

中文摘要

魚針草內酯(ovatodiolide)是由傳統中草藥金劍草(*Anisomeles indica*)分離出具有生物活性成分的雙萜類化合物，並具有抗菌和抗發炎等特性，然而對於其在抗癌研究及分子機轉的報導有限，於是本文探討魚針草內酯在人肺癌細胞株 A549 和 H1299 作用之相關研究。結果顯示，魚針草內酯造成肺癌細胞之細胞週期停滯於 G2/M 期，與 Cyclin B1 和 CDC25C 蛋白表現量降低以及 p21^{WAF1/CIP1} 表達的增加有關；並經由細胞結合 Annexin V 增強和 TUNEL 陽性反應增加之結果，證實了魚針草內酯誘導細胞凋亡。此外，魚針草內酯引發的凋亡經由內源性和外源性凋亡途徑，增加的促凋亡蛋白 PUMA、Bax 和 DR5 等現象、減少抑凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 表現、並激活創蛋白酶-8，創蛋白酶-9 和創蛋白酶-3，而創蛋白酶抑制劑可有效減弱魚針草內酯誘導的細胞凋亡。此外，魚針草內酯還刺激了細胞內活性氧分子(ROS)產生和誘導的 DNA 損傷反應信號通路，包括 ATM/ATR，CHK1 和 CHK2 的磷酸化活化作用。咖啡因(Caffeine)是一種 ATM/ATR 抑制劑，可部分回復了魚針草內酯誘導產生的細胞週期停滯和細胞凋亡，而不是影響活性氧分子的產生。然而，抗氧化劑 N-乙酰基半胱氨酸(N-acetyl-cysteine)幾乎完全阻斷了魚針草內酯誘導的分子物質，包括 ATM，ATR，CHK1，CHK2 和 CDC25C 的活化；p21^{WAF1/CIP1}、Bax 和 DR5 的表達以及 G2/M 期停滯和細胞凋亡等現象。這些實驗結果顯示，魚針草內酯能刺激 A549 和 H1299 細胞內活性氧分子的產生，引起氧化壓力(oxidative stress)和 DNA 損傷、隨後引發 DNA 損傷信號途徑，最終導致 G2/M 期細胞週期阻滯，並引發人肺癌細胞凋亡。

關鍵詞：魚針草內酯、活性氧分子、細胞週期停滯、細胞凋亡

Abstract

Ovatodiolide, a kind of macrocyclic diterpenoid, is a bioactive ingredient isolated from the traditional Chinese medicinal herb *Anisomeles indica*, which possesses anti-bacterial and anti-inflammatory properties. However, the anti-cancer activity and its molecular mechanisms of Ovatodiolide have been limitedly reported. Here, we showed that ovatodiolide inhibited the growth and retarded the cell cycle progression at the G2/M phase in human lung cancer A549 and H1299 cells. The ovatodiolide-mediated G2/M phase arrest was associated with the decrease of Cyclin B1 and CDC25C levels, as well as increase of p21^{WAF1/CIP1} expression. Besides, ovatodiolide-induced apoptosis was confirmed by enhancing annexin V binding and increasing TUNEL positive cells. Moreover, ovatodiolide-triggered apoptosis was through both intrinsic and extrinsic pathways characterized by the elevating PUMA, Bax, and DR5 proteins, decreasing Bcl-2 and Mcl-1, and activating caspase-8, caspase-9, and caspase-3. Caspase inhibitors could effectively attenuate ovatodiolide-triggered apoptosis. Furthermore, ovatodiolide stimulated intracellular reactive oxygen species (ROS) production and induced DNA damage response signaling pathway, including ATM/ATR, CHK1, and CHK2 phosphorylated activation. Caffeine, an ATM/ATR inhibitor, partly rescued ovatodiolide-mediated cell cycle arrest and apoptosis, but not ROS generation. Nevertheless, antioxidant N-acetyl-cysteine almost completely blocked ovatodiolide-mediated molecular events, including ATM, ATR, CHK1, CHK2 and CDC25C activation, and p21^{WAF1/CIP1}, Bax and DR5 expression, as well as the G2/M arrest and apoptosis. These

observations suggest that ovatodiolide stimulates intracellular ROS generation, causes oxidative stress and DNA damage; subsequently, provokes DNA damage signaling pathways, eventually leads to block cell cycle at the G2/M phase and trigger apoptosis in human lung cancer A549 and H1299 cells.

Key words: Ovatodiolide, reactive oxygen species, ATM, ATR, cell cycle arrest, apoptosis

第一章、前言

癌症是世界主要的公共衛生問題。其中，肺癌在女性和男性中的死亡率高於任何其他癌症，2012 年全球約有 180 萬名惡性腫瘤患者，並導致 160 萬人死亡(Brambilla E, 2014)。據行政院衛生福利部之統計，自民國 85 年到 105 年，癌症一直高居國人死亡率之首位。105 年國人癌症死亡人數為 4 萬 7,760 人，占總死亡數之 27.7%，較 104 年增加 2.0%，依死亡率排序，近年來肺癌已經成為十大癌症死因之首（衛生福利部，105 年國人死因統計結果）。肺癌在病理上分為兩大類，即小細胞癌（Small Cell Lung Cancers, SCLSs）與非小細胞癌（Non-Small Cell Lung Cancers, NSCLCs），大約有 75% 以上的患者屬於非小細胞癌，非小細胞肺癌又可分為肺腺癌（adenocarcinoma lung cancer）、鱗狀細胞肺癌（squamous cell lung cancer）和大細胞肺癌（large cell lung cancer），其中肺腺癌為肺癌患者中最常見，無吸煙者常為罹患肺腺癌。到目前為止，臨床上用來治療肺癌的方式有：外科手術、化學療法、放射線療法及免疫療法等等。但是這些治療方法除了有使用上的限制外，還會造成許多嚴重的副作用，使得病患在治療上之接受度及治療效果大受影響。因此，開發有效且毒性小的治療肺癌新藥實是當務之急。幾千年來，中草藥一直用於治療各種疾病(Li and Brown, 2009)。過去幾十年來，

許多學者致力尋找天然物中有效的抗癌成分，並深入探討其抑制癌症的分子機轉，期能找到有效、穩定、無不良副作用之癌症治療藥劑。*Anisomeles indica* (L.) Kuntze (Labiatae)，通常被稱為“金劍草或魚針草”，傳統上被用作抗發炎劑(Rao et al., 2009)，它也被證明具有抗胃腸道疾病的活性(Liao et al., 2012)，並用於免疫系統缺陷以及肝臟疾病(Huang et al., 2003)。以前曾報導過從金劍草植株中分離出的二萜類化合物魚針草內酯(ovatodiolide)具有生物活性，包括抗菌活性(Rao et al., 2012)、抗 HIV 活性(Shahidul Alam et al., 2000)、誘導人口腔鱗狀細胞癌細胞的細胞週期停滯和凋亡(Hou et al., 2009)、抑制人乳腺癌細胞中的轉移作用(Lin et al., 2011)和抑制腫瘤發生並克服腎細胞癌的耐藥性(Ho et al., 2013)。然而，魚針草內酯的抗腫瘤作用及其分子機轉尚未被廣泛探討。在這項研究中，我們檢測了魚針草內酯對肺癌細胞的抗腫瘤特性。我們的研究結果顯示，魚針草內酯刺激細胞內活性氧分子的產生，引起 DNA 損傷，激活 ATM/ATR 和 CHK1/2 信號傳導路徑，從而誘導 A549 和 H1299 細胞發生細胞週期 G2/M 期停滯和細胞凋亡。本論文的研究是針對魚針草內酯在細胞內造成分子層次之作用，探討魚針草內酯作用在人類肺腺癌細胞之調控機轉；進一步藉此研究結果深入瞭解魚針草內酯抗癌機制，以期能對魚針草內酯之抗癌潛力有更深刻之認知。

第二章、緒論

第一節 肺癌

根據世界衛生組織的統計，最近二十年來全世界的癌症死亡率增加 19%，其中以肺癌死亡率增加最多，在男性增加 76%，女性增加 135%。行政院衛生福利部統計資料顯示，肺癌已經佔據惡性腫瘤死因的第一位多年，105 年國人癌症死亡人數為 4 萬 7,760 人，占總死亡數之 27.7%，較上 104 年增加 2.0%；平均每日死亡人數 130 人；其中男性為 2 萬 9,215 人，女性為 1 萬 8,545 人；因肺癌死亡率：每十萬人口 39.9 人。於正常情況下，肺臟的功能是吸進氧氣以維持細胞的生存及正常的功能，並且將細胞代謝後的二氧化碳廢氣排出體外，一旦肺細胞因為受到外界刺激而不再正常運作時就可能導致癌症的生成。

一、肺癌形成的原因

肺癌的成因可能不是單一因素，往往是由許多因素造成的，其中與下列幾項因素的關係較為密切。

(一) 吸煙：目前已知最重要的致癌原因，許多研究資料顯示吸煙

與肺癌有密切關係，特別是鱗狀上皮細胞和未分化的小細胞癌。

紙煙中含有安息香比林 (benzopyrene) 等多致癌物質，有吸煙

習慣發病率比不吸煙者高十倍，吸煙量大者發病率更高，比不吸煙者高二十倍。長期吸煙會引致支氣管黏膜上皮細胞增生，誘發鱗狀上皮癌或未分化的小細胞癌。無吸煙嗜好者，雖然也可患肺癌，但腺癌較為常見，與吸煙者不同。

(二) 二手煙：根據研究顯示，抽煙者的妻子死於肺癌的機率為非抽煙者妻子的 2~3 倍，而吸入二手煙者其肺癌罹患率要比沒吸二手煙者高出 30%。

(三) 空氣汙染：工業發達國家肺癌的發病率高，另外城市亦比農村高，依據衛生部統計 2004 年至 2005 年城市肺癌死亡率為 48.25/10 萬人，農村肺癌死亡率為 19.3/10 萬人，相差 2.5 倍，這可能是因為工業和交通發達地區，石油、煤和內燃機等燃燒後，和瀝青公路塵埃含有致癌物質、汙染大氣層。

(四) 致癌因素：工作時如有與石綿、金屬業（例如：砷、鉻、鉍）、礦冶業、藥物、油漆製造業、合成橡膠業、及無機顏料業、放射性物質如鈾、氫、鐳等，均容易誘發肺癌的產生。

(五) 廚房油煙：女性認為導致肺癌的前三個原因是抽菸、煮飯的油煙、二手菸，以及烹調油的類型、有無抽油煙裝置、廚房通氣以及烹飪的時間等因素有關

(六) 肺部慢性病變：慢性支氣管炎、肺結核、彌漫性肺間質纖維化

患者，其肺癌發生率較正常人為高。此外，病毒感染、真菌毒素、維生素 A 缺乏、機體免疫狀態低下、內分泌失調及家族遺傳等因素，對肺癌的發生可能起綜合性致癌作用。

- (七) 遺傳因素：許多研究證實遺傳因素會導致家族中罹患肺癌的可能性提高，長庚醫院的研究發現，若父母或兄弟姊妹有一人得到肺癌，則其罹患肺癌的機會比一般人高出 2 倍，而女性罹患肺癌的機會又為男性的 2.6 倍；家族中若有超過二人以上得到肺癌，則其他家族成員得到肺癌的機會甚至提高到 3 倍之多。更令人驚訝的是，假如家族成員在五十歲以前罹患肺癌，則其他族人得到肺癌的機會將增加到 4.7 倍。

二、肺癌細胞的種類

病理上肺癌分為兩大類，即小細胞癌（Small Cell Lung Cancers，SCLSs）與非小細胞癌（Non-Small Cell Lung Cancers，NSCLCs），其他少見的肺癌，則有腺鱗癌、支氣管類癌、及黏液上皮樣癌。

- (一) 小細胞癌：多發生於男性，且與抽菸關係密切，約佔全部肺癌的 25% 左右。小細胞肺癌生長迅速，且容易擴散到其它器官。小細胞肺癌對於化學治療的感受性良好，所以都以化學治療為主。

- (二) 非小細胞癌：大約有 75% 以上的患者屬於非小細胞癌，非小細

胞肺癌的生長較慢，其擴散轉移的發生也較慢。又可依發生多寡依序分成 1. 肺腺癌 (adenocarcinoma lung cancer)，佔 30% 為目前肺癌數量最多的一種類型、而且女性較多，常在轉移後才出現臨床症狀，無吸菸者所罹患之肺癌常為腺癌。2. 鱗狀細胞肺癌 (squamous cell lung cancer)，佔 25%，又稱表皮樣癌，常見於男性吸菸者，發病初期多為局部向外延伸的轉移，後期則由血液擴散。3. 大細胞肺癌 (large cell lung cancer)，佔 15%，成長速度較緩慢，會經由血液及淋巴擴散。

三、治療的方法 (Bunn and Carney, 1997)

肺癌患者早期病灶較小，無顯著徵狀不易察覺；但大多數的人在明確診斷時癌腫病灶已較大，通常會很快的擴散到肺門(hilum)、縱膈腔的淋巴結或胸腔附近的其它組織，也容易很快的擴散轉移到身體的其它器官，例如腦部、肝臟或骨頭、骨髓等。

- (一) 外科手術：適用於初期局部未遠處轉移的非小細胞肺癌患者。
- (二) 放射線治療：適用於切除手術後患者之輔助治療，或為後期患者緩解治療之用。未分化小細胞癌對放射治療最為敏感，次之為鱗狀上皮細胞癌，腺癌的敏感度最低。

(三) 化學治療：對小細胞癌治療之效果顯著。而在非小細胞癌方面，一般單獨使用或與放射線治療合用，多用於不能接受手術切除之晚期肺癌(III B)，也用於肺癌手術切除前後(III A)或開刀發現無法完全切除乾淨之輔助療法。目前常用於肺癌之化療藥物包括: gemcitabine、doxorubicin、cisplatin、etoposide 及 vinblastine 等等。但是這些抗癌藥物不僅對癌細胞具毒殺之效果，亦對正常細胞亦有嚴重毒性。常見的副作用：對於一些生長較快速的正常細胞，例如：骨髓細胞 (bone marrow cells)、腸道上皮細胞 (intestinal epithelial cell) 或頭髮毛囊細胞有明顯生長抑制作用，造成消化道反應 (如：噁心、嘔吐、腹脹、腹瀉、食欲下降)、口腔疼痛或潰瘍、白血球下降，肝功能損害、脫髮、疲倦等等。

(四) 標靶治療：是目前癌症治療最新的突破，在正常人的體內腫瘤基因是被控制的，但在癌症患者，癌組織的腫瘤基因是被活化而無法控制的，目前最主要的腫瘤基因分子有血管內皮生長因子(簡稱 VEGF)及細胞上皮生長因子受體(簡稱 EGFR)，標靶治療就是抑制這些腫瘤基因的藥物。目前發展出肺癌標靶藥物有愛瑞莎(Iressa)、得舒緩(Tarceva)。肺癌標靶藥物具有高度的特異性，因此較一般化療要減少很多的副作用，但缺

點在於患者必須要帶有表皮生長因子接受器的突變點才能使標靶藥物作用，並非每一個患者都有效，因此在確認使用標靶藥物前，可先進行基因檢測確認是否開始使用。

(五) 其他：目前一般所知其他作為輔助治療方式有鐳射治療、免疫療法、基因療法。目前上述的治療法療法,尚未有定論仍在試驗階段。另外一方面，也可給予止痛劑和鎮靜劑控制疼痛，用支氣管擴張劑以用來緩解呼吸困難的症狀。

第二節 細胞週期 (Cell cycle) 調控細胞增生之影響

一、細胞週期

所謂細胞週期是指一個細胞經由增殖並分裂成兩個細胞所經歷的整個過程。在這個過程中，細胞遺傳物質複製並加倍，且在分裂結束時平均分配到兩個子細胞中去。細胞週期又可以分為間期 (interphase) 和有絲分裂期 (M phase)。間期又分為三期 G_1 、S、 G_2 phase，只有在完成前期所有的準備工作後，細胞分裂才可以開始，並且所有前期準備工作也只有嚴格按部就班的情況下才可以完成的(Schafer, 1998)。

二、細胞週期之調控分子

細胞週期的進行主要是受到 cyclin 與 Cdk (cyclin-dependent kinases) 兩大家族所調控，其中的 cyclin 是當作一個調節的分子，而 Cdk 是屬於 serine/threonine 蛋白激酶，單獨存在時並無磷酸化其下游分子的能力，必須當 Cdk 與 cyclin 結合形成複合體時，Cdk 才會具有蛋白質激酶的活性，即可磷酸化下游分子；在細胞週期各個時期中，特定的 cyclin 結合並活化不同 Cdk。Cdk4 和 Cdk6 二者與特定 D-cyclin 結合，活化於 G₁ 的早期並去調控 RB (retinoblastoma protein) 蛋白的活性(Draetta, 1994)。Cdk2/cyclin E 複合物的活性決定細胞是否能由 G₁ 期進入 S 期(Sherr, 1993)。Cdk2/cyclin A 複合物調控著 S 時期的進行，Cdk1/cyclin B 複合物調控著 G₂/M 期的轉換，以及 M 期的進行過程(Hunter and Pines, 1994)。

cyclin D 以及 E，主要存在於 G₁ 時期，並在 G₁-S 的過渡期間被分解(Tyson et al., 1996)，如果 cyclin E 大量表現，cyclin E 把 Cdk2 都抓住，使得細胞週期無法順利進入到 S 期(Fang et al., 1996)。而 cyclin A 與 B 被稱為 mitotic cyclin，穩定的存在於 interphase，但在 mitosis 時會迅速分解(King et al., 1994)，如果 cyclin B 在進入 mitosis 的晚期時，若沒有被 anaphase-promoting complex (APC) ubiquitylation 分解，則會使 mitosis 停止於 anaphase。細胞在 G₀/G₁ 時期，Cdk4、6 會和 cyclin D 家族結合；而 Cdk2 也會與 cyclin D 家

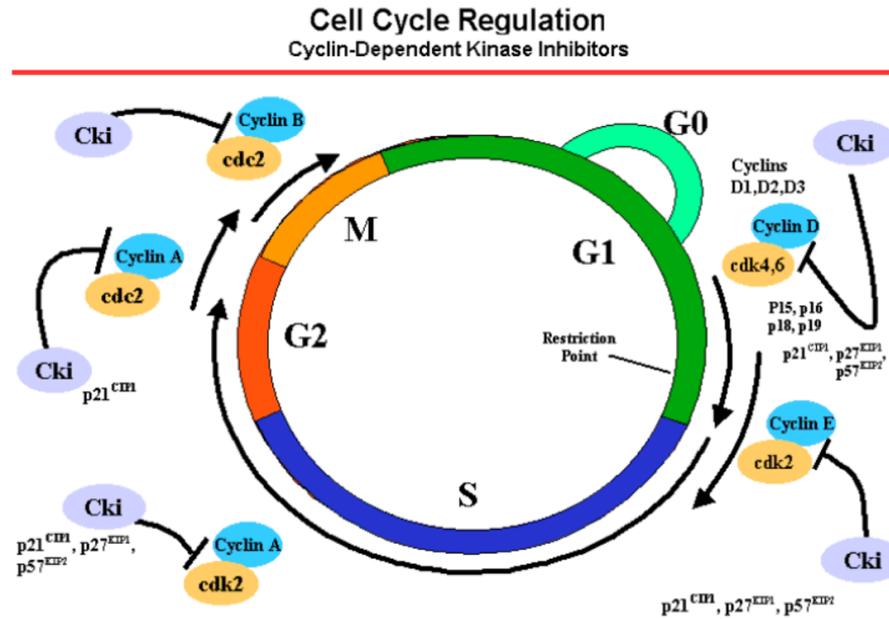
族結合，但主要還是在 G_1 及 G_1 -S 過渡期與 cyclin A 及 E 結合 (Schafer, 1998)。

在文獻中指出，Cdks 與 cyclin 結合在一起並不能代表一定就有活性，其中還會受到一些分子的調控(Booher et al., 1997; Fattaey and Booher, 1997)。當 Cdks 某些位置上被加上磷酸根時，有可能會使其失活性，例如在 Tyr15 的位置被 Wee1 kinase 磷酸化時，就會使 Cdks 失活性，相反的，在相同位置 Cdc25 phosphatase 解磷酸化時，會使得 Cdks 又恢復活性；另外，在 Thr14 如被 Myt1 加上磷酸根，同樣會使 Cdks 失活性，而在 Thr160 位置由 CAK(Cyclin H/Cdk7 complex)加上磷酸根的話，可使得 Cdks 為活性型態。因此，當 Cdks 上的 Thr14 和 Tyr15 其中一者或者是兩者均被加上磷酸根時，Cdks 活性是受到抑制的，而 Thr160 單獨被磷酸化，Cdks 才具有活性(Ohi and Gould, 1999)。

細胞週期中，除了上述 cyclin 與 cyclin-dependent kinases 的正向調控因子外，另有擔任著負向調控的角色，稱之為 cyclin-dependent kinases inhibitors(CdkI) (Brooks et al., 1998; Pines, 1997; Reed et al., 1994)。CdkI 主要可分為兩大家族，一為 INK4 家族，另一為 KIP/CIP 家族(Driscoll et al., 1974)。在 INK4 家族中，主要成員有 $p15^{INK4B}$ ， $p16^{INK4A}$ ， $p18^{INK4C}$ 以及 $p19^{INK4D}$ ，INK4 家族則對於 G_1 期的 Cdk4 與

Cdk6 具有選擇性的抑制作用，會與 cyclin D 競爭 Cdk4 跟 Cdk6 的結合區域，使 cyclin D 無法與 Cdk4 跟 Cdk6 形成有活性的 complex，而使得的細胞週期停滯於 G₁ 早至中期(Schafer, 1998),(McConnell et al., 1999)。因此，CdkIs 可以抑制細胞週期的前進，阻止細胞不當的增生，所以在一些癌細胞上都可以發現它們有缺失，例如 p16^{INK4A} 和 p15^{INK4B} 的基因位於 chromosome 9p21,在許多癌細胞中發現基因有缺失或甚至被刪除 (Hannon and Beach, 1994; Liew et al., 1999)。

另一家族為 KIP/CIP 家族，包括了 p21^{CIP1/WAF1/sdi1}，p27^{KIP1} 以及 p57^{KIP2}。KIP/CIP 家族所影響的層級較 INK4 家族為廣，p57^{KIP2} 主要是跟細胞的分化比較相關，而 p21^{CIP1/WAF1/sdi1} 與 p27^{KIP1} 對於所有的 cyclin-Cdk complexes 均有抑制作用(Xiong et al., 1993),(Brooks et al., 1998; Pines, 1997; Reed et al., 1994)。它們會形成 cyclin-Cdk-CdkI 型式的三元體，藉由遮蔽掉 Cdks 的 catalytic site，使不能與下游分子反應，進而抑制了細胞週期的進行(Russo et al., 1996)。



附圖 1. The mammalian cell cycle (Zafonte et al., 2000)

p53 是一抑癌基因 (tumor suppressor gene) 也為一轉錄因子，在正常情形下，p53 會受到它的負調控分子 MDM2 (Murine double minute 2)，結合到 p53 的 transactivation domain，使 p53 無法與 p300/CBP 等共同轉錄活化子 (transcriptional coactivator) 結合，同時 p53 也會活化 MDM2 基因的表現，形成一個負迴饋 (feedback) 的路徑。MDM2 會與 p53 結合，造成 p53 進行 ubiquitin-dependent degradation，使正常細胞中，p53 維持較低的濃度(Cho et al., 1994; Kastan et al., 1995)。

p53 在 N 與 C 端具有許多可磷酸化的位置，這些位置是許多 kinase 的目標所在。在 N 端 transactivation domain 的磷酸化與 p53 的穩定性有關，當細胞遭受 DNA 傷害時，ATM (The ataxia telangiectasia-mutated kinase) 或 ATR (ATM- and Rad-related kinase) 可以磷酸化

p53 的 Serine 15 與 37，ATM 同時可以活化 Chk2 (checkpoint kinases 2)，Chk2 可直接對 MDM2 binding domain 進行磷酸化，降低 MDM2 與 P53 結合能力，增加 p53 穩定度。在 C 端的磷酸化雖然不參與穩定 p53，但與 p53 的活化有關。p300/CBP 是 p53 的共同活化子，可以藉由與 p53 之 N 端結合，並且 acetylating lysine 382，增加 p53 活化基因表現的能力(Cho et al., 1994)。

當細胞一些外來的刺激如：DNA 受到傷害 (DNA damage)、缺氧 (hypoxia) 或是致癌因子 (oncogene) 活化及生長因子突然缺乏 (Growth factor withdrawal) 的形況下，就會誘使 p53 的活化(Levine, 1997)。p53 參與了包括細胞 DNA 的修復、細胞週期的停止與細胞凋亡 (apoptosis) 等的生物反應，我們所熟知，p53 造成細胞週期停滯可能是經由去調控下游分子 CdkIs 中的 p21^{CIPI/WAF1/sdi1} 以及去調控 DNA 修復有關細胞的 GADD45 (Growth arrest and DNA damage-45) (May and May, 1999; Prives and Hall, 1999; Smith et al., 1994)。此外，p53 也會去調控細胞凋亡相關的分子，例如 Bax、NOXA、PUMA 和 Fas (Han et al., 1996; Ryan et al., 2001)。

第三節 細胞凋亡 (Apoptosis)

在正常的狀況下，生物體內細胞的增殖 (proliferation) 及死亡維

持著一定的平衡。生理性的細胞死亡是細胞經由程序性細胞死亡 (programmed cell death), 稱之細胞凋亡。當正常的細胞受到傷害時, 也可以利用細胞凋亡的機制, 去除受傷嚴重的細胞, 以便於新的細胞增生, 維持生物體內的恆定。因細胞 DNA 受傷而發生基因突變時, 也會自動引發細胞凋亡的機制使突變的細胞死亡, 避免突變的遺傳 (Reed, 1999), 因此細胞凋亡在生物體中扮演著一個非常重要的角色 (Ishizaki, 1998; Lockshin and Beaulaton, 1974)。

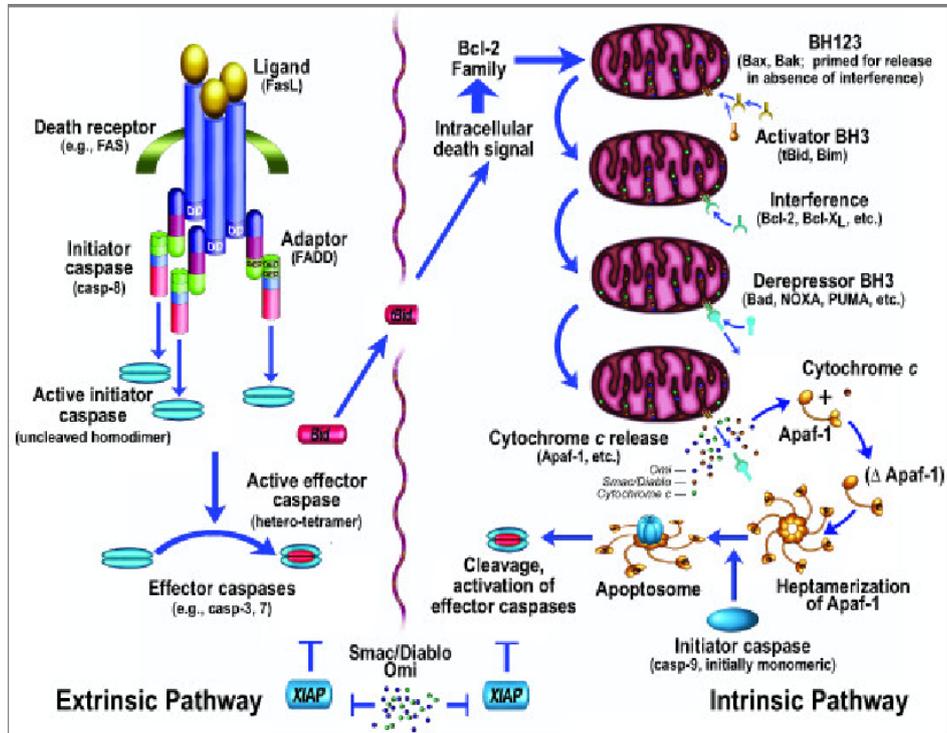
許多疾病引起原因歸咎於生物體內的細胞不正常進行凋亡, 例如自體免疫疾病。正常生理情況下, 免疫系統有能力清除會對自體蛋白有功及能力的 T 細胞, 若體內無法以凋亡方式移除對抗自體蛋白的免疫細胞, 就容易發生自體免疫疾病 (Korsmeyer, 1992)。相反的, 癌症則是細胞本身不正常的增殖所造成的。因為細胞受到外界刺激例如: UV 照射細胞造成 DNA 受到傷害, 容易造成正常細胞的基因突變, 使得細胞得以逃脫掉正常的生理性管控, 因而讓細胞本身不正常的增殖 (Reed, 1999), 細胞不斷分裂增殖, 甚至侵犯了一些能執行正常生理功能的細胞, 造成對人體更進一步的傷害, 進而影響了生命之延續。所以, 現今臨床上所使用許多抗癌藥物都針對抑制癌細胞增殖, 進而使癌細胞走向細胞凋亡。

不同於生理性細胞死亡, 另外還有一種病理性的細胞死亡稱之為

壞死 (necrosis)。細胞凋亡與細胞壞死不論在型態上、生化上及分子層面上皆有很大的不同，細胞壞死是當細胞受到傷害而產生的死亡，細胞會快速的脹破 (swell) 及溶解 (lysis)，引起周圍組織的發炎，會造成生物體莫大的傷害。而細胞凋亡則會造成細胞膜皺縮 (shrinkage) 但粒線體及胞膜皆保持完整、細胞膜產生發泡 (membrane blebbing)、細胞核質濃縮 (chromatin condensation)、DNA 斷片 (DNA fragmentation) 及凋亡小體 (apoptotic bodies)，且快速由周圍鄰近細胞進行吞噬作用 (phagocytosis) 而清除，因此並不會引起免疫發炎反應 (Kerr et al., 1972; Thompson, 1995)。

當細胞接受不同刺激後引起細胞凋亡的路徑，主要分為兩類：內源性或粒線體路徑 (The intrinsic or mitochondrial pathway)，是因粒線體膜通透性改變、Bcl-2 家族分子之參與，會引起粒線體釋放出 cytochrome *c*，使得 cytochrome *c* 與 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 和活化的創蛋白酶-9 形成 Apoptosome 造成細胞凋亡 (Green and Reed, 1998)。另外一個路徑是外源性或死亡受體路徑 (The extrinsic or death receptor pathway)，藉由活化細胞膜上的死亡受體 (death receptor)，引發創蛋白酶-8 的活化所導致。以及還有一個路徑是因為誘發內質網 (endoplasmic reticulum) 釋放鈣離子，引起創

蛋白酶-12 的活化。而這三個路徑所引發的細胞凋亡，主要是與創蛋白酶活化有關。



附圖 2. Programmed cell death pathways (E Bredesen, 2009)

一、死亡受體(Death receptor)與細胞凋亡

死亡受體是一組膜表面受體，與細胞質內之 death domain 結合後，可以引起受體下游分子訊號傳遞而造成細胞凋亡(Wajant, 2003)。死亡受體包括 TNFR I 及 II (tumor necrosis factor receptor I and II)、Fas (Apo-1 and CD95)、DR3 (death receptor 3)、DR4 (又稱 TNF Related Apoptosis Inducing Ligand I ; TRAIL I)、DR5 (又稱 TRAIL II)、CAR I 等，它們都屬於腫瘤壞死因子接受體 (TNFR)

超級家族，其共同特徵是細胞質中都有一段 60~80 胺基酸所組成的 death domain。TNFR 之 death domain 包括：TRADD (TNFR I associated death domain protein) 它可以和 TNFR I 特異性地結合，TRADD 在多種細胞中過表達可以導致細胞凋亡以及啟動轉錄因子 NF- κ B (Nuclear factor- κ B)、TRADD 的誘導細胞凋亡作用；FADD (Fas associated death domain protein)，它的 C 端含有一個死亡結構域可以和 Fas/Apo1 結合，N 端含有死亡效應結構 (death effector domain, DED)，通過它可以和蛋白酶家族的創蛋白酶-8 結合，從而誘導細胞凋亡。而 RIP (receptor-interacting protein)，它和 Fas 及 TNFR I 兩個受體都能夠結合，其 RIP 在細胞中的過表達也可以引起細胞凋亡。Daxx (death associated protein 6) 能和 Fas 特異性結合，Daxx 在細胞中的過表達產生兩種生物學效應：啟動 JNK 途徑以及誘導細胞凋亡，Daxx 本身沒有死亡結構域，但它的 C 端存在能夠和 Fas 的死亡結構域相結合的區域。其 N 端具有誘導細胞凋亡及啟動 JNK 途徑的作用 (Magnusson and Vaux, 1999)。這些死亡受體與細胞質中 death domain 相互結合後，會誘導細胞凋亡信號，啟動細胞內部的凋亡程式，引起細胞凋亡 (Prasad et al., 1999)。

二、Bcl-2 家族分子與細胞凋亡

Bcl-2 (B cell lymphoma protein 2) 是為一個原致癌基因 (proto-oncogene)，最初是在 B 細胞淋巴瘤中的染色體轉位發現的，此種轉位會去抑制 B 細胞的死亡，導致細胞瘤的生長。Bcl-2 家族在細胞凋亡過程中，扮演一個重要的角色。Bcl-2 家族成員可分為兩大類：一類為抑制細胞凋亡的分子 (Antiapoptotic member)：如 Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-w Mcl-1 及 A-1。另一類則為促進細胞凋亡的分子 (Pro-apoptotic member)：如 Bax、Bad、Bid、Bak、Bcl-X_S、Bik、Bim、Blk 及 Hrk(Hengartner et al., 1992)。所有 Bcl-2 家族成員結構相似，都具有 BH (Bcl-2 homology domains) 結構。BH4 domain 幾乎只存在 anti-apoptotic 分子中，Bcl-2 的 BH4 domain 還可以跟 Raf-1 以及 p53 binding protein 結合。Bcl-2 及 Bcl-X_L 位在 BH3 和 BH4 domain 之間有一個 loop 的結構，如果失去 loop 的結構，則 Bcl-2 無法被磷酸化(Fang et al., 1998; Otilie et al., 1997)。目前已知 Bcl-2 家族成員間的交互作用與蛋白質的相對含量有關。另外 Bcl-X 含有兩個分子：較長者為 Bcl-X_L，較短者為 Bcl-X_S。Bcl-X_L 與 Bcl-2 作用類似，可防止細胞因各種凋亡刺激所引起的死亡(Fridman et al., 2001)。Bcl-2 或 Bcl-X_L 本身具有類似抗氧化劑的能力，能捕捉自由基，而 Bcl-2 或 Bcl-X_L 能與 Bax 或 Bak 形成複合體，當 Bcl-2 本身量多時可以保護細胞，而抑制了細胞死亡的訊號(Hockenbery et al., 1993; Liu and Stein, 1997)。而促進凋

亡的分子，Bax、Bad、Bak，則至少含有一個 BH3 domains。促進細胞凋亡的分子與抑制細胞凋亡的分子彼此以 heterodimers 或 homodimers 的形式結合，調控細胞的存活或死亡 (Kelekar and Thompson, 1998)，Bax 量多時會誘導細胞傳遞死亡訊號 (McDonnell et al., 1989)。

Bcl-2 的家族成員大部分在 C-terminal 都含有 transmembrane domain; TM，使得它們可以存在粒線體、內質網 (endoplasmic reticulum) 或是核膜上；而促進細胞凋亡的分子 Bad 及 Bid 在 C-terminal 缺乏 transmembrane domain，平時存在細胞質中，但是如果接受到死亡訊息例如：創蛋白酶-8，則會轉位 (translocation) 到膜上，尤其是粒線體膜上，使得 Bax 大量表現在粒線體的膜上，Bax 結構中的 BH1 及 BH2 domain 會在粒線體膜上形成通道 (channel)，而促使粒線體釋放 cytochrome *c*，而細胞進行凋亡 (Kelekar and Thompson, 1998)，另一方面，一般 Bcl-2 蛋白是表現於粒線體膜上，而與 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 蛋白結合在一起，但是當細胞內部受到刺激，如：自由基 (reactive oxygen species ; ROS) 產生時，會導致 Bcl-2 釋放 Apaf-1，而 Bax 轉位到粒線體膜上，促進了 cytochrome *c* 釋放，進一步造成創蛋白酶-9 活化，引發細胞的凋亡 (Hengartner, 2000; Jurgensmeier et al., 1998; Kroemer and Reed, 2000; Reed, 1997)。

三、創蛋白酶(caspase)與細胞凋亡

細胞凋亡進行時，一群含有 cysteine 蛋白分解酶 (proteases) 的分子，作用於受質的天門冬胺酸(aspartate)部位，被稱為 cysteine aspartate-specific protease，簡稱 caspase (創蛋白酶) (Thornberry and Lazebnik, 1998)。創蛋白酶平常以酵素原 (zymogens) 這種不具活性型態方式存在細胞質內，當受到刺激後才會從兩個前創蛋白酶被裂解 (proteolytic) 成含有 large and small subunits 的四聚體，進而形成活化形態創蛋白酶(Chao and Korsmeyer, 1998)。創蛋白酶常見的 structural motifs 有 N-terminal Pro-domain 例如 death effector domain (DED) 及 caspase recruitment domain (CARD)，具有 DED 部分的是創蛋白酶-8 和-10 和具有 CARD 部分為創蛋白酶-1、-2、-4、-5、-9、-11 和-13。以及 Large subunit，這個部分包含了 cysteine active site 擁有 Gln-Ala-Cys-X-Gly motif 而 X 可能為 Arg, Gln 或 Gly 胺基酸，另外還有 C-terminal small subunit 及 Interdomain，而 Interdomain 是介於 large and small subunit 之間包括 1 個或 2 個 aspartate residues(Wolf and Green, 1999)。

目前研究至少已經發現 14 種的創蛋白酶存在。根據他們的同源性，可大致分為三類(Shi, 2002; Zornig et al., 2001)：第一類為 Initiators

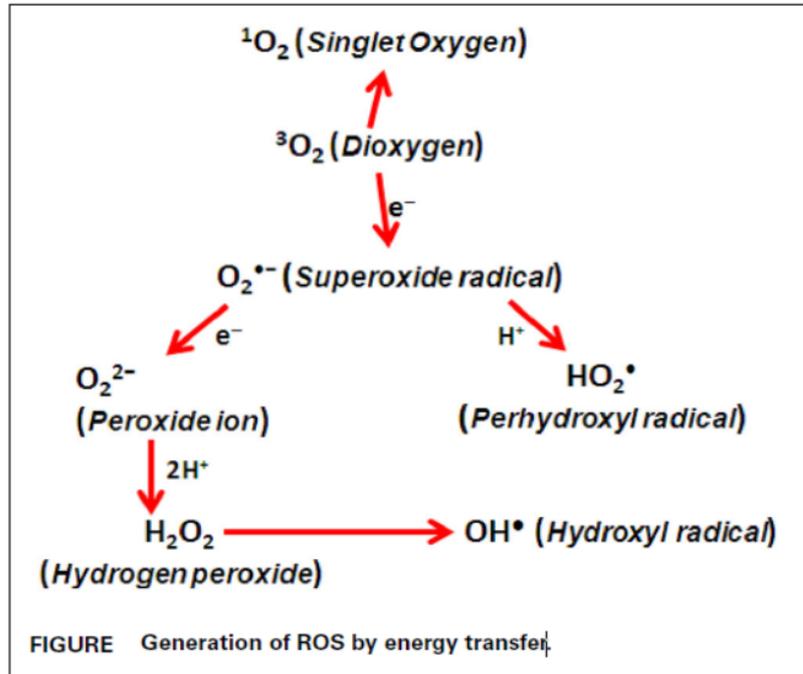
caspases，此類之創蛋白酶有創蛋白酶 -2、-8、-9、-10 以及-12，其功能負責活化 apoptotic executioners 使其能執行細胞凋亡，此類創蛋白酶在結構上，N 端具有較長的 prodomain，如：創蛋白酶-8 和-10，其 N 端 prodomain 具有兩個 death effector domain (DED)，來與下游的 adaptor molecule C 端的 DD domain 連結，以傳遞來自 death receptor pathway (如：TNF, Fas) 的死亡訊號。而在創蛋白酶-9 上，則具有 CARD (caspase recruitment domain) 位於 prodomain 上，此 CARD domain 可與 Apaf-1 上 N 端的 CARD 結合，傳導來自 mitochondria pathway 的死亡訊號。第二類為 Effector caspases 此類創蛋白酶有創蛋白酶-3、-6 及-7，此類創蛋白酶的功能則負責執行細胞凋亡，這類創蛋白酶在其結構上，N 端的 prodomain 較短，裂解其下游的 protein 如：Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)，此蛋白質為創蛋白酶-3 的受質。而 PARP 其原本作用為修復受損的 DNA、調控細胞增殖與死亡的平衡、和維持基因體的穩定性。但當 PARP 受創蛋白酶-3 裂解，會由 116kDa 被水解成 85kDa，進而失去原本的效用。創蛋白酶-3 也會裂解 ICAD/DFP45 (DNA fragmentation factor 45) 導致其鍵結的 CAD 能脫離 ICAD 的束縛，進而 CAD 可轉移到細胞核內分解 DNA，將 DNA 切成大約 180-200 bp 長度的片斷(Sun et al., 1999)。第三類為 Cytokine processor caspases，此類創蛋白酶有創蛋白酶-1、-4、-5、-11、

-13 以及-14, 此類創蛋白酶的功能與發炎反應比較有關係(Shi, 2002; Zornig et al., 2001)。

四、活性氧分子 (Reactive Oxygen Species) 與細胞凋亡之相關性

(一) 自由基 (free radicals) 與活性氧分子

自由基為能夠獨立存在的任何分子種類，其包含原子軌道中的不成對電子(Babbs and Steiner, 1990)。自由基又可依其未成對電子所在位置不同而區分成以碳、氧、氮或硫為中心之自由基(Simic, 1988)。在生物體中，氧可以經由數種途徑進行活化，一般可歸類為電子轉移及能量轉移兩種反應(Das and Roychoudhury, 2014)，電子轉移包括基態氧分子連續接受電子所形成的反應物（如超氧陰離子和過氧化氫）；碳中心自由基與氧形成的反應物(如脂質過氧化自由基)以及氧與含有未成對電子之過渡金屬的結合物（如 ferryl ion）等。而能量轉移則是指由基態之三重態氧 ($^3\text{O}_2$) 吸收能量激發為單重態氧 ($^1\text{O}_2$)。這些反應性較強的含氧物質稱為活性氧族群 (reactive oxygen species)，能量轉移產生活性氧分子作用關聯性，如附圖 3。許多自由基不穩定且反應性很強，它們可以向其他分子提供電子或接受電子，因此可以作為氧化劑或還原劑。



附圖 3：能量轉移產生活性氧分子(Das and Roychoudhury, 2014)

(二) 自由基與活性氧族群之來源

活性氧族群其來源可分為外在及內生性兩方面，內生性的 ROS 大多源自於粒線體中的呼吸鏈所生成。而外在性活性氧的來源可能來自於環境之中，例如：離子輻射、空氣污染和暴露於化學物質等。一般而言，內生性的 ROS 在好氧情況下，生物體主要是經由兩種途徑產生活性氧與自由基(Lobo et al., 2010)：

1. 偶發性產生：生物體在正常的呼吸作用下， O_2 自粒線體電子傳遞鏈、細胞色素 P450 或其他系統，經由連續步驟接受四個電子和四個氫原子還原成水。在此過程經由電子轉移會依序產生超氧陰離子 ($\bullet\text{O}_2^-$)、過氧化氫 (H_2O_2) 和氫氧自由基 ($\bullet\text{OH}$) 等。

2. 需求性產生：生物體本身也會有計畫性的產生活性氧分子，典型的例子就是白血球活化而產生 $\cdot\text{O}_2^-$ 、HOCl 與 H_2O_2 ，此種特性對於白血球在殺死細菌和真菌上扮演相當重要的角色 (Curnutte and Babior, 1987)。

另一方面，外在性活性氧分子的產生是因：

1. 生物體暴露於離子輻射、環境之中，會使得體內水分子 O—H 鍵斷裂而產生 $\cdot\text{OH}$ 。
2. 暴露於二氧化氮 (NO_2) 下，其會加入細胞之不飽和脂肪酸的雙鍵上而產生自由基，並起始自身氧化反應。
3. 香菸是生物體暴露於自由基傷害的另一項來源，香菸燃燒時會產生多種氧化物和自由基，包括氧化烷基 (alkoxyl) 和以碳為中心的自由基 (Church and Pryor, 1985)。
4. 另外，日常生活中的許多化學物質被攝入體內時，也可能產生自由基，例如除草劑 paraquat(百草枯)和 diquat(敵草快)經氧化還原循環後會形成 $\cdot\text{O}_2^-$ (Sandy et al., 1986)；四氯化碳在體內的代謝也會產生多種的自由基 (Poyer et al., 1980)，此外一些致癌物質與抗癌藥物（例如：烷化劑）在體內的代謝也會形成自由基 (Hazlewood and Davies, 1995)。

(三) 活性氧之種類

活性氧族群種類包含了以氧為中心的自由基，如超氧陰離子自由基 (superoxide radical, $\bullet\text{O}_2^-$)、過氧化氫自由基 (hydroperoxyl radical, $\text{HO}_2\bullet$) 與氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\bullet\text{OH}$) 以及包括了與氧有關之非自由基衍生物如過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、次氯酸 (hypochlorous acid, HOCl) 等，經由引發自由基的連鎖反應，攻擊許多重要分子並且生成有毒之中間代謝產物，進而對生物體造成傷害。

1. 超氧陰離子 (superoxide radical, $\bullet\text{O}_2^-$)

在生物體內是最先也是最常產生的自由基，但其半衰期很短，所以極少對生物體直接造成傷害，但易引起自由基連鎖反應，其反應之產物會對生物體造成傷害(Valko et al., 2007)。

2. 過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)

H_2O_2 主要來自於 $\bullet\text{O}_2^-$ 歧化反應，以及在單胺氧化酶 (monoamine oxidase)、urate oxidase、acyl-CoA oxidase、L-gulonolactone oxidase 等部分氧化酶催化下也會產生，其中以巨噬細胞的吞噬過程及粒線體的電子傳遞鏈為產生 H_2O_2 的主要途徑。由於 H_2O_2 不具有未配對的電子，因此不屬於自由基，其為 O_2 被還原成 H_2O 的過程中最安定的中間物質；雖然 H_2O_2 不會立刻與生物分子作用但是它會通過細胞膜 (Halliwell and Gutteridge, 1986)。

3. 氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\bullet\text{OH}$)

•OH 為最活潑的自由基，其來源可由 H_2O_2 在金屬離子如銅離子、鐵離子的催化下進行 Fenton reaction。然而 •OH 相當不穩定會攻擊粒線體的 DNA，造成 DNA 結構改變(Pryor, 1988)；還會造成生物膜上的不飽和脂肪酸以及醣類，使得脂肪酸本身會成為脂質自由基 (carbon-centered lipid radical, $R\cdot$)、脂質氧化自由基 (alkoxyl radical, $RO\cdot$)、以及脂質過氧化自由基 (peroxyl radical, $ROO\cdot$) 等脂質氧化連鎖反應，並且生成有毒的脂質過氧化產物 (lipid peroxide, LPO)，造成膜上的蛋白質結構也因此受到破壞。因而使細胞膜流動性喪失、降低細胞膜電位，以及破壞膜通透性，導致細胞外外鈣離子流入 (Jaeschke, 1995)。同時也會增加膜內物質的滲漏流失，膜內的運輸、流動性以及膜電位均會受到影響(Elroy-Stein et al., 1986; Yu et al., 1992)，細胞膜上所連結的酵素及受器也因此失去活性。因此，•OH 為活性氧族群中對生物體最具威脅性。

(四) 活性氧分子對生物體之影響

雖然活性氧分子是一些正常生理反應，可是參與氧化還原反應的進行以及作為訊息傳遞分子，一旦累積過多活性氧分子而無法被順利的清除，細胞的蛋白質、酵素、醣類、脂質、DNA 與 RNA 等，均為活性氧族群攻擊的主要目標，這些生物體內的重要物質一旦遭受到活性氧族群的攻擊，便會導致嚴重的氧化性傷害。最近有部分的研究顯

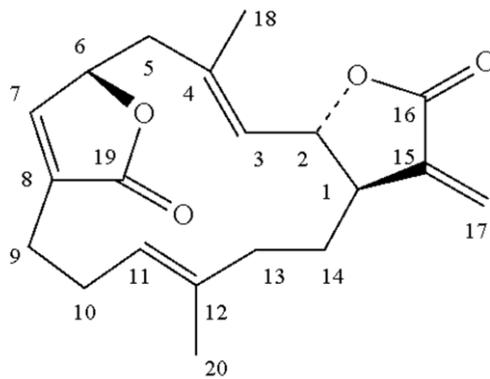
示，p53 可以促使細胞粒線體活性氧分子產生，並且使粒線體 apoptotic factors 的釋放 (Johnson et al., 1996; Sheikh and Fornace, 2000)。進一步活性氧分子會去活化 stress responsive pathways 如：p38/SAPK。另一方面，也有其他的研究認為活性氧分子可能會去抑制 Bcl-2 以及去活化 p53 (Martindale and Holbrook, 2002)。還有一些研究顯示，Bcl-2 能抗 H₂O₂、t-丁基或甲萘醌 (t-menadione) 對細胞凋亡的誘導，其可能原因為 Bcl-2 透過參與抗氧化通路而抑制細胞凋亡 (Hockenbery et al., 1993)。

第三章、材料與方法

第一節、實驗藥劑與藥品

一、實驗藥劑

實驗中使用中使用之金劍草純化物 Ovatodiolide(魚針草內脂)，是由朝陽科技大學曾耀銘老師研究室提供。魚針草內脂(分子量 328.4)粉末以每 32.84 mg 溶於 1ml 之 DMSO (Dimethyl sulfoxide)，配置成濃度 100 mM、避光並放置於-20°C 之冷凍櫃儲存。



化學結構式：

化學名稱：3,7,11,15(17)-Cembratetraene-16,2:19,6-diolide

分子式： $C_{20}H_{24}O_4$

二、實驗試劑

1. 榮民製藥：

Penicillin, Streptomycin

2. ABI (American Biorganics INC)：

Tris

3. Abcam (Cambridge, UK)

Anti-DR4 antibody, Anti-DR5 antibody, Anti- γ -H2AX^{Ser139} antibody, Anti-phosphorylated ATM^{Ser1981} antibody and Anti-ATR^{Ser428} kinase antibodies

4. Amersham :

ECL detection kits

5. Bhoringer Mannheim

Ribonuclease A (RNase A) and Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescin nicked end-labeling (TUNEL) assay kit

6. Cell Signaling Technology (Danvers, MA., USA)

Anti-phosphorylated CHK1 antibody, Anti-phosphorylated CHK2 antibody, Anti-Mcl-1 antibody

7. Falcon :

Cell culture dish (10cm diameter), Cell culture plate (12 well)

8. GeneTex (California, USA)

Anti-H2AX antibody

9. Gibco :

RPMI 1640 Medium

10. Kamiya (Thousand Oaks, CA, USA)

Inhibitor of caspase-3 (Z-DEVD-FMK), Inhibitor of caspase-8 (Z-

IETD-FMK), and Inhibitor of caspase-9 (Z-LEHDFMK)

11. Merck :

2-Mercaptoethanol (2-ME), EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$),
Dimethylsulfoxide (DMSO), Methanol, Sodium dodecyl sulfate
(SDS), Sodium chloride (NaCl), Xylene cyanol, Ethanol,
Glycerol, HCl, L-glutamine, Methanol, $NaHCO_3$, NaCl, Na_2HPO_4 ,
KCl, KH_2PO_4 , Ortho-phosphoric acid

12. Millipore (Billerica, MA, USA)

Anti-PUMA antibody

13. Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

Dihydroethidine (HE) and 2' -7' -dichlorofluorescein diacetate
acetyl ester (DCFH-DA)

14. Promega (Msdison, WI, USA).

Lactate dehydrogenase (LDH) assay kit

15. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

Activity assay kits of caspases

16. Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO. USA)

N-acetylcysteine (NAC), caffeine, and propidium iodide (PI)

17. Santa Cruz (Santa Cruz, CA., USA)

Anti-Bcl-2 antibody, Anti-Bax antibody, Anti- β -actin antibody, Anti-
CDK1 antibody, Anti-Cyclin B1 antibody, Anti-p21^{WAF1/CIP1} antibody,
and Anti-p27^{KIP1} antibody

第二節、細胞株的培養

一、細胞株來源

本實驗使用之A549細胞株為人類非小細胞肺癌細胞株（Human Non Small Cell Lung Cancer）中的肺腺癌細胞株（lung adenocarcinoma cell line）、以及H1299 非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer) 細胞株，購自新竹食品工業發展研究所菌種中心 (Culture Collection and Research Center, CCRC)。

二、細胞株的培養

(一)細胞培養液的配製

將 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco)粉末先溶於約 0.95 公升 Mili-Q 去離子水中，秤取 2 g 的 NaHCO_3 加入，再用 HCl 調整 pH 至 7.0~7.2 之間以 Mili-Q 去離子水補足體積至 1 公升，然後以 0.22 μM 的過濾器過濾滅菌，最後儲存於 4°C 冰箱備用。

(二)完全培養液

每 500 毫升 RPMI 1640 細胞培養液添加 100 IU 青黴素 (Penicillin)、100 μg 鏈黴素 (Streptomycin)、2 mM 麩胺酸 (L-glutamine)、100 μM 非必須胺基酸 (non-essential amino acid)，

1mM 焦葡萄糖酸鈉 (Sodium Pyruvate)，最後加入 10%胎牛血清 (Fetal Calf serum, FCS) 即得。

(三) 繼代培養

A549 及 H1299 細胞株，以 RPMI 1640 完全培養液培養於 37°C、5%CO₂ 的培養箱中；繼代培養時，先用 PBS (Phosphate-Buffered Saline) 清洗 2 次，再以 TEG (0.05 mM trypsin、2.5 mM EDTA 和 2.8 mM glucose) 處理數分鐘之後，待細胞與培養皿底部解離，將細胞於培養皿中打散，最後分植於新的細胞培養皿中，每一培養皿注入約 10 毫升的細胞培養液，細胞培養液需每兩天更換一次。

三、細胞存活率測定

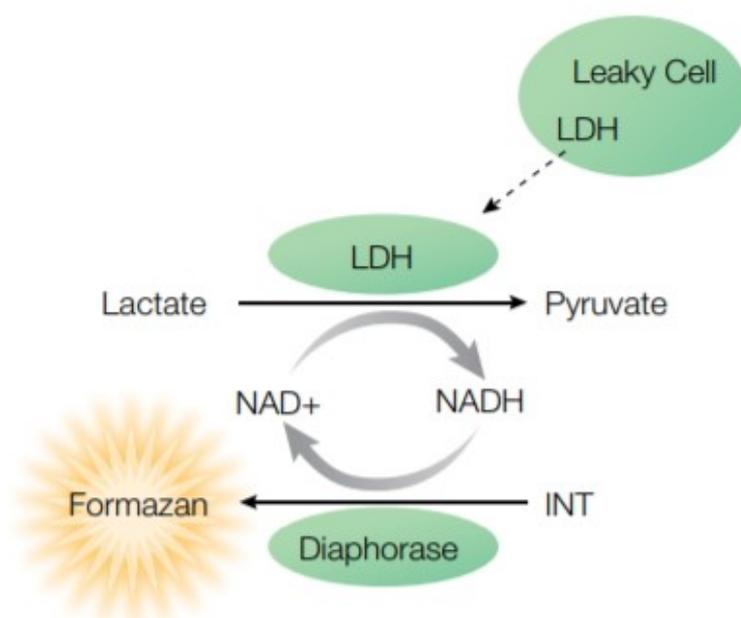
將培養的細胞經TEG處理過後，以2~3毫升的培養液將細胞打下來，利用血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞培養皿中所有的細胞數目，接著以每毫升含有 3×10^4 個細胞分種於12孔細胞培養盤中，均勻搖散細胞後，將細胞培養於37°C、5% CO₂的培養箱中24小時後，給予各濃度藥物處理、再經24、48小時後，加入200 μ l Trypsine 將細胞打下，取10 μ l 細胞液與10 μ l Trypan blue dye 均於混合，以血球計數器計算各孔盤內的細胞數，每一藥物濃度處理為三重覆，

取平均值作成存活曲線。

第三節、實驗分析方法

一、 乳酸去氫酶分析法(Lactate dehydrogenase assay ; LDH assay)

乳酸去氫酶 (LDH ; lactate dehydrogenase)是一種穩定存在於細胞質中的酵素，當細胞膜破損時，原本存在於細胞質內的乳酸去氫酶即會被釋放至細胞培養液中，可作為細胞傷害或死亡的指標之一。藉由加入可與乳酸去氫酶反應形成水溶性紅色結晶物質的呈色試劑，即可測得細胞的死亡率。其偵測原理如下：血清中的乳酸去氫酶(LDH)促使乳酸轉化為丙酮酸，同時 NAD^+ 也轉化成 NADH ，通過測定吸光度的變化而求得乳酸去氫酶的活性值。



(www.promega.com)

將肺癌細胞以不含牛血清的培養液，培養細胞於 24 孔細胞培養盤 (100 μ L/well) 中，加入不同濃度之魚草內酯，在 5% CO₂、37°C 的條件下，分別培養 24、48 與 72 小時後，取出上清液 50 μ L 至另一 96 孔盤中，之後加入 50 μ L 之受質混合液，在室溫下避光反應 30 分鐘後，加入 50 μ L Stop solution 終止反應，測量 490 nm 之吸光值。

二、 流式細胞分析儀

將細胞以每 5ml 含有 10⁶ 個細胞植入於 6 cm 的培養皿中，經 24 小時後，分別將經過各濃度及時間藥物處理之細胞，先以 PBS 清洗細胞，再將細胞用 TEG 處理，用 1 ml PBS 將細胞打下來，置於 1.5 ml 的離心管中，再以 1200 rpm 室溫下離心 5 分鐘，倒掉上清液，置於震盪器中輕輕震盪，將 1 ml 70% EtOH/PBS 一滴一滴的慢慢低入離心管中，使細胞均勻分散於 70% EtOH/PBS 中，即可置於 4°C 冰箱中保存，直到分析。待分析之前，將 Sample 以 1200 rpm 在 4°C 下離心 5 分鐘，倒掉上清液，之後便於避光條件下，每一個 Sample 加入 1 ml 碘化丙啶溶液 propidium iodide (PI) solution (10 μ g/ml 的 PI, RNase 0.1 mg/ml) 中，置於 37°C 作用 30 分鐘，最後至於冰上，利用流式細胞儀 Flow cytometer (FACScan, Becton Dickson) 分析，所得之結果再以 ModFIT LT 2.0 軟體分析，並加以量化。

三、 TUNEL 及 DAPI 雙染色

當細胞發生凋亡 DNA 斷裂成許多小片段，因而顯露出許多 3'端點，故以末端脫氧核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記、或稱 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein nick end-labeling assay)處理後，即可偵測到綠色螢光訊號；而正常狀況之細胞利用 TUNEL 檢測，則訊號微弱不易偵測。DAPI 即 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole)是一種與 DNA 專一性的螢光染劑，一般正常細胞中之 DNA 呈均質狀分布，以 DAPI 染色後可見較大面積淺藍色螢光訊號；但若細胞發生凋亡而導致 DNA 濃縮，則可見小面積強烈藍色螢光訊號。故以 TUNEL 及 DAPI 雙染色可確認細胞是否進行細胞凋亡。

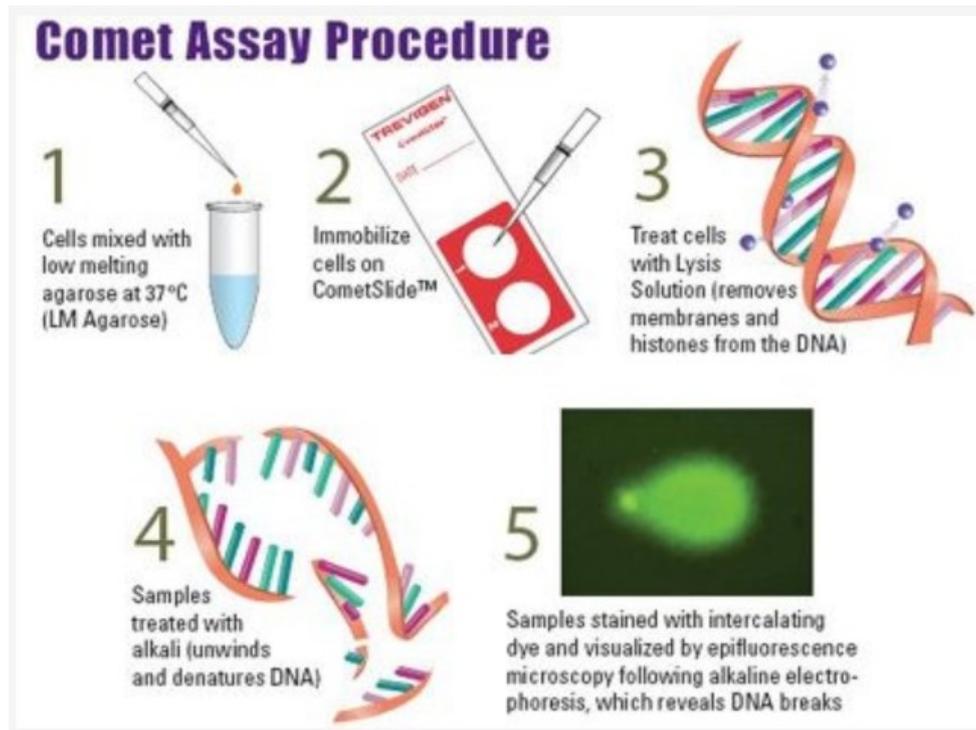
將 1.5 cm 圓形玻片置入 12 孔盤中，將每孔以 1 ml 完全培養液接種 1×10^5 個細胞，培養於含有 5% CO_2 之 37°C 恆溫培養箱中 24 小時，使細胞貼附於玻片上。處理魚針草內酯後之細胞以 PBS 清洗二次 (每次 5 分鐘)後，以 2% paraformaldehyde 於室溫下作用 30 分鐘，進行細胞固定。PBS 清洗二次(每次 5 分鐘)，再以含有 0.1% Triton X-100 之 PBS 於室溫下作用 30 分鐘，使染劑可以進入細胞內。以 PBS 清洗三次(每次 5 分鐘)後，加入 TUNEL 反應綜合試劑 (34 mM terminal

transferase, 280 pmol of dATP, 90 pmol fluorescein-11 dUTP, 30 mM Tris-HCl, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM CoCl₂, pH 7.2) (Roche Diagnostic Co., IN USA)於 37°C 避光反應 1 小時;以 PBS 清洗三次(每次 5 分鐘),再以 1 µg/ml DAPI (Sigma Chemical Co.)避光反應 20 分鐘;以 PBS 清洗三次,取出玻片以 10 µl 螢光封片劑 mounting solution (glycerol : PBS=8 : 2)滴在載玻片上,將玻片以 45°角小心覆蓋其上,並注意防止氣泡產生。最後以倒立螢光顯微鏡鏡檢,並以數位相機(Nikon COOLPIX995, Nikon Corporation Imaging Company, Tokyo Japan)照相記錄。

四、彗星分析測定(Comet assay)

先在玻片上覆上一層 1%瓊脂 (Normal Melting Agarose, NMA),放置 37°C 培養箱約 5~10 分鐘。在以藥物處理或未經處理之不同時間點之細胞,用 1x PBS 洗一次後,以 trypsin-EDTA 作用數分鐘之後,加入培養基將細胞打下來,進行細胞計數,取 1×10^5 細胞加入 75 µl 的 1% 低溶點瓊脂(Low Melting Agarose, LMA)均勻混合,取 100 µl 到以覆蓋一層 1%瓊脂 NMA 的玻片上,均勻塗抹,放置 37°C 培養箱約 5~10 分鐘,再將玻片浸置 lysis buffer (2.5 M NaCl、100 mM EDTA、10 mM Tris, pH=10)室溫十分鐘,倒掉 lysis buffer 後,用 1X PBS 清洗一次,再將玻片放置鹼性電泳溶液 Electrophoresis buffer (5 N NaOH、

200 mM EDTA, pH=10) 靜置 20 分鐘，再以 24 Volts、300 mA 跑 30 分鐘，將玻片取出，浸置中和溶液 Neutralization buffer (0.4 M Tris、pH=7.5) 5 分鐘，取出玻片以 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 ethidium bromide 染 5 分鐘，在顯微鏡下觀察細胞。



(<http://www.amsbio.com/comet-assays.aspx>)

五、 活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS)

將細胞種於 6 cm dish 中，經由 24 小時培養之後，分別處理魚針草內酯 1、2、4 小時，待處理藥物時間點結束前 30 分鐘，加入含 5 μM H₂DCFDA 或 5 μM HE 於培養基中，避光作用培養於 37°C，反應 30 分鐘，以 1 X PBS 清洗細胞後，加入 trypsin-EDTA 作用數分

鐘後將吸取出 trypsin-EDTA，加入 1 毫升的 1 X PBS 將細胞打下，移至 FACS 管中。利用 Flow cytometer (FACScan, Becton Dickson) 儀器分析細胞中之螢光變化量。

六、細胞蛋白質萃取與定量

(一) 蛋白質的萃取 (Protein Extraction)

以藥物處理或未經處理之不同時間點之細胞，漂浮及貼覆的細胞均收集，在 4°C 以 3200 rpm 離心 5 分鐘，用冰的 PBS 將細胞清洗一次後，於 4°C 下再離心 5 分鐘，倒掉上清液並用棉棒將多餘的水吸乾，將細胞 pellet 均勻打散，加入適量的 RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.25% Na Deoxycholate, 5 mM EDTA (pH 8.0) , 1 mM EGTA (pH 8.0) , * 1 mM DTT, *5 µg/ml Leupeptin, * 0.2 mM PMSF, * 5 µg/ml Aprotinin, * 1 mM Na Vanadate, * 1 mM NaF (* add before use)]，置於冰上作用 20 分鐘，將細胞液轉至超高速離心管中，接著以超高速離心 55000 rpm、4°C、30 分鐘，收集上清液，以 Bradford 的方法測量蛋白質溶液 (Bradford, 1976)，在波長 595 nm 下的吸光值，以一系列稀釋已知濃度的 BSA 做成標準曲線 (standard curve)，換算成蛋白質濃度 (µg/µl)。以每個 eppendorf tube 50 µg 的蛋白質分裝並用 RIPA buffer 調整成相同體積，

接著再加入調整完體積的蛋白質溶液 1/3 量的 4X protein loading dye (8 % SDS, 0.04 % Serva blue R-250, 40 % glycerol, 200 mM Tris pH 6.8, 10 % 2-mercaptoethanol)，以 95°C 乾浴加熱變性 7 分鐘後，即可置於-80°C 中保存。

(二) 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE Assay)

將蛋白質依分子量分離利用 SDS-PAGE，首先配製 1.5 mm 厚的 discontinuous acrylamide gel，gel 分上下兩層，下層 separating gel 其 acrylamide 的百分比視分析蛋白質分子量而定，上層的 stacking gel 則含 4 % acrylamide。配製完成的膠體放置於電泳槽內，加入電泳緩衝液 (running buffer : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)。接著將萃取出蛋白質與 4X protein loading dye 混合液再以 95°C 乾浴、加熱變性 7 分鐘，置入冰浴冷卻後離心。將各 sample 及標示標準分子量的 Multimaker 依序注入膠體的孔槽中，通以電壓 80 Voltage，待樣品通過 stacking gel 後電壓調整為 100 Voltage，視其分子量大小斟酌電泳時間，即可將電源關閉。

(三) 西方墨點法 (Western blot)

將 PVDF 膜浸於甲醇 數秒後以 Milli-Q 水浸濕，接著裁好的濾紙與膜先浸泡在轉漬溶液 (50 mM Tris, 40 mM glycine, 0.375 % SDS, pH 9.0-9.4 ; 20 % methanol) 中。裁下電泳膠中所要轉漬的區域後，

亦浸泡於轉漬溶液中。轉印石墨板之正極板以轉漬溶液潤濕後，依序重疊平鋪 4 張濾紙、膜、gel、4 張濾紙，最後蓋上以轉漬溶液潤濕的負極石磨板，設定電流（電流 = 濾紙面積 $\times 9/7$ \times 疊數），通電流經 1 小時又 10 分鐘後將 PVDF 膜取出，浸泡於 5 % non-fat milk/TBST 中，於室溫下搖晃至少 30 分鐘。以 TBST buffer（24.22 g Tris, 87.75 g NaCl, 10 ml Tween 20, 加水調到 1L）清洗膜 10 分鐘三次，加入一級抗體，置於 4°C 下作用隔夜。

隔日先以 TBST buffer 清洗膜 10 分鐘三次，加入二級抗體，使其在室溫下搖晃作用 1 小時之後，再用 TBST buffer 清洗 10 分鐘三次，接著在暗房中將膜與 ECL（enhanced chemi-luminescence）反應後，裝於透明塑膠袋內並置於壓片夾中，以 X-ray film 感光顯影，再以自動沖片機沖片。

七、 創蛋白酶活性測定（Caspase activity assay）

以藥物處理或未經處理之不同時間點之細胞，漂浮及貼覆的細胞均收集，在 4°C 以 3200 rpm 離心 5 分鐘，用冰的 PBS 將細胞清洗一次後，於 4°C 下再離心 5 分鐘，倒掉上清液並用棉棒將多餘的水吸乾，將細胞 pellet 均勻打散，加入細胞 pellet 4 倍體積量的 lysis buffer（1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8),

2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin) (R & D Systems Inc., MN USA), 於 4°C 下依照萃取蛋白的步驟萃取並測定蛋白質濃度。取 200 µg 蛋白質以及 50 µl 的 2 倍 reaction buffer (100 mM HEPES, 10% sucrose, 10 mM DTT, 0.1% 3-[(3-chloamidopropyl) dimethylammoniol] 1 - propanesulfonate (CHAPS), 使用前加入 10 µl 1 M 之 DTT); 兩者均勻混和後加入 96 孔盤 (Nalge Nunc International, Roskilde Denmark) 中, 避光每一孔中加入 2.5 µl 200 µM 創蛋白酶受質, 如: caspase-3 (DEVD-AFC)、caspase-8 (IETD-AFC) 和 caspase-9 (LEHD-AFC)。於 37°C 培養箱中避光反應 1 小時, 以 Fluorescence spectrometer (Fluoroskan Ascent; Labsystems Oy, Helsinki Finland) 測定螢光強度判別各創蛋白酶活化之情形。其激發波長 (excitation wavelength) 為 405 nm, 吸收波長 (emission wavelength) 為 510 nm。

八、 統計分析

本論文每一試驗處理為三重複, 同樣試驗至少重複執行三次。試驗結果以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 表示, 並使用 Microsoft Office Excel 進行 Student's *t*-test 分析。**p*<0.05、***p*<0.01 或****p*<0.001 表示統計上具顯著差異。

第四章 結果

一、魚針草內酯誘導細胞週期 G2/M 期停滯和凋亡

為了確認魚針草內酯對人肺癌細胞的生長抑制作用，分別以0、2、5、10、20和30 μM 不同濃度的魚針草內酯，分別處理A549（野生p53基因型）和H1299（無p53基因型）細胞株經過24小時和48小時後，利用Trypan blue dye染色方法測定活細胞數量。結果如圖1左圖，魚針草內酯抑制A549和H1299細胞的生長，具有濃度和時間關聯性（concentration- and time-dependent manners）方式，A549及H1299肺癌細胞株處理24小時之百分之五十生長抑制濃度(IC_{50})為17和10 μM ，處理48小時後之百分之五十生長抑制濃度(IC_{50})分別為10和4 μM 。為進一步確認魚針草內酯對肺癌細胞之致死作用，A549和H1299細胞以0、2、5、10、20和30 μM 不同濃度的魚針草內酯分別處理24小時和48小時後，收集細胞之上清液，利用乳酸去氫酶測定法(LDH assay)檢測魚針草內酯的對於肺癌細胞毒性，結果顯示(圖1右圖)，魚針草內酯處理肺癌細胞，具有細胞毒殺作用，同樣隨著藥物處理濃度及時間之增加而增強其效用。A549和H1299細胞株在處理24小時後百分之五十致死濃度值(LC_{50})分別為18和11

μM ，48小時百分之五十致死濃度值分別為12和7 μM 。此外，以魚針草內酯處理肺癌細胞株24小時後，從顯微鏡下觀察可以發現 A549和H1299細胞分別處理10及8 μM 以上濃度時，細胞形態上除形成內部空泡外，外觀明顯皺縮、變小，而且形成圓起和浮動細胞，並且有細胞死亡之情形（圖2）。

由上述實驗結果得知，魚針草內酯對肺癌細胞具生長抑制之作用，此現象極有可能是透過抑制細胞週期之進行。故利用流式細胞分析儀，進一步分析魚針草內酯對於肺癌細胞週期的影響。將A549及H1299細胞株分別以0、10、20 μM 以及0、5、10 μM 之魚針草內酯處理24小時後收集細胞，再以流式細胞分析儀分析細胞週期分布的情形。如圖3所示，與對照組細胞相比，以魚針草內酯（20 μM ）處理A549細胞其G2/M期由20.1%上升至38.7%；H1299（10 μM 處理）細胞株之G2/M期由34.7%上升至57.0%，並同時均伴隨G1期和S期細胞比例減少。結果表示，魚針草內酯處理後顯著地導致肺癌細胞停滯在G2/M期。為進一步確認魚針草內酯是否也能誘導非小細胞肺癌細胞凋亡，進行了Annexin V-FITC / PI雙染色測定。

Annexin V細胞染色，用於檢測細胞凋亡早期的細胞膜變化。在細胞凋亡早期，細胞膜上磷脂絲胺酸 phosphatidylserine (PS)由膜內側翻向外側。Annexin V是一種Ca離子依賴性磷脂結合蛋白，可以與磷脂絲胺酸 phosphatidylserine (PS) 特異性結合，用綠色螢光(FITC)標記的 Annexin V通過流式細胞儀或螢光顯微鏡，可以檢測到細胞凋亡的發生。結合細胞核染劑 碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) ，利用流式細胞儀或螢光顯微鏡可偵測偵測細胞凋亡現象及其凋亡分期。碘化丙啶 (PI) 是一種DNA染料，PI只能透過凋亡晚期和死細胞的細胞膜對細胞核染色，因此Annexin V和PI結合使用，可以區分凋亡早晚期的細胞及死細胞。圖4結果顯示，凋亡細胞在A549和H1299細胞中，隨著魚針草內酯處理濃度增加而顯著增加。此外，利用TUNEL測定(當細胞核中DNA斷裂時，其3'-OH端被接上帶有綠色螢光FITC分子的dUTP，因此呈現綠色螢光)和DAPI(檢測細胞核，呈藍色螢光)細胞雙染色以檢測晚期凋亡的現象。如圖5所示，將A549和H1299肺癌細胞分別用20和10 μM魚針草內酯處理48小時後，顯著增進細胞凋亡及細胞核濃縮現象、以及增加TUNEL陽性細胞(綠色螢光

細胞)，這些實驗結果顯示魚針草內酯觸發的細胞死亡是經由細胞凋亡途徑。

二、魚針草內酯調控 G2/M 期相關蛋白之影響

細胞週期分析結果顯示，魚針草內酯所引起肺癌細胞週期停滯於 G2/M 期，因此試著分析 G2/M 期相關控制分子的調節情形。

細胞週期的進行是由許多分子的參與加以調控，每一個時期所參與的分子也不盡相同，其中在 G2/M 期調控的分子如 CDC25C、Cyclin-B1、CDK1、p53，p21^{WAF1/CIP1} 和 p27^{KIP1} 等分子。當細胞週期進行至 G2/M 期，Cyclin-B1 會作用在此間期，它與 CDC2 複合成 maturation-promoting factor (MPF)，啟始了染色體凝集、核膜破裂與紡垂絲形成的機制，進而引導染色體在子細胞作均等的分裂 (Jacobs, 1992)。Cdk2/Cyclin A 複合物調控著 S 時期的進行，而 Cdk1/Cyclin B 複合物調控著 G2/M 期的轉換、及 M 期的進行過程 (Hunter and Pines, 1994)。所有的 Cyclin-Cdk 複合物均有抑制作用 (Xiong et al., 1993)，它們會形成 cyclin-Cdk-CdkI 型式的三元體，藉由遮蔽掉 Cdk 的催化位置，使其無法與下游分子反應，進而抑制了細胞週

期的進行(Russo et al., 1996)。

西方墨點法分析結果，CDK1，Cyclin B1 和 CDC25C 的蛋白表現量顯著下降，與細胞週期停滯於 G2/M 期停滯的表現情形相符合；而 p21^{WAF1/CIP1} 的表現量在兩種肺癌細胞株中對魚針草內酯的處理均顯著增加（圖 6）；p53 蛋白表現量增加僅在 p53 基因存在的 A549 細胞中觀察到此現象，但在 H1299 細胞（p53 缺失）中未觀察到；然而，在魚針草內酯處理後，p27^{KIP1} 的表現量改變不大。因為 CDC25C 是 CDK1 專一性去磷酸酶，其藉由使 CDK1 在 Tyr14 / 15 鹼基處去磷酸化，來激活 Cyclin-B1 / CDK1 複合物，以促進 G2/M 期進展。因此，使用針對磷酸化 CDK1-Tyr14 / 15 的抗體測量其活性。結果顯示肺癌細胞經魚針草內酯處理後，其磷酸化的 CDK1-Tyr14 / 15 蛋白表現量增加（圖 7），證明了在魚針草內酯處理的細胞中 CDK1 的活性降低。

三、魚針草內酯觸發內源性和外源性細胞凋亡途徑

創蛋白酶活化除了是細胞凋亡的特徵之一，創蛋白酶家族分子在細胞凋亡的過程中，也扮演著非常重要的角色，無論是經由粒線體路徑或細胞膜上死亡受體路徑，都

會活化創蛋白酶，啟動下游一些執行重要功能的分子，促使細胞走向凋亡。為了進一步探討魚針草內酯促使肺癌細胞凋亡，是否也藉由活化了創蛋白酶。實驗以不同濃度魚針草內酯處理 A549 (0、10、20 μM)和 H1299 細胞 (0、5、10 μM)經 48 小時後，收集細胞及萃取蛋白質後，以創蛋白酶活性分析套組測定創蛋白酶-3、-8 及 -9 的活性 (Ac-DEVD-AFC 為 蛋白酶-3 之螢光受體, Ac-LETD-AFC 為蛋白酶-8 之螢光受體; Ac-LEHD-AFC 為蛋白酶-9 之螢光受體)。結果顯示，A549 和 H1299 細胞分別處理 10 及 5 μM 濃度之魚針草內酯經過 48 小時後，創蛋白酶-3、-8 及 -9 的活性均顯著上升，隨著處理濃度增加，創蛋白酶活性也隨之增加(圖 8)。

此外，當肺癌細胞預先處理 50 μM 之創蛋白酶抑制劑(Z-DEVD-FMK為創蛋白酶-3抑制劑；Z-IETD-FMK為創蛋白酶-8抑制劑；Z-LEHD-FMK為創蛋白酶-9抑制劑) 1小時後，再以魚針草內酯處理48小時，利用TUNEL檢測分析螢光強度，藉以評估魚針草內酯造成細胞DNA斷裂凋亡之情形。結果顯示細胞預先處理創蛋白酶抑制劑後，明顯減少魚針草內酯所造成DNA斷裂之現象(圖9)。由於創蛋白酶-8的活

化，是專屬外源性細胞凋亡途徑；而創蛋白酶-9的活化，則為內源細胞凋亡途徑專一性，而本實驗結果顯示在魚針草內酯處理肺癌細胞後，創蛋白酶-8和創蛋白酶-9明顯都被激活，這些數據顯示魚針草內酯觸發A549和H1299細胞凋亡的作用，包括內源性和外源性凋亡途徑都參與其中。

前人研究證據顯示，粒線體是內在凋亡途徑的中心調控因子，而 Bcl-2 家族成員在內源性凋亡途徑中具有關鍵作用 (Youle and Strasser, 2008)。此外，由配體結合死亡受體 (ligand-bound death receptors) 激活外源性凋亡途徑，該受體主要包括 TNF-TNFR1，FasL-Fas 和 TRAIL-DR4 或 -DR5 受體 (Guicciardi and Gores, 2009)。為了釐清與魚針草內酯引發的細胞凋亡相關的分子，通過西方墨點轉漬法確定這些抗凋亡 (anti-apoptotic) 和促凋亡 (pro-apoptotic) 蛋白分子的表現情形。實驗結果顯示，魚針草內酯顯著增加促凋亡蛋白 Bax，PUMA 和 DR5 的表現量，同時降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 的表現量 (圖 10)。

四、魚針草內酯激發活性氧分子刺激的 DNA 損傷信號傳導路徑

活性氧分子 (Reactive oxygen species, ROS) 是正常代謝產物，或是由於暴露於外在化學物質所產生 (xenobiotic exposure) 的。活性氧分子對組織和細胞有益或有害，取決於濃度。在生理濃度較低時，活性氧分子在細胞內作為信號傳導和調節“氧化還原信使” (redox messengers) 的作用；而過量的活性氧分子，誘導細胞大分子的氧化修飾並促進細胞死亡 (Circu and Aw, 2010)。前人研究顯示魚針草內酯增進人類口腔鱗狀細胞癌 Ca9-22 細胞中的活性氧分子產生，並且誘發細胞凋亡 (Hou et al., 2009)。因此，為了加以確認魚針草內酯是否刺激 A549 和 H1299 細胞的細胞內活性氧分子產生，進一步利用 H2DCFDA (檢測 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2) 和 HE (檢測 superoxide anion, $\text{O}_2\cdot^-$)，來偵測魚針草內酯處理肺癌細胞後活性氧分子之變化。

兩株細胞用魚針草內酯處理 0.5, 1 和 2 小時，在細胞培養液中分別加入 $10\ \mu\text{M}$ HE 和 $5\ \mu\text{M}$ H2DCFDA 作用 30 分鐘後，以流式細胞分析儀偵測其螢光強度的變化。實驗結果顯示，魚針草內酯顯著增加 A549 和 H1299 細胞中細胞內過氧化氫/羥基自由基的含量，而細胞內超氧自由基 ($\text{O}_2\cdot^-$) 的相對表現量則不受魚針草內酯的影響 (圖 11)。

先前的研究表示，活性氧分子是一種 DNA 損傷刺激物 (Salmon et al., 2004)。為了確認肺癌細胞經魚針草內酯刺激產生活性氧分子是否會造成 DNA 損傷反應，於是將 A549 和 H1299 細胞以魚針草內酯處理 24 小時，然後進行彗星分析 (comet assay) 試驗。我們發現魚針草內酯在兩種細胞株中，藥物處理造成 DNA 損傷之反應；而且隨著處理藥物劑量的增加，DNA 斷裂形成之彗星巴現象愈明顯 (圖 12，上圖)。

當細胞暴露於輻射或的化療劑時，往往引起雙股 DNA 斷裂 (DSB, double-stranded breaks)，其迅速導致組織蛋白 H2AX 的磷酸化。由於雙股 DNA 產生斷裂時，H2AX 在 Ser-139 上的大量磷酸化 (γ -H2AX) 且反應快速、並與雙股 DNA 斷裂有很好的相關性，所以它是用於檢測 DNA 損傷和隨後修復 DNA 損傷的最敏感的標記 (Sharma et al., 2012)。當肺癌細胞 A549 和 H1299 分別 0、10、20 μ M 及 0、5、10 μ M 濃度之魚針草內酯處理 24 小時後，以 γ -H2AX 免疫螢光染色，結果顯示 (圖 12 下圖)，細胞 γ -H2AX 的螢光強度隨著處理藥物濃度增加而顯著增強。

研究報導指出，ATM/ATR 激酶是重要的 DNA 損傷傳導訊號反應調節中心 (Maréchal and Zou, 2013)，它們磷酸化各

種下游靶分子，包括 γ -H2AX，CHK1 和 CHK2，並因此導致細胞週期停滯和凋亡(Kastan and Bartek, 2004a)。因此，檢測了魚針草內酯對 ATM/ATR 信號傳導路徑分子的影響。由西方墨點法分析魚針草內酯給藥處理肺癌細胞 24 小時後，除了誘導 A549 及 H1299 細胞其磷酸化的-ATM^{Ser1981} 及-ATR^{Ser428} 激酶表現量顯著增加外，並且還導致磷酸化的-CHK1^{Ser345}、-CHK2^{Thr-68}， γ -H2AX^{Ser139} 蛋白表現量增加；但是對於未磷酸化之 ATM、ATR、CHK1、CHK2 及 H2AX 等分子，其蛋白質層次表現則無影響（圖 13）。

為了進一步確定 ATM/ATR 激酶活化在魚針草內酯誘導的 DNA 斷裂及造成凋亡所扮演之角色，肺癌細胞先以 ATM/ATR 之抑制劑咖啡因 (caffeine, 2 μ M) 處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μ M、H1299 細胞 10 μ M) 24 小時，進行細胞週期分佈分析。實驗結果顯示，咖啡因本身對於肺癌細胞生長週期無影響(A549 及 H1299 G2/M 期分別為 6.8% 及 14.8%)；當處理魚針草內酯後，G2/M 期所佔比例顯著增加；而有添加咖啡因抑制劑及魚針草內酯之處理組，A549 細胞其 G2/M 期則由單獨處理魚針草內酯 40.1%降為 28.5%、而 H1299 細胞 G2/M 期比例，則由 45.4%降為

33.6% ，結果顯示咖啡因可以阻止魚針草內酯誘導的細胞週期 G2/M 期阻滯現象(圖 14)。此外，以同樣條件咖啡因及魚針草內酯處理肺癌細胞 48 小時後，利用 TUNEL 分析進行細胞凋亡檢測，實驗結果顯示，單獨咖啡因處理對肺癌細胞凋亡無影響；當細胞處理魚針草內酯與預先處理咖啡因後添加藥物組比較，咖啡因顯著降低凋亡細胞 (A549 由 78%降至 42%、 H1299 由 82%降至 48%)(圖 15)。這些結果證明了魚針草內酯影響 A549 和 H1299 細胞中的 ATM/ATR 信號傳導途徑，進而導致細胞週期停滯和細胞凋亡。

五、活性氧分子(ROS)作為魚針草內酯誘導肺癌細胞週期 G2/M 期停滯和凋亡的上游調節因子

為了確認細胞內活性氧分子的產生，是否在內質網誘導的細胞週期阻滯和細胞凋亡中發揮重要作用，將 A549 和 H1299 細胞用 0.5 μ M 抗氧化劑 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 預處理 1 小時，然後再添加魚針草內酯培養 24 小時 (用於細胞週期分佈分析) 和 48 小時 (用於凋亡檢測)，分別用流式細胞儀及 TUNEL 染色方法加以分析。結果顯示，單獨用 N-乙酰半胱氨酸處理肺癌細胞，不影響肺

癌細胞生長週期及造成細胞凋亡情形；用 N-乙酰半胱氨酸預處理組，顯著抑制了使用魚針草內酯誘導產生的 G2/M 期停滯(A549 由 53.1%降至 17.4%， H1299 由 46.8%降至 25.2%) (圖 16)、以及所引起之細胞凋亡現象(A549 由 66%降至 8%， H1299 由 72%降至 12%) (圖 17)，闡明活性氧分子的產生內酯誘導的 G2/M 期阻滯所需的並且細胞凋亡。

同時，還藉由西方墨點轉漬法檢測了 N-乙酰半胱氨酸對 ATM/ATR 信號分子、調節細胞週期以及細胞凋亡等相關分子蛋白層次的影響。由實驗結果顯示，肺癌細胞單獨處理 N-乙酰半胱氨酸，對於有或無磷酸化之 ATM、ATR、CHK1、CHK2、 γ -H2AX 及 H2AX 等分子的蛋白表現量，幾乎無影響；當預處理 N-乙酰半胱氨酸後，對於由魚針草內酯處理細胞，誘導其磷酸化-ATM^{Ser1981}、-ATR^{Ser428}、-CHK1^{Ser345}、-CHK2^{Thr-68} 及 γ -H2AX^{Ser139} 等分子蛋白表現量增加之情形，顯著地抑制以上分子活化之現象；但是對於未磷酸化之 ATM、ATR、CHK1、CHK2 及 H2AX 等分子，則幾乎無影響 (圖 18)。

至於與細胞週期 G2/M 期調節相關分子，肺癌細胞先以 N-乙酰半胱氨酸抗氧化劑 (NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然

後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μ M、H1299 細胞 10 μ M) 處理 24 小時後，收集細胞萃取蛋白，以西方墨點法分析 CDK1、Cyclin B1 及 CDC25C 等相關分子的蛋白表現量。魚針草內酯處理肺癌細胞所造成 CDK1、Cyclin B1 及 CDC25C 表現量降低之情形，當預處理 N-乙酰半胱氨酸再以魚針草內酯處理後，顯著地增加 CDK1、Cyclin B1 以及 CDC25C 受抑制之現象(圖 19)。

此外，魚針草內酯處理肺癌細胞所造成降低抗凋亡分子 Bcl-2 蛋白、並增加促凋亡蛋白 Bax 和 DR5 蛋白表現，當添加用抗氧化劑 N-乙酰半胱氨酸再處理魚針草內酯處理時，顯著地增加抗凋亡分子 Bcl-2 的蛋白表現量、並降低促凋亡蛋白 Bax 和 DR5 的表現量 (圖 20)。這些數據表明，在 A549 和 H1299 細胞中，活性氧分子刺激的信號傳導途徑，是促成魚針草內酯誘導的 DNA 損傷信號傳導、細胞週期 G2/M 期停滯、以及造成細胞凋亡主要調節因子。

六、魚針草內酯誘導肺癌細胞的細胞週期 G2/M 期停滯和凋亡調控不需要 p53 基因參與

越來越多的證據表明，腫瘤抑制因子 p53 在化療藥物誘

導的細胞週期停滯和凋亡中扮演著重要的角色(Lee and Bernstein, 1995)。在本研究中，我們發現魚針草內酯在 A549 (野生型 p53 基因) 和 H1299 (無 p53 基因) 細胞系中誘導 G2/M 期阻滯和凋亡 (圖 1)。為了釐清 p53 在魚針草內酯誘導肺癌細胞週期停滯和凋亡中所扮演之作用，檢測了魚針草內酯對去除 p53 基因(knockdown) 之 A549 細胞系 A549/p53-shRNA 中，對於細胞週期和細胞死亡的影響。分別以 0、10 及 20 μM 濃度之魚針草內酯處理已進行去除 p53 基因之 A549 細胞(A549/p53-shRNA)及載體對照組(A549/shRNA) A549 細胞 24 小時後，以流式細胞儀分析細胞週期。實驗結果顯示，在載體對照組 (A549/shRNA) 中，隨著藥物處理濃度增加，G2/M 期所占比例為 20.2%、26.6%、及 48.8%；而在去除 p53 基因 A549 細胞(A549/p53-shRNA)部分，其 G2/M 期所占比例分別為 21.3%、28.3%、及 44.8%，在有或無 p53 基因兩組細胞間幾乎無差異 (圖 21)。此外，去除 p53 基因及對照組兩細胞株，分別以 0、10 及 20 μM 魚針草內酯處理 48 小時後，再以 TUNEL 染色分析細胞凋亡情形，實驗結果如圖 22 所示，在載體對照組 (A549/shRNA) 中，隨著藥物處理濃度增加，凋亡細胞比例為 3%、46%、及 78%；在去

除 p53 基因 A549 細胞 (A549/p53-shRNA) 部分，細胞凋亡比例則為 4%、53%、及 81%，兩者表現情形一致。

至於 p53 基因的表現，與魚針草內酯造成肺癌細胞活性氧分子訊號傳導、細胞週期 G2/M 期停滯、以及細胞凋亡調控因子等，分析之間的關聯性。分別以 0、10 及 20 μM 及 0、5 及 10 μM 濃度之魚針草內酯，處理去除 p53 基因 A549 細胞 (A549/p53-shRNA) 以及載體對照組 (A549/shRNA)，利用西方墨點轉漬分析相關蛋白表現。實驗結果如圖 23，在去除 p53 基因之 A549 細胞 (A549/p53-shRNA) 部分，幾乎無 p53 的表現、而且 p21 蛋白表現量也極低；但是在對照組部分，隨著藥物處理濃度增加，p53 及 p21 的蛋白表現量顯著隨之增加。在有或無剔除 p53 基因兩組細胞中，磷酸化-ATM^{Ser1981}、磷酸化-ATR^{Ser428}、磷酸化-CHK1^{Ser345}、磷酸化-CHK2^{Thr-68}， γ -H2AX^{Ser139} 等蛋白表現量，隨著處理藥物濃度增加而增加；G2/M 期相關分子 CDC25C 及 Cyclin B1，其表現量則隨著藥物濃度增加而降低。魚針草內酯處理肺癌細胞所造成降低抗凋亡分子 Bcl-2 及 Mcl-1 蛋白、並增加促凋亡蛋白 Bax、PUMA 和 DR5 蛋白的表現量，在有無 p53 基因存在之兩細胞株中，表現趨勢一致。

第五章 討論

衛生福利部公告105年國人死因統計，惡性腫瘤繼續蟬聯首位，其中肺癌除了在十大惡性腫瘤中排行第一外，台灣癌症基金會統計公告，肺癌佔醫療支出、死亡率、晚期發現比例，皆屬最高。每年世界上死於肺癌的病人高達數以百萬計，在美國平均每四個人就有一人死於肺癌(Siegel et al., 2013)。對於不同類型及期別的肺癌已有相對的有效治療方法應付，例如手術切除、放射治療、化療、免疫系統治療等。隨着現代醫療科技的進步與改善，不同藥物合併化療對肺癌產生顯著的療效；同時，大眾對傳統中草藥治療癌病的認識日益增加，許多中草藥的有效成分進一步的被分離出來，對於藥物之開發及分子作用機轉探討頗有助益(Zhang et al., 2013)。

金劍草 (*Anisomeles indica*) 是一種用於傳統治療藥物的芳香類植物，作為補品和驅風劑以及胃痛，消化不良和間歇性發熱等用途(Cross et al., 1987)，也具有抗發炎之特性(Jones, 1987; Rao et al., 2009)。從金劍草植物中分離出幾種活性成分，包括： β -谷甾醇 (β -sitosterol)、魚針草內酯 (ovatodiolide)、芹菜素 (apigenin)、 β -谷甾醇-3-O- β -D-葡

葡萄糖苷 (β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside) 等，均被證實有調節免疫功能及輔助調節血壓之功效(K. Baranwal et al., 2012)。其中魚針草內酯為雙萜類純物質，在金劍草萃取純化物中，為最重要之活性分子之一 (Chen et al., 2008; Liao et al., 2012)。相關研究顯示，在人類乳腺癌MCF-7細胞中，金劍草之水萃純化物藉由NF- κ B/AP-1傳導途徑、抑制MMP-9活性，進而抑制癌細胞轉移能力(Liao et al., 2012)。此外，魚針草內酯也被證明具有抑制幽門螺桿菌誘導發炎的潛力(Jones, 1987)；魚針草內酯也被證實可以抑制過敏原誘導的骨髓衍生的樹突狀細胞(dendritic cell)的成熟和Th2細胞分化的誘導，有助於開發魚針草內酯作為免疫調節治療輔助劑 (Rao et al., 2013)。

對於魚針草內酯的抗癌活性研究，只有少數報導並提供了有限的證據來說明其分子機制。先前的研究指出，魚針草內酯在人乳腺癌MDA-MB-231細胞中，經由抑制PI3K/Akt，p38-MAPK，JNK和NF- κ B信號傳導途徑來降低MMP-9活性來抑制轉移能力(Lin et al., 2011)。魚針草內酯直接降低 β -catenin活性、抑制其訊號傳導路徑，進而抑制人類腎癌細胞的腫瘤發生，並且魚針草內酯與標靶藥物sorafenib或sunitinib具有協同作用，克服腎臟惡性腫瘤之耐藥性(Ho et al., 2013)。

在人類口腔鱗狀細胞癌 Ca9-22 細胞中，魚針草內酯可誘導細胞週期 G2/M 期停滯和促進細胞凋亡(Hou et al., 2009)。在本研究中，我們發現魚針草內酯藉由激活人肺癌 A549 和 H1299 細胞中的 ATM/ATR 和 CHK1/2 信號途徑，觸發活性氧分子介導的細胞週期 G2/M 期停滯和細胞凋亡。

細胞週期為細胞進行有絲分裂的過程，當正常細胞受到外來壓力，例如：基因損害，會激活細胞週期檢查點(Kastan and Bartek, 2004b)。正常細胞即停止進入下一階段並將基因修復，修復成功後才能繼續下一階段；相反的若基因修復失敗，則會啟動細胞凋亡機制，避免產生受損的基因(Sherr, 1996)。但是許多的癌細胞其抑制細胞週期的基因常發生突變，例如：P53、RB 和 LKB1 等而失去功能，導致細胞持續過度增生，累積過多錯誤基因，最終造成癌化 (Muller and Vousden, 2013)。

中斷細胞週期進行被認為是消除癌細胞的重要方法之一(Waldman et al., 1997)。真核細胞週期進程受激活劑（細胞週期蛋白，CDK，CDC25 等）和抑制劑（INK 和 CIP/KIP 家族及 p53 等）之間相互作用的嚴格控制(Boonstra and Post, 2004)。CDK1 / Cyclin B1 激酶是使細胞週期從 G2 期進入 M 期的主要調節因子，在 G2 期，CDK25 藉由在 Thr14 / 15 處的去磷酸化作用被 CDC25C 激活；並且在 Thr14

/ 15 處經由磷酸化，被 WEE1 和 MYT1 蛋白激酶抑制活性(Bulavin et al., 2003; Weinert, 1997)。 CDC25C 是控制細胞週期 G2/M 期轉換的關鍵蛋白，也是檢測點途徑的一個重要因素，可以在 DNA 損傷反應中被激活(Abraham, 2001)。由 DNA 損傷觸發的 ATM 的活化，導致抑制 CHK1、CHK2 的活化以及 CDC25C 的降解；此外 CDC25C 抑制 CDK1，進而引起細胞週期 G2/M 期停滯(Abraham, 2001)。

其中週期素依賴性激酶 (Cycline-dependent kinase, CDKs) 為調控細胞週期重要的分子，因此學者認為如果能抑制 CDKs，即可以選擇性的破壞癌細胞的細胞週期，使得癌細胞死亡，CDKs 被認為是有潛力的抗癌標靶。目前 CDKs 抑制劑仍處於實驗室研究或臨床試驗階段，例如 Seliciclib，一種小分子嘌呤類藥物，可抑制 CDK2、CDK7、CDK9，用於治療非小細胞肺癌，目前處於臨床二期試驗階段；Flavopiridol (Alvocidib) 一種半合成的黃酮類藥物，第一個進行臨床試驗的 CDK 抑制劑，其作用機制為競爭 CDKs 的 ATP 結合位點，抑制 CDKs 的活性，在腎細胞癌、非小細胞肺癌、大腸直腸癌和胃癌完成臨床一期試驗(Shapiro, 2006)。

在本研究中，A549 和 H1299 細胞以魚針草內酯處理後，分別顯著增加磷酸化-ATM^{Ser1981}、-ATR^{Ser428}、-CHK1^{Ser345}、-CHK2^{Thr68} 等蛋白分子的活化。 ATM/ATR 和 CHK1/2 訊號傳遞路徑的激活，導致

磷酸化-CDC25C^{Ser216}，其抑制 CDK1 / Cyclin B1 激酶活性，然後在 G2/M 期觸發細胞週期停滯。

p21^{WAF1/CIP1} 在魚針草內酯處理 A549 和 H1299 細胞後表現量上升，可能是魚針草內酯在藥物處理中，造成細胞週期 G2/M 期停滯的另一個影響因子。p21^{WAF1/CIP1} 是一種常見的 CDKs 抑制劑，可阻斷不同類型癌細胞的細胞週期 G2/M 期進展(Kim, 2015; Liberio et al., 2015)。據報導，DNA 損傷信號，藉由 p53 依賴性、和非 p53 依賴性訊號傳遞路徑，促進 p21^{WAF1/CIP1} 表現量增加，進而觸發 G2 期中的細胞週期停滯(Dvory-Sobol et al., 2006; Han et al., 2012; Sugimoto et al., 2006)。因應 DNA 損傷， p21^{WAF1/CIP1} 是藉由降解 cyclin B1，導致 Cyclin B1/CDK1 激酶失去活性，進而導致細胞週期 G2 期停滯的關鍵因子(Gillis et al., 2009)。

本研究的數據顯示，魚針草內酯誘導的 DNA 損傷和 p21^{WAF1/CIP1} 表現量增加，伴隨著降低 cyclin B1 蛋白的表現量和抑制 CDK1 活性，以及 G2/M 期細胞週期停滯;然而，Cyclin B1 mRNA 表現量並未受到影響，說明了魚針草內酯誘導肺癌細胞細胞週期在 G2/M 期的停滯，部分是經由 p21^{WAF1/CIP1} 介導的 Cyclin B1 / CDK1 激酶經由促使 Cyclin B1 降解而失活。總體而言，本研究結果顯示，魚針草內酯藉由降低 Cyclin B1 蛋白表現量和 CDK1 活性的失活，促使 A549 和 H1299 細

胞中停滯於 G2/M 期；其藉由調升 p21^{WAF1/CIP1} 表現量及調降 CDC25C 的表現量而作用。值得注意的是，在 A549 (p53 野生型) 和 H1299 (無 p53 型) 細胞中，都觀察到 p21^{WAF1/CIP1} 的過度表現量，以及促使細胞週期停滯於 G2/M 期，這表明魚針草內酯介導的 p21^{WAF1/CIP1} 表現量增加和 G2/M 期停滯，無論 p53 基因存在與否都可以進行。

細胞凋亡是非常緊密程序化的細胞死亡，具有不同的生化和遺傳途徑，其在正常組織的發育和體內平衡中發揮關鍵作用(Lockshin and Williams, 1965)；它有助於消除不必要和不需要的細胞，以維持細胞存活和細胞死亡之間的平衡(Elmore, 2007)。有證據顯示，凋亡不足可能表現為癌症或自身免疫，而加速的細胞死亡在急性和慢性退行性疾病，免疫缺陷和不孕症中是明顯的。在許多壓力條件下，如癌前病變，DNA 損傷檢查點路徑的激活，可藉由細胞凋亡誘導去除可能有害的 DNA 受損細胞以阻止致癌(Halazonetis et al., 2008)。因此，凋亡信號有助於維護基因組的完整性(Fulda, 2010)，而凋亡途徑的失調不僅可以促進腫瘤發生，還可使癌細胞對治療產生耐藥性。因此，凋亡的逃避是癌症的顯著標誌(Plati et al., 2008)。實際上，癌細胞包含導致凋亡信號傳導受損的改變，其促進腫瘤發展和轉移(Hanahan and Weinberg, 2000)。此外，細胞凋亡是一種高度保留性的細胞自殺過程，由許多生理和病理刺激引起，包括化療和放療(Hassan et al., 2014)。哺乳動物細

胞凋亡主要分為兩類，即外源性（死亡受體依賴性）和內源性（粒線體依賴性），受多種分子機制調控，這些機制歸因於促凋亡蛋白，包括 Bax, PUMA, Bak, Fas, TNF-R 和 TRAIL-R (DR4 和 DR5) 以及抗凋亡蛋白，如 Bcl-2 和 Mcl-1(Elmore, 2007)。有證據證明細胞凋亡在腫瘤發生中起重要作用；其在癌細胞中的損傷可能導致腫瘤進展。因此，針對凋亡信號通路的治療策略，可能在抗癌方面發揮關鍵作用。據研究報導指出 魚針草內酯誘導細胞凋亡，如人類口腔鱗狀細胞癌 Ca9-22 細胞中激活創蛋白酶-3、-8 和-9 酵素活性、DNA 片段化和 PARP 切割所示(Hou et al., 2009)。同樣，在本研究的結果也顯示經由創蛋白酶-3、-8 和-9 的激活，促進了魚針草內酯誘導的 A549 和 H1299 細胞凋亡。此外在圖 10 之研究結果顯示，魚針草內酯增加促凋亡蛋白 Bax、PUMA 和 DR5 的蛋白表現量；並降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 的表現量。這些實驗數據顯示魚針草內酯對於肺癌細胞是一種強有力的促凋亡劑，其可以引發不同的途徑，導致人癌細胞中的內源性和外源性凋亡細胞死亡。

許多癌症來自慢性刺激，感染或發炎反應，最近的研究顯示發炎是腫瘤進展的關鍵因素(Balkwill, 2009)。巨噬細胞經由分泌各種刺激物（如 TNF α ），在腫瘤細胞內誘導產生活性氧分子 (Storz, 2005)；由嗜中性顆粒細胞和巨噬細胞產生的活性氧分子作為殺死腫瘤細胞

的機制，已得到證實，主要在這些細胞中由 NAPDH 氧化酶介導的超氧化物形成迅速爆發，導致隨後產生過氧化氫(Babior, 1995)。此外在發炎反應過程中，活化的巨噬細胞還產生一氧化氮，與超氧化物反應產生過氧亞硝酸根，其活性與羥基自由基類似，並有助於腫瘤細胞凋亡(Cui et al., 1994)。而誘導細胞內活性氧分子的產生，是一些抗癌藥物或放射療法殺死癌細胞的重要機制之一 (Verrax et al., 2009)。活性氧分子介導的氧化壓力(oxidative stress)可損傷細胞之組成分子，包括 DNA 和蛋白質等。DNA 損傷誘導是許多數肺癌治療劑的主要作用機制(Helleday, 2008)。細胞通過其相應的修復機制，修復 DNA 損傷；當累積大量的 DNA 修復失敗，可能導致其轉化為雙股 DNA 斷裂，最終引發細胞週期停滯和細胞死亡。越來越多的證據證明活性氧分子可以藉由激活各種氧化壓力敏感的細胞內信號通路 (oxidative stress-sensitive intracellular signaling pathways)，如 ATM/ATR，CHK1/2 和 JNK (Sahu et al., 2009)，影響細胞週期進程和凋亡。藉由誘導細胞週期 G2/M 期停滯，提高細胞內活性氧分子濃度；增加 ATM^{Ser1981}，ATR^{Ser428}，CHK1^{Ser345}，CHK2^{Thr68} 的磷酸化蛋白質，以及降低 CDC25C 蛋白質表現量，與抑制癌細胞增殖有關 (O'Reilly et al., 2007; Sun et al., 2007)。前人研究顯示魚針草內酯經由干擾口腔鱗狀細胞癌細胞中的細胞內氧化還原平衡(redox balance)，觸發細胞週期 G2/M 期停滯和

凋亡 (Hou et al., 2009)。在本研究中，我們發現魚針草內酯誘導的細胞週期 G2/M 期停滯和凋亡現象，伴隨著活性氧分子的增加；此外，魚針草內酯顯著誘導肺癌細胞 DNA 損傷(圖 12)，並且伴隨 ATM^{Ser1981}、ATR^{Ser428}、CHK1^{Ser345}，及 CHK2^{Thr68} 等磷酸化蛋白表現量增加(圖 13)。功能上，我們發現 ATM/ATR 信號傳導是魚針草內酯介導的細胞週期停滯和凋亡的原因。在 A549 和 H1299 細胞中藉由預處理 ATM/ATR 抑制劑咖啡因，有效地抑制魚針草內酯介導的細胞週期停滯和細胞凋亡(圖 14)。此外，活性氧分子產生在魚針草內酯介導的細胞和分子事件中的主要作用，藉由添加抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)抑制 ATM/ATR 和 CHK1/2 活化，減少 p21^{WAF1/CIP1}、CDC25C、PUMA、Bax 和 DR5 的表達，以及完全阻斷 G2/M 期停滯和細胞凋亡。因此，綜合以上研究結果，在人類肺癌 A549 和 H1299 細胞中，由魚針草內酯誘導產生的細胞週期 G2/M 期停滯、和活化 ATM/ATR 訊號傳導路徑及其下游分子引起的細胞凋亡，受激活的活性氧分子扮演著關鍵和調節作用。

第六章 結論

關於用魚針草內酯處理肺癌細胞株 A549 和 H1299 之分子作用機制研究，實驗結果顯示，經由刺激細胞內活性氧分子的產生並誘導 DNA 損傷，隨後激活 ATM/ATR 和 CHK1/2 訊號路徑，抑制 CDC25C 和 p21^{WAF1/CIP1}，抑制 CDK1 /Cyclin B1 複合物活性，最終導致細胞週期 G2/M 期停滯。同時，活性氧分子激活 ATM/ATR 和 CHK1/2 訊號路徑，導致抗凋亡分子 Bcl-2 和 Mcl-1 表達下降、促凋亡分子 PUMA、Bax、DR5 等分子表現量增加；並藉由活化創蛋白酶-3，創蛋白酶-8 和創蛋白酶-9 來調節內源性和外源性凋亡性細胞死亡（圖 24），這與肺癌細胞中的 p53 基因存在與否並無關連。總體而言，本研究結果提供了魚針草內酯在體外抑制肺癌細胞生長和誘導細胞死亡中的機制作用，並且為進一步研究魚針草內酯體內表徵其肺癌的預防和治療潛力提供了基礎。

參考文獻

1. Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development* 15, 2177-2196.
2. Babbs, C.F., and Steiner, M.G. (1990). Simulation of free radical reactions in biology and medicine: a new two-compartment kinetic model of intracellular lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 8, 471-485.
3. Babior, B.M. (1995). The respiratory burst oxidase. *Current Opinion in Hematology* 2, 55-60.
4. Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer* 9, 361-371.
5. Booher, R.N., Holman, P.S., and Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* 272, 22300-22306.
6. Boonstra, J., and Post, J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337, 1-13.
7. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
8. Brambilla E, T.W. (2014). Lung cancer. In: *World Cancer Report*, Stewart BW, Wild CP (Eds). World Health Organization, Lyon
9. Brooks, G., Poolman, R.A., and Li, J.M. (1998). Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc Res* 39, 301-311.
10. Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Demidenko, Z.N., Meek, S., Graves, P., Phillips, C., Zhao, H., Moody, S.A., Appella, E., Piwnicka-Worms, H., *et al.* (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nat Cell Biol* 5, 545-551.
11. Bunn, P.A., Jr., and Carney, D.N. (1997). Overview of chemotherapy for small cell lung cancer. *Semin Oncol* 24, S7-69-S67-74.
12. Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death.

Annu Rev Immunol 16, 395-419.

13. Chen, Y.L., Lan, Y.H., Hsieh, P.W., Wu, C.C., Chen, S.L., Yen, C.T., Chang, F.R., Hung, W.C., and Wu, Y.C. (2008). Bioactive membrane diterpenoids of *Anisomeles indica*. *Journal of natural products* 71, 1207-1212.
14. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355.
15. Church, D.F., and Pryor, W.A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 64, 111-126.
16. Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine* 48, 749-762.
17. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., and Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107, 526-545.
18. Cui, S., Reichner, J.S., Mateo, R.B., and Albina, J.E. (1994). Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer research* 54, 2462-2467.
19. Curnutte, J.T., and Babior, B.M. (1987). Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet* 16, 229-297.
20. Das, K., and Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2.
21. Draetta, G.F. (1994). Mammalian G1 cyclins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 842-846.
22. Driscoll, J.S., Hazard, G.F., Jr., Wood, H.B., Jr., and Goldin, A. (1974). Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives. *Cancer Chemother Rep* 2 4, 1-362.
23. Dvory-Sobol, H., Cohen-Noyman, E., Kazanov, D., Figer, A., Birkenfeld, S., Madar-Shapiro, L., Benamouzig, R., and Arber, N. (2006). Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *European journal of cancer* 42, 422-426.
24. E Bredesen, D. (2009). Neurodegeneration in Alzheimer's disease: Caspases and synaptic element interdependence, Vol 4.

25. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.
26. Elroy-Stein, O., Bernstein, Y., and Groner, Y. (1986). Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *Embo J* 5, 615-622.
27. Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T., and Ruoslahti, E. (1996). Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science* 271, 499-502.
28. Fang, G., Chang, B.S., Kim, C.N., Perkins, C., Thompson, C.B., and Bhalla, K.N. (1998). "Loop" domain is necessary for taxol-induced mobility shift and phosphorylation of Bcl-2 as well as for inhibiting taxol-induced cytosolic accumulation of cytochrome c and apoptosis. *Cancer Res* 58, 3202-3208.
29. Fattaey, A., and Booher, R.N. (1997). Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog Cell Cycle Res* 3, 233-240.
30. Fridman, J.S., Parsels, J., Rehemtulla, A., and Maybaum, J. (2001). Cytochrome c depletion upon expression of Bcl-XS. *J Biol Chem* 276, 4205-4210.
31. Fulda, S. (2010). Evasion of Apoptosis as a Cellular Stress Response in Cancer. *International Journal of Cell Biology* 2010, 6.
32. Gillis, L.D., Leidal, A.M., Hill, R., and Lee, P.W.K. (2009). p21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. *Cell Cycle* 8, 253-256.
33. Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
34. Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal* 23, 1625-1637.
35. Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319, 1352-1355.
36. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246, 501-514.
37. Han, J., Kim, S., Yang, J.H., Nam, S.J., and Lee, J.E. (2012). TPA-induced p21

- expression augments G2/M arrest through a p53-independent mechanism in human breast cancer cells. *Oncol Rep* 27, 517-522.
38. Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., and White, E. (1996). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev* 10, 461-477.
 39. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70.
 40. Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
 41. Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., and Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International* 2014, 150845.
 42. Hazlewood, C., and Davies, M.J. (1995). Damage to DNA and RNA by tumour promoter-derived alkoxyl radicals: an EPR spin trapping study. *Biochem Soc Trans* 23, 259S.
 43. Helleday, T. (2008). Amplifying tumour-specific replication lesions by DNA repair inhibitors - a new era in targeted cancer therapy. *European journal of cancer* 44, 921-927.
 44. Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
 45. Hengartner, M.O., Ellis, R.E., and Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.
 46. Ho, J.Y., Hsu, R.J., Wu, C.L., Chang, W.L., Cha, T.L., Yu, D.S., and Yu, C.P. (2013). Ovatodiolide Targets beta-Catenin Signaling in Suppressing Tumorigenesis and Overcoming Drug Resistance in Renal Cell Carcinoma. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 161628.
 47. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.
 48. Hou, Y.Y., Wu, M.L., Hwang, Y.C., Chang, F.R., Wu, Y.C., and Wu, C.C. (2009). The natural diterpenoid ovatodiolide induces cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma Ca9-22 cells. *Life sciences* 85, 26-32.
 49. Huang, T.C., Hsieh, C. F., Boufford, D. E., Kuoh, C. S., Ohashi, H., Peng, C. I.,

- Tsai, J. L., Yang, K. C., Hsiao, A., Tsai, J. M. (2003). *Flora of Taiwan*, 2nd Eds. National Science Council of the Republic of China, Taipei, 437-448.
50. Hunter, T., and Pines, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* *79*, 573-582.
 51. Ishizaki, Y. (1998). [Physiological functions of programmed cell death]. *Seikagaku* *70*, 365-370.
 52. Jacobs, T. (1992). Control of the cell cycle. *Developmental Biology* *153*, 1-15.
 53. Jaeschke, H. (1995). Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* *209*, 104-111.
 54. Johnson, T.M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., and Finkel, T. (1996). Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 11848-11852.
 55. Jones, G.R. (1987). Dysbaric osteonecrosis (caisson disease of bone): are active oxygen species and the endocrine system responsible, and can control of the production of free radicals and their reaction products confer protection? *Free Radic Res Commun* *4*, 139-147.
 56. Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4997-5002.
 57. K. Baranwal, V., Irchhaiya, R., and Singh, S. (2012). *Anisomeles indica*: an overview, Vol 3.
 58. Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004a). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316-323.
 59. Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004b). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316.
 60. Kastan, M.B., Canman, C.E., and Leonard, C.J. (1995). P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* *14*, 3-15.
 61. Kelekar, A., and Thompson, C.B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* *8*, 324-330.
 62. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* *26*, 239-257.

63. Kim, J., Choi, H., Lee, H., Shin, J., Shin, D., Choi, J., Lee, Y. S., Lee, K. (2015). Resveratrol analogue (E)-8-acetoxy-2-[2-(3,4-diacetoxyphenyl)ethenyl]-quinazoline induces G2/M cell cycle arrest through the activation of ATM/ATR in human cervical carcinoma HeLa cells. *Oncology Reports*, 2639-2647.
64. King, R.W., Jackson, P.K., and Kirschner, M.W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.
65. Korsmeyer, S.J. (1992). Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 15, 105-118.
66. Kroemer, G., and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
67. Lee, J.M., and Bernstein, A. (1995). Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer metastasis reviews* 14, 149-161.
68. Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
69. Li, X.M., and Brown, L. (2009). Efficacy and mechanisms of action of traditional Chinese medicines for treating asthma and allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123, 297-306; quiz 307-298.
70. Liao, Y.F., Rao, Y.K., and Tzeng, Y.M. (2012). Aqueous extract of *Anisomeles indica* and its purified compound exerts anti-metastatic activity through inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent MMP-9 activation in human breast cancer MCF-7 cells. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 2930-2936.
71. Liberio, M.S., Sadowski, M.C., Davis, R.A., Rockstroh, A., Vasireddy, R., Lehman, M.L., and Nelson, C.C. (2015). The ascidian natural product eusynstyelamide B is a novel topoisomerase II poison that induces DNA damage and growth arrest in prostate and breast cancer cells.
72. Liew, C.T., Li, H.M., Lo, K.W., Leow, C.K., Chan, J.Y., Hin, L.Y., Lau, W.Y., Lai, P.B., Lim, B.K., Huang, J., *et al.* (1999). High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 18, 789-795.
73. Lin, K.L., Tsai, P.C., Hsieh, C.Y., Chang, L.S., and Lin, S.R. (2011). Antimetastatic effect and mechanism of ovatodiolide in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Chemico-biological interactions* 194, 148-158.

74. Liu, Q.Y., and Stein, C.A. (1997). Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in c and bak expression. *Clin Cancer Res* 3, 2039-2046.
75. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4, 118-126.
76. Lockshin, R.A., and Beaulaton, J. (1974). Programmed cell death. *Life Sci* 15, 1549-1565.
77. Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1965). Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. *Journal of Insect Physiology* 11, 123-133.
78. Magnusson, C., and Vaux, D.L. (1999). Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol* 77, 41-46.
79. Maréchal, A., and Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a012716.
80. Martindale, J.L., and Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192, 1-15.
81. May, P., and May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18, 7621-7636.
82. McConnell, B.B., Gregory, F.J., Stott, F.J., Hara, E., and Peters, G. (1999). Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol* 19, 1981-1989.
83. McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1989). BCL-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 79-88.
84. Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology* 15, 2.
85. O'Reilly, K.M., McLaughlin, A.M., Beckett, W.S., and Sime, P.J. (2007). Asbestos-related lung disease. *American family physician* 75, 683-688.
86. Ohi, R., and Gould, K.L. (1999). Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell*

Biol 11, 267-273.

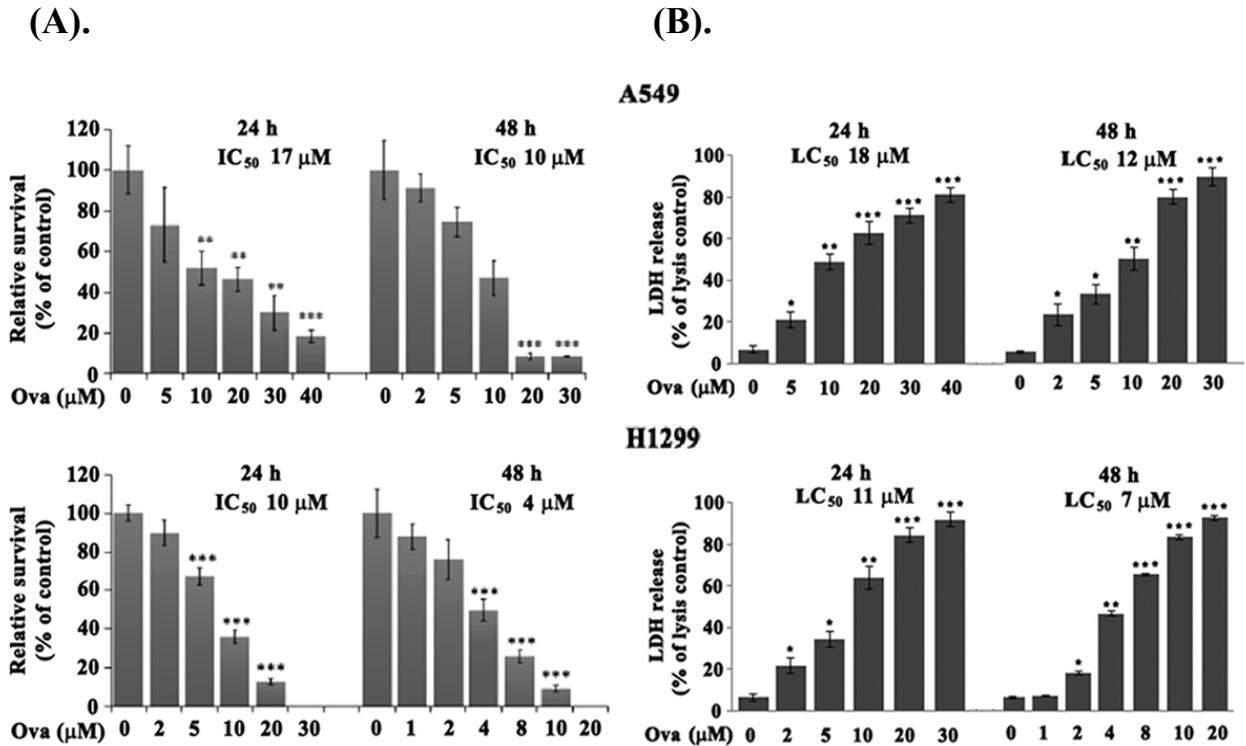
87. Otilie, S., Diaz, J.L., Horne, W., Chang, J., Wang, Y., Wilson, G., Chang, S., Weeks, S., Fritz, L.C., and Oltersdorf, T. (1997). Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *J Biol Chem* 272, 30866-30872.
88. Pines, J. (1997). Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochim Biophys Acta* 1332, M39-42.
89. Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry* 104, 1124-1149.
90. Poyer, J.L., McCay, P.B., Lai, E.K., Janzen, E.G., and Davis, E.R. (1980). Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during ¹³C-carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 94, 1154-1160.
91. Prasad, S., Soldatenkov, V.A., Srinivasarao, G., and Dritschilo, A. (1999). Intermediate filament proteins during carcinogenesis and apoptosis (Review). *Int J Oncol* 14, 563-570.
92. Prives, C., and Hall, P.A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-126.
93. Pryor, W.A. (1988). Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radic Biol Med* 4, 219-223.
94. Rao, Y.K., Chen, Y.-C., Fang, S.-H., Lai, C.-H., Geethangili, M., Lee, C.-C., and Tzeng, Y.-M. (2013). Ovatodioidide inhibits the maturation of allergen-induced bone marrow-derived dendritic cells and induction of Th2 cell differentiation. *International Immunopharmacology* 17, 617-624.
95. Rao, Y.K., Fang, S.H., Hsieh, S.C., Yeh, T.H., and Tzeng, Y.M. (2009). The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 292-296.
96. Rao, Y.K., Lien, H.-M., Lin, Y.-H., Hsu, Y.-M., Yeh, C.-T., Chen, C.-C., Lai, C.-H., and Tzeng, Y.-M. (2012). Antibacterial activities of *Anisomeles indica* constituents and their inhibition effect on *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial cells. *Food Chemistry* 132, 780-787.

97. Reed, J.C. (1997). Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell* *91*, 559-562.
98. Reed, J.C. (1999). Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* *11*, 68-75.
99. Reed, S.I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., and Slingerland, J. (1994). G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl* *18*, 69-73.
100. Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* *382*, 325-331.
101. Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 332-337.
102. Sahu, R.P., Batra, S., and Srivastava, S.K. (2009). Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *British Journal of Cancer* *100*, 1425-1433.
103. Salmon, T.B., Evert, B.A., Song, B., and Doetsch, P.W. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* *32*, 3712-3723.
104. Sandy, M.S., Moldeus, P., Ross, D., and Smith, M.T. (1986). Role of redox cycling and lipid peroxidation in bipyridyl herbicide cytotoxicity. Studies with a compromised isolated hepatocyte model system. *Biochem Pharmacol* *35*, 3095-3101.
105. Schafer, K.A. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol* *35*, 461-478.
106. Shahidul Alam, M., Quader, M.A., and Rashid, M.A. (2000). HIV-inhibitory diterpenoid from *Anisomeles indica*. *Fitoterapia* *71*, 574-576.
107. Shapiro, G.I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *24*, 1770-1783.
108. Sharma, A., Singh, K., and Almasan, A. (2012). Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol* *920*, 613-626.
109. Sheikh, M.S., and Fornace, A.J., Jr. (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* *182*, 171-181.
110. Sherr, C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* *73*, 1059-1065.

111. Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
112. Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470.
113. Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63, 11-30.
114. Simic, M.G. (1988). Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202, 377-386.
115. Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., and Fornace, A.J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266, 1376-1380.
116. Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10, 1881-1896.
117. Sugimoto, M., Gromley, A., and Sherr, C.J. (2006). Hzf, a p53-Responsive Gene, Regulates Maintenance of the G2 Phase Checkpoint Induced by DNA Damage. *Molecular and cellular biology* 26, 502-512.
118. Sun, S., Schiller, J.H., and Gazdar, A.F. (2007). Lung cancer in never smokers [mdash] a different disease. *Nature Reviews Cancer* 7, 778-790.
119. Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R., and Cohen, G.M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 5053-5060.
120. Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
121. Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
122. Tyson, J.J., Novak, B., Odell, G.M., Chen, K., and Thron, C.D. (1996). Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *Trends Biochem Sci* 21, 89-96.
123. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.

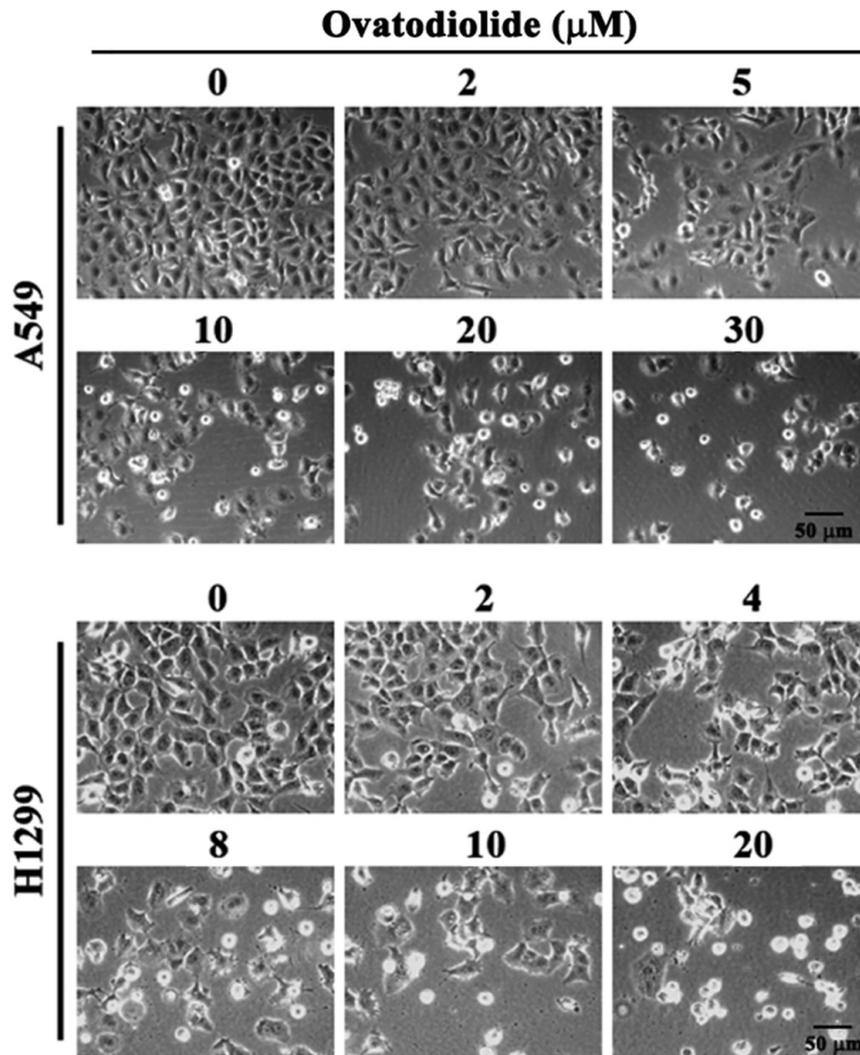
124. Verrax, J., Pedrosa, R.C., Beck, R., Dejeans, N., Taper, H., and Calderon, P.B. (2009). In Situ Modulation of Oxidative Stress: A Novel and Efficient Strategy to Kill Cancer Cells. *Current Medicinal Chemistry* 16, 1821-1830.
125. Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays Biochem* 39, 53-71.
126. Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Yu, J., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Williams, J. (1997). Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nature medicine* 3, 1034-1036.
127. Weinert, T. (1997). A DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. *Science* 277, 1450-1451.
128. Wolf, B.B., and Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274, 20049-20052.
129. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
130. Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
131. Yu, B.P., Suescun, E.A., and Yang, S.Y. (1992). Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev* 65, 17-33.
132. Zafonte, B.T., Hult, J., Amanatullah, D.F., Albanese, C., Wang, C., Rosen, E., Reutens, A., Sparano, J.A., Lisanti, M.P., and Pestell, R.G. (2000). Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 5, D938-961.
133. Zhang, A., Sun, H., and Wang, X. (2013). Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European journal of medicinal chemistry* 63, 570-577.
134. Zornig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1-37.

圖 表



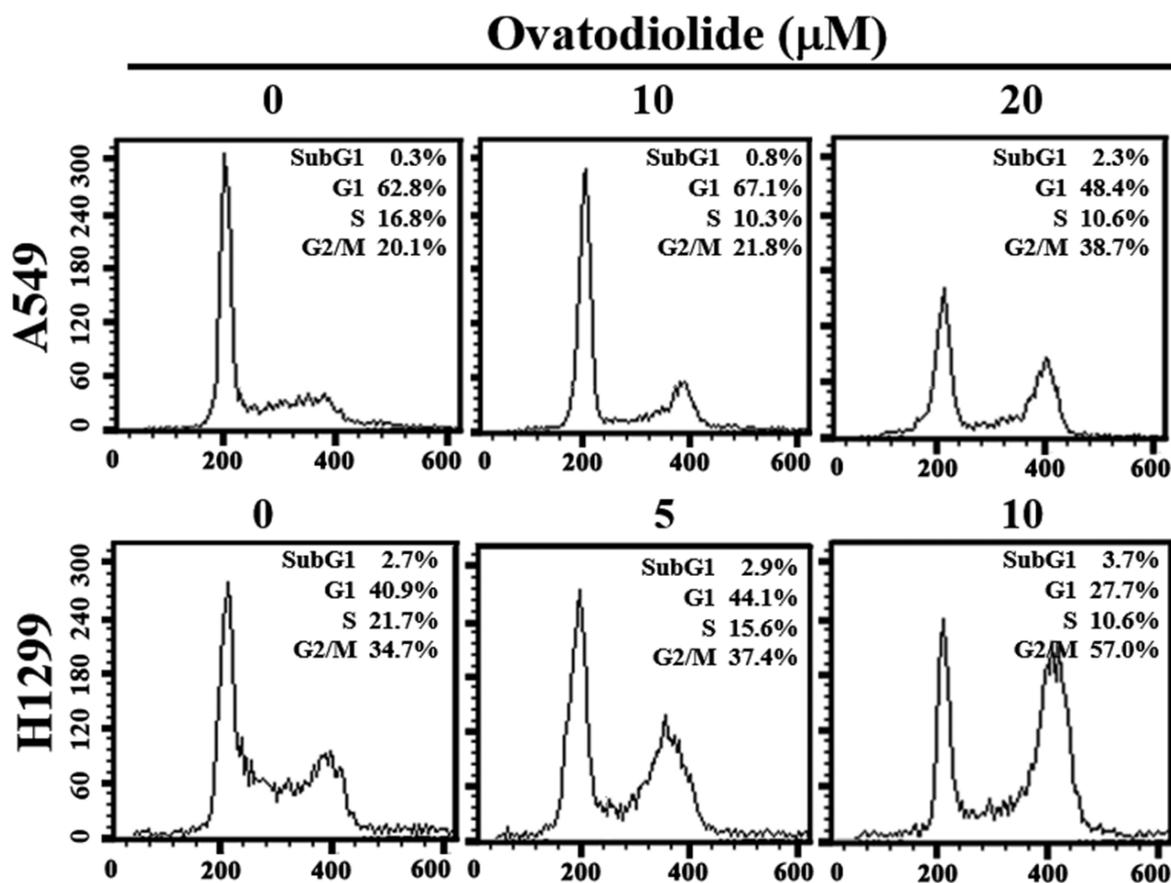
圖一、魚針草內酯抑制肺癌細胞的生長及造成細胞凋亡。

圖上 A549 (wt-p53) 及圖下 H1299 (p53 null) 肺癌細胞，分別處理不同濃度的魚針草內酯經過 24 及 48 小時後，圖左(A)：以台酚藍排除染色法 (trypan-blue exclusion assay) 測定細胞存活率，以血球計數器計算存活的細胞。數據以平均值 ± 標準差呈現，重覆進行三次獨立試驗， (*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 v.s. 控制組)。圖右 (B)：取出上清液 50 μL 至另一 96 孔盤中，之後加入 50 μL 之乳酸去氫酶分析套組 (lactate dehydrogenase assay) 受質混合液，在室溫下避光反應 30 分鐘後，加入 50 μL Stop solution 終止反應，測量 490 nm 之吸光值。



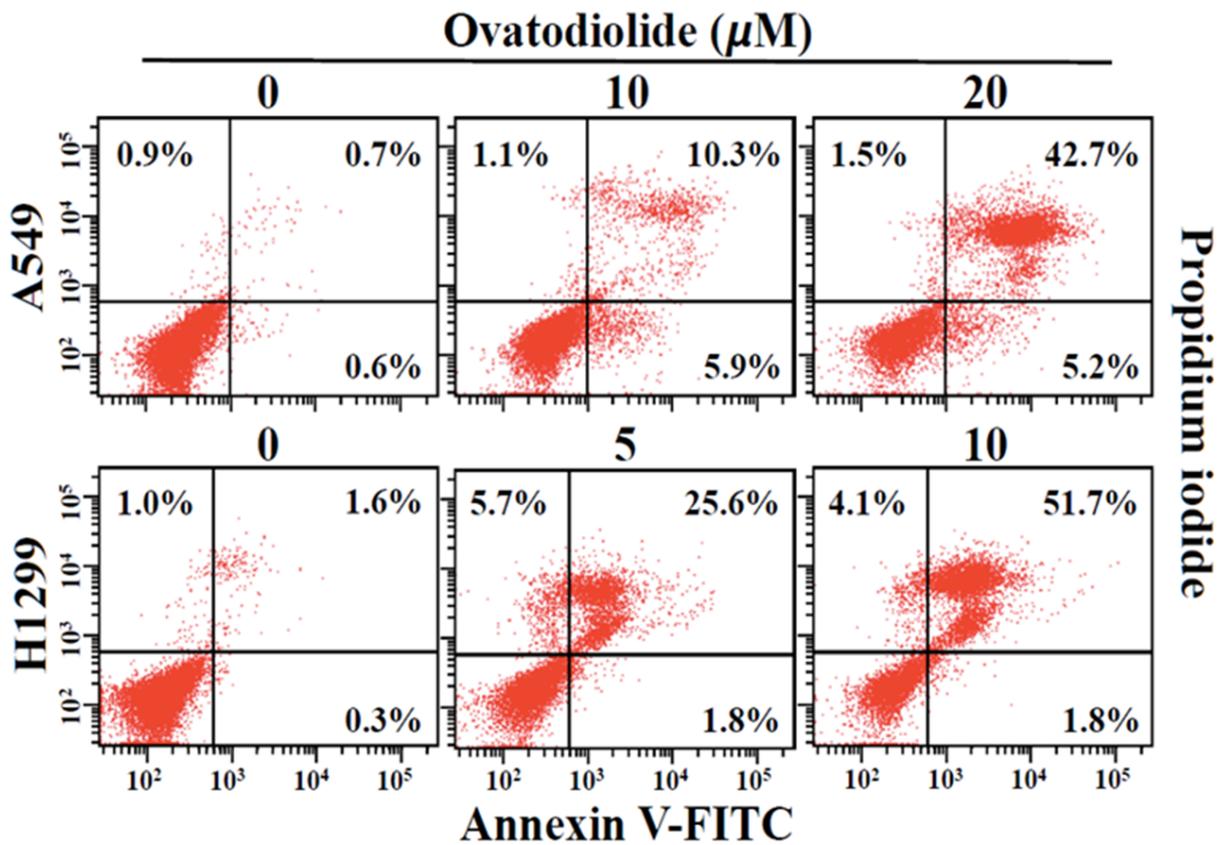
圖二、魚針草內酯對肺癌細胞生長之影響。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度(0、2、5、10、20、30 μM)和(0、2、4、8、10、20 μM)之魚針草內酯經過 24 小時後，於相位差顯微鏡下觀察細胞型態，圖中比例尺為 50 μm 。



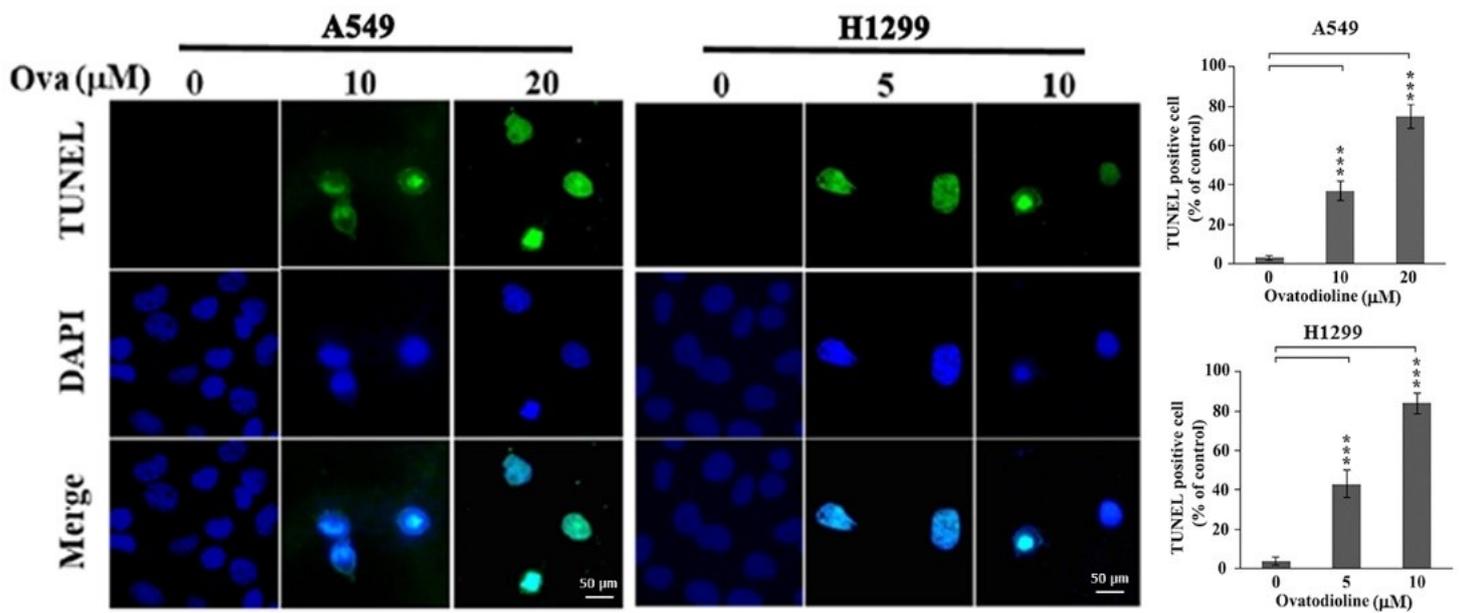
圖三、魚針草內酯造成肺癌細胞之細胞週期停滯於 G2/M 期。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理 0、10、20 μM 和 0、5、10 μM 之魚針草內酯 24 小時後，收集細胞，以碘化丙啶 propidium iodide (PI) 處理後，再以流式細胞儀分析細胞週期之分佈。隨處理魚針草內酯劑量增加，停滯於 G2/M 期之現象的細胞數目也增加。



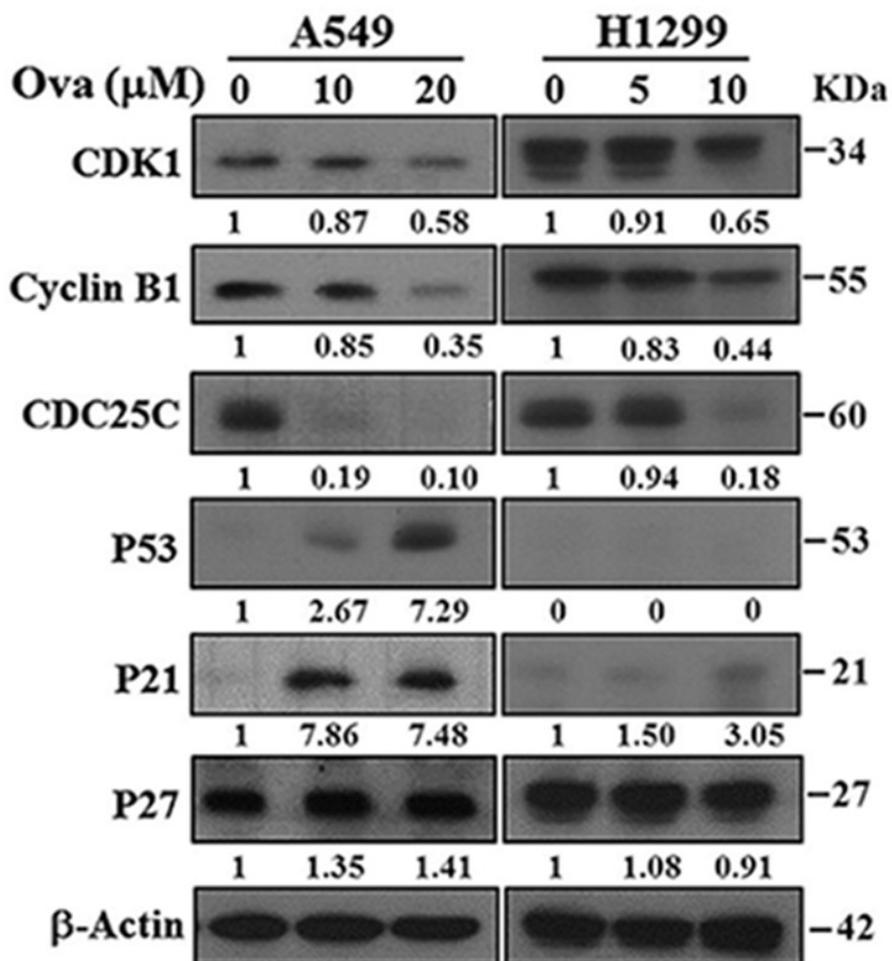
圖四、魚針草內酯誘導肺癌細胞走向凋亡。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM)和(0、5、10 μM) 之魚針草內酯經過 24 小時後，收集細胞用 Annexin V-FITC 及碘化丙啶 propidium iodide (PI) 染劑雙重染後，以流式細胞儀分析細胞凋亡現象。



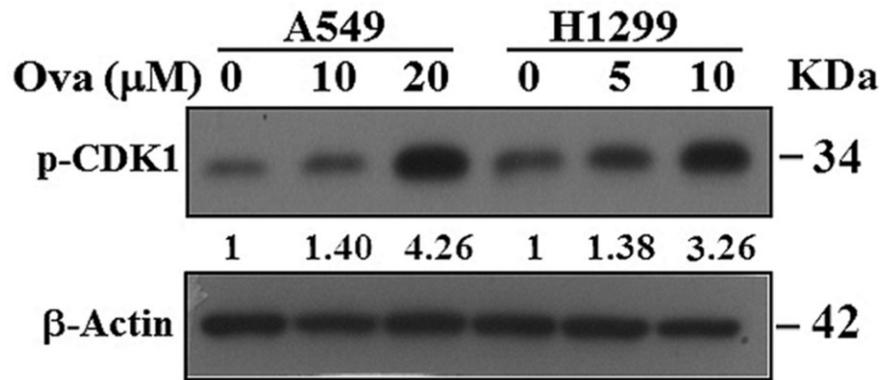
圖五、TUNEL 分析魚針草內酯誘發肺癌細胞凋亡。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM) 和 (0、5、10 μM) 之魚針草內酯 48 小時後，使用 TUNEL 分析及 DAPI 染劑於螢光顯微鏡觀察下細胞核 (藍色) 和凋亡的細胞 (綠色)。放大 400 倍；比例尺：50 μm。



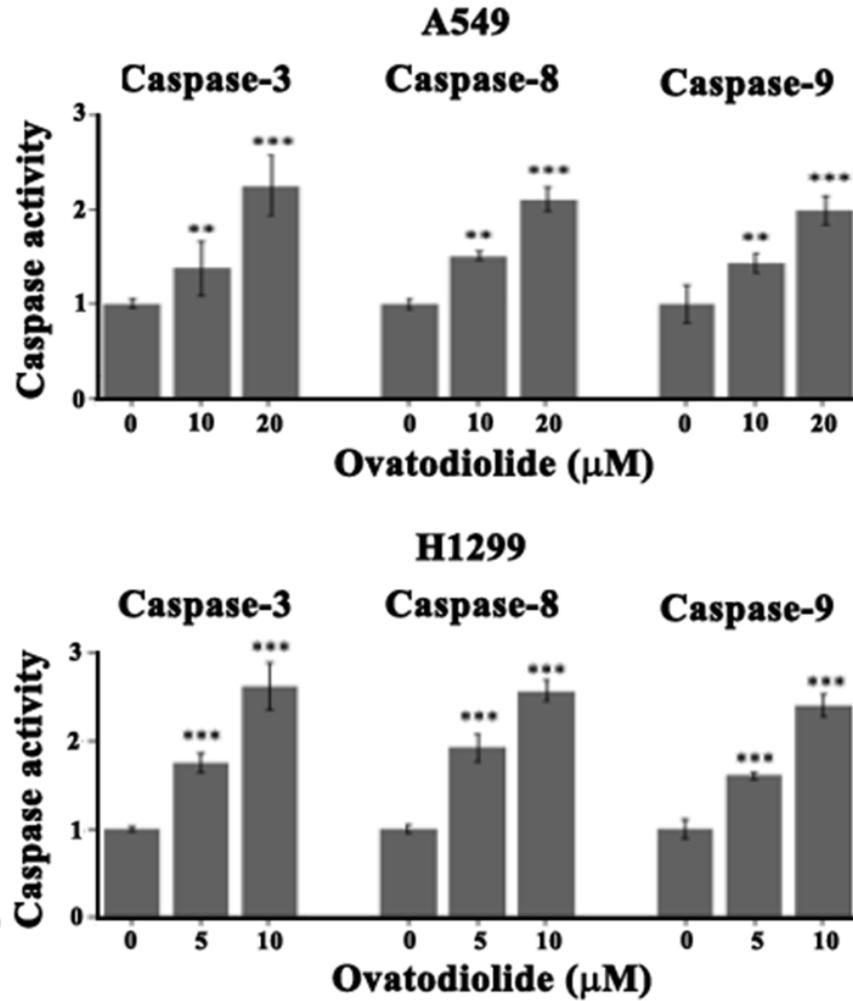
圖六、魚針草內酯調節細胞週期相關蛋白分子的表現。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM)和(0、5、10 μM)之魚針草內酯 48 小時後，萃取細胞中的蛋白質，以西方墨點法分析細胞週期 CDK1, Cyclin B1, CDC25C, P53, P21 及 P27 等特定蛋白質之表現量，並以 β -Actin 蛋白表現量，做為內部蛋白均量對照組。



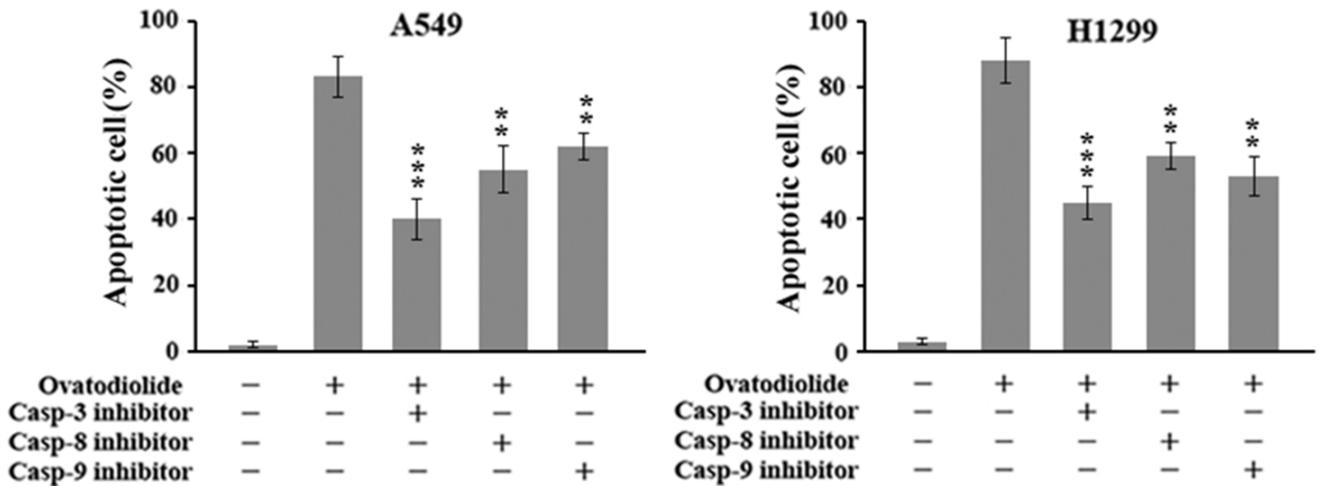
圖七、魚針草內酯調節磷酸化 CDK1 蛋白分子的表現。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM)和(0、5、10 μM)之魚針草內酯 48 小時後，萃取細胞中的蛋白質，以西方墨點法分析磷酸化-CDK1 蛋白質之表現量，並以 β -Actin 蛋白表現量，做為內部蛋白均量對照組。



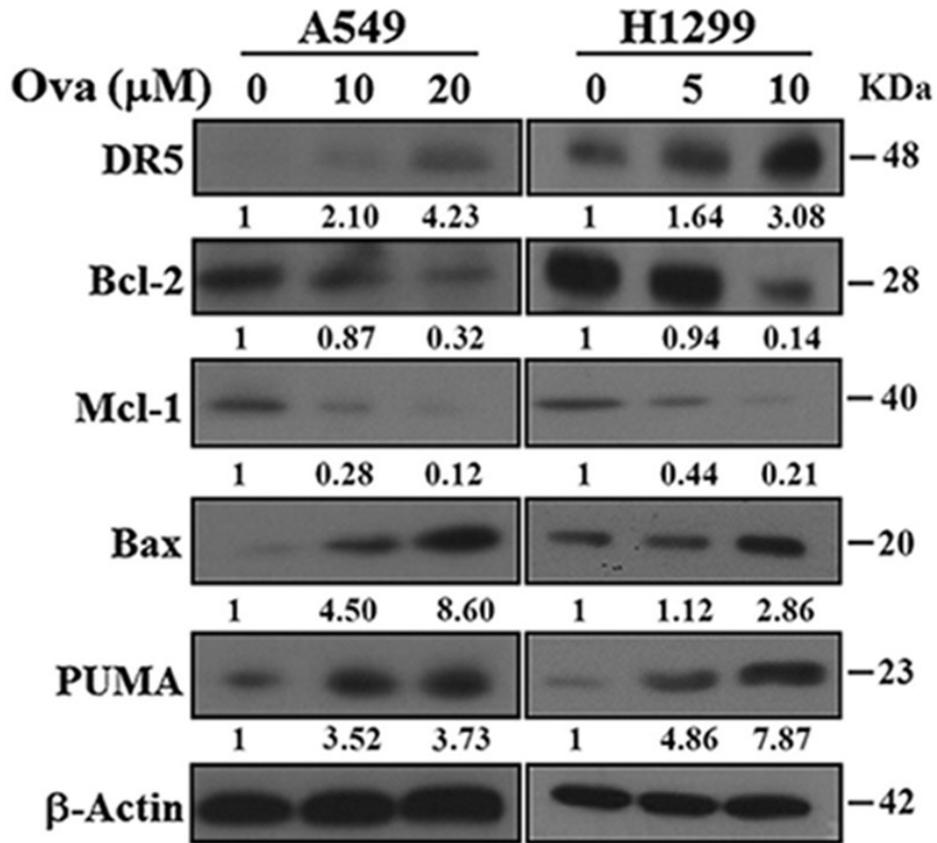
圖八、魚針草內酯激活人類肺癌細胞創酶蛋白之活性。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM)和(0、5、10 μM)之魚針草內酯 48 小時後，收集細胞萃取蛋白，取定量細胞萃取液，分別加入創酶蛋白-3、-8、以及創酶蛋白-9 的受質，偵測創酶蛋白的活性。數據以平均值 ± 標準差呈現，重覆進行三次獨立試驗。 (***) P < 0.001 和控制組比較)



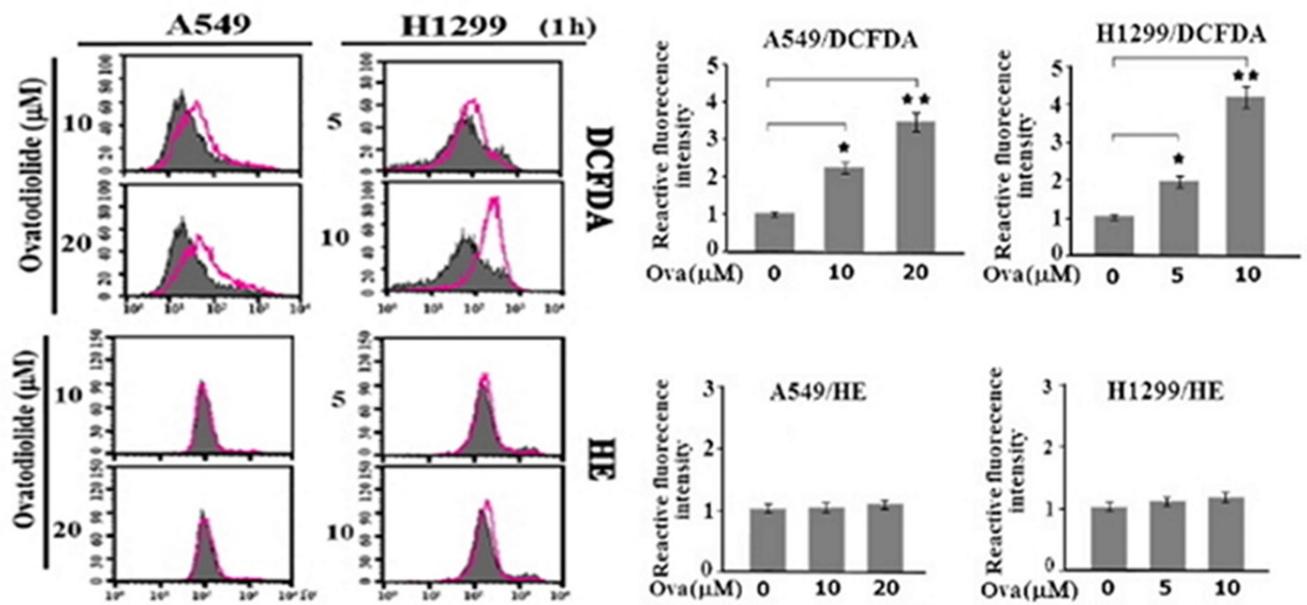
圖九、創蛋白酶抑制劑減低魚針草內酯激發肺癌細胞凋亡。

A549 和 H1299 肺癌細胞預先處理 50 μ M 之創蛋白酶抑制劑 (創蛋白酶-3 抑制劑為 Z-DEVD-FMK；創蛋白酶-8 抑制劑為 Z-IETD-FMK；創蛋白酶-9 抑制劑為 Z-LEHD-FMK) 經過 1 小時後，再添加魚針草內酯處理 48 小時，利用 TUNEL 分析螢光強度，藉以評估魚針草內酯造成細胞 DNA 斷裂凋亡之情形。數據以平均值 \pm 標準差呈現，重覆進行三次獨立試驗。 (***) $P < 0.001$ 和控制組比較)



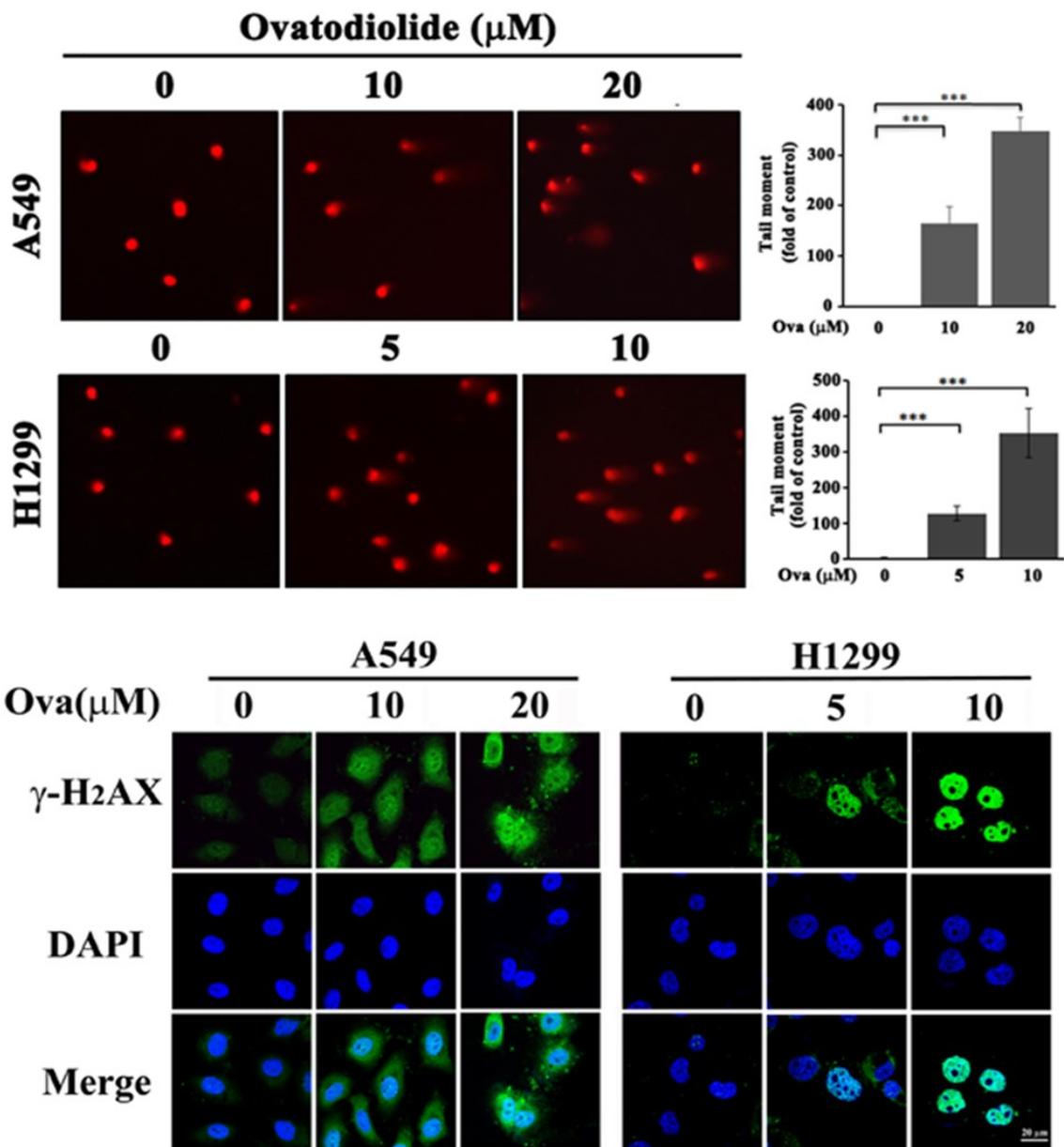
圖十、魚針草內酯調節肺癌細胞凋亡相關分子的表現。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM)和(0、5、10 μM)之魚針草內酯 48 小時後，萃取細胞中的蛋白質，以西方墨點法分析偵測 DR5、PUMA 及 Bcl-2 家族分子蛋白質之表現量。並以 β -Actin 蛋白表現量，做為內部蛋白均量對照組。



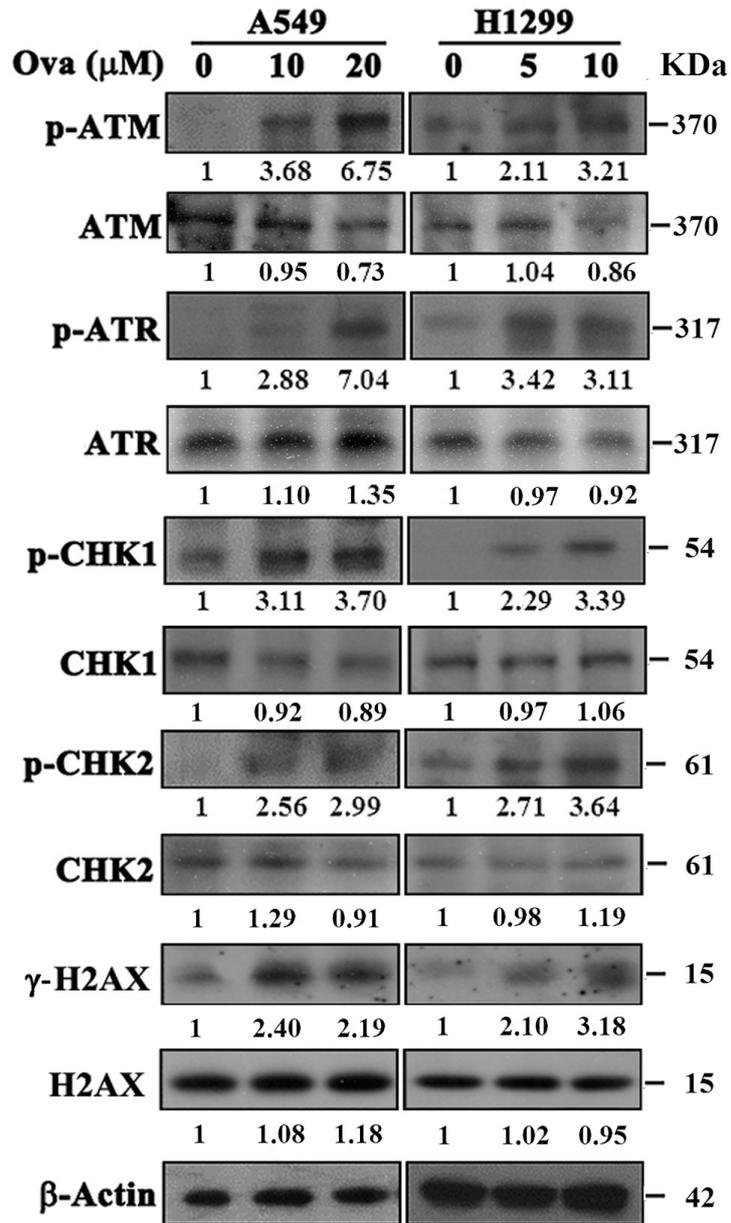
圖十一、魚針草內酯刺激肺癌細胞內活性氧分子的產生。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (10、20 μM)和(5、10 μM)之魚針草內酯 1 小時。使用 (A)偵測氫氧根離子 (DCFDA) 和 (B) 偵測超氧陰離子 (HE) 之螢光物質染色後，以流式細胞儀分析，曲線向右移動即表示螢光強度增加，(*P < 0.05, ** P < 0.01 v.s. 控制組)。



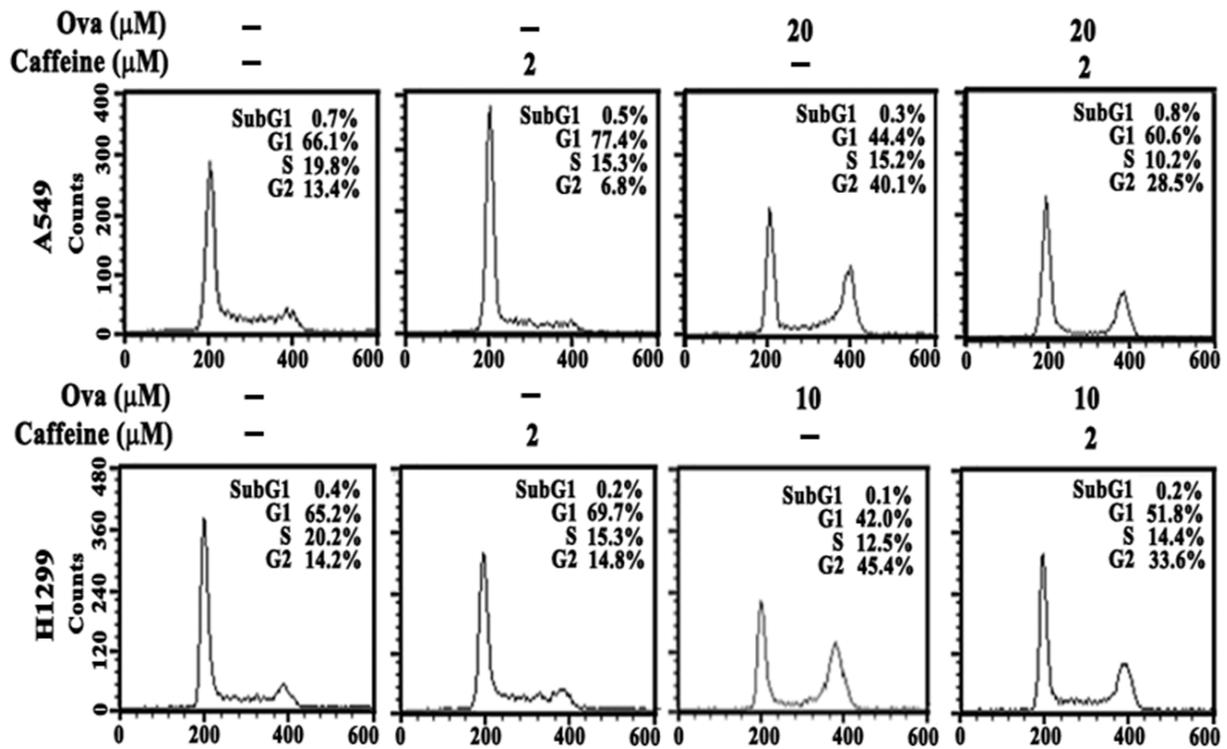
圖十二、魚針草內酯觸發肺癌細胞 DNA 損傷。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM)和(0、5、10 μM)之魚針草內酯 24 小時後，使用彗星分析法(Comet assay)處理後，細胞於螢光顯微鏡觀察 DNA 損傷的細胞。使用偵測 $\gamma\text{-H2AX}$ 抗體及 DAPI 染劑於螢光顯微鏡觀察下凋亡的細胞 (綠色)和細胞核 (藍色)。(放大 400 倍，*** $P < 0.001$ v.s. 控制組)



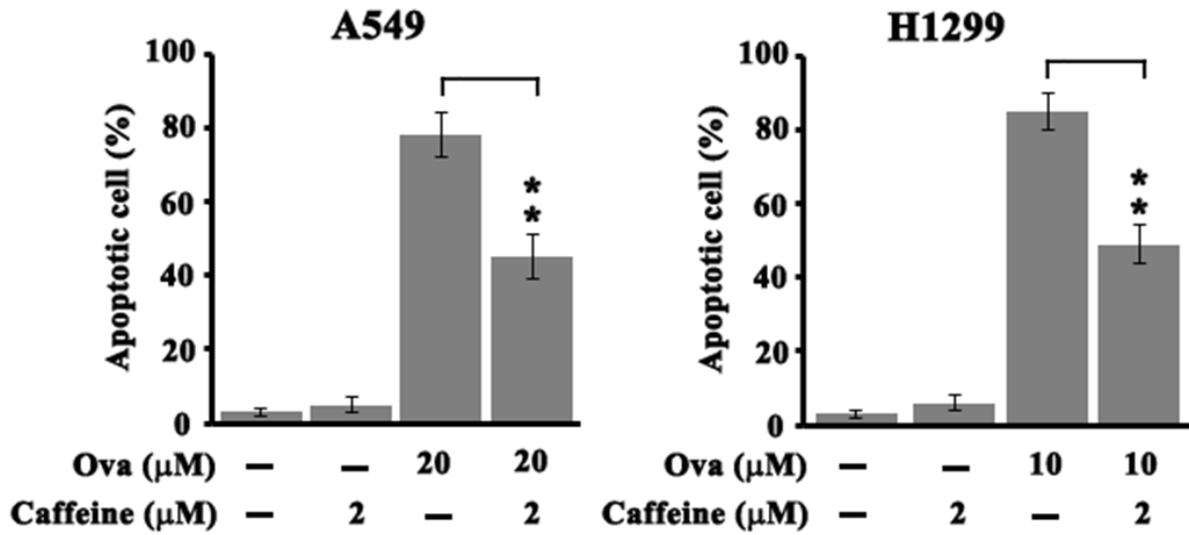
圖十三、魚針草內酯活化 ATM / ATR 訊號傳導路徑相關分子。

A549 和 H1299 肺癌細胞分別處理不同濃度 (0、10、20 μM)和(0、5、10 μM)之魚針草內酯 24 小時後，萃取細胞中的蛋白質，以西方墨點法分析偵測有或無磷酸化之 ATM, ATR, CHK1, CHK2, 以及 γ -H2AX 等蛋白之表現量。以 β -Actin 蛋白表現量，做為內部蛋白均量對照組。



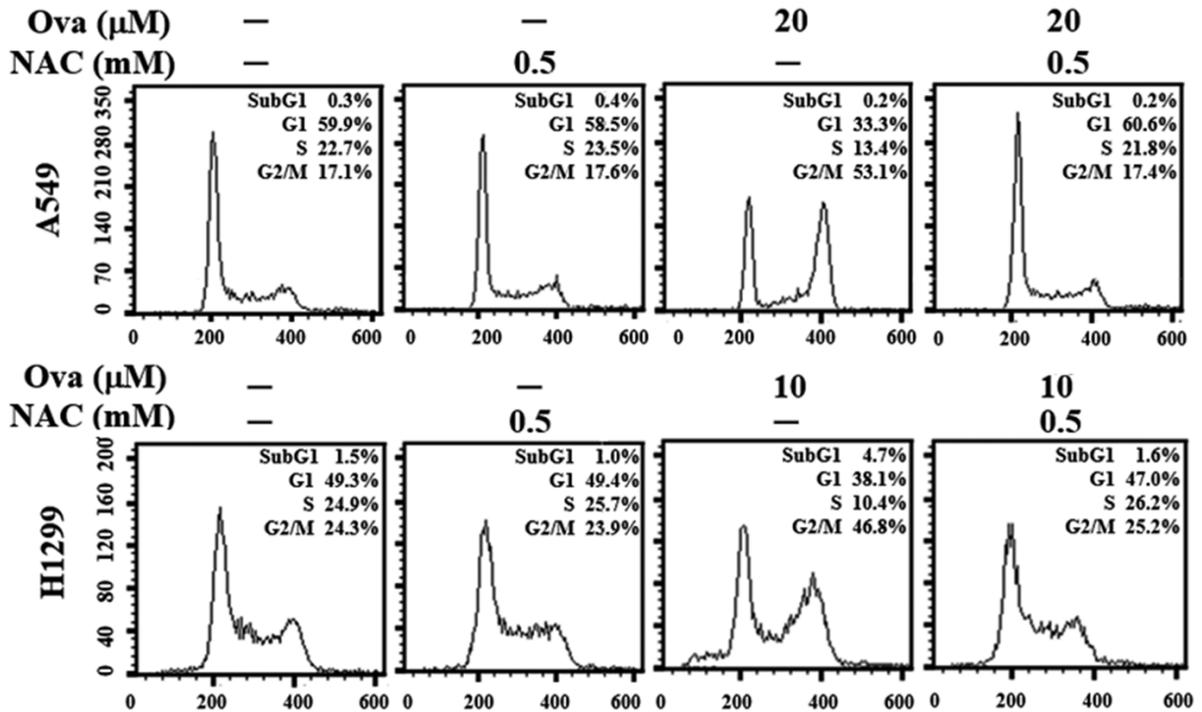
圖十四、咖啡因可減緩魚針草內酯誘發的細胞週期 G2/M 期停滯。

肺癌細胞先以 ATM/ATR 之抑制劑咖啡因(caffeine, 2 μM)處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μM、H1299 細胞 10 μM) 處理 24 小時後，收集細胞以流式細胞儀進行細胞週期分佈分析。



圖十五、咖啡因可降低魚針草內酯誘發肺癌細胞凋亡。

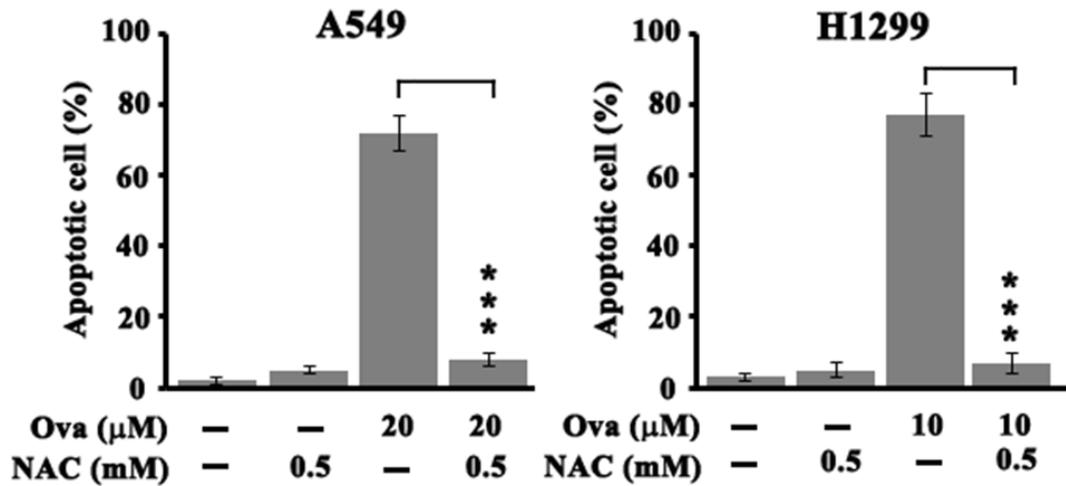
肺癌細胞先以 ATM/ATR 之抑制劑咖啡因(caffeine, 2 μM)處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μM、H1299 細胞 10 μM) 處理 48 小時後，收集細胞以 TUNEL 染色分析細胞凋亡情形。



圖十六、N-Acetyl-cysteine 可減緩魚針草內酯誘發的細胞週期 G2/M

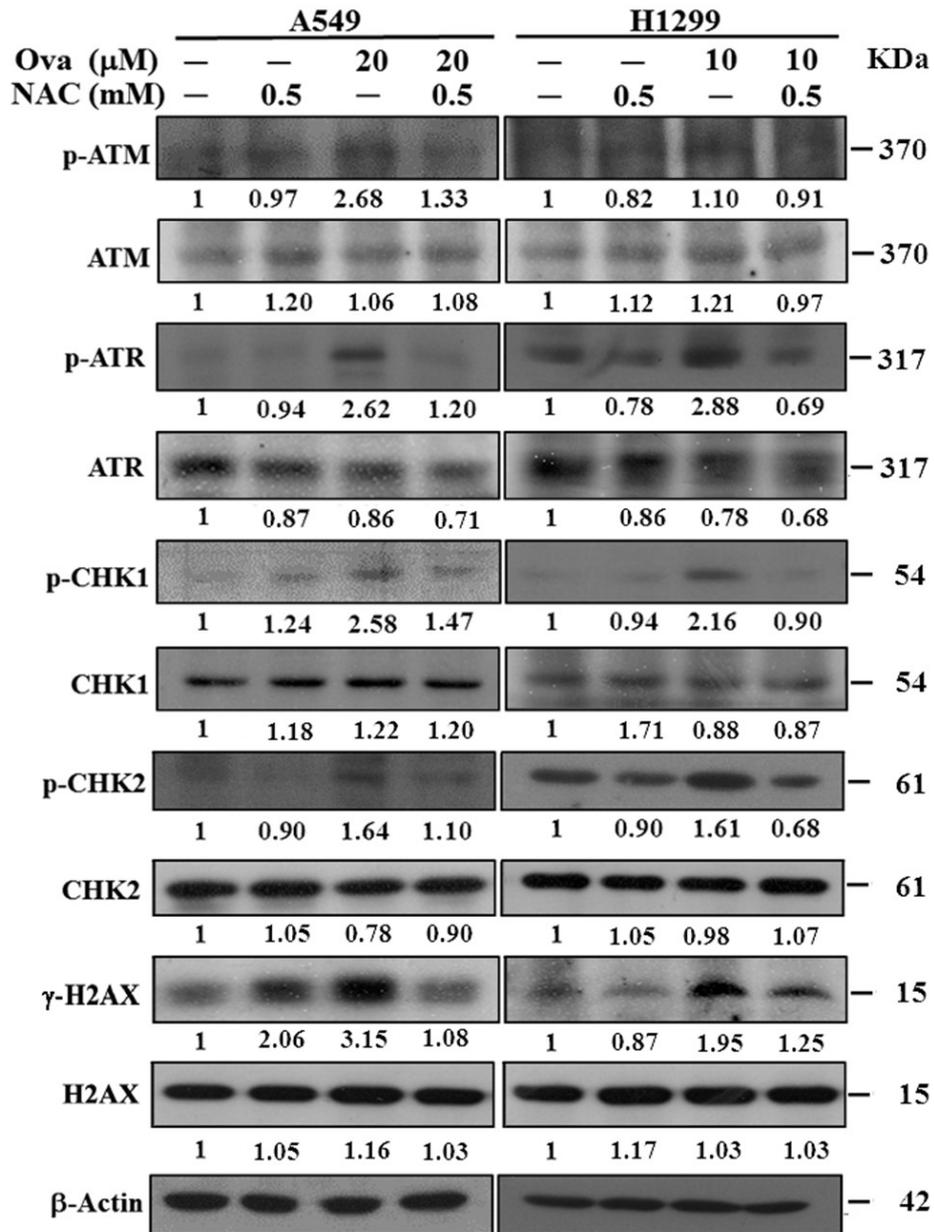
期停滯。

肺癌細胞先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μM、H1299 細胞 10 μM) 處理 24 小時後，收集細胞以流式細胞儀進行細胞週期分佈分析。



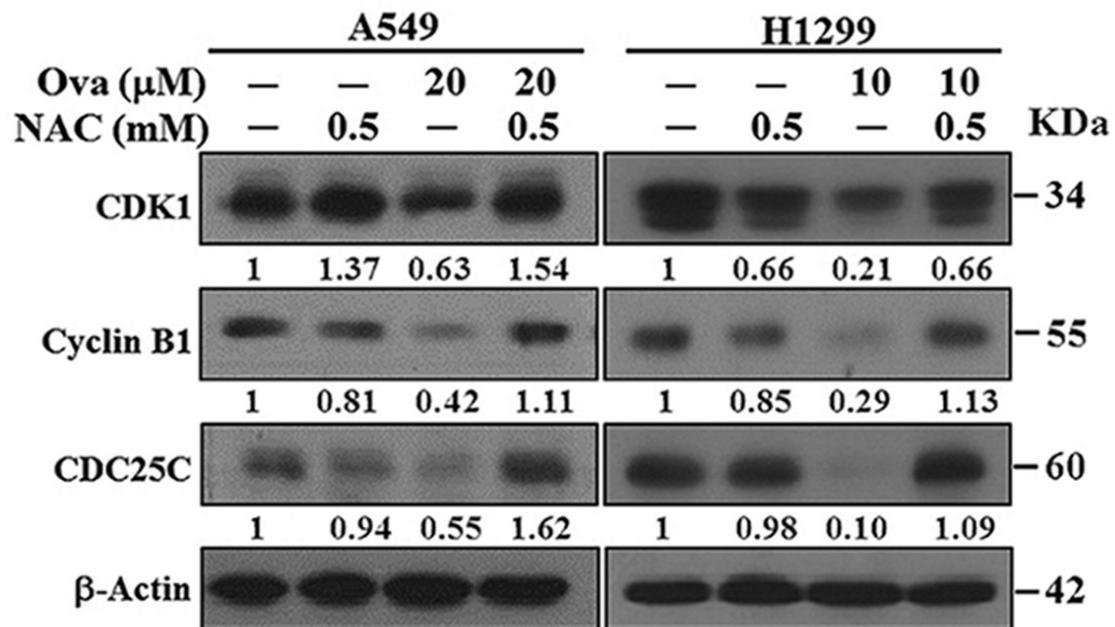
圖十七、N-Acetyl-cysteine 可降低魚針草內酯所誘發的細胞凋亡。

肺癌細胞先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM)處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μM、H1299 細胞 10 μM) 處理 48 小時後，收集細胞以 TUNEL 染色分析細胞凋亡。



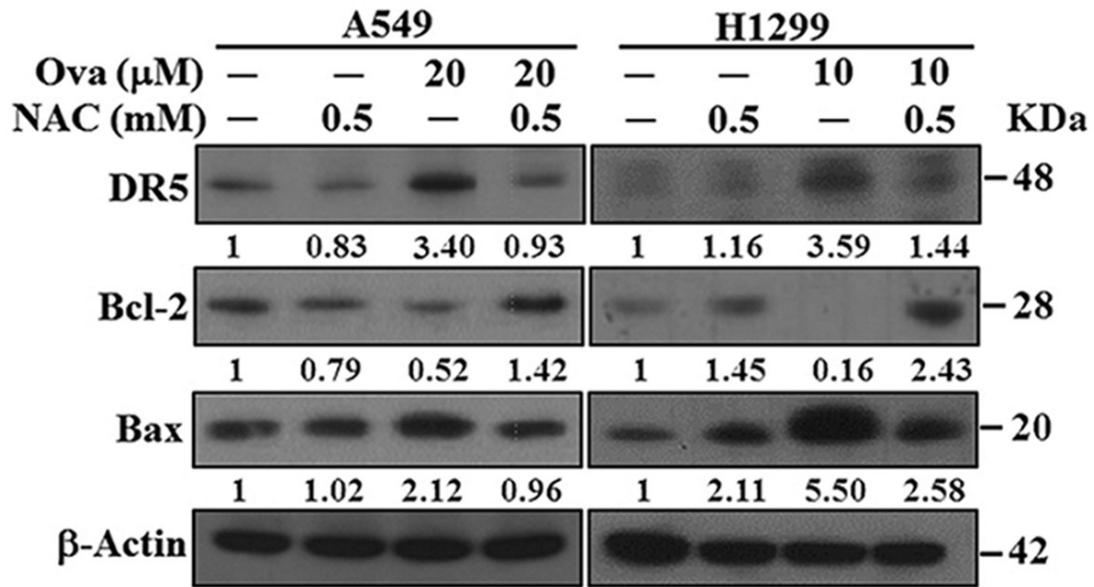
圖十八、N-Acetyl-cysteine 可減低魚針草內酯誘發 ATM/ATR 訊號途徑相關分子的活化。

肺癌細胞先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μ M、H1299 細胞 10 μ M) 處理 24 小時後，收集細胞萃取蛋白，以西方墨點法分析 ATM/ATR 訊號途徑之相關分子。



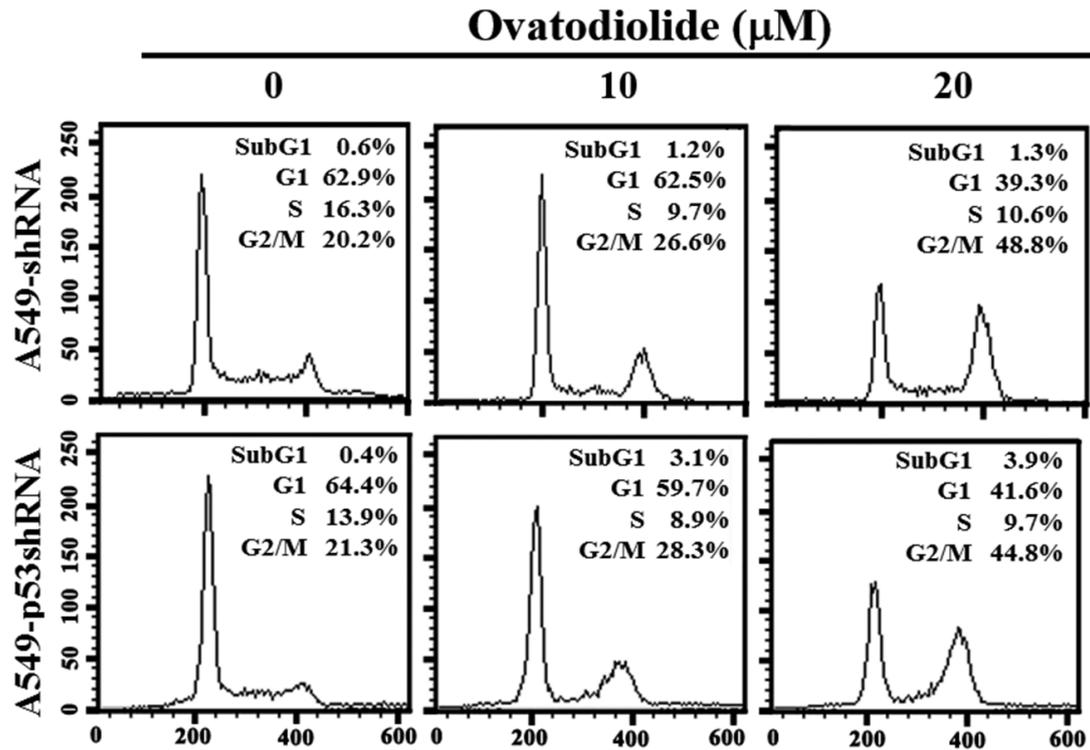
圖十九、N-Acetyl-cysteine 可回復魚針草內酯抑制細胞週期相關分子的表現。

肺癌細胞先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μM 、H1299 細胞 10 μM) 處理 24 小時後，收集細胞萃取蛋白，以西方墨點法分析 CDK1、Cyclin B1 及 CDC25C 等相關分子。



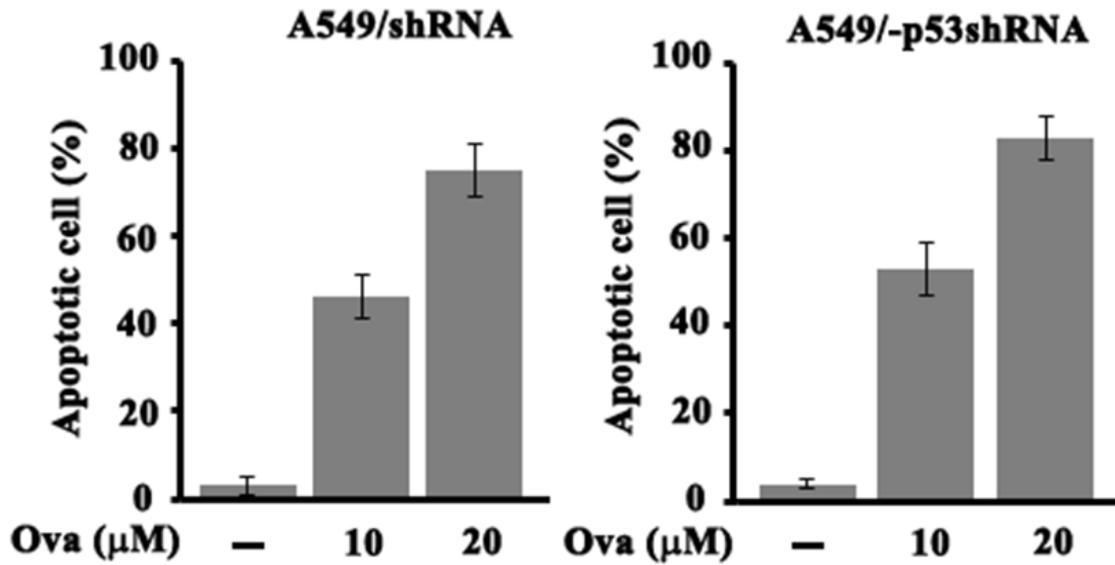
圖二十、N-Acetyl-cysteine 可回復魚針草內酯影響細胞凋亡相關分子的表現。

肺癌細胞先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然後加入魚針草內酯 (A549 細胞 20 μM 、H1299 細胞 10 μM) 處理 48 小時後，收集細胞萃取蛋白，以西方墨點法分析 DR5、Bcl-2 及 Bax 等細胞凋亡相關分子。



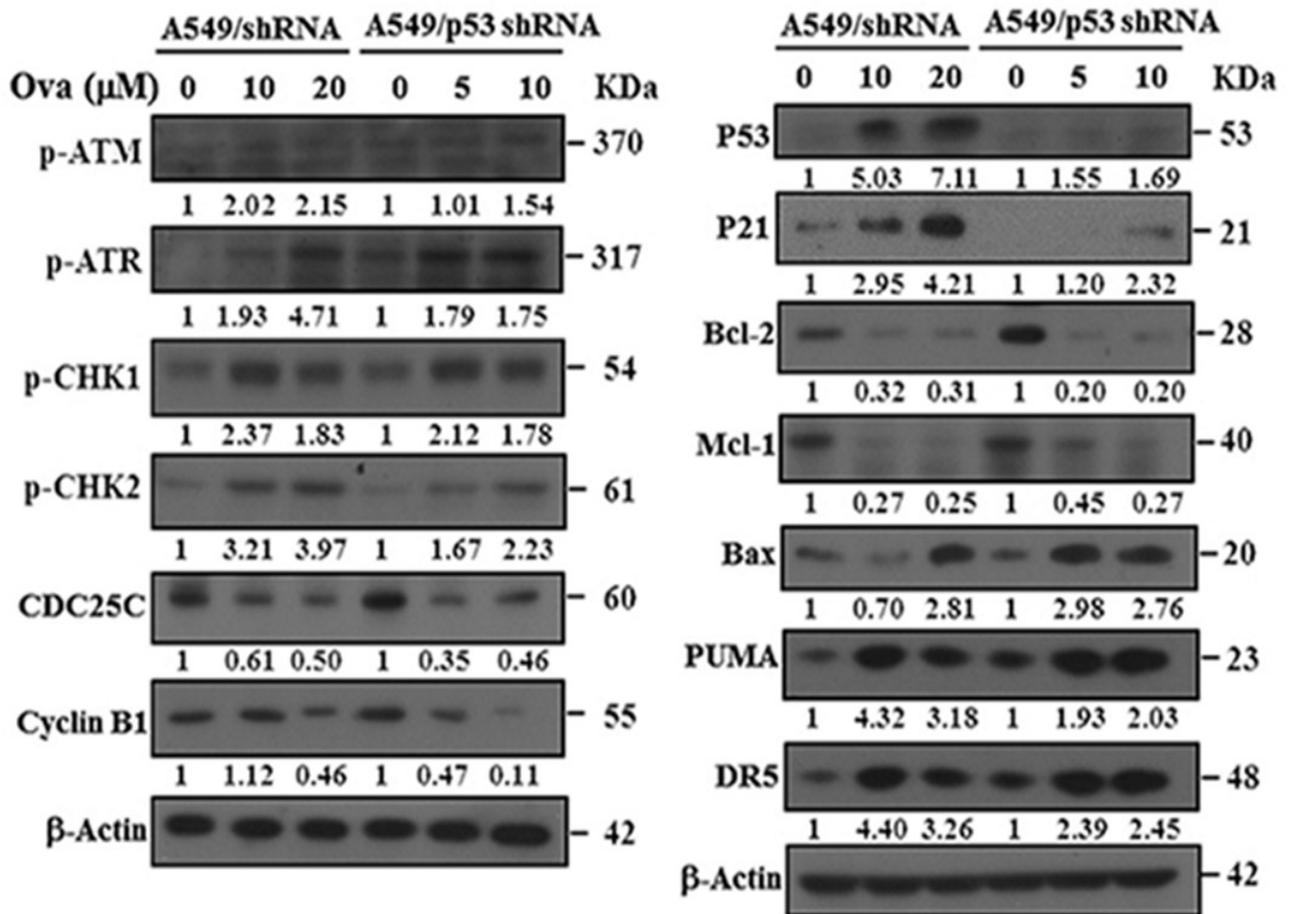
圖二十一、剔除 p53 基因不影響魚針草內酯誘發 A549 細胞的細胞週期 G2/M 期停滯。

A549 載體對照組細胞(A549/shRNA) 及 p53 剔除細胞 (A549-p53shRNA)先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然後分別加入 10 或 20 μM 魚針草內酯處理 24 小時後，收集細胞以流式細胞儀進行細胞週期分佈分析。



圖二十二、剔除 p53 基因不影響魚針草內酯誘發 A549 細胞凋亡。

A549 載體對照組細胞(A549/shRNA) 及 p53 剔除細胞 (A549-p53shRNA)先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸 (N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然後分別加入 10 或 20 μM 魚針草內酯處理 24 小時後，收集細胞以 TUNEL assay 分析細胞凋亡。



圖二十三、 p53 基因不影響魚針草內酯誘發 A549 細胞的 DNA 損傷、細胞週期停滯及細胞凋亡等相關分子。

A549 載體對照組細胞(A549/shRNA) 及 p53 剔除細胞 (A549-p53shRNA)先以抗氧化劑 N-乙醯半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC, 0.5 mM) 處理 1 小時，然後分別加入 10 或 20 μ M 魚針草內酯處理 24 小時後，收集細胞萃取蛋白，以西方墨點法分析 DNA 損傷、細胞週期停滯及細胞凋亡等相關分子表現量。

附錄 1、發表論文

1. **European Journal of Pharmacology 819 (2018) 16-29**

Ovatodiolide isolated from *Anisomeles indica* induces cell cycle G2/M arrest and apoptosis via a ROS-dependent ATM/ATR signaling pathways

Chen-Yuan Yu^{1,2}, Chieh-Lin Jerry Teng³, Pei-Shan Hung⁴, Chi-Chih Cheng², Shih-Lan Hsu^{1,2,4}, Guang-Yuh Hwang^{1,#}, Yew-Min Tzeng^{5,#}

¹ Department of Life Science, Tunghai University, Taichung, Taiwan, ROC

² Department of Medical Research, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, Taiwan, ROC

³ Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, Taiwan, ROC

⁴ Department of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC

⁵ Department of Life Science, National Taitung University, Taitung, Taiwan, ROC