

東海大學化學系研究所

碩士論文

指導教授：許員豪 博士

心磷脂於細胞週期間的組成變異

**Cardiolipin Composition Changes
in the Stages of Cell Cycle**

研究生：趙昱任 撰

中華民國 104 年 1 月

目錄

摘要

圖表索引

第一章 緒論

- 1.1 前言.....p.1
- 1.2 磷脂質的合成與代謝(Phospholipid synthesis and metabolism)p.2
- 1.3 心磷脂(Cardiolipin)p.3
- 1.4 化療藥物與作用機制(Chemotherapy drugs and mechanism).....p.4
 - 1.4.1 化療藥物.....p.4
 - 1.4.2 Methotrexate (MTX)p.5
 - 1.4.3 Mitomycin C (MMC)p.6
 - 1.4.4 Vincristine (VIN)p.7
- 1.5 實驗目的.....p.7

第二章 實驗步驟與方法

- 2.1 藥品/試劑.....p.8
- 2.2 細胞的無血清培養(Starvation)與活化(Activation).....p.8
- 2.3 化療藥物調控.....p.8
- 2.4 脂質萃取.....p.9
- 2.5 質譜分析.....p.9

第三章 結果與討論(一) 飢餓與活化調控

- 3.1 心磷脂鑑定.....p.11
- 3.2 HT-1080 細胞的心磷脂種類.....p.12
- 3.3 細胞活化(Activation)時期的心磷脂含量與種類.....p.14
- 3.4 活化期間心磷脂種類的變異.....p.15
- 3.5 Starvation 期間的心磷脂含量與種類.....p.19
- 3.6 Starvation 期間心磷脂種類的變異.....p.20
- 3.7 結論.....p.23
- 3.8 延伸討論.....p.24

第四章 結果與討論(二) 化療藥物調控

- 4.1 化療藥物調控細胞週期停滯.....p.26
- 4.2 化療藥物調控期間的心磷脂含量變化.....p.27

| | |
|------------------------|------|
| 4.3 調控期間的心磷脂種類分佈..... | p.28 |
| 4.4 心磷脂組成於細胞週期的改變..... | p.29 |
| 4.5 結論..... | p.30 |
| 4.6 延伸討論..... | p.30 |
| | |
| 參考文獻 | p.32 |
| | |
| 附件 | p.37 |

摘要

癌細胞被抑制生長後的復甦，可能會導致癌症病患的復發。細胞從被抑制的狀態轉換到生長狀態，需要高度的粒線體活性來調節，其關係到粒線體膜上脂質的組成。而心磷脂為一個關鍵調節粒線體功能與型態的磷脂質。在此實驗中，藉由 LC-MS 來分析 HT-1080 人類肌肉瘤細胞從抑制狀態進入生長狀態時心磷脂種類的改變。經 MS/MS 分析，我們總共於 HT-1080 細胞中鑑定出 41 種心磷脂種類並以半定量分析心磷脂的含量變化。心磷脂種類於 HT-1080 細胞中呈現一個常態分佈，依照脂肪酸鏈上碳數總和分別為 C64、C66、C68、C70、C72 以及 C74 的群落，而這些群落在抑制生長的調控中，隨著進入細胞週期的停滯，各細胞的心磷脂含量下降。但在活化調控中，各細胞內的心磷脂總量卻維持相同水平。而當細胞從抑制狀態復甦並進行複製時，較短脂肪鏈的群落，如 C64、C66 與 C68，呈現心磷脂含量百分比下降的趨勢。較長脂肪鏈的群落，如 C70 與 C72，則呈現心磷脂含量百分比上升的趨勢。有趣的是，進入生長週期的抑制與活化後的心磷脂種類變化趨勢完全相反。此實驗結果呈現出，當 HT-1080 細胞從細胞週期被抑制的狀態復甦(活化)後，粒線體中的心磷脂組成會趨向於較長碳鏈的脂肪酸鏈。

前部分實驗發現營養匱乏造成的細胞週期停滯，顯著的影響細胞中粒線體的心磷脂組成。因此後續分別以無血清培養與化療藥物 Methotrexate、Mitomycin C 和 Vincristine 來調控 HT-1080 的細胞週期，使週期分別停滯在 G0/G1、S、G2 和 M 時期。經各個化療藥物調控後的細胞，總心磷脂含量皆有明顯的倍數提升，而無血清培養的細胞含量則下降。心磷脂種類含量分析中，當 HT-1080 細胞的細胞週期被停滯於 G0/G1、G2 和 M 時期，短碳鏈的心磷脂(C64、C66、C68)隨著進入細胞週期的停滯而含量上升，而長碳鏈的心磷脂(C72、C74)含量下降。在 S 時期的心磷脂組成則呈現完全相反於其他細胞週期階段的長碳鏈增加趨勢。此實驗結果顯示出，抗癌藥物誘導細胞週期的停滯，會造成細胞內心磷脂含量的增加，且在 S 時期的粒線體內心磷脂有別於其他時期的組成轉變。

Abstract

Cell survival from the arrested state can be a cause for the recurrence of cancer patients. Transition from the arrest state to growth state is highly regulated by mitochondrial activity, which is related to the lipid compositions of the mitochondrial membrane. Cardiolipin is a critical phospholipid for the mitochondrial integrity and functions. We examined the changes of cardiolipin species by LC-MS in the transition while HT1080 fibrosarcoma cells exited the cell cycle arrest. There are 41 cardiolipin species identified by MS/MS and semi-quantitated to analyze the detailed changes of cardiolipins. Cardiolipin species in human sarcoma HT1080 cells showed a normal distribution of C64, C66, C68, C70 C72 and C74 groups. The cardiolipin quantity in a cell decreased while entering the cell arrest, but maintains at a similar level through cell survival. While cells awakening from the arrested state and preparing itself for replication, the groups with short acyl chains, such as C64, C66 and C68 showed a decrease of cardiolipin percentage, but the groups with long acyl chains, such as C70 and C72 showed an increase of cardiolipin percentage. Interestingly, the changes in cardiolipin species between cell arrest and cell survival are completely reversed. Our results display a clear shift of the cardiolipin species from the short chain to long chain cardiolipin during the transition from cell arrest to cell progression.

We have found nutritional deficiency induced cell cycle arrest significantly changes cardiolipin compositions in mitochondria. Therefore, we further compare serum starvation induced G0/G1 arrest with chemotherapy drugs induced phase arrest, including S phase arrest by methotrexate, G2 phase arrest by mitomycin C and M phase arrest by vincristine. The cardiolipin quantity increased in all drug-induced arrests, but decreased in the starvation treatment. While cells were arrested in G1, G2 and M phases, the cardiolipin composition displayed increases in short acyl chain (C64, C66, C68) and decreases in long acyl chain (C72, C74). In particular, the trends of cardiolipin composition in S phase is opposite to other phases of the cell cycle in drug-induced arrest. Chemotherapy drugs induced cell cycle arrest leads to an increase of cardiolipin quantity, and unique changes in cardiolipin composition at S phase. Our results imply a discoordination between cell cycle arrest and mitochondrial cell cycle, which results in the accumulation of cardiolipin at the S phase.

圖表索引

| | |
|--|------|
| 圖 1、磷脂質於細胞生長週期的合成與代謝..... | p.2 |
| 圖 2、心磷脂結構..... | p.3 |
| 圖 3、MTX 與 Dihydrofolic acid 結構..... | p.5 |
| 圖 4、MTX 藥物作用機制..... | p.5 |
| 圖 5、MMC 與鳥糞嘌呤鍵結形式..... | p.6 |
| 圖 6、Vincristine 結構式(上)與藥物作用機制示意圖(下) | p.7 |
| 圖 7、心磷脂於 HT-1080 細胞之質譜圖..... | p.11 |
| 圖 8、MS/MS 解析心磷脂(C18:2)的結構組成..... | p.12 |
| 圖 9、細胞活化後心磷脂總含量變化..... | p.14 |
| 圖 10、HT-1080 細胞中心磷脂各種類分佈與含量變化(Activation)..... | p.15 |
| 圖 11、不同碳數群落的心磷脂含量變化與分佈(Activation)..... | p.16 |
| 圖 12、C66 與 C68 之心磷脂含量下降(Activation)..... | p.17 |
| 圖 13、C70 與 C72 之心磷脂含量上升(Activation) | p.18 |
| 圖 14、Starvation 後心磷脂總含量變化..... | p.19 |
| 圖 15、HT-1080 細胞中心磷脂各種類分佈與含量變化(Starvation)..... | p.20 |
| 圖 16、不同碳數群落的心磷脂含量變化與分佈(Starvation) | p.21 |
| 圖 17、C66 與 C68 之心磷脂含量上升(Starvation) | p.22 |
| 圖 18、C70 與 C72 之心磷脂含量下降(Starvation) | p.23 |
| 圖 19、Starvation 與活化調控於各心磷脂含量之趨勢比較..... | p.24 |
| 圖 20、化療藥物調控細胞週期停..... | p.26 |
| 圖 21、無血清培養與化療藥物調控後心磷脂總含量變化..... | p.27 |
| 圖 22、HT-1080 細胞中心磷脂各種類分佈與含量變化(Starvation)..... | p.28 |
| 圖 23、心磷脂組成於細胞週期停滯的改變..... | p.29 |
| | |
| 表 1、飢餓調控和化療藥物抑制細胞週期的階段與作用機制..... | p.4 |
| 表 2、質譜儀參數設定..... | p.10 |
| 表 3、HT-1080 細胞中的心磷脂種類..... | p.13 |

第一章 緒論

1.1 前言

DNA 的損傷、營養的缺乏以及代謝或外界刺激而產生的氧化壓力都會導致細胞生長週期的停滯。細胞會於停滯期間進行自我修復，若為無法修復的損傷則會導向細胞的凋亡(Apoptosis)或壞死(Necrosis)^{1, 2}。而修復完成的細胞則跳脫停滯的狀態並再次進入細胞生長週期，其循環主要分為 Gap1 (G1)、Synthesis (S)、Gap2 (G2) 及 Mitosis (M) 四個階段，當中每個階段都有不盡相同的蛋白質與 DNA 的含量，並藉由特定的週期素(Cyclin)與週期素激酶(Cyclin-dependent kinase)形成複合體(Cyclin-CDK complexes)來調控生長週期³⁻⁵。在細胞週期中除了蛋白質與 DNA 的合成，磷脂質也會於週期中進行合成與代謝(詳見 1.2)。當細胞從停滯狀態復甦後，除了粒線體參與生長的調節，並同時以粒線體的週期(Mitochondrial cycle)與基因來調節自己的增生^{6, 7}。在細胞週期與粒線體週期相互調節生長的情況下，復甦與生長的過程需要粒線體來產生大量的 ATP 提供能量的代謝⁸。而粒線體膜上磷脂質的組成可影響粒線體的形態(Morphology)與功能，相對也涉及到 ATP 的產生^{7, 9-11}。其中，心磷脂(Cardiolipin)為一個獨特且關鍵存在於粒線體內膜上的磷脂質，並且涉及內膜上電子傳遞鏈(Electron transport chain)與 ATP 的產生¹²⁻¹⁷(詳見 1.3)。為了瞭解心磷脂在進入細胞週期停滯與復甦後的影響(或被影響)，因此藉由質譜儀為基礎的脂質體學(Lipidomic)方法來測量 HT-1080 人類肌肉瘤細胞中的心磷脂。並經由血清的移除(Serum starvation)與抗癌藥物的刺激，偵測調控期間 HT-1080 細胞中心磷脂的總含量(Quantitative)與種類(Qualitative)上的變異。

1.2 磷脂質的合成與代謝(Phospholipid synthesis and metabolism)

細胞生長週期中，磷脂質在 G1 時期會有大量的轉換(Turnover)，亦即由磷脂水解酶(Phospholipases)水解磷脂質上的脂肪酸鏈(Fatty acyl chains)後，在由醯基轉移酶(Transacylases)進行脂肪酸鏈的置換，使磷脂質於細胞生長時更成熟(Maturation)¹⁸⁻²⁰。由磷脂水解酶水解後的磷脂質產生溶血磷脂(Lysophospholipids)與脂肪酸的衍生物-類花生酸(Eicosanoids)則會涉及到各種細胞訊息(Cellular signaling)¹⁹。在 S 時期，所有的磷脂質降解速度下降，取而代之的是淨磷脂質(Net phospholipid)的合成，並於 G2-M 時期所有淨磷脂質結束合成，此時擁有兩倍的磷脂質含量可進行有絲分裂(圖 1)²¹。磷酸膽鹼胞苷醯基轉移酶(Phosphocholine cytidyltransferase)的活性於細胞週期中也被證實會隨著膜上淨磷脂質的代謝有相對應的調節，其在 G1 時期提升，並穩定下降至 S 後期與 G2-M 時期²²。而心磷脂相對在粒線體週期中，大部分依照合成(Synthesis)、重建(Remodeling)、複製(Replication)的程序後進行粒線體的分裂²³。

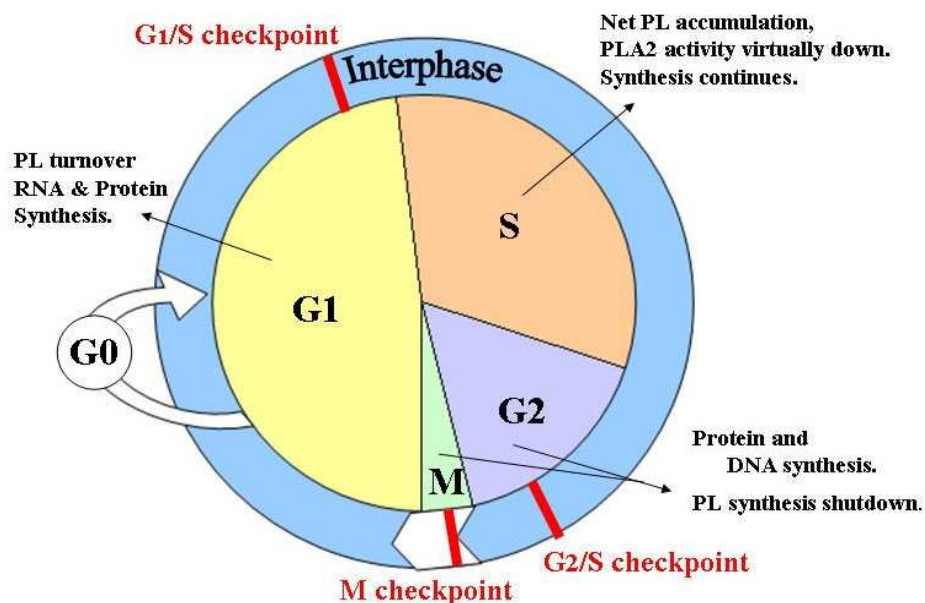


圖 1、磷脂質於細胞生長週期的合成與代謝

1.3 心磷脂(Cardiolipin)

心磷脂為一個關鍵存在於粒線體內膜上的磷脂質並參與粒線體膜的架構(Morphology)與功能性^{7, 9-11}。從結構上(圖 2)，心磷脂具有一個獨特的陰離子頭端(Anionic head group)，其中伴隨著磷酸所攜帶的兩個負電價與四條疏水性的醯基鏈(Acyl chain)。這種具有陰電性頭端與疏水性尾端的結構，讓心磷脂可於粒線體內膜上分別藉由靜電吸引力(Electrostatic attraction)與疏水性作用力(Hydrophobic interaction)來穩定一些蛋白複合體的結構，例如電子傳遞鏈上的蛋白複合體(Electron transport chain complex II, III, IV)與 ATP 合成酶(ATP synthase)等²⁴⁻³⁰。這些蛋白複合體涉及電子的傳遞與 ATP 的產生，在能量代謝中均參與較為上游的生物體反應。因此與心磷脂相關的蛋白或基因皆與許多疾病的生成有直接的關連。如重建(remodeling)心磷脂的 Taffazzin 蛋白或其基因，若出現缺陷則會容易引發巴氏綜合症(Barth syndrome)造成擴大型心肌病變、嗜中性白血球減少、骨骼肌肉病變及粒線體異常等症狀^{31, 32}。

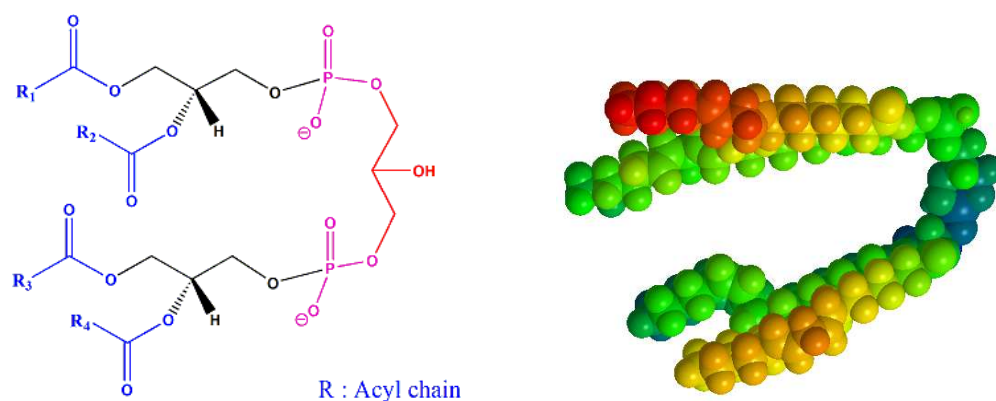


圖 2、心磷脂結構與 3D 模型：

結構圖中(左)，包含甘油骨架(Glycerol backbones)(紅色)與磷酸所攜帶的兩個負電價(紫色)和具有疏水性的四條醯基鏈(Acyl chains)(藍色)。各種醯基鏈的組合形成多樣性的心磷脂種類。3D 模型圖中(右)，視角距離由進至遠為紅色到藍色。

心磷脂尾端的四條醯基鏈通常於正常細胞中被發現為對稱的組成，如哺乳類動物的心臟通常為 C18:2 的醯基鏈，而雙殼貝類大部分為 C22:6 與 C20:5 的組

成^{33,34}。就癌細胞而言，如老鼠的腦腫瘤細胞會因為心磷脂合成與重建間調節的異常，因此失去心磷脂對稱性的維持³⁵。而市售從 *E. coli* 萃取的心磷脂(Avanti Lipid)，也具有獨特 cyclo-C17:0 的醯基鏈與非對稱性的組成。最近文獻也從甲烷代謝古菌(Methane-metabolizing archaea)發現更多特異性的心磷脂組成³⁶。而代謝中的心磷脂也可藉由磷脂水解酶 A₂S (Phospholipase A₂S)水解產生單溶血(monolyso-)與雙溶血(dilyso-)心磷脂和脂肪酸³⁷。以上各種醯基鏈的組合形成多樣性的心磷脂種類。若是哺乳類細胞的粒線體產生心磷脂種類的變異，粒線體的功能也會直接被影響。在細胞中，心磷脂組成變異的因素除了外界的刺激就是自身能量代謝後所產生的氧化壓力(Oxidative stress)。氧化自由基(ROS)造成心磷脂的氧化，進而阻礙電子傳遞鏈並改變粒線體的生物能量(Bioenergetic)轉換³⁸⁻⁴⁰。心磷脂結合細胞色素 *c* (Cytochrome *c*)形成的過氧化酶(Peroxidase)的活化也會導致細胞進入細胞凋亡⁴¹。心磷脂與細胞色素 *c* 的結合也可調節細胞色素 *c* 從粒線體的釋放，來控制粒線體進入細胞凋亡的程序⁴²⁻⁴⁴。

1.4 化療藥物與作用機制(Chemotherapy drugs and mechanism)

1.4.1 化療藥物

在實驗中分別藉由 Starvation 與以下三種抗癌藥物的調控來刺激細胞的生存環境(表 1)：

| Drug/method | Arrest phase | Cellular targets/Mechanism |
|------------------|----------------|-----------------------------------|
| Serum starvation | Gap0 / Gap1 | Serum feeding Cut-off |
| Methotrexate | Synthesis | Dihydrofolate reductase inhibitor |
| Mitomycin C | Gap2 / Mitosis | DNA damage |
| Vincristine | Mitosis | Microtubule depolymerization |

表 1、Starvation 和化療藥物抑制細胞週期的階段與作用機制

1.4.2 Methotrexate (MTX)

MTX 為化療常用藥物，在醫學上主要用於乳癌與絨毛膜癌等癌症疾病。在細胞生物學的實驗中，MTX 則多用於細胞週期在 S 時期的停滯^{45, 46}。其作用機制主要是結構與二氫葉酸(Dihydrofolic acid)相近，因此產生競爭型的抑制(圖 3)⁴⁷。如圖 4，MTX 可競爭抑制二氫葉酸還原酶(DHFR)。而二氫葉酸還原酶為負責將二氫葉酸(DHF)轉成四氫葉酸(THF)的還原酶，若二氫葉酸還原酶被抑制則使合成 dTMP (Thymidine monophosphate)的 5,10-亞甲基四氫葉酸(5,10-MTHF)含量減少。相對的，dTMP 的量也會下降導致細胞無法進入 DNA 合成期而達抑制細胞生長的效果。而亞甲基四氫葉酸還原酶(MTHFR)可將 5,10-MTHF 轉成 5-甲基四氫葉酸(5-MTHF)，在經由甲硫氨酸合成酶(MS)的催化轉化為甲硫氨酸(methionine)與四氫葉酸。

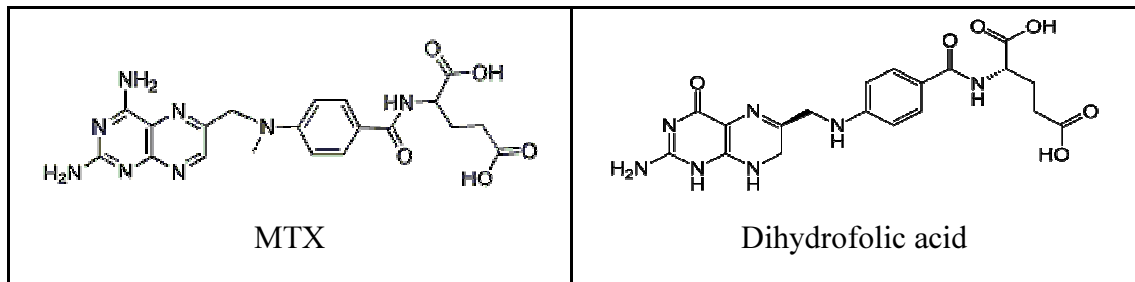


圖 3、MTX 與 Dihydrofolic acid 結構

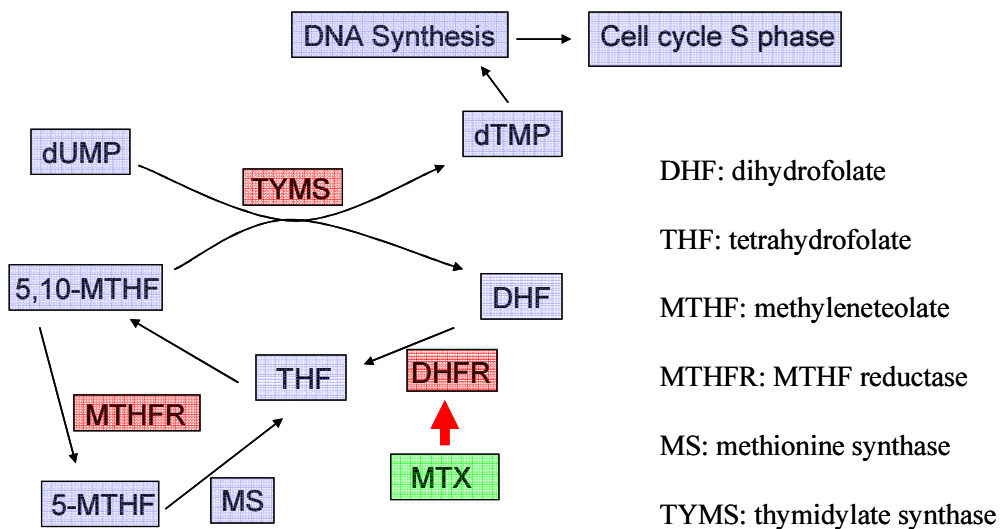


圖 4、MTX 藥物作用機制

1.4.3 Mitomycin C (MMC)

MMC 又名絲裂黴素，可把細胞週期停滯在 G2/M 時期^{48, 49}。作用機制主要是與雙股 DNA 小凹槽(minor groove)裡的鳥糞嘌呤(Guanine)間做共價性的鍵結，使 DNA 時期無法順利進行複製，進而無法前進至有絲分裂期。如圖 5，MMC 於鳥糞嘌呤上形成的共價性交聯除了於雙股 DNA 間也可於單個鹼基間進行交聯，並且對於 CpG(5'-3')或單股 GpG 序列上的鳥糞嘌呤具有專一的鍵結特性⁵⁰。於醫學上主要用於肺癌、白血病、肉瘤等癌症疾病。

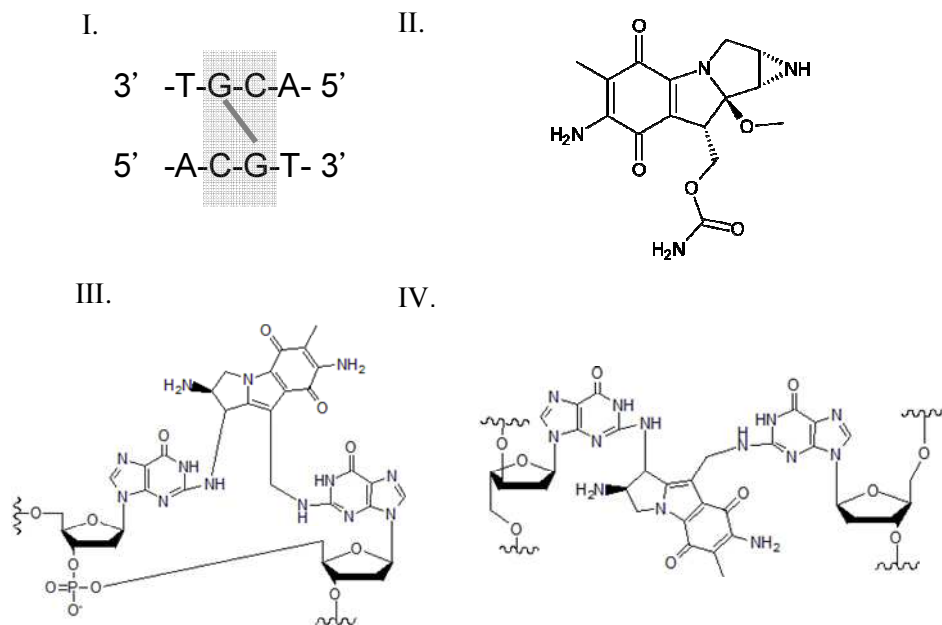


圖 5、MMC 與鳥糞嘌呤鍵結形式：

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

1.4.4 Vincristine (VIN)

VIN 又名長春新鹼，為長春花所提煉出來的生物鹼(Vinka alkaloid)之一。主要作用機轉是藉由防止微小管(microtubule)的聚合使細胞週期停滯在 M 時期⁵¹⁻⁵³。如圖 6，微小管為 α -tubulin 與 β -tubulin 兩種微管蛋白所形成。其聚合時含有生長速度較快、解離速度較慢的正端和生長速度較慢、解離速度較快的負端，因此微小管形成時具有極性。當細胞進行有絲分裂時須靠微小管的聚合來牽引染色體到達分裂極。VIN 則會於微管蛋白聚合時與微管蛋白結合並妨礙微管蛋白聚集，因此阻止動態聚合中的微小管聚合可專一性的讓細胞停滯在有絲分裂時期(M phase)。在醫學上常用於治療急性白血病等癌症相關症狀。

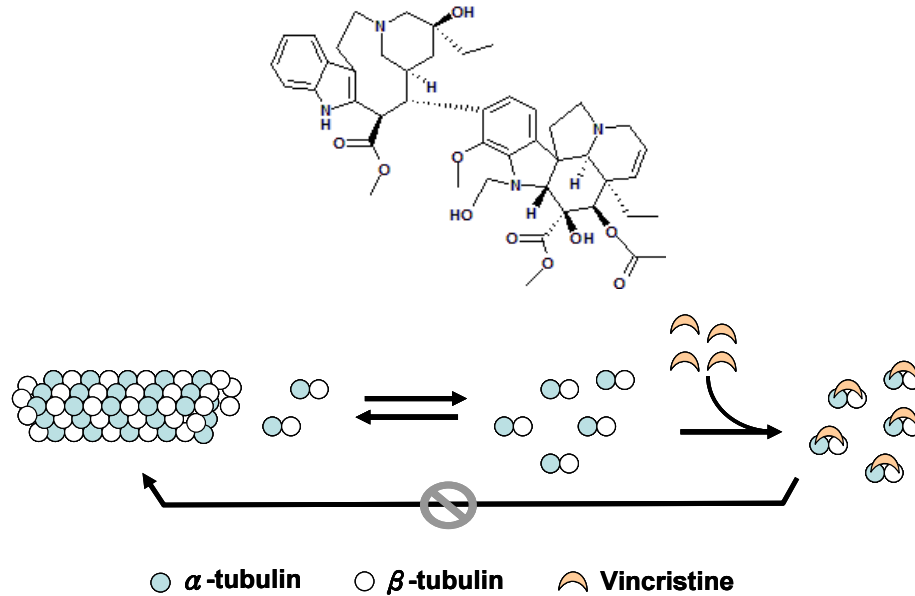


圖 6、Vincristine 結構式(上)與藥物作用機制示意圖(下)

1.5 實驗目的

- 瞭解心磷脂在進入細胞週期停滯與復甦後的影響(或被影響)。
- 測定 HT-1080 細胞之心磷脂於各細胞週期的組成變異。

第二章 實驗步驟與方法

2.1 藥品/試劑

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、Fetal bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin 與 1M 細胞培養用 HEPES 皆購自於 Gibco (USA)。Tetramyristoyl cardiolipin (C14:0) 標準品購自 Avanti Polar Lipids(USA)。Methotrexate (powder)、Mitomycin C (powder)購自 Merck；Vincristine sulfate (powder) 購自 SIGMA。

2.2 細胞的無血清培養(Starvation)與活化(Activation)

實驗所使用細胞株為人類纖維肉瘤細胞 (HT-1080)，以 Growth medium(DMEM 含 10% fetal bovine serum、0.5% Pen-strep、25mM HEPES)於 5% CO₂、37°C 環境培養。當細胞生長至 50%盤面密度(Activation group: 10-cm dish, Starvation group: 6-cm dish)時移除 medium 並以 PBS 清洗三次。在加入 serum-free medium 培養 48 小時，培養期間 Starvation group 於 0、12、24、36 和 48 小時各時間點收成細胞。Activation group 則於 48 小時後把細胞培養回 Growth medium，並於 0、4、8、16、22 小時各時間點收成細胞。收成的細胞保存於 -20°C，待後續做脂質萃取。

2.3 化療藥物調控

實驗所使用細胞株為人類纖維肉瘤細胞 (HT-1080)，以 Growth medium(DMEM 含 10% fetal bovine serum、0.5% Pen-strep、25mM HEPES)於 5% CO₂、37°C 環境培養。將細胞分盤至 25%盤面密度(細胞數約為 3.0×10^5 顆, 6-cm dish)並等待細胞貼覆盤面。之後分別於各實驗組將 medium 換成含藥物之

medium : Methotrexate 50nM (Stock: 100 μ g/ml 於 1M NaOH)、Mitomycin C 2 μ M (Stock:1 mg/ml 於 DDW) 與 Vincristine 0.25nM (Stock:0.1 μ g/ml 於 DDW)，培養 48 小時並於 0、12、24、36 和 48 小時各時間點收成細胞。收成的細胞保存於負 20 度，待後續做脂質萃取。

2.4 脂質萃取

樣品全脂質萃取依據 Bligh-Dyer 方法⁵⁴。將細胞樣品於玻璃瓶內加入 2 mL methanol 後再加入 125ng 的 CL(14:0)₄ 標準品。冰浴下超音波震盪破碎細胞後移至玻璃試管並加入 1 mL chloroform (此時 chloroform/methanol 為 1 : 2)。震盪 10 分鐘，在加入 1 mL chloroform 與 1 mL 去離子蒸餾水(DDW)。在震盪 15 分鐘後，離心(2000 rpm, 5 分鐘)並取下層有機層即為樣品全脂質。

2.5 質譜分析

細胞樣品經萃取後的全脂質以氮氣吹乾溶劑，並加入 100 μ L 回溶液 (acetonitrile/2-propanol/H₂O = 65:30:5)回溶。樣品經 HPLC-ESI-Ion trap MS(High Performance Liquid Chromatography, HITACHI ; Electrospray Ionization-Mass, Bruker)來進行 Lipidomic 的分析。HPLC 移動相系統：mobile phase A 分別為 ACN:H₂O(60:40)、10 mM ammonium formate 和 0.1% formic acid，mobile phase B 為 IPA:ACN (90:10)、10 mM ammonium formate 和 0.1% formic acid⁵⁵。移動相梯度：0-25 分鐘為 60% A 到 100% B，並保持 100% B 到 45 分鐘後反至 60% A。使用分離管柱為 *Acclaim RSLC 120 C18* 2.1mm x 100 mm 2.2 μ m column (Thermo)，HPLC 分析流速為 0.2 mL/min、管柱溫度為攝氏 55 度。質譜參數設定如表 2，所有資料處理均以 Bruker DataAnalysis (ver.3.4)軟體取質量訊號之 EIC(Extracted ion chromatogram)面積來做半定量分析。

| ESI-MS 設定 | | |
|---------------------|---------------|-------|
| 參數 | 數值 | 單位 |
| Charge mode | Negative mode | |
| Nebulizer | 25 | Psi |
| Dry gas | 8 | L/min |
| Dry temp. | 325 | °C |
| Mass range | 1200-1600 | m/z |
| ESI-MS/MS 設定 | | |
| Isolation width | 4.0 | m/z |
| Fragmentation Ampl | 1.20 | Volt |

表 2、質譜儀參數設定

第三章 結果與討論(一)-無血清培養與活化調控

3.1 心磷脂鑑定

基於心磷脂獨特的結構與電價性質，心磷脂可從萃取的全脂質中由逆向層析經質譜被分析(圖 7)。所呈現的 TIC (Total ion chromatogram)圖譜中，心磷脂標準品(C14:0)於 31 分鐘出現(圖 7A)，分子量為 1239.9 m/z(圖 7B)。以此為基準，可分析樣品裡心磷脂的沖提時間約為 30-36 分鐘(圖 7C)與種類的分佈(圖 7D)，而有部分少量的心磷脂種類較標準品早 2-3 分鐘被沖提出。由於心磷脂在質譜儀中為負電價模式偵測，因此 Phosphatidylcholine (PC) 與弱陰電性的 Phosphatidylethanolamine (PE) 等脂質可於酸化條件下的移動相被排除。Phosphatidylglycerol (PG)、Phosphatidylinositol (PI)、Phosphatidylserine (PS)和 Phosphatidic acid (PA)等脂質的分子量都低於 900 Da，而大部分的心磷脂都分布於 1200-1600 Da。就以上特性可排除其餘種類的脂質出現在心磷脂的分析區段。其中，心磷脂上脂肪酸鏈(Fatty acyl chains)的碳數都不盡相同，因此在分析區段中約分佈成 6 個群落。每個群落包含多種不同雙鍵數(Double bond)的心磷脂。

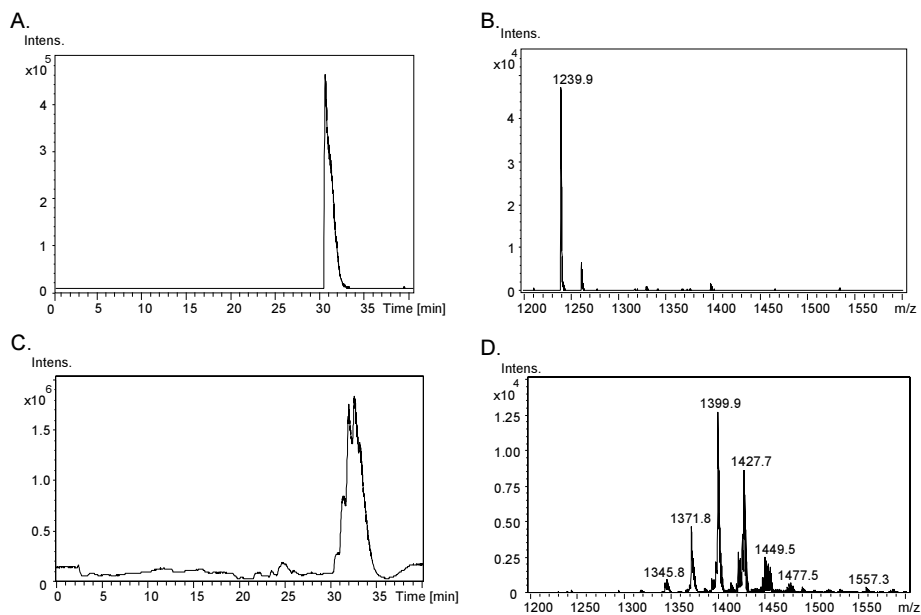


圖 7、心磷脂於 HT-1080 細胞之質譜圖：心磷脂標準品 CL(14:0)₄ 的 TIC (A) 與質譜圖 (B)。和細胞內心磷脂的 TIC (C) 與質譜圖 (D)。

雖然多種類的心磷脂可於 LC-MS 中被分離與偵測，但就分子量的訊息不足以充分辨認出心磷脂上四條脂肪酸鏈的組成。因此使用串聯質譜(MS/MS)的子離子模式(Product ion mode)來分析細胞中各個種類的心磷脂組成與結構。在 MS/MS 中，心磷脂根據結構的特性具有特定的裂解模式。以最普遍的 Tetralinoleoyl-cardiolipin(C18:2)為例子(分子量 1448.2 m/z) (圖 8A)。心磷脂(C18:2)經裂解過後的 831、751、695 與 415 m/z 之子離子片段經解析後皆為含概一條或兩條脂肪酸鏈的裂解片段(圖 8B、D)，或是可從二電價的心磷脂(C18:2)直接裂解得到亞油酸(Linoleic acid, 278.6 m/z)的脂肪酸片段(圖 8C、D)。基於以上模式，可辨認出多種心磷脂的詳細結構組成。

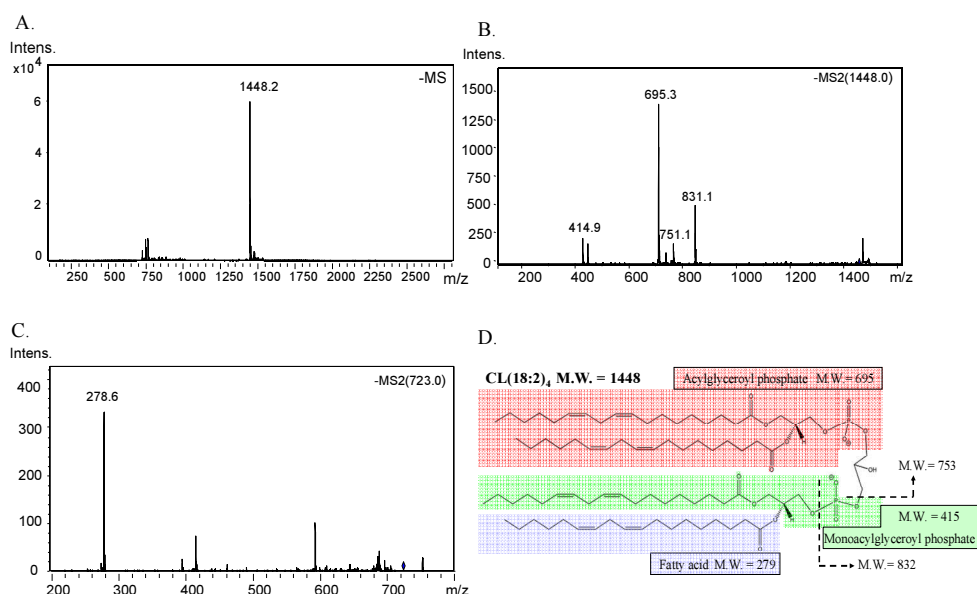


圖 8、MS/MS 解析心磷脂(C18:2)之結構組成：

Tetralinoleoyl-cardiolipin 分子量為 1448.2 m/z (A) 經串聯質譜鑑定後裂解片段(B)，與其脂肪酸鏈的裂解片段(C)。以上裂解片段根據結構的特性具有特定的裂解模式(D)。

3.2 HT-1080 細胞的心磷脂種類

HT-1080 細胞經 Growth medium 培養並於約 90%盤面密度時做分代培養。而細胞樣品經 Bligh-Dyer 脂質萃取法後，由 LC-MS 分析細胞內粒線體的心磷脂

組成(表 3)。經篩選與鑑定後，全部共 31 個分子量包含 41 種心磷脂種類(包含心磷脂標準品)。其中表格上心磷脂種類，如 C70:4，表示此心磷脂的四條脂肪酸的碳數總和為 70 個碳與 4 個雙鍵。

表 3、HT-1080 細胞中的心磷脂種類

| Species | m/z | Formula | Species | m/z | Formula |
|---------|--------|---|---------|--------|---|
| C56:0 | 1239.7 | (14:0)(14:0)(14:0)(14:0) | C72:7 | 1450.7 | (18:2)(18:2)(18:2)(18:1) |
| C64:4 | 1343.3 | (16:1)(14:0)(16:1)(18:2)* (18:2)(14:0)(18:2)(14:0) | C72:6 | 1451.8 | (18:2)(18:2)(18:1)(18:1) |
| C64:3 | 1345.5 | (16:1)(14:0)(16:1)(18:1) | C72:5 | 1453.5 | (18:2)(18:1)(18:1)(18:1) |
| C66:5 | 1369.7 | (16:1)(18:2)(18:2)(14:0) | C72:4 | 1455.8 | (18:1)(18:1)(18:1)(18:1) |
| C66:4 | 1371.7 | (18:2)(18:1)(16:1)(14:0) | C74:10 | 1472.5 | (16:0)(18:2)(20:4)(20:4) |
| C66:3 | 1373.5 | (18:1)(16:1)(16:1)(16:0) | C74:9 | 1474.4 | (18:2)(18:2)(18:2)(20:3) |
| C68:8 | 1391.5 | <i>(34:5)^a(16:1)(18:2)</i> (18:2)(14:0)(18:2)(18:2) | C74:7 | 1477.8 | (18:1)(18:2)(18:2)(20:2) |
| C68:6 | 1395.7 | (18:2)(18:2)(16:1)(16:1) (16:1)(18:2)(16:1)(18:2)* | C76:13 | 1493.4 | (16:1)(18:2)(20:4)(22:6) |
| C68:5 | 1397.7 | (16:1)(16:1)(18:1)(18:2) (16:1)(18:1)(16:1)18:2)* | C76:12 | 1495.5 | (18:2)(18:2)18:2)(22:6) |
| C68:4 | 1399.3 | (16:1)(16:0)(18:1)(18:2) (16:1)(18:1)(16:1)(18:1)* (16:1)(16:1)(18:1)(18:0)* | C76:11 | 1497.7 | (18:1)(18:2)(18:2)(22:6)* (18:2)(18:2)(20:3)(20:4) |
| C68:3 | 1401.3 | (16:1)(16:0)(18:1)(18:1) (16:1)(18:0)(16:1)(18:1)* | C76:10 | 1499.5 | (18:2)(18:1)(18:2)(22:5) |
| C70:6 | 1423.5 | (16:1)(18:1)(18:2)(18:2) | C78:13 | 1521.4 | <i>(36:4)^a(20:3)(22:6)</i> |
| C70:5 | 1426.1 | (16:1)(18:1)(18:1)(18:2) | C78:12 | 1523.5 | (18:2)(18:2)(20:4)(22:4) |
| C70:4 | 1427.8 | (16:1)(18:1)(18:1)(18:1) | C78:11 | 1525.4 | (18:1)(18:1)(20:3)(22:6) (18:1)(18:2)(20:2)(22:6)* |
| C72:9 | 1446.4 | (18:2)(18:2)(18:2)(18:3) <i>(34:4)^a(20:4)(18:1)</i> | C78:9 | 1529.7 | (16:1)(20:4)(20:4)(22:0) |
| C72:8 | 1448.2 | (18:2)(18:2)(18:2)(18:2) | | | |

Bold: identified species
*: main species
a: predicted formula

3.3 細胞活化(Activation)時期的心磷脂含量與種類

為了觀測細胞經飢餓環境刺激後復甦的心磷脂種類變化，在此將細胞經由移除血清的培養(Serum starvation) 48 小時使細胞同步進入 G0 時期，此時期的細胞週期為停滯狀態。在以 Growth medium 培養使細胞跳脫 G0 並進入 G1 時期，並在培養期間於 0、4、8、16 和 22 小時各收成細胞。HT-1080 細胞中的心磷脂經萃取後以 LC-MS 分析，所有實驗皆為三重複。分析結果中，不管是細胞數還是心磷脂總量在 16 到 22 小時間都相較明顯於 8 小時內的成長趨勢(圖 9A)。此結果顯示心磷脂的含量伴隨細胞的複製而增加，而每顆細胞中的心磷脂總量於各時間點並無瞬間的提升(圖 9B)。

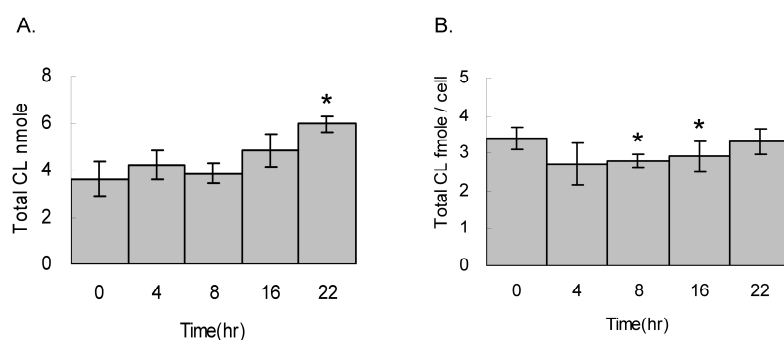


圖 9、細胞活化後心磷脂總含量變化：

細胞經血清移除培養 48 小時，在回復生長環境並於 0、4、8、16 和 22 小時收成。經脂質萃取後，以 LC-MS 定量所有細胞(A)與單一細胞(B)內的心磷脂含量。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

對於每個心磷脂種類的含量，都可藉由內標準品(CL14:0)的相對 EIC 值做半定量。雖然每顆細胞中的心磷質總量都保持一定水平，但過程中心磷脂種類的改變可能對於細胞的生存有較大影響。如圖 10，在 HT-1080 細胞裡的心磷脂種類分佈在 22 小時中幾乎保持相同，其中以脂肪酸鏈總和 68 與 70 個碳的心磷脂種類含量最高。而隨細胞生長時間的增加，心磷脂種類的百分比含量也有不同程度的變異。

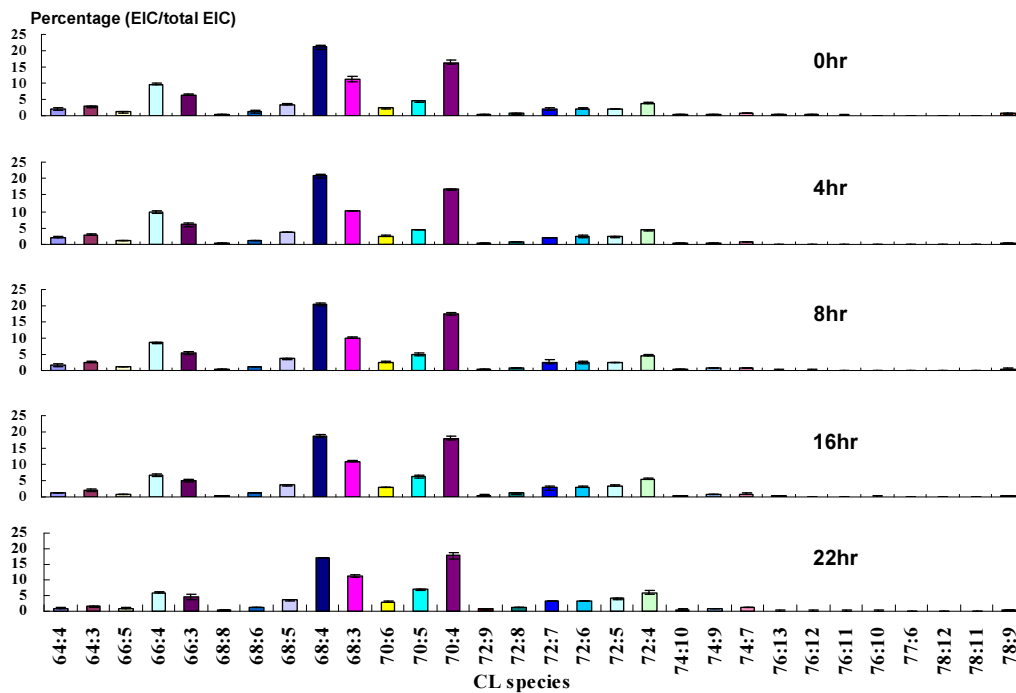


圖 10、HT-1080 細胞中心磷脂各種類分佈與含量變化(Activation)：

細胞經血清移除培養 48 小時，在回復生長環境並於 0、4、8、16 和 22 小時收成。脂質萃取後，以質譜測量與標準化並藉由 species EIC/total EIC 得相對含量。

3.4 活化期間心磷脂種類的變異

心磷脂種類於 HT-1080 細胞中呈現一個常態分佈，在單一脂肪酸鏈上每增加兩個碳會增加 28 Da。因此在分析區段中心磷脂有數個群落，依照脂肪酸鏈上碳數總和分別為 C64、C66、C68、C70、C72 以及 C74 的群落(圖 11)。其中以 C68 的群落為最高含量，並隨著碳數的增加或減少而含量降低。在 C66、C68、C70 與 C72 的群落中總共佔所有心磷脂含量的 70%，而 C64 與 C74 為相對較小含量的群落。就脂肪酸鏈上的雙鍵而言，每增加一個雙鍵會減少 2 Da，因此在相同的碳數群落中存在著許多不同雙鍵數的心磷脂。從結果發現，在相同群落的心磷脂含量百分比隨著活化期間都有一致增減的趨勢。圖中以每個群落中最高含量的心磷脂種類為代表呈現。雖然每個心磷脂種類趨勢的增幅不同，但可發現脂肪酸鏈碳數總和較低的心磷脂群落(C64、C66、C68)會隨活化時間而含量下降。相反的，脂肪酸鏈碳數總和較高的心磷脂群落(C70、C72)含量則上升。

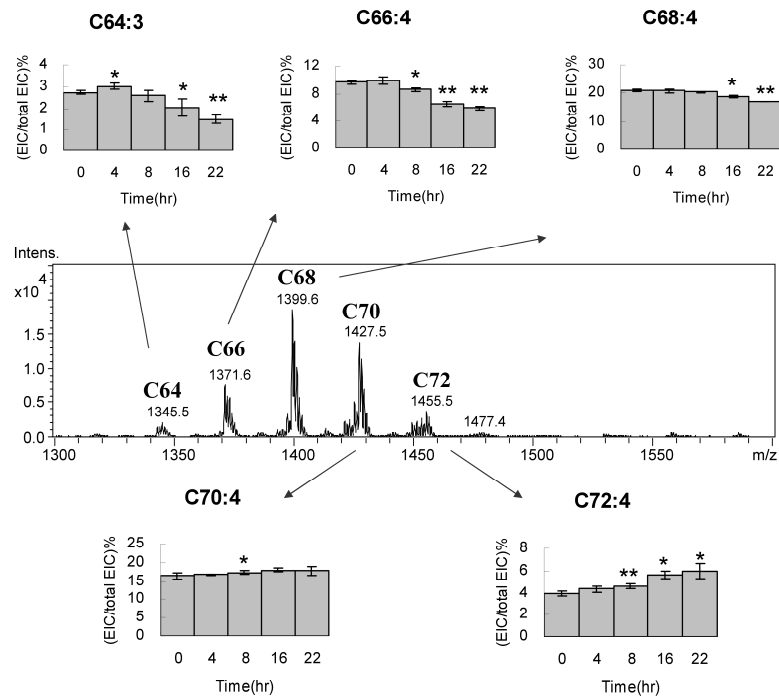


圖 11、不同碳數群落的心磷脂含量變化與分佈(Activation)：

心磷脂群落標記於分子量上方。圖中以每個群落中最高含量的心磷脂種類為代表，呈現心磷脂種類於 22 小時內含量百分比的改變。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

在 C66 群落中，C66：3、C66:4 與 C66:5 的心磷脂種類於活化後呈現含量下降的趨勢(圖 12A)。其中 C66：4 與 C66：3 為群落中較為主要的心磷脂種類，分別佔總心磷脂含量的 9.6%與 6.4%。活化 22 小時後，C66：4 與 C66：3 於總心磷脂含量分別各下降 3.6%與 1.9%，其對於活化初始含量(0 小時)相對下降 37%與 18%。而 C64：3 跟 C66 群落有相同趨勢，對於活化初始含量相對下降 45%(圖 11)。在 C68 群落中，C68：3、C68：5、C68：6 以及 C68：8 於活化期間都維持一定含量的心磷脂(圖 12B)。除了 C68：4，其存在於本次實驗的 HT-1080 細胞中含量最高的心磷脂，對於活化初始含量相對下降 19%，呈現 C68 群落中獨特的下降趨勢。另外於 HT-1080 細胞中，為下降趨勢的心磷脂種類，也於另一組三重複實驗中呈現(附件 1)。

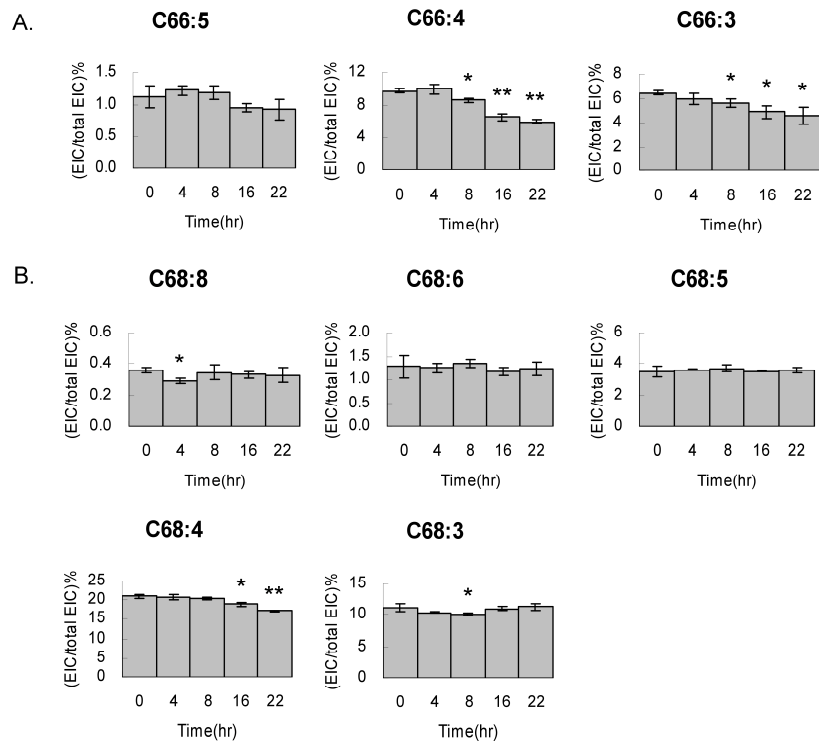


圖 12、C66 與 C68 之心磷脂含量下降(Activation)：

細胞從 starvation 活化，並收成於 0、4、8、16 和 22 小時，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類於 C66 與 C68 群落都經過心磷脂(C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

在脂肪酸鏈碳數總和 70 以上的心磷脂，活化期間呈現含量上升的趨勢。C70 群落中，C70：4、C70：5 與 C70：6 於總心磷脂含量分別各上升 1.3%、2.5%與 0.7%，其對於活化初始含量(0 小時)相對增加 10%、36%與 23%(圖 13A)。而 C72 群落中，C72：4、C72：5、C72：6 與 C72：7 這些群落中含量較高的種類，對於活化初始含量也顯著的相對增加 33%、50%、33%以及 38%(圖 13B)。C72：8 與 C72：9 於群落中含量較少的種類，分別相對增加 33%與 17%。值得注意的是，C72：4 和 C72：5 為其中含量較大與提升最顯著的心磷脂種類。另外於 HT-1080 細胞中，為上升趨勢的心磷脂種類，也於另一組三重複實驗中呈現(附件 2)。

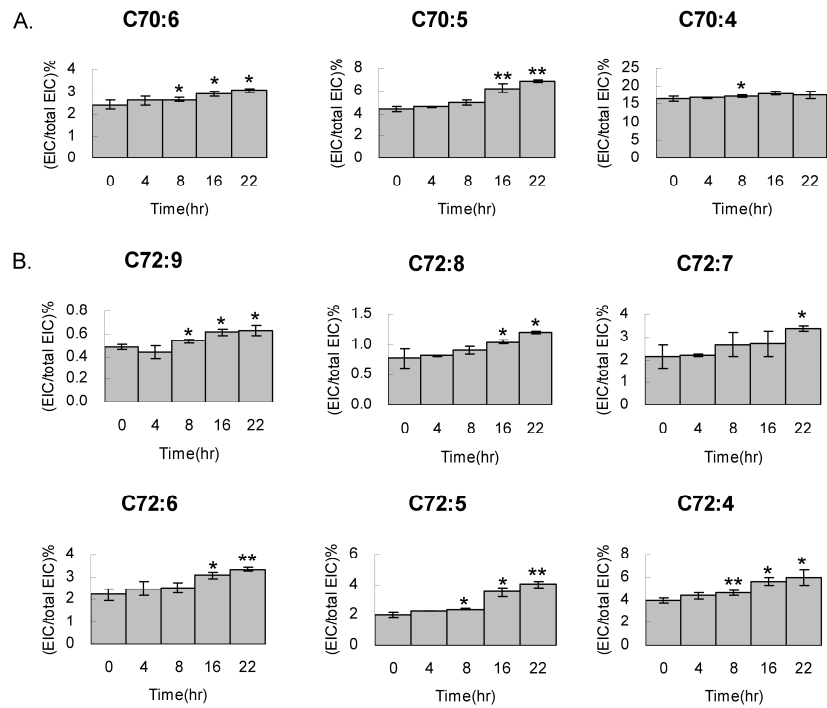


圖 13、C70 與 C72 之心磷脂含量上升(Activation)：

細胞從 starvation 活化，並收成於 0、4、8、16 和 22 小時，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類於 C70 與 C72 群落都經過心磷脂(C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

3.5 Starvation 期間的心磷脂含量與種類

當細胞經 starvation 的刺激後會進入細胞週期的停滯，停滯期間進行損傷的修復或能量的保存，其中相對影響到粒線體的活性與 ATP 的生成。從前部分實驗可看到心磷脂經 starvation 在活化後的變化趨勢，因此在進入 starvation 調控期間應有相反於前部分實驗的結果。在此實驗中，我們將定量之 3×10^5 顆 HT-1080 細胞培養於直徑 6 公分培養皿中，經移除血清培養 2 天來觀測心磷脂的變化，所有實驗皆為三重複。的確在分析結果中，心磷脂總量於 starvation 調控 12 小時內平均下降 35%，並維持到 48 小時，其現象與活化實驗的結果相反(圖 14)。由於 Starvation 調控期間，經顯微鏡觀察細胞無明顯增長，亦無死亡所表現的懸浮狀況。在細胞培養初期即控制每次實驗之細胞數恆定，經過 Starvation 48 小時後，測定其蛋白質濃度，發現調控組與控制組蛋白質總濃度值無顯著差異(附件 3)。因此判斷細胞數在調控期間已無細胞生長或死亡現象。此結果也顯示，當 HT-1080 細胞進入細胞週期停滯期間，會流失其心磷脂含量。

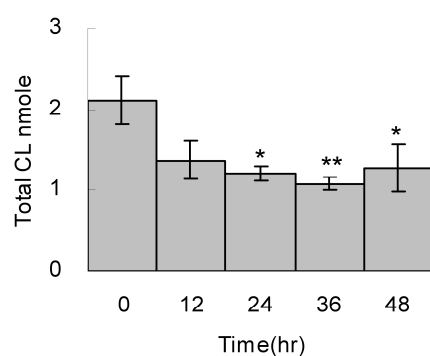


圖 14、Starvation 後心磷脂總含量變化：

細胞經血清移除培養 48 小時，並於 0、12、24、36 和 48 小時收成。經脂質萃取後，以 LC-MS 定量所有細胞內的心磷脂含量。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

對於每個心磷脂種類的含量，一樣藉由內標準品(CL14:0)的相對 EIC 值做半定量。如圖 15，經 starvation 調控後，HT-1080 細胞裡的心磷脂種類分佈在 48

小時中幾乎保持相同，其中也以脂肪酸鏈總和 68 與 70 個碳的心磷脂種類含量最高。而隨環境刺激的時間增加，心磷脂種類的百分比含量也有不同程度的變異。相對於活化調控的實驗，可發現經 starvation 調控的心磷脂種類變異程度較大。

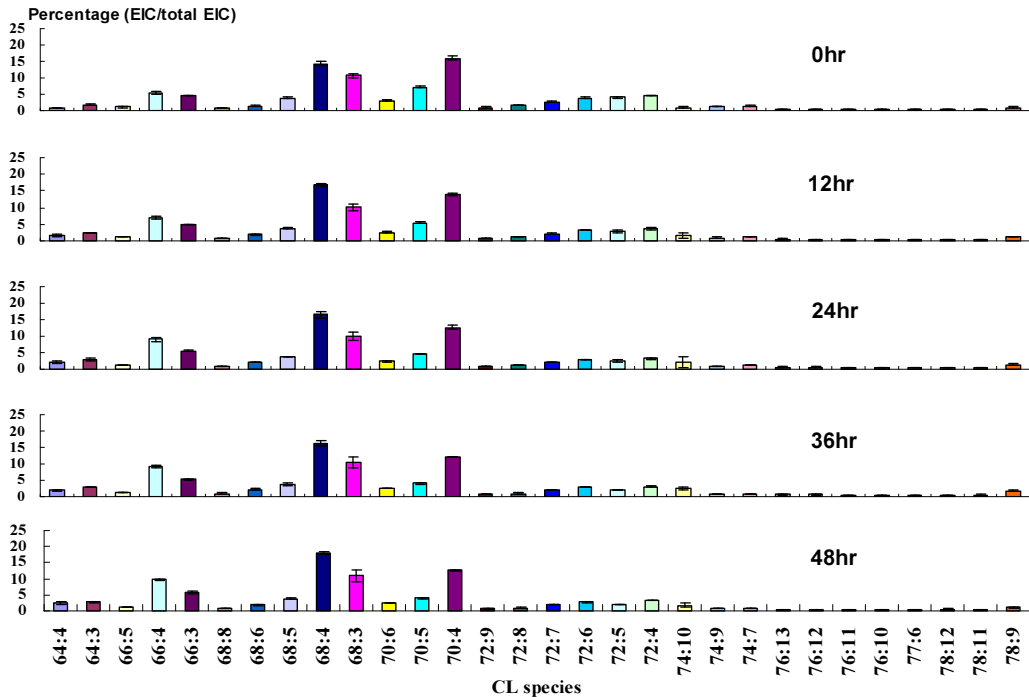


圖 15、HT-1080 細胞中心磷脂各種類分佈與含量變化(Starvation)：

細胞經血清移除培養 48 小時，每 12 小時收成一次。脂質萃取後，以質譜測量與標準化並藉由 species EIC/total EIC 得相對含量。

3.6 Starvation 期間心磷脂種類的變異

在實驗結果中，除了發現總心磷脂含量趨勢與活化調控相反，在心磷脂各種類的含量變化也有趨勢上相反的變異(圖 16)。其中，脂肪酸鏈碳數總和較低的心磷脂群落(C64、C66、C68)會隨調控時間而含量上升。相反的，脂肪酸鏈碳數總和較高的心磷脂群落(C70、C72)含量則下降。圖中以每個群落中最高含量的心磷脂種類為代表呈現。

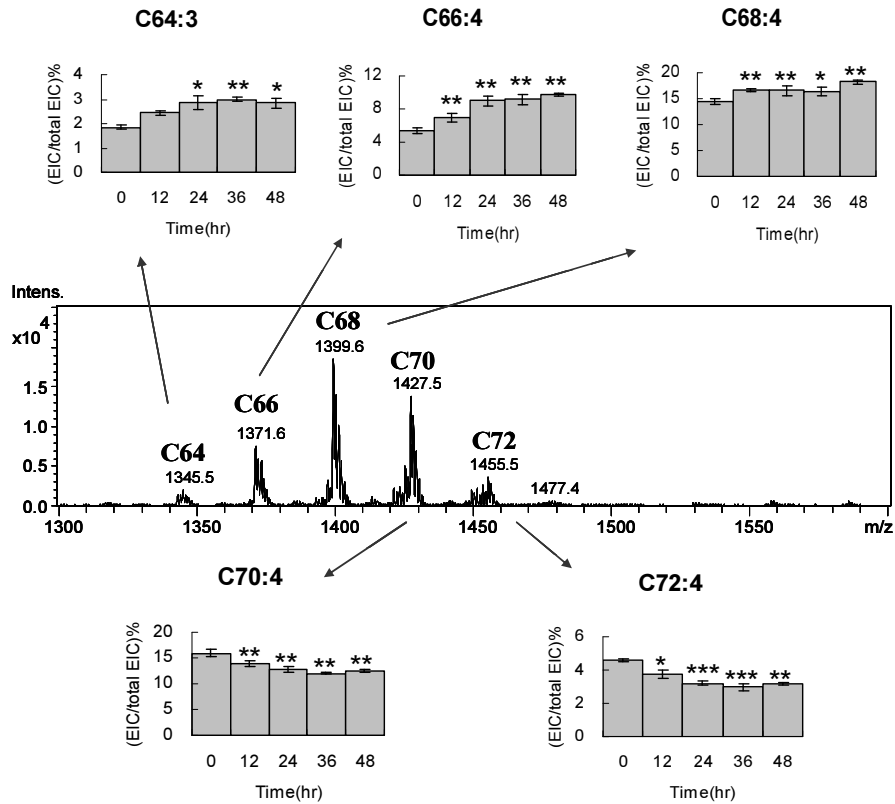


圖 16、不同碳數群落的心磷脂含量變化與分佈(Starvation)：

心磷脂群落標記於分子量上方。圖中以每個群落中最高含量的心磷脂種類為代表，呈現心磷脂種類於 48 小時內含量百分比的改變。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

從 C66 群落中，C66:3、C66:4 與 C66:5 的心磷脂種類於活化後呈現含量上升的趨勢(圖 17A)。其中 C66:4 與 C66:3 為群落中較為主要的心磷脂種類，分別佔總心磷脂含量的 5.4%與 4.6%。Starvation 調控 48 小時後，C66:4 與 C66:3 於總心磷脂含量分別各上升 4.4%與 1.1%，其對於調控初始含量(0 小時)相對上升 45%與 19%。而 C64:3 跟 C66 群落有相同趨勢，對於活化初始含量相對上升 32%(圖 16)。在 C68 群落中，C68:3、C68:5 以及 C68:8 於 starvation 期間都維持一定含量的心磷脂(圖 17B)。除了 C68:4，其於總心磷脂含量上升 3.8%，對於調控初始含量相對上升 21%。而 C68:6 於總心磷脂含量也些微上升 0.5%。

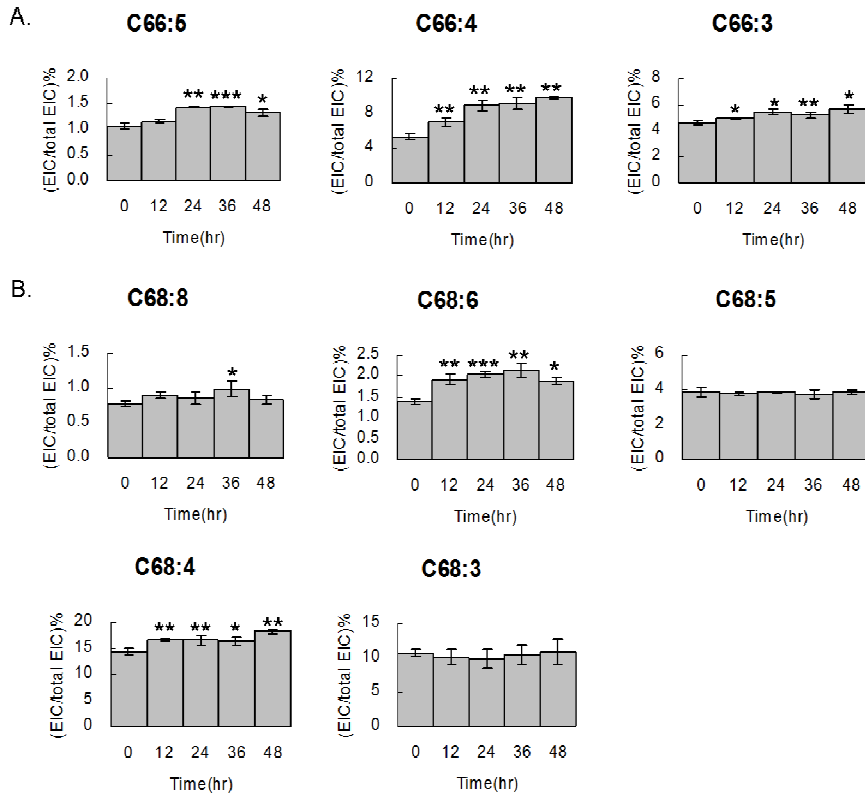


圖 17、C66 與 C68 之心磷脂含量上升(Starvation)：

細胞經 starvation 培養 48 小時，每 12 小時收成一次，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類於 C66 與 C68 群落都經過心磷脂 (C14:0) 標準品之相對 EIC 做定量。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

在脂肪酸鏈碳數總和 70 以上的心磷脂，starvation 期間呈現含量下降的趨勢。C70 群落中，C70:4、C70:5 與 C70:6 於總心磷脂含量分別各下降 3.4%、3.4%與 0.7%，其對於調控初始含量(0 小時)相對減少 21%、47%與 21%(圖 18A)。而 C72 群落中，C72:4、C72:5、C72:6 與 C72:7 這些群落中含量較高的種類，對於調控初始含量也相對減少 30%、50%、31%以及 19%(圖 18B)。C72:8 與 C72:9 於群落中含量較少的種類，分別相對減少 41%與 40%。值得注意的是，C72:5 為其中含量較大與下降最顯著的心磷脂種類。

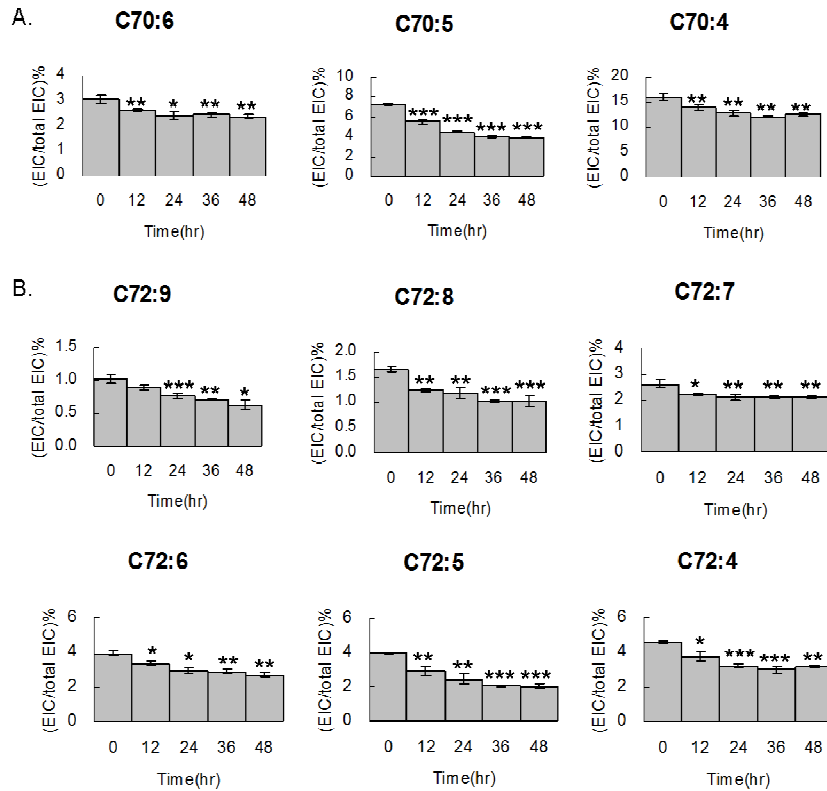


圖 18、C70 與 C72 之心磷脂含量下降(Starvation)：

細胞經 starvation 培養 48 小時，每 12 小時收成一次，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類於 C70 與 C72 群落都經過心磷脂 (C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

3.7 結論

樣品細胞經串聯質譜的鑑定後，總共於 HT-1080 細胞中找到 41 種心磷脂，其依照脂肪酸鏈上碳數總和分別為 C64、C66、C68、C70、C72 以及 C74 的群落，並常態分佈於心磷脂的分析區段。樣品細胞在實驗中，分別經 starvation 與活化的調控。在 starvation 調控中，隨著進入細胞週期的停滯，各細胞的心磷脂含量下降。此實驗結果也指出，細胞可能在此時期對於心磷脂或是其功能有較少的需求。而活化調控中，整體心磷脂的含量隨細胞複製而增加，但各細胞中的心磷脂含量並無明顯提升。這可能也暗示心磷脂從細胞週期停滯狀態到細胞增生時期，心磷脂的合成與降解維持一定的平衡。兩組實驗的調控於心磷脂總量呈現相反的

調節趨勢，且調控過程並不影響 HT-1080 細胞的心磷脂種類分部。但各種類的含量卻會在調控下有不同的增減趨勢，圖中以每個群落中最高含量的心磷脂種類為代表呈現(圖 19)。在 C64 與 C66 群落，心磷脂含量皆於 24 小時內變化較高，而 C68 群落相對變化較小。就群落分佈裡相對低碳數的心磷脂種類，其含量皆會隨活化調控而下降。相反，在 starvation 調控中則上升。這些碳數相對較少的心磷脂種類，大部分都為 Myristic acid (C14:0)、Palmitic acid (C16:0)與其不飽和形式的脂肪酸鏈所組成。在 C70 與 C72 群落，心磷脂含量分別於活化與 starvation 調控中，在 24 小時內明顯上升與下降。這些碳數相對較多的心磷脂種類，大部分都為 Palmitic acid (C16:0)、Oleic acid (C18:1)與其更多不飽和形式的脂肪酸鏈所組成。從兩組實驗調控間可發現，除了心磷脂總量上的相反成長，各種類的含量趨勢也都隨著調控而相反調節，此實驗結果也於 MCF-7 細胞株中證實(附件 4)。其結果顯示，當 HT-1080 細胞從細胞週期被抑制的狀態復甦(活化)後，粒線體中的心磷脂組成會趨向於較長碳鏈的脂肪酸鏈。

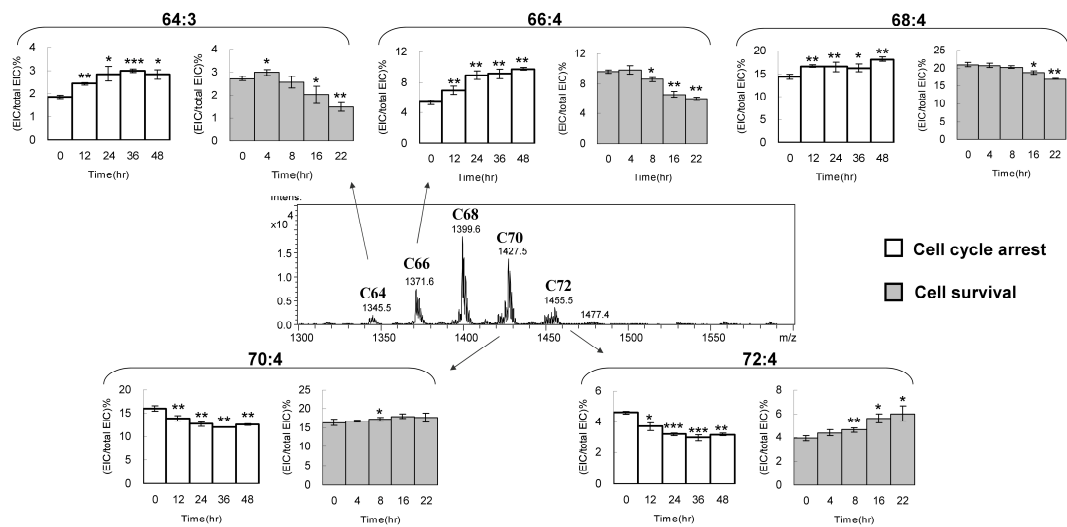


圖 19、Starvation (cell cycle arrest)與活化調控(cell survival)於各心磷脂含量之趨勢比較：心磷脂群落標記於分子量上方。圖中以每個群落中最高含量的心磷脂種類為代表，呈現心磷脂種類於各時間內含量百分比的改變。實驗皆為三重複並以 T-test 計算。

3.8 延伸討論

細胞週期的停滯可以使癌細胞進入休眠狀態，在癌症化療的應用中也是被重視的方法之一，但這其中也伴隨著一定風險的問題⁵⁶。若癌細胞從休眠狀態復甦，則會導致癌症的復發，更可能威脅到正在接受化療的病患。而有文獻指出，若癌細胞中粒線體的脂質組成發生改變，則會降低接受刺激的敏感度以及 ATP 的生成效率^{57, 58}。心磷脂為一個獨特且關鍵存在於粒線體內膜上的磷脂質，其被發現為對稱形式且以 linoleic acid (C18:2) 為主存在於人體中。然而有部分的心磷脂會被氧化，導致組成的不對稱性⁵⁹。癌細胞因為失去重建心磷脂的能力，因此會失去原本心磷脂的對稱性，也導致癌細胞內未成熟心磷脂的累積⁶⁰。此現象的確也於我們實驗的纖維肉瘤細胞(HT-1080)的心磷脂鑑定中發現，其心磷脂組成不同於我們先前在豬心、豬肝和牛心中發現 CL(18:2)₄ (Tetralinoleoyl-cardiolipin) 為主的心磷脂組成。在心磷脂的種類中，不管為細胞週期停滯、生長過程、過度生長狀態甚至是細胞死亡都會呈現常態分佈的心磷脂群落。在我們實驗中，復甦後細胞的心磷脂總量提升，但在單一細胞內的心磷脂總量卻沒有改變。這可能也暗示心磷脂從細胞週期停滯狀態到細胞增生時期，心磷脂的合成與降解維持一定的平衡。當細胞進入細胞週期停滯狀態並且保持存活時，心磷脂總量則大幅下降。此實驗結果也指出，細胞可能在此時期對於心磷脂或是其功能有較少的需求。

在此實驗總共於 HT-1080 細胞鑑定出超過 40 種對稱與非對稱形式的心磷脂，其非對稱的存在現象也是由於癌細胞重建心磷脂能力的缺陷。先前有文獻指出，心磷脂的置換(Turnover)遠比其它磷脂質的置換還要慢⁶¹。在我們實驗中，心磷脂種類也在細胞週期停滯或活化中，持續於 1 天內發生改變。細胞週期停滯時，心磷脂從高碳數的脂肪酸鏈往低碳數的脂肪酸鏈置換，其相反結果於活化調控。因此，心磷脂上脂肪酸鏈的碳數非常可能成為進入或脫離細胞週期時調節粒線體功能的關鍵。而脂肪酸鏈上的雙鍵數，在此實驗中似乎不是影響心磷脂重建的因素，雖然越高碳鏈數的脂肪酸也可能伴隨越多的雙鍵數。在此實驗結果顯

示，HT-1080 細胞在休眠期時並不需要高效益的粒線體來製造 ATP。因此，粒線體中的心磷脂被取代成較短碳鏈的脂肪酸，並可能將較長碳鏈的脂肪酸用於細胞生存上的維持，如生物能源的製造或生物分子的合成。在細胞復甦後的增生過程中，心磷脂從短碳鏈的脂肪酸置換成高碳數的脂肪酸。此結果也指出心磷脂的重建酵素可能還有活性來置換脂肪酸。因此，若避免心磷脂回復到長碳鏈的組成，或許能成為一個預防癌細胞擴散與增生的方法。

第四章 結果與討論(二)-化療藥物調控

4.1 化療藥物調控細胞週期停滯

前部分實驗中發現營養匱乏造成的細胞週期停滯，顯著的影響 HT-1080 細胞中粒線體的心磷脂組成。因此在此部分實驗中運用無血清培養(Serum starvation)與化療藥物(chemotherapy drugs): Methotrexate (MTX)、Mitomycin C (MMC)和 Vincristine (VIN)來調控 HT-1080 的細胞週期，使週期分別停滯在 G0/G1、S、G2 和 M 時期(圖 20)。並藉由 MTT 測試篩選出最低有效抑制生長濃度的化療藥物劑量(附件 5)，將細胞於 Growth medium 中培養 48 小時來觀察 HT-1080 細胞進入各細胞週期停滯(cell cycle arrest)間的心磷脂組成變化。

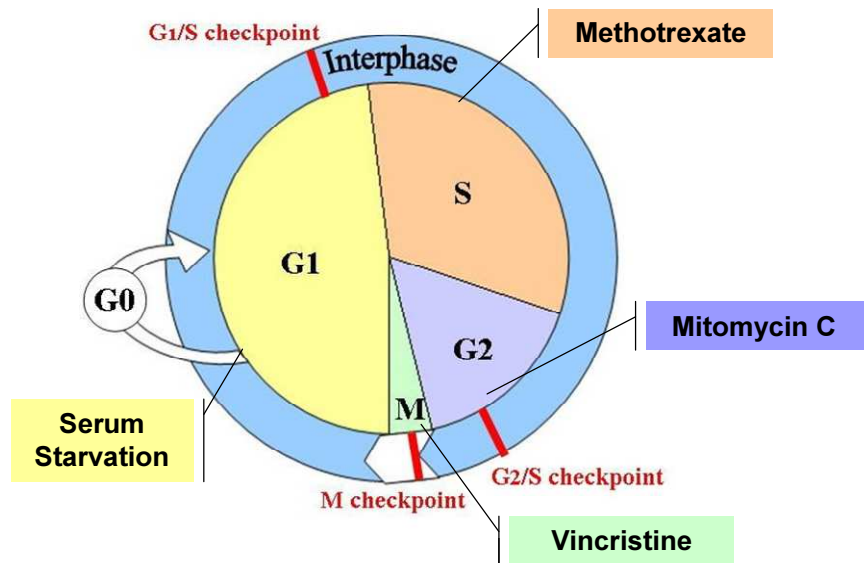


圖 20、化療藥物調控細胞週期停滯：

實驗中以無血清培養(Serum starvation) 48 小時使細胞週期停滯在 G0/G1 階段。而極低濃度的化療藥物 Methotrexate、Mitomycin C 與 Vincristine 的於細胞培養液培養 48 小時後分別使細胞週期停滯在 S、G2 與 M 階段。

4.2 化療藥物調控期間的心磷脂含量變化

為了觀測細胞經化療藥物刺激後心磷脂總含量的變化，在此將細胞經由無血清培養(Serum starvation) 與含有化療藥物的 Growth medium (Methotrexate 50nM、Mitomycin C 2 μ M、Vincristine 0.25nM)中培養 48 小時使細胞週期漸入停滯狀態，並在培養期間每 12 小時各收成細胞直至 48 小時。HT-1080 細胞中的心磷脂經萃取後以 LC-MS 分析，所有實驗皆為三重複。分析結果中，除了 Starvation 調控組的總心磷脂含量於 12 小時內明顯下降約 20% (圖 21A)，Methotrexate、Mitomycin C 以及 Vincristine 調控組的總心磷脂含量則是在 48 小時內有明顯的倍數提升 (圖 21B, C, D)。由於化療藥物的調控使細胞週期進入停滯狀態，細胞數也不會有所增長，因此意味著單顆細胞中的心磷脂在低濃度的化療藥物調控期間持續累積於細胞中。

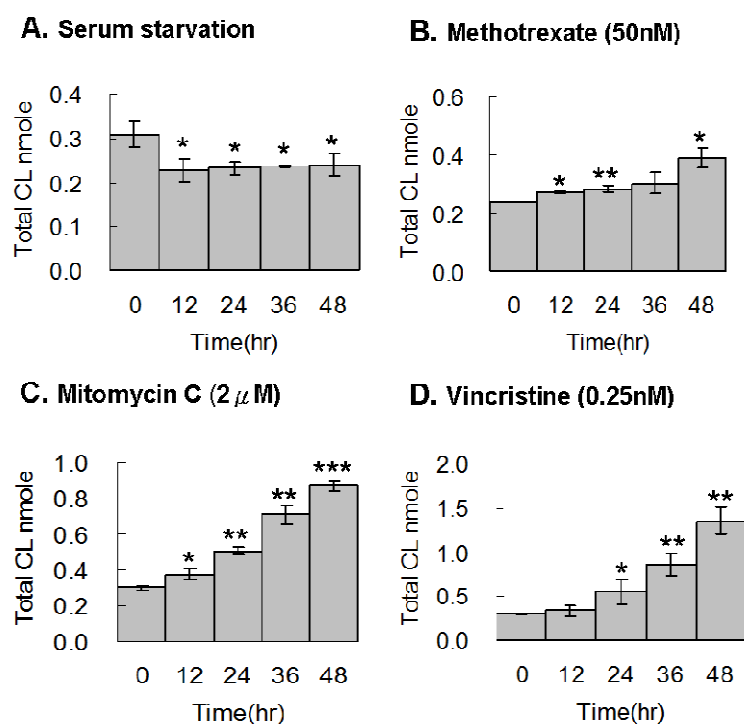


圖 21、無血清培養與化療藥物調控後心磷脂總含量變化：

細胞經血清移除培養與各化療藥物培養 48 小時，並於 0、12、24、36 和 48 小時收成。經脂質萃取後，以 LC-MS 定量所有細胞內的心磷脂含量。統計皆以 T-test 計算。

4.3 調控期間的心磷脂種類分佈

對於細胞中每個心磷脂種類的含量，可藉由內標準品(CL14:0)的相對 EIC 值做半定量。如圖 22，以無血清培養的調控組為代表，HT-1080 細胞中的心磷脂在各碳數族群中呈現常態分佈。其中以脂肪酸鏈總和 68、70 與 72 個碳的心磷脂種類含量最高。隨無血清培養的調控，相對較長碳鏈的心磷脂族群(C72、C74)含量下降，而相對較短碳鏈的心磷脂族群(C66、C68)含量則上升，可發現與前部份實驗結果相同(參考 3.5 章節)。Methotrexate、Mitomycin C 以及 Vincristine 調控組的變化皆直接以圖中「調控 48 小時與 0 小時的差值」呈現於下個小節探討。化療藥物調控後的各別心磷脂種類含量變化也呈現於附件 6~8。

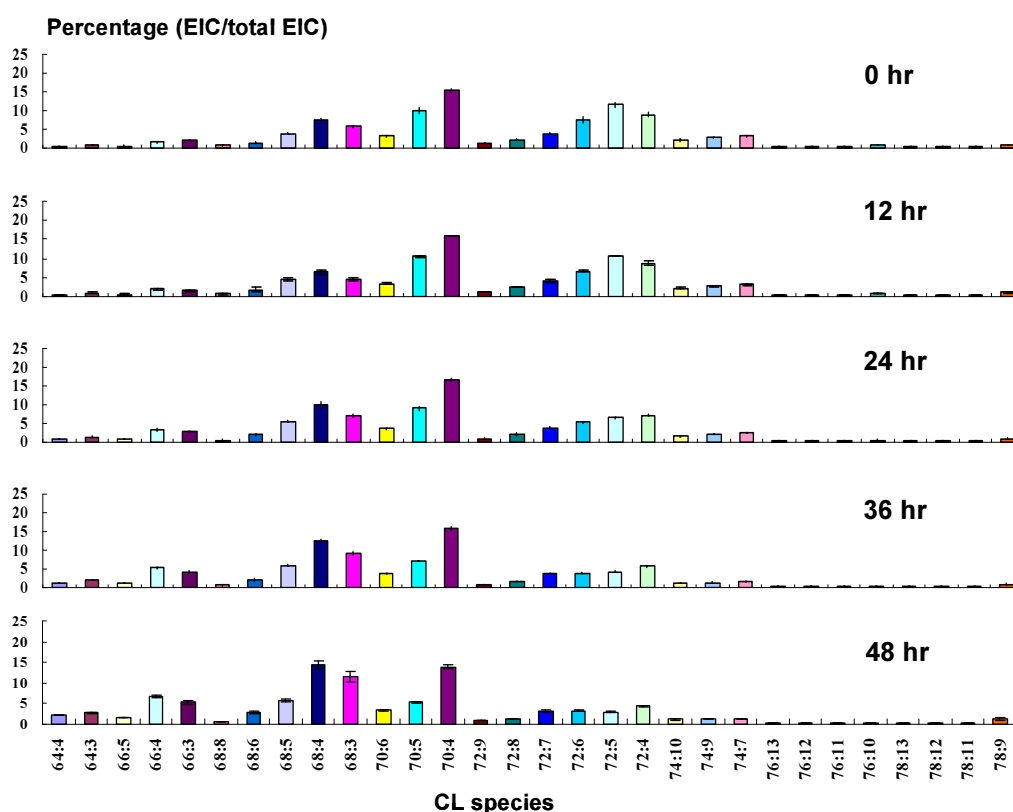


圖 22、HT-1080 細胞中心磷脂各種類分佈與含量變化(Starvation)：

細胞經血清移除培養 48 小時，每 12 小時收成一次。脂質萃取後，以質譜測量與標準化並藉由 species EIC/total EIC 得相對含量。

4.4 心磷脂組成於細胞週期的改變

無血清培養與化療藥物調控的心磷脂種類分佈與含量變化圖(如圖 22)中，以調控 48 小時與 0 小時之相對變化圖(48hr - 0hr)呈現於圖 23。其結果顯示，當 HT-1080 細胞的細胞週期被停滯於 G0/G1、G2 和 M 時期，碳數總和較低的心磷脂群落(C66、C68)隨著進入細胞週期的停滯而含量上升，而碳數總和較高的心磷脂群落(C72、C74)含量則下降。其中細胞週期停滯於 S 時期呈現獨特的相反變化趨勢，在碳數總和較低的心磷脂群落(C66、C68)含量下降，而相對碳數總和較高的的心磷脂群落(C72、C74)含量則明顯上升。而各細胞週期的心磷脂含量變化趨勢中，屬於中間群落的 C70 心磷脂種類在 G0/G1 與 S 時期為含量下降趨勢，在 G2 和 M 時期則呈現含量上升趨勢，整體表現出不同於其他群落在細胞週期的獨特變化。總結所有趨勢變化也顯示出，隨著 HT-1080 的細胞週期停滯於 S 時期中，其粒線體內心磷脂的組成有相反於其他時期的重大轉變。

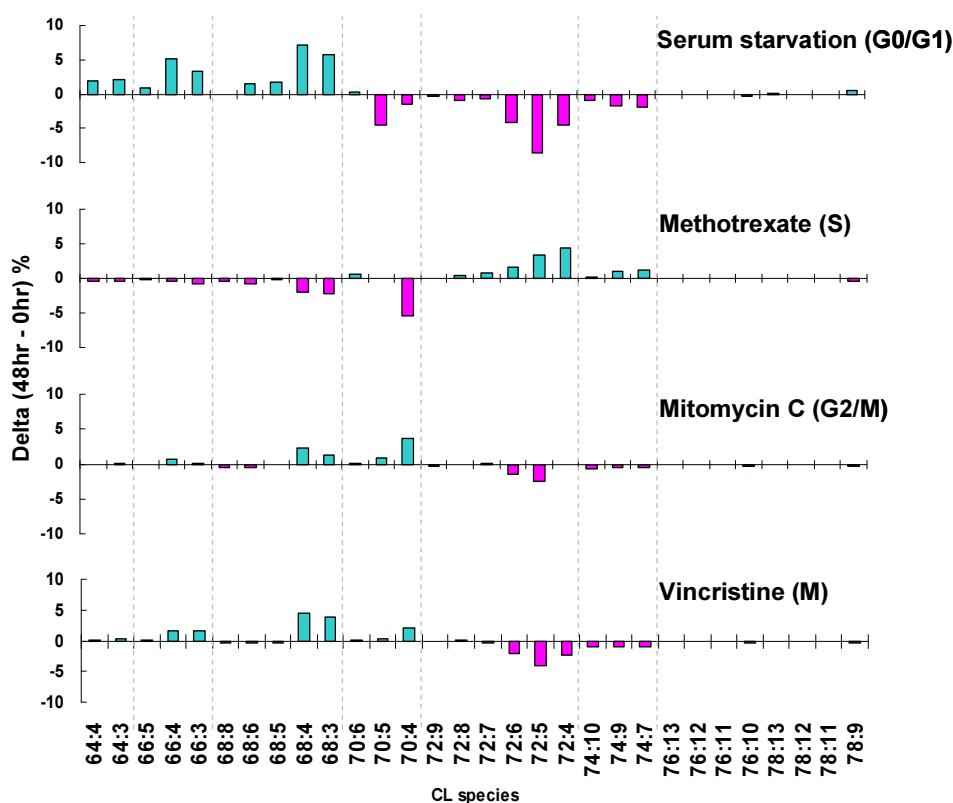


圖 23、心磷脂組成於細胞週期停滯的改變：

經無血清培養與化療藥物調控 48 小時，各時期心磷脂種類含量變化以調控 48 小時與 0 小時之差值呈現。

4.5 結論

本次實驗藉由前部分實驗的心磷脂質譜分析系統(參考 3.1 章節)，重新分析另一代 HT-1080 細胞的心磷脂種類分布與總量變化。在總量分析結果中，Starvation 調控組的總心磷脂含量於 12 小時內明顯下降，在此營養匱乏條件下的趨勢性變化已於前部分實驗探討(參考第三章)。而本次實驗在給予細胞營養充足的情況下，加入了不同細胞週期專一性抑制的化療藥物。實驗結果發現，經化療藥物 Methotrexate、Mitomycin C 以及 Vincristine 調控後的總心磷脂含量在調控 48 小時內有明顯的倍數提升。由於化療藥物的調控使細胞週期進入停滯狀態，細胞數也不會有所增長，意謂單顆細胞中的心磷脂在低濃度的化療藥物調控期間持續累積於細胞中，因此也暗示著細胞內粒線體還在持續複製，或單顆粒線體中心磷脂含量的增加。心磷脂種類含量分析中，再 Starvation 調控組我們看到與前部分實驗相同的情況，呈現短碳鏈的心磷脂增加而長碳鏈的心磷脂下降。由於營養的缺乏，長碳鏈心磷脂的脂肪酸可能作用於能量帶謝，以提供基本的生命維持。相反再營養正長的條件下，我們可看到細胞週期 S 時期有相反於 G2、M 時期的趨勢，其為長碳鏈的心磷脂含量增加。這意味著心磷脂合成酶在此階段開始合成心磷脂，也由於在合成期間需要較高的粒線體活性來提供能量，因此趨向於長碳鏈的心磷脂，其狀況與 cell survival 類似。而再 G2/M 時期中，可看見兩個時期的趨勢相近。由於 G2/M 較為接近，並因為接續再 S 時期完成生物分子的合成後不需要高效益的粒線體活性，因此相對增加短碳鏈的心磷脂含量，來回到原本粒線體心磷脂組成的趨勢。

4.6 延伸討論

癌症病患若長期服用化療藥物，對於病患全身是一種藥物性的刺激。在臨床上的化療藥物，絕大部分都是抑制細胞週期來調控癌細胞的生長。而細胞週

期的進行需結合粒線體週期來運作，因此細胞週期的停滯勢必影響(或是被影響)到粒線體週期的調控^{6, 7}。心磷脂為一個獨特且關鍵存在於粒線體內膜上的磷脂質，其涉及到粒線體膜的架構與功能性。在我們實驗結果中，癌細胞在營養匱乏的環境下心磷脂的總含量下降，說明細胞可能在此時期對於心磷脂或是其功能有較少的需求(參考第三章)。化療藥物在癌細胞營養充足的環境下進行調控，細胞停止生長而心磷脂總含量卻顯著上升。此結果說明粒線體的心磷脂還在代謝或堆積，也意味著在細胞週期被化療藥物停滯時，粒線體週期可能脫離停滯的細胞週期而獨立運行。在此時期的粒線體或許還在自我複製或製造心磷脂，因而造成調控期間心磷脂的總量增加。

正常的細胞週期在運行期間，必須通多個檢查點(check point)來進入下一個階段。當細胞從細胞週期 G1 到 S 時期，會提高粒線體的活性以及 ATP 的效能來通過 G1/S 的檢查點，進而幫助 S 時期的各種生物分子來進行複製⁶²。實驗結果發現，在停滯於 S 時期的心磷脂組成呈現長碳鏈心磷脂種類上升的趨勢，其結果相反於其他細胞週期階段。此結果除了說明細胞週期 S 時期對於心磷脂組成的獨特性。配合第三章活化實驗的結果，也暗示長碳鏈心磷脂種類，可能對於粒線體內膜內的複合蛋白有較高穩定性，因此涉及到粒線體高度活性的表現。整體結果也意味著，長期服用化療藥物的癌症病患可能會影響到其粒線體內心磷脂的組成與含量。相反地，長碳鏈心磷脂組成的調控或許能成為抑制癌細胞生長或提升正常細胞代謝功能的新指標。

参考文献：

1. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**, *26* (4), 239-57.
2. Proskuryakov, S. Y.; Konoplyannikov, A. G.; Gabai, V. L., Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* **2003**, *283* (1), 1-16.
3. Malumbres, M.; Barbacid, M., Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9* (3), 153-66.
4. Temple, S.; Raff, M. C., Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* **1986**, *44* (5), 773-9.
5. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N., The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **2003**, *36* (3), 131-49.
6. Xiong, W.; Jiao, Y.; Huang, W.; Ma, M.; Yu, M.; Cui, Q.; Tan, D., Regulation of the cell cycle via mitochondrial gene expression and energy metabolism in HeLa cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2012**, *44* (4), 347-58.
7. Lee, S.; Kim, S.; Sun, X.; Lee, J. H.; Cho, H., Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *357* (1), 111-7.
8. Weinberg, F.; Chandel, N. S., Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci* **2009**, *1177*, 66-73.
9. Youle, R. J.; van der Bliek, A. M., Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **2012**, *337* (6098), 1062-5.
10. Martinez-Diez, M.; Santamaria, G.; Ortega, A. D.; Cuezva, J. M., Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS One* **2006**, *1*, e107.
11. Osman, C.; Voelker, D. R.; Langer, T., Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol* **2011**, *192* (1), 7-16.
12. Pangborn, M. C., The composition of cardiolipin. *J Biol Chem* **1947**, *168* (1), 351-61.
13. Hirschberg, C. B.; Kennedy, E. P., Mechanism of the enzymatic synthesis of cardiolipin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**, *69* (3), 648-51.
14. Hostetler, K. Y.; van den Bosch, H.; van Deenen, L. L., The mechanism of cardiolipin biosynthesis in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1972**, *260* (3), 507-13.
15. Ascenzi, P.; Polticelli, F.; Marino, M.; Santucci, R.; Coletta, M., Cardiolipin drives cytochrome c proapoptotic and antiapoptotic actions. *IUBMB Life* **63** (3),

160-5.

16. Claypool, S. M., Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788* (10), 2059-68.
17. Sparagna, G. C.; Lesnefsky, E. J., Cardiolipin remodeling in the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **2009**, *53* (4), 290-301.
18. Hooks, S. B.; Cummings, B. S., Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in cell growth and signaling. *Biochem Pharmacol* **2008**, *76* (9), 1059-67.
19. Dennis, E. A.; Cao, J.; Hsu, Y. H.; Magrioti, V.; Kokotos, G., Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* **2011**, *111* (10), 6130-85.
20. Schlame, M., Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochim Biophys Acta* *1831* (3), 582-8.
21. Jackowski, S., Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem* **1996**, *271* (34), 20219-22.
22. Jackowski, S., Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle. *J Biol Chem* **1994**, *269* (5), 3858-67.
23. Antico Arciuch, V. G.; Elguero, M. E.; Poderoso, J. J.; Carreras, M. C., Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid Redox Signal* **2012**, *16* (10), 1150-80.
24. Gomez, B., Jr.; Robinson, N. C., Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. *Biochemistry* **1999**, *38* (28), 9031-8.
25. Eble, K. S.; Coleman, W. B.; Hantgan, R. R.; Cunningham, C. C., Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* **1990**, *265* (32), 19434-40.
26. Sedlak, E.; Robinson, N. C., Phospholipase A(2) digestion of cardiolipin bound to bovine cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry* **1999**, *38* (45), 14966-72.
27. Dieude, M.; Striegl, H.; Tyznik, A. J.; Wang, J.; Behar, S. M.; Piccirillo, C. A.; Levine, J. S.; Zajonc, D. M.; Rauch, J., Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted gammadelta T cells in the normal murine repertoire. *J Immunol* *186* (8), 4771-81.
28. Yankovskaya, V.; Horsefield, R.; Tornroth, S.; Luna-Chavez, C.; Miyoshi, H.; Leger, C.; Byrne, B.; Cecchini, G.; Iwata, S., Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **2003**, *299* (5607), 700-4.
29. Yang, J.; Kulkarni, K.; Manolaridis, I.; Zhang, Z.; Dodd, R. B.; Mas-Droux, C.; Barford, D., Mechanism of isoprenylcysteine carboxyl methylation from the crystal structure of the integral membrane methyltransferase ICMT. *Mol Cell* *44* (6), 997-1004.

30. Shintre, C. A.; Pike, A. C.; Li, Q.; Kim, J. I.; Barr, A. J.; Goubin, S.; Shrestha, L.; Yang, J.; Berridge, G.; Ross, J.; Stansfeld, P. J.; Sansom, M. S.; Edwards, A. M.; Bountra, C.; Marsden, B. D.; von Delft, F.; Bullock, A. N.; Gileadi, O.; Burgess-Brown, N. A.; Carpenter, E. P., Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- and nucleotide-bound states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (24), 9710-5.
31. Brandner, K.; Mick, D. U.; Frazier, A. E.; Taylor, R. D.; Meisinger, C.; Rehling, P.; Tazl, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol Biol Cell* **2005**, *16* (11), 5202-14.
32. McKenzie, M.; Lazarou, M.; Thorburn, D. R.; Ryan, M. T., Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J Mol Biol* **2006**, *361* (3), 462-9.
33. Schlame, M.; Ren, M.; Xu, Y.; Greenberg, M. L.; Haller, I., Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids* **2005**, *138* (1-2), 38-49.
34. Kraffe, E.; Grall, J.; Le Duff, M.; Soudant, P.; Marty, Y., A striking parallel between cardiolipin fatty acid composition and phylogenetic belonging in marine bivalves: a possible adaptative evolution? *Lipids* **2008**, *43* (10), 961-70.
35. Kiebish, M. A.; Han, X.; Cheng, H.; Chuang, J. H.; Seyfried, T. N., Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res* **2008**, *49* (12), 2545-56.
36. Yoshinaga, M. Y.; Wormer, L.; Elvert, M.; Hinrichs, K. U., Novel cardiolipins from uncultured methane-metabolizing archaea. *Archaea* **2012**, 832097.
37. Hsu, Y. H.; Dumlao, D. S.; Cao, J.; Dennis, E. A., Assessing phospholipase A2 activity toward cardiolipin by mass spectrometry. *PLoS One* **2013**, *8* (3), e59267.
38. Paradies, G.; Petrosillo, G.; Pistolese, M.; Di Venosa, N.; Federici, A.; Ruggiero, F. M., Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* **2004**, *94* (1), 53-9.
39. Lesnefsky, E. J.; Slabe, T. J.; Stoll, M. S.; Minkler, P. E.; Hoppel, C. L., Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2001**, *280* (6), H2770-8.
40. Paradies, G.; Petrosillo, G.; Ruggiero, F. M., Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1319* (1), 5-8.
41. Abe, M.; Niibayashi, R.; Koubori, S.; Moriyama, I.; Miyoshi, H., Molecular mechanisms for the induction of peroxidase activity of the cytochrome c-cardiolipin complex. *Biochemistry* **2011**, *50* (39), 8383-91.

42. Kalanxhi, E.; Wallace, C. J., Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. *Biochem J* **2007**, *407* (2), 179-87.
43. Ott, M.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S., Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **2007**, *14* (7), 1243-7.
44. Belikova, N. A.; Vladimirov, Y. A.; Osipov, A. N.; Kapralov, A. A.; Tyurin, V. A.; Potapovich, M. V.; Basova, L. V.; Peterson, J.; Kurnikov, I. V.; Kagan, V. E., Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* **2006**, *45* (15), 4998-5009.
45. Richardson, V. B.; Littlefield, L. G.; Sayer, A. M.; Peterson, P. T., Cell-cycle-stage specificity of the methotrexate block as resolved by X-ray-induced chromosome damage. *Cytogenet Cell Genet* **1994**, *66* (2), 126-8.
46. Genestier, L.; Paillot, R.; Quemeneur, L.; Izeradjene, K.; Revillard, J. P., Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* **2000**, *47* (2-3), 247-57.
47. Bertino, J. R.; Goker, E.; Gorlick, R.; Li, W. W.; Banerjee, D., Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* **1996**, *1* (4), 223-226.
48. Petru, E.; Sevin, B. U.; Haas, J.; Ramos, R.; Perras, J., A correlation of cell cycle perturbations with chemosensitivity in human ovarian cancer cells exposed to cytotoxic drugs in vitro. *Gynecol Oncol* **1995**, *58* (1), 48-57.
49. Verweij, J.; Sparreboom, A.; Nooter, K., Mitomycins. *Cancer Chemother Biol Response Modif* **1999**, *18*, 46-58.
50. Kang, S. G.; Chung, H.; Yoo, Y. D.; Lee, J. G.; Choi, Y. I.; Yu, Y. S., Mechanism of growth inhibitory effect of Mitomycin-C on cultured human retinal pigment epithelial cells: apoptosis and cell cycle arrest. *Curr Eye Res* **2001**, *22* (3), 174-81.
51. Sakai, T.; Aoike, A.; Marui, N.; Kawai, K.; Nishino, H.; Fukushima, M., Protection by cycloheximide against cytotoxicity induced by vincristine, colchicine, or delta 12-prostaglandin J2 on human osteosarcoma cells. *Cancer Res* **1989**, *49* (5), 1193-6.
52. Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T., Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* **1998**, *18* (4), 259-96.
53. Wang, L. G.; Liu, X. M.; Kreis, W.; Budman, D. R., The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* **1999**, *44* (5), 355-61.
54. Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37* (8), 911-7.
55. Bird, S. S.; Marur, V. R.; Sniatynski, M. J.; Greenberg, H. K.; Kristal, B. S., Lipidomics profiling by high-resolution LC-MS and high-energy collisional

dissociation fragmentation: focus on characterization of mitochondrial cardiolipins and monolysocardiolipins. *Anal Chem* **2011**, 83 (3), 940-9.

56. Aguirre-Ghiso, J. A., Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **2007**, 7 (11), 834-46.

57. Dumas, J. F.; Peyta, L.; Couet, C.; Servais, S., Implication of liver cardiolipins in mitochondrial energy metabolism disorder in cancer cachexia. *Biochimie* **95** (1), 27-32.

58. Schug, Z. T.; Frezza, C.; Galbraith, L. C.; Gottlieb, E., The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour. *Acta Oncol* **51** (3), 301-10.

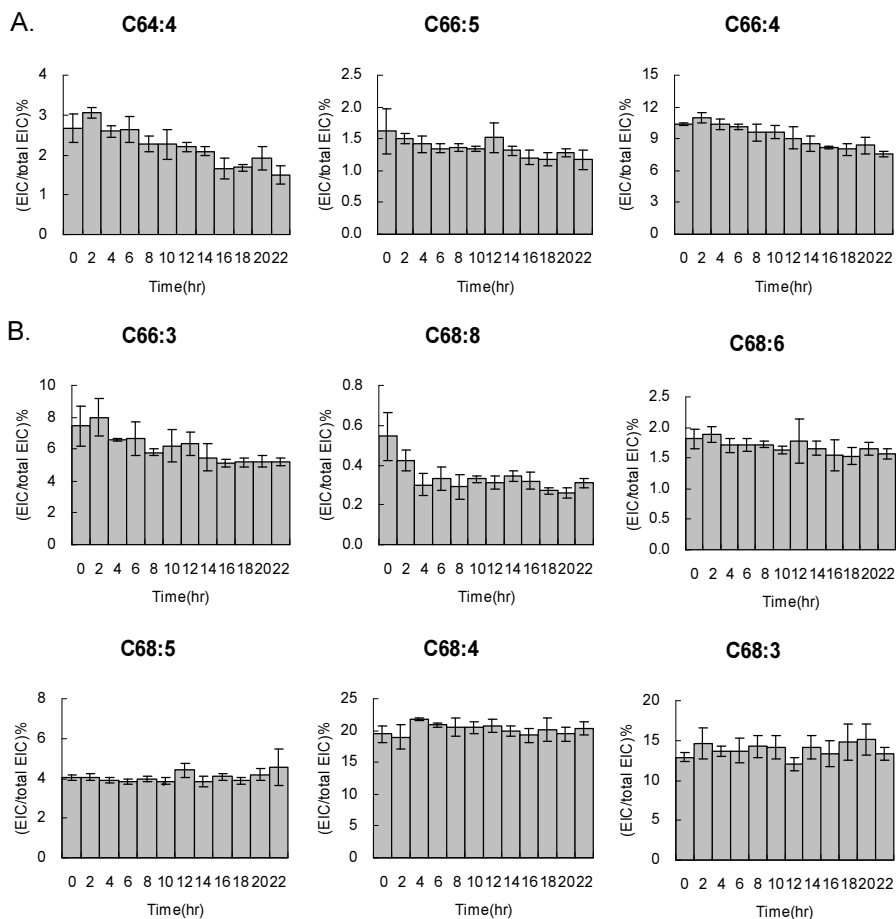
59. Tyurina, Y. Y.; Domingues, R. M.; Tyurin, V. A.; Maciel, E.; Domingues, P.; Amoscato, A. A.; Bayir, H.; Kagan, V. E., Characterization of cardiolipins and their oxidation products by LC-MS analysis. *Chem Phys Lipids* **179**, 3-10.

60. Baile, M. G.; Lu, Y. W.; Claypool, S. M., The topology and regulation of cardiolipin biosynthesis and remodeling in yeast. *Chem Phys Lipids* **179**, 25-31.

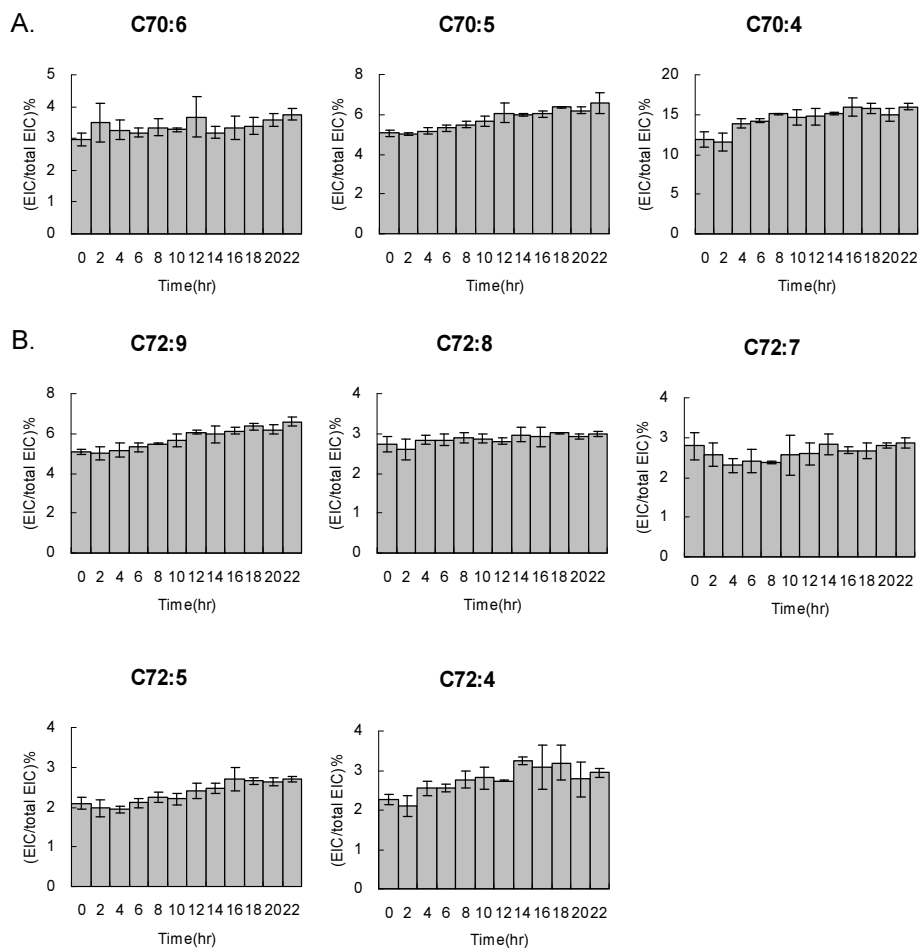
61. Xu, Y.; Schlame, M., The turnover of glycerol and acyl moieties of cardiolipin. *Chem Phys Lipids* **179**, 17-24.

62. Mitra, K.; Wunder, C.; Roysam, B.; Lin, G.; Lippincott-Schwartz, J., A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106 (29), 11960-5.

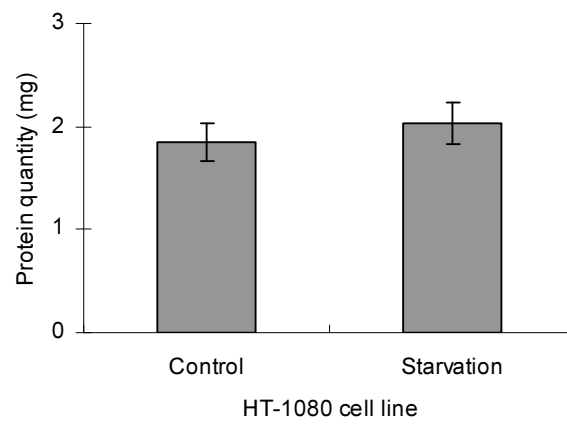
附件 1、C66 與 C68 之心磷脂含量下降(Activation)：細胞從 starvation 活化，並於每 2 小時收成一次至 22 小時，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類於 C66 與 C68 群落都經過心磷脂(C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。



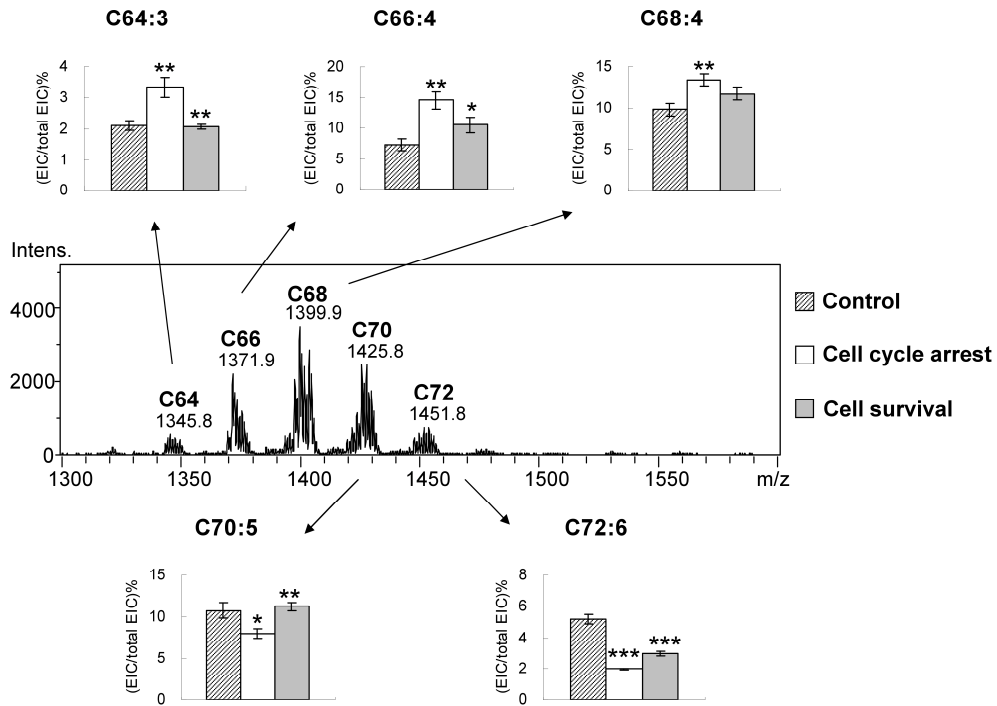
附件 2、C70 與 C72 之心磷脂含量下降(Activation)：細胞從 starvation 活化，並於每 2 小時收成一次至 22 小時，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類於 C70 與 C72 群落都經過心磷脂(C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。



附件 3、經 Starvation 調控後細胞生長停滯：HT-1080 細胞經 starvation 培養 48 小時後，以 Bradford protein assay 測量培養前後所有細胞的蛋白質總濃度。

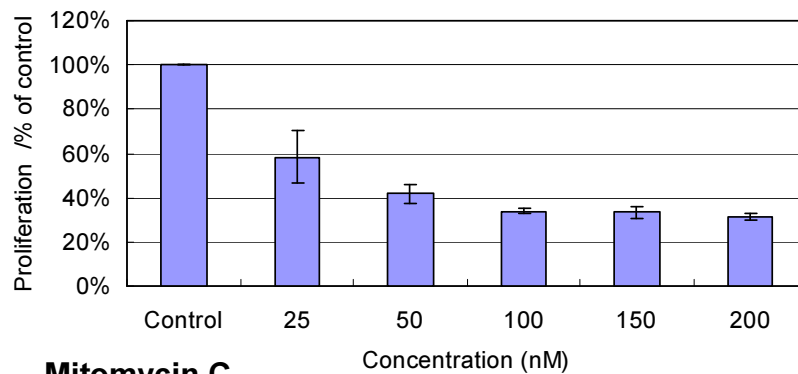


附件 4、MCF-7 細胞株 Starvation (cell cycle arrest)與活化調控(cell survival)於各心
 磷脂含量之趨勢比較：實驗方法同 HT-1080 實驗組。心磷脂群落標記於分
 子量上方。圖中以每個群落中最高含量的心磷脂種類為代表，呈現心磷脂
 種類於各時間內含量百分比的改變。

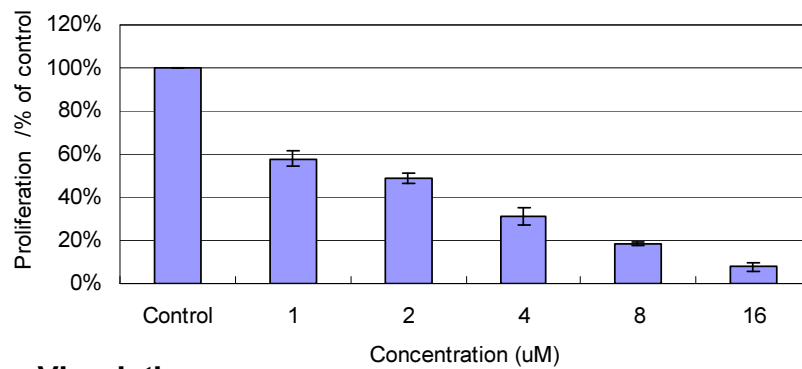


附件 5、化療藥物於 HT1080 細胞之 MMT 測試：各化療藥物皆於 Growth medium 中調控細胞 48 小時。以 48 小時內不讓細胞生長且不會過多死亡之最低有效劑量為篩選標準。測試後(A) Methotrexate 採用 50nM、(B) Mitomycin C 採用 2 μ M 和(C) Vincristine 採用 0.25nM 為實驗操作濃度。

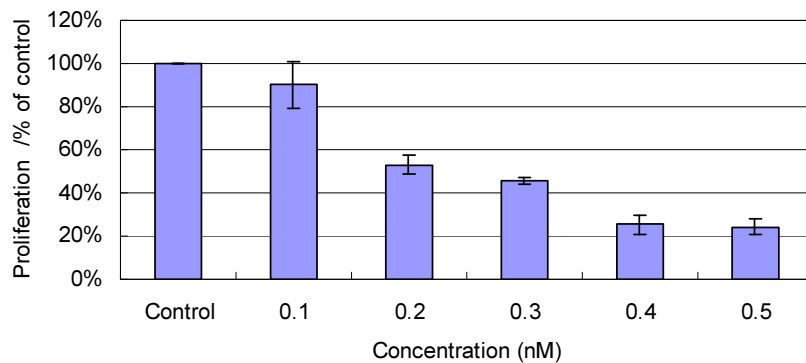
A. Methotrexate



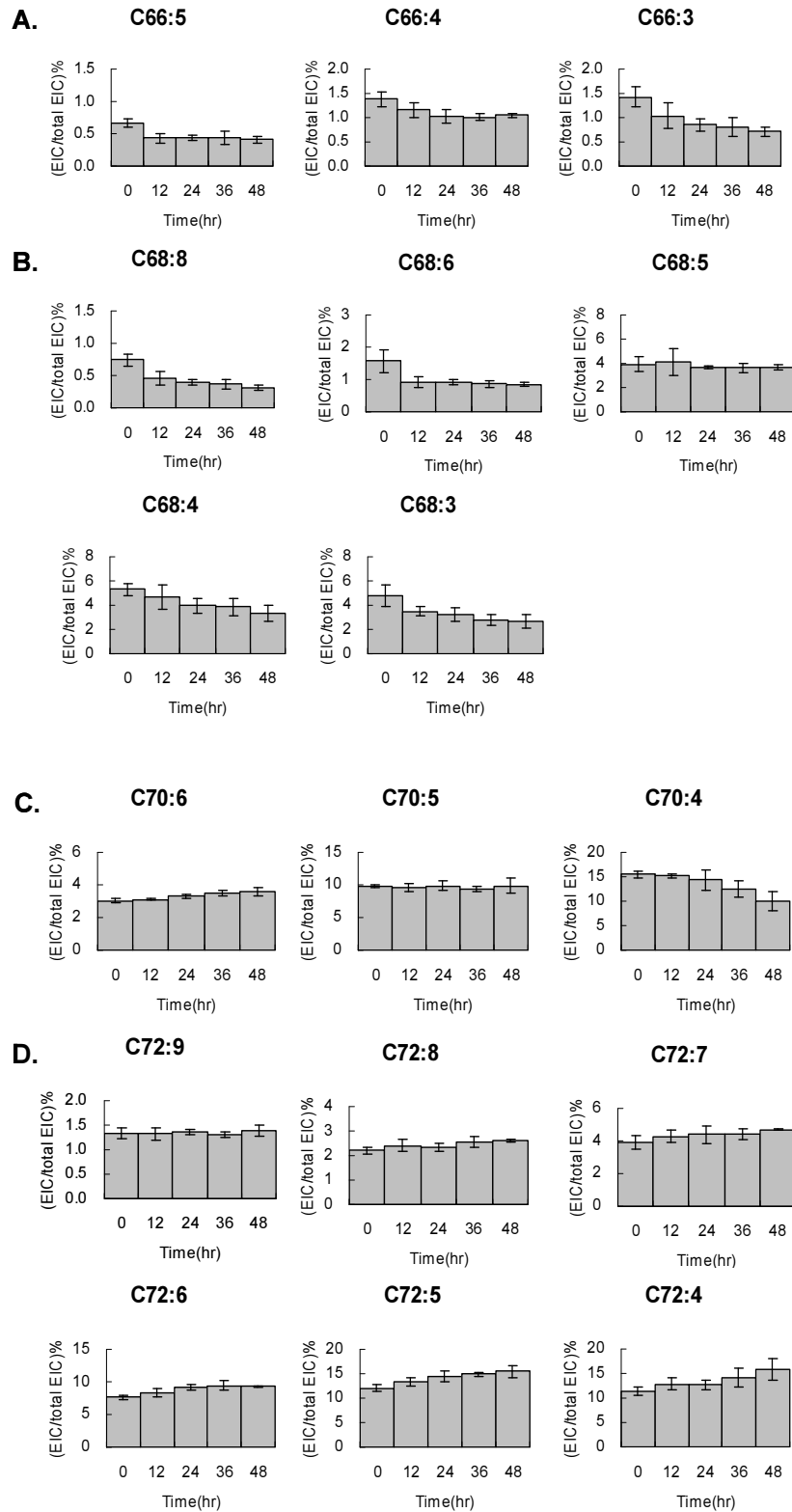
B. Mitomycin C

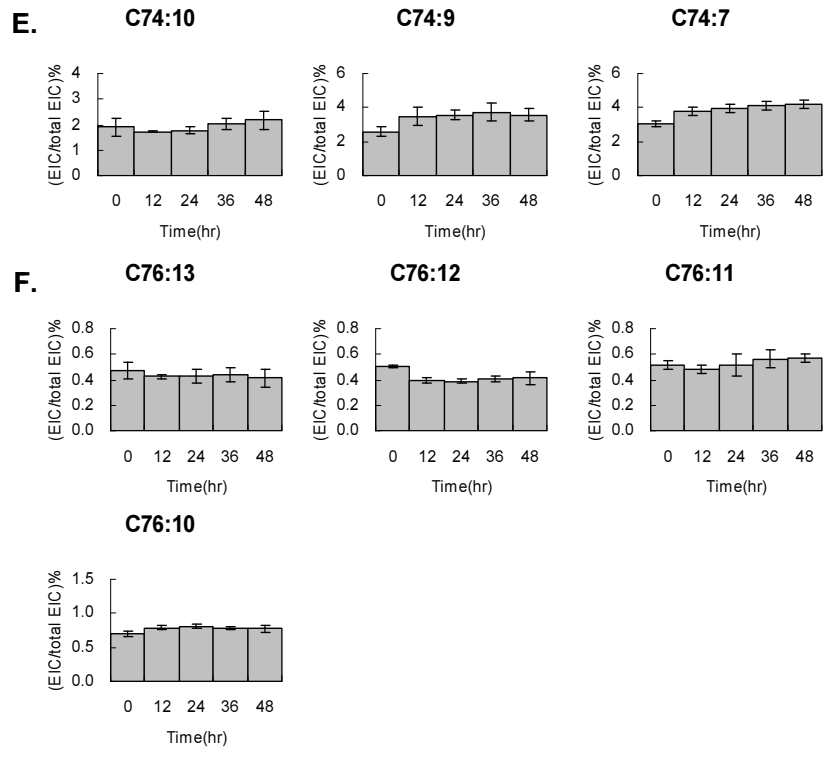


C. Vincristine

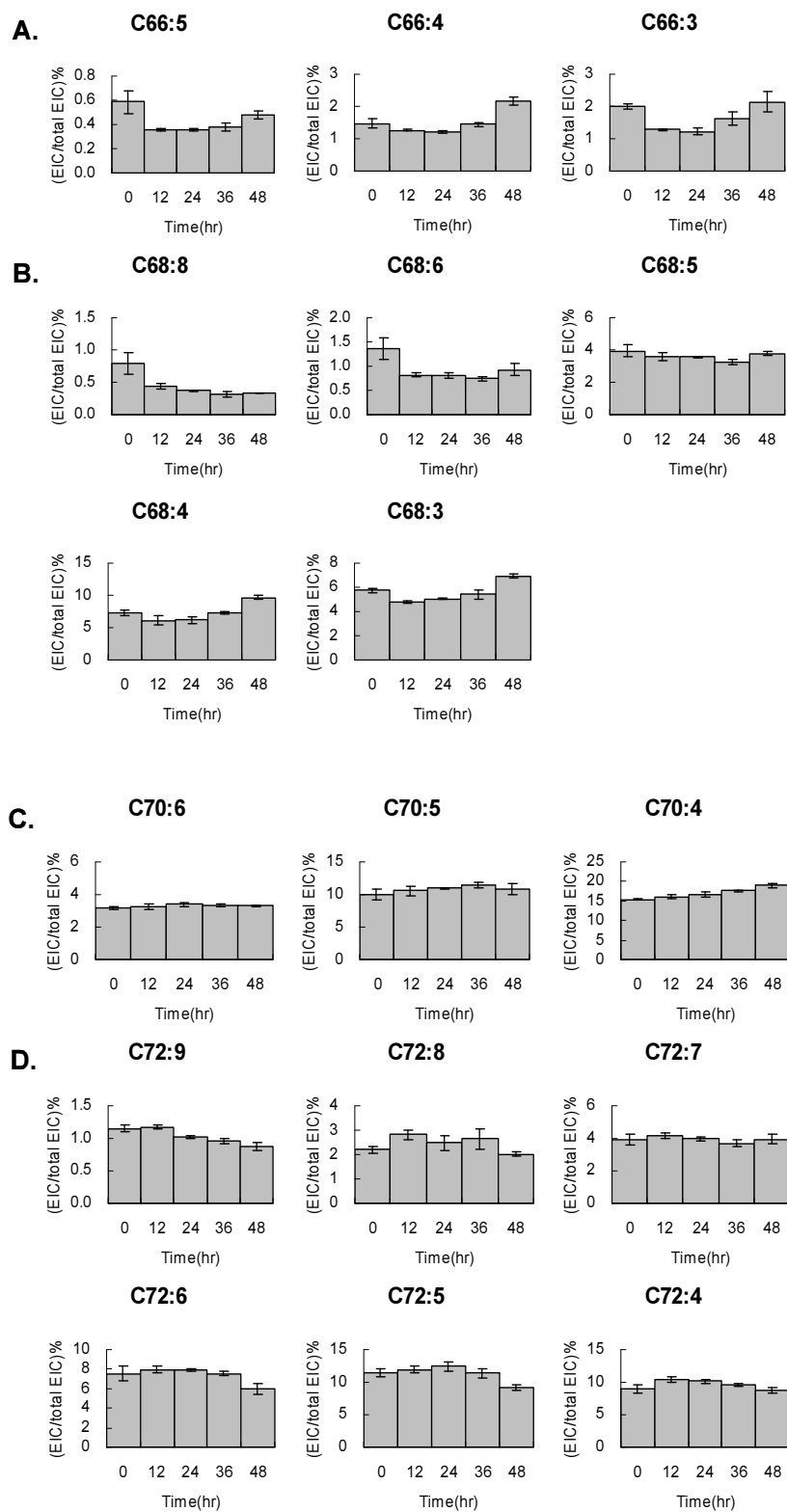


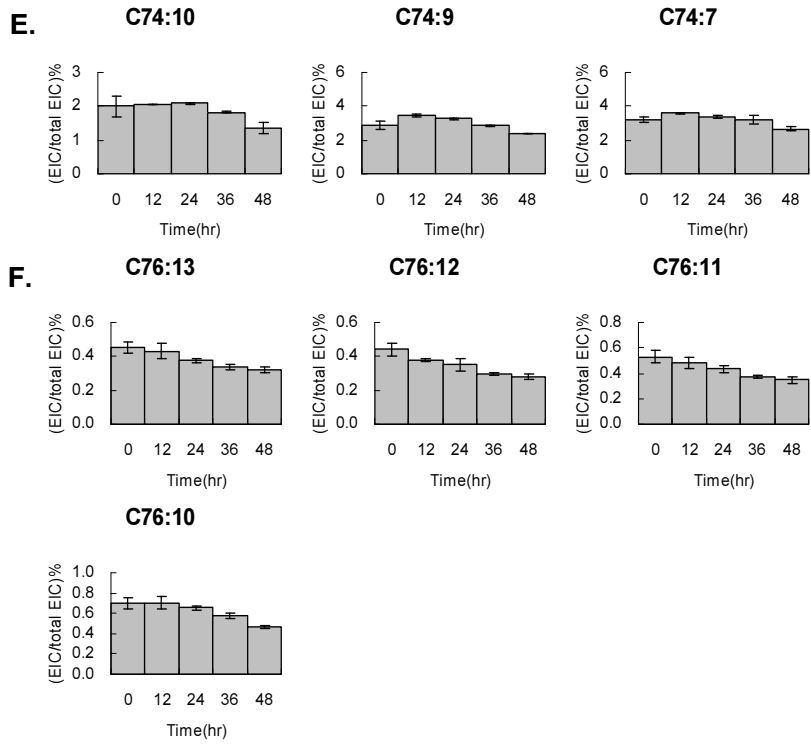
附件 6、HT-1080 細胞經 Methotrexate 調控 48 小時，每 12 小時收成一次，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類都經過心磷脂(C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。





附件 7、HT-1080 細胞經 Mitomycin C 調控 48 小時，每 12 小時收成一次，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類都經過心磷脂(C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。





附件 8、HT-1080 細胞經 Vincristine 調控 48 小時，每 12 小時收成一次，經脂質萃取後以 LC-MS 分析。所有心磷脂種類都經過心磷脂(C14:0)標準品之相對 EIC 做定量。

