

國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

鑑定以細胞自噬清除神經母細胞瘤堆積多麩醯  
胺的小分子化合物

**Identification of a Small Molecule in  
Eliminating Cellular Polyglutamine  
Aggregation in Neuroblastoma Cells**

研究生：楊采蓁

**Tsai-Chen Yang**

指導教授：方剛 博士

**Kang Fang**

中華民國 103 年 8 月

## 誌謝

時光匆匆不知不覺兩年過去了，這兩年中，從懵懂無知的新生蛻變成累積許多實驗經驗的老手並且能夠順利完成論文，這一路上有許多人相助及鼓勵，在此由衷的感謝。

本論文的完成，首先要感謝我的指導教授方剛老師，在學術上觀念的啟發及在我徬徨無助的時候為我指點迷津，才使得在我面對任何困難時，得以豁然開朗。並感謝口試委員黃偉邦教授及姚清發教授耐心的討論和指正，使得本論文得以更加完善。

授業期間，感謝學長景平、長亨、俊彥、Martin及學弟柏緯與好友佩岑、偉賢一同渡過生命中重要的時刻，另外也感謝實驗室新生潮永、文興、玉玲、丹玉所給予的關心及事務上的協助永銘於心。另外要感謝我的家人，給我最大鼓勵支持我讀碩士，讓我在學業上有一番成績，最後，僅以此論文獻給我敬愛的家人、朋友和師長。

# 目錄

中文摘要	3
英文摘要	4
壹、文獻回顧	5
貳、研究背景	10
參、研究目標	12
肆、研究材料與方法	12
伍、研究結果	19
陸、討論	24
柒、參考文獻	27
捌、圖示	32

## 中文摘要

多麩醯胺酸疾病多屬於神經退化性疾病，主要原因是因為核苷酸CAG異常重複，讓蛋白質錯誤折疊造成聚集所引起細胞毒性，進一步造成細胞死亡。目前已有報導指出，自噬系統可以透過溶酶體降解突變蛋白、胞器並減輕polyQ聚集所引發的細胞毒性，因此促進細胞自噬也許對於神經退化性疾病的治療能提供一個有效的方向。本研究轉殖不同長度polyQ結合綠色螢光蛋白的基因進入人類神經瘤母細胞建立穩定細胞株作為篩選平台，實驗首先利用螢光染色標定細胞自噬相關標記，篩選出能誘導細胞自噬並且不會影響細胞的存活的化合物。再透過螢光顯微鏡觀察藥物是否可以加強清除蛋白堆積物。此外在西方轉漬法，確定藥物能增加細胞自噬的相關標記蛋白。最後利用自噬抑制劑抑制細胞自噬進而降低清除polyQ聚集蛋白的能力，以證明藥物是透過促進自噬方式清除毒性蛋白堆積物。本研究所篩選的藥物，可作為治療神經退化性疾病的潛力藥物的發展，未來將更進一步確認細胞自噬如何清除細胞polyQ堆積的相關機制。

關鍵字: 細胞自噬、多麩醯胺酸疾病、神經退化性疾病

## 英文摘要

Polyglutamine-related neurodegenerative diseases are made of abnormally expanded tri-nucleotide CAG repeats. The accumulated repeats caused misfolding accumulation of intracellular aggregates and induced cytotoxicity leading to cell death. It is known that autophagy through autolysosomes reduced polyQ aggregation which caused toxicity. Autophagy provides an effective approach in treating of neurodegenerative diseases .The neuroblastoma cell lines transfected with green fluorescent protein conjugated with different length of polyQ were established. First we used lysotracker to screen series of synthetic chemical compounds, we found one compound can induce autophagy and do not affect cell survival. By fluorescence microscopy, we observed this compound can remove toxic protein accumulation. We determined the compound can increase autophagy-related marker proteins by western blotting. Lastly, autophagy inhibitors can promote polyQ protein aggregation and decrease compound effects, this work can confirm that the compound promotes autophagy to clear toxic protein accumulation. In this study, we found a compound as potential drug for treating neurodegenerative diseases. We will confirm how the drugs clear polyQ accumulation through autophagy.

Keywords: autophagy 、 neurodegenerative diseases 、 Polyglutamine

## 壹、文獻回顧

### 一、多麩醯胺酸疾病(Polyglutamine diseases)

多麩醯胺酸疾病是體染色體顯性的遺傳性神經疾病，包括：亨丁頓氏病(Huntington's disease, HD)、齒狀紅核蒼白球萎縮症(Dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA)、脊髓延髓肌肉萎縮症(Spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA)及多種類型脊髓小腦萎縮症(Spinocerebellar ataxias, SCAs)等等(1)，它們都是漸進式影響到中央神經系統，目前醫學上面仍無太多有效治療方法。這些疾病都有共同的原因主要是相關基因上核苷酸 CAG 大量重複所造成的異常，CAG 編碼為麩胺酸，而 CAG 片段超過一定長度的區域，會導致基因的突變，在細胞內 polyQ 片段大於 40 個麩胺酸，這些聚集物會形成不溶性聚集(2)。CAG 重複片段大於 40 個麩胺酸會造成較嚴重神經退化性疾病(3,4)。雖然多麩醯胺酸疾病中，蛋白質聚集或中間產物形成過程中是否會造成毒性或是保護的機制目前仍有爭議，然而利用免疫染色研究可以發現擴展的 polyQ 片段會生成聚集體(aggregates)(5)，而擴展的 polyQ 片段會改變結構，造成細胞毒性。擴展的 polyQ 片段長度越長越容易形成不溶性聚集(insoluble aggregates)(6)。在細胞質發現擴展的 polyQ 片段為可溶性蛋白質，進一步可以形成寡聚體和原纖維結構(7)。一般典型錯誤折疊的蛋白質相關疾病中，會造成毒性主要是因

為轉錄失調(transcriptional dysregulation)、粒腺體功能障礙(mitochondrial dysfunction)、內質網壓力(endoplasmic reticulum stress)(8)。

### **I、內質網壓力(ER stress)**

近年來研究探討發現 polyQ 片段擴增所引起的神經毒性與內質網有關聯。內質網透過細胞內吞途徑用來控制蛋白質的部位，一般 ER 是協助胜肽鏈正確摺疊及修飾後轉譯，以維持蛋白質正確功能。壓力會損害內質網的折疊能力，而導致錯誤折疊的蛋白質在 ER 腔(ER lumen)堆積，造成內質網壓力(9)。有報導顯示內質網壓力會促使神經元死亡，進而伴隨引起相關神經變性疾病(10-12)。

### **II、轉錄失調(transcriptional dysregulation)**

突變的亨丁頓蛋白(Huntingtin,htt)的 N 端含有異常擴增的多麩醯胺酸蛋白，會與不同轉錄因子交互作用其中包括轉錄因子 CREB(element-binding protein)、Sp1 和轉錄輔助活化因子 CBP (CREB binding protein)。然而，可溶性(soluble)突變的 htt 會干擾轉錄因子，如 Sp1，它不僅可以辨認 GC-rich 序列的啟動子(promotor)，也能藉由調節轉錄活性以影響下游基因的表現(13)，突變的 htt 會使 Sp1 轉錄的基因表現量減少，進而影響下游的基因，包括多巴胺 D2 受體

(dopamine D2 receptor)和神經生長因子受體(nerve growth factor receptor) 表現量也會相對減少(14,15)。另外, CREB 目標基因的表現, 不論在體外或體內, 都會在 HD 疾病患者中被抑制(16,17), 其中 CREB 目標基因過氧化體增生活化受體[peroxisome proliferator-activated receptor( PPAR) gamma coactivator (PGC)-1 $\alpha$ ] 在粒腺體生物合成扮演極重要的作用。在 HD 的病患腦部及老鼠模式中發現 PPAR 表現量是較低(18,19)。所以, 突變的 htt 不僅可以破壞核 CREB 的功能, 也會破壞粒腺體 CREB 功能(20)。

### **III、粒腺體功能障礙(mitochondrial dysfunction)**

在 HD 病患及小鼠模型中都可以發現粒腺體異常的變化(21,22)。然而, 粒腺體結構及功能不正常會與 HD 的疾病相關(23)。突變的 htt 表現在神經元細胞, 會造成粒腺體結構分裂(fission)及融合( fusion)進一步使神經元功能受損。首先在 HD 小鼠模型發現氧化磷酸化作用(oxidative phosphorylation)、電子傳遞鏈的 complexes II、II 和 IV 相關的酵素活性會降低(24,25), 此外粒腺體 ATP 數量較少, 粒腺體攝入 ADP 功能也會下降(26)。因此, 粒腺體功能異常與 HD 有密切的關係(21)。

### **IV、PolyQ diseases 治療策略**

目前針對分子機制以延緩疾病的策略, 主要方式分為兩大類:清除

突變蛋白的累積和回復突變蛋白導致的功能缺陷(27)。

### A、累積突變蛋白的清除

目前已知可以透過三個途徑清除錯誤折疊的蛋白質，包括 1:UPS 系統(ubiquitin-proteasome system) 2: 細胞自噬 3: chaperones。其中 UPS 可降解存在較短暫的蛋白，所以許多研究集中在調控細胞自噬。HD 模式及脊髓小腦萎縮症，可以透過 mTOR 抑制劑 rapamycin 活化細胞自噬之後可以清除突變蛋白(28)，另外也可透過 chaperones 可將促進錯誤的蛋白質重新折疊，利用過度表達 chaperone 蛋白，Hsp27 和 Hsp104 可抑制 HD 的毒性(27)。

### B、恢復突變蛋白所造成功能的缺陷

HDACs (histone deacetylases)的抑制劑，過去被認為是減緩轉錄失調的藥物，suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)是屬於 HDAC 的抑制劑，並且可以通過血腦屏障(BBB)。另有研究發現在 HD 小鼠模式中將 HDAC4 基因剔除，可改善以 polyQ 疾病。另外含有 R6/2 HD 小鼠模型的大腦中被證明透過增加組蛋白乙酰化(histone acetylation)，可改善 polyQ 疾病的運動障礙(27)。

## 二、細胞自噬

細胞自噬(Autophagy)是指透過溶酶體代謝機制以降解細胞內胞器

及老舊蛋白(29)，細胞自噬作用可被分成三種型式，它分別為輔助蛋白媒介之細胞自噬(chaperone-mediated autophagy; CMA)、微自噬(microautophagy) 和巨自噬(macroautophagy)(30)，在這裡我們主要關注於其中一種巨自噬以下簡稱細胞自噬(Autophagy)。

## I、細胞自噬的機制

研究發現已有多種 Atg 基因及其編碼的蛋白參與細胞自噬的形成。Vps34 是屬於 PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase) 的一種，在 PI3K 複合體扮演重要角色，而 PI3K 複合體包括 Beclin1/Atg6、UVRAG/Vps34 等蛋白，其中 Beclin1 與 Vps34 結合後可促進 Vps34 生成磷脂酰肌醇 3 磷酸(PI3P)，而 PI3P 會吸引其他 Atg 相關蛋白，此調控會參與自噬體膜形成和延伸。另外，實驗顯示複合體活化會激活 ATG7 和 ATG10，自噬體的雙層膜組合及延長需要此兩個泛素連接體系。首先，Atg7(泛素活化酶 E1)活化 Atg12，之後又與 Atg12 結合到 Atg10(泛素活化酶 E2)，最後與 Atg5 結合，ATG5-ATG12 複合物會與 ATG16 結合，此複合體有助於自噬體前體形成。其次 Atg4 會將 Atg8 降解形成細胞質 LC3-I，而 LC3-I 與磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine)結合形成 LC3-II，接上磷脂化後的 LC3-II 會緊密嵌附於自噬體膜上(31)，讓自噬前體雙層膜閉合，以形成自噬體，透過 SNARE 蛋白使自噬體與溶酶體融合，最後形成自噬溶酶體(autolysosomes)透過其中水解酶來

降解其涵蓋的內容物(32)。

## II、細胞自噬的調控機制

絲胺酸—蘇胺酸激酶(serine–threonine kinase) mTOR 在 autophagy 路徑中扮演負調控的角色，它會透過抑制 ULK1 複合體的活性以阻斷細胞自噬。mTOR 的活性是取決於上游的多個訊號，其中包含能量狀態、細胞的營養狀況，以及胺基酸和生長因子存在的因素，當營養素缺乏，生長因子減少及 ATP 濃度下降時， mTOR 的活性會受到抑制，進而提高細胞自噬的形成(31)。

## 貳、研究背景

### 一、細胞自噬與多麩醯胺酸疾病

神經退化性疾病與多麩胺酸擴展重複序列蛋白(polyQ)累積相關，polyQ 蛋白擴展與疾病進展有密切關聯(33)，較長的 polyQ 蛋白片段會導致提早發病和較嚴重的發病症狀。此外 PolyQ 片段的擴展和毒性相關的機制，已在動物模型中被報導(34)。無論在實驗模型或人腦解剖中，發現異常細胞自噬(autophagy)，會引發細胞死亡，造成神經退化性病變。然而，最近的實驗證據顯示，細胞自噬藉由清除錯誤折疊的蛋白質和聚集體(inclusion body)達到神經保護目的(35)，是目前最

具有潛力治療神經變性疾病的方法。

## 二、誘導細胞自噬治療神經退行性疾病

最近的研究顯示，當錯誤摺疊蛋白聚集形成單聚體(oligomers)造成很大毒性(36,37)，透小分子藥物誘導細胞自噬來清除蛋白聚集體的形成，是目前清除多麩醯胺酸蛋白堆積的方法。誘導細胞自噬機制可分為mTOR相關路徑和mTOR不相關路徑兩類(38)，首先自噬誘導劑為rapamycin 已經應用於臨床。在哺乳動物細胞中，rapamycin 與FK506和FKBP12結合形成複合體，使mTOR失活可以讓細胞自噬提升(39)。另外在果蠅及HD小鼠模型中加入 rapamycin使亨丁頓氏症的突變蛋白聚集減少和防止形成毒性細胞(39-41)。

mTOR 不相關路徑方面的自噬誘導劑為海藻糖，研究發現trehalose 可以降低細胞毒性、水溶性亨丁頓突變蛋白的聚集及清除 $\alpha$ -synuclein 的突變蛋白，當自噬抑制劑 bafilomycin A1 和海藻糖共同處理發現細胞 polyQ 聚集體形成的數目不減，並且在自噬缺陷的細胞中發現海藻糖並不能降解自噬缺陷細胞中的 polyQ 聚集體，確定是由細胞自噬將 polyQ 聚集體清除，透過海藻糖增加細胞自噬的形成來降解 polyQ 聚集體但作用機制尚未清楚(41)。因此本研究希望篩選出低分子量和低劑量的藥物，並能透過誘導細胞自噬來清除多麩醯胺酸蛋白聚集體，以達到保護細胞的效果。

## 參、研究目標

利用具致病基因擴展 polyQ-EGFP 的神經瘤母細胞平台，以篩選各式化學分子，首先透過溶酶體的染色與觀察確認藥物是否能誘導細胞自噬，進一步使用低濃度的化學分子藥物處理之後，觀察它們是否減少 polyQ-EGFP 疾病蛋白堆積，此外利用自噬抑制劑確認藥物效果是透過自噬來清除 polyQ-EGFP 疾病蛋白堆積，最後利用西方墨點法鑑定自噬相關機制。

## 肆、材料方法

### 1. 表現不同長度多麩醯胺酸基因的人類神經瘤母細胞株培養

#### A. 細胞培養

人類神經瘤母細胞株(SK-N-SH)來自於 American Type Tissue Collection (Rockville, MD)。本實驗室已建立將不同重複 CAG 序列的 tet: polyQ-EGFP 基因轉殖到人類神經瘤母細胞的穩定表現細胞株。該基因表現系統在一般情況不表現轉殖的基因,只有在培養液中含有 doxycycline 才會大量表現。細胞培養在含有 10 % FBS 的 DMEM 培養液中，並處於維持恆定 5 % CO<sub>2</sub>、37°C 的條件的細胞培養箱中。在培養液消耗一定量時以 phosphate-buffered saline (PBS)清洗並更換培養液。當細胞擴張至培養皿八成面積時進行細胞繼代，先將上清液移除並以 PBS 清洗，清洗完後使用適量胰蛋白酶-EDTA (0.25%

trypsin/EDTA) 覆蓋細胞表面，放入培養箱中作用 5min，再以培養液將懸浮的細胞沖洗下來，並將沖洗下來的細胞液以適量的細胞液加入另一培養皿，再加入培養液繼續培養。

### **B.細胞計數**

利用 PBS 清洗細胞後用胰蛋白酶-EDTA 處理後再以培養液將作用後的細胞沖洗下來，並將沖洗下來的細胞液移到 15 mL 離心管中，以 800 rpm 離心 5 min 後，去除掉上清液，再以 1 mL 培養液將沉澱的細胞沖散混勻，接著取 10  $\mu$ L 的細胞液適當稀釋後，再與 Trypan blue 1:1 混勻後取 10  $\mu$ L 放入血球計數器，計算出細胞總數。

### **C.細胞冷凍**

細胞培養至適當的量後，利用 PBS 清洗細胞培養皿後用胰蛋白酶-EDTA 處理，再以培養液將作用後的細胞沖洗下來，經離心後去除上清液，並加入抗凍劑 DMSO 與細胞培養液以 1:9 的比例配置，混勻後放入冷凍小管，接著放入漸凍盒一天後，儲存到液態氮桶中保存。

### **D.誘導轉殖基因表現並形成蛋白累積物**

將轉殖基因的細胞計數後種在培養皿中，以含有 2% FBS 的 DMEM 培養液培養 24 小時後，以 PBS 清洗加入含 20  $\mu$ g/mL doxycycline 和 2% FBS 的 DMEM 培養液，培養四天誘導轉殖基因表現並形成蛋白

累積物。

## **E. 藥物處理**

在誘導四天後用 PBS 清洗細胞培養皿並加入含有 2% FBS 的 DMEM 培養液培養和加入待測試的藥物，處理 48 小時後進行後續實驗。

## **2. 利用 LysoTracker 染劑篩選能誘導細胞自噬的藥物**

### **A. 利用流式細胞儀偵測分析染劑強度**

藥物處理後的細胞，移除培養液並用 PBS 清洗後加入含有 2% FBS 的 DMEM 培養液和 1:20,000 稀釋 lysoTracker 染劑。染色 20 min 後移除培養液，用胰蛋白酶-EDTA 處理 5 min，用 PBS 沖洗收集細胞樣本。利用流式細胞儀程式 (cell Quest Pro) 偵測細胞樣本，收集 10,000 個細胞樣本的染劑強度數據。

## **3. 顯微鏡照相**

### **A. 活細胞顯微鏡照相**

藥物處理後，移除培養液並用 PBS 清洗後，加入含有 2% FBS、1:20,000 稀釋 lysoTracker 和 1:20,000 稀釋細胞核染劑 Hoechst 33342 的 DMEM 培養液染色 20 min，再使用 PBS 清洗後加入適當的 PBS 做顯微觀察。

## B.共軛焦顯微照相

用 95% 酒精浸泡的蓋玻片並過火將酒精蒸發，接著放入培養皿中。在玻片上加上計數後的懸浮細胞液細胞，使細胞貼覆於蓋玻片上生長，接著如同誘導轉殖基因表現和藥物處理的處理步驟，最後將蓋玻片取出，以 4 % 的甲醛溶液固定 30 min，接著再用 PBS 洗去甲醛，並加入初級抗體反應 1 天；接繼用 PBS 洗去初級抗體，並加入次級抗體反應一天；最後用 PBS 洗去次級抗體，將樣本滴上 mounting buffer，快速的將蓋玻片貼附細胞的一面向下，讓 mounting buffer 均勻覆蓋；待稍微風乾時，在蓋玻片周圍塗上透明指甲油，避免 mounting buffer 蒸發，玻片也保存在閉光環境以供雷射共軛焦顯微鏡觀察。

## 4.蛋白質萃取與定量

### A.蛋白質萃取

將藥物處理後的細胞樣品，移除培養液後使用 PBS 清洗一次，加入適量的 RIPA buffer ( 20 mM Tris-HCL(pH 7.5), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 μg/mL leupeptin )，充分覆蓋後放入 4°C 冰箱中 5 min。以細胞刮勺 (scraper)刮起細胞與蛋白，並將含有細胞與蛋白的 RIPA buffer 放入 eppendorf，以 13,000 rpm 離心 30 min。再將上清液取出移入另一個新的 eppendorf 中，接著保存於-20°C 冰箱中存放，待後續的蛋白質定

量實驗。

## B. 蛋白質定量

利用 Bradford 的原理，在 96-well plate 中各孔加入 300 $\mu$ l Coomassie Blue (Bio-Rad protein assay, Coomassie® Brilliant Blue G-250 dye 1:4 ddH<sub>2</sub>O 稀釋)。接著取出保存於-20°C 冰箱的蛋白樣品取出回溶，並使用已知的濃度的標準訂量品，蛋白質牛血清蛋白(BSA ;Bovine serum Albumin; 2000  $\mu$ g/mL)(Albumin Standard, Thermo #23209) 回溶後配製標準蛋白質，以 PBS 作倍率稀釋配置 1000、500、250、125、62.5  $\mu$ g/mL 等不同濃度的標準蛋白質。

接著將標準蛋白質定量品以 4  $\mu$ L 加入，而實驗蛋白質樣品以 1  $\mu$ L 加入。充分混勻後避光反應 10min，以連續性波長酵素免疫分析儀 ( $\mu$ Quant) 測量，用 OD<sub>595</sub> 的吸光值。接著以標準蛋白質定量品的吸光值製作出標準曲線，後換算樣品的蛋白質濃度。

## 5. 十二烷基硫酸鈉—聚丙烯醯胺膠體電泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis , SDS-PAGE)

<b>Separating gel</b>	<b>12%</b>	<b>Stacking gel</b>	<b>5%</b>
ddH <sub>2</sub> O	2.69 mL	ddH <sub>2</sub> O	1.17 $\mu$ L
1.5M Tris-HCL	2.00 mL	1.5M Tris-HCL	500 $\mu$ L
30% acrylamide (1:29)	3.20 mL	30% acrylamide (1:29)	333 $\mu$ L
10%SDS	80 $\mu$ L	10%SDS	20 $\mu$ L
10%APS	50 $\mu$ L	10%APS	20 $\mu$ L
TEMED	9 $\mu$ L	TEMED	3 $\mu$ L

## A. 制備膠體

使用 Science(CBS)系統膠體製備裝置，依成份表配置 12%的分離膠 (separating gel)置入 CBS 系統膠體製備裝置中，並在上層加入異丙醇 (isopropanol) 使分離膠表層平整。在分離膠凝固後將上層的異丙醇移除並吸乾，接著依成分表配置 5%的聚集膠(stacking gel)，並將它置入膠體製備裝置中的上層後插入齒梳。等待膠體完全凝固，將電泳緩衝液(running buffer)加入直立式電泳槽，後將膠體組裝至電泳槽並避免氣泡殘留底部，再將電泳緩衝液蓋過齒梳接著把齒梳拔除便完成膠體製作。

## B. 蛋白質樣品制備與置入

將定量好的蛋白樣品於-20°C 冰箱取出，取用一定量的樣品與 3×的 sample buffer (350 mM Tris-HCl, pH 6.8; 12% SDS; 0.02% bromophenol blue; 35% glycerol; 30% β-mercaptoethanol)均勻混和。接著利用乾浴槽以 95°C 加熱 5 min；然後將樣品逐一置入分離膠中的 well 裡，並加入蛋白質分子量的標記蛋白 (prestained molecular weight markers, Infiniton EZColor II™, IN1125)。

## C. 膠體電泳

利用電源線將電源供應器與直立式電泳槽連接，將負極電源線(黑色)接至上方，正極源線(紅色)接至下方，以電流方向負到正向下電泳，

先以 30 V 的電壓 20-30 min 使蛋白樣品聚集在聚集膠底部，再以 120 V 的電壓 60 min 進行分離膠的電泳，進行分離後，即完成電泳。

## **6. 西方轉漬法**

### **A. 轉漬準備**

準備濾紙，以及與膠體大小相似的聚二氟乙烯膜(PVDF: Pall Corporation)或硝化纖維膜(nitrocellulose membrane, NC membrane; Pall Corporation)，其中 PVDF 須以 100% 的甲醇於室溫下浸潤活化不超過 20 min，濾紙與海綿再轉漬前須先以 transfer buffer 浸潤後再進行轉漬。

### **B. 置轉漬槽(transfer unit)與轉漬**

取出 SDS-PAGE 後將多餘膠體切除後，從轉漬板夾(transfer pads)負極端，依序疊上海綿、濾紙 1 張、膠體、代轉漬的膜、濾紙 1 張、海綿。將轉漬板夾夾緊組成轉漬三明治(transfer sandwich)。將轉漬三明治放入轉漬槽(HOEFER; Amersham Pharmacia)後裝填八分滿的轉漬緩衝液(blotting buffer)進行轉漬，以 80 V 的固定電壓轉漬 50 min，轉漬完畢後便可以利用冷光儀(LAS3000, Fuji Film)中的 GFP 螢光影像呈像。

### **C. Blocking 與免疫轉漬(immunoblot)**

使用 PBS-T (含 0.05% Tween-20 的 PBS)搖晃清洗 5min 後以 5% 的

blocking buffer (5% skim milk 的 PBS-T) 浸泡轉漬後的轉漬膜，用來蓋掉轉漬膜上非專一性的空白區域，在室溫下搖晃浸泡 1 小時，接著利用 PBS-T 搖晃清洗 3 次，每次 5 min，之後加入適當稀釋倍率的一級抗體(primary antibody)，依需求短時間放在室溫下 1 到 4 小時不等，長時間放入 4°C 冰箱中 16 小時至 3 天不等。一級抗體反應後，利用 PBS-T 搖晃清洗 3 次，每次 5 min，接續加入以 1:3,000 稀釋的二級抗體(secondary antibody) 室溫下反應 1 小時。再以 PBS-T 搖晃清洗 3 次，每次 5min 後加入 Immobilon™ western chemiluminescent HRP substrate (Millipore) (luminal reagent : peroxide solution = 1 : 1)，均勻覆蓋在轉漬膜上，再以冷光儀(LAS3000, Fuji Film)中的可見光與冷光影像呈像。

#### **D. Stripping**

呈像後的轉漬膜會以 stripping buffer (0.78 mL  $\beta$ -mercaptoethanol ; 20 mL 10%SDS ; 12.5 mL 0.5 M Tris-HCl ; 加水至 100 mL) 清除抗體與 ECL，於 57°C 下作用 40 min。之後便可以重新進行 Blocking、免疫轉漬與呈像。

### **伍、研究結果**

#### **1. 鑑定分子化合物能促進細胞自噬**

將各式小分子的化合物後溶入脂溶性介質 DMSO 中。利用

doxycycline 誘導表達出不同長度 polyQ-EGFP 基因的細胞，再將藥物處理在神經瘤母轉殖細胞中，進行篩選。lysoTracker 是一種標定紅色螢光的鹼性胺基酸，會堆積在 autolysosome 的酸性區域，故利用溶酶體染劑 LysoTracker 作為篩選的指標。利用誘導四天不同長度 polyQ-EGFP 的細胞，以 5、10 及 20  $\mu$ M 藥物濃度處理 48 小時。首先利用流式細胞儀鑑定能使 lysoTracker 螢光量提高，使螢光量提高的分子化合物分別為 compound A、B 與 C (Figure 1A) 而 compound A 螢光強度上升 1.2 倍，compound B 螢光強度上升 1.3 倍，compound C 螢光強度上升 1.7 倍。compound A 是實驗室尚未發表篩選出透過細胞自噬清除 polyQ 聚集的藥物，作為本實驗的控制組。而本論文先以 compound C 為主，並與 compound A 作比較，例如：細胞自噬的相關分子機制。表現不同長度 polyQ 細胞包括 Q36、61 及 79。當加入不同藥物濃度處理之後，隨著藥物濃度增加而螢光圖譜也隨著上升向右方(強螢光)移動(Figure 1B)，以 20 $\mu$ M compound C 處理 48 小時，Q36 螢光強度增加 1.4 倍，Q61 螢光強度增加 1.8 倍，Q79 螢光強度增加 1 倍。利用螢光平均值的數值作統計，發現會隨著藥物濃度增加同時螢光值也會隨著增加並經統計後達到了統計上的差異(Figure 1C)。因此我們確認此新藥物能有效地增加不同長度的 polyQ 細胞中的 autolysosome。

## 2. 在 polyQ 細胞經藥物處理後會增加細胞自噬分子相關蛋白

透過西方墨點法觀察 compound C 藥物處理後可以增加細胞自噬的分子。誘導 4 天 polyQ-EGFP 的細胞，以藥物處理 48 小時，再由 LC3 抗體可以篩選出來藥物在 polyQ-EGFP 的細胞中可以活化 LC3-I 轉換成 LC3-II (Figure2A)，在 20 $\mu$ M compound C 處理 48 小時，LC3-I 轉換成 LC3-II 增加 2 倍。同時進行統計並在統計上達顯著差異(Figure2B)。另外藥物處理後也可以增強其他細胞自噬相關蛋白的反應，包括 autophagosome 的核心蛋白 Beclin 1 (Figure2A)增加了 2.5 倍。因此更加確認在長鏈的 polyQ 細胞處理 compound C 能增加自噬在分子層面上相關蛋白反應。

## 3. Compound C 可以增加細胞自噬的證據

將神經纖維瘤母細胞 (SK-N-SH) 轉染 EGFP- LC3 以進行不同藥物濃度處理 48 小時後，使用 lysotracker 染色，再利用共軛焦顯微鏡進行觀察。實驗可以看到當加入不同藥物濃度處理後 EGFP- LC3 puncta 會隨著藥物濃度增加而上升，同時酸性液胞 lysosome 的指標 lysotracker 染色程度也會增加，此外也可以看到 EGFP- LC3 puncta 與 lysotracker 雙重指標所代表的 autolysosome，也會隨著藥物添加後明顯增加(Figure3A)。另外利用誘導四天 79Q-EGFP 的細胞處理不同藥物濃度 48 小時後，以 anti-LC3 標定 autophagosome，並接上會有 TRITC

結合的二級抗體之後，做成玻片，以共軛焦顯微鏡觀察。實驗結果可以看出誘導表現 Q79 的穩定細胞株會因為藥物處理濃度的增加而讓 autophagosome 的數目會更多(Figure3B)。

#### 4. 藥物處理清除 polyQ 的聚集

透過 western blotting 觀察 insoluble form 的 polyQ 蛋白在細胞中聚集，在加入不同濃度的藥物處理後細胞，是否因細胞自噬增加而降低。以誘導表現的 polyQ 穩定細胞株中處理 compound C 48 小時之後，收取蛋白質作 western blotting 分析。由 stacking gel interface 可以看到 79Q-EGFP 高分子有明顯聚集，但隨藥物處理濃度的增加，被清除 insoluble form 的聚集下降 50%，然而 soluble form 的 polyQ 卻會因為藥物處理而增加 70%(Figure4A)。因此推測 autophagy 除了降解 insoluble form polyQ 外，另外 soluble form polyQ 也會增加。

#### 5、藥物處理可以清除堆積的多甈醯胺酸

利用誘導四天 polyQ-EGFP 的細胞，以 5、10 和 20  $\mu\text{M}$  不同濃度處理 48 小時後利用螢光顯微鏡觀察(Figure5A)，計算每 500 個有 79Q-EGFP 表現的細胞具有聚集的細胞數目。並與 DMSO 的控制組為基準，觀察加藥組的聚集比例上是否減少。發現 compound C 能隨濃度增加而增加消除聚集的數量，並且有顯著差異其中在 5 $\mu\text{M}$  處理後 polyQ 聚

集下降接近 50% (Figure5B)。

## 6.利用細胞自噬抑制劑證明藥物透過促進細胞自噬去清除 polyQ 聚集

PolyQ 聚集的清除有可能是藉由其他路徑達成，例如:UPS 系統。因此利用細胞自噬抑制劑阻斷 compound C 的能力，因抑制劑使藥物所帶來的清除能力下降，確定清除 polyQ 聚集的能力是來至於增強 autophagy 的能力。使用誘導四天 polyQ-EGFP 的細胞，以 20  $\mu$ M 細胞自噬抑制劑—3-MA 及 0.5 nM Bafilomycin A1 作用 24 小時後移除，再加入 20  $\mu$ M 藥物處理 48 小時後利用螢光顯微鏡觀察量(Figure6A)，比較只有藥物處理和同時在以抑制劑處理再進行藥物處理兩組之間的差異，發現抑制劑處理後藥物效力下降，polyQ-EGFP 的堆積物上升，量化後也具統計意義(Figure6B)。表示藥物透過誘導細胞自噬而達到減少 polyQ-EGFP 的堆積物的效果。

## 7.藥物對細胞存活率的影響

細胞存活率對藥物是個很重要的，我們利用 PI 染色方法來確認藥物沒有毒性使細胞造成凋亡。在細胞加入 PI 染劑，PI 不能穿透完整細胞膜，而壞死細胞由於失去膜的完整性，PI 可進入細胞內與 DNA 結合，依據此特點，使用 PI 染色可鑑定死細胞。將細胞誘導後並經藥物處理後利用流式細胞儀程式(cell Quest Pro)分析，染劑無法穿透

細胞膜，代表藥物處理在不同長度 polyQ-EGFP 的細胞中能有效幫助細胞存活。

## 8. 藥物減少細胞核內 polyQ 聚集

以 5、10 和 20  $\mu\text{M}$  不同濃度處理 48 小時後，透過螢光顯微鏡觀察 Q79 細胞內 polyQ-EGFP 分布情況，發現 insoluble form 的 polyQ 蛋白在細胞質與細胞核有顯著下降(Figure8A)。另外透過 western blotting 也發現 insoluble form 的 polyQ 蛋白在細胞核的表現有顯著下降(Figure8B)。

## 陸、討論

本研究希望透過藥物誘導細胞自噬減少擴增PolyQ 蛋白的堆積。實驗以flow cytometry 進行第一步的篩選，以多種化合物處理Q36、Q61及Q79 細胞株後，觀察lysotracker的紅色螢光(42)。利用compound A 作為本實驗的控制組，由lysotracker紅色螢光結果顯示，compound C處理後，細胞中的lysosome確實增加和compound A有相似結果(Figure1)。研究結果顯示藥物誘導的細胞自噬LC3-II會明顯增加，我們在Western blot 與螢光顯微鏡觀察compound C會增加LC3-II表現量達50%(Figure2,3)。前文提及細胞自噬形成初期Vps34會與Beclin-1結合參與自噬小體雙層膜的形，本實驗結果Beclin-1的表現量與控制組相比增加2.5倍，結果在Western blot中發現compound C會增加

Beclin-1的表現量與控制組compound A 結果相似(Figure2)。

在某些神經變性疾病中有研究顯示細胞會透過細胞自噬清除polyQ聚集，然而透過螢光顯微鏡觀察加入compound C有明顯使polyQ聚集減少(Figure5)。要進一步確認我們的藥物與細胞自噬的關係，加入compound C與細胞自噬的抑制劑，數據顯示當細胞加入compound C與細胞自噬的抑制劑處理後，清除polyQ聚集能力有下降趨勢，可以確認我們藥物compound C是高度敏感的自噬調節劑(Figure.6)。藥物是否具毒性是一個很重要的問題，實驗利用流式細胞儀分析可以發現compound C處理下不會導致細胞死亡(Figure7)，代表compound C有效幫助細胞存活。有研究指出當細胞核累積大量的多麩醯胺酸重複序列蛋白導致轉錄失活(43)，因此想探討compound C是否可清除細胞核累積的多麩醯胺酸重複序列蛋白，首先，透過螢光顯微鏡觀察，當加入compound C 確認polyQ聚集在細胞核的程度有dose-dependent下降並沒有顯著差異，進一步透過 western blot 確認，藥物使細胞核的insoluble form的polyQ蛋白有下降(Figure8)。有研究指出細胞內含有Xpo1基因蛋白可將細胞核內insoluble form的polyQ蛋白游離到細胞質(43)。因此推測我們的藥物可以促進Xpo1基因將細胞核內insoluble form的polyQ蛋白清除，堆積在細胞質的insoluble form的polyQ蛋白可透過細胞自噬清除。未來可以進一步利用western blot 確認藥物是透

過mTOR dependent或mTOR independent 路徑去促進細胞自噬。

## 柒、参考文献

1. Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience* **30**, 575-621
2. Huang, C. C., Faber, P. W., Persichetti, F., Mittal, V., Vonsattel, J. P., MacDonald, M. E., and Gusella, J. F. (1998) Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somatic cell and molecular genetics* **24**, 217-233
3. Semaka, A., Creighton, S., Warby, S., and Hayden, M. R. (2006) Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clinical genetics* **70**, 283-294
4. Langbehn, D. R., Hayden, M. R., and Paulsen, J. S. (2010) CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* **153b**, 397-408
5. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., and Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science (New York, N.Y.)* **277**, 1990-1993
6. Wellington, C. L., Brinkman, R. R., O'Kusky, J. R., and Hayden, M. R. (1997) Toward understanding the molecular pathology of Huntington's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **7**, 979-1002
7. Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H., and Wanker, E. E. (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549-558
8. Shao, J., and Diamond, M. I. (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human molecular genetics* **16 Spec No. 2**, R115-123
9. Cortes, C. J., and La Spada, A. R. (2014) The many faces of autophagy dysfunction in Huntington's disease: from mechanism to therapy. *Drug discovery today*
10. Imai, Y., Soda, M., Murakami, T., Shoji, M., Abe, K., and Takahashi, R. (2003) A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* **278**, 51901-51910
11. Mattson, M. P., LaFerla, F. M., Chan, S. L., Leissring, M. A., Shepel, P. N.,

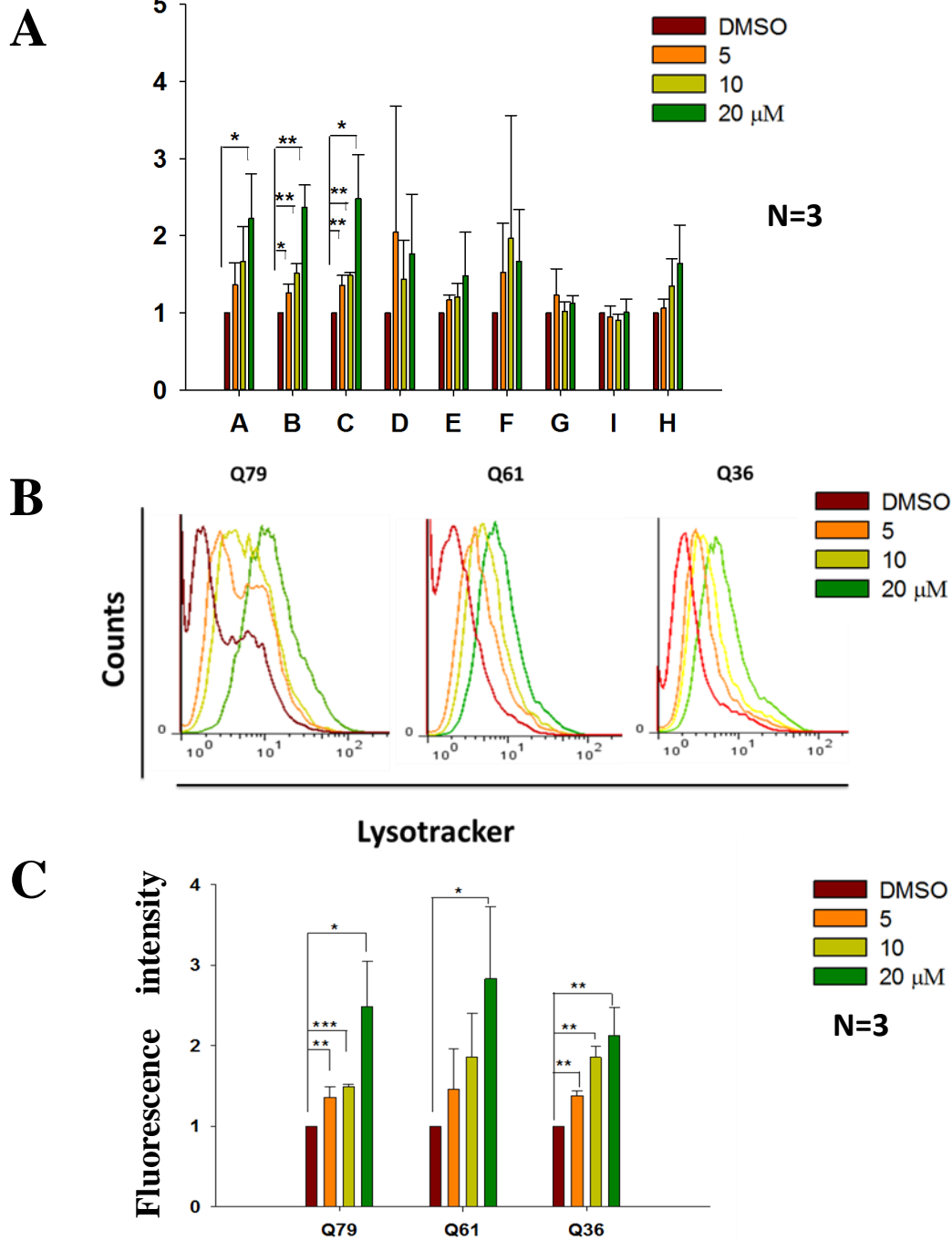
- and Geiger, J. D. (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences* **23**, 222-229
12. Ryu, E. J., Harding, H. P., Angelastro, J. M., Vitolo, O. V., Ron, D., and Greene, L. A. (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 10690-10698
  13. Emili, A., Greenblatt, J., and Ingles, C. J. (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Molecular and cellular biology* **14**, 1582-1593
  14. Dunah, A. W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y. M., Standaert, D. G., Hersch, S. M., Mouradian, M. M., Young, A. B., Tanese, N., and Krainc, D. (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 2238-2243
  15. Chen-Plotkin, A. S., Sadri-Vakili, G., Yohrling, G. J., Braveman, M. W., Benn, C. L., Glajch, K. E., DiRocco, D. P., Farrell, L. A., Krainc, D., Gines, S., MacDonald, M. E., and Cha, J. H. (2006) Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease. *Neurobiology of disease* **22**, 233-241
  16. Nucifora, F. C., Jr., Sasaki, M., Peters, M. F., Huang, H., Cooper, J. K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V. L., Dawson, T. M., and Ross, C. A. (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science (New York, N.Y.)* **291**, 2423-2428
  17. Sugars, K. L., Brown, R., Cook, L. J., Swartz, J., and Rubinsztein, D. C. (2004) Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 4988-4999
  18. Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N., and Krainc, D. (2006) Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* **127**, 59-69
  19. McConoughey, S. J., Basso, M., Niatetskaya, Z. V., Sleiman, S. F., Smirnova, N. A., Langley, B. C., Mahishi, L., Cooper, A. J., Antonyak, M. A., Cerione, R. A., Li, B., Starkov, A., Chaturvedi, R. K., Beal, M. F., Coppola, G., Geschwind, D. H., Ryu, H., Xia, L., Iismaa, S. E., Pallos, J., Pasternack, R., Hils, M., Fan, J., Raymond, L. A., Marsh, J. L., Thompson, L. M., and Ratan,

- R. R. (2010) Inhibition of transglutaminase 2 mitigates transcriptional dysregulation in models of Huntington disease. *EMBO molecular medicine* **2**, 349-370
20. Lee, J., Kim, C. H., Simon, D. K., Aminova, L. R., Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Murphy, A. N., Lonze, B. E., Kim, K. S., Ginty, D. D., Ferrante, R. J., Ryu, H., and Ratan, R. R. (2005) Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *The Journal of biological chemistry* **280**, 40398-40401
  21. Shirendeb, U., Reddy, A. P., Manczak, M., Calkins, M. J., Mao, P., Tagle, D. A., and Reddy, P. H. (2011) Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Human molecular genetics* **20**, 1438-1455
  22. Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Masliah, E., Ellisman, M., Rouiller, I., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., Perkins, G., and Bossy-Wetzel, E. (2011) Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature medicine* **17**, 377-382
  23. Kim, J., Moody, J. P., Edgerly, C. K., Bordiuk, O. L., Cormier, K., Smith, K., Beal, M. F., and Ferrante, R. J. (2010) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Human molecular genetics* **19**, 3919-3935
  24. Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D., and Beal, M. F. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of neurology* **41**, 646-653
  25. Pandey, M., Varghese, M., Sindhu, K. M., Sreetama, S., Navneet, A. K., Mohanakumar, K. P., and Usha, R. (2008) Mitochondrial NAD<sup>+</sup>-linked State 3 respiration and complex-I activity are compromised in the cerebral cortex of 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* **104**, 420-434
  26. Seong, I. S., Ivanova, E., Lee, J. M., Choo, Y. S., Fossale, E., Anderson, M., Gusella, J. F., Laramie, J. M., Myers, R. H., Lesort, M., and MacDonald, M. E. (2005) HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Human molecular genetics* **14**, 2871-2880
  27. Watson, L. M., Scholefield, J., Greenberg, L. J., and Wood, M. J. (2012) Polyglutamine disease: from pathogenesis to therapy. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* **102**, 481-484

28. Renna, M., Jimenez-Sanchez, M., Sarkar, S., and Rubinsztein, D. C. (2010) Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases. *The Journal of biological chemistry* **285**, 11061-11067
29. Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., Zhu, H., Yu, A. D., Xie, X., Ma, D., and Yuan, J. (2007) Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19023-19028
30. Kourtis, N., and Tavernarakis, N. (2009) Autophagy and cell death in model organisms. *Cell death and differentiation* **16**, 21-30
31. Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., and Rubinsztein, D. C. (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* **90**, 1383-1435
32. Harris, H., and Rubinsztein, D. C. (2012) Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology* **8**, 108-117
33. Taylor, J. P., Hardy, J., and Fischbeck, K. H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 1991-1995
34. Riley, B. E., and Orr, H. T. (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes & development* **20**, 2183-2192
35. Lemasters, J. J. (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research* **8**, 3-5
36. Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* **10 Suppl**, S10-17
37. Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 101-112
38. Metcalf, D. J., Garcia-Arencibia, M., Hochfeld, W. E., and Rubinsztein, D. C. (2012) Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration. *Experimental neurology* **238**, 22-28
39. Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F. M., Oroz, L. G., Underwood, B. R., Pangalos, M. N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B. O., O'Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2006) Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human molecular genetics* **15**, 433-442

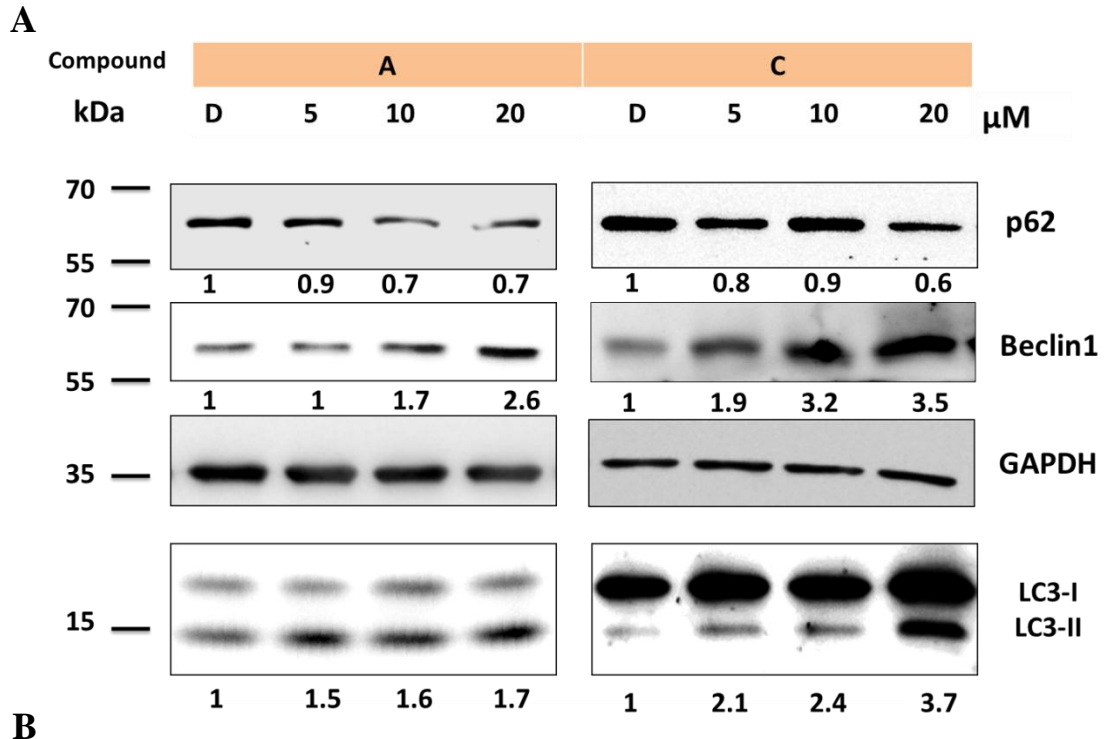
40. Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2006) Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Human molecular genetics* **15**, 1209-1216
41. Sarkar, S., Ravikumar, B., Floto, R. A., and Rubinsztein, D. C. (2009) Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell death and differentiation* **16**, 46-56
42. Chikte, S., Panchal, N., and Warnes, G. (2014) Use of LysoTracker dyes: a flow cytometric study of autophagy. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **85**, 169-178
43. Chan, W. M., Tsoi, H., Wu, C. C., Wong, C. H., Cheng, T. C., Li, H. Y., Lau, K. F., Shaw, P. C., Perrimon, N., and Chan, H. Y. (2011) Expanded polyglutamine domain possesses nuclear export activity which modulates subcellular localization and toxicity of polyQ disease protein via exportin-1. *Human molecular genetics* **20**, 1738-1750

捌、圖示

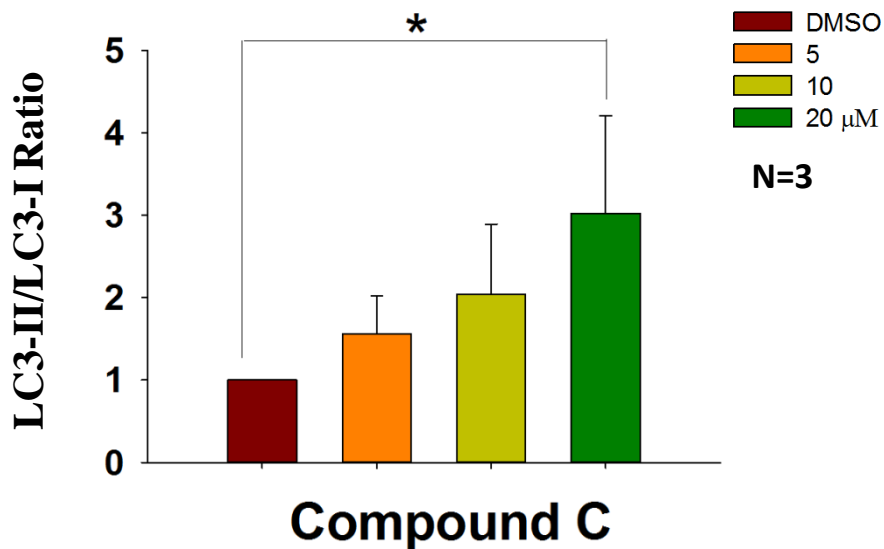


**Fig 1. 篩選出藥物 Compound C 會誘導 autolysosome 的形成。**

使用 Q36、61 與 79 的穩定細胞株，doxycycline 誘導四天，藥物處理 5、10、20 μM，流式細胞儀(cell Quest Pro)觀察 lysotracker 染色。**A.**透過 lysotracker 篩選藥物 **B.** compound C 誘導 autolysosome 使螢光光譜向右增強。**C.**以平均值進行統計隨著 compound C 濃度上升而 autolysosome 也 dose-dependent 上升(Y 軸以 DMSO 為參考的螢光強度相對值)(student's *t*-test; N=3; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  ).

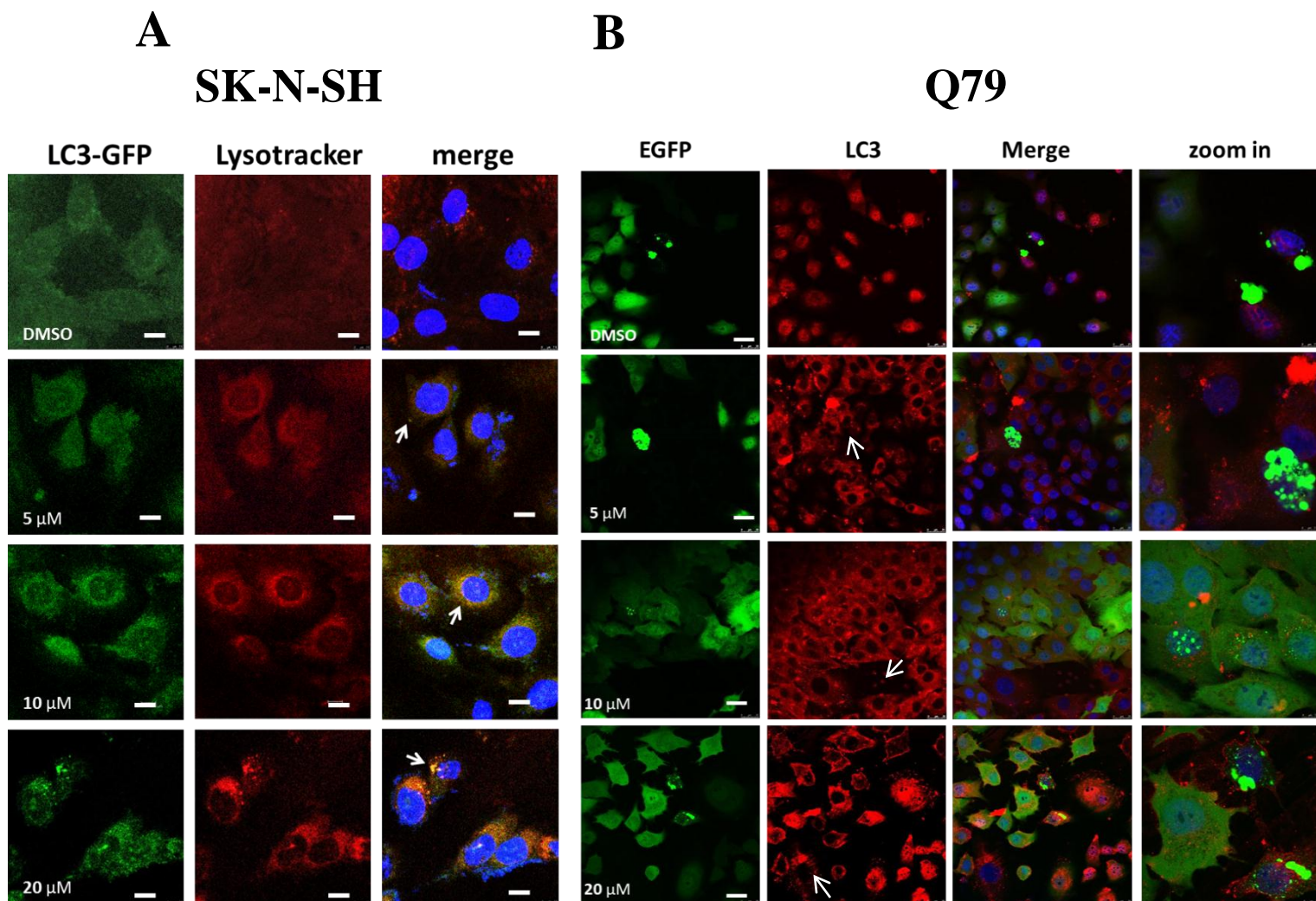


**B**



**Fig 2. Compound C 能增加自噬相關蛋白的增加**

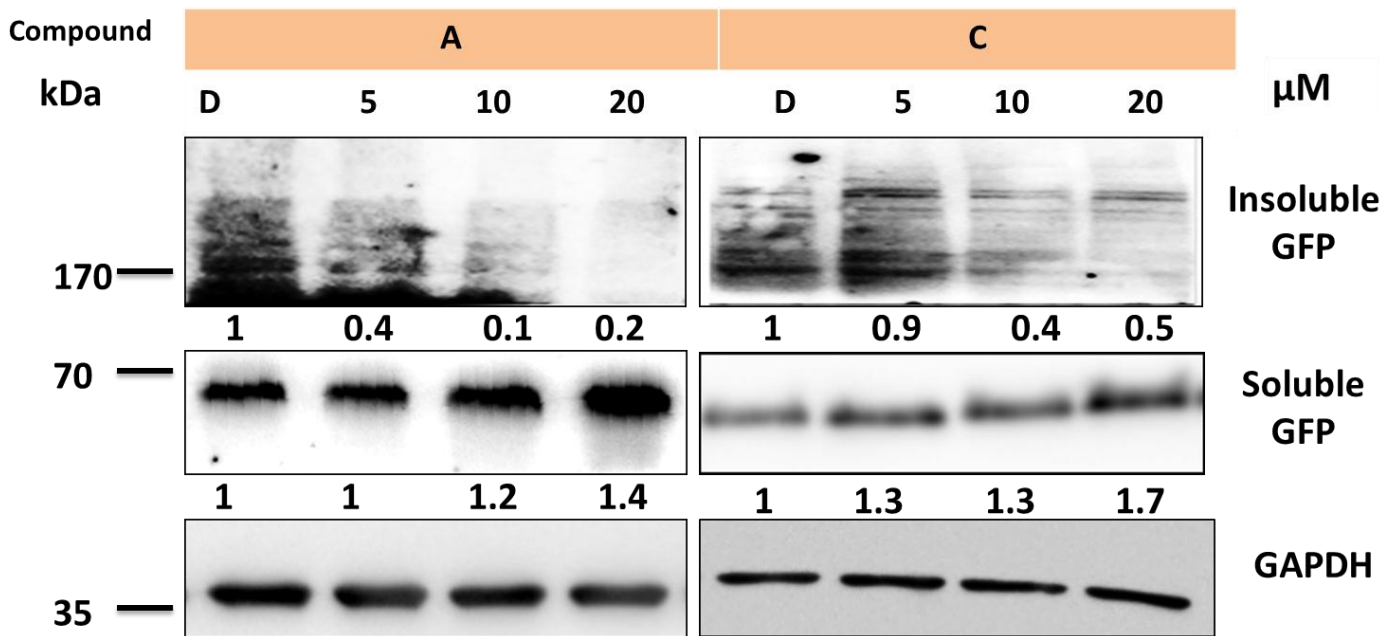
使用 Q79 的穩定細胞株，doxycycline 誘導四天，藥物處理 5、10、20  $\mu\text{M}$ ，再抽蛋白進行 Western blot。A.在 Q79 的穩定細胞株，compound C 誘導自噬相關蛋白的增加，Beclin1 上升與 LC3I 轉換 LC3II 的轉換率上升。B.以 western 定量進行統計 (利用 DMSO(D)做為控制組)。(student's *t*-test;  $N=3$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



### Fig 3. Compound C 能影響誘導自噬相關蛋白

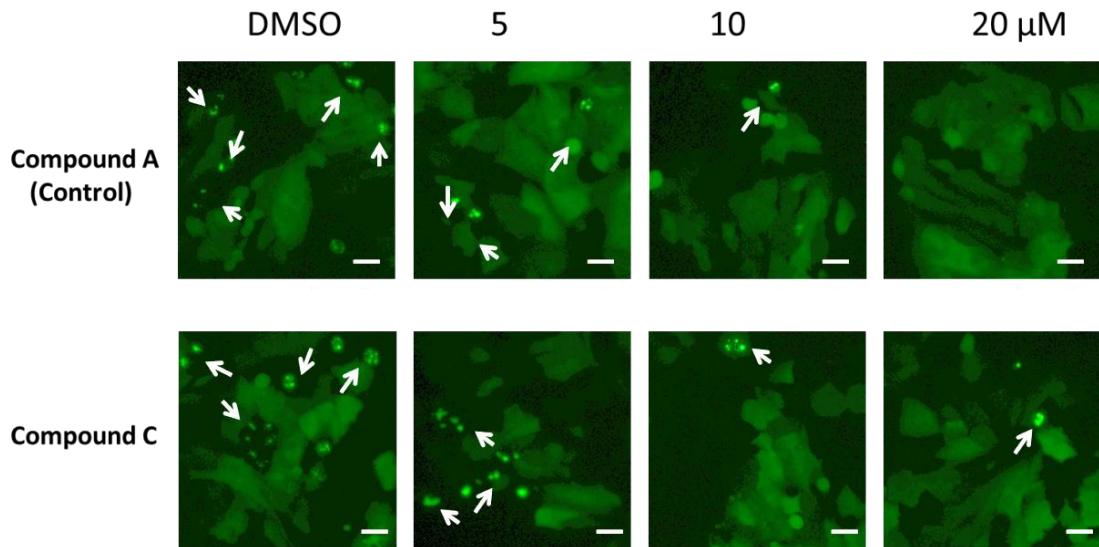
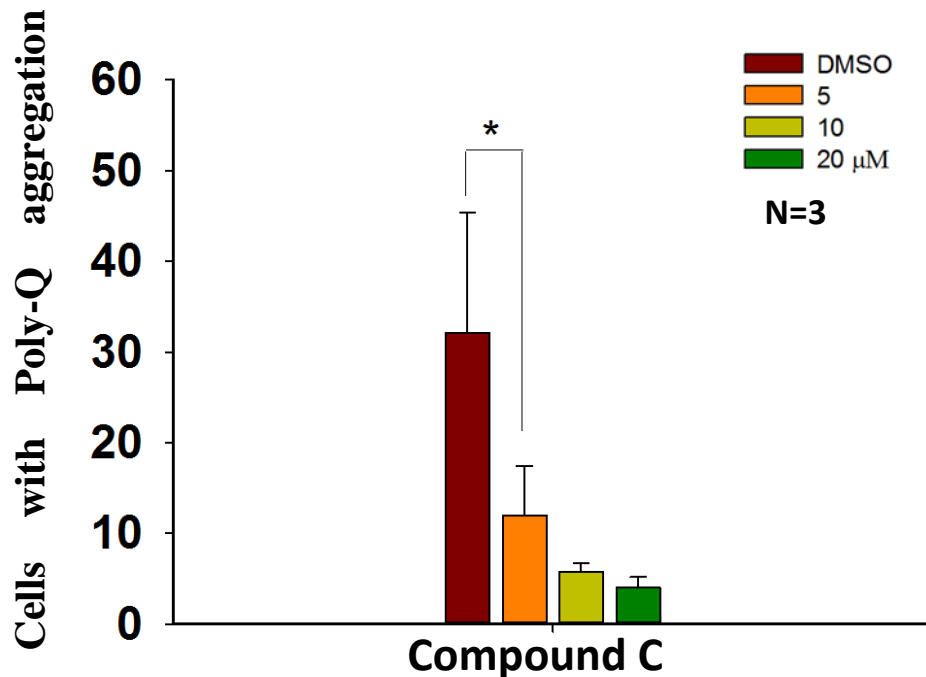
在 SK 及 Q79 的穩定細胞株，doxycycline 誘導四天，藥物 5、10、20  $\mu$ M 處理 48 小時，進一步以螢光顯微鏡觀察。A.以螢光顯微鏡觀察，加入 compound C 誘導 autolysosome 上升，lysotracker 所標定的 lysosome(紅色)、LC3-EGFP(綠色)與雙重標定的 autolysosome 都有隨著藥物濃度上升 dose-dependent 上升。(scale bar, 10  $\mu$ m.) B.經 compound C 處理後，細胞標定 anti-LC3(紅色)的 autolysosome 有隨著藥物處理而上升。(scale bar, 25  $\mu$ m.)

A



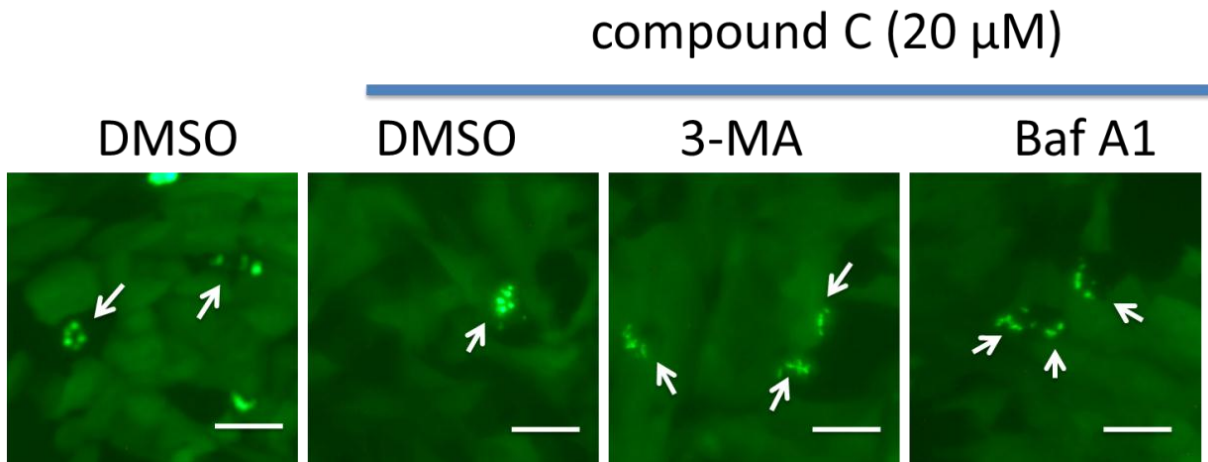
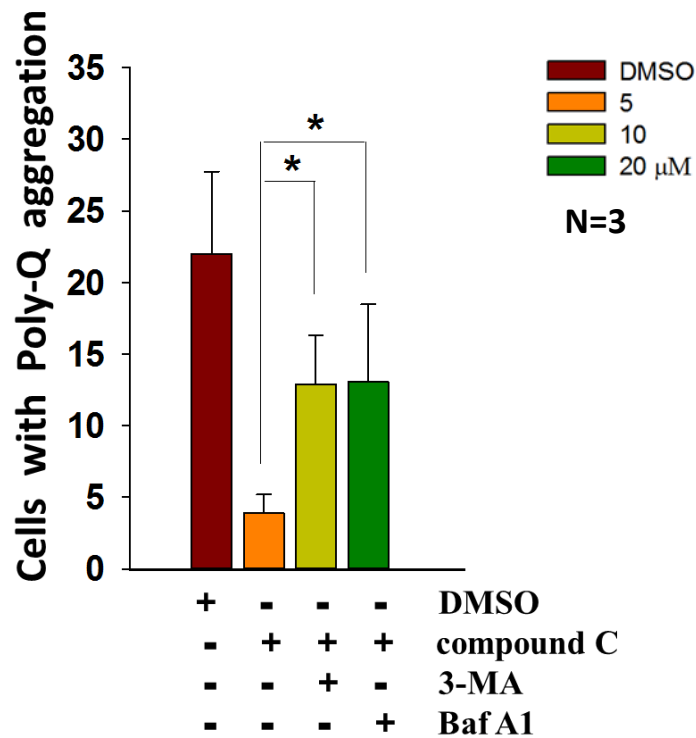
**Fig 4. 利用 Western blot 中的結果證實 Compound C 可以清除 polyQ 蛋白質的聚集**

利用 Q79 的穩定細胞株，先以 doxycycline 誘導四天後，加入藥物 5、10、20 μM 處理 48 小時，再萃取蛋白進行 Western blot。A. Q79 細胞株，隨著 compound C 藥物濃度增加會逐漸清除 polyQ 的聚集效果也愈見明顯，另外藥物並不影響一般蛋白的 soluble form 表現或者會增加 soluble form 表現量。(實驗以 GAPDH 作為 loading control)

**A****B**

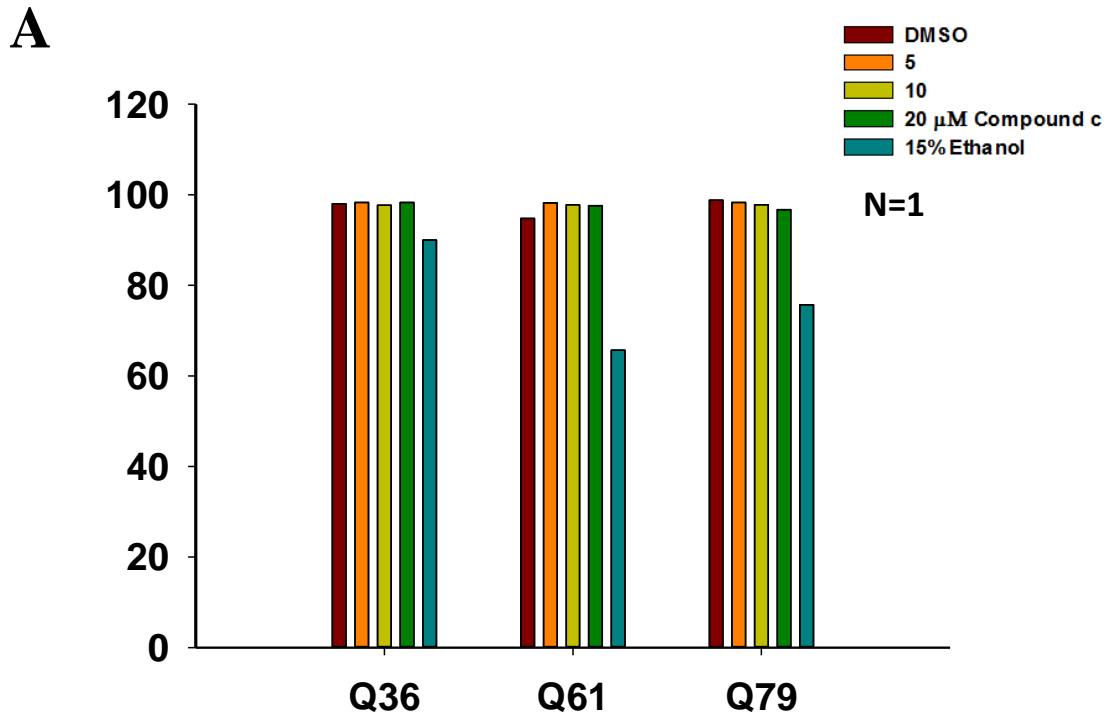
**Fig.5 經螢光顯微鏡確認 Compound C 可以清除堆積的多麩醯胺酸**

使用 Q79 的穩定細胞株，doxycycline 誘導四天，藥物 5、10、20 μM 處理 48 小時。A.隨著 compound C 濃度上升，PolyQ 聚集減少。(scale bar, 10 μm.) B.以計算 500 個有 PolyQ-EGFP 表現的細胞中有幾個細胞表現聚集小體(綠色小點)進行統計。compound C 濃度上升會使聚集小點下降，並且達到顯著差異。(student's t-test; N=3; \*p< 0.05, \*\*p< 0.01, \*\*\*p< 0.001 ).

**A****B**

**Fig.6 Autophagy 抑制劑能阻斷 compound C 清除 polyQ 的能力**

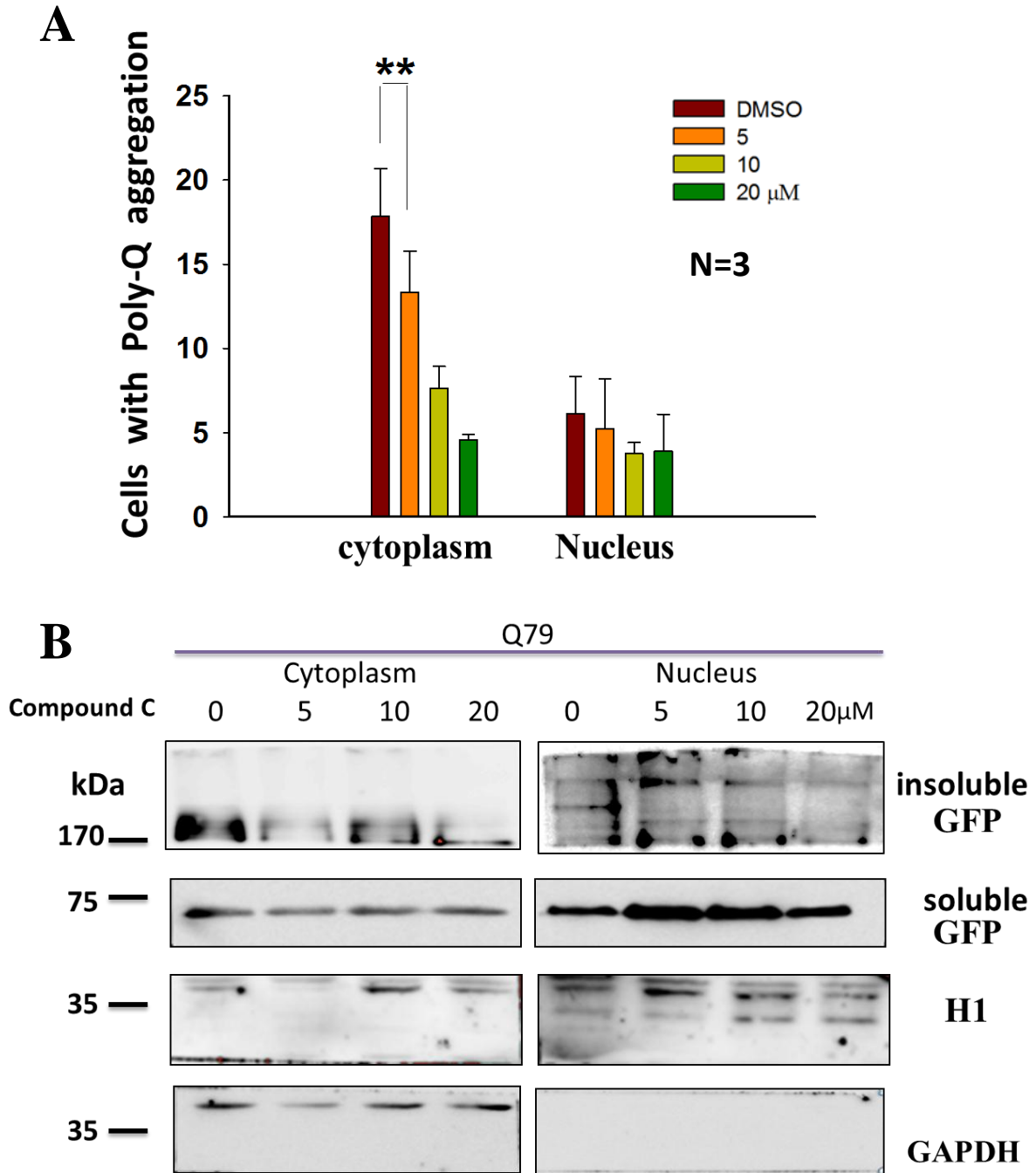
使用 Q79 的穩定細胞株，doxycycline 誘導四天，分別加入細胞自噬抑制劑—3-MA 及 0.5nM Bafilomycin A1 作用 24 小時後移除，再以藥物濃度 20  $\mu$ M 處理 48 小時。A.加入 Autophagy 抑制劑，明顯使 PolyQ 聚集增加。(scale bar, 10  $\mu$ m.) B.以計算 500 個有 PolyQ-EGFP 表現的聚集小體(綠色小點)，當加入 Autophagy 抑制劑，PolyQ-EGFP 表現的聚集小體有明顯上升，經統計有顯著差異。(student's t-test; N=3; \*p< 0.05, \*\*p< 0.01, \*\*\*p< 0.001 ).



**Fig 7. 藥物不會影響細胞存活率**

使用 Q36、61 與 79 的穩定細胞株，doxycycline 誘導四天，藥物處理 5、10、20  $\mu$ M，使用流式細胞儀(cell Quest Pro)分析觀察細胞存活率。

A.加入 compound C 在不同長度 polyQ-EGFP 的細胞中，並沒有影響細胞存活率。



**Fig 8. Compound C 透過細胞自噬作用將 polyQ 聚集體分布改變**

使用 Q 79 的穩定細胞株，doxycycline 誘導四天，藥物 5、10、20 μM 處理 48 小時，透過 Western blot 及螢光顯微鏡觀察 polyQ-EGFP 的堆積物分布。A.利用螢光顯微鏡觀察，計算每五百個表現綠色螢光的細胞中，polyQ-EGFP 的堆積物數量及細胞質與細胞核的分布(student's t-test; N=3; \*p< 0.05,\*\*p< 0.01, \*\*\*p< 0.001)。B.透過 Western blot 發現，隨著 compound C 藥物濃度增加，也會清除細胞核內 polyQ 的聚集。(實驗以 GAPDH 作為細胞質 loading control, H1 作為細胞核 loading control)

## **2. 鑑定具有清除肝癌類幹細胞潛力的藥物**

**The Identification of Potential Molecules to  
Eliminate Liver Cancer Stem-Like Cells**

# 目錄

中文摘要	42
英文摘要	43
壹、文獻回顧	45
貳、研究背景	50
參、研究目標	55
肆、研究材料與方法	55
伍、研究結果	59
陸、討論	61
柒、參考文獻	63
捌、圖示	68

## 中文摘要

肝癌是全球排名第三與癌症死亡有關的疾病，雖然手術切除可以提高存活率，但是在術後常發現還是有癌細胞轉移及擴散的現象。癌症幹細胞具有自我更新以及分化能力，認為是造成癌症轉移、復發，對於化療、放射性療法產生抗藥性的主要原因，由於腫瘤細胞亞群可以抵抗藥物毒性導致在癌症病患體內要徹底清除癌細胞是一大挑戰。本論文使用肝細胞株 Huh7 (mutant p53)，HepG2 (wild Type p53)和 Hep3B (p53 null)分別處理 teroxirone 以及各種中藥，觀察細胞型態。實驗首先要培養肝癌類幹細胞，將肝癌細胞培養在不含血清但含有特定生長因子的培養基(DMEM/F12)裡面含鹼性成纖維細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF)，表皮生長因子(epidermal growth factor; EGF)以及 B27，培養 7 天後，將培養出 tumor sphere，實驗以不同濃度的 teroxirone 以及中藥處理進一步利用顯微鏡觀察 spheroid 的生成和大小，並鑑定相關蛋白質變化。目前本研究發現這些藥物會有不同程度降低 tumor sphere 的體積及數目，會進一步會利用癌症標誌物分離肝癌 spheroid 的細胞，未來將具有癌症幹細胞特徵的細胞使用萃取緩衝液萃取出蛋白，再利用西方點墨法觀察幹細胞相關標誌物以及可能的細胞凋亡機制，期望本研究可以利用不同藥物以降低肝癌類幹細胞生長以及有效抑制腫瘤的增生。

關鍵字: 肝癌類幹細胞、夏枯草、teroxirone、鴉膽子、苦蔘

## 英文摘要

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third leading cause of cancer related death in the world. Although surgical resection improves survival, the prognosis of HCC remains unsatisfactory mainly because of frequent intrahepatic spread and extrahepatic metastasis. Cancer stem cells (CSCs) represent a subpopulation of tumor cells endowed with self-renewal and multilineage differentiation capacity. Being considered to cause cancer metastasis, recurrence, for chemotherapy, radiation therapy mainly resistance, there is a major clinical challenges towards the complete eradication of minimal residual disease in cancer patients. The work aimed at liver cancer cells by using cell lines Huh7 (mutant type p53), HepG2 (wild type p53) and Hep3B (p53 null) treating with teroxirone and different Chinese herb medicine. First, the tumor sphere was cultured in media supplemented with B27, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor in ultra-low -attachment surface plate. After 7 days, the formed tumor spheres were treated with different concentrations teroxirone and Chinese herb medicines followed by microscopy to examine spheroid numbers and sizes. The study found that teroxirone and Chinese herb medicines affected tumor sphere size, further use of cancer stem cell markers isolated hepatoma spheroid cells. Next, the cell lysates from the stem cells will be extracted for western blot to study cancer stem cell-related markers and possible cell death mechanisms. Finally, we will check tumor invasion markers. This project is hoped to be useful and these identified drugs are expected to reduce liver cancer stem-like cell proliferation and inhibit tumor growth.

Keywords: liver cancer stem-like cell · teroxirone · Chinese herb medicines

## 壹、研究目的:

肝癌是全世界第五名常見的癌症和排名第三與癌症死亡有關的疾病，當病人確診發現肝癌，如果是早期肝癌可適用於切除或移植的方式治療，但是如果患者確診時是晚期，導致治療方法有限。雖然治療性療法上可以預防肝癌復發也可以提高病人生存能力，但是肝癌復發率仍是很高。有研究指出癌症類幹細胞也稱為腫瘤起始細胞，因具備有自我更新能力，造成癌症復發、轉移以及放射與化學藥物治療會在不同肝癌亞型中產生抗藥性，因此癌症類幹細胞的發現可以解釋癌症治療後無法消除肝癌腫瘤的原因。所以本研究將建立及鑑定 Huh7、HepG2 和 Hep3B 的類幹細胞(stem-like cell)，分別處理 teroxirone 以及各種中藥，再進一步觀察肝癌幹細胞數量、大小以其相關基因表現改變，包括 Oct4、Nanog、CD133 等，針對這些可能途徑可以有效消滅癌症類幹細胞蔓延。

## 貳、文獻回顧

### 1. 幹細胞

幹細胞的研究是了解從有機體形成單一細胞以及在成年組織中健康細胞如何替換受損的細胞。在每一個器官，幹細胞對正常細胞修復是扮演重要腳色(1)。幹細胞具有不同於其它類型細胞的重要特性：首先具有未特化能力及不具任何組織特異性。第二：幹細胞是一個能長時間持續分裂和更新自己的細胞，當幹細胞自我複製倍增被稱為增殖(proliferation)，因此產生的細胞是非特化。第三：幹細胞可以產生特化細胞，當非特化幹細胞形成特化細胞此過程稱為分化。因此幹細胞具有顯著的潛力發展成許多在體內不同的細胞類型以及可作為對身體一種的修復系統 (59)。

### 2. 癌症類幹細胞

腫瘤類幹細胞首先被發現在造血系統惡性腫瘤中後來在乳腺癌，結腸癌等都有發現腫瘤類幹細胞的存在(2-4)。並且有報導顯示，在人體內與原發腫瘤基因及表型不同的細胞亞群會對化療藥物耐藥性，這些細胞被稱為“腫瘤類幹細胞”。腫瘤類幹細胞具有三個獨特的性質(5)：首先，腫瘤能持續生長的原因之一，是因為癌症類幹細胞具有自我更新的能力(6)，儘管有癌症類幹細胞有自我更新能力但細胞週期與proliferating nonstem cells(SCs)比起來是相對的較長這可歸因於腫瘤

類幹細胞會被停滯在 G<sub>0</sub> 期的檢查點 (check point) 因此導致增殖能力下降(7)。第二，可以利用多種腫瘤類幹細胞相關表面標記來鑑定腫瘤類幹細胞，如 CD133(8)，CD44(9)等以及 Wnt 的活性(10)和 ALDH1 活性(11)，在肝臟中含有 CD133<sup>+</sup>細胞相較於 CD133<sup>-</sup>細胞具有較高增殖力，當細胞含有腫瘤類幹細胞標誌物與 ALDH1，使腫瘤發生肝臟腫瘤類幹細胞排序為 CD133<sup>+</sup>ALDH<sup>+</sup>> CD133<sup>+</sup>ALDH<sup>-</sup>> CD133<sup>-</sup>ALDH<sup>-</sup>(12)。第三，與原腫瘤癌細胞特徵相似的能力，當腫瘤類幹細胞分裂時會產生一個分化細胞及保持相同的屬性的親代細胞作為子細胞。腫瘤類幹細胞會使癌症在治療後復發並且產生抗藥性的主要因素，也很可能是癌症惡性轉移的原因之一並且腫瘤類幹細胞因增殖速率較為緩慢(13)，使細胞處於停止分裂的狀態，並且相較於一般腫瘤細胞的 ABC 運輸蛋白(ATP-binding cassette transporter)的表現量高，導致對化療藥物或放射線產生抗藥性(14)。

### 3.癌症幹細胞相關路徑

#### A.TGF-β pathway

Transforming growth factor beta (TGF-β)家族蛋白是負責控制細胞的生長，分化及細胞凋亡(15)。TGF-β 家族成員主要抑制增殖促進分化來維持正常體細胞功能，但是在癌變中，TGF-β 信號也會增強 Snail 轉錄因子家族成員的表達量來誘導 EMT(16)。近年來研究指出在人類肝癌中來自 TGF-β receptor 的訊息傳遞是較少，在正常組織中會表現

訊號蛋白 TGFBR2(TGF- $\beta$  receptor 2)及 embryonic liver fodrin (ELF) 而肝癌細胞中則不會表現。透過改變 TGF- $\beta$  路徑抑制細胞分化進一步引起肝癌形成 (17)。

## **B.Hedgehog pathway**

Hedgehog (HH)訊號控制著細胞的生長與增殖(18)。有報導指出在肝癌中利用cyclopamine藥物可以抑制Hedgehog訊號路徑，藉由降低DNA合成及抑制細胞生長可顯著減少細胞浸潤(19,20)，因此透過抑制Hedgehog訊號路徑可有效用於癌症的治療(21)。

## **C. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway**

Wnt是參與胚胎發育和癌症的蛋白質的重要路徑，wnt蛋白被認為是與細胞的自我更新能力有關(22)。在肝祖細胞發現Wnt/ $\beta$ -catenin路徑被活化與抗藥性有密切相關(23)。PTEN是癌症中最常見的突變腫瘤抑制因子之一(24)，有研究指出PTEN表現量下降會使p53蛋白過度表達(25)進一步PTEN-Akt會活化幹細胞以調節Wnt/ $\beta$ -catenin的核漿分布(26)，另外有研究指出抑制Wnt/ $\beta$ -catenin路徑會使細胞的自我更新及形成腫瘤能力下降(27)。

肝癌新的治療策略可以藉由觀察參與腫瘤幹細胞的自我更新以及阻斷癌細胞分化的相關訊息途徑，而這些治療的重要步驟是利用調控訊息網絡，如生長因子，生長因子受體或激酶參與細胞週期，細胞存活，

血管生成和轉移。

#### 4.治療癌症幹細胞的方法

##### A. MicroRNAs 與癌症幹細胞

癌症類幹細胞是屬於癌細胞亞群但具有正常幹細胞相關特徵，使細胞轉移或是使癌細胞復發。因此，如果腫瘤類幹細胞被消除，腫瘤細胞會走向細胞凋亡。透過標靶治療腫瘤幹細胞，可以不用切除腫瘤並且防止腫瘤轉移，可有效提升癌症病人的存活率。

有研究指出，在肝癌腫瘤幹細胞可以由數種細胞表面抗原鑑定，如 CD133， CD90， CD44， OV6 和 EpCAM，可在側群中分離出肝癌腫瘤幹細胞(28)。MIR-181 家族會高度表達在胚胎肝和分離出的肝腫瘤幹細胞，並且會增加肝臟的 EpCAM<sup>+</sup>/ AFP<sup>+</sup>使腫瘤具有腫瘤幹細胞特性， (29)，有三個調控 miR-181 的基因分別為 CDX2、GATA6 和 NLK(29)。CDX2 和 GATA6 是轉錄因子與幹細胞特性有關，NLK 會負調控 Wnt/b-catenin 路徑。因此 miR-181 藉由調控幹細胞路徑來抑制腫瘤幹細胞，micro RNA 的優點為小分子可容易通過體液進行運但利用 micro RNA 標定細胞需要大量的樣品及成本較高目前仍是一大挑戰。

##### B.透過誘導分化治療癌症幹細胞

另外有報導提出誘導分化來消除腫瘤幹細胞是治療方案之一，這

種治療策略是迫使腫瘤幹細胞轉移到末端上皮細胞表型，失去自我更新的能力，因此變得脆弱所以較容易治療。這種方法並不直接殺死腫瘤幹細胞，但它可以增加傳統療法在消除腫瘤的效率。近年來，結腸腫瘤幹細胞中 BMP4 蛋白(bone morphogenetic protein 4)被發現可以誘導分化，在結腸癌症幹細胞 BMP4 蛋白可以誘導分化及透過抑制 PI3K/AKT 路徑來減少  $\beta$ -catenin 活性使細胞凋亡(30)。此外在脂肪幹細胞中也發現高劑量的 BMP4 可以誘導含有 CD133<sup>+</sup>肝癌腫瘤幹細胞分化，同時抑制自我更新，化療抗性及腫瘤形成(31)。另外有報導顯示 BMP4 在大鼠肝祖細胞中，可以藉由誘導分化來減少肝癌腫瘤幹細胞，並且高劑量的 BMP4 會減少細胞增殖，在肝癌中低劑量的 BMP4 會增加 CD133<sup>+</sup>的表現量，在肝癌組織中，SMAD6 會抑制 BMP4 增加 CD133 的表現量，利用 MEK 抑制劑活化 Erk1/2 訊號路徑增加 BMP4 減少 CD133 的表現量(32)，綜合所述，研究結果顯示 BMP4 在肝癌形成腫瘤幹細胞過程中可以成為有效的治療藥物。腫瘤幹細胞治療方法到目前為止都具有爭議性，透過調控訊息傳遞路徑來抑制腫瘤幹細胞作為治療方式並不適當，因為許多訊息傳遞路徑在正常細胞及腫瘤幹細胞中都有運作。因此本研究希望發展低濃度的藥物，抑制肝癌類幹細胞的生成。

## 叁、研究背景

### 1 分離癌症類幹細胞

分子標記主要是確認細胞的表面抗原，可以利用不同的標誌物，確認各類癌症類幹細胞的生成以及用來檢測幹細胞自我更新和分化的能力。此外，如果能夠成功地分離出癌症類幹細胞，也可藉由體外培養作為藥物篩選平台可發展出更多有效治療癌症的方式。

根據癌症類幹細胞的特性，可以利用三種方式將癌症類幹細胞分離。首先，依據特異性表現在癌症類幹細胞的表面抗原，例如:CD133，利用流式細胞儀(flow cytometry)分離出癌症類幹細胞(2,33)。人類首先發現腫瘤幹細胞是在急性髓性白血病（AML）中具有 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>的表面抗原(34,35)。而另一組研究人員從腦腫瘤組織中分離 CD133<sup>+</sup>與 CD133<sup>-</sup>的腫瘤細胞，而在小鼠體內只需種植 100 個 CD133<sup>+</sup>腫瘤細胞便可形成腫瘤，此腫瘤表型與原始腫瘤相似，但是 CD133<sup>-</sup>的腫瘤細胞數量雖占多數，卻無法在小鼠體內形成腫瘤。因此在各種研究發現藉由 CD133 可分離出癌症類幹細胞(36,37)。第二、在研究小鼠骨髓細胞造血幹細胞中，利用螢光染劑 Hoechst 33342 標記細胞，使用流式細胞儀分離出不具螢光訊號的細胞，因細胞排出染料 Hoechst 33342 代表具有 SP 表型的能力並且與 ABC 轉運蛋白家族中 ABCG2/Bcrp1 基因有關(38)，所以這群細胞具有造血幹細胞特性因此

稱為側族群(side population, SP)(37)。此基因是一種三磷酸腺苷水解酶運轉子(ATPase transporter) 會導致細胞在傳統化療過程中產生抗藥性的主要轉運子之一，與腫瘤幹細胞的抗藥性特徵相符，因此利用流式細胞儀分析出具有 SP 表型就定義為具幹細胞特性。第三、前研究發現指出，將癌細胞培養在不含血清的環境中，但含有特定的生長因子——如鹼性纖維細胞生長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)、表皮生長因子(epidermal growth factor; EGF)等，透過體外培養，使其處於未分化的狀態，讓細胞形成球體，此時球體可能富含大量的癌症類幹細胞，可再進一步去篩選出真正的癌症類幹細胞(39)。

## 2. 癌症類幹細胞的鑑定

目前有許多研究關注在癌症的發生與幹細胞性因子(stemness factors)有關。有研究指出幹細胞性因子異常的表現，例如:Nanog、Oct4 及 Sox2 會導致產生各種癌症類幹細胞。Nanog 會影響細胞轉換成胚胎幹細胞，而在分化的體細胞中 Nanog 會失去表現，體細胞在不適當的時間活化 Nanog 的表現會導致癌症類幹細胞的形成。有報導指出，Nanog 的高表現量會減少癌症病患的生存率，另外由研究指出，Nanog 會增強腫瘤細胞增殖、自我更新及抗藥性。因此 Nanog 可作為鑑定癌症類幹細胞的重要關鍵因子。(40)

### 3. BrdU 與細胞自我更新能力

Bromodeoxyuridine(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)是胸腺嘧啶的類似物，它在細胞 S-phase 與 DNA 結合。標記 BrdU 可以觀察細胞是否有 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 停滯(41)，進一步透過 BrdU 偵測細胞增殖能力。另外有研究顯示原致癌基因和腫瘤抑制基因可調控癌細胞增殖及幹細胞自我更新，故可利用 BrdU 偵測 spheroid 的自我更新能力(42)。

### 4. 藥物對癌症治療的效果

目前除了西藥治療癌症，由於中藥使用在民間歷史悠久，目前也研究使用中藥來協助癌症病患的治療，在中醫概念中，認為疾病會造成體內機能失衡，而利用中藥的和緩特性，可以中和患者的身體症狀，進一步恢復整體的平衡狀態。肝癌有分為三階段，始期(initiation)、激活期(promotion) 及進展期(progression)，在過去數十年中，針對中草藥預防及治療肝癌的研究發現，中藥可利用這些階段進行複合性治療(43,44)。以中藥分子作為標靶藥物應用在肝癌，對於未來是一種新的考慮方向。

#### 1. 夏枯草 (*Prunella vulgaris*)

目前臨床上所使用的抗腫瘤藥物，大多是由天然植物所分離純化出來，而這幾年來以天然物進行抗癌的研究相當多，並且發現天然物對

癌細胞的抑制確實有其作用，有研究發現夏枯草(*Prunella vulgaris*)水萃取液中成分含有 Oleanolic acid 和 Ursolic acid。Oleanolic acid 和 Ursolic acid 為三萜類化合物，有研究報導三萜類化合物可以減少凋亡基因 Bcl-2 表現量並且也可以抑制腫瘤生長能力、血管新生以及抗發炎(45,46)。

夏枯草(*Prunella vulgaris*)影響細胞的遷移和侵襲人體肝癌細胞的作用機制仍未明確，但有研究指出夏枯草的萃取物是透過抑制金屬蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的活性而影響遷移和侵襲人體肝癌細胞，兩者的活性降低導致遷移能力下降可能與肝癌細胞中的基因 p53 相關，夏枯草可以抑制人體肝癌細胞轉移和侵襲(47)。

## II. 鴉膽子 (*Brucea javanica*)

鴉膽子的藥理特性具有味苦、性寒及低毒性，在本草綱目中，鴉膽子，其特徵在於作為解熱、解毒，並廣泛地使用在肺癌，前列腺癌和胃腸癌的治療中，及具有有效的抗發炎和抗病毒的效果。現代藥理研究顯示鴉膽子的成分中含有抗癌作用的低分子化合物 quassinoid，此物質會透過抑制 Bcl-2，造成細胞凋亡及細胞增殖能力下降。(48)

## III. 苦蔘 (*Sophora flavescens*)

中國傳統的中草藥苦蔘，常用於治療腸炎，黃疸及痢疾。有研究報導苦蔘主要活性成分具有喹啉里西啶生物鹼(Quinolizidine alkaloids)

及黃硯類化合物，此兩種物質使苦蔘能有效的抗發炎、抑制 B 型肝炎及抗癌作用。(49)

#### **4.Teroxirone 相關研究**

Teroxirone 是一個三環氧化物抗腫瘤藥物，它是一種烷化劑 (alkylating reagent)，會與 DNA 的鹼基以共價鍵結合，讓 DNA 複製不完全(50)。teroxirone 可以在 P388 和 L1210 的白血病細胞株，可以抵抗環磷酰胺(Cyclophosphamide)具有效功能。teroxirone 在第一期和第二期的臨床研究中具有顯著效果。它的新穎結構特性可能具有潛在的臨床價值。這個藥物也被報導可以有效清除不同類型的腫瘤，此藥物，可以協助白血病和淋巴瘤的患者康復(51,52)。

過去研究指出 teroxirone 可以抑制非小細胞肺癌細胞(H460、H1299 和 A549)的生長，其相關機制可能是經由 tumor suppressor p53 gene 調控 DNA damage 所造成的細胞凋亡(53)。本論文再繼續探討 teroxirone 如何影響肝癌細胞(Huh7、HepG2 和 Hep3B)的生長與相關反應機制。

## 肆.研究目標

### 一、利用癌症幹細胞標誌物 Nanog 鑑定肝癌類幹細胞

利用特有的生長因子使細胞處於未分化的狀態，形成球狀體，進一步透過 Nanog 確定是否為肝癌類幹細胞。

### 二、透過螢光染劑觀察各種中藥影響肝癌幹細胞的自我更新能力。

首先加入特有的生長因子，使細胞處於未分化的狀態，形成球狀體，再加入各種的中藥，再進一步透過 BrdU 確認藥物是否會影響肝癌類幹細胞自我更新能力。

## 伍、材料與方法

### 1.細胞株

本研究以 Huh7、HepG2 和 Hep3B 這三株人類肝癌細胞株進行實驗，Huh7、HepG2 和 Hep3B；此三種細胞株都不含 B 型肝炎病毒基因組或病毒顆粒。

### 2.細胞培養

移除舊培養液，以 2 mL PBS 將細胞洗過，然後移除 PBS，加入 trypsin-EDTA，於 37°C 下作用 5 分鐘，以培養液(DMEM/F12)中止 trypsin-EDTA 的作用，緩慢將細胞從培養盤上打下來，細胞計數時，先將細胞收到離心管中，以 800 rpm、5 分鐘離心，然後移除上清液，再加入 1 mL 培養液(DMEM/F12)將細胞混勻，取出 10  $\mu$ L 以 trypan

blue 作稀釋和染色，最後以顯微鏡觀察並計數。

最後細胞以含有 10 ng/mL 鹼性成纖維細胞生長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)，20 ng/mL 表皮生長因子(epidermal growth factor; EGF)，1% B27 和 1% 抗生素(streptomycin/penicillin) 的 DMEM/F12，取適量的細胞放置在 ultra- low attachment 孔盤，培養於含 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培養箱中。

### **3. Tumor sphere 形成**

肝癌幹細胞株 Huh7、HepG2 和 Hep3B 培養在 DMEM/F12 含有 10 ng/mL 鹼性成纖維細胞生長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)，20 ng/mL 表皮生長因子(epidermal growth factor; EGF)，1% B27 和 1% 抗生素(streptomycin/penicillin)，取適量的細胞放置在 ultra-low Attachment 24 孔盤，培養 7 天後，Tumor sphere 形成，加入不同藥物分別為 teroxirone(5、10、20 或 30 $\mu$ M) 夏枯草濃度(2、4 或 6 mg/mL)，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 Tumor sphere 的大小及數量變化。

### **4. Soft agar colony formation assay**

目的是可以反映出細胞分裂的能力，形成的群落越多，表示具有分裂能力的前驅細胞越多。首先準備底部的 agar，將 2% agar 利用微波爐加熱溶解，在放入滅菌釜滅菌，將 1 x DMEM with 10% FBS 裝

入試管中(至少要在室溫放置 30 min) ，混和 DMEM 3: agar 1 得到 0.5% Agar +0.75×RPMI + 10% FBS (Final concentration 7.5%)，從混合的培養基中取 0.75 mL 到 12 孔盤，放置五分鐘等 agar 凝固(在室溫放置 30 min 即可使用或是放置在 4°C 可保存一周)。

配製頂部的 agarose，將 1.4% agarose 利用微波爐加熱溶解，再放入滅菌釜滅菌將 1×DMEM with 10% FBS 裝入試管中(至少要在室溫放置 30 min) ，混和 DMEM 3: agar 1 得到 0.3% agarose +0.75× RPMI + 10% FBS (Final concentration 7.5%)，將懸浮細胞的上清取出放置到 Eppendorf，以 2,000 rpm、5 分鐘離心，移除上清液，將頂部的 agarose 與 Eppendorf 底部細胞混合，細胞混合的培養基分別各取 0.75mL 到 12 孔盤。

## **5. BrdU incorporation cell proliferation assay**

肝癌幹細胞株 Huh7、HepG2 和 Hep3B 培養在 DMEM/F12 含有 10 ng/mL 鹼性成纖維細胞生長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)， 20 ng/mL 表皮生長因子(epidermal growth factor; EGF)， 1% B27 和 1% 抗生素(streptomycin/penicillin)，取適量的細胞放置在 ultra-low Attachment 24 孔盤，培養 7 天後，Tumor sphere 形成。在每個 well 中加 Bromodeoxyuridine(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU, 10 $\mu$ M) 放置培養箱 37°C 兩個小時，在加入 Hoechst 33342 放置 30 分鐘。收

集培養液，離心 300g 、10 分鐘，去除上清液，PBS 洗兩次，加入一抗 Anti-BrdU 放置一天，離心 300g 、10 分鐘，去除上清液，PBS 洗兩次，再加入 FITC-conjugated goat anti-rabbit 的抗體放置一天。離心 300g 、10 分鐘，去除上清液，PBS 洗兩次，再加入 PBS，用活細胞顯微鏡觀察細胞型態。

## **6. Immunofluorescence assay**

培養皿中加入適當的細胞培養使細胞貼覆在蓋玻片上，分別處理不同藥物濃度 teroxirone (5、10、20 或 30 $\mu$ M) 夏枯草濃度(2、4 或 6 mg/mL)，在不同時間點將蓋玻片取出，用 PBS 洗滌，以 4%的甲醛溶液固定 30 分鐘。含有 0.5% Tween-20 的 PBS 配置一級抗體(primary antibody)在 4 $^{\circ}$ C 放置 18 小時，一級抗體反應後，利用 PBS 清洗，加入螢光標記的二級抗體以及細胞核染劑 DAPI 在室溫下反應 1 小時，載玻片上頭滴上 mounting buffer，將蓋玻片貼附細胞的一面向下覆蓋載玻片上利用指甲油封蓋玻片以免 mounting buffer 乾掉。接著保存在閉光與 4 $^{\circ}$ C 的環境以便之後用雷射共軛交顯微鏡 confocal 觀察。

## **7. Apoptosis analysis by flow cytometry**

肝癌腫瘤幹細胞取適當量放置在 ultra- low attachment 孔盤，分別處理不同藥物濃度 Teroxirone(5、10、20、30 $\mu$ M) 夏枯草濃度(2、4、

6 mg/mL)，將培養液收集到試管中，以 800 rpm、5 分鐘離心，移除上清液，接著加入 trypsinization 與 PBS 洗滌此步驟重複兩次，再用酒精固定一天，隔天，加入 PBS 利用離心將酒精洗掉，加入 1% propidium iodide (PI)、PBS、1% RNase 放置黑暗環境 30 分鐘，之後將樣品利用流式細胞儀分析細胞週期。

肝癌腫瘤幹細胞取適當量放置在 ultra- low attachment 孔盤，分別處理不同藥物濃度 teroxirone(5、10、20 或 30 $\mu$ M) 夏枯草濃度(2、4 或 6 mg/mL)，將含待測藥物的新培養液收集到試管中，用 PBS 清洗細胞，再用 trypsinization 將細胞打散，以 800 rpm、5 分鐘離心，上清液移除，最後再用 PBS 洗滌，使用 0.5  $\mu$ L annexin-V FITC (20 $\mu$ g/mL) (BD, Cat. 556547) 的 100  $\mu$ L 1 $\times$  annexin-V binding buffer，在室溫下避光 15 至 30 分鐘。將樣品過篩網後，以流式細胞儀 (Becton-Dickson, Mansfield, MA) 進行測定細胞分佈。

## 伍、結果

### 1. teroxirone 影響肝癌幹細胞型態

在不同肝癌細胞株 Huh7、HepG2 和 Hep3B 在含有特定生長因子的培養基培養 7 天，當有 tumor sphere 形成時，分別加入 teroxirone (5、10、20 或 30 $\mu$ M) ，之後利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小。Huh7 (Fig1A) 及 Hep3B (Fig3A)細胞株在不同時間點

以及在處理不同 teroxirone 藥物濃度處理下 tumor sphere 大小、數量有明顯減少的趨勢，而 HepG2 (Fig2A) 細胞株在不同時間點以及處理不同 teroxirone 藥物濃度處理 tumor sphere 大小、數量則沒有明顯變化。量化後也具統計意義(Fig1B, Fig2B and Fig3B)。

## 2. 中藥夏枯草影響肝癌幹細胞型態

在不同肝癌細胞株 Huh7、HepG2 和 Hep3B 在含有特定生長因子的培養基培養 7 天，當有 tumor sphere 形成時，加入夏枯草分別為(2、4 或 6mg/mL)，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小。在 Huh7 (Fig4A) 及 HepG2 (Fig5A) 細胞株處理夏枯草藥物細胞大小及數量都有改變，在 Hep3B (Fig6A) 細胞株處理夏枯草不同的時間點及藥物濃度中並沒有明顯變化，量化後也具統計意義(Fig4B, Fig5B and Fig6B)。

## 3. 利用幹細胞標誌物 Nanog 鑑定肝癌類幹細胞

在不同肝癌細胞株在含有特定生長因子的培養基培養 7 天，當有 tumor sphere 形成時，Huh7、HepG2 和 Hep3B 加入夏枯草濃度為(2、4 或 6mg/mL)，再加入 Nanog 進一步利用活細胞顯微鏡觀察。(Fig8A, Fig8B and Fig8C)。Huh7、HepG2 和 Hep3B 分別加入 teroxirone 濃度為 (5、10、20 或 30 $\mu$ M)，再加入 Nanog 進一步利用活細胞顯微鏡觀

察(Fig7A, Fig7B and Fig7C) ,

#### **4.利用螢光染劑確認肝癌幹細胞的細胞數量及自我更新能力**

肝癌細胞株 Huh7 在含有特定生長因子的培養基培養 7 天，當有 tumor sphere 形成時，分別加入不同中藥處理後加入 BrdU，再進一步利用活細胞顯微鏡觀察 BrdU 的變化。在鴉膽子及夏枯草 BrdU 表現量的變化及細胞數量有明顯下降(Fig9A, Fig9B, Fig9C, Fig9D)，而苦蔘則沒有任何影響 (Fig9E, Fig9F)

### **陸、討論**

#### **1.teroxirone 抑制肝癌 tumor sphere 大小及數目**

有研究指出 teroxirone 可以抑制非小細胞肺癌細胞(53)，所以本研究推測 teroxirone 可以抑制肝癌 tumor sphere。而在我們實驗結果發現，加入 teroxirone 處理下，Huh7 數量及大小都有隨著藥物處理濃度上升而下降，另外有報導發現，夏枯草、鴉膽子及苦蔘對肝癌細胞有抑制效果(47)。因此利用此三種中藥觀察對肝癌 tumor sphere 的影響，在 HepG2 的 tumor sphere 加入夏枯草處理後，數量及大小都有明顯下降，Huh7 的 tumor sphere 加入鴉膽子處理後，數量及大小都有明顯下降。在處理藥物的 tumor sphere 加入幹細胞標誌物 Nanog，雖然藥物會影響 tumor sphere 大小，但是還是具有癌症幹細胞的功能。另外本研究利用 BrdU 偵測藥物處理過後 spheroid 的自我更新能力，實驗發現

Huh7 的 tumor sphere 在鴉膽子處理下，tumor sphere 的自我更新能力有明顯的下降。結果發現藥物會影響肝癌類幹細胞的自我更新能力，未來可以進一步利用西方墨點法觀察藥物是透過調控此特徵的相關路徑例如: Wnt pathway，Hedgehog pathway... 等等，來達到抑制肝癌 tumor sphere 生長。

## 柒、参考文献

1. Madka, V., and Rao, C. V. (2011) Cancer stem cell markers as potential targets for epithelial cancers. *Indian J Exp Biol* **49**, 826-835
2. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 3983-3988
3. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-110
4. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115
5. Maenhaut, C., Dumont, J. E., Roger, P. P., and van Staveren, W. C. (2010) Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis* **31**, 149-158
6. Puglisi, M. A., Barba, M., Corbi, M., Errico, M. F., Giorda, E., Saulnier, N., Boninsegna, A., Piscaglia, A. C., Carsetti, R., Cittadini, A., Gasbarrini, A., and Sgambato, A. (2011) Identification of Endothelin-1 and NR4A2 as CD133-regulated genes in colon cancer cells. *The Journal of pathology* **225**, 305-314
7. Boman, B. M., Fields, J. Z., Cavanaugh, K. L., Guetter, A., and Runquist, O. A. (2008) How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer. *Cancer research* **68**, 3304-3313
8. Chiba, T., Kita, K., Zheng, Y. W., Yokosuka, O., Saisho, H., Iwama, A., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2006) Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **44**, 240-251
9. Haraguchi, N., Ohkuma, M., Sakashita, H., Matsuzaki, S., Tanaka, F., Mimori, K., Kamohara, Y., Inoue, H., and Mori, M. (2008) CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Annals of surgical oncology* **15**, 2927-2933
10. Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., and Clarke, M. F. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10158-10163

11. Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J. Z., Wicha, M. S., and Boman, B. M. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer research* **69**, 3382-3389
12. Ma, S., Chan, K. W., Lee, T. K., Tang, K. H., Wo, J. Y., Zheng, B. J., and Guan, X. Y. (2008) Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Molecular cancer research : MCR* **6**, 1146-1153
13. Boman, B. M., and Huang, E. (2008) Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 2828-2838
14. Huang, E. H., and Wicha, M. S. (2008) Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy. *Trends in molecular medicine* **14**, 503-509
15. Sukowati, C. H., Rosso, N., Croce, L. S., and Tiribelli, C. (2010) Hepatic cancer stem cells and drug resistance: Relevance in targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology* **2**, 114-126
16. Watabe, T., and Miyazono, K. (2009) Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell research* **19**, 103-115
17. Amin, R., and Mishra, L. (2008) Liver stem cells and tgf-Beta in hepatic carcinogenesis. *Gastrointestinal cancer research : GCR* **2**, S27-30
18. Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., and Berman, D. M. (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**, 324-331
19. Cheng, W. T., Xu, K., Tian, D. Y., Zhang, Z. G., Liu, L. J., and Chen, Y. (2009) Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells. *International journal of oncology* **34**, 829-836
20. Huang, S., He, J., Zhang, X., Bian, Y., Yang, L., Xie, G., Zhang, K., Tang, W., Stelter, A. A., Wang, Q., Zhang, H., and Xie, J. (2006) Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* **27**, 1334-1340
21. Dean, M. (2006) Cancer stem cells: redefining the paradigm of cancer treatment strategies. *Molecular interventions* **6**, 140-148
22. Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I. L. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414
23. Yang, W., Yan, H. X., Chen, L., Liu, Q., He, Y. Q., Yu, L. X., Zhang, S. H., Huang, D. D., Tang, L., Kong, X. N., Chen, C., Liu, S. Q., Wu, M. C., and Wang, H. Y. (2008) Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer research* **68**, 4287-4295

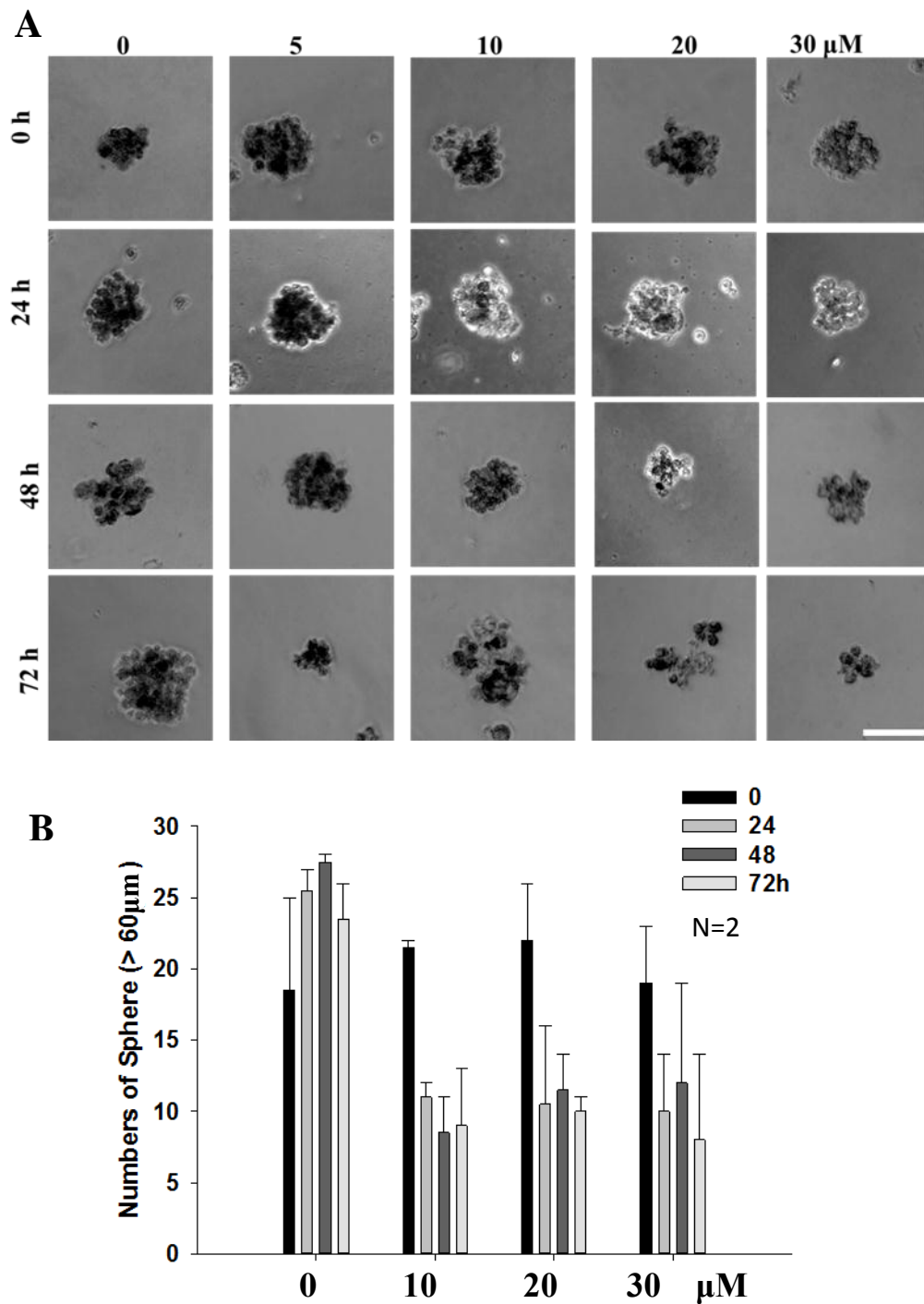
24. Ali, I. U., Schriml, L. M., and Dean, M. (1999) Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1922-1932
25. Hu, T. H., Huang, C. C., Lin, P. R., Chang, H. W., Ger, L. P., Lin, Y. W., Changchien, C. S., Lee, C. M., and Tai, M. H. (2003) Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **97**, 1929-1940
26. He, X. C., Yin, T., Grindley, J. C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W. A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K. S., Hembree, M., Johnson, T., Wiedemann, L. M., Barrett, T. A., Hood, L., Wu, H., and Li, L. (2007) PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature genetics* **39**, 189-198
27. Lee, T. K., Cheung, V. C., and Ng, I. O. (2013) Liver tumor-initiating cells as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* **338**, 101-109
28. Luo, H., Hao, X., Ge, C., Zhao, F., Zhu, M., Chen, T., Yao, M., He, X., and Li, J. (2010) TC21 promotes cell motility and metastasis by regulating the expression of E-cadherin and N-cadherin in hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* **37**, 853-859
29. Ji, J., Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M., Jia, H. L., Li, C., Deng, C., Wauthier, E., Reid, L. M., Ye, Q. H., Qin, L. X., Yang, W., Wang, H. Y., Tang, Z. Y., Croce, C. M., and Wang, X. W. (2009) Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **50**, 472-480
30. Nowak, D., Stewart, D., and Koeffler, H. P. (2009) Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* **113**, 3655-3665
31. Vicente Lopez, M. A., Vazquez Garcia, M. N., Entrena, A., Olmedillas Lopez, S., Garcia-Arranz, M., Garcia-Olmo, D., and Zapata, A. (2011) Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. *Stem cells and development* **20**, 1011-1019
32. Zhang, L., Sun, H., Zhao, F., Lu, P., Ge, C., Li, H., Hou, H., Yan, M., Chen, T., Jiang, G., Xie, H., Cui, Y., Huang, X., Fan, J., Yao, M., and Li, J. (2012) BMP4 administration induces differentiation of CD133+ hepatic cancer stem cells, blocking their contributions to hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **72**, 4276-4285
33. Pardal, R., Clarke, M. F., and Morrison, S. J. (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews. Cancer* **3**, 895-902
34. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111

35. Van Den Berg, D. J., Sharma, A. K., Bruno, E., and Hoffman, R. (1998) Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood* **92**, 3189-3202
36. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401
37. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**, 5821-5828
38. Shimano, K., Satake, M., Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Takemura, M., Sakagami, M., Terada, N., and Tsujimura, T. (2003) Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *The American journal of pathology* **163**, 3-9
39. Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M., and van der Kooy, D. (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 4462-4471
40. Wang, M. L., Chiou, S. H., and Wu, C. W. (2013) Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *OncoTargets and therapy* **6**, 1207-1220
41. Stacey, D. W., and Hitomi, M. (2008) Cell cycle studies based upon quantitative image analysis. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **73**, 270-278
42. Pardal, R., Molofsky, A. V., He, S., and Morrison, S. J. (2005) Stem cell self-renewal and cancer cell proliferation are regulated by common networks that balance the activation of proto-oncogenes and tumor suppressors. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **70**, 177-185
43. Treasure, J. (2005) Herbal medicine and cancer: an introductory overview. *Semin Oncol Nurs* **21**, 177-183
44. Ruan, W. J., Lai, M. D., and Zhou, J. G. (2006) Anticancer effects of Chinese herbal medicine, science or myth? *Journal of Zhejiang University. Science. B* **7**, 1006-1014
45. Hsu, H. Y., Yang, J. J., and Lin, C. C. (1997) Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer letters* **111**, 7-13
46. Tsai, S. J., and Yin, M. C. (2008) Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *Journal of food*

*science* **73**, H174-178

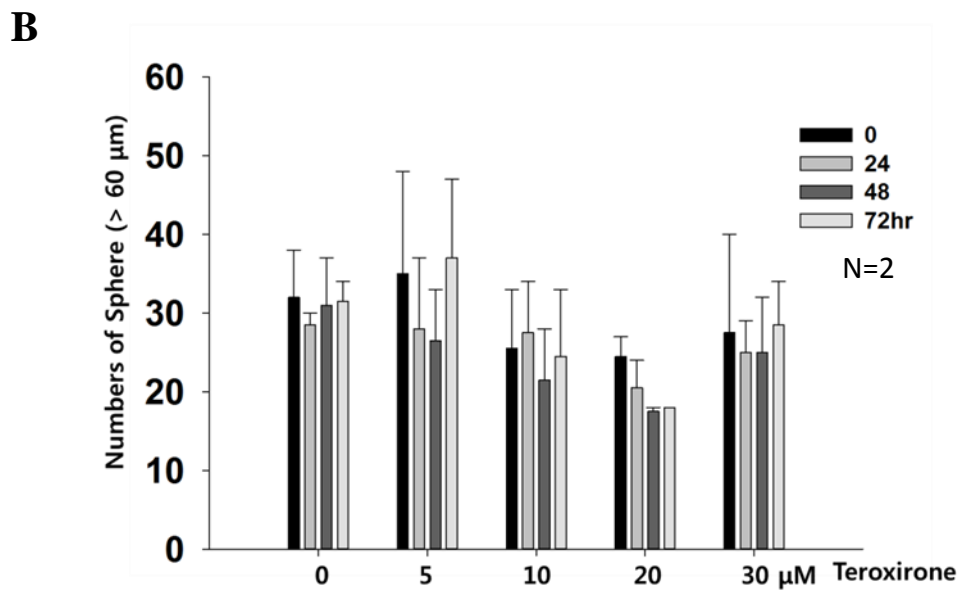
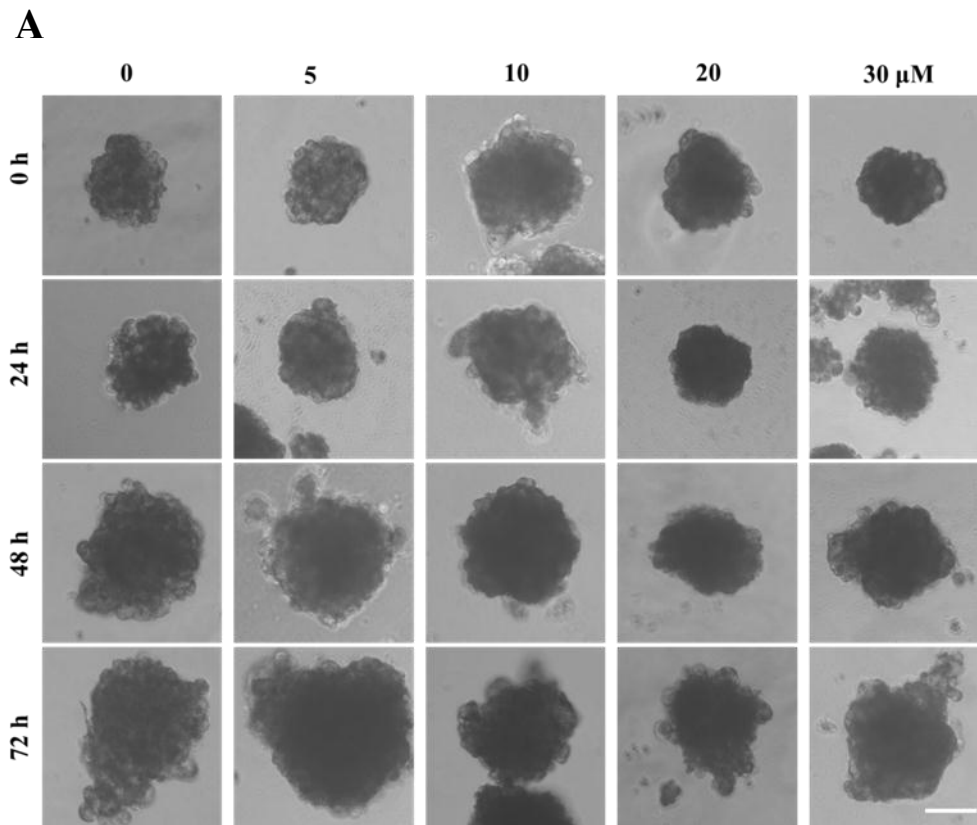
47. Kim, S. H., Huang, C. Y., Tsai, C. Y., Lu, S. Y., Chiu, C. C., and Fang, K. (2012) The aqueous extract of *Prunella vulgaris* suppresses cell invasion and migration in human liver cancer cells by attenuating matrix metalloproteinases. *The American journal of Chinese medicine* **40**, 643-656
48. Chen, M., Chen, R., Wang, S., Tan, W., Hu, Y., Peng, X., and Wang, Y. (2013) Chemical components, pharmacological properties, and nanoparticulate delivery systems of *Brucea javanica*. *International journal of nanomedicine* **8**, 85-92
49. Pu, L. P., Chen, H. P., Cao, M. A., Zhang, X. L., Gao, Q. X., Yuan, C. S., and Wang, C. M. (2013) The antiangiogenic activity of Kushecarpin D, a novel flavonoid isolated from *Sophora flavescens* Ait. *Life sciences* **93**, 791-797
50. Neidhart, J. A., Derocher, D., Grever, M. R., Kraut, E. H., and Malspeis, L. (1984) Phase I trial of teroxirone. *Cancer treatment reports* **68**, 1115-1119
51. Atassi, G., Spreafico, F., Dumont, P., Nayer, P., and Klastersky, J. (1980) Antitumoral effect in mice of a new triepoxyde derivative: 1, 3, 5-triglycidyl-s-triazinetrione (NSC 296934). *Eur J Cancer* **16**, 1561-1567
52. Dombernowsky, P., Lund, B., and Hansen, H. H. (1983) Phase-I study of alpha-1,3,5-triglycidyl-s-triazinetrione (NSC 296934). *Cancer Chemother Pharmacol* **11**, 59-61
53. Wang, J. P., Lin, K. H., Liu, C. Y., Yu, Y. C., Wu, P. T., Chiu, C. C., Su, C. L., Chen, K. M., and Fang, K. (2013) Teroxirone inhibited growth of human non-small cell lung cancer cells by activating p53. *Toxicology and applied pharmacology* **273**, 110-120
59. National Institutes of Health  
<http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/StemCellBasics.pdf>

捌、圖示



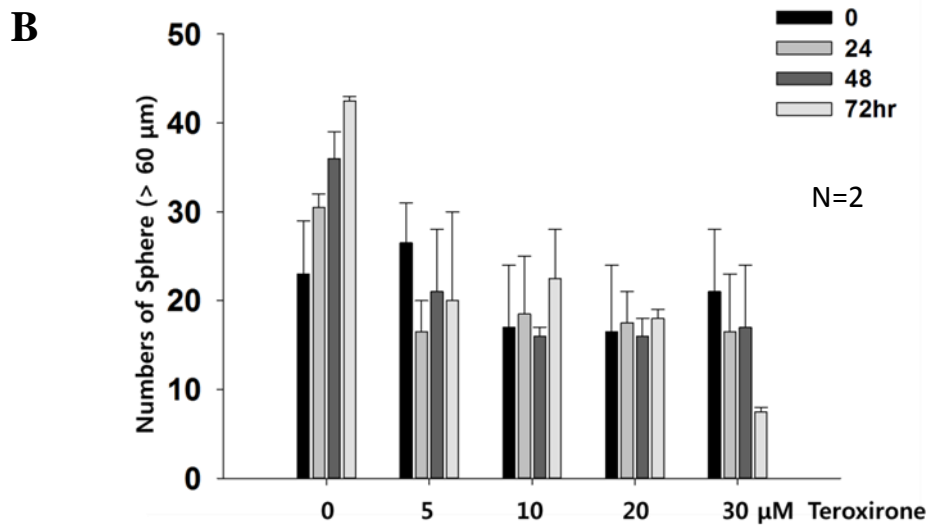
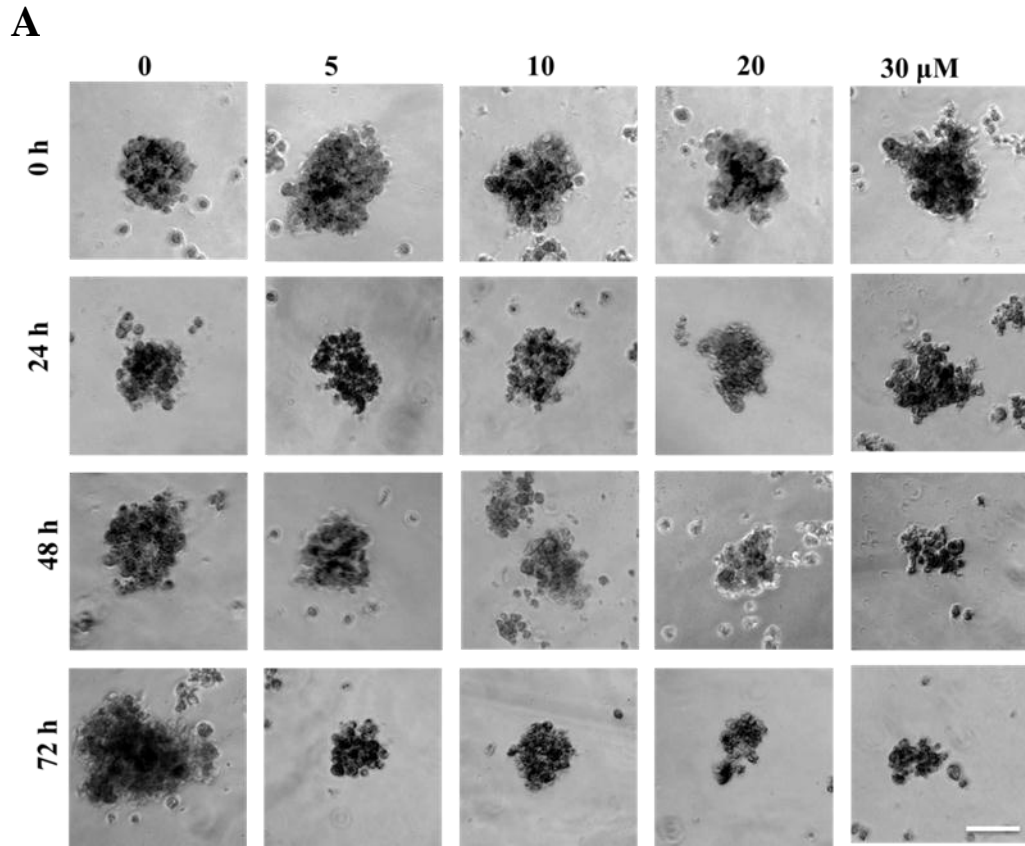
**Fig.1 不同濃度 teroxirone 對 Huh7 tumor sphere 的影響**

Huh7 培養在 ultra-low attachment dish 七天，加入 teroxirone 處理 0、5、10、20  $\mu\text{M}$ ，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小及數量。A. 隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 大小有 dose-dependent 下降。(scale bar, 100 $\mu\text{m}$ .)B. 觀察大於 60 $\mu\text{m}$  的 tumor sphere 數量，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量有 dose-dependent 下降。



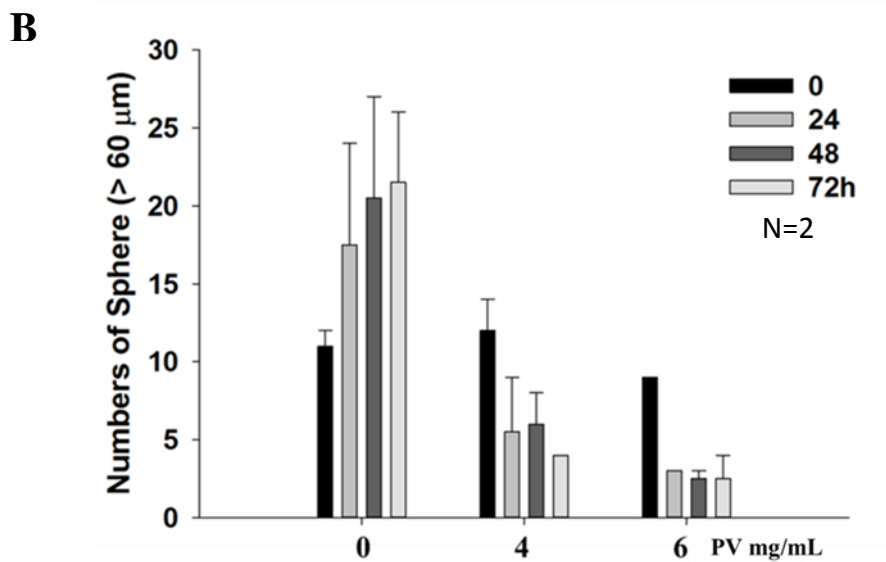
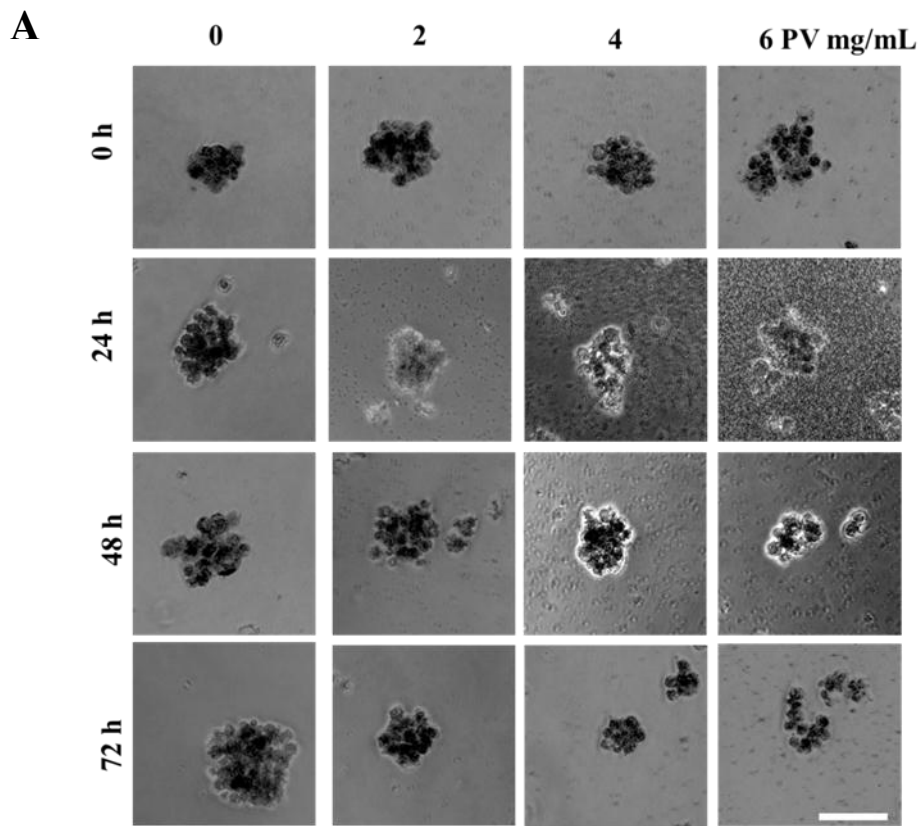
**Fig.2 不同濃度 teroxirone 對 HepG2 tumor sphere 的影響**

HepG2 培養在 ultra-low attachment dish 七天，加入 teroxirone 處理 0、5、10、20  $\mu\text{M}$ ，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小及數量。A. 隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 大小沒有變化。(scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .) B. 觀察大於 60 $\mu\text{m}$  的 tumor sphere 數量，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量沒有差異。



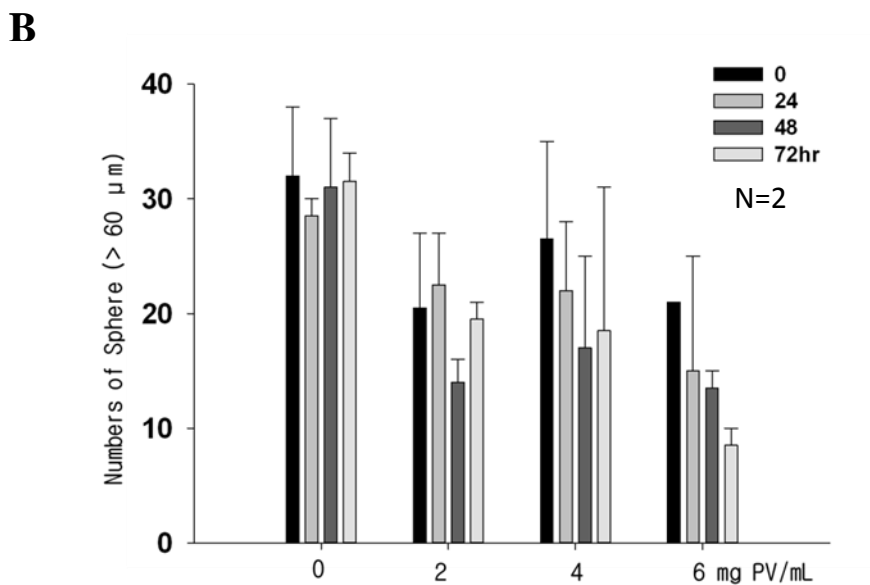
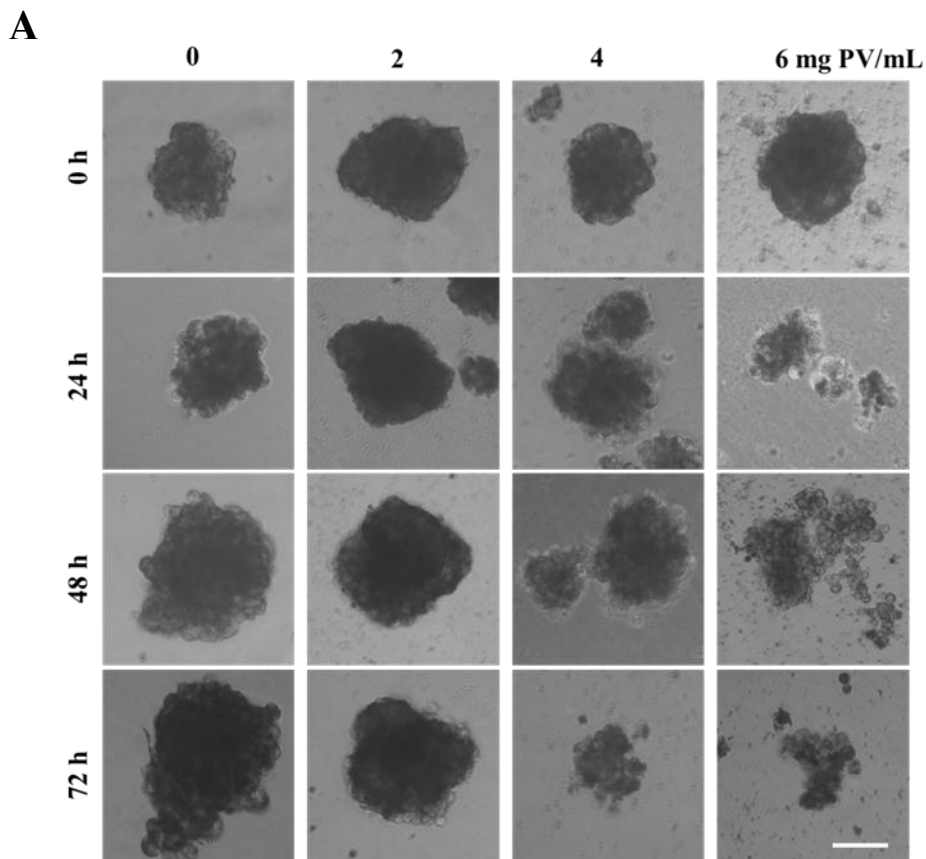
**Fig.3 不同濃度 teroxirone 對 Hep3B tumor sphere 的影響**

Hep3B 培養在 ultra-low attachment dish 七天，加入 teroxirone 處理 0、5、10、20  $\mu\text{M}$ ，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小及數量。A. 隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 大小有 dose-dependent 下降。(scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .) B. 觀察大於 60 $\mu\text{m}$  的 tumor sphere 數量，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量有 dose-dependent 下降。



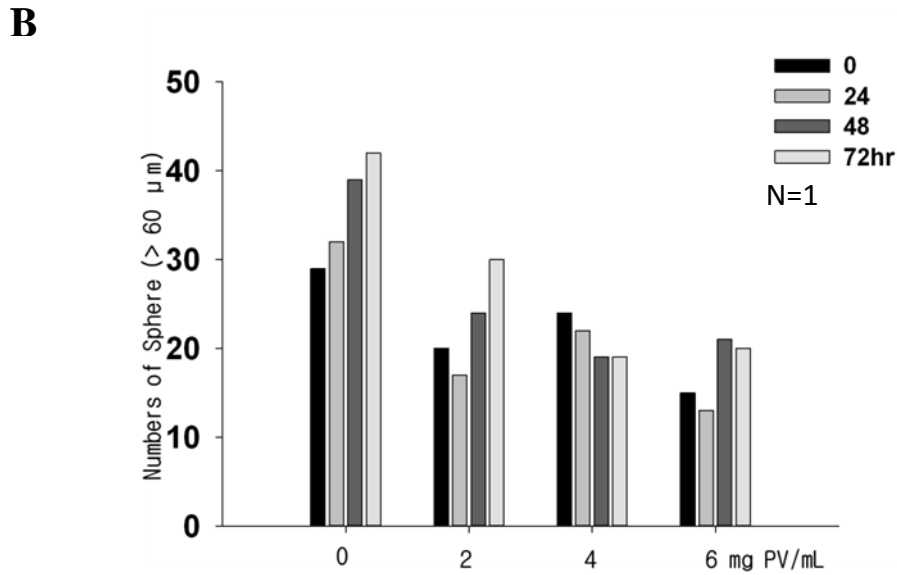
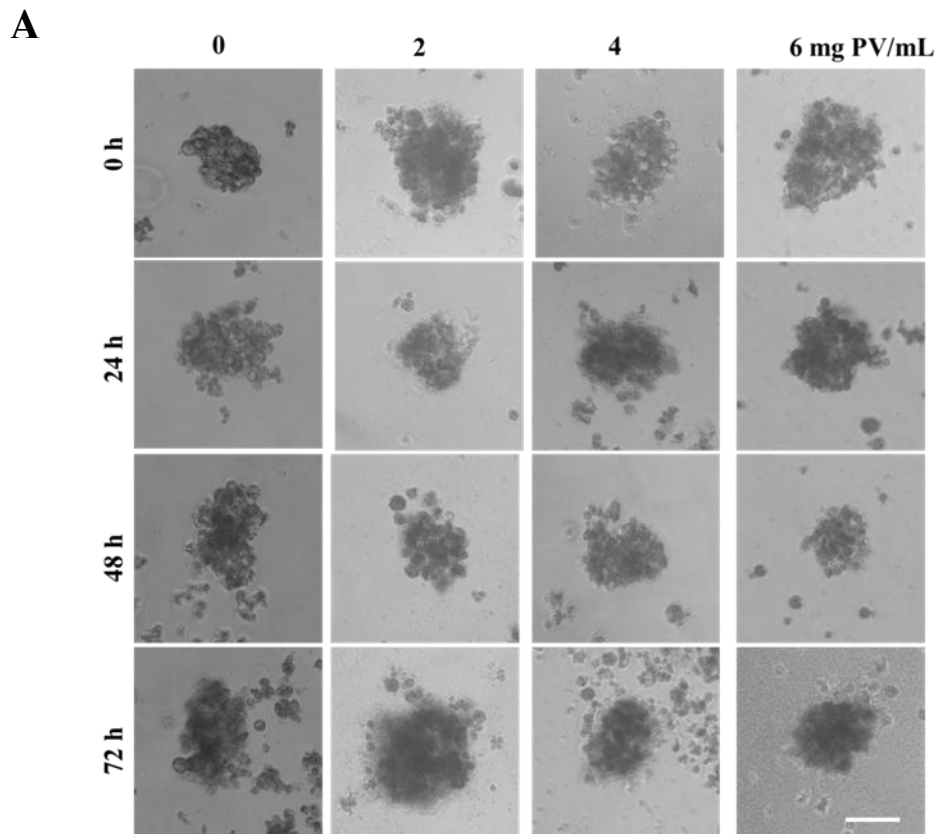
**Fig.4 不同濃度夏枯草(PV)對 Huh7 tumor sphere 的影響**

Huh7 培養在 ultra- low attachment dish 七天，加入夏枯草濃度 2、4 或 6 mg/mL，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小及數量。A.6 mg/mL 的夏枯草處理 48 小時，tumor sphere 變小。(scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .) B. 觀察大於 60 $\mu\text{m}$  的 tumor sphere 數量，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量有 dose-dependent 下降。



**Fig.5 不同濃度夏枯草(PV)對 HepG2 tumor sphere 的影響**

HepG2培養在 ultra-low attachment dish 七天，加入夏枯草濃度 2、4 或 6 mg/mL，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小及數量。A. 6 mg/mL 的夏枯草處理 24 小時，tumor sphere 變小。(scale bar, 100  $\mu$ m.) B. 觀察大於 60 $\mu$ m 的 tumor sphere 數量，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量有 dose-dependent 下降。



**Fig.6 不同濃度夏枯草(PV) 對 Hep3B tumor sphere 的影響**

Hep3B 培養在 ultra-low attachment dish 七天，加入夏枯草濃度 2、4 或 6 mg/mL，利用顯微鏡觀察 0、24、48 或 72 小時 tumor sphere 的大小及數量。A. 隨著藥物濃度及時間增加，tumor sphere 沒有變化。(scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .) B. 觀察大於 60 $\mu\text{m}$  的 tumor sphere 數量，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量沒有變化。

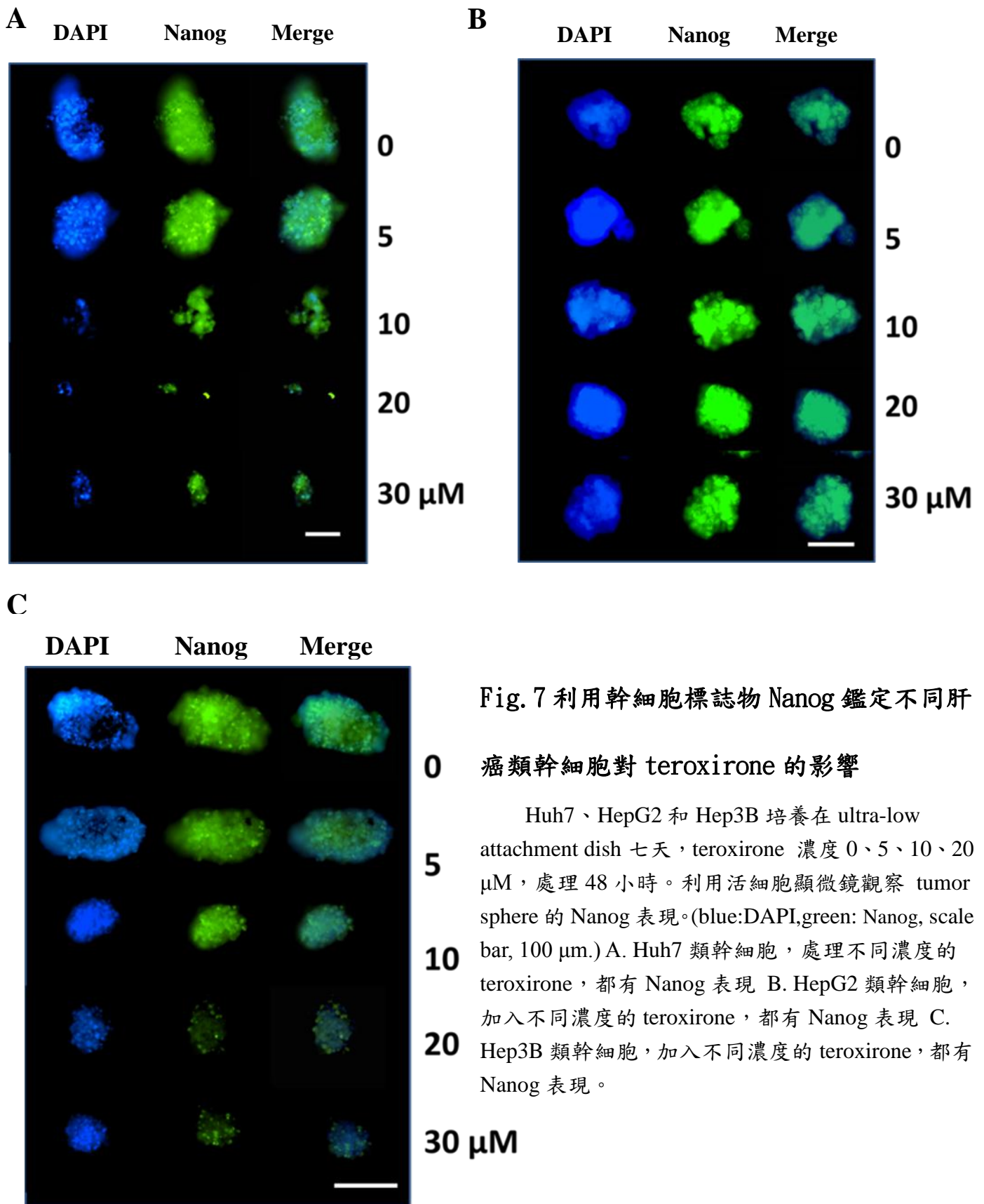
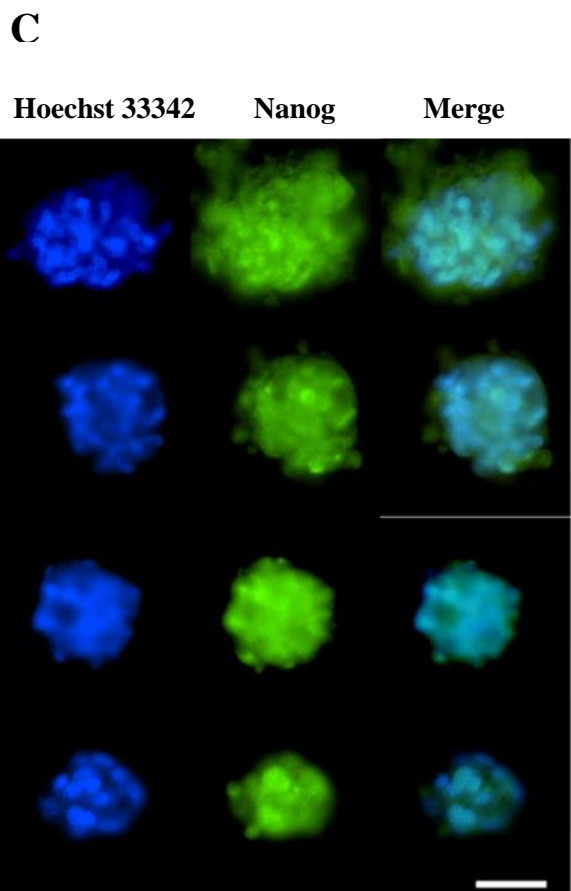
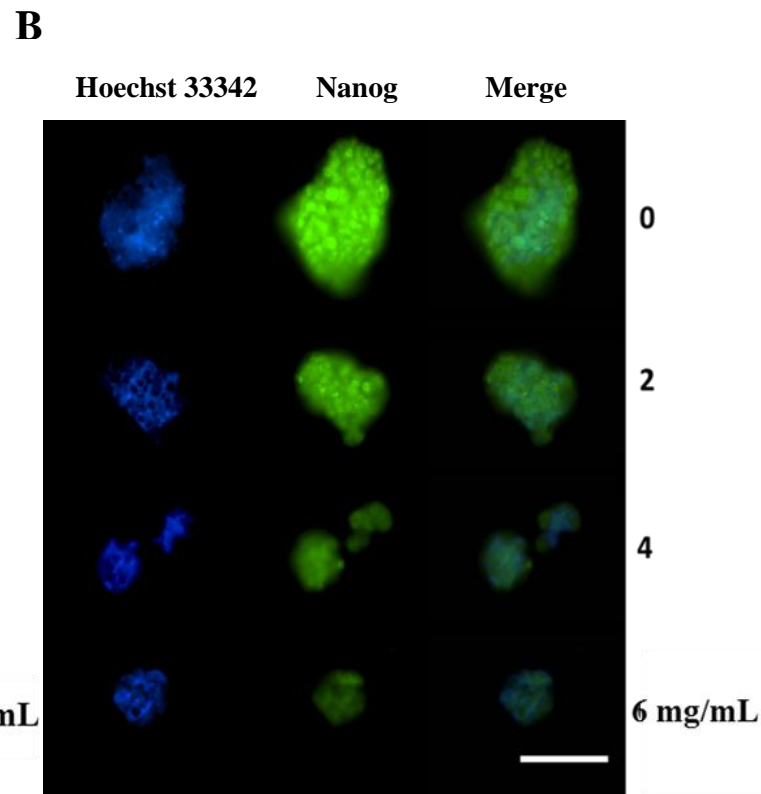
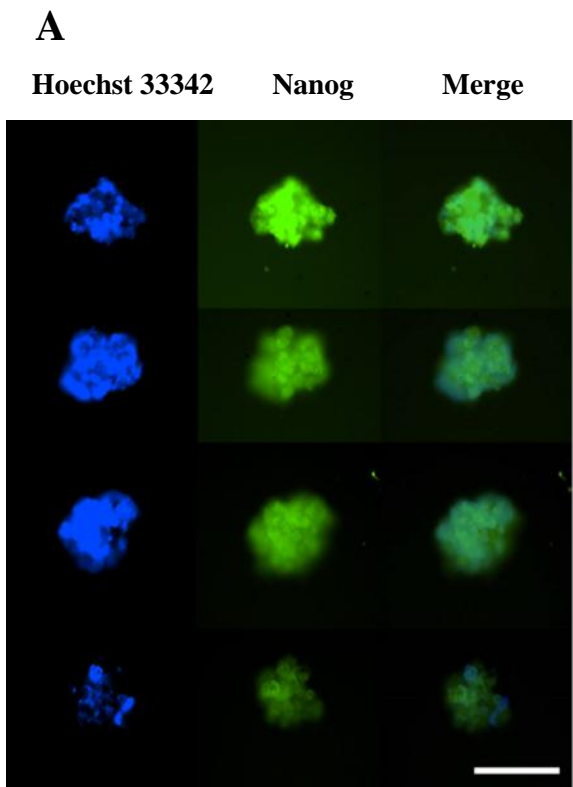


Fig. 7 利用幹細胞標誌物 Nanog 鑑定不同肝

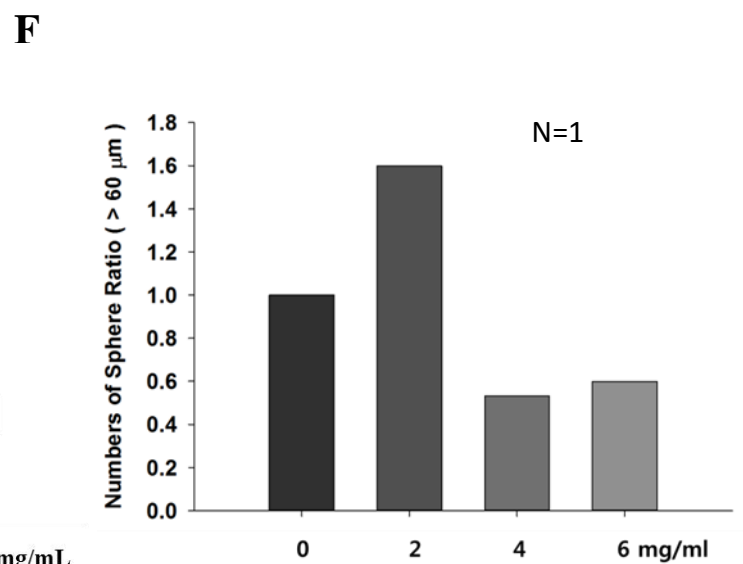
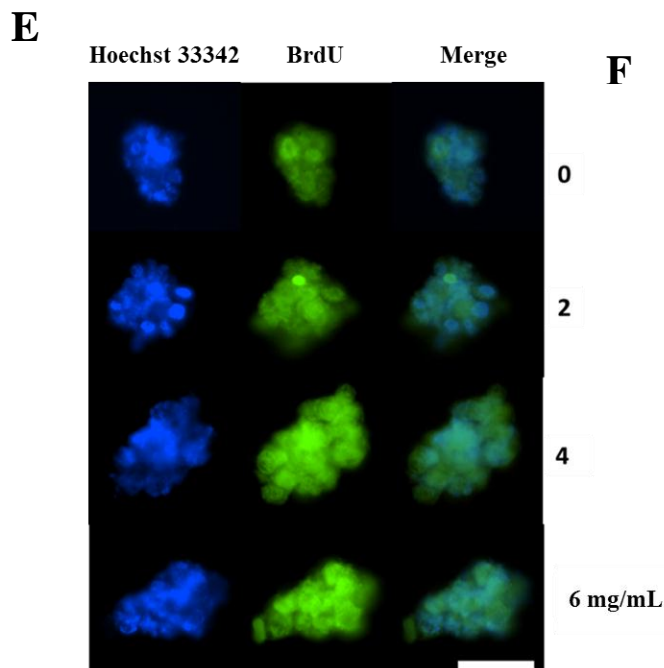
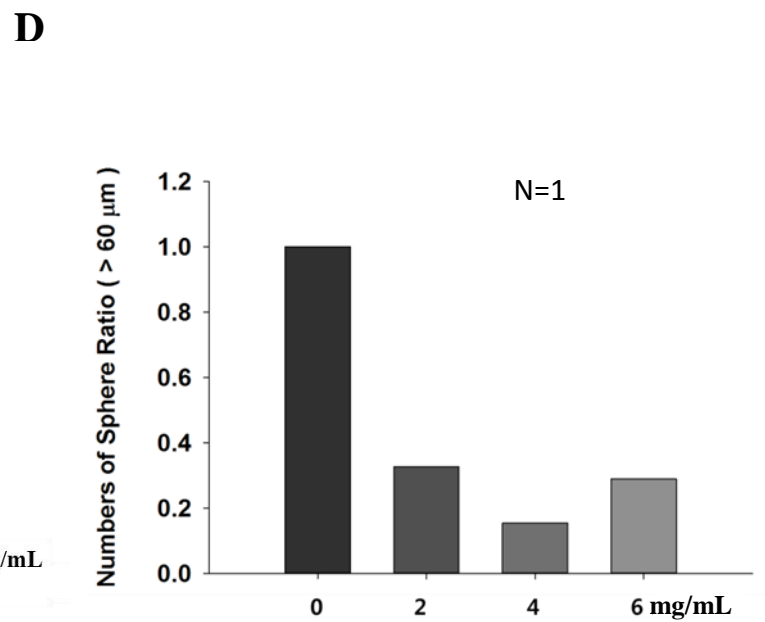
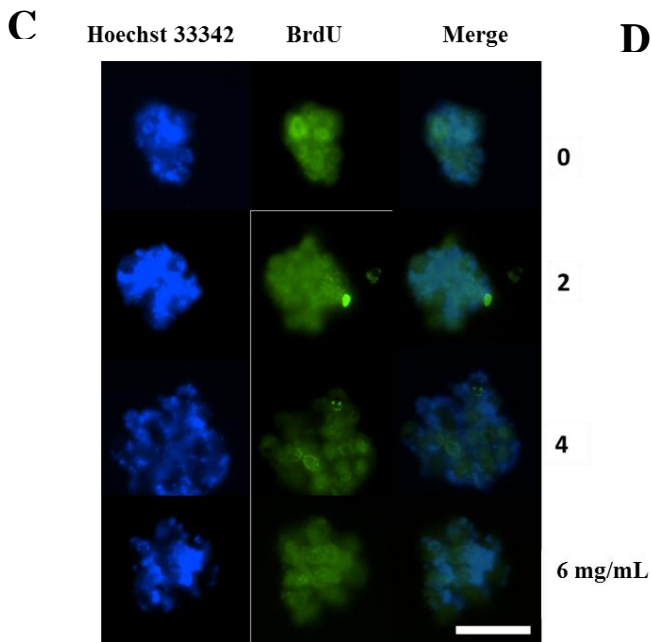
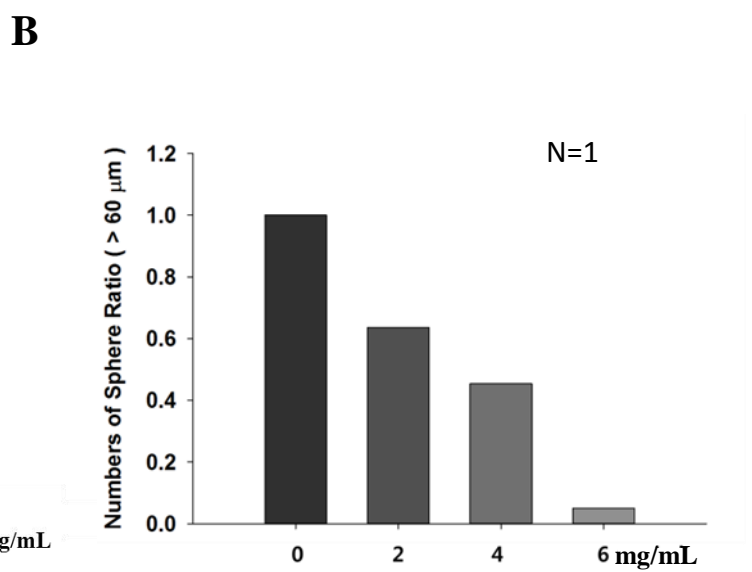
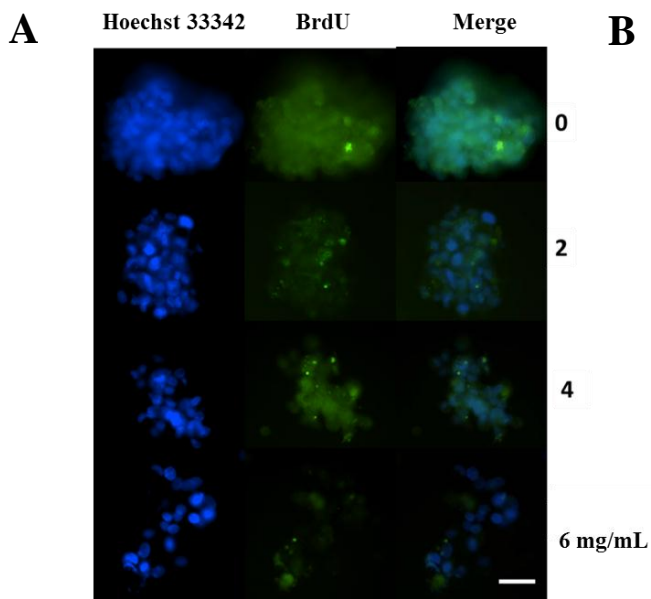
### 0 癌類幹細胞對 teroxirone 的影響

Huh7、HepG2 和 Hep3B 培養在 ultra-low attachment dish 七天，teroxirone 濃度 0、5、10、20  $\mu\text{M}$ ，處理 48 小時。利用活細胞顯微鏡觀察 tumor sphere 的 Nanog 表現。(blue:DAPI,green: Nanog, scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .) A. Huh7 類幹細胞，處理不同濃度的 teroxirone，都有 Nanog 表現 B. HepG2 類幹細胞，加入不同濃度的 teroxirone，都有 Nanog 表現 C. Hep3B 類幹細胞，加入不同濃度的 teroxirone，都有 Nanog 表現。



**Fig. 8 利用幹細胞標誌物 Nanog 鑑定不同濃度夏枯草對肝癌類幹細胞的影響**

Huh7、HepG2 和 Hep3B 培養在 ultra-low attachment dish 七天，加入夏枯草濃度 2、4 或 6 mg/mL，處理 48 小時。利用活細胞顯微鏡觀察 tumor sphere 的 Nanog 表現。(blue: Hoechst 33342, green: Nanog, scale bar, 100  $\mu$ m.) **A.**在 Huh7 的類幹細胞，處理不同濃度的夏枯草，都有 Nanog 表現 **B.**在 HepG2 的類幹細胞，加入不同濃度的夏枯草，都有 Nanog 表現 **C.**在 Hep3B 的類幹細胞，加入不同濃度的夏枯草，都有 Nanog 表現。



## Fig.9 利用螢光染劑確認不同中藥對 Huh7 的細胞存活及自我更新能力的影響

Huh7 培養在 ultra-low attachment dish 七天，分別加入夏枯草、鴉膽子及苦蔘濃度 2、4 或 6 mg/mL，處理 48 小時。利用活細胞顯微鏡觀察。(blue: Hoechst 33342, green: Nanog, scale bar, 50  $\mu$ m.) A. 利用活細胞顯微鏡觀察 tumor sphere 處理夏枯草後的 BrdU 表現。(scale bar, 50  $\mu$ m.) B. 觀察大於 60  $\mu$ m 的 tumor sphere 數量進行量化，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量下降。C. 利用活細胞顯微鏡觀察 tumor sphere 處理鴉膽子後的 BrdU 表現。(scale bar, 50  $\mu$ m.) D. 觀察大於 60  $\mu$ m 的 tumor sphere 數量進行量化，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量下降。E. 利用活細胞顯微鏡觀察 tumor sphere 處理苦蔘後的 BrdU 表現。(scale bar, 50  $\mu$ m.) F. 觀察大於 60  $\mu$ m 的 tumor sphere 數量進行量化，隨著時間及藥物濃度上升，tumor sphere 數量沒有變化。

