥物刺激過後發炎路徑 COX 被活化。

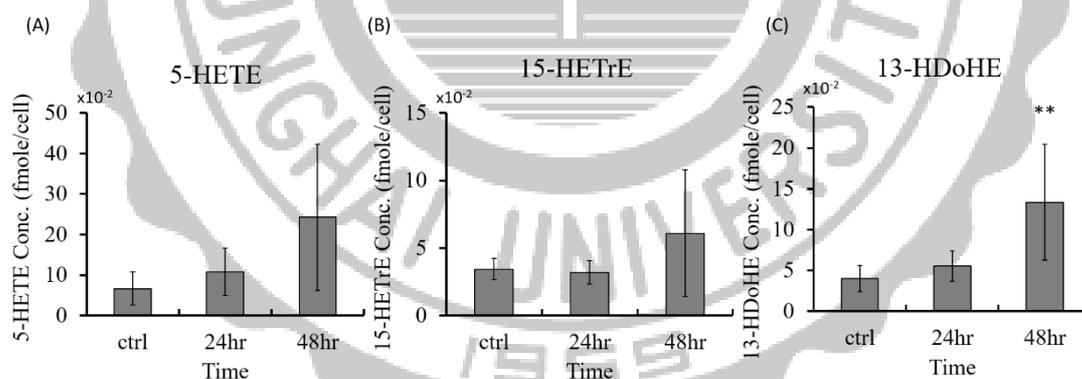


圖十四、HT-1080 細胞經化療藥物 Mitomycin C (MMC) 刺激後前列腺素變化圖  
 細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，前列腺素 15d-PGJ<sub>2</sub>  
 濃度變化圖 (A)、13,14-Dihydro-15ketoPGA<sub>2</sub> 濃度變化圖 (B)、PGE<sub>1</sub> 濃度變化  
 圖 (C)、PGD<sub>1</sub> 濃度變化圖 (D)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* ≤ 0.05，  
 \*\* ≤ 0.01，\*\*\* ≤ 0.001)。

### 3.7.2 HT-1080 細胞經化療藥物 Mitomycin C (MMC) 刺激後其他類花生酸變化

HT-1080 細胞經 Mitomycin C 刺激培養，偵測 3 個時間點分別為 0 小時、24 小時、48 小時。經固相萃取 SPE 後，以 UPLC-Q-TOF-MS 偵測所測得其他類花生酸有 6 種 (表四)，所有實驗皆為三重覆。

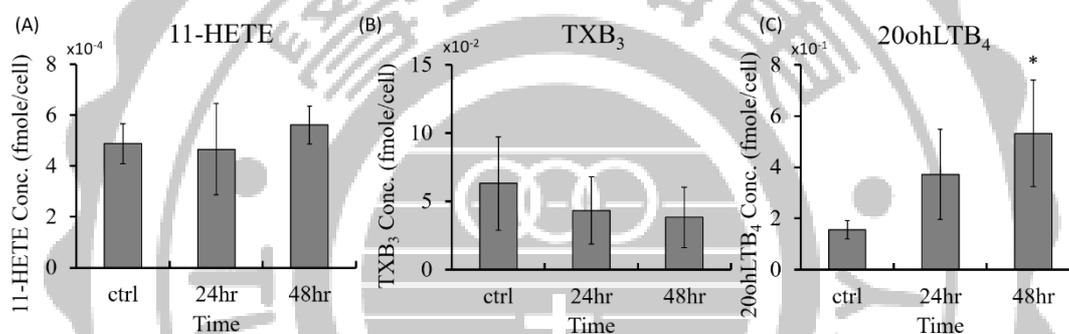
分析細胞中 5-HETE 濃度變化，由於經化療藥物刺激 48 小時濃度變化誤差值增加，與控制組比較並無明顯變化 (圖十五、A)。15-HETrE 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化誤差值增加，與控制組並無明顯變化 (圖十五、B)。13-HDoHE 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則有上升的趨勢，上升約 3 倍 (圖十五、C)。在羥基二十碳四烯酸 (HETEs) 的變化中，COX 路徑代謝的 13-HoHE 經藥物刺激 48 小時，有明顯的上升，推測經藥物刺激過後發炎反應 COX 被活化。



圖十五、HT-1080 細胞經化療藥物 Mitomycin C (MMC) 刺激後類花生酸變化圖

細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，5-HETE 濃度變化圖 (A)、15-HETrE 濃度變化圖 (B)、13-HDoHE 濃度變化圖 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

分析細胞中 11-HETE 濃度變化，由於經化療藥物刺激 48 小時濃度變化誤差值增加，與控制組比較並無明顯變化（圖十六、A）。TXB<sub>3</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時相比後並無明顯變化（圖十六、B）。LTB<sub>4</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時與控制組相比則有上升的趨勢，上升約 3 倍（圖十六、C）。整體言在類花生酸變化中，COX 路徑產生的類花生酸有較明顯的上升，推測在因為藥物刺激過後在細胞中產生發炎反應導致活化了 COX 路徑產生了許多經由 COX 代謝出的類花生酸。



圖十六、HT-1080 細胞經化療藥物 mitomycin C (MMC) 刺激後類花生酸變化圖

細胞經化療藥物 MMC 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時時間點測定，11-HETE 濃度變化圖 (A)、TXB<sub>3</sub> 濃度變化圖 (B)、20ohLTB<sub>4</sub> 濃度變化圖 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* ≤ 0.05，\*\* ≤ 0.01，\*\*\* ≤ 0.001)。

### 3.8 RT-qPCR 分析 HT-1080 添加化療藥物 MitomycinC (MMC) 的 mRNA 表達量

利用 RT-qPCR 分析 HT-1080 細胞與 HT-1080 細胞加入化療藥物 MMC 刺激後相關的基因 mRNA 表現量，實驗所選擇的 mRNA 大致分為：細胞發炎反應、CL 重塑、合成、水解、細胞凋亡和粒線體融合及分裂，參考基因 (Referencegene)

為 glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (*Gapdh*) 引子設計如 (表五)。

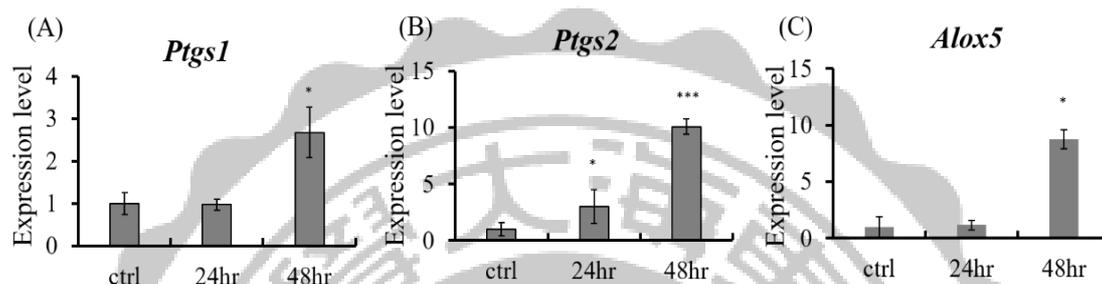
表五、Real-time quantitative PCR 引子設計

GeneID	AccessionNumber	ForwardOligoSequence 5'-3'	ReverseOligoSequence 5'-3'	ProductSize (bp)	Temp(°C)	IntronSpanning
<i>CRLS1</i>	NM_001127458	AGCAGTCCAGTTAATCTT	TTATCACCTGAACAGTCTT	161	78	yes
<i>TAZ</i>	NM_000116	AAGGAAAGTGAACATGA	AGATGACACTCAGCAATC	76	76.5	yes
<i>FADS2</i>	NM_001281501	TTGTGTTGTGTGCGTGT	GCGGAAGGCATCCTGTTG	76	79.2	yes
<i>PLA2G6</i>	NM_001004426	GACCGAGATCCATGAGTA	ACAACGATGGAGAGTTTC	78	78	yes
<i>PNPLA8</i>	NM_015723.4	GGGTGAGTATTGATAACAG	GAATAATTCTTCCTTGACAG	152	—	yes
<i>BID</i>	NM_001196	AATAGAGGCAGATTCTGAAAGTCA	GCTACGGTCCATGCTGTC	88	79.1	yes
<i>PLSCR3</i>	NM_001201576	AATCCTGGTGCAGATTGAT	CGCAGTTCATACCGATTACA	97	77.8	yes
<i>PTGS1</i>	NM_000962	CCTTGACCCTACCAGTGTGA	GTCCACAGGCCAGGGATGG	75	82.7	yes
<i>PTGS2</i>	NM_000963.3	TAAGTGCGATTGTACCCGGAC	TTTGTAGCCATAGTCAGCATTGT	250	—	yes
<i>ALOX5</i>	NM_000698	CTGTTCATCAACCGCTTCA	GACCCGCTCAGAAATAGTG	105	76.8	yes
<i>DNMIL</i>	NM_012062.4	TCGCTGTCACTGCTGCTAAT	GCTAGGGTTCTGCGACCATC	—	—	yes
<i>MFN1</i>	NM_033540.2	CTGAAGCACTTGTGCTGGC	CCGGATTCTTATATGTTGCTTCAA	—	—	yes
<i>MFN2</i>	NM_014874.3	TCGTTTTGATGGACAGCCCT	GTCTGCATCAGGGTGGACTC	—	—	yes
<i>GAPDH</i>	NM_001289745	CACCGTCAAGGCTGAGAAC	GAGGGATCTCGCTCTGG	75	77.8	yes

### 3.8.1 發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量

*Ptgs1* 主要調控發炎反應中 COX1, *Ptgs1* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 3 倍 (圖十七、A), 推測細胞經藥物刺激後活化了發炎路徑 COX1。 *Ptgs2* 為調控發炎反應中 COX2, *Ptgs2* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 5 倍 (圖十七、B), 推測在受藥物刺激後活化了發炎路徑 COX2。 *Alox5* 主要為調控發炎反應 LOX, *Alox5* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 5 倍 (圖十七、C), 推測 LOX 在藥物刺激過後被活化。以化療藥物 MMC 刺激細胞後, 以 0 小時、24 小時及

48 小時測定，發現當以藥物刺激細胞後，隨著時間增加，發炎反應的相關蛋白 mRNA *Ptgs1*、*Ptgs2* 及 *Alox5* 表現量皆呈現上升的趨勢，間接證實 Eicosanoids 的增加，是因發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量上升造成細胞隨著時間產生發炎物質。



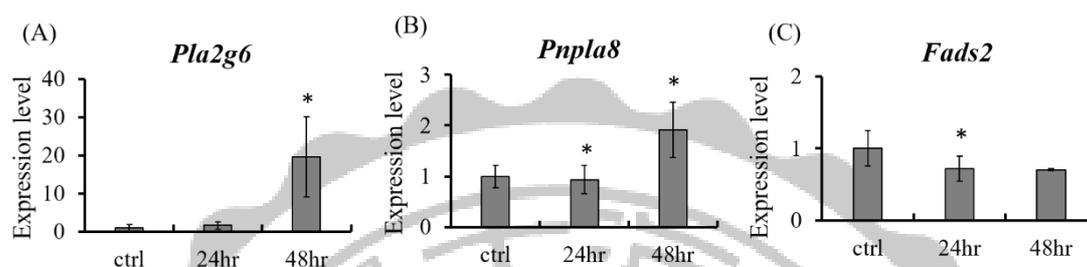
圖十七、RT-qPCR 相對定量發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MMC 刺激 24 小時、48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Ptgs1* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (A)、*Ptgs2* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (B)、*Alox5* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

### 3.8.2 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量

*Pla2g6*、*Pnpla8* 及 *Fad32* 為調控 CL 水解基因，*Pla2g6* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 10 倍 (圖十八、A)。*Pnpla8* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 2 倍 (圖十八、B)。*Fads2* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後下降約為控制組的 0.5 倍 (圖十八、

C)。推測當細胞經藥物刺激過後活化了水解效率，水解效率會增加。*Fads2* 表現量在藥物刺激後隨著時間降低，當細胞受到藥物刺激後 CL 去飽和酶會降低，使碳鏈雙鍵變少。意味著 CL 的碳鏈飽和度會上升。

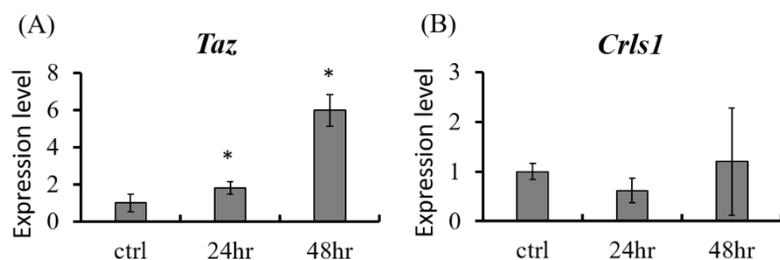


圖十八、RT-qPCR 相對定量 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MMC 刺激 24 小時、添加化療藥物 MMC 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Pla2g6* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (A)、*Pnpla8* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (B)、*Fads2* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

### 3.8.3 CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量

*Taz* 為調控 CL 水解基因，*Taz* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 6 倍 (圖十九、A)。*Crls1* 為控制 CL 重塑基因，*Crls1* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後誤差值變大，與控制組相比表達量無明顯變化 (圖十九、B)。細胞在藥物刺激後重塑基因表現量上升，意味著當藥物刺激時間增加，重塑效率會上升。而添加藥物刺激過後，對合成沒有明顯影響。

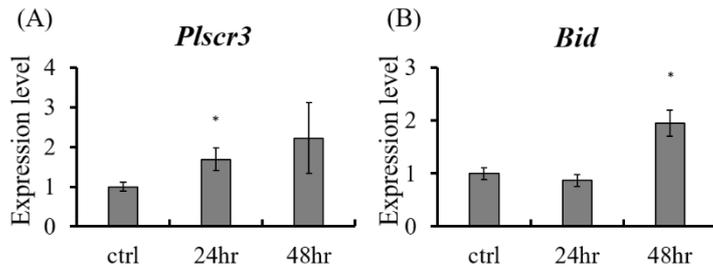


圖十九、RT-qPCR 相對定量 CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MMC 刺激 24 小時、添加化療藥物 MMC 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Taz* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (A)、*Crls1* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (B)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

### 3.8.4 細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量

*Plscr3* 及 *Bid* 為控制細胞凋亡因子基因，*Plscr3* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後，誤差值上升與控制組相比表達量沒明顯變化，添加化療藥物 24 小時的表達量則有上升為控制組的 1.5 倍 (圖二十、A)。*Bid* 表表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 2 倍 (圖二十、B)。在細胞受到藥物刺激後，凋亡基因表現量上升。這表示當細胞受到藥物刺激後，細胞會增加凋亡因子，推測細胞會刺激粒線體釋放出細胞色素 C，讓細胞的凋亡因子濃度上升。

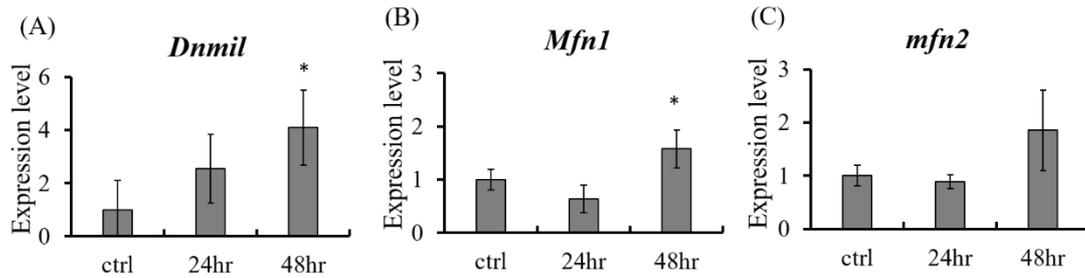


圖二十、RT-qPCR 相對定量細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MMC 刺激 24 小時、添加化療藥物 MMC 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Plscr3* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (A)、*Bid* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (B)。(統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

### 3.8.5 粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量

*Dnm1l* 主要是控制粒線體融合基因，*Dnm1l* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 4 倍 (圖二十一、A)。*Mfn1* 及 *Mfn2* 為控制粒線體融合基因，*Mfn1* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後上升為控制組的 1.5 倍 (圖二十一、B)。*Mfn2* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後，誤差值上升，與控制組相比表達量無明顯變化 (圖二十一、C)。意味著當細胞受到藥物刺激後，細胞的粒線體融合以及分裂隨著藥物刺激時間增加而上升。



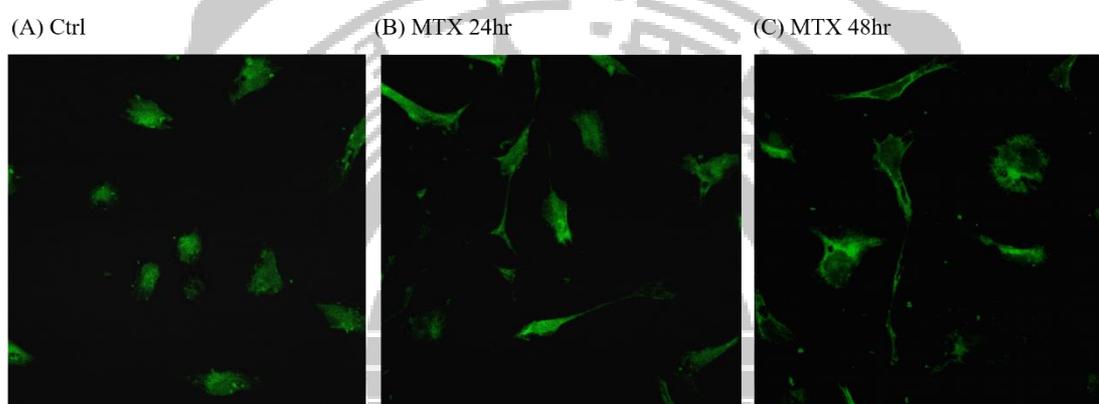
圖二十一、RT-qPCR 相對定量粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MMC 刺激 24 小時、添加化療藥物 MMC 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Dnm1l* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(A)、*Mfn1* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(B)、*Mfn2* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (C)。(統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

### 3.9 添加 Methotrexate (MTX) 對 HT1080 細胞造成的影響

將人類纖維肉瘤細胞 (HT-1080 細胞) 分盤至 25% 盤面密度 (細胞數約為  $2.0 \times 10^5$  顆, 3 cm dish) 並等待半小時細胞貼附盤面。添加化療藥物 50 nM Methotrexate (MTX)，經過分別於 24 小時、48 小時收成，並將未添加化療藥物 0 小時收成當作控制組。透過螢光 NAO 試劑 (Acridine Orange 10-Nonyl Bromide) 染色，利用 Zeiss LSM510 共軛焦顯微鏡在 40X 的物鏡下，分別以藍光波長 488nm 放射，再用綠色 Ch2-T1 濾片下得到螢光位置，與白光照得到細胞位置，再用 ZEN 2009 軟體疊圖 (圖二十二)。以共軛焦顯微鏡 40X 觀察，HT 1080 細胞以 Methotrexate (MTX) 調控，Ctrl 經 NAO 染色後，因 NAO 會染到所有帶負電的 Lipid，呈現的是比較平均的螢光訊號 (圖二十二、A)。經 24 小時後，開始會有

較明顯的螢光訊號產生，而慢慢地聚集在細胞核的周圍（圖二十二、B）。經 48 小時後，螢光訊號會更加明顯的聚集到細胞核周圍，相較於 Ctrl 的 cardiolipin (CL) 分布上有顯著的變化。HT 1080 經 MTX 刺激培養 48 小時後的亮點分布較於 Ctrl 聚集，聚集部位會在細胞的細胞核周圍（圖二十二、C）。整體而言，在經過藥物刺激過後，在細胞核周圍有明顯螢光訊號開始聚集，間接證實心磷脂有在粒線體內累積。



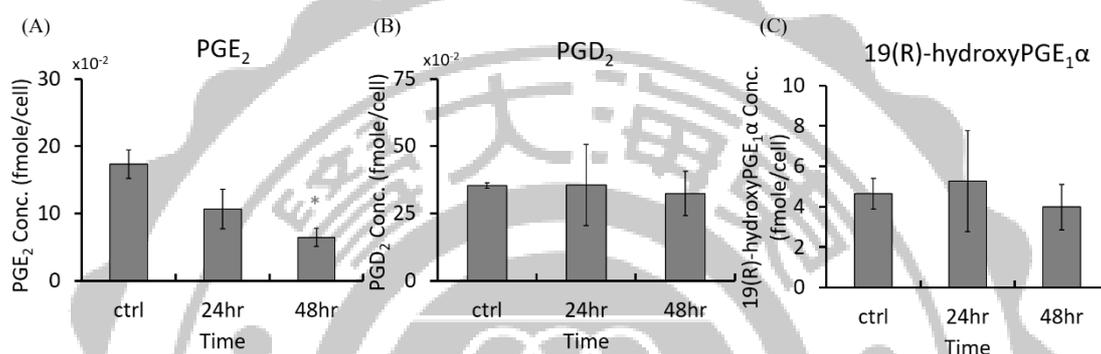
圖二十二、添加 50 nM Methotrexate 於 HT 1080 細胞以 NAO 染色螢光圖分別調控不同時間點 Ctrl (A)、24 小時 (B)、48 小時 (C) 經 NAO 染色，以共軛焦顯微鏡在 40X 下觀察。

### 3.9.1 HT-1080 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後前列腺素 PG 變化

HT-1080 細胞經 Methotrexate (MTX) 刺激培養，偵測 3 個時間點分別為 0 小時、24 小時、48 小時。經固相萃取 SPE 後，以 UPLC-Q-TO-MS 偵測所測得前列腺素有 10 種（表四），所有實驗皆為三重覆。

分析結果中在發炎反應中常見的前列腺素  $\text{PGE}_2$ 、 $\text{PGD}_2$  在經化療藥物刺激 48 小時後， $\text{PGE}_2$  相較於控制組的濃度變化呈現下降的趨勢，下降約有 3 倍（圖二十

三、A)。PGD<sub>2</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時後濃度與控制組無明顯變化（圖二十三、B）。PGE<sub>1</sub>α 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時後濃度與控制組無明顯差異（圖二十三、C）。經由藥物刺激過後，PGE<sub>2</sub> 呈現下降，推測在發炎路徑 COX 可能已經被藥物或是其他機制所抑制。而 PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>1</sub>α 在加入藥物刺激過後無明顯影響。

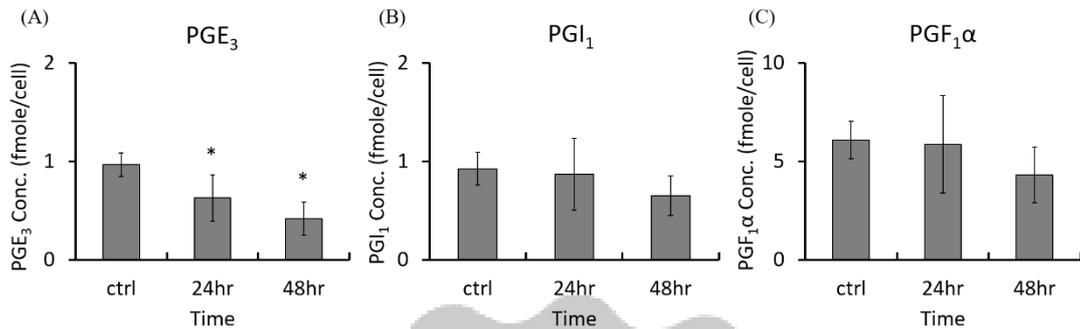


圖二十三、HT-1080 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後前列腺素變化圖

細胞經化療藥物 MTX 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，前列腺素 PGE<sub>2</sub> 濃度變化圖 (A)、PGD<sub>2</sub> 濃度變化圖 (B)、19 (R) -hydroxyPGE<sub>1</sub>α 濃度變化圖 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* ≤ 0.05，\*\* ≤ 0.01，\*\*\* ≤ 0.001)。

細胞經化療藥物 MTX 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，分析細胞中前列腺素 PGE<sub>3</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時後濃度變化下降的趨勢，比控制組下降了 2 倍 (圖二十四、A)。PGI<sub>2</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則沒有明顯變化 (圖二十四、B)。PGF<sub>1</sub>α 濃度變化量，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則沒有明顯變化 (圖二十四、C)。在經由藥物刺激過後，PGE<sub>3</sub> 開始下降，意味著抗發炎物質濃度已經減少，推測

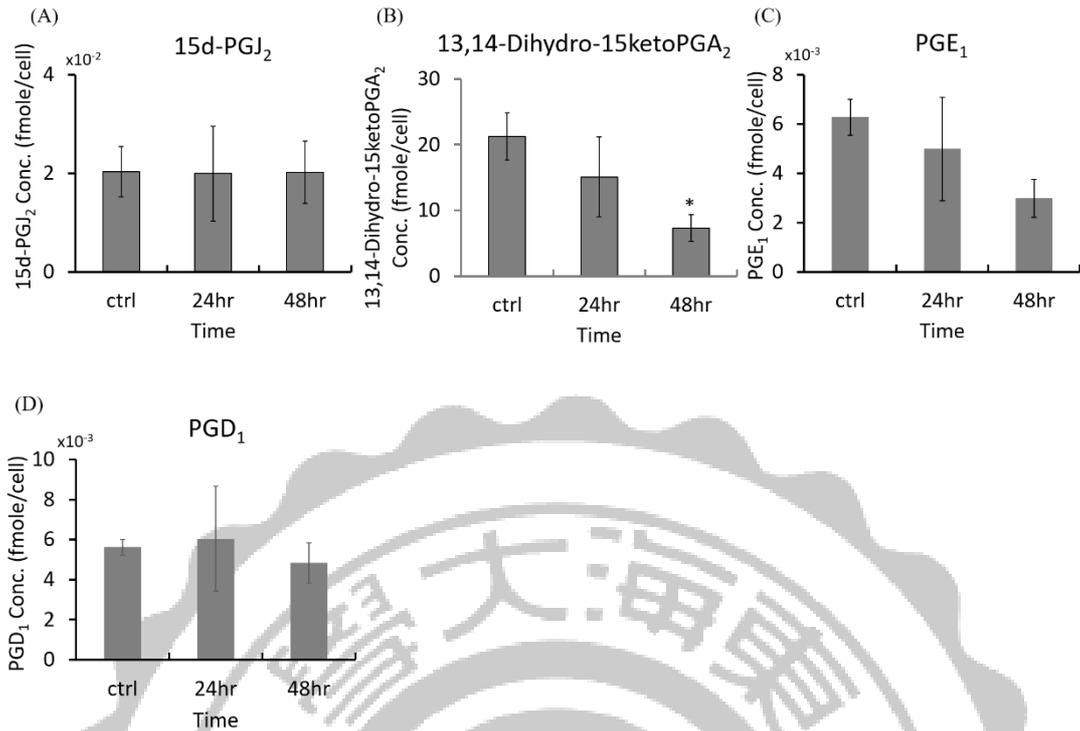
當類花生酸濃度失衡會容易產生發炎反應。



圖二十四、HT-1080 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後前列腺素變化圖

細胞經化療藥物 MTX 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時時間點測定，前列腺素 PGE<sub>3</sub> 濃度變化圖 (A)、PGI<sub>1</sub> 濃度變化圖 (B)、PGF<sub>1</sub>α 濃度變化圖 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

細胞經化療藥物 MTX 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時測定，分析細胞中前列腺素 PGJ<sub>2</sub> 濃度變化量，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則沒有明顯變化 (圖二十五、A)。PGA<sub>2</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度比控制組下降了 2.5 倍 (圖二十五、B)。PGE<sub>1</sub> 濃度變化量，經化療藥物刺激 48 小時濃度比控制組下降了 2 倍 (圖二十五、C)。PGD<sub>1</sub> 濃度變化量，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比則沒有明顯變化 (圖二十五、D)。整體而言，在添加化療藥物後，前列腺素沒有明顯變化甚至有變低的趨勢，推測在整個發炎路徑 COX 被藥物影響所抑制。



圖二十五、HT-1080 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後前列腺素變化圖

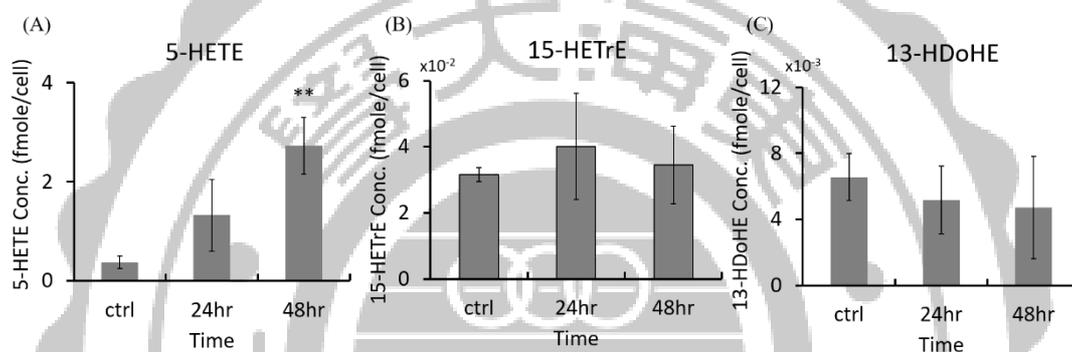
細胞經化療藥物 MTX 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時時間點測定，前列腺素 15d-PGJ<sub>2</sub> 濃度變化圖 (A)、13,14-Dihydro-15ketoPGA<sub>2</sub> 濃度變化圖 (B)、PGE<sub>1</sub> 濃度變化圖 (C)、PGD<sub>1</sub> 濃度變化圖 (D)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* ≤ 0.05，\*\* ≤ 0.01，\*\*\* ≤ 0.001)。

### 3.9.2 HT-1080 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激其他類花生酸變化

HT-1080 細胞經 Methotrexate (MTX) 刺激培養，偵測 3 個時間點分別為 0 小時、24 小時、48 小時。經固相萃取 SPE 後，以 UPLC-Q-TOF 偵測所測得其他類花生酸有 6 種，所有實驗皆為三重覆。

分析細胞中 5-HETE 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組相比

則有上升的趨勢，上升約 3 倍（圖二十六、A）。15-HETrE 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組並無明顯變化（圖二十六、B）。13-HDHE 濃度變化量，經化療藥物刺激 48 小時濃度變化與控制組並無明顯變化（圖二十六、C）。在經過藥物刺激過後，5-HETE 濃度明顯上升，推測在經由藥物刺激過後活化了發炎反應中 LOX 路徑。在 15-HETrE、13-HDHE 在加入藥物刺激後，沒有明顯影響。

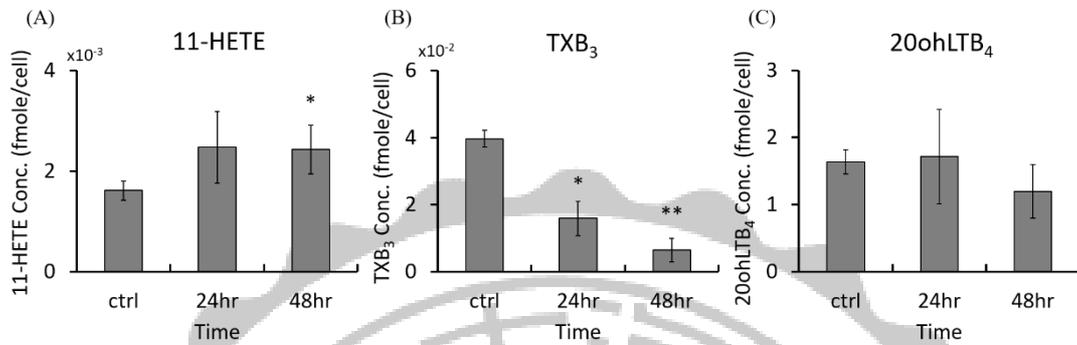


圖二十六、HT-1080 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後類花生酸變化圖

細胞經化療藥物 MTX 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時時間點測定，5-HETE 濃度變化圖 (A)、15-HETrE 濃度變化圖 (B)、13-HDoHE 濃度變化圖 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

分析細胞中 11-HETE 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時與控制組相比則有上升的趨勢，上升約 1.5 倍（圖二十七、A）。TXB<sub>3</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時與控制組相比則有下降的趨勢，下降約 4 倍（圖二十七、B）。LTB<sub>4</sub> 濃度變化，經化療藥物刺激 48 小時相比後並無明顯變化（圖二十七、C）。整體而言，在細胞經藥物刺激過後，活化了發炎反應路徑 LOX 使 LOX 代謝出的類花

生酸有濃度上升的趨勢。TXB<sub>3</sub> 濃度隨著藥物時間刺激，呈現下降的趨勢，意味著抗發炎物質也慢慢變少，使細胞慢慢呈現發炎。



圖二十七、HT-1080 細胞經化療藥物 Methotrexate (MTX) 刺激後類花生酸變化圖。

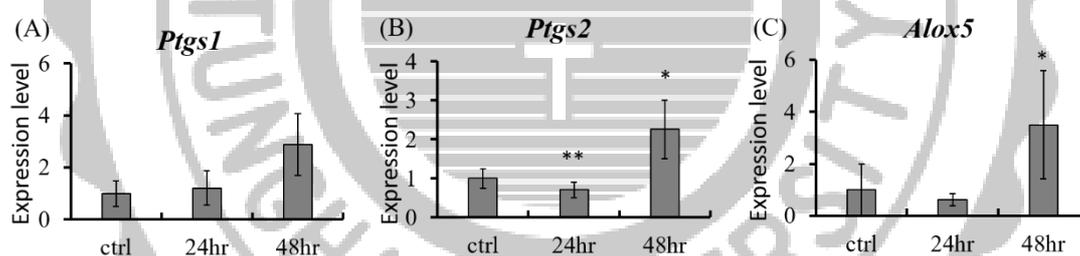
細胞經化療藥物 MTX 刺激後 0 小時、24 小時、48 小時時間點測定，11-HETE 濃度變化圖 (A)、TXB<sub>3</sub> 濃度變化圖 (B)、20ohLTB<sub>4</sub> 濃度變化圖 (C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* ≤ 0.05，\*\* ≤ 0.01，\*\*\* ≤ 0.001)。

#### 4.0 RT-qPCR 分析 HT-1080 添加化療藥物 Methotrexate (MTX) 的 mRNA 表達量

利用 RT-qPCR 分析 HT-1080 細胞與 HT-1080 細胞加入化療藥物 MTX 刺激後相關的基因 mRNA 表現量，實驗所選擇的 mRNA 分為：細胞發炎反應、重塑、合成、水解、細胞凋亡和粒線體融合及分裂，參考基因 (Reference gene) 為 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)。

#### 4.0.1 發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量

*Ptgs1* 主要在調控發炎反應 COX1，*Ptgs1* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後上升為控制組的 3 倍(圖二十八、A)。*Ptgs2* 主要調控發炎反應中 COX2，*Ptgs2* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後上升為控制組的 2 倍(圖二十八、B)。*Alox5* 主要調控發炎反應 LOX5，*Alox5* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後上升為控制組的 4 倍(圖二十八、C)。推測 LOX 在藥物刺激過後被活化。以化療藥物 MMC 刺激細胞後，以 0 小時、24 小時及 48 小時測定，發現當以藥物刺激細胞後，隨著時間增加，發炎反應的相關蛋白 mRNA *Ptgs1*、*Ptgs2* 及 *Alox5* 表現量皆呈現上升的趨勢，間接證實 Eicosanoids 的增加，是因發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量上升造成細胞隨著時間產生發炎物質。

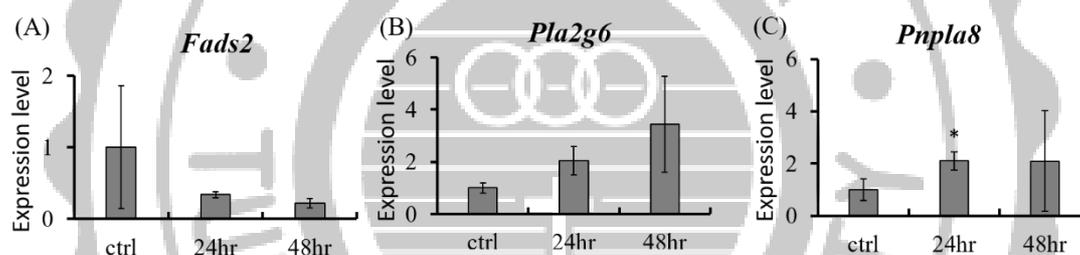


圖二十八、RT-qPCR 相對定量發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MTX 刺激 24 小時、添加化療藥物 MTX 刺激 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Ptgs1* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(A)、*Ptgs2* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(B)、*Alox5* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

#### 4.0.2CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量

*Fads2*、*Pla2g6*、*Pnpla8* 為調控 CL 水解基因，*Fads2* 表達量在控制組誤差值較大，與經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後相比表達量無明顯變化(圖二十九、A)。*Pla2g6* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後表達量誤差值變大，與控制組相比無明顯變化(圖二十九、B)。*Pnpla8* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 24 小時後上升為控制組兩倍，經化療藥物 MTX 刺激 48 小時因誤差值增加與控制組相比無明顯變化(圖二十九、C)。整體而言在水解基因表現量，加入藥物刺激後沒有明顯影響。

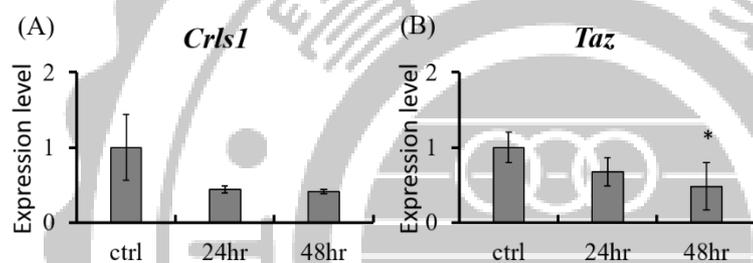


圖二十九、CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MTX 刺激 24 小時、添加化療藥物 MTX 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Fads2* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(A)、*Pla2g6* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(B)、*Pnpla8* 在加入化療藥物 MMC 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(C)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

#### 4.0.3 CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量

*Crls1* 為控制 CL 合成基因，*Crls1* 表達量在控制組誤差值較大，與經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時比較後表達量無明顯變化（圖三十、A）。*Taz* 為控制 CL 重塑基因，*Taz* 表達量在添加化療藥物 48 小時刺激後的表達量下降為控制組的 2 倍（圖三十、B）。添加藥物刺激後，對合成基因並無明顯影響。在重塑部分隨著時間增加，*Taz* 重塑基因表現量有下降的趨勢，意味著添加藥物刺激過後，對於 CL 水解有抑制的效果。



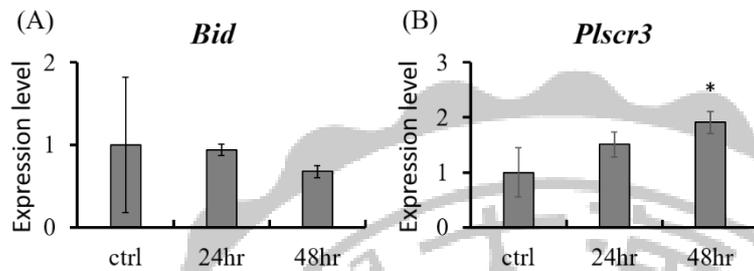
圖三十、CL 重塑、合成相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MTX 刺激 24 小時、添加化療藥物 MTX 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Crls1* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (A)、*Taz* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (B)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

#### 4.0.4 細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量

*Bid*、*Plscr3* 為控制細胞凋亡基因，*Bid* 表達量在經過化療藥物 MMC 刺激 48 小時後與控制組相比無明顯變化（圖三十一、A）。*Plscr3* 表達量在經過化療

藥物 MMC 刺激 48 小時後表達量則有上升為控制組的 1.5 倍 (圖三十一、B)。在凋亡基因表現亮中，在 *Plscr3* 呈現上升的趨勢，推測當使用藥物刺激過後，細胞受到刺激使凋亡基因上升使細胞收到較高的凋亡訊息。

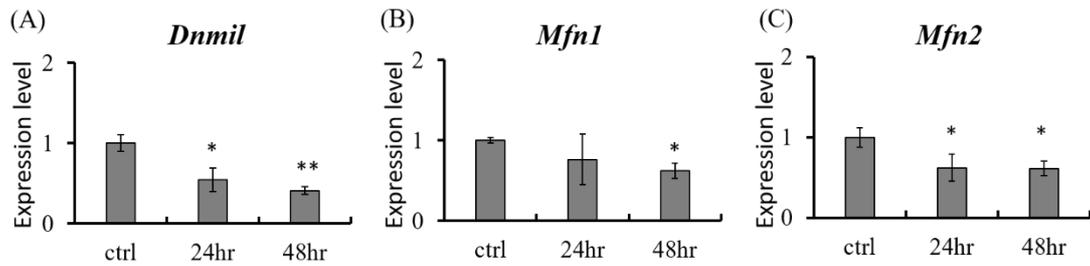


圖三十一、RT-qPCR 相對定量細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MTX 刺激 24 小時、添加化療藥物 MTX 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Bid* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(A)、*Plscr3* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率(B)。(實驗為三重覆，統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

#### 4.0.5 粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量

*Dnm1l*、*Mfn1*、*Mfn2* 為控制粒線體融合及分裂基因，*Dnm1l* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後下降為控制組的 2 倍 (圖三十二、A)。*Mfn1* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後下降為控制組的 1.5 倍 (圖三十二、B)。*Mfn2* 表達量在經過化療藥物 MTX 刺激 48 小時後下降為控制組的 1.5 倍 (圖三十二、C)。整體而言，在粒線體融合及分裂基因表現量皆都呈現下降的趨勢，代表當藥物刺激過後影響了粒線體的融合及分裂，基因表現量下降。



圖三十二、RT-qPCR 相對定量粒線體融合、分裂相關蛋白 mRNA 表達量

由左而右依序為控制組、添加化療藥物 MTX 刺激 24 小時、添加化療藥物 MTX 48 小時，抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA 以 RT-qPCR 分析放大曲線，以 *Gapdh* 為參考基因校正。*Dnm1l* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (A)、*Mfn1* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (B)、*Mfn2* 在加入化療藥物 MTX 24 小時、48 小時與控制組的相對比率 (C)。(統計皆以 T-test 計算，\* $\leq 0.05$ ，\*\* $\leq 0.01$ ，\*\*\* $\leq 0.001$ )。

## 第四章、討論

### 4.1、細胞中心磷脂的累積

先前的實驗當中，使用了化療藥物將細胞停滯在不同的細胞週期，觀察在細胞受到化療藥物的刺激，發現細胞內的心磷脂累積的現象，在 MMC 及 MTX 兩種藥物呈現不同的結果。因此本實驗使用了化療藥物 MMC、MTX 來刺激細胞，並利用共軛焦顯微鏡來觀察細胞中的心磷脂，在結果中表明經過 MMC 48 小時的刺激後，細胞型態已明顯改變，也觀察到有較明顯的螢光訊號產生，藥物刺激時間越長螢光訊號會呈現點狀，證實有較多的心磷脂在細胞核周圍累積。利用 MTX 刺激過後，隨著時間越長，螢光訊號也呈現變多的趨勢並慢慢的在細胞核周圍明顯聚集，卻沒有 MMC 聚集的型態相似。推測與先前實驗中發現心磷脂的碳鏈數的改變有著密切的關係，在 MMC 中，使用 HPLC-Ion Trap-MS 觀察 CL Species 變化，發現在碳數總和較低的心磷脂群落 (C66,C68) 的含量上升，碳數總和較高的心磷脂群落 (C72,C74) 含量下降，在實驗使用 MMC 調控細胞，CL 水解與重塑 mRNA 表現量升高，推測當細胞感受到心磷脂的累積，水解與重塑的基因會升高來水解以及重塑過多的心磷脂，推測碳鏈的長短在這水解與重塑的調控下差異下會改變。在單水解心磷脂的變化較不明顯，推測在水解與重塑的速率相同，造成單水解心磷脂沒有明顯產生。

觀察心磷脂因化療藥物特殊改變間接影響到粒線體，我們偵測粒線體的融合及分裂基因表現量，發現基因表現量都隨著時間增長而上升，在心磷脂短碳鏈增加情況下，推測會促進心磷脂融合以及分裂，促使心磷脂在細胞中大量累積，因此在螢光訊號中會有強烈的點狀訊號。另一種化療藥物 MTX，前實驗中有著特殊的變化，在碳數總和較低的心磷脂群落 (C66,C68) 的含量變少，碳數總和較

高的心磷脂群落 (C72,C74) 變多，因此水解及重塑的基因表現也呈現與添加 MMC 的結果有所差異，MTX 在重塑 mRNA 表達量變少，水解 mRNA 則是沒有明顯變化。推測這特殊的碳鏈變化影響了粒線體的融合及分裂，觀察到粒線體分裂以及融合 mRNA 表達量下降，推測當含有碳鏈數較長心磷脂，融合及分裂反應是降低的。兩種藥物心磷脂累積的情形不同，皆會影響粒線體的動態。

#### 4.2、粒線體活性

在兩種藥物中顯示有心磷脂在粒線體中累積，兩種藥物的聚集型態以及數量並不相同，意味著當細胞停滯在不同時期的心磷脂呈現不一樣的聚集現象，當心磷脂種類不同時，間接會影響粒線體的功能。利用 MMC 刺激後測定粒線體活性，發現當用化療藥物使細胞停滯生長時，粒線體的耗氧率 OCR 值隨著刺激時間增加而上升，顯示當細胞停滯時，粒線體會照常運作因心磷脂累積的情形，影響了粒線體的運作效率。加入 Oligomycin 使電子傳遞鏈進行極限呼吸作用隨著心磷脂累積的狀態，實驗組比起控制組高出了 1.5 倍，推測當心磷脂濃度變高粒線體的極限運作是變強的。意味的當心磷脂濃度上升，活性也會跟著增加。

#### 4.3、類花生酸的影響

細胞培養液經固相萃取後，使用質譜儀偵測類花生酸的濃度變化，來觀察當細胞停滯中類花生酸的代謝相關反應，當細胞停滯在不同時期的代謝產物會有所不同，在偵測的類花生酸種類中主要分為前列腺素 PG、白三烯、血酸素、環氧化物 Lipoxins。在化療藥物 MMC 的刺激下，在發炎反應中 COX 常見的 PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub> 皆呈現倍數的成長。在 LOX 的 5-HETE、LTB<sub>4</sub> 也有呈現上升的趨勢，而抗發炎物質 PGE<sub>3</sub> 呈現下降趨勢，因此在用 MMC 使細胞週期停滯在 M2 時期，控

制發炎因子的 COX、LOX 產物呈現明顯的變化，推測細胞可能因化療藥物使細胞停滯生長會處在慢性發炎的狀態。在化療藥物 MTX 的刺激下，發炎反應 COX 常見的 PGE<sub>2</sub> 呈現倍數降低，PGD<sub>2</sub> 則沒有變化，在 LOX 的 5-HETE 呈現倍數的上升，抗發炎物質 PGE<sub>3</sub>、TXB<sub>3</sub> 則呈現下降約 2 倍，因此當細胞週期停滯在 S 時期時，在類花生酸代謝路徑 LOX 較為明顯，細胞也處於一種發炎狀態下。因此在細胞停滯在不同細胞週期時，所促使的發炎路徑及種類是不同的。使用 RT-PCR 觀察 MMC 在 COX2 以及 LOX 基因表達量皆在藥物刺激過後大量上升 10 倍，在添加 MTX 的細胞中，COX2 以及 LOX 表達量上升約兩倍。代表著在接受化療時的細胞皆呈現在發炎狀態，而停滯在 MS 時期的細胞會呈現高度發炎的情形，細胞停滯在不同時期亦可能會調控發炎路徑，而產生不同的類花生酸。

#### 4.4、結論及衍伸討論

整體而言，當細胞停滯在不同細胞週期，使細胞停止生長，細胞受到藥物刺激，因此細胞會釋出發炎物質，當這些發炎物質的路徑因停滯周期的不同而會有所變動，推測會造成粒線體 CL 碳鏈上的改變，間接影響了粒線體活性。粒線體的運作還是在持續著，造成心磷脂在粒線體中開始累積，影響了心磷脂濃度，推測短碳鏈含量上升能粒線體運作效能增加，促使粒線體融合及分裂。在長碳鏈上含量上升短碳鏈下降狀態下，粒線體可能會趨於穩定不會強行運作，會降低融合及分裂的現象。

因此當在接受化療藥物的病人，可能都處於一種慢性發炎的狀態，才會有口腔潰爛等發炎症狀產生，粒線體一直處在強行運作的狀態可能因此會讓病人處於一種倦怠感。每種化療藥物皆讓細胞停滯在不同細胞週期，使癌細胞呈現停滯狀態，當化療藥物刺激細胞時，造成了粒線體的變異，使得 CL 累積情形較劇烈的

活性增加，會使得停滯在 S 時期的粒線體動態較緩，相反的在 M2 時期的粒線體動態會呈現上升的趨勢，可能促使發炎代謝路徑上的不同，因此如果在接受化療的同時可以辨別發炎路徑加以抑制並調控心磷脂的碳鏈長，或許在化療期間可以改善病人炎症發生率以及控制心磷脂讓癌細胞不會快速生長及擴散。



## 參考文獻

1. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**,*144* ( 5 ) , 646-74.
2. Balkwill, F.; Mantovani, A., Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther* **2010**,*87* ( 4 ) , 401-6.
3. Vakkila, J.; Lotze, M. T., Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* **2004**,*4* ( 8 ) , 641-8.
4. Niho, N.; Takahashi, M.; Kitamura, T.; Shoji, Y.; Itoh, M.; Noda, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K., Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res* **2003**,*63* ( 18 ) , 6090-5.
5. Harris, R. E., Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* **2009**,*17* ( 2 ) , 55-67.
6. Wang, D.; Dubois, R. N., Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* **2010**,*10* ( 3 ) , 181-93.
7. Ariel, A.; Serhan, C. N., Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* **2007**,*28* ( 4 ) , 176-83.
8. Charlier, C.; Michaux, C., Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* **2003**,*38* ( 7-8 ) , 645-59.
9. Goldyne, M. E.; Stobo, J. D., Human monocytes synthesize eicosanoids from T lymphocyte-derived arachidonic acid. *Prostaglandins* **1982**,*24* ( 5 ) , 623-30.
10. Hallinan, E. A.; Hagen, T. J.; Tsymbalov, S.; Husa, R. K.; Lee, A. C.; Stapelfeld, A.; Savage, M. A., Aminoacetyl moiety as a potential surrogate for diacylhydrazine group of SC-51089, a potent PGE2 antagonist, and its analogs. *J Med Chem* **1996**,*39* ( 2 ) , 609-13.
11. Bergmann, C.; Strauss, L.; Zeidler, R.; Lang, S.; Whiteside, T. L., Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **2007**,*67* ( 18 ) , 8865-73.
12. Greenhough, A.; Smartt, H. J.; Moore, A. E.; Roberts, H. R.; Williams, A. C.; Paraskeva, C.; Kaidi, A., The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of

cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* **2009**,*30* ( 3 ) , 377-86.

13. Okwu, A. K.; Mais, D. E.; Halushka, P. V., Agonist-induced phosphorylation of human platelet TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> receptors. *Biochim Biophys Acta* **1994**,*1221* ( 1 ) , 83-8.

14. Yokomizo, T.; Kato, K.; Terawaki, K.; Izumi, T.; Shimizu, T., A second leukotriene B ( 4 ) receptor, BLT<sub>2</sub>. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* **2000**,*192* ( 3 ) , 421-32.

15. Tager, A. M.; Bromley, S. K.; Medoff, B. D.; Islam, S. A.; Bercury, S. D.; Friedrich, E. B.; Carafone, A. D.; Gerszten, R. E.; Luster, A. D., Leukotriene B<sub>4</sub> receptor BLT<sub>1</sub> mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol* **2003**,*4* ( 10 ) , 982-90.

16. Janelsins, M. C.; Tejani, M. A.; Kamen, C.; Peoples, A. R.; Mustian, K. M.; Morrow, G. R., Current pharmacotherapy for chemotherapy-induced nausea and vomiting in cancer patients. *Expert Opin Pharmacother* **2013**,*14* ( 6 ) , 757-66.

17. Hesketh, P. J., Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med* **2008**,*358* ( 23 ) , 2482-94.

18. Wan, M.; Hua, X.; Su, J.; Thiagarajan, D.; Frostegard, A. G.; Haeggstrom, J. Z.; Frostegard, J., Oxidized but not native cardiolipin has pro-inflammatory effects, which are inhibited by Annexin A5. *Atherosclerosis* **2014**,*235* ( 2 ) , 592-8.

19. Petru, E.; Sevin, B. U.; Haas, J.; Ramos, R.; Perras, J., A correlation of cell cycle perturbations with chemosensitivity in human ovarian cancer cells exposed to cytotoxic drugs in vitro. *Gynecol Oncol* **1995**,*58* ( 1 ) , 48-57.

20. Verweij, J.; Sparreboom, A.; Nooter, K., Mitomycins. *Cancer Chemother Biol Response Modif* **1999**,*18*, 46-58.

21. Kang, S. G.; Chung, H.; Yoo, Y. D.; Lee, J. G.; Choi, Y. I.; Yu, Y. S., Mechanism of growth inhibitory effect of Mitomycin-C on cultured human retinal pigment epithelial cells: apoptosis and cell cycle arrest. *Curr Eye Res* **2001**,*22* ( 3 ) , 174-81.

22. Genestier, L.; Paillot, R.; Quemeneur, L.; Izeradjene, K.; Revillard, J. P., Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* **2000**,*47*( 2-3 ) , 247-57.

23. Richardson, V. B.; Littlefield, L. G.; Sayer, A. M.; Peterson, P. T., Cell-cycle-stage specificity of the methotrexate block as resolved by X-ray-induced chromosome damage. *Cytogenet Cell Genet* **1994**,*66* ( 2 ) , 126-8.

24. Bertino, J. R.; Goker, E.; Gorlick, R.; Li, W. W.; Banerjee, D., Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* **1996**,*1* ( 4 ) , 223-226.

25. Andrzejewski, S.; Gravel, S. P.; Pollak, M.; St-Pierre, J., Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab* **2014**,*2*, 12.
26. Munro, A.; Brown, M.; Niblock, P.; Steele, R.; Carey, F., Do Multidisciplinary Team (MDT) processes influence survival in patients with colorectal cancer? A population-based experience. *BMC Cancer* **2015**,*15*, 686.
27. Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J. W.; Shimoda, L.; Dang, C. V.; Semenza, G. L., HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **2007**,*129* ( 1 ) , 111-22.
28. Chen, Z.; Lu, W.; Garcia-Prieto, C.; Huang, P., The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* **2007**,*39* ( 3 ) , 267-74.
29. Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E., The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **1927**,*8* ( 6 ) , 519-30.
30. Zu, X. L.; Guppy, M., Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**,*313* ( 3 ) , 459-65.
31. Moreno-Sanchez, R.; Rodriguez-Enriquez, S.; Marin-Hernandez, A.; Saavedra, E., Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* **2007**,*274* ( 6 ) , 1393-418.
32. Petros, J. A.; Baumann, A. K.; Ruiz-Pesini, E.; Amin, M. B.; Sun, C. Q.; Hall, J.; Lim, S.; Issa, M. M.; Flanders, W. D.; Hosseini, S. H.; Marshall, F. F.; Wallace, D. C., mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**,*102* ( 3 ) , 719-24.
33. Ishikawa, K.; Takenaga, K.; Akimoto, M.; Koshikawa, N.; Yamaguchi, A.; Imanishi, H.; Nakada, K.; Honma, Y.; Hayashi, J., ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* **2008**,*320* ( 5876 ) , 661-4.
34. Zini, R.; Berdeaux, A.; Morin, D., The differential effects of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical on cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation. *Free Radic Res* **2007**,*41* ( 10 ) , 1159-66.
35. Xiong, W.; Jiao, Y.; Huang, W.; Ma, M.; Yu, M.; Cui, Q.; Tan, D., Regulation of the cell cycle via mitochondrial gene expression and energy metabolism in HeLa cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2012**,*44* ( 4 ) , 347-58.
36. Lee, S.; Kim, S.; Sun, X.; Lee, J. H.; Cho, H., Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**,*357* ( 1 ) , 111-7.
37. Hirschberg, C. B.; Kennedy, E. P., Mechanism of the enzymatic synthesis of cardiolipin in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**,*69* ( 3 ) , 648-51.

38. Pangborn, M. C., ISOLATION AND PURIFICATION OF A SEROLOGICALLY ACTIVE PHOSPHOLIPID FROM BEEF HEART. *Journal of Biological Chemistry* **1942**,143 ( 1 ) , 247-256.
39. Robinson, N. C., Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* **1993**,25 ( 2 ) , 153-63.
40. Cristea, I. M.; Degli Esposti, M., Membrane lipids and cell death: an overview. *Chem Phys Lipids* **2004**,129 ( 2 ) , 133-60.

