

目錄

中文摘要	4
英文摘要	6
前言	8
一、急性骨髓性白血病(Acute Myeloid Leukaemia, 簡稱為 AML).....	8
二、急性骨髓性白血病細胞分化.....	11
三、癌細胞凋亡.....	13
四、細胞凋亡路徑與參與分子.....	14
五、細胞凋亡與腫瘤形成的相關性.....	22
六、癌症的標靶治療藥物.....	24
七、標靶治療藥物 Sunitinib.....	27
研究計畫的動機與目的	31
實驗材料與方法	33
1.試劑.....	33
2.細胞培養.....	34
3.細胞存活率測定.....	34
4.細胞分化之形狀測定	34
5.流式細胞分析儀測定細胞週期分布.....	35
6.流式細胞分析儀血癌細胞分化指標分子的表現	35
7.NBT 還原活性分析.....	36
8.TUNEL assay 測定凋亡細胞.....	36
9.Annexin-V 及 Propidium iodide 雙染色測定細胞凋亡.....	37

10.蛋白質的萃取.....	37
11.西方點墨法.....	38
12.創脞蛋白活性分析.....	39
13.急性骨髓性白血病患者血液中純化分離血癌細胞.....	40
14.統計分析及實驗操作方法.....	40
實驗結果	41
1. Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病患者細胞週期 G1 期停滯及凋亡.....	41
2. Sunitinib 調控細胞週期 G1 期相關分子.....	42
3. Sunitinib 誘發經 Caspase 所造成的細胞凋亡.....	42
4. Sunitinib 調控細胞凋亡相關分子.....	43
5. Sunitinib 促使急性骨髓性白血病患者細胞進行單核球分化.....	44
6. Sunitinib 促使急性骨髓性白血病患者細胞進行單核球分化經由蛋白質激酶 C 參與之路徑.....	46
7. Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病患者細胞進行單核球分化及細胞 凋亡.....	47
討論	48
結論	55
參考文獻	56
圖表目錄	66
圖一、Sunitinib 抑制急性骨髓性白血病患者細胞生長.....	69
圖二、Sunitinib 造成急性骨髓性白血病患者細胞週期 G1 期停滯.....	70
圖三、Sunitinib 處理急性骨髓性白血病患者細胞導致細胞凋亡.....	71
圖四、Sunitinib 調控細胞週期 G1 期相關之蛋白.....	72
圖五、Sunitinib 處理促進 Caspase 的活化.....	73

圖六、Sunitinib 增加細胞內被切割之 Caspase 活化片段.....	74
圖七、Caspase 抑制劑可阻礙 Sunitinib 誘發之細胞凋亡作用	75
圖八、Sunitinib 調控 Bcl-2 家族分子之表現.....	76
圖九、Sunitinib 調控細胞死亡受体家族分子之表現.....	77
圖十、HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib 處理後，細胞分化指 標分子 CD11b 及 CD14 的表現	78
圖十一、利用流式細胞儀分化指標分子 CD11b、CD14、CD11c、CD18 及 CD54 的表現	79
圖十二、利用 Wright-Giemsa 染色法觀察 Sunitinib 處理後急性骨髓性白 血病細胞型態的變化.....	80
圖十三、處理 Sunitinib 促進 HL60 及 KG-1 細胞之分化	81
圖十四、處理 Sunitinib 之細胞其 NBT reduction 之活性增強.....	82
圖十五、Sunitinib 處理增強 HL60 及 KG-1 細胞之 NBT 活性	83
圖十六、利用 PKC 抑制劑 Go6976 抑制 Sunitinib 誘發急性骨髓性白血 病細胞的分化.....	84
圖十七、Sunitinib 促進磷酸化 PKC- α 及磷酸化 PKC- β 蛋白的表現.....	85
圖十八、Sunitinib 促進急性骨髓性白血病患者的癌細胞中細胞分化指標 分子 CD11b 及 CD14 的表現.....	86
圖十九、Sunitinib 處理誘導急性骨髓性白血病患者的癌細胞之死亡...	87
圖二十、圖解說明 Sunitinib 誘導急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞 生長抑制、單核球分化及細胞凋亡之訊息傳遞路徑.....	88
個人資料	89

中文摘要

急性骨髓性白血病 (Acute Myeloid Leukaemia, AML) 是成年人最常見的血癌。但是完全治癒率僅有 30%。Sunitinib 是目前臨床使用於腸道基質瘤以及轉移性腎癌的多標靶化療藥物。事實上，已有臨床相關的研究顯示，特定對於化學治療無效的急性骨髓性白血病病患使用 sunitinib 後，部分的病患也能達到一定的緩解。但是有關 sunitinib 作用於急性骨髓性白血病之分子機轉，目前並不清楚。本論文之研究在探討 sunitinib 對抗急性骨髓性白血病之作用及其分子機轉。實驗的結果發現，以 sunitinib 處理急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞株，可以抑制細胞生長，促進細胞分化，造成細胞凋亡。在細胞週期方面，sunitinib 會造成 G1 期的停滯，並伴隨著 cyclin D1, cyclin D3, 以及 Cdk2 的蛋白質表現量下降。同時亦會造成 p27^{kip1}, pRb1, p130/Rb2 表現量增加。同時，sunitinib 處理增加 monocyte 分化指標性分子 CD14, CD11b, CD11c, CD18, 及 CD54 的表現，以及 protein kinase C α 和 β 磷酸化的上升。處理 protein kinase C α 和 β 的抑制劑可降低 sunitinib 誘發之血癌細胞分化。更進一步的研究結果顯示，sunitinib 不但會增加急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞之凋亡分子的表現 (Bax, Bak, PUMA, Fas, FasL, DR4, 以及 DR5), 亦會降低抑制細胞凋亡分子 Bcl-2 以及 Mcl-1 的表現。最終誘發了 caspase-2, -3, -8, 以及-9 的活化，啟動了細胞死亡受體以及粒線體相關

之細胞凋亡路徑。本研究亦分離急性骨髓性白血症病人的癌細胞處理 sunitinib，發現亦可促進血癌細胞的分化及死亡。綜合以上結果，本研究之結果，提供了 sunitinib 誘使血癌細胞細胞分化以及凋亡作用之分子層次的證據。但 sunitinib 對急性骨髓性白血症臨床應用之可行性，則需要更多的研究數據來確認。

關鍵字: 急性骨髓性白血症、細胞分化、細胞凋亡、PKC、Bcl-2、DR4

Abstract

Acute myeloid leukaemia (AML) is a heterogeneous disease with dismal outcome. Sunitinib is an orally active inhibitor of multiple tyrosine kinase receptors approved for renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumour that has also been studied for AML in several clinical trials. However, the precise mechanism of sunitinib action against AML remains unclear and requires further investigation. For this purpose, this study was conducted using human AML cell lines (HL60 and KG-1) and AML patients' mononucleated cells. Sunitinib induced G1 phase arrest associated with decreased cyclin D1, cyclin D3, and Cdk2 and increased p27^{Kip1}, pRb1, and p130/Rb2 expression. Moreover, sunitinib could induce AML monocytic differentiation which was characterized by morphological change and stimulating the expression levels of CD11b, CD11c, CD14, CD18 and CD54 monocytic surface markers. This event was accompanied by phosphorylated activation of protein kinase C alpha and beta (PKC α/β). Selective PKC α/β inhibitor treatment abolished sunitinib-elicited AML differentiation, suggesting that PKC α/β may underlie sunitinib-induced monocytic differentiation. Furthermore, sunitinib increased pro-apoptotic molecule expression (Bax, Bak, PUMA, Fas, FasL, DR4, and DR5) and decreased anti-apoptotic molecule expression (Bcl-2 and Mcl-1), resulting in caspase-2, 3, 8, and 9 activation and both death receptor and mitochondria-dependent apoptosis. Taken together, these findings provide evidence that sunitinib targets AML cells through both differentiation and apoptosis pathways. More clinical studies are

urgently needed to demonstrate its optimal clinical applications in AML.

Key words: Acute myeloid leukaemia, Differentiation, Apoptosis, PKC,
Bcl-2, DR4

前言

一. 急性骨髓性白血病 (Acute Myeloid Leukaemia, 簡稱為 AML)

(一) 疾病簡介及分類

急性骨髓性白血病，是一種骨髓性造血芽細胞異常增殖的血液惡性腫瘤。其特點是骨髓內異常芽細胞的快速增殖而影響了正常造血細胞的產生。是成年人最常見的血癌，發生率約是每年 10 萬人中有 2.3 人罹病，男性比女性發生率略高，而且年紀越大發生的機會也越高，年齡大於 65 歲的人得到急性骨髓性白血病的機會約為小於 65 歲的人之 10 倍。可造成急性骨髓性白血病的致病因子，如遺傳、輻射、化學物質（如苯）、藥物及其他職業上的暴露（如濃煙、染劑、殺蟲劑）等。此疾病的生理機轉是因為骨髓性白血球不正常的增生與分化，造成血癌細胞浸潤於骨髓中，進一步壓制正常的骨髓功能 (Byrd et al., 2002)。急性骨髓性白血病的患者，往往呈現貧血，血小板降低，出血，感染以及發燒等臨床表現。急性骨髓性白血病的診斷方式，除了藉由病理切片，細胞型態等方式之外，也會利用流式細胞分析儀來分析單核球細胞的表面抗原，或應用免疫螢光染色法亦可以幫助診斷。診斷的標準是以週邊血或骨髓內出現 30% 以上不成熟的髓球芽細胞 (Myeloblast)。根據 France-America-British 的標準，依細胞型態與細胞分化，及髓球芽細胞的數量（比例）、外觀，是否合併其他種血球

的芽細胞存在，將急性骨髓性白血病分類成 M0 到 M7，八種亞型 (Bennett et al., 1976)。世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 在 2001 年將急性骨髓性白血病重新分類，並於 2008 年再度更新 (Harris et al., 1999)。在世界衛生組織的分類系統中，急性骨髓性白血病被歸類於急性骨髓性白血病合併細胞遺傳學異常 (AML with recurrent cytogenetic abnormality)、急性骨髓性白血病合併骨髓分化不良 (AML with myelodysplasia-related feature)、治療引起之急性骨髓性白血病 (therapy-related AML)、未分類之急性骨髓性白血病、以及骨髓性肉瘤 (myeloid sarcoma)。

(二)急性骨髓性白血病的致病機轉

急性骨髓性白血病致病的詳細機轉，目前並不清楚，但可以從兩方面來論述。分別是芽細胞不正常的增生以及不正常的分化。目前的研究已顯示，有許多基因的變異參與在這兩個機制中。舉例來說，*bcr/abl*，*TEL/PDGFβR*，*N-RAS*，以及 *FLT3* 的突變，會導致骨髓性芽細胞大量複製。另外一方面，*AML/ETO*，*PML/RARα*，以及 *NUP99-HOXA9* 則會導致骨髓芽細胞無法進一步分化成成熟顆粒球，導致急性骨髓性白血病的形成 (Dombret, 2011)。急性骨髓性白血病的治療，必須同時阻斷這兩個致病機轉，方能成功。

(三)急性骨髓性白血病的治療

急性骨髓性白血病的治療，主要是以化學治療為主。外科手術或是放射治療一般來說，角色並不明確。化學治療主要分為引導治療及鞏固治療兩種方式。引導治療的目的是將病人身上可見的血癌細胞完全清除。而鞏固治療則是進一步維持病人的完全緩解，並減低復發的機會。目前化學治療所使用的藥物，則是以 Idarubicin 以及 Cytarabine 為主。而引導治療達到為全緩解的機率，約為 70%。但終究只有約 30-40% 的病患，可以被治癒。

在 2001 年，Byrd 等人利用回溯性的分析，根據急性骨髓性白血病病患的染色體表現，將病患分別區分為低度風險、中度風險、以及高度風險 (Byrd et al., 2002)。而目前則有更多的基因突變指標加入了急性骨髓性白血病治療的預後指標 (Yagi et al., 2003)。對於低度風險的病患，完整的化學治療即可以達到 70% 的治癒率。但對於高度風險的急性骨髓性白血病病患，只有約 10% 的患者能被化學治療所治癒。中度風險的病患則約有 40% 的機會被化學治療所治癒。於是異體造血幹細胞移植，對於屬於中高風險的病患，則是一項需要考慮的治療方式 (Cassileth et al., 1998)。然而對復發的 AML 病患或是經引導治療而無法達到緩解病情的病人，異體造血幹細胞移植是唯一治癒的機會。但急性骨髓性白血病治療最大的阻礙還是在於未來的復

發，如何降低復發的機率是當今最重要的課題。

綜合上述內容，傳統的急性骨髓性白血病化學治療藥物，除了殺死癌細胞外，亦會對正常細胞造成傷害。近年來，AML 治療藥物開發的方向有二，其一是誘導癌細胞往正常細胞的方向分化，讓癌細胞自然死亡，減少對身體的傷害；其二是促進癌細胞的凋亡，降低對臨近正常細胞的損傷。這樣的基本概念，亦是本研究的努力的方向之一。

二. 急性骨髓性白血病細胞分化

如前述， France-America-British 主要依細胞型態與細胞分化，及髓球芽細胞的數量（比例）、外觀，是否合併其他種血球的芽細胞存在，將 AML 分類成 M0 到 M7 (附圖一)。

Subclass	Description
M0	Acute non-differentiated leukemia – immature blast cells with minimal differentiation
M1	Acute myeloblastic leukemia without maturation – immature blast cells without signs of myeloid differentiation
M2	Acute myeloblastic leukemia with granulocytic maturation
M3	Promyelocytic or acute promyelocytic leukemia (APL)
M4	Acute myelomonocytic leukemia
M4eo	Myelomonocytic leukemia with bone marrow eosinophilia
M5	M5a – acute monocytic leukemia without maturation M5b – acute monocytic leukemia with partial maturation
M6	Acute erythromyelosis
M7	Acute megakaryoblastic leukemia

附圖一：急性骨髓性白血病 France-America-British 分類
(Bennett et al., 1976)

細胞分化能力的喪失是細胞癌化的一個異常現象。而失去分化能力的程度，對於癌症的原因，惡性度，預後，以及治療效果的預測提供了重要的訊息。癌細胞失去分化能力的原因，往往是由癌細胞某些調控基因過度表現或是缺失所造成。舉例來說，在各項急性骨髓性白血病的治療中，急性前骨髓性白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia) 的治療堪稱經典。急性前骨髓性白血病病患的存活率一直很低直到全反式維甲酸的發明為止。大於 90% 的急性前骨髓性白血病患者具有第 15 對及第 17 對染色體的轉位 [t(15; 17) (q22; q21)]。這樣的染色體轉位，產生了 retinoic acid receptor alpha (RAR- α) 的重組，導致正常生理 retinoic acid 訊息傳遞路徑的阻斷，使得骨髓細胞分化停滯於前髓細胞 (promyelocyte) 的階段，無法向下分化，導致前髓細胞不正常的堆積以及凝血功能的破壞。當急性前骨髓性白血病病患接受了全反式維甲酸的治療後，目前的治癒率已經超過 80% (Mi et al., 2012)。而科學家也試圖將急性前骨髓性白血病的成功治療經驗，複製到其他分型的急性骨髓性白血病的治療中。

近年來，癌症幹細胞的研究亦有重要的突破。癌症幹細胞的內涵在於，以往認為癌症是由正常細胞中的一小群細胞，因基因缺失，造成細胞生長及周期調控異常，而進一步形成癌症。而癌症幹細胞則是一群癌症細胞具有幹細胞的能力 (Vermeulen et al., 2012)。這樣的能

力包含了細胞的增生與分化。暗示著經由適當的分化刺激，這些癌細胞有機會往成熟的細胞方向進行分化，進一步達到治療癌症的目的。

三. 癌細胞凋亡

細胞凋亡 (Apoptosis) 的名詞源自於希臘文，是形容花朵枯萎時花瓣掉落的現象 (Kerr et al., 1972)。細胞凋亡是一種程序性的細胞死亡，整個過程由特定的分子調控，經由一連串的訊息傳遞所造成，其過程中有細胞型態及生化性質的改變而導致的細胞死亡。細胞凋亡的型態變化包含細胞萎縮，細胞膜泡泡狀，染色質濃縮，以及細胞核的碎裂 (Hengartner, 2000)。細胞凋亡在生物體中正常的功能有二，其一是調控生長及維持生物體的平衡 (Riedl and Shi, 2004)。在胚胎發育時，適當的細胞凋亡作用可去除沒有功能之組織細胞，如靈長類手指的產生即是在胚胎期兩手指間之細胞產生凋亡現象的結果 (Vaux and Korsmeyer, 1999)。此外，在成熟個體中，為維持體內的平衡及正常功能，老化的淋巴球會自行凋亡而產生新的淋巴球 (Rathmell and Thompson, 2002; Vaux and Korsmeyer, 1999)。細胞凋亡的第二個目的，是為了維護生物體的防禦功能，例如：移除受到病原微生物感染的細胞，或是清除因紫外線照射產生 DNA 損傷，無法修補，導致基因突變的不正常細胞。因此細胞凋亡無論在胚胎生長發育期，或是成

熟個體中，都是一個重要的維持生物體恆定的作用。

四. 細胞凋亡路徑與參與分子

細胞凋亡之機制很複雜，參與的分子也相當的多。但是簡單的可已將細胞凋亡之過程分為兩大類，一為內生性細胞凋亡路徑，另一為外生性細胞凋亡路徑，分別敘述如下。

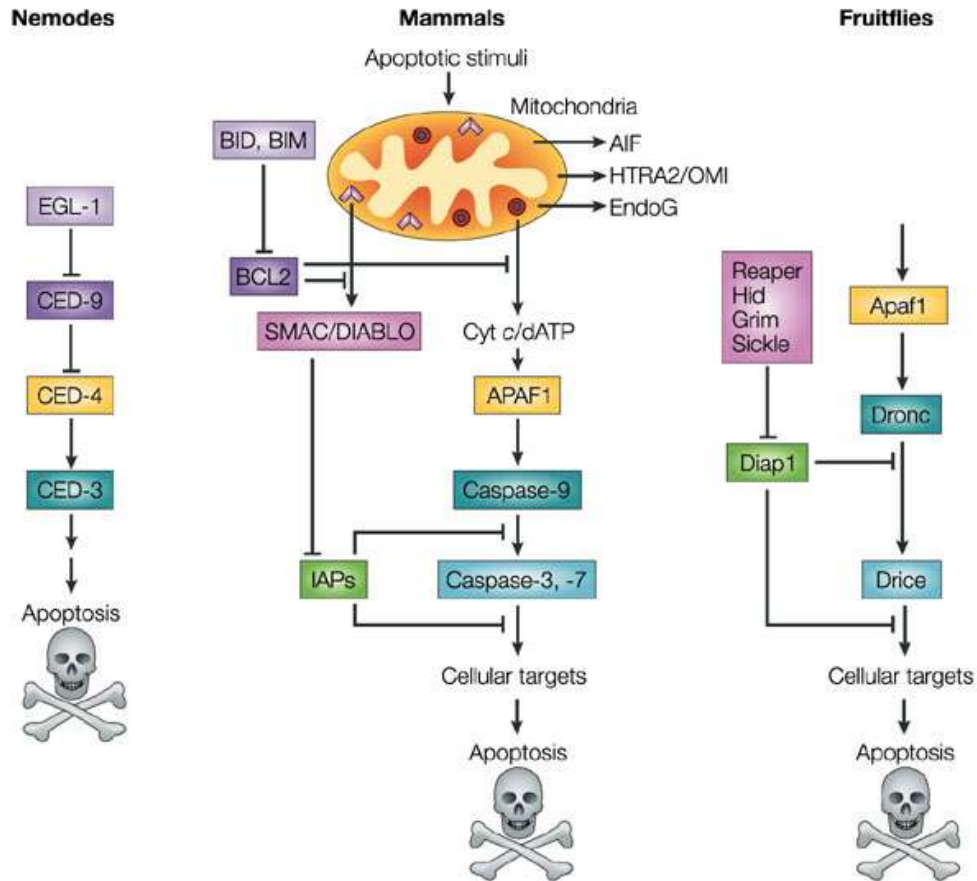
(一) 內生性凋亡路徑 (Intrinsic apoptotic pathway)

內生性細胞凋亡路徑一般又分為兩種：粒線體凋亡路徑 (Mitochondria-dependent apoptotic pathway)，及內質網凋亡路徑 (Endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathway)，分別敘述如下。

(1) 粒線體路徑 (Mitochondria pathway)：

此細胞凋亡路徑主要受到 Bcl-2 (B cell lymphoma protein 2) 家族分子的調控。Bcl-2 家族分子又分為兩群作用相反之分子，分別為抑制凋亡的分子：Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、Boo/Diva 和 A1/Bfl-1；以及促進凋亡的分子：Bax、Bak、Bok、Bad、Bim、Bmf、Bid、Bik、Blk、Hrk、PUMA、NOXA 和 BINP3 (Gogvadze et al., 2006; Gulbins et al., 2003; Huang and Strasser, 2000)。細胞凋亡是受到這些抑制凋亡分

子與促凋亡分子間的相互作用活性而調控，但是這些分子在細胞中的相對量之比率，也會影響細胞凋亡。如在正常有活性的細胞中，Bcl-2 及 Bcl-xL 會與 Bax 或 Bak 結合成複合體。在 Bcl-2 或 Bcl-xL 表現量高時，會抑制 Bax 或 Bak 之作用，促進細胞存活；若 Bax 或 Bak 表現量高時，就會造成粒線體膜穿孔，增加粒線體膜的通透性，使 cytochrome *c* 由粒線體基質間釋放到細胞質，與 dATP (deoxyadenosine triphosphate)、Apaf-1 (apoptotic protease activation factor-1) 和 pro-caspase-9 形成凋亡複合體 (apoptosome)，啟動了 caspase-9 及下游分子 caspase-3 的活性，導致細胞凋亡 (附圖二) (Chipuk et al., 2010; Gogvadze et al., 2006)。



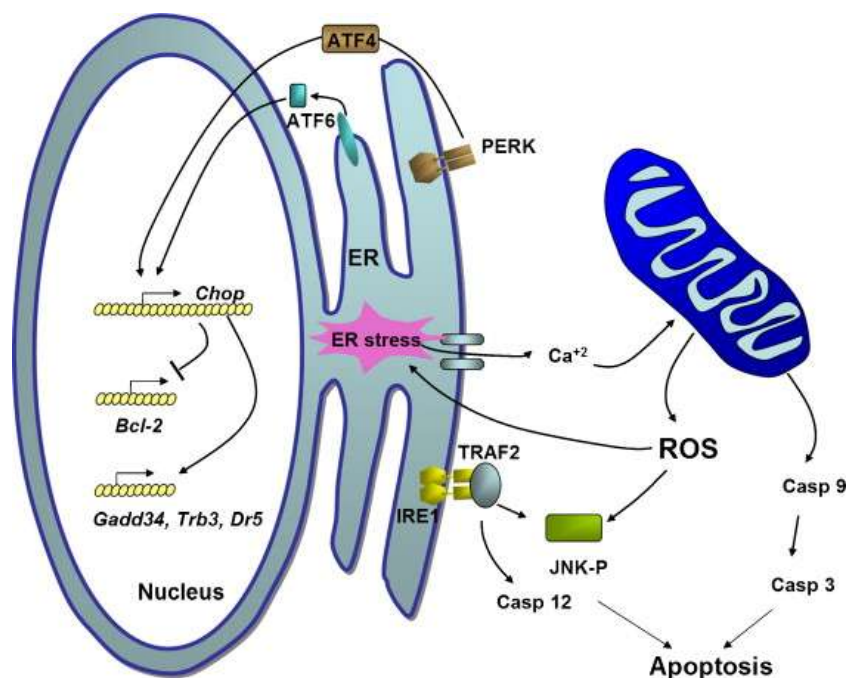
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

附圖二：線體凋亡路徑 (Riedl and Shi, 2004)

(2) 內質網路徑 (Endoplasmic reticulum stress pathway) :

內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 在細胞中是執行蛋白質合成與修飾的胞器，可調控蛋白質結構形成。當細胞內出現突變的蛋白質、病毒感染、能量或營養素的缺乏、過量的氧化自由基、不正常的糖化作用、大量的鈣離子堆積等因素，皆可造成內質網的壓力 (Kadowaki et al., 2004)。這些壓力使未折疊好的蛋白質堆積在內質網

中，啟動了細胞的保護機制，降低轉譯功能抑制未折疊蛋白質之生成，或將未折疊的蛋白質送到 proteasome 中分解。若仍無法解除內質網的壓力，則會啟動內質網路徑的細胞凋亡。與內質網凋亡路徑相關的分子如: CHOP、caspase-12、Bax、Bak、IRE1、PUMA 及 NOXA 等分子 (Li et al., 2006)。當內質網壓力產生時，位於內質網膜上的促凋亡分子 Bax 及 Bak 就形成通道，使內質網內的鈣離子大量釋出，活化了鈣激活蛋白酶 (Calpain)，進而活化了 caspase-12，而導致細胞凋亡 (附圖三)。



附圖三：內質網啟動的細胞凋亡路徑 (Malhotra and Kaufman, 2007)

此外，內質網壓力也會促進 p53 的活性，使下游基因 PUMA 和 NOXA 表現量增加，因此而活化粒線體路徑之細胞凋亡 (Di Sano et al., 2006; Li et al., 2006)。

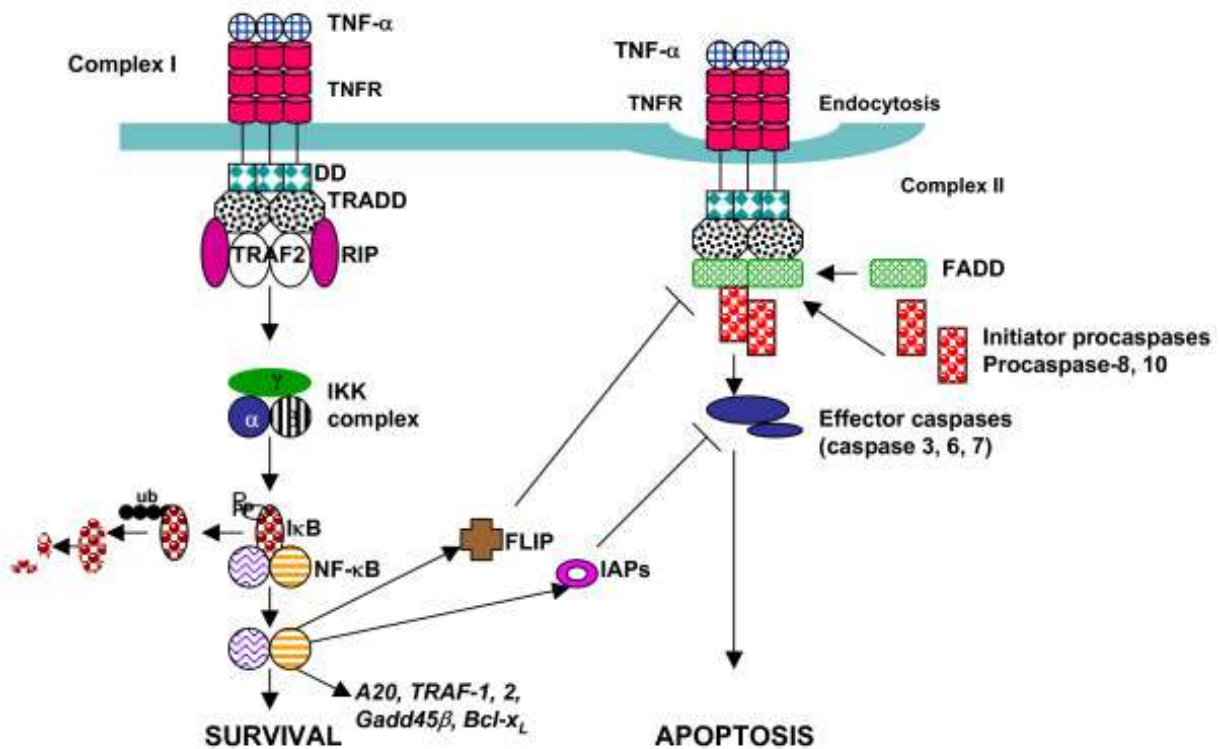
(二) 外生性死亡受體凋亡路徑 (The extrinsic-death receptor-mediated apoptotic pathway)

細胞膜上有各種死亡配體的受體 (Death ligand receptor)，當死亡配體與細胞膜上之相對應的死亡受體結合後，活化下游促凋亡之分子，進而快速活化 caspase-8 及 caspase-3 (Plati et al., 2011)。死亡受體家族分子是屬於 TNF 家族的分，其成員包括 TNF receptor 1 (TNFR1) 與 TNF (TNF-alpha)，FAS (APO-1, CD95) 與 FASL, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor 1 (TRAILR1, DR4) 與 TRAIL，及 TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2, DR5) 與 TRAIL，分別敘述如下。

(1) TNF- α 與 TNFR 啟動之凋亡訊息路徑：

TNF- α 在細胞凋亡作用中扮演重要角色，當 TNF- α 與其受體 TNFR-I 或 TNFR-II 結合後，TNFR-I 就會與死亡結構分子 TRADD 及 FADD 結合，使 caspase-8 活化；另外，也可活化 caspase-2，最後活化 caspase-3、-6、-7 而導致細胞凋亡。而 TNFR-II 分子則無死

亡結構區。文獻指出 TNFR-II 無法自行進行凋亡，但可藉調控 TNFR-I 去執行凋亡（附圖四）(Gupta, 2002)。

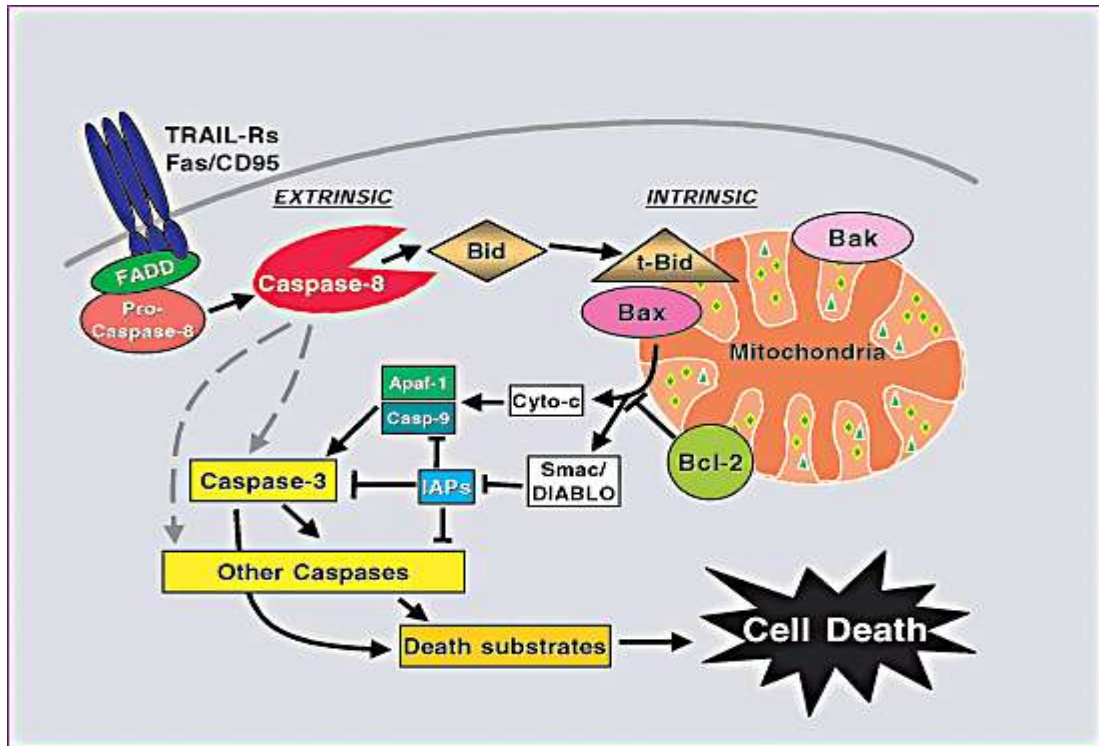


附圖四: TNF-α 死亡受體誘導細胞凋亡的訊息路徑 (Gupta, 2002)

(2) Fas/ CD95 與 Fas ligand (FasL) 啟動之凋亡訊息路徑：

在調控 T 細胞與 B 細胞的分化成熟及剔除作用上，Fas 扮演著重要角色。當免疫反應過後，必須除掉不必要的活化型 T 細胞，此時就啟動 Fas 調控之細胞凋亡路徑，摧毀參與免疫反應的發炎細胞和免疫細胞。在人體中，當 Fas 功能有缺失時，會造成自體免疫疾病 (Curtin

and Cotter, 2003; Rieux-Laucat et al., 1995)。當 FasL 與細胞膜上之 Fas 結合後，使得 Fas-associated death domain (FADD) 與 Fas 結合，接著 pro-caspase 8 被切割成活化態的 caspase-8，進一步活化 caspase-3。但活化的 caspase-8 也會將 Bcl-2 家族中之 Bid 切割，使其由細胞質轉移到粒線體膜上形成孔洞，促進 cytochrome *c* 釋出，誘發 caspase-9 及 caspase-3 活化，導致細胞凋亡 (附圖五) (Curtin and Cotter, 2003; Peter and Krammer, 1998; Walczak and Krammer, 2000)。此外，當 FasL 與細胞膜上之 Fas 結合，亦可連接 Daxx (Fas death domain associated protein)，Daxx 其本身無死亡結構，但其 C 端可與 FADD 結合，而 N 端可促進 JNK 及其下游分子 c-Jun 活化，最後抑制 Bcl-2 蛋白的表現，導致 caspase 活化，造成細胞凋亡之現象 (Curtin and Cotter, 2003; Peter and Krammer, 1998; Walczak and Krammer, 2000)。

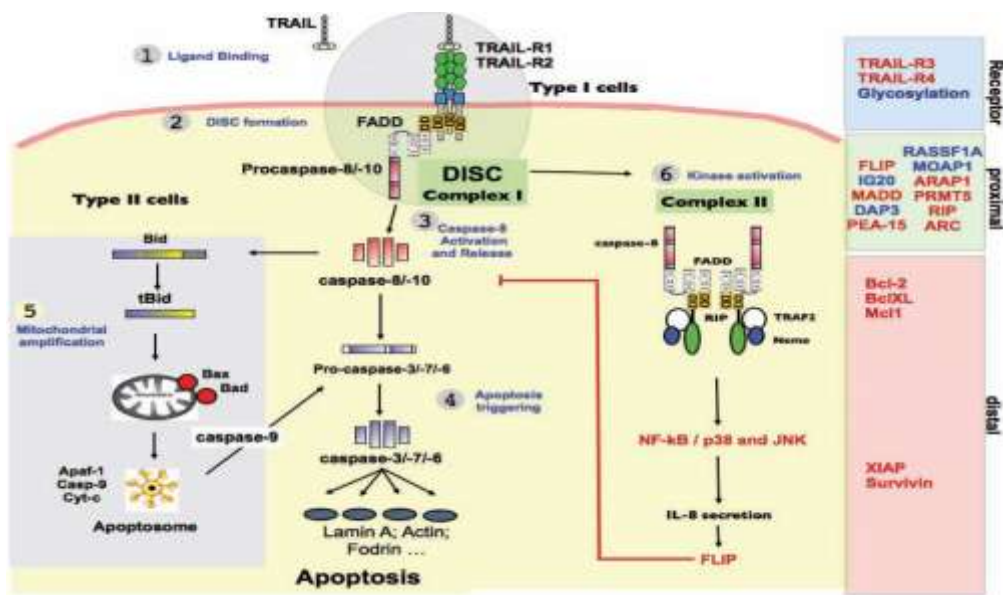


附圖五： Fas 與 FasL 啟動之細胞凋亡路徑 (Roth and Reed, 2002)

(3) TRAIL 與 TRAIL 受體啟動之凋亡訊息路徑：

TRAIL 受體正常表現於自然殺手細胞 (NK cell)、T 細胞 (T cell)、巨噬細胞 (Macrophage)、樹狀細胞 (Dendritic cell)、IFN- γ 刺激之單核球細胞 (interferon (IFN- γ)-stimulated monocytes) 及巨細胞病毒感染之纖維母細胞 (cytomegalovirus (CMV) - infected fibroblasts) 等之表面上 (Thorburn, 2007; Walczak and Krammer, 2000)。而 TRAIL 與其受體誘發之凋亡路徑與 Fas/FasL 路徑相似，當 TRAIL 與其受體 DR4 (Death receptor 4) 或 DR5 (Death receptor 5) 結合時，會形成

DISC (death-inducing signaling complex)，接著 FADD 或 TRADD 與 pro-caspase-8 或 pro-caspase-10 結合聚集，被切割而活化，進而活化 caspase-3，促使細胞凋亡（附圖六）（Chaudhary et al., 1997; MacFarlane, 2003; Wang and El-Deiry, 2003）。

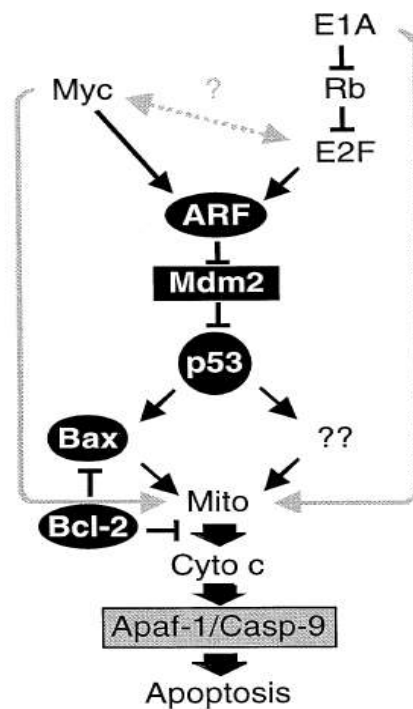


附圖六: TRAIL 的訊息路徑及調控分子 (Shirley et al., 2011)

五. 細胞凋亡與腫瘤形成的相關性

細胞凋亡最初研究的方向，是探討發育生物學以及器官恆定上。但是近年來，細胞凋亡的研究逐漸轉向癌症 (Chao et al., 2012)。越來越多的研究顯示，癌症的形成與細胞凋亡基因缺失有關。事實上，細胞凋亡在癌症生成的角色可以回朔到 1970 年代 (Kerr et al., 1972)。

一開始的觀察發現，在一些大量死亡的腫瘤細胞內，發現了細胞凋亡的證據。至今，已有許多基因被證實與癌症細胞的細胞凋亡有關，像是 Bcl-2 家族分子 (Bcl-2, Mcl-1, Bax, PUMA2 等)，死亡受體 TNF-R 家族分子 (TNF receptor, Fas/CD95, FasL, TRAIL receptor), survivin, XIAP, p53, caspases 等等 (Vogelstein et al., 2000)。現在，更清楚的發現，任何致癌基因的缺陷都有可能造成腫瘤細胞的細胞凋亡。越來越多的研究結果顯示，致癌基因的突變亦可促進細胞凋亡，舉例如下圖所示：致癌基因，如 E1A 以及 c-myc 會經由 p53 或是非 p53 的路徑來誘發細胞凋亡 (Erol, 2011)。無論是 p53 相關或不相關的路徑，皆會促使 cytochrome c 從粒線體釋放。最終藉由 Apaf/Casp-9 路徑，引起細胞凋亡。不論是致癌基因或是抑癌基因的突變，皆會造成腫瘤細胞凋亡作用調控的改變 (附圖七)。



附圖七: 抑癌基因 E1A 的突變造成腫瘤細胞凋亡 (Lowe and Lin, 2000)

近年來細胞凋亡已經被應用於癌症治療及預後效果的評估，一般認為，腫瘤細胞對於 p53 的抑制會比正常細胞更加的敏感。這樣的概念，提供了未來治療癌症的一個新的目標方向。

六. 癌症的標靶治療藥物

傳統的癌症治療包括有手術、放射治療、化學療法、賀爾蒙療法或生物製劑療法，但使用這些治療方法有其一定的限制，且療效不佳，病人的存活率不高。因此，有效藥物的研發受到醫學界高度的重視，投入大量的研發經費及人力。這幾年來癌症的治療有很大的突

破，特別是標靶治療 (Target therapy) 藥物的進展受到一定的矚目。由於傳統的化學治療，化學藥劑在對付癌細胞時，也會傷害正常的組織細胞，產生副作用。為了讓治療癌症的結果更理想，科學家研究出一種更佳的癌症治療方式，以期達到只針對特定的腫瘤細胞進行攻擊，而不會對人體其他的正常組織造成重大的傷害。而標靶治療的藥物，就是在這種「針對性」的理念下被研發出來 (Dancey et al., 2012)。這樣專一性的治療方式，跟傳統的癌症治療來比較，在某些情況下，不但在治療效果上會相對的提升，並且造成的副作用亦相對降低，故整個癌症治療過程的品質也相對的提高。而所謂的癌症標靶治療，就是以細胞表面的各種較特殊的標記，及細胞內各種訊息傳遞途徑之作用分子，作為標靶的治療方式。分子標靶治療的藥物，大多是以小分子化合物或是單株抗體的形式，進行破壞或阻斷與癌細胞增生、分化、凋亡或血管生成有關的信息傳導路徑。經過標靶治療的作用，對治療有效的癌細胞可造成促進癌細胞凋亡、減少增殖、誘導分化、及減少血管生成與轉移，並可能增進化療、放療或荷爾蒙治療對癌細胞的治療效果。標靶治療的好處是經過特定作用機轉，所以其效果有機會較高，且副作用相對於化學治療為少。標靶治療的藥物，依其作用標的可大致上分為三大類，分別是作用在抑制腫瘤血管新生、作用在癌細胞訊息傳遞的路徑及作用在癌細胞表面抗原。有些標靶治療藥物

是具有阻斷癌症訊息傳遞的小分子物質，如使用 Gefitinib 於治療非小細胞肺癌 (Janku et al., 2011)，使用 Gleevec 於慢性骨髓性白血病與胃腸道基質瘤 (Barnes and Reinke, 2011)。另有些是癌細胞凋亡的促進劑，如 Velcade 用於多發性骨髓癌 (Delforge, 2011)。還有的是針對細胞表面抗原的單株抗體：如 Rituximab 用於 CD20 陽性的惡性淋巴瘤 (Ninan et al., 2011)，Erbix 用於轉移大腸癌與頭頸癌 (Garrett and Eng, 2011)，以及 Herceptin 用於治療乳癌等 (Perez et al., 2011)。也有一類的單株抗體或其合成物，如 Avastin，也可以與血管內皮生長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 結合，而避免其下游訊息傳遞路徑的活化，進而抑制癌細胞的血管新生使血管正常化，進行抑制癌細胞生長並增加化療的效果 (Cohen et al., 2007)。雖然標靶治療的角色已經被確立，而且在部份癌症甚至可以靠標靶治療達到提高存活率的目的，例如 Gleevec 治療慢性骨髓性白血病。然而許多的病患心中最大的期待就是癌症能夠完全治癒，永不復發。可是目前許多標靶治療藥物的效果還不能夠達到臨床醫師及癌症病患心目中的需求，充其量只是增加傳統的抗癌治療的效果，取代部份化學治療的角色，增加治療的準確度，以及減少藥物的副作用。因此，目前尚有很多新藥在研發中，例如抑制 m-TOR、MET、insulin-like、proteasome、heat shock protein 等分子的藥物、或影響吞噬球之功能等藥物

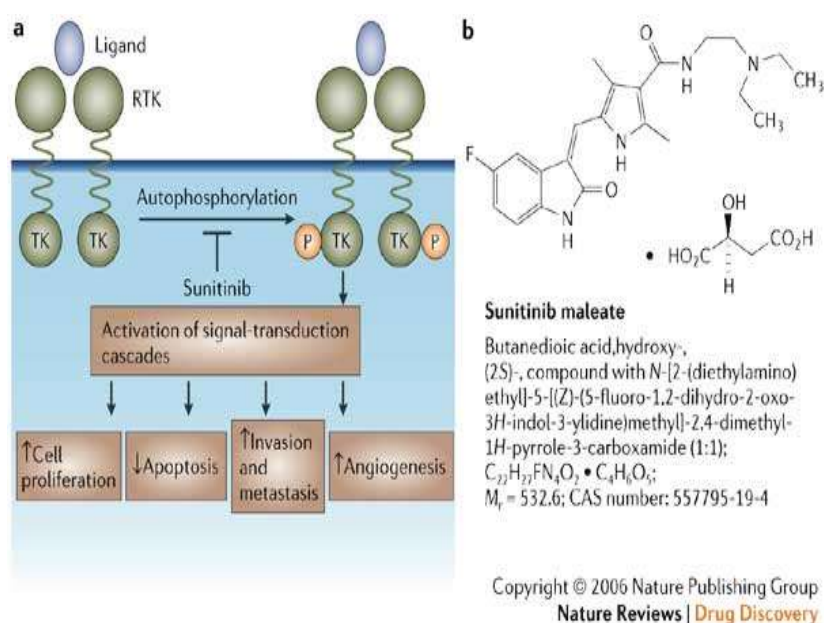
(Kwitkowski et al., 2010)。此外，在這個癌症治療革命性的年代，標靶治療的發現雖然提供了醫師及病患在對抗癌症上的新選擇，及可達到一定的治療成效。但是這些標靶治療藥物相關的分子作用機制，仍有許多不清楚的地方，需要從實證醫學的觀點，由基礎或臨床等不同的角度繼續探討及研究。

七. 標靶治療藥物 Sunitinib

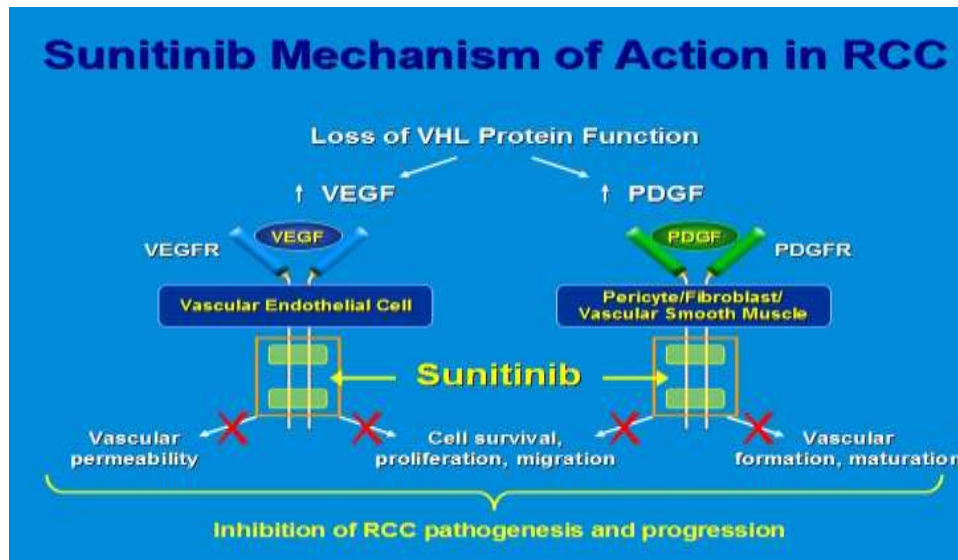
近年來，越來越多的癌細胞中特殊表達的分子，被用來當作預測癌症的發生及預後的標的因子。其中與急性骨髓性白血病的預後相關的分子，如 *fms*-like tyrosine kinase 3 (FLT3)，nucleophosmin gene，CCAAT/enhancer binding protein α gene，mixed-lineage leukemia gene，以及 neuroblastoma RAS viral oncogene homolog gene 等 (Altman et al., 2011)。在上述的基因中，FLT3 的臨床意義最為顯著。目前已臨床使用的標靶藥物中，Sunitinib 對於 FLT3 有很好的結合能力，可有效的抑制 FLT3 ITD 突變的急性骨髓性白血病。事實上，已有臨床相關的研究顯示，特定對於化學治療無效的急性骨髓性白血病病患使用 Sunitinib 後，部分的病患能達到一定的緩解 (Wiernik, 2010)。

Sunitinib，其化學結構是為 N-(2-diethylaminoethyl)-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-c

arboxamide, $C_{22}H_{27}FN_4O_2$, 是一種具有高度選擇性多目標酪胺酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitor) (附圖八) (Atkins et al., 2006), 它能斷絕腫瘤生長所需要的血液和營養 (Powles et al., 2011)。目前臨床主要應用在轉移性腎臟癌以及腸道基質瘤 (附圖九)。



附圖八: Sunitinib 的化學結構是及其作用的分子機轉 (Atkins et al., 2006)



附圖九: Sunitinib 抗腎臟癌之作用機制。(摘自 2006 ASCO Abstract LBA3 R. J. Motzer et al.)

Sunitinib 的作用機轉是藉由阻斷酪胺酸激酶受體，因此抑制細胞訊號的傳遞。這些多目標酪胺酸激酶受體包含了血小板生成因子受體 (platelet-derived growth factor receptor, PDGF-Rs)、血管內皮生成因子受體 (vascular endothelial growth factor receptors, VEGFRs)、幹細胞因子受體 (stem cell factor receptor, KIT)、glial cell-line derived neurotrophic factor receptor (RET), FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3)、以及 macrophage colony-stimulating factor (CSF-1R) (Sakurai and Kudo, 2011)。Sunitinib 抑制 PDGFR 及 VEGFR 這兩種受體，是作用於腫瘤血管新生以及腫瘤增生。藉由這兩種受體的抑制，可藉由抑制血管新生以及促進腫瘤細胞凋亡來控制腫瘤細胞，最終造成腫瘤的縮小。Sunitinib 同時亦可抑制 KIT，KIT 的抑制是 Sunitinib 治療腸道基質

瘤的重要機轉 (Caram and Schuetze, 2011)。

研究計畫的動機與目的

隨著分子生物醫學的進步，以細胞表面的分子及各種訊息傳遞路徑分子做為標靶的治療，已經成為目前癌症治療的新趨勢。近年來，癌症研究人員找到許多適當的癌細胞的標靶分子，同時也針對這些標靶分子，發展出有效的癌症治療方式及藥物。這些分子標靶治療的藥物，大多是小分子化合物或者是單株抗體，可阻斷與腫瘤增殖、分化、凋亡或血管增生有關的信息傳導路徑。sunitinib 為一多標靶的小分子藥物，目前常用於治療轉移性腎癌、大腸直腸癌及胃腸基質瘤，也有少數的例子用於治療急性骨髓性白血病人。但是相關此藥物抗癌及治療癌症之作用機制，仍有許多不清楚之處，有待繼續探討。由於初期之實驗結果發現，以 sunitinib 處理人類急性骨髓瘤 HL60 及 KG-1 細胞，在低劑量時可以抑制血癌細胞生長並促進血癌細胞分化，而較高的劑量可造成血癌細胞凋亡。基因晶片探討整體基因表現圖譜的研究亦發現，人類急性骨髓性白血病 HL60 及 KG1 細胞經 sunitinib 處理後，許多與癌細胞生長、分化、或凋亡相關的基因會被調控，其中如：5-LOX、ALOX5AP、NQO1、ITGB7、ITGB2、CD14 等基因的表現，明顯增加。而 HSP、Egr1、Fos、JUN、IL8、Mcl-1、Bcl-2 等基因的表現，明顯被抑制。由於 Mcl-1 及 Bcl-2 是抗細胞凋亡的分子，此兩分子在癌細胞中之表現量多寡可影響化療藥物之感受性。因此，本論

文將以急性骨髓性白血病 HL60 與 KG-1 細胞，及急性骨髓性白血病患者血液中之血癌細胞做為研究的細胞模式，針對 sunitinib 誘導急性骨髓性白血病細胞生長抑制、分化及凋亡的分子機轉，進行深入之研究。期望能經由本論文之研究，進一步了解 sunitinib 對這些分子的調控機制及抗癌作用之相關性，對 sunitinib 在急性骨髓性白血病治療上的潛力能有更深入的認知。

實驗材料方法

試劑

Sunitinib 的純化物來自於 Pfizer 藥廠的提供，溶於 DMSO 中處理細胞。Terminal transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL) 套組購自 Boehringer Mannheim (CA, USA)。Caspase activity assay kit 購自 R&D system (MN, USA)。抗體之來源：anti-CD11b、anti-CD11c、anti-CD14、anti-CD18、anti-CD54、anti-Fas 及 anti-FasL 購自 BD Bioscience Pharmingen (CA, USA)。Anti-Bcl2、anti-Bax、anti-Bak、anti-pRb1、anti-pRb2、anti-cyclin D1、anti-cyclin D3、anti-Cdk2、anti-phosphorylated PKC- α 及 anti-phosphorylated PKC- β 購自 Santa Cruz Biochemicals (CA, USA)。Anti-DR4、anti-DR5 及 anti-p27 購自 Abcam (Cambridge, UK)。Anti-caspase-3、anti-caspase-8 及 anti-caspase-9、購自 Cell Signaling Technology (MA, USA)。Caspase-3、caspase-8 及 caspase-9 抑制劑購自 Kamiya (WA, USA)。anti-PUMA 及 Go6976 購自 Calbiochem (Darmstadt, Germany)。Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit 購自 Strong Biotech Corporation (Taiwan)。

細胞培養

HL60及KG-1細胞為人類急性骨髓性白血病細胞株，購買自American Type Culture Collection (ATCC)。HL60 細胞培養於 RPMI-1640 培養液，並加上 5 % fetal bovine serum及1% L-glutamine。KG-1細胞培養於 RPMI-1640 培養液，並加上 10% fetal bovine serum 及 2% L-glutamine。每隔二天繼代培養一次。

細胞存活率測定

將細胞分種於12 孔細胞培養盤中，每孔含有 1×10^5 個細胞，均勻搖散細胞後，將細胞培養於37 °C、5% CO₂ 的培養箱中，給予不同濃度sunitinib處理，經24、48 和 72 小時後，用0.4% Trypan blue dye 染色，以血球計數器 (hemocytometer) 計算各孔盤內的存活細胞數，此實驗至少執行三次，每次每一藥物濃度處理為三重複，取平均值做存活曲線。

細胞分化之形狀測定

收集經藥物處理過之細胞，以 PBS 清洗後，以 Cytospin 的方法收集到玻片上，再以 Wright 染色法將細胞染色，在光學顯微鏡下觀察細胞的形狀之變化，決定細胞是否進行分化。

流式細胞分析儀測定細胞週期分布

將細胞以 1×10^6 個細胞種於10 cm 培養皿中，再處理 sunitinib 24小時後，先以 PBS 清洗細胞，再置於1.5 ml 離心管中，以1200 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，置於震盪器輕輕震盪，慢慢加入1 ml的70 % EtOH/PBS 溶液，使細胞均勻分散，即可置於 4°C 冰箱保存至分析。待分析時，將樣品以1200 rpm 於4°C下離心 5 分鐘，移除上清液後在避光條件下，每個樣品加入濃度10 $\mu\text{g/ml}$ 之 propidium iodide (PI) 溶液及0.1 mg/ml之 RNase，於37 °C下作用30分鐘，最後放至冰上，利用流式細胞儀(FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, CA, USA) 檢測，再以 Cell Quest 軟體分析。

流式細胞儀分析血癌細胞分化指標分子的表現

收集經藥物處理過之細胞，以 PBS 清洗後，將細胞與 PE- 標幟的 CD11b 的抗體或以 FITC- 標幟的 CD14 的抗體混和，在暗室中進行反應30分鐘後，以 PBS 清洗，離心後，以流式細胞儀分析細胞表面上 CD11b 及 CD14 的表現量。同時也以螢光標誌的抗體分析細胞表面 CD11c、CD18、CD54 的表現量。對照組是以 PE- 或是 FITC- 標幟的 IgG1 抗體，與細胞做反應。實驗結果是以平均的螢光強度來表示。

Nitroblue tetrazolium (NBT) 還原活性分析

將 HL60 及 KG-1 細胞 (1×10^5 cells/ml) 培養於含 5% fetal bovine serum 的 RPMI 1640 培養基，將處理過 Sunitinib 不同濃度的細胞收至 eppendorf 中，離心 (1200 rpm, 4°C , 5 mins)，倒掉上清液，加入等量的 1X PBS，混合均勻，再次離心 (1200 rpm, 4°C , 5 mins)，倒掉上清液，再加入 200 μl 濃度為 1 mg/ml Nitroblue tetrazolium (NBT) 及濃度為 200 $\mu\text{g/ml}$ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 混合均勻加入細胞中於 37°C incubator 中放置 1 小時，如果血癌細胞有分化就會形成藍黑色的顆粒 (Blue-black granules)。之後離心去除 NBT solution，並分別置入 96-well plate 中。分別加入 100 μl 於每個 well 中，濃度為 30 nM 的 Vit. D3 中誘導細胞的分化當作 positive control，接著加入處理不同的 Sunitinib 當作實驗組並將配置好的細胞加入各 well 中。拍照，並隨機取樣 3 張相同處理的樣本，算 200 顆細胞在顯微鏡下計數其分化細胞比率。

Differentiation (%) = 細胞質成紫黑色的細胞總數 / 全部細胞總數 X 100 %

TUNEL assay 測定凋亡細胞

當細胞發生凋亡會造成染色體斷裂形成許多 DNA 3'OH 端的暴露。因此利用 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated

dUTP-fluorescein nick end-labelling) 分析以綠色螢光訊號來測定 DNA 3'OH 端斷裂，以此方法間接偵測細胞凋亡。實驗進行時將藥物處理過的細胞以 2% paraformaldehyde 固定 20 分鐘後以 PBS 沖洗，加入 0.1% Triton X-100 作用 30 分鐘後，以 PBS 沖洗。加入 TdT enzyme (terminal deoxynucleotidyl transferase) 與 FITC-dUTP (FITC-deoxyuridine triphosphate) 避光反應 2 小時。(此過程中 FITC-deoxyuridine 結合進入 3'端 DNA) 以 PBS 清洗後，離心後，以流式細胞儀分析細胞的螢光強度。

Annexin V 及 propidium iodide 雙染色測定細胞凋亡

將細胞以 1×10^6 個細胞種於 10 cm 培養皿中，以 sunitinib 培養 24 小時後，在 4°C 以 1200 rpm 離心 5 分鐘，收集細胞。以 PBS 清洗兩次，加入 500 μ l binding buffer (10 mM HEPES/NaOH pH7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) 將細胞打勻，再加入 5 μ l Annexin V 及 5 μ l propidium iodide 後，避光 5 分鐘，以流式細胞儀分析。

蛋白質的萃取 (Protein Extraction)

將處理之細胞，用冰的 PBS 清洗後，在 4°C 以 1200 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞 pellet 均勻打散，加入適量的 RIPA 溶液 [含 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.25%

Sodium Deoxycholate, 5 M EDTA (pH 8.0), 1 mM EGTA (pH 8.0), x 1 mM DTT, x5 µg/ml Leupeptin, x 0.2 mM PMSF, x 5 µg/ml Aprotinin, * 1 mM Na Vanadate, *1 mM NaF (*使用前添加)]，置於冰上作用 20 分鐘，將細胞液以超高速離心 55000 rpm、4 °C、30 分鐘，收集上清液，以 Bradford 的方法測量換算出蛋白質濃度 (µg/µl) 後，取定量的蛋白加入 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 10 分鐘後，即可置於 -80 °C 中保存。

西方點墨法 (Western blot)

分離之蛋白質檢體可利用 discontinuous 聚丙烯醯胺膠體電泳膠 (SDS-PAGE gel)，將蛋白質依分子量分離。SDS-PAGE 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 則含有 4 % acrylamide。配置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)。接著將萃取出來的蛋白質與 4× protein loading dye 混合再以 95 °C 乾浴、加熱變性 10 分鐘，置入冰浴後冷卻後離心。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 100 Voltage，待樣品通過 stacking gel 後電壓調整為 80 Voltage，視其分子量大小斟酌電泳時間後，即可將電源關閉。再

將膠體與 PVDF membrane 浸於 methanol 數秒後以 Milli-Q 水浸濕，接著浸泡在 transfer buffer (50 mM Tris, 40 mM glycine, 0.37% SDS, pH 9.0 - 9.4; 20% methanol) 中。將膠體中的蛋白轉漬到 PVDF membrane 上。將轉漬後之 PVDF membrane 浸泡於 5% non-fat milk / TBST 中，於室溫下搖晃至少一小時。以 1 倍之 TBST buffer 清洗 membrane 10 分鐘三次，加入一級抗體，置於 4 °C 下隔夜後，再以 TBST buffer 清洗 membrane 10 分鐘三次，加入二級抗體，在室溫下搖晃作用一小時之後，再用 TBST buffer 清洗 10 分鐘三次，接著在暗房中將 membrane 與 ECL (Enhance chemi-luminescence) 溶液反應後，裝於透明塑膠袋內並置於壓片夾中，以 X-ray 感光顯影，再以自動沖片機沖片。

創酶蛋白活性分析 (Caspase activity assay)

收集藥物處理後之細胞，用冰的 PBS 清洗後離心，將沉澱的細胞均勻打散，加入適量的細胞分解液(1% Trion X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 2 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin)，置於冰上作用 20 分鐘。萃取蛋白液經 Bradford 方法將蛋白定量後，取 200 µg/ml 蛋白、50 µl 的 2 倍 reaction buffer 及 10 µl 之 1 M DTT 混合後，加入 96 孔盤中，避光再加入每孔 2.5 µl 的 200 µM caspase substrate，如：caspase-2 (VDVAD-AFC)，caspase-3

(DEVD-AFC), caspase-8 (IETD-AFC) 與 caspase-9 (LEHD-AFC) 的反應基質 (substrates)。此反應在 37 °C 中作用 2 小時後，以螢光 fluorescence microplate reader 在 excitation wavelength 405 nm 及 emission wavelength 510 nm 的條件下偵測。

急性骨髓性白血病患者血液中純化分離血癌細胞

將急性骨髓性白血症病人血液在 4°C 以 1600 rpm 離心 10 分鐘，取上清液輕輕注入含 6 ml HISTOPAQUE 溶液上層，再於 4°C 以 3000 rpm 離心 30 分鐘，由兩層溶液中間之 buffy coat 層分離出急性骨髓性白血症病人血癌細胞，以 PBS 洗清兩次，在 4°C 以 1600 rpm 離心 5 分鐘後，將細胞打散，培養於含 10% FBS 的 RPMI-1640 培養液中。本研究經台中榮民總醫院人體試驗委員會審查通過後執行 (計畫編號: CE11166)。

統計分析及實驗操作方法

實驗結果以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) 表示，使用 One-way ANOVA 統計方法，並以 Student's *t*-test 及 SARS 分析法來決定實驗組與對照組之差異。*、**、及 *** 分別顯示當 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 及 $p < 0.001$ 時，統計上具顯著差異。

實驗結果

1. Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞週期 G1 期停滯及凋亡

為了證實 sunitinib 對於急性骨髓性白血病細胞的抑制作用，以不同濃度的 sunitinib 分別處理急性骨髓性白血病 HL60 以及 KG-1 細胞。經處理 24 及 48 小時後，再以 trypan blue exclusion 的方法計算細胞存活率。如圖一顯示，以較高濃度的 sunitinib 處理較長的時間，會抑制 HL60 以及 KG-1 細胞的生長。在 sunitinib 處理 48 小時的情形下，對於 HL60 以及 KG-1 細胞之百分之五十細胞生長抑制濃度 (Inhibitory concentration 50, IC₅₀) 分別是 4.5 以及 3.9 μM 。為了更加了解 sunitinib 所造成急性骨髓性白血病細胞生長抑制之機轉，本實驗探討了 sunitinib 對於急性骨髓性白血病細胞細胞週期的影響。結果如圖二所顯示。HL60 以及 KG-1 細胞在經由 sunitinib 處理 24 小時後，G0/G1 期的細胞比例顯著增加；同時 S 以及 G2/M 期的細胞比例顯著減少，顯示處理 sunitinib 會使 HL60 及 KG-1 細胞週期停滯於 G0/G1 期。進一步分析細胞週期的變化發現，當 HL60 及 KG-1 細胞在經由 sunitinib 處理 24 小時後，細胞的 sub-G1 比例開始上升。而當細胞被處理 48 小時後，這個比例持續增加。這樣的實驗結果表示，HL60 以及 KG-1 細胞在經由 sunitinib 處理後，DNA 會被裂解，細胞進行凋亡作用。

接著，處理 sunitinib 的細胞以 annexin V 及 Propidium iodide 雙重染色。結果如圖三，經過 sunitinib 處理過後的 HL60 及 KG-1 細胞呈現較高的 annexin V 染色，顯示 sunitinib 可以促進 HL60 及 KG-1 細胞的凋亡。

2. Sunitinib 調控細胞週期 G1 期相關分子

由於 sunitinib 處理可以造成細胞停滯於 G0/G1 期，顯示細胞週期 G1 期的調控分子會受到調控。接著以西方墨點法分析細胞週期 G0/G1 期的調控分子蛋白質的表現量。結果如圖四所示。HL60 及 KG-1 細胞在經過 sunitinib 處理 24 小時後，P27^{kip1}，pRB1，以及 p130/Rb2 的表現量顯著上升。然而細胞週期蛋白 cyclin D1 與 D3，以及細胞週期蛋白依存激酶 cyclin-dependent kinase 2 (Cdk 2) 表現量明顯下降。然而細胞週期蛋白依存激酶 4 與 6，以及細胞週期蛋白 cyclin D2 和 E 則不受 sunitinib 處理影響。

3. Sunitinib 誘發經 caspase 所造成的細胞凋亡

caspase 的活化在細胞凋亡的過程中佔有重要的地位，接著探討 HL60 及 KG-1 細胞在經過 sunitinib 處理後，其 caspase 的活性變化。實驗結果顯示，HL60 及 KG-1 細胞在經過 sunitinib 處理 48 小時後，caspase-2，-3，-8，以及-9 的活性顯著增加（如圖五）。然而 caspase-12

的活性則沒有變化。利用西方點墨法分析 caspase-3, -8, 以及-9 的蛋白質表現量, 結果如圖六。sunitinib 處理 48 小時後, 裂解為小片段活化型態的 caspase-3, -8, 以及-9 的表現量增加, 顯示其被活化而活性增強。若前處理 caspase-2, -3, -8, 以及-9 的抑制劑可明顯的降低 sunitinib 造成的 HL60 及 KG-1 細胞之凋亡現象 (sub-G1 的細胞數量明顯減少) (如圖七)。

4. Sunitinib 調控細胞凋亡相關分子

上述實驗結果, 得知 caspase-2, -3, -8, 以及-9 的活化參與了 sunitinib 誘發的細胞凋亡。顯示 sunitinib 可同時經由活化粒腺體以及死亡受體兩路徑啟動細胞凋亡的作用; 由於先前許多研究均已證實 Bcl-2 家族成員是調控粒腺體死亡路徑的主要分子 (Kelly and Strasser, 2011), 為了進一步探討處理 sunitinib 的細胞可經由粒腺體路徑造成細胞凋亡, 就以西方墨點法測定 Bcl-2 家族中抑制凋亡分子以及促凋亡分子的表現。實驗結果顯示, 當 HL60 及 KG-1 細胞處理 sunitinib 後, 抑制凋亡分子 Bcl-2 及 Mcl-1 的表現量顯著下降。相反的, 促凋亡分子 Bax, Bak, 以及 PUMA 的表現量則明顯上升 (如圖八)。但 Bcl-xL 的表現量則沒有改變。

為了探討 sunitinib 可調控死亡受體的表現, 造成 HL60 及 KG-1

細胞經由死亡受體活化路徑的凋亡。實驗也測試了 sunitinib 處理後，死亡受體的蛋白質表現量之變化。結果顯示，經 sunitinib 處理的 HL-60 及 KG-1 細胞，其細胞內死亡受體 Fas，Fas-L，DR4，以及 DR5 等分子之表現明顯上升（如圖九）。相反的腫瘤壞死因子接受體(tumor necrosis factor receptor) 1 及 2 則不受影響。綜合上述結果，可得知 sunitinib 所誘發之 HL60 以及 KG-1 細胞凋亡，是同時經由 Bcl-2 家族分子以及細胞死亡受體家族分子所調控。

5. Sunitinib 促使急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化

先前 Nishioka 等人的研究已證明 sunitinib 可以促進人類急性骨髓性白血病 HL60 以及 MOLM13 細胞株進行單核球分化 (Nishioka et al., 2009)。本研究也進一步探討 sunitinib 誘導急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化的可能機轉。首先由流式細胞儀分析細胞表面分子的變化，證實 sunitinib 可促使 HL60 以及 KG-1 細胞進行單核球分化。實驗結果顯示，在 HL60 及 KG-1 細胞經 sunitinib 處理後，代表細胞進行單核球分化的表面分子 CD14 及 CD11b 的表現量，有顯著的增加，並呈現劑量效應（如圖十）。進一步分析與單核球細胞分化相關的其他細胞表面分子 CD11c，CD18，及 CD54。由於維生素 D 是一已知會促進血癌細胞分化為單核球的化合物，因此本實驗以維生素 D 處

理當做為促進細胞分化藥物的正對照組。結果發現處理維生素 D 確實可以增加單核球細胞分化的指標分子 CD11b, CD14, CD11c, CD18, 及 CD54 在細胞膜上的表現量；且 sunitinib 處理也會顯著增加這些分化指標分子的表現 (如圖十一)。

接著利用 Wright-Giemsa 染色法觀察 sunitinib 處理後細胞型態的變化。實驗結果如圖十二 所示, 未經 sunitinib 處理的 HL60 以及 KG-1 細胞呈現骨髓芽球狀, 且具有規則的細胞邊緣以及大的細胞核與清楚的核仁。但經過 sunitinib 處理的 HL60 以及 KG-1 細胞, 其細胞核變小且呈現不規則凹凸的邊緣以及較多的細胞質比例。此型態的變化, 顯示 sunitinib 處理的 HL60 以及 KG-1 細胞走向單核球分化的路徑, 呈現單核球分化的細胞特徵。量化的結果顯示, 經過 1 μ M sunitinib 處理的 HL60 細胞中, 約有 $76.5\% \pm 6.3\%$ 呈現單核球分化的型態變化。而約有 $87.2\% \pm 7.5\%$ 的 KG-1 細胞有類似的變化。這樣的比例, 顯著的高於對照組 (如圖十三)。NBT 實驗的結果亦顯示 sunitinib 可促使急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化。如圖十四所示, HL60 以及 KG-1 細胞在經過 1 μ M sunitinib 處理 24 小時後, 有更多的細胞其細胞質中出現黑色顆粒。將此實驗結果量化, 發現 $48.5\% \pm 5.6\%$ 的 HL60 細胞以及 $57.3\% \pm 5.9\%$ 的 KG-1 細胞呈現 NBT assay 陽性, 顯著高於對照組 (如圖十五)。綜合以上之實驗結果可知, sunitinib 處理

後可誘導 HL60 及 KG-1 細胞走向單核球細胞分化的路徑。

6. Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化經由蛋白質激酶 C 參與之路徑

在骨髓細胞的分化過程中，有許多的細胞內訊息傳遞分子參與其中，例如 mitogen-activated protein kinase, Janus family kinase, phosphatidylinositol-3-kinase, Smad, 以及蛋白質激酶 C (Miranda and Johnson, 2007)。為了了解 sunitinib 促使急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化的分子機轉，加入了不同訊息傳遞分子的抑制劑，來探討這些分子與單核球分化的關連性。實驗結果如圖十六所示，前處理蛋白質激酶 C α 和 β 的抑制劑 Go6976，可顯著的減少 HL60 及 KG-1 細胞膜上 CD14 以及 CD11b 的表現，顯示抑制蛋白質激酶 C α 和 β 可抑制 sunitinib 誘發的 HL60 及 KG-1 細胞進行單核球分化。以西方點墨法偵測蛋白質激酶 C α 和 β 蛋白質表現量，結果發現，不同濃度 sunitinib 處理 HL60 及 KG-1 細胞，2 小時後，磷酸化的蛋白質激酶 C α 和 β 的表現顯著增加 (圖十七)。相反的，磷酸化蛋白質激酶 C δ 並沒有變化。此實驗結果證明了 sunitinib 促使急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化可能與蛋白質激酶 C α 和 β 傳遞的訊息有關連。

7. Sunitinib 促使急性骨髓性白血病患者的癌細胞進行單核球分化及細胞凋亡

為了解 sunitinib 在急性骨髓性白血病病患臨床的使用潛力，將來自於三位急性骨髓性白血病患者的癌細胞分別以 sunitinib 處理後，分析 sunitinib 促進病患血癌細胞之分化及細胞死亡的現象。此三位病患的臨床診斷分別是兩位 FAB-M2，以及一位 FAB-M5。實驗結果如圖十八，當病患之血癌細胞分別經 0.3 和 1 μM sunitinib 處理後，其中兩位診斷為急性骨髓性白血病 FAB-M2 病患的血癌細胞，在經 sunitinib 處理後，表面標記 CD14 和 CD11b 的比例有顯著的增加。表示急性骨髓性白血病病患的血癌細胞的確因 sunitinib 的處理而進行單核球分化。然而另一位診斷為急性骨髓性白血病 FAB-M5 病患的血癌細胞，在經 sunitinib 處理後，表面標記 CD14 和 CD11b 的表現並沒有顯著增加。表示 sunitinib 無法促使 FAB-M5 病患的血癌細胞進行單核球分化。

另外，亦進行了 sunitinib 對急性骨髓性白血病患者血癌細胞的毒性實驗。來自於這三位病患之血癌細胞，在經由 sunitinib 6 μM 處理 48 小時後，幾乎全部死亡。若以 3 μM 的 sunitinib 處理 48 小時後，存活血癌細胞的比例則分別為 $25\% \pm 3\%$ ， $35\% \pm 6\%$ ，以及 $20\% \pm 5\%$ (圖十九)。

討論

“Two-hit” 理論是目前解釋急性骨髓性白血病的病理機轉最廣為認同的模式之一。這個理論的根源，是認為急性骨髓性白血病的發生，是因為兩類型的基因突變所造成。其中第一類型基因的突變是使得白血球分化被抑制；而第二類型基因的突變則是造成白血球的增生失控 (Kelly et al., 2002)。基於上述理論，學者專家提出假說，認為促進急性骨髓性白血病細胞分化以及細胞凋亡是治療這個疾病最重要的策略。因此，世界各國的醫藥業界及學界均致力於開發具有誘導癌細胞分化及凋亡的有效抗癌藥物。Sunitinib 是一個多標靶的抗癌藥物，目前臨床應用於治療轉移性腎癌及腸胃基質瘤，也有些小型臨床研究發現其對血癌病人亦有緩解的效果。究竟 sunitinib 對血癌病人的有效性是否與細胞分化及細胞凋亡有關，相關的研究報告甚少，值得進一步探究。因此，本論文之研究在細胞模式探討 sunitinib 對人類急性骨髓性白血病細胞的分化及死亡的作用。研究結果顯示，以 sunitinib 處理人類急性骨髓性白血病 HL60 以及 KG-1 細胞株 48 小時後，其百分之五十細胞生長抑制濃度 (Inhibitory concentration 50, IC50) 分別為 4.5 以及 3.9 μM 。此外，本研究亦顯示 sunitinib 會造成 HL60 以及 KG-1 細胞停滯於 G0/G1 期，誘導單核球分化，以及促進細胞凋亡。而 Sunitinib 所造成的這些現象，很可能與 p53 基因無關，因為 HL60

細胞株並沒有 p53 基因的表現 (Konopleva et al., 2002), 但 HL60 細胞依舊對於 sunitinib 的處理產生與 KG-1 細胞 (具 p53 基因的表現) 同樣的反應。本研究亦發現, sunitinib 可誘導急性骨髓性白血病患者之血癌細胞產生單核球分化以及細胞毒殺的作用。

在哺乳類動物細胞中, 有一群調控細胞週期 G1 至 S 期的分子, 這些分子包含 Cdk, D-type cyclins, Rb family 蛋白質, 以及 Cdk 抑制蛋白。D-type cyclins 可在早期及中期時活化 Cdk-4/6, 而 cyclin E 則是在 G1 的晚期出現, 並在 G1/S 期活化 Cdk-2 激酶 (Lange and Calegari, 2010)。而哺乳類動物細胞中的 Cdk 抑制劑 p27^{kip1} 可抑制細胞週期由 G0/G1 進展至 S 期。當 p27^{kip1} 高度表達時會促使哺乳類動物細胞休止於細胞週期的 G0/G1 期 (Blomen and Boonstra, 2007)。而視網膜母細胞瘤 (Rb) 蛋白質家族, 其中包含了 pRb1, p130/Rb2, 以及 p107 則藉由負向調控機轉, 在細胞週期中扮演控制 G0/G1 期的角色。這樣的調控機制, 可藉由 Rb 蛋白以不同形式與不同時間的表現, 與 E2F 蛋白共同參予 (Dyson, 1998)。而 sunitinib 造成的細胞凋亡亦有可能是藉由上述分子所引發。文獻報導顯示, sunitinib 可藉由負向調控 cyclin E, cyclin D2, 以及 cyclin D2, 且正向調控 p27^{kip1}, 造成視網膜母細胞瘤細胞的生長停滯 (Yang et al., 2010)。本研究的結果, 發現 sunitinib 可以造成人類急性骨髓性白血病細胞株在細胞週期

G0/G1 期的生長停滯。這樣的現象，可能與 cyclin D1，cyclin D3，和 Cdk2 等分子的負向調控，以及 p27^{kip1}，pRb1，和 p130/Rb2 等分子的正向調控有關。此實驗結果，證明了 sunitinib 對於人類急性骨髓性白血病細胞的生長抑制，是藉由一個多分子參予的路徑，使得細胞停滯於細胞週期 G0/G1 期。

此外，p27^{kip1}，pRb1，和 p130/Rb2 等分子的正向調控可能在 sunitinib 造成的急性骨髓性白血病細胞單核球分化上也扮演了重要的角色。由文獻報導可以得知，Rb 家族分子以及 Cdk 抑制分子，如 p21^{Cip1} 和 p27^{kip1}，可以誘發胚胎幹細胞、神經組織、以及造血幹細胞進行細胞分化 (Lange and Calegari, 2010)。此外，缺乏 p27^{kip1} 表現的小鼠則會有細胞分化上的缺陷 (Tong et al., 1998)。在造血細胞系統中，p27^{kip1} 的累積不但會引起紅血球細胞的分化，亦會造成細胞週期 G1 期的停止 (Dzikaite et al., 2000)。他人研究也顯示，pRb1，和 p130/Rb2 等分子的正向調控會促進肌肉細胞 (Delehouzee et al., 2005)、脂肪細胞 (Hansen et al., 2004)、骨髓性血球細胞 (Garriga et al., 1998)、成骨細胞 (Thomas et al., 2001)、角質細胞 (Paramio et al., 1998)、以及神經星狀細胞 (Galderisi et al., 2001) 等的細胞分化。本研究結果顯示，在 sunitinib 造成的急性骨髓性白血病細胞單核球分化過程中，p27^{kip1}，pRb1，和 p130/Rb2 等分子的表現顯著增加。至於這些分子之間的關

聯性，則需要更多的研究去進一步的探討。綜合上述的實驗結果，可提出下列的假設。當人類急性骨髓性白血病細胞經 sunitinib 處理後，導致細胞週期停滯與單核球分化，此現象與 Cyclin D1 表現量的減少，以及 p27^{kip1}，pRb1，和 p130/Rb2 表現量的增加，有極大的關聯性。

本論文之研究結果，發現 PKC α/β 在 sunitinib 所引起的急性骨髓性白血病細胞單核球分化作用中，扮演重要的調控角色。之前的研究也顯示，PKC 的活化對於血液細胞的單核球分化有重要的影響 (Meinhardt et al., 2000)。PKC α 以及 PKC β 亦被證明在 TPA 誘發的 U937 細胞分化過程中，扮演重要的角色 (Macfarlane and Manzel, 1994)。而 PKC α 的過度表現亦會誘發 U937 細胞的單核球分化 (Noti et al., 2001)。研究更進一步發現，白血球生成激素所造成的 HL60 細胞的細胞分化，可以被 PKC 的抑制劑所阻止 (Deshpande et al., 1997)。本論文的實驗結果顯示，經 sunitinib 處理後的 HL60 和 KG-1 細胞，磷酸化的 PKC α 以及 PKC β 表現量增加 (圖十七)。而 sunitinib 所誘導的急性骨髓性白血病細胞單核球分化，可以部分的被 PKC α 以及 PKC β 的抑制劑所阻斷 (圖十六)。這樣的實驗結果，證明了 PKC α 以及 PKC β 在 sunitinib 所誘導的急性骨髓性白血病細胞單核球分化過程中，扮演重要的角色。然而，此實驗結果，無法排除有其他分子

參與調控 sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞單核球分化的過程。先前 Nishioka 等人的研究顯示，sunitinib 所誘發的急性骨髓性白血病 MOLM13 和 HL60 細胞之單核球分化是伴隨著 C/EBP α 的正向回饋，以及 c-Myc 的逆向回饋 (Nishioka et al., 2009)。然而，在本研究的實驗結果中，並無法偵測到 C/EBP α 以及 c-Myc 的變化。

由於以 sunitinib 處理人類急性骨髓性白血病細胞時，subG1 期的細胞數目增加，且細胞表面 phosphatidylserine 的轉位現象增加，而證實 sunitinib 具有誘發血癌細胞凋亡的能力。同時，也探討了 sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞凋亡的作用機轉。Sunitinib 引起細胞凋亡的現象已被發現在許多癌症細胞株中，像是具有 Flt3 K663Q 的 Ba/F3 細胞 (Schittenhelm et al., 2006)，腎細胞癌細胞 (Xin et al., 2009)，具有 Flt3 突變的 MV4-11 和 MOLM14 血癌細胞 (Nishioka et al., 2008)，以及人類膀胱癌 T24 細胞 (Ping et al., 2010)。但是 sunitinib 造成急性骨髓性白血病細胞凋亡的機轉，尚不明確。過去的研究顯示，將子宮頸癌細胞 (Miller et al., 2010)，髓質母細胞瘤細胞 (Yang et al., 2010)，人類泌尿道上皮癌細胞 (Sonpavde et al., 2009)，乳癌細胞 (Zwolak et al., 2008)，腸胃道基質瘤細胞 (Ikezoe et al., 2006)，以及攝護腺癌細胞 (Guerin et al., 2008) 等，經 sunitinib 處理而導致細胞凋亡時，caspase 會被活化。本研究之實驗結果亦證明，當急性骨髓性白

血病細胞經 sunitinib 處理產生凋亡時，caspase-2，-3，-8，以及-9 均被活化。這樣的實驗結果顯示粒線體路徑以及死亡受體路徑兩者皆參與在 sunitinib 所導致的急性骨髓性白血病細胞的凋亡過程。

Bcl-2 家族分子是公認為粒線體細胞凋亡路徑中的重要調控分子。在這個家族的分子中，Bcl-2，Bcl-xL，以及 Mcl-1 屬於抗細胞凋亡的分子；而 Bax，Bak，PUMA，以及 Bad 則屬於促細胞凋亡的分子 (Kelly and Strasser, 2011)。這些分子的交互作用與平衡與否，控制了細胞是否要進行凋亡作用的樞紐。研究顯示，sunitinib 誘發膀胱癌細胞凋亡的過程中，促細胞凋亡分子 Bax 以及 Bad 的表現會增加 (Yoon et al., 2011)。而在 sunitinib 誘發 T24 人類膀胱癌細胞凋亡的過程中，抗細胞凋亡分子 Bcl-2 的表現則降低 (Ping et al., 2010)。研究也顯示 sunitinib 可藉由降低 Mcl-1 的表現，造成大腸癌 SW620 和肺癌 95-D 細胞進行細胞凋亡 (Ding et al., 2010)。本研究的實驗結果顯示，以 sunitinib 處理急性骨髓性白血病細胞後，Bcl-2 以及 Mcl-1 等抗細胞凋亡分子的表現減少；而促細胞凋亡的分子 Bax，Bak，以及 PUMA 等的表現則明顯增加。此實驗結果證明，sunitinib 可經由粒線體路徑造成急性骨髓性白血病細胞的凋亡。

本研究亦發現，在處理 sunitinib 的血癌細胞中，caspase-8 被活化，顯示死亡受體路徑也參與調控 sunitinib 誘導的細胞凋亡。同時由本研

究所呈現的結果中亦發現，sunitinib 處理可增加細胞死亡受體家族的分子 Fas, FasL, DR4, 以及 DR5 的表現。本研究是第一個發現 sunitinib 可經由死亡受體路徑誘導急性骨髓性白血病細胞進行凋亡。但是這些調控死亡路徑的促細胞凋亡分子以及抑制細胞凋亡分子的表現及活性調控機制，仍需繼續深入的探討。

為了進一步了解 sunitinib 應用於臨床治療急性骨髓性白血病的可能性，本研究利用急性骨髓性白血病病患之初代培養的血癌細胞，進行 sunitinib 的細胞毒性以及促進細胞分化的實驗。結果顯示，三位病患的血癌細胞經高劑量 (6 μ M) sunitinib 處理後，皆呈現明顯的細胞凋亡現象。而在低劑量 (3 μ M) 的 sunitinib 處理下，編號一號以及二號病患的血癌細胞則顯著的被 sunitinib 誘導分化。此實驗結果，初步的印證了 sunitinib 在臨床治療急性骨髓性白血病的可能性。然而單核球的細胞分化並未在三號病患的血癌細胞發生。其可能的原因是，由於三號病患的診斷是急性單核球白血病，此時期的血癌細胞原本就已經有 CD11b 以及 CD14 的表現，故 sunitinib 的處理無法進一步的促使其 CD11b 以及 CD14 的表現。而上述的這些實驗結果，還需要更多病患參與實驗，來證實 sunitinib 應用於臨床治療急性骨髓性白血病的潛力及其作用原理。

結論

綜合本論文的實驗結果，本研究證實了多目標酪胺酸激酶抑制劑 sunitinib 可造成人類急性骨髓性白血病細胞 HL60 以及 KG-1 細胞週期 G0/G1 停滯，誘導白血病細胞走向單核球分化，並且促進細胞凋亡（圖二十）。其中急性骨髓性白血病細胞週期 G0/G1 停滯和單核球分化的機轉，可能與 p27^{kip1}，pRb1，和 p130/Rb2 的表現增加，以及 cyclin D1，cyclin D3，和 Cdk2 的表現減少有關。而 PKC α 和 PKC β 的活化亦在 sunitinib 誘導的急性骨髓性白血病細胞單核球分化的過程中，扮演重要的角色。此外，由 caspase-2，-3，-8，和-9 的活化，促細胞凋亡的分子 (Bax，Bak，PUMA，DR4，以及 FasL) 的正向調控，以及抑制凋亡的分子 (Bcl-2 和 Mcl-1) 的負向調控，可得知 sunitinib 可同時經由內在與外在路徑，導致急性骨髓性白血病細胞產生細胞凋亡。但是 sunitinib 在臨床治療急性骨髓性白血病的應用，則需要大型的臨床試驗來進一步探討與證實。

參考文獻

- Altman, J.K., Sassano, A., and Plataniias, L.C. (2011). Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions. *Oncotarget* 2, 510-517.
- Atkins, M., Jones, C.A., and Kirkpatrick, P. (2006). Sunitinib maleate. *Nature reviews Drug discovery* 5, 279-280.
- Barnes, T., and Reinke, D. (2011). Practical management of imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin J Oncol Nurs* 15, 533-545.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* 33, 451-458.
- Blomen, V.A., and Boonstra, J. (2007). Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol Life Sci* 64, 3084-3104.
- Byrd, J.C., Mrozek, K., Dodge, R.K., Carroll, A.J., Edwards, C.G., Arthur, D.C., Pettenati, M.J., Patil, S.R., Rao, K.W., Watson, M.S., *et al.* (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100, 4325-4336.
- Caram, M.V., and Schuetze, S.M. (2011). Advanced or metastatic gastrointestinal stromal tumors: systemic treatment options. *J Surg Oncol* 104, 888-895.
- Cassileth, P.A., Harrington, D.P., Appelbaum, F.R., Lazarus, H.M., Rowe, J.M., Paietta, E., Willman, C., Hurd, D.D., Bennett, J.M., Blume, K.G., *et al.* (1998). Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *The New England journal of medicine* 339, 1649-1656.

Chao, M.P., Majeti, R., and Weissman, I.L. (2012). Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 58-67.

Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7, 821-830.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular cell* 37, 299-310.

Cohen, M.H., Gootenberg, J., Keegan, P., and Pazdur, R. (2007). FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *Oncologist* 12, 356-361.

Curtin, J.F., and Cotter, T.G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 15, 983-992.

Dancey, J.E., Bedard, P.L., Onetto, N., and Hudson, T.J. (2012). The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 148, 409-420.

Delehouzee, S., Yoshikawa, T., Sawa, C., Sawada, J., Ito, T., Omori, M., Wada, T., Yamaguchi, Y., Kabe, Y., and Handa, H. (2005). GABP, HCF-1 and YY1 are involved in Rb gene expression during myogenesis. *Genes Cells* 10, 717-731.

Delforge, M. (2011). Bortezomib for previously untreated multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother* 12, 2553-2564.

Deshpande, R.V., Peterson, R.H., and Moore, M.A. (1997). Granulocyte colony-stimulating factor-induced activation of protein kinase-C in myeloid cells. *J Cell Biochem* 66, 286-296.

Di Sano, F., Ferraro, E., Tufi, R., Achsel, T., Piacentini, M., and Cecconi, F. (2006). Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol*

Chem 281, 2693-2700.

Ding, W., Cai, T., Zhu, H., Wu, R., Tu, C., Yang, L., Lu, W., He, Q., and Yang, B. (2010). Synergistic antitumor effect of TRAIL in combination with sunitinib in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 293, 158-166.

Dombret, H. (2011). Gene mutation and AML pathogenesis. *Blood* 118, 5366-5367.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.

Dzikaite, V., Kanopka, A., Brock, J.H., Kazlauskas, A., and Melefors, O. (2000). A novel endoproteolytic processing activity in mitochondria of erythroid cells and the role in heme synthesis. *Blood* 96, 740-746.

Erol, A. (2011). Deciphering the intricate regulatory mechanisms for the cellular choice between cell repair, apoptosis or senescence in response to damaging signals. *Cell Signal* 23, 1076-1081.

Galderisi, U., Melone, M.A., Jori, F.P., Piegari, E., Di Bernardo, G., Cipollaro, M., Cascino, A., Peluso, G., Claudio, P.P., and Giordano, A. (2001). pRb2/p130 gene overexpression induces astrocyte differentiation. *Mol Cell Neurosci* 17, 415-425.

Garrett, C.R., and Eng, C. (2011). Cetuximab in the treatment of patients with colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther* 11, 937-949.

Garriga, J., Limon, A., Mayol, X., Rane, S.G., Albrecht, J.H., Reddy, E.P., Andres, V., and Grana, X. (1998). Differential regulation of the retinoblastoma family of proteins during cell proliferation and differentiation. *Biochem J* 333 (Pt 3), 645-654.

Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1757, 639-647.

Guerin, O., Formento, P., Lo Nigro, C., Hofman, P., Fischel, J.L.,

Etienne-Grimaldi, M.C., Merlano, M., Ferrero, J.M., and Milano, G. (2008). Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 134, 51-57.

Gulbins, E., Dreschers, S., and Bock, J. (2003). Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 88, 85-90.

Gupta, S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Experimental gerontology* 37, 293-299.

Hansen, J.B., Jorgensen, C., Petersen, R.K., Hallenborg, P., De Matteis, R., Boye, H.A., Petrovic, N., Enerback, S., Nedergaard, J., Cinti, S., *et al.* (2004). Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4112-4117.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17, 3835-3849.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Huang, D.C., and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.

Ikezoe, T., Yang, Y., Nishioka, C., Bandobashi, K., Nakatani, H., Taguchi, T., Koeffler, H.P., and Taguchi, H. (2006). Effect of SU11248 on gastrointestinal stromal tumor-T1 cells: enhancement of growth inhibition via inhibition of 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling. *Cancer Sci* 97, 945-951.

Janku, F., Garrido-Laguna, I., Petruzelka, L.B., Stewart, D.J., and Kurzrock, R. (2011). Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6, 1601-1612.

Kadowaki, H., Nishitoh, H., and Ichijo, H. (2004). Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *J Chem Neuroanat* 28, 93-100.

Kelly, L., Clark, J., and Gilliland, D.G. (2002). Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Current opinion in oncology* 14, 10-18.

Kelly, P.N., and Strasser, A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 18, 1414-1424.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

Konopleva, M., Tsao, T., Ruvolo, P., Stiouf, I., Estrov, Z., Leysath, C.E., Zhao, S., Harris, D., Chang, S., Jackson, C.E., *et al.* (2002). Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 99, 326-335.

Kwitkowski, V.E., Prowell, T.M., Ibrahim, A., Farrell, A.T., Justice, R., Mitchell, S.S., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2010). FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* 15, 428-435.

Lange, C., and Calegari, F. (2010). Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 9, 1893-1900.

Li, J., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J*

Biol Chem 281, 7260-7270.

Lowe, S.W., and Lin, A.W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-495.

Macfarlane, D.E., and Manzel, L. (1994). Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC beta) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC beta-defective PET mutant. *J Biol Chem* 269, 4327-4331.

MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* 139, 89-97.

Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in cell & developmental biology* 18, 716-731.

Meinhardt, G., Roth, J., and Hass, R. (2000). Activation of protein kinase C relays distinct signaling pathways in the same cell type: differentiation and caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 7, 795-803.

Mi, J.Q., Li, J.M., Shen, Z.X., Chen, S.J., and Chen, Z. (2012). How to manage acute promyelocytic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 26, 1743-1751.

Miller, S.C., Huang, R., Sakamuru, S., Shukla, S.J., Attene-Ramos, M.S., Shinn, P., Van Leer, D., Leister, W., Austin, C.P., and Xia, M. (2010). Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol* 79, 1272-1280.

Miranda, M.B., and Johnson, D.E. (2007). Signal transduction pathways that contribute to myeloid differentiation. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 21, 1363-1377.

Ninan, M.J., Wadhwa, P.D., and Gupta, P. (2011). Prognostication of

diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Leuk Lymphoma* 52, 360-373.

Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., Takeshita, A., Taniguchi, A., Komatsu, N., Togitani, K., Koeffler, H.P., and Yokoyama, A. (2008). Blockade of MEK/ERK signaling enhances sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene. *Leuk Res* 32, 865-872.

Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., and Yokoyama, A. (2009). Sunitinib, an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor, induces monocytic differentiation of acute myelogenous leukemia cells that is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 23, 2171-2173.

Noti, J.D., Reinemann, B.C., and Johnson, A.K. (2001). The leukocyte integrins are regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in a leukemic cell that overexpresses protein kinase C-zeta. *Int J Oncol* 19, 1311-1318.

Paramio, J.M., Lain, S., Segrelles, C., Lane, E.B., and Jorcano, J.L. (1998). Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* 17, 949-957.

Perez, E.A., Suman, V.J., Davidson, N.E., Gralow, J.R., Kaufman, P.A., Visscher, D.W., Chen, B., Ingle, J.N., Dakhil, S.R., Zujewski, J., *et al.* (2011). Sequential versus concurrent trastuzumab in adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 4491-4497.

Peter, M.E., and Krammer, P.H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545-551.

Ping, S.Y., Wu, C.L., and Yu, D.S. (2010). Sunitinib can enhance BCG mediated cytotoxicity to transitional cell carcinoma through apoptosis pathway. *Urol Oncol*.

Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3, 279-296.

Powles, T., Chowdhury, S., Jones, R., Mantle, M., Nathan, P., Bex, A., Lim, L., and Hutson, T. (2011). Sunitinib and other targeted therapies for renal cell carcinoma. *British journal of cancer* 104, 741-745.

Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 *Suppl*, S97-107.

Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 897-907.

Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I.A., Debatin, K.M., Fischer, A., and de Villartay, J.P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.

Roth, W., and Reed, J.C. (2002). Apoptosis and cancer: when BAX is TRAILing away. *Nature medicine* 8, 216-218.

Sakurai, T., and Kudo, M. (2011). Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology* 81 *Suppl 1*, 24-29.

Schittenhelm, M.M., Yee, K.W., Tyner, J.W., McGreevey, L., Haley, A.D., Town, A., Griffith, D.J., Bainbridge, T., Braziel, R.M., O'Farrell, A.M., *et al.* (2006). FLT3 K663Q is a novel AML-associated oncogenic kinase: Determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248). *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 20, 2008-2014.

Shirley, S., Morizot, A., and Micheau, O. (2011). Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 6, 311-323.

Sonpavde, G., Jian, W., Liu, H., Wu, M.F., Shen, S.S., and Lerner, S.P. (2009). Sunitinib malate is active against human urothelial carcinoma and enhances the activity of cisplatin in a preclinical model. *Urol Oncol* 27, 391-399.

Thomas, D.M., Carty, S.A., Piscopo, D.M., Lee, J.S., Wang, W.F., Forrester, W.C., and Hinds, P.W. (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular cell* 8, 303-316.

Thorburn, A. (2007). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) pathway signaling. *J Thorac Oncol* 2, 461-465.

Tong, W., Kiyokawa, H., Soos, T.J., Park, M.S., Soares, V.C., Manova, K., Pollard, J.W., and Koff, A. (1998). The absence of p27Kip1, an inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, uncouples differentiation and growth arrest during the granulosa->luteal transition. *Cell Growth Differ* 9, 787-794.

Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.

Vermeulen, L., de Sousa e Melo, F., Richel, D.J., and Medema, J.P. (2012). The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol* 13, e83-89.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.

Walczak, H., and Krammer, P.H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256, 58-66.

Wang, S., and El-Deiry, W.S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22, 8628-8633.

Wiernik, P.H. (2010). FLT3 inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 8, 429-436, 444

Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., and Yu, H. (2009). Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 69, 2506-2513.

Yagi, T., Morimoto, A., Eguchi, M., Hibi, S., Sako, M., Ishii, E., Mizutani, S., Imashuku, S., Ohki, M., and Ichikawa, H. (2003). Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* 102, 1849-1856.

Yang, F., Jove, V., Xin, H., Hedvat, M., Van Meter, T.E., and Yu, H. (2010). Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways. *Mol Cancer Res* 8, 35-45.

Yoon, C.Y., Lee, J.S., Kim, B.S., Jeong, S.J., Hong, S.K., Byun, S.S., and Lee, S.E. (2011). Sunitinib malate synergistically potentiates anti-tumor effect of gemcitabine in human bladder cancer cells. *Korean J Urol* 52, 55-63.

Zwolak, P., Jasinski, P., Terai, K., Gallus, N.J., Ericson, M.E., Clohisy, D.R., and Dudek, A.Z. (2008). Addition of receptor tyrosine kinase inhibitor to radiation increases tumour control in an orthotopic murine model of breast cancer metastasis in bone. *Eur J Cancer* 44, 2506-2517.

圖表目錄

Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞週期 G1 期停滯及細胞凋亡。

圖一、*Sunitinib* 抑制急性骨髓性白血病細胞生長

圖二、*Sunitinib* 造成急性骨髓性白血病細胞週期 G1 期停滯

圖三、*Sunitinib* 處理急性骨髓性白血病細胞導致細胞凋亡

圖四、*Sunitinib* 調控細胞週期 G1 期相關之蛋白。

Sunitinib 誘發經 caspase 所造成的細胞凋亡。

圖五、*Sunitinib* 處理促進 caspase 的活化

圖六、*Sunitinib* 增加細胞內被切割之 caspase 活化片段

圖七、*Caspase* 抑制劑可阻礙 *Sunitinib* 誘發之細胞凋亡作用

Sunitinib 調控細胞凋亡相關分子。

圖八、*Sunitinib* 調控 Bcl-2 家族分子之表現

圖九、*Sunitinib* 調控細胞死亡受體家族分子之表現

Sunitinib 促使急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化。

圖十、HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 *Sunitinib* 處理後，細胞

分化指標分子 CD11b 及 CD14 的表現

圖十一、利用流式細胞儀分析細胞分化指標分子 CD11b、CD14、CD11c、CD18 及 CD54 的表現

圖十二、利用 Wright-Giemsa 染色法觀察 sunitinib 處理後急性骨髓性白血病細胞型態的變化

圖十三、處理 Sunitinib 促進 HL60 及 KG-1 細胞之分化

圖十四、處理 Sunitinib 之細胞其 NBT reduction 之活性增強

圖十五、Sunitinib 處理增強 HL60 及 KG-1 細胞之 NBT 活性

經由蛋白質激酶 C 參與之路徑，Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞進行單核球分化。

圖十六、利用 PKC 抑制劑 Go6976 抑制 Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞的分化

圖十七、Sunitinib 促進磷酸化 PKC- α 及磷酸化 PKC- β 蛋白的表現

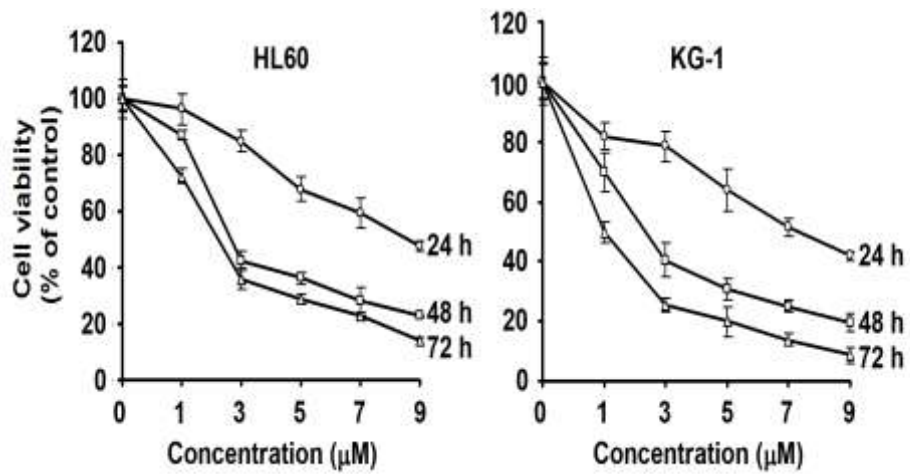
Sunitinib 促使急性骨髓性白血病患者的癌細胞進行單核球分化及細胞死亡。

圖十八、Sunitinib 促進急性骨髓性白血病患者的癌細胞中細胞分化指標分子 CD11b 及 CD14 的表現

圖十九、Sunitinib 處理誘導急性骨髓性白血病患者之癌細胞的死

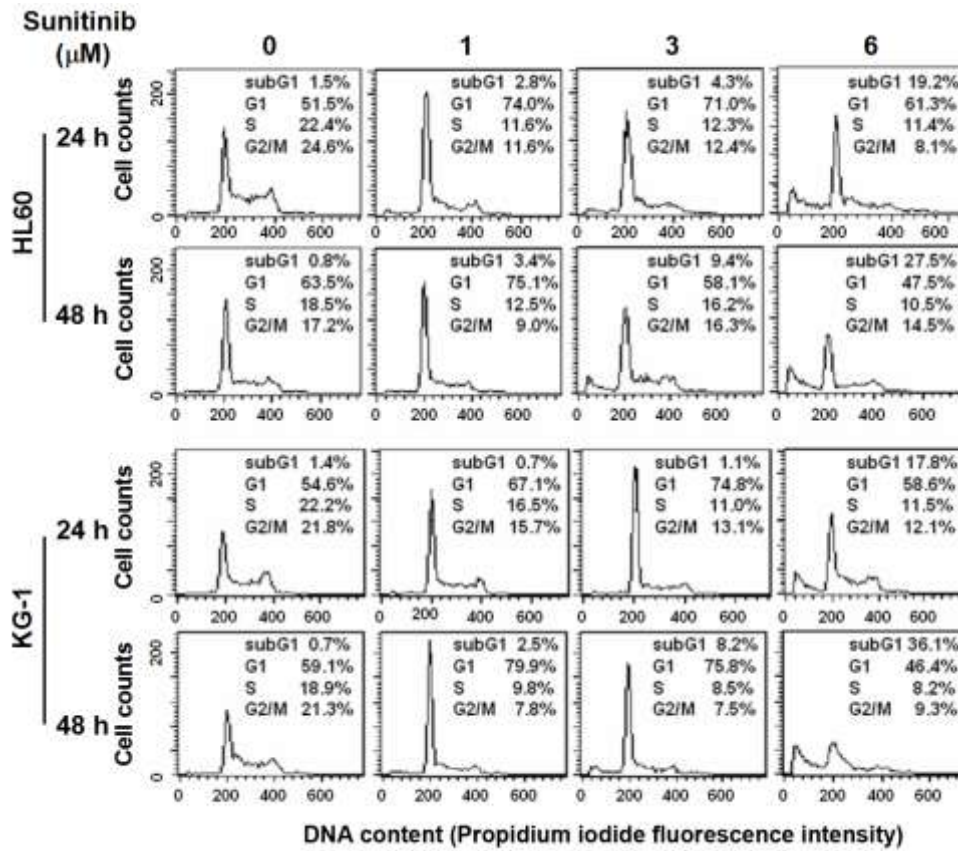
亡

圖二十、研究總結



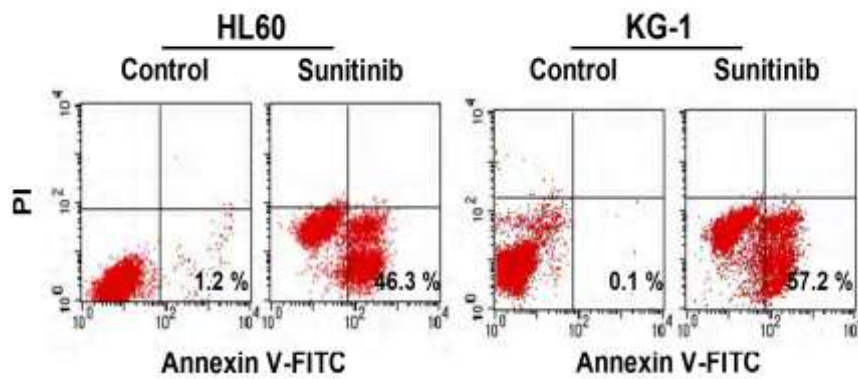
圖一、Sunitinib 抑制急性骨髓性白血病細胞生長

將急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib 培養 24、48 及 72 小時。以 trypan blue dye exclusion 的方法計算存活細胞的數目。



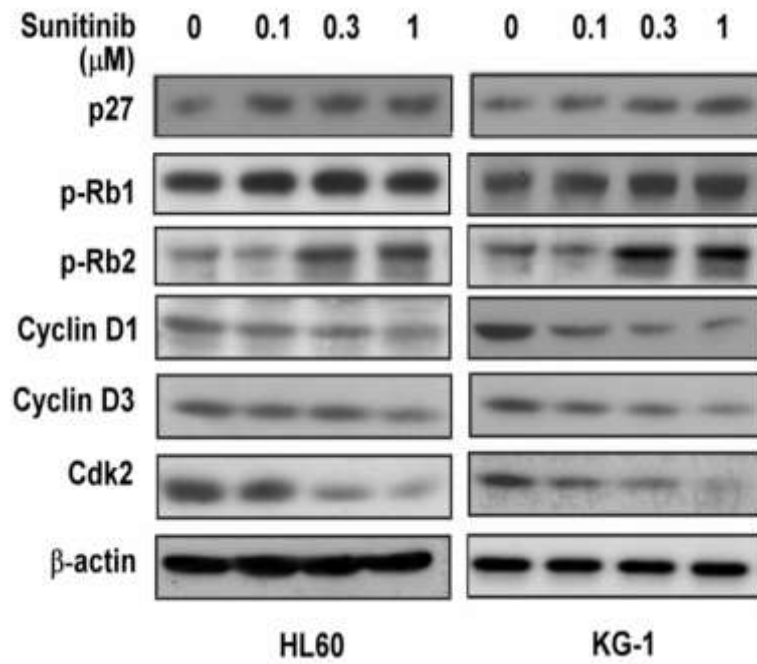
圖二、Sunitinib 造成急性骨髓性白血病細胞週期 G1 期停滯

將急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib 培養處理 24 或 48 小時，以流式細胞儀分析細胞週期之分布。



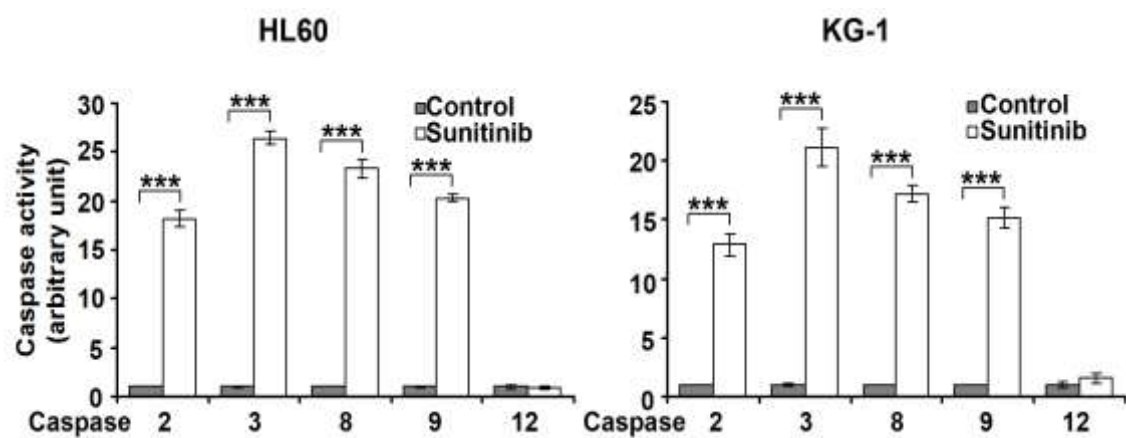
圖三、Sunitinib 處理急性骨髓性白血病細胞導致細胞凋亡

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以 6 μ M Sunitinib 培養 48 小時後，以 annexin-V 及 propidium iodide 雙染色法處理細胞，再以流式細胞儀分析細胞凋亡的狀況。



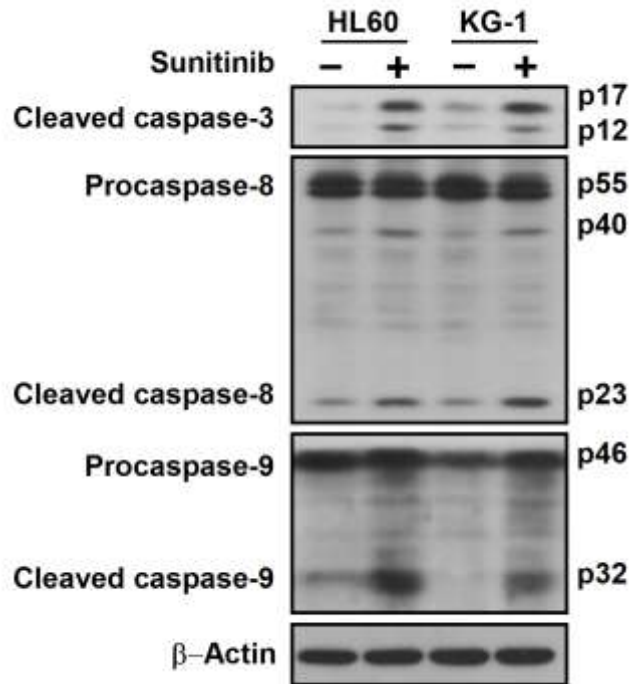
圖四、Sunitinib 調控細胞週期 G1 期相關之蛋白

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度之 Sunitinib (0、0.1、0.3 及 1 μM) 培養 24 小時後，以抗体進行西方點墨法分析與細胞週期 G1 期相關之分子其蛋白質之表現量。



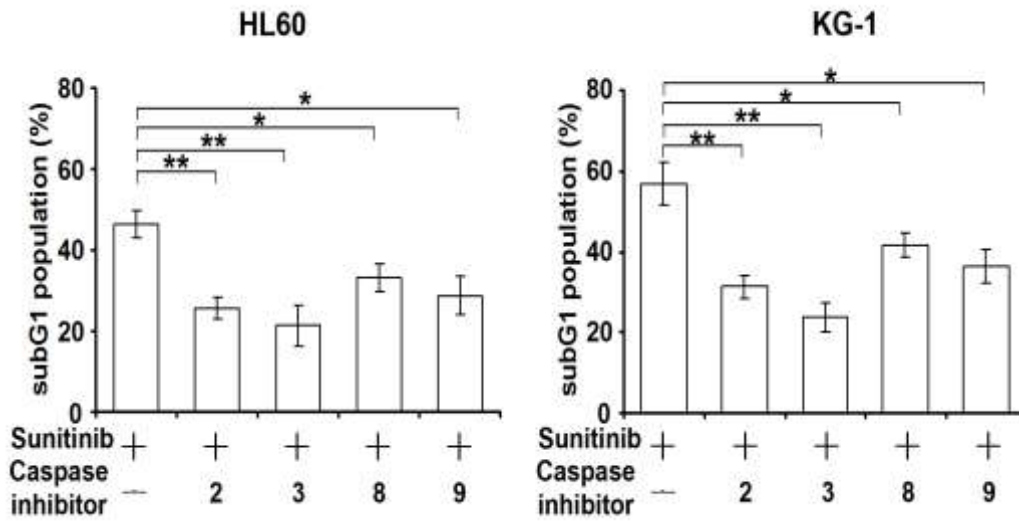
圖五、Sunitinib 處理促進 caspase 的活化

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以 6 μ M Sunitinib 培養 48 小時後，萃取其細胞蛋白液以特殊之螢光胜肽受質測定不同的 caspase 的活性。*** 顯示 $p < 0.001$ 時，統計上具顯著差異。



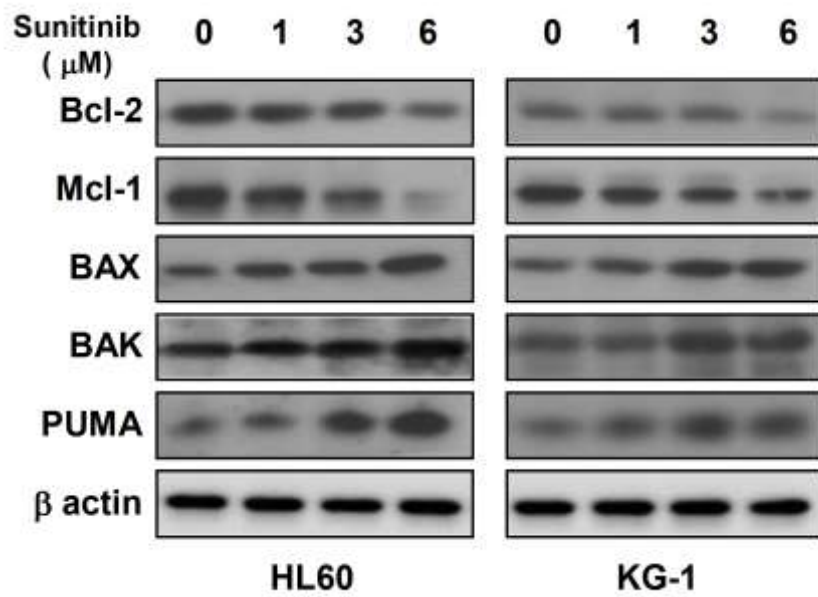
圖六、Sunitinib 增加細胞內被切割之 caspase 活化片段

利用西方點墨法分析 caspase-3, -8, 以及-9 的蛋白質表現量。當 HL60 及 KG-1 細胞經由 6 μ M sunitinib 培養 48 小時後，裂解為小片段活化型態的 caspase-3, -8, 以及-9 的表現量增加，顯示其被活化而活性增強。



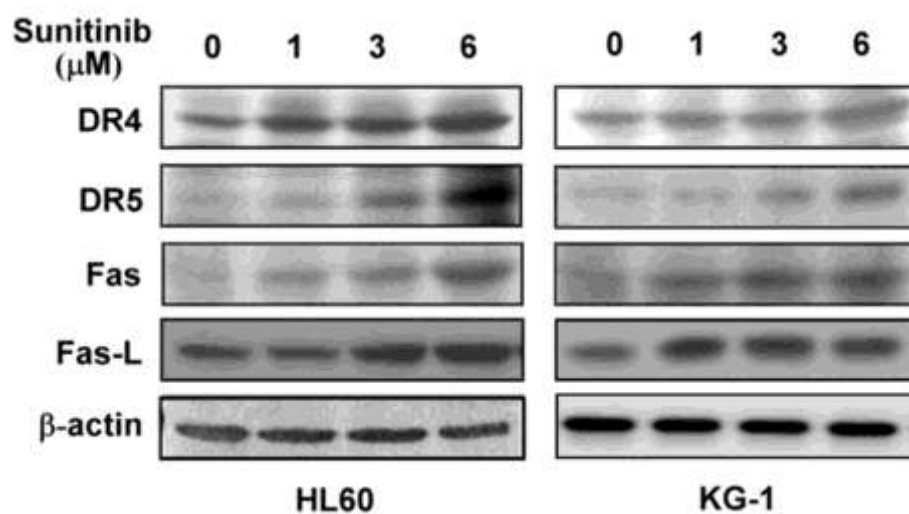
圖七、Caspase 抑制劑可阻礙 Sunitinib 誘發之細胞凋亡作用

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞先處理 caspase 抑制劑 1 小時後，再處理 6 μ M Sunitinib 培養 48 小時後，凋亡之細胞數以 TUNEL 法測定。* 及 ** 分別顯示當 $p < 0.05$ 及 $p < 0.01$ 時，統計上具顯著差異。



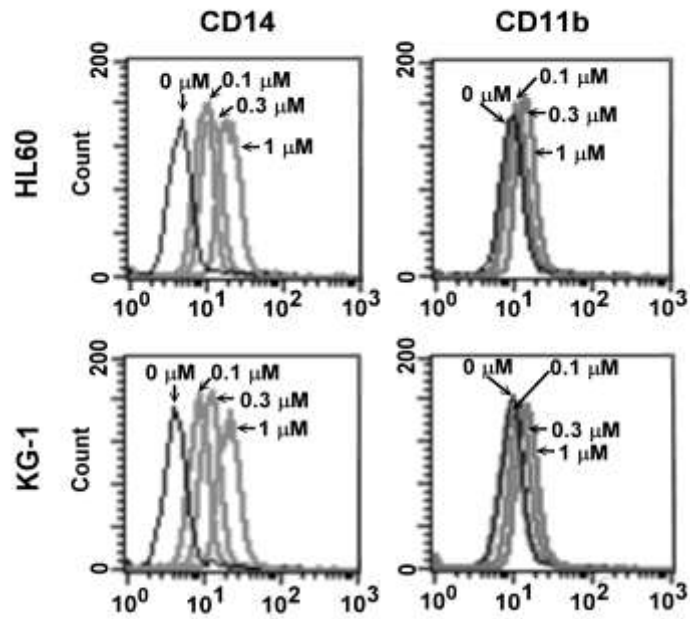
圖八、Sunitinib 調控 Bcl-2 家族分子之表現

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度 Sunitinib 培養 48 小時後，萃取其細胞內蛋白液；以西方點墨法偵測 Bcl-2 家族蛋白之表現。



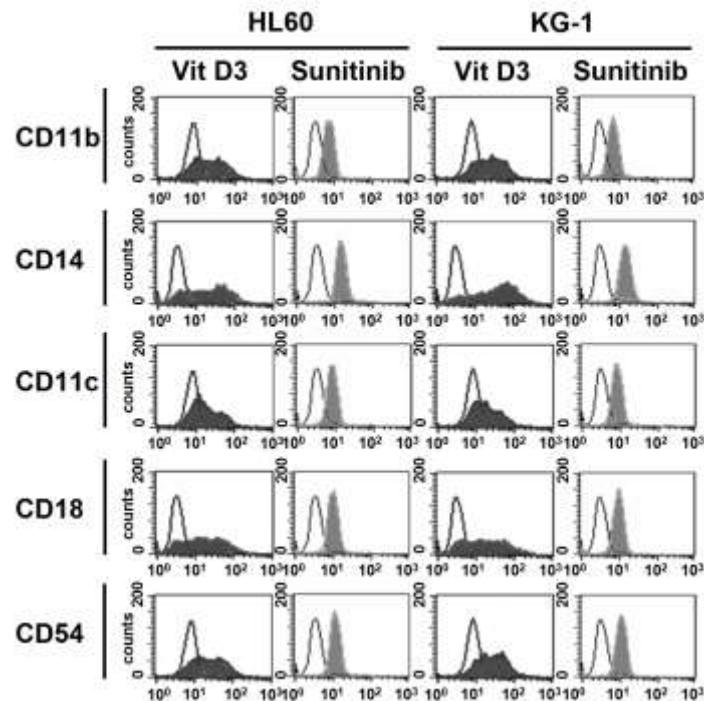
圖九、Sunitinib 調控細胞死亡受體家族分子之表現

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度 Sunitinib 培養 48 小時後，萃取其細胞內蛋白液；以西方點墨法偵測細胞死亡受體家族分子之表現。



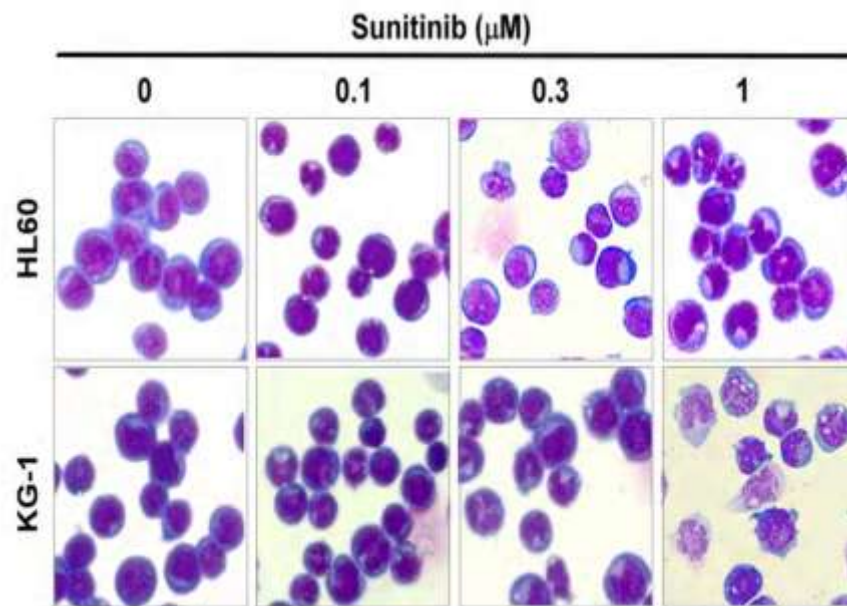
圖十、HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib 處理後，細胞分化指標分子 CD11b 及 CD14 的表現

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib (0、0.1、0.3 及 1 μ M) 培養 24 小時，以帶螢光的 CD11b 及 CD14 抗体處理 20 分鐘後，利用流式細胞儀測定細胞表面螢光變化，分析細胞分化指標分子 CD11b 及 CD14 的表現。



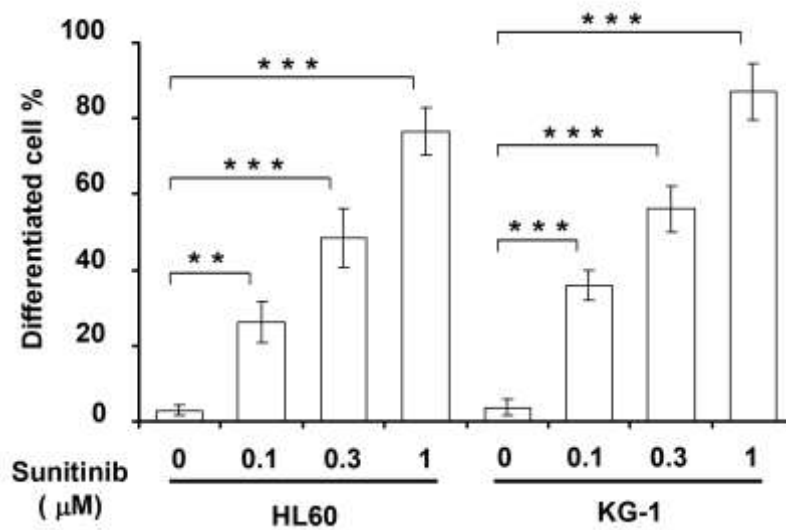
圖十一、利用流式細胞儀分析細胞分化指標分子 CD11b、CD14、CD11c、CD18 及 CD54 的表現

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib (0 及 1 μ M)與不同濃度的 vitamin D3 (0 及 30 nM)培養 24 小時，以螢光標幟的 CD11b、CD14、CD11c、CD18 及 CD54 的抗体處理 20 分鐘後，利用流式細胞儀測定細胞表面螢光變化，分析細胞分化指標分子 CD11b、CD14、CD11c、CD18 及 CD54 的表現。處理 vitamin D3 當作對照組 (圖示呈黑色區域)，處理 Sunitinib 的急性骨髓性白血病細胞當作實驗組 (圖示呈灰色區域)。



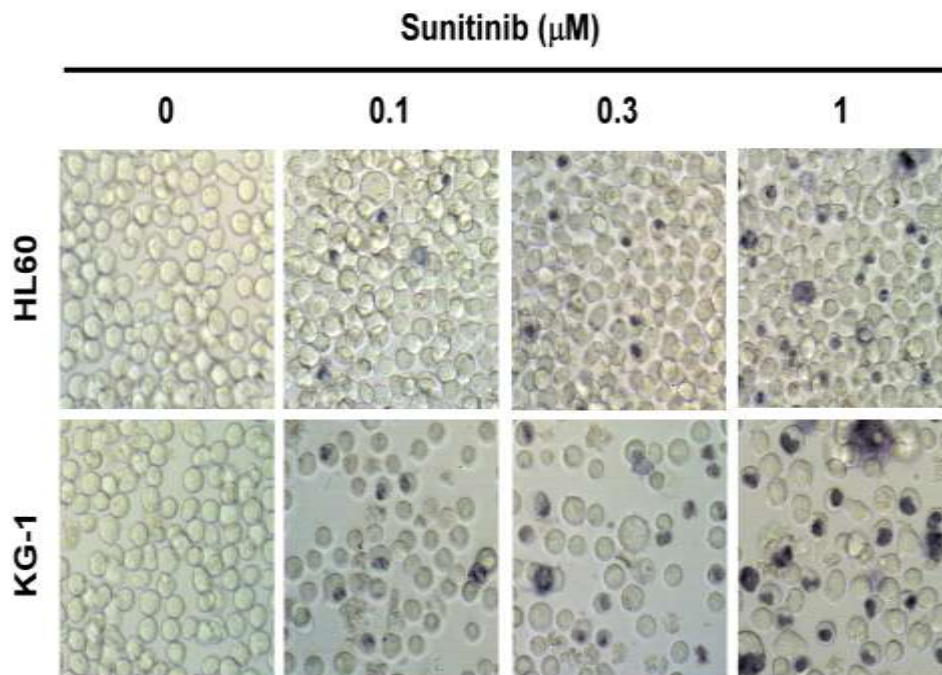
圖十二、利用 Wright-Giemsa 染色法觀察 sunitinib 處理後急性骨髓性白血病細胞型態的變化

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib (0、0.1、0.3 及 1 μM) 培養 24 小時，以 Wright-Giemsa 染色法觀察細胞型態的變化。處理 Sunitinib 後之細胞呈現明顯分化為單核球細胞的形態。



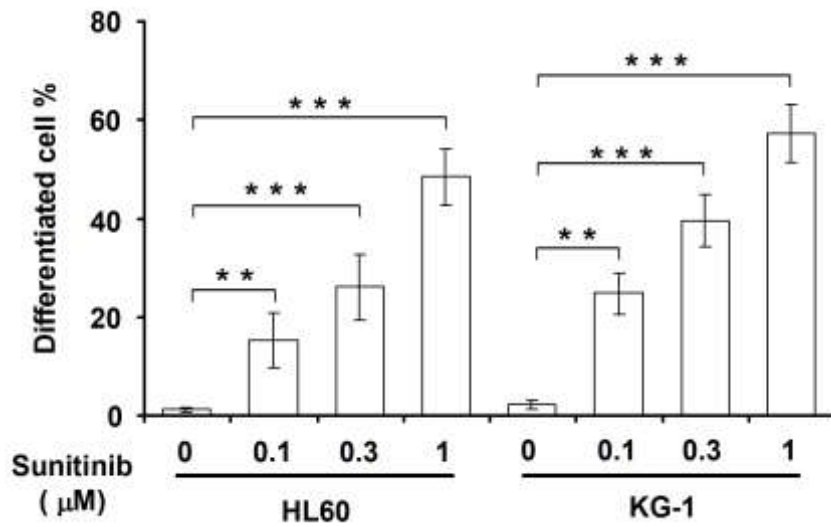
圖十三、處理 Sunitinib 促進 HL60 及 KG-1 細胞之分化

經過 1 μM sunitinib 處理的 HL60 細胞中，約有 76.5% ± 6.3% 呈現單核球分化的型態變化。而約有 87.2% ± 7.5% 的 KG-1 細胞有類似的變化。這樣的比例，顯著的高於對照組。** 及 *** 分別顯示當 $p < 0.01$ 及 $p < 0.001$ 時，統計上具顯著差異。



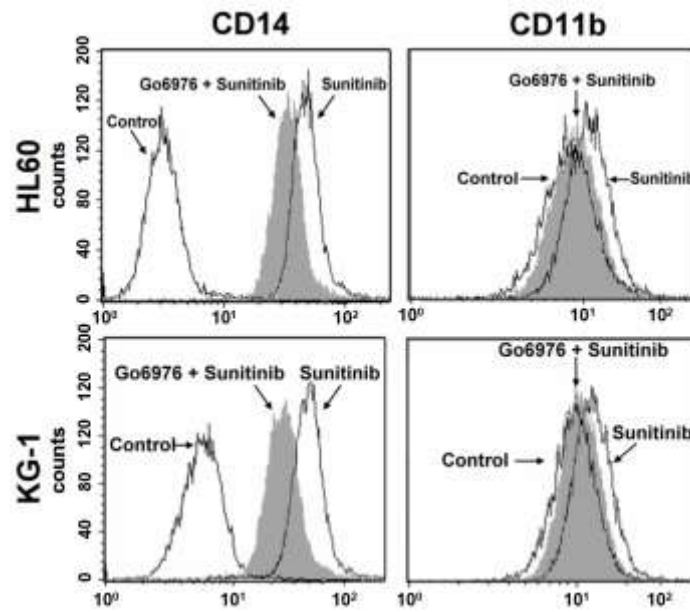
圖十四、處理 Sunitinib 之細胞其 NBT reduction 之活性增強

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞以不同濃度的 Sunitinib (0、0.1、0.3 及 1 μM) 培養 24 小時，NBT reduction assay 偵測細胞分化的程度。



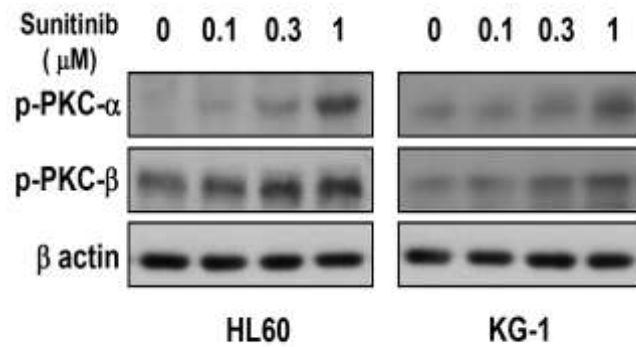
圖十五、Sunitinib 處理增強 HL60 及 KG-1 細胞之 NBT 活性

HL60 及 KG-1 細胞在經過 1 μM sunitinib 處理 24 小時後， $48.5\% \pm 5.6\%$ 的 HL60 細胞以及 $57.3\% \pm 5.9\%$ 的 KG-1 細胞呈現 NBT assay 陽性，顯著高於對照組。 $**$ 及 $***$ 分別顯示當 $p < 0.01$ 及 $p < 0.001$ 時，統計上具顯著差異。



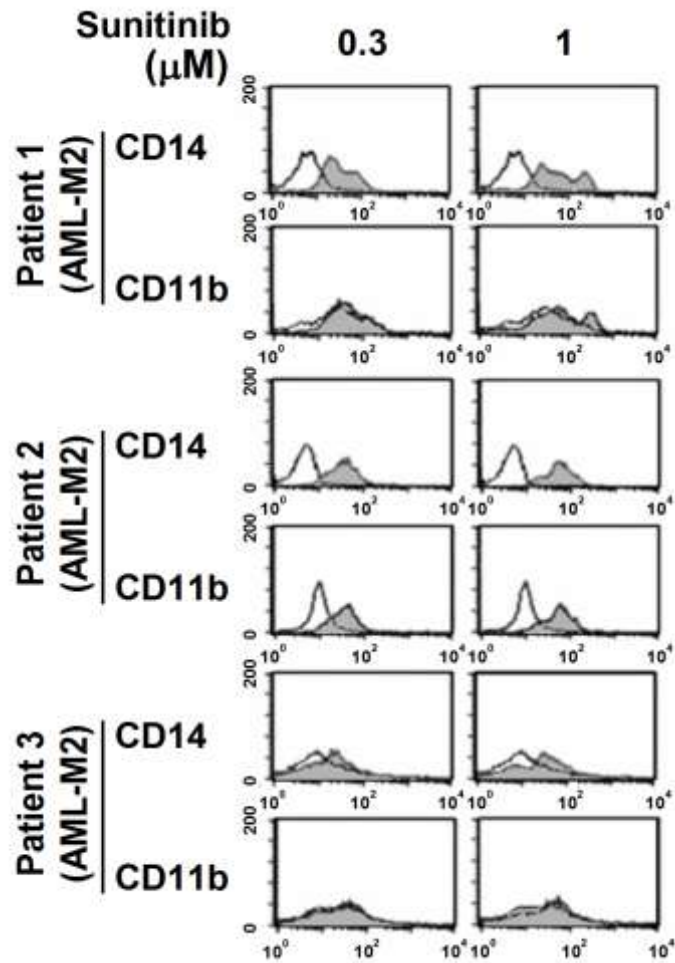
圖十六、利用 PKC 抑制劑 Go6976 抑制 Sunitinib 誘發急性骨髓性白血病細胞的分化

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞先以 $0.1 \mu\text{M}$ Go6976 培養 2 小時，接著以 $1 \mu\text{M}$ Sunitinib 培養 24 小時。利用流式細胞儀測定細胞表面單核球細胞分化指標分子 CD11b 及 CD14 的表現。



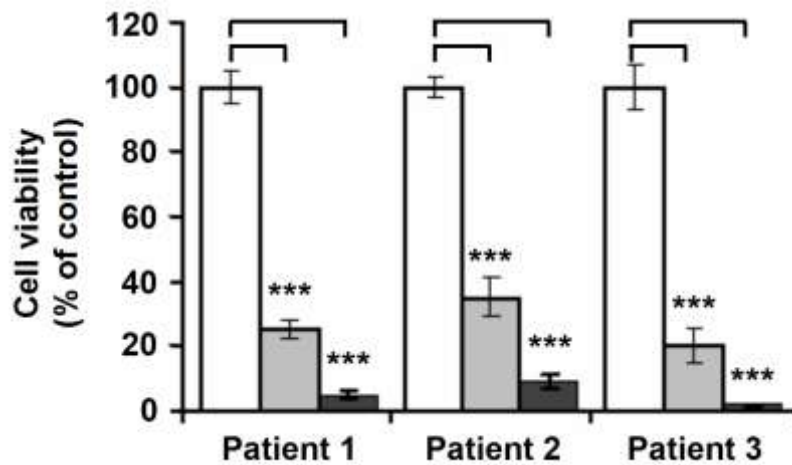
圖十七、 Sunitinib 促進磷酸化 PKC- α 及磷酸化 PKC- β 蛋白的表現

急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1 細胞處理不同濃度 Sunitinib (0、0.1、0.3 及 1 μ M) 培養 2 小時後，萃取蛋白利用西方點墨法偵測 p-PKC- α 及 p-PKC- β 蛋白的表現，以 β -actin 當作 loading control。



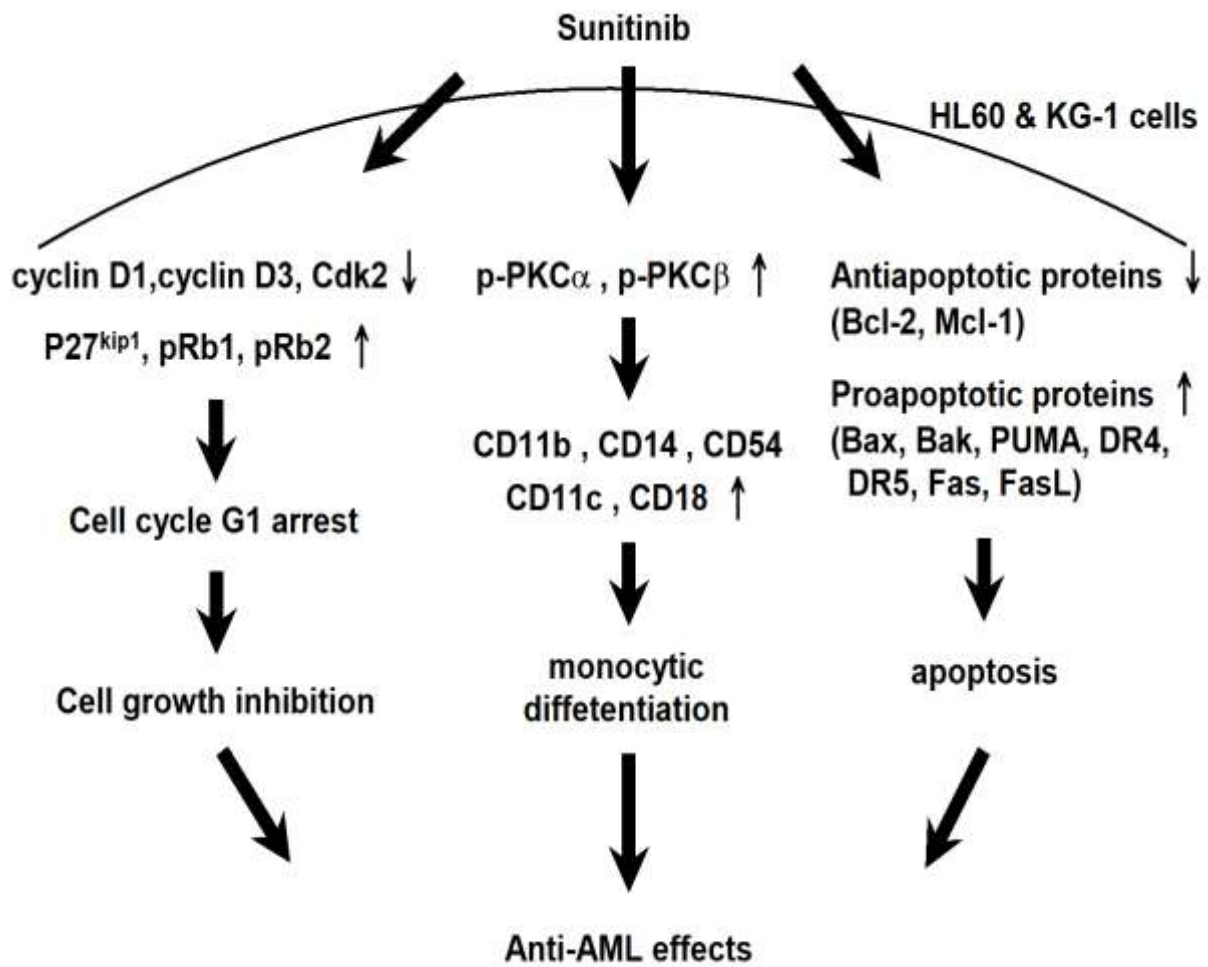
圖十八、Sunitinib 促進急性骨髓性白血病患者的癌細胞中細胞分化指標分子 CD11b 及 CD14 的表現

三位急性骨髓性白血病患者的癌細胞分別以不同濃度 sunitinib 培養 1 天後，利用流式細胞儀測定細胞表面螢光變化，分析細胞分化指標分子 CD11b 及 CD14 的表現。對照組 (圖示呈白色區域)；處理不同濃度 sunitinib 當實驗組 (圖示呈灰色區域)。



圖十九、Sunitinib 處理誘導急性骨髓性白血病患者之癌細胞的死亡

以不同濃度 sunitinib (0、3 及 6 μM) 培養 48 小時後，利用 Trypan blue dye 染色，以血球計數器 (hemocytometer) 計算血癌細胞的存活率。對照組 (圖示呈白色區域)；處理 3 μM sunitinib (圖示呈灰色區域)；處理 6 μM sunitinib (圖示呈黑色區域)。*** 顯示當 $p < 0.001$ 時，統計上具顯著差異。



圖二十、圖解說明 sunitinib 誘導急性骨髓性白血病 HL60 及 KG-1

細胞生長抑制、單核球分化及細胞凋亡之訊息傳遞路徑。

個人基本資料

中文姓名：滕傑林

英文姓名：Chieh-Lin Jerry Teng

通訊地址：台中市西屯區臺灣大道四段 1650 號

電子信箱：drteng@vghtc.gov.tw

學歷

東海大學生命科學研究所博士 (2007.09-2013.01)

東海大學生命科學研究所碩士 (2003.09-2005.12)

中國醫藥大學醫學系 (1993.09-2000.08)

經歷

美國德州大學 MD Anderson Cancer Center 訪問學者

台中榮民總醫院內科部血液腫瘤科主治醫師

台中榮民總醫院內科部血液腫瘤科研究醫師

台中榮民總醫院內科部住院醫師

個人著作 (*表示通訊作者)

Chang, C.M., Hwang, W.L., Hsieh, Z.Y., Wang, R.C., and **Teng, C.L.*** (2010). Monoclonal gammopathy of undetermined significance related pyoderma gangrenosum successfully treated with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Annals of hematology* 89, 823-824.

Cheng, S.B., Wu, L.C., Hsieh, Y.C., Wu, C.H., Chan, Y.J., Chang, L.H., Chang, C.M., Hsu, S.L., **Teng, C.L.***, and Wu, C.C. (2012). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Aromatic Turmerone from *Curcuma longa* Linn. Induces Apoptosis through Reactive Oxygen Species-Triggered Intrinsic and Extrinsic Pathways in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 9620-9630.

Cho, C.H., Hwang, W.L., Cheng, S.B., Lee, T.Y., and **Teng, C.L.*** (2011). Hepatitis B reactivation induced by Rituximab maintenance therapy for lymphoma. *Annals of hematology* 90, 111-112.

Han, S.M., **Teng, C.L.**, Hwang, G.Y., Chou, G., and Tsai, C.A. (2008). Primary splenic lymphoma associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis complicated with splenic rupture. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 71, 210-213.

Liao, Y.C., Su, C.S., **Teng, C.L.**, Wang, K.Y., Lin, F.Y., Ting, C.T., and Lin, W.W. (2012). Acute necrotizing eosinophilic myocarditis in a young woman. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 75, 536-538.

Lin, C.Y., Chen, H.C., Hwang, W.L., and Teng, C.L. (2011). Immune thrombocytopenic pupura-induced reversible posterior leukoencephalopathy successfully treated by rituximab. *Annals of hematology* 90, 731-732.

Lin, Y.C., Chen, H.C., Cheng, S.B., Hwang, W.L., Wang, R.C., and **Teng, C.L.*** (2012). Splenic irradiation-induced gastric variceal bleeding in a primary splenic diffuse large B-cell lymphoma patient: a rare complication successfully treated by splenectomy with short gastric vein ligation. *World journal of surgical oncology* 10, 150.

Ou, M.C., Hwang, W.L., and **Teng, C.L.*** (2011). Leukaemic pleural

effusion in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*.

Teng, C.L., Hsieh, Y.C., Phan, L., Shin, J., Gully, C., Velazquez-Torres, G., Skerl, S., Yeung, S.C., Hsu, S.L., and Lee, M.H. (2012a). FBXW7 is involved in Aurora B degradation. *Cell Cycle* *11*, 4059-4068.

Teng, C.L., Hwang, G.Y., Lee, B.J., Wang, R.C., and Chou, M.M. (2009). Pregnancy-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis combined with autoimmune hemolytic anemia. *Journal of the Chinese Medical Association* : *JCMA* *72*, 156-159.

Teng, C.L., Hwang, W.L., Chen, Y.J., Chang, K.H., and Cheng, S.B. (2012b). Sorafenib for hepatocellular carcinoma patients beyond Milan criteria after orthotopic liver transplantation: a case control study. *World journal of surgical oncology* *10*, 41.

Teng, C.L., Li, K.W., Yu, J.T., Hsu, S.L., Wang, R.C., and Hwang, W.L. (2012c). Malignancy-associated chylothorax: a 20-year study of 18 patients from a single institution. *European journal of cancer care* *21*, 599-605.

Teng, C.L., Lin, T.H., Young, J.H., Chou, G., and Young, C.S. (2005). Rapidly fatal Langerhans' cell histiocytosis in an adult. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* *104*, 955-959.

Teng, C.L., Young, J.H., Hsu, S.L., Chou, G., Kuo, I.T., Yu, C.Y., and Hwang, G.Y. (2006). Lactate dehydrogenase, not vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor, positively correlates to bone marrow vascularity in acute myeloid leukemia. *Journal of the Chinese Medical Association* : *JCMA* *69*, 534-537.

Teng, C.L., Yu, C.T., Hwang, W.L., Tsai, J.R., Liu, H.C., Hwang, G.Y., and Hsu, S.L. (2012d). Effector mechanisms of sunitinib-induced G1 cell cycle arrest, differentiation, and apoptosis in human acute myeloid leukaemia HL60 and KG-1 cells. *Annals of hematology*.

Tzeng, H.E., **Teng, C.L.**, Yang, Y., Young, J.H., and Chou, G. (2007). Occult subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with initial

presentations of cellulitis-like skin lesion and fulminant hemophagocytosis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 106, S55-59.

Yang, C.S., Chou, G., Jan, Y.J., Wang, J., Yeh, D.C., and **Teng, C.L.** (2007). Primary lymphohistiocytic variant of anaplastic large cell lymphoma of the stomach. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 70, 71-75.

Yu, J.T., Hwang, W.L., Wang, R.C., and **Teng, C.L.*** (2012). Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplant could be beneficial to angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annals of hematology* 91, 805-807.