國立臺灣師範大學生命科學系 碩士論文

三環藥物Teroxirone對非小細胞肺癌細胞增生機制的探討

The Mechanistic Study of Growth Inhibition by Teroxirone in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells

研 究 生：林楷涵

Kai Han Lin

指導教授：方剛 博士

Kang Fang

中華民國一〇一年八月

目錄

中文摘要

肺癌細胞依其組織型態可分為兩類:小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 以及非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)，而其中大多數屬於非小細胞肺癌。目前在臨床治療上經常使用的抗癌藥物 (例如: camptothecin, doxorubicin, etoposide, cisplatin) 容易產生抗藥性，導致治療的困難，因此本文開發目前臨床上還未徹底了解，但具有抗癌效果的化合物。

研究目標是發展小分子且低劑量的三環氧化物 teroxirone，了解 teroxirone 如何引發細胞凋亡。實驗以 MTT 及細胞群落分析 (colony formation assay) 確認 teroxirone 確實能降低非小細胞肺癌的存活率。接著要確認非小細胞肺癌細胞的存活率下降的確是由於細胞凋亡所造成。再利用單細胞凝膠電泳 (single cell gel electrophoresis (SCGE) / comet assay)，偵測 teroxirone 是否造成 DNA 損傷。再利用 propidium iodide (PI) 染色觀察 teroxirone 對細胞週期的影響，再利用二維流式細胞儀及 DNA 片段化實驗觀察 teroxirone 所誘導的細胞凋亡。

實驗結果顯示，teroxirone 都會對 NSCLC 細胞造成不同程度 DNA 損傷，且細胞凋亡與 p53 的基因型有關。

關鍵詞: Teroxirone、DNA 損傷、細胞凋亡

英文摘要

Lung cancer according to biological characteristics can be classified two types: small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC), most of which belong to non-small cell lung cancer. Clinical treatment used anticancer drugs (ex: camptothecin, doxorubicin, etoposide, cisplatin) frequently is easy to become resistant, leading to difficulties of treatment. The purpose of the thesis is to study the effectiveness of potential anticancer drugs.

The goal of this study is to understand how low doses of teroxirone induce NSCLC cell apoptosis. Teroxirone can reduce the proliferation rate of non-small cell lung cancer on indicated by MTT assay and colony forming assay. To confirm the reduced NSCLC cell growth rate is indeed due to cell death. To be have used the single cell gel electrophoresis (SCGE) / comet assay to detect DNA damage. To be have used propidium iodide (PI) staining to observe that impact of teroxirone on cell cycle and the induced apoptosis by flow cytometry. Double staining with PI and Annexin V – FITC of cell death for apoptosis. At the same time, DNA fragmentation also confirmed teroxirone indeed induced cells apoptosis.

The experimental results showed that teroxirone caused different degrees of DNA damage in NSCLC cells, but is caused apoptosis only occurred in p53 wild-type cells.

Key words: Teroxirone, DNA damage, apoptosis

圖目錄

一.緒論

1. 文獻評述

(1) 肺癌

根據衛生署的統計，國人的十大死因以惡性腫瘤為首 (行政院衛生署, 2012)，其中又以肺癌高居榜首。肺癌在男性部分僅次於肝癌，在女性部分則居於首位 (婦癌基金會, 2012)。引起肺癌的可能原因包括抽菸、二手菸、空氣汙染、烹調時油煙汙染、因職業而長期接觸致癌物質、長時間攝取高脂肪食物、放射性物質、遺傳因素、或者是其他肺部疾病引起。肺癌的症狀有長期咳嗽、咳血、胸悶、胸痛、呼吸困難、聲音嘶啞等 (聯合新聞網, 2012)。

肺癌細胞依其組織型態可分為兩類:小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 以及非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)，而其中以非小細胞肺癌占 80%。非小細胞肺癌又可分為:鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma)、腺癌 (adenocarcinoma)、支氣管癌 (bronchioalveolar carcinoma) 與未分化大細胞癌 (large-cell undifferentiated carcinoma) (Baldi, et al., 2011)。

(2) 現行使用之肺癌藥物

目前常用的肺癌化療藥物大致可分為: 作用於 DNA、作用於微管 (microtubules) 和標靶治療。標靶治療是針對只有在癌細胞上才會出現的特定分子作為辨識目標，對癌細胞進行作用，最重要的是降低對正常細胞的毒性 (Wu, et al., 2006)。

作用於 DNA 的藥物又可分為直接與間接。直接的部分，例如: cisplatin (Pierceall, et al., 2012)、carboplatin (Chatelut, 2011)，兩者都屬於含鉑藥物 (platinum-base)，臨床使用上可單獨使用，或者和其他藥物合併使用於治療非小細胞肺癌 (Mirshahidi and Hsueh, 2010)，其中，cisplatin 會和 DNA 相互作用抑制 RNA 的轉錄和 DNA 的複製，導致細胞週期停滯和細胞凋亡 (Hsieh, et al., 2012)；另外還有抗腫瘤抗生素，例如: etoposide (商品名:VP-16) (Pharmachemie, Netherlands) (Jinturkar, et al., 2012) 會和拓撲異構酶 (topoisomerase) II 以及 DNA 形成三元化合物，造成 DNA 破損和細胞死亡 (Sengupta, et al., 2000)；topotecan (商品名: hycamtin) (GlaxoSmithKline Manufact. SPA, Italy) 為一種 DNA 拓撲異構酶 I 抑制劑，經美國食品和藥物管理局 (FDA) 批准為患者治療敏感的復發小細胞肺癌 (Spigel, et al., 2011)；irinotecan (商品名: CPT-11) (Topogen, USA) (Segawa, et al., 2011) 是

一種拓撲異構酶 I 抑制劑；間接則是使用代謝劑，例如: gemcitzar (商品名: gemzar) (Eli Lilly and Company, USA) (Falchook, et al., 2011) 是一種核苷類似物，主要是使癌細胞的細胞週期停滯在 G_1/S 期，以達到治療的效果 (Huang, et al., 1991) (Plunkett, et al., 1995) (Plunkett, et al., 1995)， gemcitzar 代謝後會活化雙磷酸核苷和三磷酸核苷，藉由細胞內的核苷激酶，抑制 DNA 的合成。

作用於抑制微管形成的藥物則有 vinorelbine (商品名: navelbin) (R. P. Scherer GmbH, Germany)，是長春花的生物鹼，它會影響微管的組合。微管的抗腫瘤活性，主要是在細胞週期中期 (metaphase) 透過與微管蛋白作用，抑制有絲分裂 (Galano, et al., 2011) ；paclitaxel (商品名: taxol) (Corden Pharma Latina for BMS, Italy) (Videira, et al., 2011) 具有抑制細胞增生和血管新生以及使細胞凋亡的功能 (Giannakakou, et al., 2001)，它會和微管蛋白 (tubulin) 作用，進一步阻止有絲分裂，此外，paclitaxel 還可以活化細胞凋亡的相關基因 (Giannakakou, et al., 2001) (Huisman, et al., 2002) (Li, et al., 2005)；(Wang, et al., 2003) (Zaffaroni, et al., 1998)；docetaxel (商品名: taxotere) (Aventis Pharma, UK) (Feng, et al., 2011) 是 paclitaxel 的半合成類似物，一種有絲分裂抑制劑，為目前治療非小細胞肺癌的第一線藥物，藉由穩定微管，透過微管的綑綁和抑制 Bcl-2 誘導細胞凋亡 (Yvon, et al.,

1999) (Lyseng-Williamson and Fenton, 2005)。

另外還有標靶治療，例如: getfitinib (商品名: iressa) (AstraZeneca, UK) 和 erlotinib (商品名: tarceva) (Schwarz Phama Manufacturing, USA) (Kobayashi, et al., 2012)。其作用機轉是表皮生長因子（epidermal growth factor receptor, EGFR）的酪胺酸激酶抑制劑（tyrosine kinase inhibitors, TKI）(EGFR-TKIs) 臨床研究證實，EGFR-TKIs 治療的效果較細胞毒殺性化學治療好 (Maemondo, et al., 2010) (Mok, et al., 2009) 。EGFR-TKIs 的治療特別針對 EGFR 敏感的突變的非小細胞肺癌 (Shepherd, et al., 2005) (Johnson, et al., 2005) (Maemondo, et al., 2010) (Mok, et al., 2009) (Inoue, et al., 2006)。

但是這些化療藥物卻會產生許多副作用，例如: Cisplatin 容易會造成周邊神經病變 (Nodera, et al., 2011)、聽力喪失 (Ding, et al., 2011)、腎毒性 (Sahu, et al., 2011) 等。由於不同的藥物會產生不同的副作用，在臨床治療上會根據病患的狀況給予不同的藥物治療。因此，在抗癌新藥的追求上是一直持續不斷的。

(3) 具有抗癌功效的天然三環氧化物 — Triptolide

根據先前的研究發現，由中草藥雷公藤甲素所萃取出的天然三環氧化物 triptolide，具有抗癌的功效。研究指出 triptolide 能抑制裸鼠中

的人類乳癌細胞 (Shamon, et al., 1997) 和倉鼠中的人類膽管癌細胞 (Jiang, et al., 2001) 的生長。Triptolide 在乳癌 MDA-435 細胞的生成中，抑制癌細胞的增生是藉由減少細胞週期促進因子 (cell-cycle promoting factors)，例如: cyclin A, B1 和 D1 (Yang, et al., 2003)。在人類的纖維肉瘤 HT-1080 細胞中 (Fidler, et al., 2003) 和人類的前列腺腺癌 (Kiviharju, et al., 2002)，triptolide 會使細胞週期停滯在 S 期。

由於 teroxirone 和 triptolide 在結構上都具有三個環氧結構 (triglycyl)， 鑒於天然的三環氧化物具有抗癌的效果，推斷合成的三環氧化物，也應具有抗癌的效果。實驗設計以非小細胞肺癌當作試驗對象，研究 teroxirone 的抗癌功效及其詳細的分子作用機制。

(4) α-1,3,5-triglycidyl-s-triazinetrione (teroxirone) 相關研究及副作用

Teroxirone (α-TGT or NSC 296934) 是在 1968 年合成的三環氧化物，其作用為 alkylator，它會和 DNA 的鹼基共價結合，以烷基取代 DNA 上的氫原子，造成 DNA 無法複製 (Neidhart, et al., 1984)。Teroxirone 是一個三環氧化物，可分為:α-和 β-stereoisomers (Atassi, et al., 1980) (Atassi, et al., 1980) 由 Budnowki 所合成，其組態分別為 (R,R,S/S,S,R)和 (R,R,R,/S,S,S) (Budonowski, 1968) 。根據先前的研究，這兩個 teroxirone 立體異構物都具有很好的抗癌功能，但是

α-stereoisomers 相對於 β- stereoisomers 在水中有更好的溶解度 (Ames, et al., 1984) ，且更能增加動物的存活率、延長動物的壽命 (Wu et al., 1982) 。

Teroxirone 先前在歐美已經過臨床實驗第一期，它對 P388 和 L1210 型的白血病具有強烈的細胞毒殺性。當 P388 和 L1210 型的白血病對另一 alkylator ， cyclophosphamide 具有抗藥性的時候， teroxirone 卻會對抗 cyclophosphamide 的 P388 和 L1210 型白血病細胞具有療效 (Wu and Pecq, 1982)。

根據先前藥物動力學的實驗結果顯示，teroxirone 的測試極限劑量為 15 ng/ml (n=10)，且相關係數達 0.99 以上。而在受試者體內的代謝速度則是 240 mg/sq。根據九位受試者所得的實驗結果，teroxirone 在體內的半衰期平均是 1.4 分鐘，全身代謝平均則需 5.7 liters/min，每位受試者施打藥物平均體積為 17.9 liters。可將 1 mM 的 Teroxirone 和肝臟的微粒體 (microsome) 一起培養，而所謂微粒體是由磷脂雙層膜形成的小體 (Yamada, et al., 2001)，不論 $NADP^+$ 存在與否，teroxirone 含量都會快速下降；若沒有和微粒體一起培養，則 teroxirone 就不會消失，因此可以推論 teroxirone 的代謝是藉由微粒體的酵素作用。因為 teroxirone 在體內的代謝很快速，因此必須藉由持續動脈注射進行醫療 (Ames, et al., 1984) 。

實驗也發現，當病人接受最高限制劑量 (340 mg/m^2/day X 5) 的 teroxirone 時，會產生靜脈炎和黏膜皮膚的現象，而噁心、嘔吐和骨髓抑制 (myelosuppression) 等情形則是不受劑量限制，會一直存在的副作用 (Neidhart, et al., 1984) 。

(5) DNA 損傷會造成細胞週期停滯，導致細胞凋亡

細胞週期的基本功能就是準確的複製染色體中 DNA，然後進行分裂，產生兩個完全相同的子代細胞。在細胞週期中，這個過程可以分為兩個部分，染色體的複製是在 S 期 (DNA synthesis)，大約需要 10 至 12 小時，占了整個細胞週期的一半時間。其次，染色體分離、細胞分裂則是 M 期 (mitosis) 。

啟動細胞週期主要是藉由 cyclin-dependent kinases (CDKs) ，它是屬於 serine/threonine 家族的激酶。若是 CDK 沒有作用，細胞就無法進入 S 期。細胞必須藉由許多 CDK 產生一連串的活化以完成整個細胞週期 (Satyanarayana and Kaldis, 2009)。為了達到催化的作用，CDKs 需要和 cyclin subunit 做結合，或者也可藉由內生性抑制劑，例如: CDK inhibitor 1A ($p21^{CIP1}$) 和 CDK inhibitor 1B ($p27^{KIP1}$) 這些控制 G_1/S 期的相關蛋白，分別抑制 CDK 的作用 (Malumbres and Barbacid, 2009) 。

一般細胞產生明顯的 DNA 損傷時，需要有一個機制來阻止細胞週期的進行，讓細胞停留在控制點，細胞內兩個主要的控制點分別是 G_1/S 和 G_2/M。控制點的激酶為 ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) 和 ATR (ATM- and Rad3-related)，它們透過受動器激酶 (effector kinase) : CHK1 和 CHK2 進行調節，抑制 CDKs 的活性和細胞週期的進程 (Takaki, et al., 2008) 。基因的不穩定及突變機率上升，容易使 DNA 損傷產生，若是 DNA 修復不能順利進行，就會發生病變 (Stratton, et al., 2009) (Halazonetis, et al., 2008) 。

大多數的致癌基因和抑癌基因都能調控細胞週期的進程。但是癌細胞卻能抑制控制點的調控，導致增生無法受到控制 (Dibb and Ang, 2011)，例如: INK4 family 中，*p16* 的啟動子 (promoter) 被甲基化之後，使得 *p16* 的轉錄作用減少，降低基因表現。*p16* 是 CDK 的抑制劑，當 *p16* 喪失功能時，導致細胞增生無法被控制，進而生成癌細胞 (Wajed, et al., 2001) 。

(6) p53 與 DNA 損傷的影響

DNA 損傷反應 (DNA damage response, DDR) 可以保護細胞基因組的完整性，避免癌症的形成 (Jackson and Bartek, 2009)。當發生細胞代謝、UV 光照射、離子輻射、化學物質、基因複製錯誤等情況

時，容易產生 DNA 損傷。其後，細胞則會活化細胞週期的控制點、轉錄機制活化、DNA 修補，還有細胞凋亡 (Harper and Elledge, 2007)。DNA 損傷，會促使細胞產生細胞週期停滯和修補。若損壞擴大致不能修復 DNA，則會引發細胞凋亡 (Zou, et al., 2011)。

DNA 損傷劑 (DNA damaging agents) 的能力，是藉由 p53 的調控而誘發細胞凋亡 (Mayo, et al., 2005)。當藥物讓細胞產生 DNA 損傷，會導致修補基因 ATM/ATR 的表現上升，接著則有兩種路徑可以進行，一條路徑與 p53 相關，另一條路徑則與 p53 沒有相關。若有，則 p53 會與 p21 及其他 p53 的下游基因表現量上升；若與 p53 沒有關，則細胞週期 G_2/M 的調控基因 cdc25 產生活化，導致細胞週期停滯在 G_2/M 期 (Harper and Elledge, 2007)。

(7) p53 在 DNA 損傷、 細胞週期停滯及細胞凋亡中所扮演的角色

p53 在人類癌症中經常發生突變，約有一半以上的癌症有不具活性的 p53 (Soussi and Beroud, 2001)。p53 蛋白有很多的生物功能，包括調控細胞週期、細胞凋亡、老化、代謝、血管增生、細胞分化和免疫反應 (Suzuki and Matsubara, 2011)。

p53 是腫瘤抑制基因，它會抑制癌細胞的細胞週期前進或者誘發細胞凋亡，也會對一些細胞壓力，例如: DNA 損傷，產生反應。若

p53 活性下降，導致 DNA 損傷在細胞中累積，或者，p53 產生突變，喪失原本的功能，都會促進癌症的發生 (Suzuki and Matsubara, 2011)。

p53 可以用來偵測 DNA 損傷，當它偵測到 DNA 損傷時，便會誘導細胞凋亡或者是細胞週期停滯 (Hanahan and Weinberg, 2000)。在小鼠中，有一個 p53 基因突變是脯胺酸區域的缺失，會使小鼠誘導細胞週期停滯的功能喪失，但卻保留了誘導細胞凋亡的功能，由此可知 p53 促進細胞凋亡的功能，相較於誘導細胞週期停滯，p53 在抗癌功用上極重要 (Suzuki and Matsubara, 2011)。

p53 抑制腫瘤的形成不只是藉由調控 *bax* 基因誘導細胞凋亡，還有引起細胞週期停滯，例如: p53 會透過 CDK inhibitor p21 的轉錄與活化，引起 G_1 期的停滯 (Giono and Manfredi, 2006)。p53 也可以控制 G_2/M 的停滯，藉由抑制 G_2/M 的控制點 cdc2，阻止細胞進入有絲分裂。cdc2 必須和 cyclin B1 作結合才具有功能，所以 p53 抑制 cyclin B1，達到抑制 cdc2 的目的，同時也讓細胞停滯在 G_2/M 期 (Taylor and Stark, 2001) 。

(8) 細胞凋亡

在哺乳動物和其他脊椎動物上有兩條訊息傳遞路徑與細胞凋亡

相關，一是內在途徑 (intrinsic pathway)，又稱 Bcl-2 家族調控 (Bcl-2 family regulated) 或粒線體 (mitochondrial) 途徑；另一則是外在途徑 (extrinsic pathway)，又稱死亡受體 (death receptor) 途徑 (Strasser, et al., 1995)。當上游的細胞死亡訊息開始傳遞後，這兩條細胞凋亡路徑就會分別活化下游的caspase，導致酵素CAD (caspase activated DNAse) 降解細胞的 DNA。這些 caspase 的活化會導致細胞有秩序的分解，例如:染色質濃縮、細胞膜產生泡化等，進而導致細胞凋亡 (Hengartner, 2000)；(Salvesen and Dixit, 1997)；(Shi, 2002) 。

生長因子的喪失、大範圍的細胞毒殺性壓力、DNA 損傷或缺氧等因素，都可能會啟動內在途徑 (Hengartner, 2000)；(Strasser, et al., 2000)；(Youle and Strasser, 2008) 。內在途徑中有一群重要的蛋白質，Bcl-2 家族，大約有 15 個以上的複合物，可分為兩大部分: 促生存 (pro-survival) 和促凋亡 (pro-apoptotic) (Youle and Strasser, 2008) 。促生存的部分有: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1 和 Boo/Diva (Muchmore, et al., 1996) 。促凋亡則又分為 multi-BH domain protein 有 Bax、Bak、Bok/Mtd (Suzuki, et al., 2000)；BH-3 only protein 包括 Bim/Bod、Puma/Bbc3、Bid、Noxa/Pmaip1、Bad、Hrk/DP5、Bmf 和 Bik/Blk/Nbk (Huang and Strasser, 2000) (Youle and Strasser, 2008)。

訊息經由內生途徑，會造成 BH3-only protein 的活化，再藉由轉

錄與後轉譯機制使 BH3-only protein 和 Bcl-2 pro-survival protein 作用，讓 Bax 和 Bak 被釋放，導致粒線體外膜通透。接著 cytochrome c 會從粒線體的外膜釋放出來，同時還伴隨著 Apaf-1 和 dATP，它們會使 caspase-9 受到活化，誘導下游的 caspases-3、6 及 7 活化，讓細胞進行凋亡 (Kelly and Strasser, 2011) 。

而外在途徑則是藉由細胞膜上的死亡受體 (death receptor)，FADD (FAS-associated death domain)，受到 death ligand 刺激後，形成 DISC (death-inducing signaling complex)，使 caspase-8 活化，然後誘導下游的 caspases-3、6 及 7 活化，傳遞細胞凋亡的訊號，導致細胞凋亡的產生 (Kelly and Strasser, 2011)；(Ashkenazi and Dixit, 1999)。

Caspase 是細胞凋亡的過程中，重要的訊息傳遞者 (Porter and Janicke, 1999)。雖然人類身上有 14 種 caspase 蛋白 (Cryns and Yuan, 1998)；(Van de Craen, et al., 1998)，但在不同細胞接受不同刺激會活化不同的 caspase 蛋白。然而 pro-caspase-3 通常會藉由自身蛋白水解而分裂或者是藉其他的蛋白而導致水解活化 (Faleiro, et al., 1997)；(Martins, et al., 1997)；(Polverino and Patterson, 1997)，所以 caspase-3 在細胞凋亡的過程中所扮演的角色，相對於其他 caspase 蛋白是較為活躍的 (Porter and Janicke, 1999)。

2. 研究目標

先前的研究主要是以 teroxirone 的動物實驗及人體實驗，觀察它是否具有任何抗癌功能，在活體內代謝的速度及對人體的副作用。但是對 teroxirone 影響細胞內訊息傳遞的分子機制相關的研究則沒有任何報導。

由於 p53 是重要的腫瘤抑制基因，如果能夠控制 p53 的表現將可以有效幫助新抗癌藥物的發展。本論文的研究目的是發展低劑量，具有毒殺肺癌細胞的小分子藥物 teroxirone，目標是誘導 NSCLC 細胞凋亡的產生，同時也期望瞭解這個現象是否與 p53 訊息傳遞路徑有關。

二.材料與方法

1. 細胞株

本研究以 H460、H1299 以及 A549 這三株非小細胞肺癌細胞進行實驗。H460 與 A549 均為 p53 野生型 ($p53^{+/+}$) 的細胞株 (Duarte, et al., 2009)，H1299 是缺乏 p53 基因 ($p53^{-/-}$)的突變株 (Osaki, et al., 2000)。其中 H460 (Swennen, et al., 2010) 和 H1299 (Osaki, et al., 2000) 是屬於未分化大細胞癌，而 A549 則是腺癌 (Guo, et al., 2004)。

2. 細胞培養

細胞以含有 10% (v/v) 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培養於含 5% CO_2、37℃ 的培養箱中。

細胞繼代時，先移除舊培養液，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，以培養液中止 trypsin-EDTA 的作用，緩慢將細胞從培養盤上打下來，取適量的細胞放置於新的 10 公分培養盤。

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 培養液將細胞混勻，取出 10 µl 以 trypan

blue 作稀釋和染色，最後以顯微鏡觀察並計數

3. 新藥物的開發與研究

根據現有的參考文獻，在一開始要判斷此藥物對癌細胞的存活率是否有影響，可以使用 MTT 分析或者是細胞群落形成分析 (colony forming assay)，來做初步觀察藥物對細胞存活率的影響。若結果顯示藥物對癌細胞的存活率有明顯的抑制效果，可以接著以 comet assay 觀察有無 DNA 損傷的現象 (Moretti, et al., 2011)。判斷細胞存活率的下降是否和細胞週期停滯有關，再測試是否有細胞凋亡的跡象，這部分以 PI 將細胞染色並以流式細胞儀分析 sub G_1、G_0/G_1、S、G_2/M 期在整個細胞週期中的變化，並以 PI 和 annexin V 做雙染，觀察細胞凋亡的程度。同時可以西方轉漬法 (western blot) 來看細胞內與細胞週期相關基因的表現，例如: p53、p21、caspase 3、PARP 等。並且可以 DNA 片段化 (DNA fragmentation) 做進一步的確認，確認藥物使細胞存活率下降是因為細胞凋亡的關係。最後以進行動物實驗來確定藥物治療癌症的效果 (Selvendiran, et al., 2010);(Lee, et al., 2012) 。

4. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

(MTT) assay

取 1.5x10^3 個細胞，置於 96 孔培養盤中，在培養箱中培養 24 小時，讓細胞貼附於盤底。24 小時之後將舊的培養液移除，再放入含待測藥物的新培養液，此時的藥物濃度分別為 2、5 和 20 μM。48 小時後，將含待測藥物的培養液移除，再同時加入 80 μl 培養液以及 10 μl 的 MTT 試劑，置於培養箱中 3 小時。將含有 MTT 的培養液移除，加入 100 μl 的 dimethyl sulfoxide (DMSO)，待紫色結晶溶解後，以光電比色計 (BioRad) 測試樣品在波長 540 nm 下的吸光值。

5. 細胞群落形成分析 (Colony forming assay, CFA)

H460 細胞取 1,500 顆、H1299 細胞取 200 顆、A549 細胞取 500 顆，分別置於 12 孔培養盤中，培養 24 小時待細胞貼附於盤底後，移除培養液，再加入含待測藥物的新培養液，藥物濃度分別為 0.2、0.5 及 1 μM。48 小時後，將含待測藥物的培養液移除，放入新的培養液，培養 10 天後，將細胞以 2% (w/v) 結晶紫 (crystal violet) 染色 10 分鐘。

6. Single cell gel electrophoresis (SCGE/Comet assay)

當細胞的 DNA 受到損傷時，經單細胞凝膠電泳實驗後，會產生細胞拖尾，若細胞拖尾長度越長，則表示 DNA 損傷越嚴重 (Sorte, et al., 2011);(Olewinska, et al., 2010)。

取 $3x10^4$ 個細胞，置於 12 孔培養盤中，培養 24 小時待細胞貼附於盤底後，移除培養液，加入含待測藥物的新培養液，藥物濃度分別為 0.5、1 及 2 μM。分別在 4、8 及 12 小時後，移除培養液，用 PBS 清洗細胞後，加入 trypsin-EDTA 將細胞收集到 1.5 ml 微量離心管 (eppendorf) 中，以 13,000 rpm. 離心 15 分鐘，去除上清液，加入 30 μl PBS 將細胞回溶。

取 70 μl 下層膠 (0.5% low melting point agarose (LMP) (Bethesda Research Laboratories)、0.5% normal melting point agarose (NMP) (汎德儀器有限公司)) 置於載玻片上，並以蓋玻片覆蓋在膠體上，以協助固定膠體形狀，待下層膠凝固後拿下蓋玻片。將 70 μl 上層膠 (0.5% LMP agarose) 和樣品混勻，再取 70 μl 放在已凝固的下層膠上，同樣再覆蓋上蓋玻片以固定形狀，待上層膠凝固後，取下蓋玻片 。

接著配製新鮮的 lysis buffer (2.5 M NaCl、10 mM Tris - HCl、0.1 M EDTA、1% (v/v) Triton X–100、pH 值約 8 至 10，pH 值調好之後再加入 1% (v/v) Triton X–100)，將製做好的載玻片樣品置於 lysis buffer 中，

在冰上浸泡 1 小時。將載玻片樣品移置 alkaline buffer (0.3 M NaOH、1 mM EDTA)，於冰上浸泡 20 分鐘。接著將載玻片樣品置於電泳槽中，且將電泳槽放在冰上，並以 alkaline buffer 作為電泳液進行電泳 30 分鐘 (25V； 300 mA)。電泳結束後，將載玻片樣品移置 neutralizing buffer (0.4 M Tris buffer，pH 7.5)，在冰上浸泡 15 分鐘，最後，將在玻片樣品浸泡在甲醇中 5 分鐘。

在載玻片樣品上，加上 PI (5 µg/ ml) 後，以螢光顯微鏡觀察與拍照。再利用 Comet Score™ software (TriTek Corp., Sumerduck, VA, USA) 分析樣品的「尾矩」（Tail Moment, TM），也就是拖尾部分的 DNA 在總 DNA 中所佔的百分比與頭尾部中心間距的乘積，並用數值量化表示 (Sorte, et al., 2011)。

7. 以 propidium iodide (PI) 染色觀察細胞週期分布

取 $2x10^5$ 個細胞，置於 12 孔培養盤中，培養 24 小時待細胞貼附於盤底後，移除培養液，加入含待測藥物的新培養液，藥物濃度分別為 1、2 及 5 µM。分別經過 24、30 及 36 小時後，將培養液收到 15ml 離心管中，用 PBS 清洗細胞，並收到離吸管，再用 trypsin-EDTA 將細胞收集到離心管中，最後再用 PBS 將 12 孔培養盤中殘餘的細胞收到離心管中。以 1,200 rpm、5 分鐘離心，移除上清液，再用 PBS 將

細胞清洗兩次、離心、移除上清液後，加入 70%酒精，以固定細胞。置於 -20℃ 冰箱，16 小時之後即可上機。

將樣品從 -20℃ 冰箱取出，離心之後去掉上清液，再用 PBS 將細胞清洗兩次，離心後去掉上清液，加入含有 10 µl PI (0.5 mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO) 及 10 µl RNase A (20 mg/mL) (ICN Pharmaceutical；Costa Mesa, CA) 的 1 mL PBS，於室溫下避光 30 分鐘。

將樣品過篩網後，以流式細胞儀 (Becton-Dickson, Mansfield, MA) 進行實驗，並用 Modfit 軟體 (Becton-Dickson, Mansfield, MA) 分析數據。

8. 以 propidium iodide (PI) 和 Annexin V 雙染色觀察細胞凋亡

取 $2x10^5$ 個細胞，置於 12 孔培養盤中，培養 24 小時待細胞貼附於盤底後，移除培養液，加入含待測藥物的新培養液，藥物濃度分別為 5 及 10 µM。經過 48 小時後，先將培養液收到 15 ml 離心管中，用 PBS 清洗細胞，並收到離吸管，再用 trypsin-EDTA 將細胞收集到離心管中，最後再用 PBS 將 12 孔培養盤中殘餘的細胞收到離心管中。以 1,200 rpm、5 分鐘離心，移除上清液，再用 PBS 將細胞清洗兩次、離心、移除上清液後，加入含有 0.5 µl PI (50 µg/mL) (BD, Cat. 556547) 及 0.5 µl Annexin-V FITC (20µg/mL) (BD, Cat. 556547) 的 100 µl 1x

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) 進行實驗。將 x 軸設定為 FL-1，代表是綠光 (annexin-V)，y 軸則是 FL-2，代表紅光 (PI)，並用 WinMDI 2.9 軟體 (Windows Multiple Document Interafce for Flow Cytometry) 分析四象限數據，左下角定義為未受藥物影響的細胞 (Healthy cells)，右下角為早期細胞凋亡，右上角為晚期細胞凋亡，左上角為細胞壞死。

9. DNA 片段化 (DNA fragmentation)

取 $1x10^6$ 個細胞，置於 6 公分培養盤中，培養 24 小時待細胞貼盤後，移除培養液，加入含待測藥物的新培養液，藥物濃度分別為 5、10 及 20 μM。經過 48 小時後，先將培養液收到 15 ml 離心管中，用 PBS 清洗細胞，並將 PBS 收到離吸管，再用 trypsin-EDTA 將細胞收集到離心管中，最後再 PBS 用將 6 公分培養盤中殘餘的細胞收到離心管中。以 1,200 rpm、5 分鐘離心，移除上清液後，加入 500 μl lysis buffer (0.1M NaCI、10 mM Tris-HCI (pH 7.5)、10 mM EDTA、0.5 % SDS、500 μg/ml 蛋白酶 K) 將沉澱物混勻，同時將樣品移至 1.5 ml 微量離心管中，於 37℃ 水浴 24 小時。再加入相同體積的酚:氯仿 (v/v = 1:1) 混勻後，4℃ 離心 10,000 rpm、5 分鐘，然後取上層水相到新的微量離心管中，此步驟要避免取到中間的蛋白質。再用酚:氯仿 (v/v = 1:1)

第二次混勻，離心、去掉上清液。加入同體積的氯仿，混勻、離心、去掉上清液。以十分之一體積的3M NaOAC和兩倍體積的無水乙醇，在室溫下混勻 18 小時。然後 4℃ 離心 12,000 rpm、60 分鐘，去掉上清液，以 100 µl 75%酒精沖洗細胞，4℃ 離心 12,000 rpm、 60 分鐘，去掉上清液。等沉澱物乾燥後，以含有 200 µg/ml RNase 的 TE buffer (10 mM Tris-HCI, 1 mM EDTA, pH8.0) 回溶 DNA。

以光譜儀 (NanoDrop, ND-100, General Campus, Ottawa) 測量樣品所含的 DNA 濃度。用含有 1% agarose 的膠片進行 DNA 電泳，然後置於 EtBr 中進行染色，最後用照膠器，以紫外光照相，觀察 DNA 的情況。

10. 以 caspase 抑制劑抑制細胞凋亡

N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al (DEVD-CHO, Sigma, St. Louis, USA；A0835) 是一合成的 caspase-3 專一性抑制劑，可用來確定細胞凋亡是否和 caspase-3 有關 (Mashima, et al., 1995)；(Nicholson, et al., 1995)；(Patel, et al., 1996)。

取 $1.5x10^5$ 個 H460 或 H1299 細胞，置於 12 孔培養盤中，培養 24 小時待細胞貼盤後，移除培養液，加入含 10 µM caspase-3 抑制劑的新培養液，作用 24 小時。再將培養液換成含 5 µM 待測藥物的新培養液，作用 24 及 36 小時後，將細胞收集到離心管中。再以前述第

7 點相同的方式為樣品作前處理，以及利用流式細胞儀分析樣品。

取 $1.5x10^5$ 個 A549 細胞，置於 12 孔培養盤中，培養 24 小時待細胞貼盤後，移除培養液，加入含 10 μM caspase-3 抑制劑的新培養液，作用 12 小時。再將培養液換成含 5 μM 待測藥物的新培養液，作用 36 及 48 小時後，將細胞收集到離心管中。再以前述第 7 點相同的方式為樣品作前處理，以及利用流式細胞儀分析樣品。

三.結果

1. Teroxirone 會抑制非小細胞肺癌細胞的增生

本研究先以 MTT assay 測試不同的藥物是否能有效抑制非小細胞肺癌細胞的增生，包括: teroxirone (Fig 2A.)、 KCY (Fig 2B.)、 KC1 (Fig 2C.)、 KC009 (Fig 2D.)、 2-007 (Fig 2E.)、 B008 (Fig 2F.)、 B011 (Fig 2G.)。其中，Teroxirone、 KCY、 KC009 和 KC1 所使用的濃度為 2、5 及 20 μM，而 2-007、 B008、 B011 所使用的濃度為 10、20 及 50 μM。

首先分別以 2、5 及 20 μM 的 teroxirone 對 H460、H1299 及 A549 細胞反應 48 小時之後，檢視細胞的存活率。實驗結果顯示 2 μM 的濃度就能夠明顯抑制這三株細胞的存活率，而對這三株細胞的存活率都隨著 teroxirone 的濃度上升而下降 (Fig 2A.)。其中，尤以 H460 細胞對 teroxirone 最為敏感，其 IC_{50} 約在 5 μM； A549 細胞 5 μM 的時候細胞存活率約在 65%；最不敏感的是 H1299 細胞，其細胞存活率在 5 μM 的時候約在 70%。由 MTT assay 的實驗結果顯示，低濃度的 teroxirone 就能夠對非小細胞肺癌細胞的存活率造成不同程度的影響。

H460 和 H1299 細胞以 KCY 測試的結果顯示，在低濃度的時候

細胞存活率都在 70%以上，到 20 μM，細胞存活率降到 20%左右，而 A549 細胞在低劑量的時候細胞存活率也都在 70%以上，即使到 20 μM 的時候，細胞存活率也在 70%左右 (Fig 2B.)。KC1 (Fig 2C.) 和 KC009 (Fig 2D.) 對 H460、H1299、A549 這三株細胞均無抑制存活率的效果，在 20 μM 的時候，存活率高達 80%左右。

藥物 2-007 (Fig 2E.)、B008 (Fig 2F.) 對 H460、H1299、A549 這三株細胞不論劑量的高低，細胞的存活率並無明顯差異。其中 2-007 對 H460 細胞以不同濃度作用 48 小時，其細胞存活率都在 60%左右，H1299 和 A549 細胞存活率都在 70%左右。B008 (Fig 2F.) 則是讓 H460 細胞的存活率在 50%，H1299 和 A549 細胞存活率都在 70%。B011 對 H460 細胞以 10、20 及 50 μM 作用 48 小時，細胞存活率分別是 80%、50%、40%；H1299 和 A549 細胞的存活率都 70%以上。

從另一方面可以證實 teroxirone 確實可以抑制非小細胞肺癌細胞的增生。利用細胞群落形成分析實驗探討 teroxirone 對 H460、H1299 及 A549 三株細胞都具有抑制增生的能力 (Fig 3A.)。實驗以 0.2、0.5 及 1 μM 反應 48 小時，H460 細胞在 0.2 μM 的 teroxirone 反應下，就會完全被抑制細胞的增生。H1299 細胞在 0.5 μM 才會開始抑制細胞的增生，使細胞群落數下降到 70 %，在 1 μM teroxirone 反應之下，細胞群落數只剩 8%。A549 細胞在 0.2 μM 的 teroxirone 反應之下，細

胞群落數開始減少，下降到 83%，當 teroxirone 濃度提高到 0.5 μM，細胞群落數只剩 35%，在 1 μM 的 teroxirone 反應下，A549 細胞群落數只有 6% (Fig 3B.)。

2. 低濃度的 teroxirone 造成非小細胞肺癌細胞產生不同程度 DNA 的損傷

對 H460、H1299 及 A549 三株細胞，以不同程度的 teroxirone 反應 4、8 和 12 小時。若細胞對 teroxirone 敏感，則增加藥物濃度或反應時間都會增加細胞拖尾長度。

經過 4 小時，H460 細胞就已經可以看到明顯 DNA 拖尾，且細胞拖尾的程度，隨著藥物濃度上升，拖尾長度越長。拖尾程度也隨著時間的拉長越為明顯在 12 小時部分最高 (Fig 4.)。

H1299 細胞在較低劑量 0.5 及 1 μM 及較短作用時間 4 和 8 小時下，其細胞並沒有產生 DNA 拖尾。要在較高劑量及較常作用時間下，也就是在 1 和 2 μM 作用 12 小時，才會有明顯的拖尾 (Fig 5.)。

A549 細胞則在作用 4 小時，就會產生 DNA 拖尾，且作用時間越長，拖尾長度也較明顯。A549 細胞於 teroxirone 作用 12 小時候，拖尾的程度最高 (Fig 6.)。

3. Teroxirone 會先讓非小細胞肺癌細胞的細胞週期停滯在 S 及 G_2/M 期，接著再使 sub G_1 細胞數增加

H460、H1299 及 A549 這三株細胞，以 1、2 及 5 μM，分別反應 24、30 及 36 小時。經實驗發現，雖然較低濃度的 teroxirone 不會使細胞的 sub G_1 上升，但都可以使 S 及 G_2/M 細胞數量明顯增加。

當 H460 細胞加了 1 μM teroxirone 反應 24 小時，就開始可以看到 S 及 G_2/M 的細胞數明顯增加，而 G_0/G_1 的細胞數開始減少。隨著濃度上升及作用時間的增加，在 5 μM teroxirone 作用 36 小時，sub G_1 細胞的數量增加到 10 %左右 (Fig 7.)。

H1299 細胞在 1 μM teroxirone 作用 24 小時後，其 S 及 G_2/M 的細胞數開始上升，G_0/G_1 期開始下降。但是隨著作用時間的拉長及 teroxirone 的濃度上升，H1299 細胞的 sub G_1 值並沒有顯著增加 (Fig 8.)。

A549 細胞在以 1、2 及 5 μM 的 teroxirone，分別作用 24、30 及 36 小時。sub G_1 細胞數量沒有增加，與對照組沒有明顯差異，約在 2%，S 及 G_2/M 的細胞數目也沒有顯著增加，約在 50%，細胞週期沒有受到影響。因此，本實驗將 teroxirone 的反應時間拉長至 48 小時，以 5 μM teroxirone 作用 48 小時， sub G_1 細胞數量明顯增加 (Fig 9.)。

4. Teroxirone 會導致有 p53 基因的非小細胞肺癌細胞產生細胞凋亡

(一)以二維流式細胞儀檢視

以 5 和 10 μM 的 teroxirone 對 H460、H1299 和 A549 三種細胞作用 48 小時。結果可以看到 H460 細胞經 teroxirone 作用後，產生細胞凋亡，且主要是晚期的細胞凋亡，晚期細胞凋亡的細胞數從 5 μM teroxirone 作用下的 27 %上升到 10 μM teroxirone 作用下的 51 %。相對於晚期的細胞凋亡數目，早期的細胞凋亡數目都在 15 %以下 (Fig 10.)。

A549 細胞經 teroxirone 作用後，也會產生細胞凋亡，但和 H460 細胞不同的是，A549 細胞主要是早期的細胞凋亡 ，早期細胞凋亡的細胞數從 5 μM teroxirone 作用下的 17 %上升到 10 μM teroxirone 作用下的 32 % ，而晚期的細胞凋亡數目都在 6 %以下 (Fig 11.)。此外，teroxirone 不會使 H1299 細胞產生細胞凋亡 (Fig 12.)。

(二)檢視 DNA 片段化

當細胞產生細胞凋亡時，其 DNA 會斷裂成 180 至 200 的 bps，此時以洋菜膠電泳的方式分離，會觀察到 DNA 斷裂形成階梯狀，產生 DNA 階梯 (DNA ladder) (Bonior, et al., 2012)。

本研究以 5、10 及 20 μM 的 teroxirone，分別對 H460、H1299 和

A549 三種細胞作用 48 小時。H460 細胞從 5 μM 開始就可以看到 DNA 階梯。且隨著 teroxirone 濃度上升，DNA 階梯就愈益明顯。而 H1299 細胞沒有看到 DNA 階梯。A549 則是在 10 μM 的時候，看到 DNA 階梯 (Fig 13.)。

5. DEVD-CHO 可以抑制由 teroxirone 所誘導的細胞凋亡

這部分的實驗分為四組，分別是: (1) 對照組、(2) 以 5 μM teroxirone 作用、(3) 10 μM DEVD-CHO 作用後，再用 DMSO 處理、(4) 10 μM DEVD-CHO 作用後，再用 5 μM teroxirone 處理。

H460 細胞在 5 μM teroxirone 的反應時間分別為 24 與 36 小時，並另以 10 μM DEVD-CHO 事先反應 24 小時。H460 細胞在 24 小時的部分，加了 5 μM teroxirone 之後 sub G_1 的細胞數增加，G_0/G_1 的細胞數減少而 S 及 G_2/M 的細胞數有明顯增加。10 μM DEVD-CHO 作用 24 小時後，再用 5 μM teroxirone 處理 24 小時，sub G_1 的細胞數明顯減少，G_0/G_1 的細胞數增加，S 及 G_2/M 的細胞數則是減少 (Fig 14A.)。H460 細胞在 36 小時的部分，加了 5 μM teroxirone 之後 sub G_1 細胞數有明顯增加，G_0/G_1 的細胞數減少而 S 及 G_2/M 的細胞數增加。10 μM DEVD-CHO 作用 24 小時後，再用 5 μM teroxirone 處理 24 小時，sub G_1 細胞數也有明顯減少，G_0/G_1 的細胞數增加，S 及 G_2/M 的細胞數

則是減少 (Fig 14B.)。

H1299 細胞在 5 μM teroxirone 的反應時間分別為 24 與 36 小時，並另以 10 μM DEVD-CHO 事先反應 24 小時。H1299 細胞在 24 及 36 小時同樣都有加了 5 μM teroxirone 之後，G_0/G_1 細胞數目減少，S 及 G_2/M 細胞數目增加，而 sub G_1 細胞數沒有明顯改變的趨勢。結果顯示 DEVD-CHO 不會對 H1299 細胞產生影響 (Fig 15.)。

A549 細胞在 5 μM teroxirone 的反應時間分別為 36 與 48 小時，並另以 10 μM DEVD-CHO 事先反應 12 小時。A549 細胞在 36 小時的部分，加了 5 μM teroxirone 之後 sub G_1 細胞數增加，G_0/G_1 的細胞數減少而 S 及 G_2/M 的細胞數明顯增加。10 μM DEVD-CHO 作用 12 小時後，再用 5 μM teroxirone 處理 36 小時，sub G_1 的細胞數有減少，G_0/G_1 的細胞數增加，S 及 G_2/M 的細胞數則是明顯減少 (Fig 16A.)。A549 細胞在 48 小時的部分，加了 5 μM teroxirone 之後 sub G_1 的細胞數有明顯增加，G_0/G_1 的細胞數減少而 S 及 G_2/M 的細胞數明顯增加。10 μM DEVD-CHO 作用 12 小時後，再用 5 μM teroxirone 處理 48 小時，sub G_1 細胞數減少，G_0/G_1 的細胞數增加 ，S 及 G_2/M 的細胞數則是減少(Fig 16B.)。

四. 討論

1. Teroxirone 抑制非小細胞肺癌細胞的增生和 p53 基因有關

Teroxirone 在實驗的最低劑量 2 μM，就能有效抑制非小細胞肺癌細胞的增生，此結果以 H460 細胞最為顯著，更在 5 μM 的時候達到 IC_{50}，其次為 A549 細胞，最後是 H1299 細胞 (Fig 2A.)。這三株細胞中，H460 細胞和 A549 細胞都是有野生型 p53 的細胞株，而 H1299 細胞是沒有 p53 基因。因此，本研究推測，teroxirone 抑制非小細胞肺癌細胞的增生，應該是和 p53 的調控相關。若有 p53 基因，會對藥物較敏感，而導致存活率下降；若無 p53 基因，則細胞較不易受藥物影響 (Osaki, et al., 2000)。

由於 KCY 在低劑量無法使細胞存活率下降，而要到高劑量 (20 μM) 才可以使細胞存活率下降，不符合本研究對新藥研發的要求 (Fig 2B.)。2-007 與 B008 對 NSCLC 細胞作用 48 小時後，並沒有看到 NSCLC 細胞的存活率隨著藥物濃度上升而下降，所以判斷 2-007 和 B008 可能只是使非小細胞肺癌細胞的細胞週期停滯而導致活率下降。而 B011 雖然會使非小細胞肺癌細胞的存活率隨著藥物濃度上升，存活率下降，但效果不彰，要達到 IC_{50}，所需濃度高達 50 μM 以上 (Fig 2G.)，不符合本論文對治療癌症藥物低濃度的要求。

2. 低濃度的 teroxirone 造成非小細胞肺癌細胞產生不同程度 DNA 的損傷

Teroxirone 是一 alkylator 會造成 DNA 無法複製，因此 H460、H1299、A549 這三株細胞都會產生 DNA 損傷。三株細胞中以 H460 細胞拖尾長度最長，DNA 損傷的程度最嚴重 (Fig 4.)；其次是 A549 細胞 (Fig 6.)；DNA 損傷程度最輕的是 H1299 細胞 (Fig 5.)。推測 teroxirone 使非小細胞肺癌細胞產生 DNA 損傷的程度，和 p53 基因相關。當 p53 偵測到 DNA 損傷時，會誘導細胞凋亡 (Hanahan and Weinberg, 2000)，細胞產生凋亡會導致 DNA 被切成片段 (Bonior, et al., 2012)，因此經由單細胞凝膠電泳實驗可以看到，若有 p53 基因，在藥物測試後，會導致細胞拖尾長度較長；若無 p53 基因，則細胞拖尾長度較短。

3. Teroxirone 會先讓非小細胞肺癌細胞的細胞週期停滯在 S 及 G_2/M 期，接著再使 sub G_1 細胞數增加

DNA 損傷後會有三種反應: (1) 導致細胞週期停滯，(2) DNA 修補和 (3) 細胞凋亡 (van Vugt and Yaffe, 2010)。

當 H460 細胞以 teroxirone 處理 24 及 30 小時後，出現 S 及 G_2/M 期停滯，但是 sub G_1 細胞數量沒有增加，此時是細胞先讓細胞週期停滯，以爭取時間進行 DNA 的修補。但是若以 5 μM teroxirone 處理 36 小時，細胞無法進行 DNA 的修補，於是開始細胞凋亡，sub G_1 細胞數量明顯增加 (Fig 7.)。

H1299 細胞以 teroxirone 處理 24、30 及 36 小時後，出現 S 及 G_2/M 期停滯，但是 sub G_1 細胞數量沒有增加。H1299 細胞發生 DNA 損傷後，就進入細胞週期停滯，以修補受損的 DNA (Fig 8.)，而且 H1299 細胞沒有 p53 基因，所以不會進行細胞凋亡。

A549 細胞在實驗中，並不像 H460 和 H1299 細胞，在 24、30 及 36 小時就出現 S 及 G_2/M 細胞數增加，甚至 sub G_1 細胞數增加。本研究認為 A549 細胞對 teroxirone 的敏感程度較 H460 細胞低，需要更高的濃度或者將作用時間延長，才能使 A549 細胞出現 S 及 G_2/M 細胞數增加及 sub G_1 細胞數增加 (Fig 9.)。

4. Teroxirone 會導致有 p53 基因的非小細胞肺癌細胞產生細胞凋亡

本研究對 H460、H1299 及 A549 這三株細胞以 5 和 10 μM 的 teroxirone，作用 48 小時。接著將細胞以 PI 和 annexin-V 作雙染，以流式細胞儀觀察細胞是否有細胞凋亡，並以 DNA 片段化實驗確認

teroxirone 確實能使非小細胞肺癌細胞細胞凋亡。

DNA 損傷後，會藉由調控 p53 誘導細胞凋亡 (Mayo, et al., 2005)。H460 細胞主要是晚期的細胞凋亡 (Fig 10.)，而 A549 細胞則是早期的細胞凋亡 (Fig 11.)。這部分的雙染實驗可以印證 A549 細胞以 teroxirone 作用時間在 36 小時的時候，細胞週期在藥物處理後沒有明顯差異。

實驗結果觀察到 H460 細胞和 A549 細胞從 5 μM 開始到 20 μM 都有 DNA 階梯 (Fig 13.) ，但是 A549 細胞相對 H460 細胞卻較不明顯。本研究認為，因為 A549 細胞在 48 小時只有早期的細胞凋亡 (Fig 11.) ，所以在 DNA 片段化實驗中 DNA 階梯的現象較不明顯。

H1299 細胞由於沒有 p53 基因，所以 DNA 損傷後，是走 cdc25 路徑，使細胞週期停滯在 S 及 G_2/M 期 (Harper and Elledge, 2007)，相對於 H460 和 A549 細胞，較不受 teroxirone 的影響，所以 H1299 細胞加了 teroxirone 之後，不會產生細胞凋亡，也沒有 DNA 階梯。

5. DEVD-CHO 可以抑制由 teroxirone 所誘導的細胞凋亡

根據先前的實驗結果顯示 teroxirone 是藉由 p53 活化來誘導非小細胞肺癌細胞的細胞凋亡，而 caspase-3 是 p53 的一個下游基因，p53 基因活化誘使 caspase-3 活化，導致細胞凋亡 (Hattangadi, et al., 2004)。

本實驗認為若是能藉由抑制 p53 基因下游的 caspase-3 的活性，而使得細胞凋亡受到抑制，那麼便能藉由此結果，證實 teroxirone 誘導非小細胞肺癌細胞產生細胞凋亡，確實是和 p53 基因有關。

在 H460 和 A549 細胞的實驗中，可以看到在先以 10 μM DEVD-CHO 作用 24 小時，再以 5 μM teroxirone 處理的結果，sub G_1 細胞數明顯下降，而 S 及 G_2/M 的細胞數下降，G_0/G_1 的細胞數則是增加。

而 H1299 細胞若事先以 10 μM DEVD-CHO 先處理 24 小時，再加 5 μM teroxirone，不論是 24 或 36 小時，sub G_1 細胞數都沒有明顯改變，也沒有出現 S 及 G_2/M 的細胞數下降，G_0/G_1 的細胞增加。因為 H1299 細胞沒有 P53 基因，所以就不會藉由 DEVD-CHO 來抑制 caspase-3 的活性。

五. 參考文獻

Ames, M.M., Kovach, J.S. and Rubin, J. (1984) Pharmacological characterization of teroxirone, a triepoxide antitumor agent, in rats, rabbits, and humans, *Cancer Research*, **44**, 4151-4156.

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors, *Current Opinion in Cell Biology*, **11**, 255-260.

Atassi, G., *et al.* (1980) Antitumoral effect in mice of a new triepoxyde derivative: 1, 3, 5-triglycidyl-s-triazinetrione (NSC 296934), *European Journal of Cancer*, **16**, 1561-1567.

Baldi, A., *et al.* (2011) Tumor suppressors and cell-cycle proteins in lung cancer, *Pathology Research International*, Article ID 605042.

Bonior, J., *et al.* (2012) Long-lasting effect of infant rats endotoxemia on heat shock protein 60 in the pancreatic acinar cells: involvement of toll-like receptor 4, *International Journal of Inflammation*, Article ID 354904.

Chatelut, E. (2011) Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability, *Bulletin du Cancer*, **98**, 1253-1261.

Cryns, V. and Yuan, J. (1998) Proteases to die for, *Genes & development*, **12**, 1551-1570.

Dibb, M. and Ang, Y.S. (2011) Targeting the cell cycle in esophageal adenocarcinoma: an adjunct to anticancer treatment, *World Journal of Gastroenterology*, **17**, 2063-2069.

Ding, D., *et al.* (2011) Cisplatin ototoxicity in rat cochlear organotypic cultures, *Hearing Research*, **282**, 196-203.

Duarte, M.L., *et al.* (2009) Role of p53 in the induction of cyclooxygenase-2 by cisplatin or paclitaxel in non-small cell lung cancer

cell lines, *Cancer Letters*, **279**, 57-64.

Falchook, G.S., *et al.* (2011) Age-stratified phase I trial of a combination of bortezomib, gemcitabine, and liposomal doxorubicin in patients with advanced malignancies, *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, **69**, 1117-1126 .

Faleiro, L., *et al.* (1997) Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells, *The EMBO Journal*, **16**, 2271-2281.

Feng, B., Wang, R. and Chen, L.B. (2011) MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting Plk1, *Cancer Letters*, **317**, 184-191.

Fidler, J.M., *et al.* (2003) PG490-88, a derivative of triptolide, causes tumor regression and sensitizes tumors to chemotherapy, *Molecular Cancer Therapeutic*, **2**, 855-862.

Galano, G., *et al.* (2011) Efficacy and tolerability of vinorelbine in the cancer therapy, *Current Drug Safety*, **6**, 185-193.

Giannakakou, P., *et al.* (2001) Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity, *Oncogene*, **20**, 3806-3813.

Giono, L.E. and Manfredi, J.J. (2006) The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints, *Journal of Cellular Physiology*, **209**, 13-20.

Guo, M., *et al.* (2004) Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer, *Clinical Cancer Research*, **10**, 7917-7924.

Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G. and Bartek, J. (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development, *Science*, **319**, 1352-1355.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70.

Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2007) The DNA damage response: ten years after, *Molecular Cell*, **28**, 739-745.

Hattangadi, D.K., *et al.* (2004) Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell, *Biochemical Pharmacology*, **68**, 1699-1708.

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

Hsieh, J.L., *et al.* (2012) Acquisition of an enhanced aggressive phenotype in human lung cancer cells selected by suboptimal doses of cisplatin following cell deattachment and reattachment, *Cancer Letters*, **321**, 36-44.

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

Huang, P., *et al.* (1991) Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis, *Cancer Research*, **51**, 6110-6117.

Huisman, C., *et al.* (2002) Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460, *Clinical Cancer Research*, **8**, 596-606.

Inoue, A., *et al.* (2006) Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations, *Joural Clinical Oncology*, **24**, 3340-3346.

Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, **461**, 1071-1078.

Jiang, X.H., *et al.* (2001) Functional p53 is required for triptolide-induced apoptosis and AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in gastric

cancer cells, *Oncogene*, **20**, 8009-8018.

Jinturkar, K.A., *et al.* (2012) Liposomal formulations of Etoposide and Docetaxel for p53 mediated enhanced cytotoxicity in lung cancer cell lines, *Biomaterials*, **33**, 2492-2507.

Johnson, J.R., *et al.* (2005) Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen, *Clinical Cancer Research*, **11**, 6414-6421.

Kelly, G.L. and Strasser, A. (2011) The essential role of evasion from cell death in cancer, *Advances in Cancer Research*, **111**, 39-96.

Kiviharju, T.M., *et al.* (2002) Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells, *Clinical Cancer Resaerch*, **8**, 2666-2674.

Kobayashi, T., *et al.* (2012) A phase II trial of erlotinib in patients with EGFR wild-type advanced non-small-cell lung cancer, *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, **69**, 1241-1246.

Lee, Y.R., *et al.* (2012) Reversine suppresses oral squamous cell carcinoma via cell cycle arrest and concomitantly apoptosis and autophagy, *Journal of Biomedical Science*, **19**, 9-20.

Li, R., *et al.* (2005) Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim, *Cell Death and Differentiation*, **12**, 292-303.

Lyseng-Williamson, K.A. and Fenton, C. (2005) Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer, *Drugs*, **65**, 2513-2531.

Maemondo, M., *et al.* (2010) Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR, *The New England Journal of Medicine*, **362**, 2380-2388.

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nature Reviews Cancer*, **9**, 153-166.

Martins, L.M., *et al.* (1997) Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 7421-7430.

Mashima, T., *et al.* (1995) Aspartate-based inhibitor of interleukin-1 beta-converting enzyme prevents antitumor agent-induced apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **209**, 907-915.

Mayo, L.D., *et al.* (2005) Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 25953-25959.

Mirshahidi, H.R. and Hsueh, C.T. (2010) Updates in non-small cell lung cancer - insights from the 2009 45(th) annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, *Journal Hematoology &Oncology*, **3,** 18-29.

Mok, T.S., *et al.* (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma, *The New England Journal of Medicine*, **361**, 947-957.

Moretti, M., *et al.* (2011) A study protocol for the evaluation of occupational mutagenic/carcinogenic risks in subjects exposed to antineoplastic drugs: a multicentric project, *BMC Public Health*, **11**, 195-204.

Muchmore, S.W., *et al.* (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, *Nature*, **381**, 335-341.

Neidhart, J.A., *et al.* (1984) Phase I trial of teroxirone, *Cancer Treatment Reports*, **68**, 1115-1119.

Nicholson, D.W., *et al.* (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis, *Nature*, **376**,

37-43.

Nodera, H., *et al.* (2011) Neuroprotective effects of Kv7 channel agonist, retigabine, for cisplatin-induced peripheral neuropathy, *Neuroscience Letters*, **505**, 223-227.

Olewinska, E., *et al.* (2010) Level of DNA damage in lead-exposed workers, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **17**, 231-236.

Osaki, S., *et al.* (2000) Alteration of drug chemosensitivity caused by the adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells, *Cancer Gene Therapy*, **7**, 300-307.

Patel, T., Gores, G.J. and Kaufmann, S.H. (1996) The role of proteases during apoptosis, The *FASEB Journal*, **10**, 587-597.

Pierceall, W.E., *et al.* (2012) Cisplatin benefit is predicted by immunohistochemical analysis of DNA repair proteins in squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma: theranostic modeling by NSCLC constituent histological subclasses, *Annals of Oncology*, **23**, 2245-2252.

Plunkett, W., Huang, P. and Gandhi, V. (1995) Preclinical characteristics of gemcitabine, *Anti-Cancer Drugs*, **6**, 7-13.

Plunkett, W., *et al.* (1995) Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation, *Seminars in Oncology*, **22**, 3-10.

Polverino, A.J. and Patterson, S.D. (1997) Selective activation of caspases during apoptotic induction in HL-60 cells. Effects of a tetrapeptide inhibitor, *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 7013-7021.

Porter, A.G. and Janicke, R.U. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death and Differentiation*, **6**, 99-104.

Sahu, B.D., *et al.* (2011) Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity, *Food and*

Chemical Toxicology, **49**, 3090-3097.

Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell*, **91**, 443-446.

Satyanarayana, A. and Kaldis, P. (2009) Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms, *Oncogene*, **28**, 2925-2939.

Segawa, Y., *et al.* (2011) Small cell carcinoma of the tonsil treated with irinotecan and Cisplatin: a case report and literature review, *Case Reports in Oncology*, **4**, 587-591.

Selvendiran, K., *et al.* (2010) Anticancer efficacy of a difluorodiarylidenyl piperidone (HO-3867) in human ovarian cancer cells and tumor xenografts, *Molcular Cancer Thereputics*, **9**, 1169-1179.

Sengupta, S., *et al.* (2000) Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies, *Pharmacological Research*, **42**, 459-464.

Shamon, L.A., *et al.* (1997) Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from Tripterygium wilfordii, *Cancer Letters*, **112**, 113-117.

Shepherd, F.A., *et al.* (2005) Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer, *The New England Journal of Medicine*, **353**, 123-132.

Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis, *Molecular Cell*, **9**, 459-470.

Sorte, K., *et al.* (2011) Quantitative assessment of DNA damage directly in lens epithelial cells from senile cataract patients, *Molecular Vision*, **17**, 1-6.

Soussi, T. and Beroud, C. (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome, *Nature Reviews Cancer*, **1**,

233-240.

Spigel, D.R., *et al.* (2011) A phase II study of higher dose weekly topotecan in relapsed small-cell lung cancer, *Clinical Lung Cancer*, **12**, 187-191.

Strasser, A., *et al.* (1995) Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis, *The EMBO Journal*, **14**, 6136-6147.

Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling, *Annual Review of Biochemistry*, **69**, 217-245.

Stratton, M.R., Campbell, P.J. and Futreal, P.A. (2009) The cancer genome, *Nature*, **458**, 719-724.

Suzuki, K. and Matsubara, H. (2011) Recent advances in p53 research and cancer treatment, *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, **2011**, 978312.

Suzuki, M., Youle, R.J. and Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, *Cell*, **103**, 645-654.

Swennen, E.L., *et al.* (2010) ATP sensitizes H460 lung carcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis, *Chemico-Biological Interactions*, **184**, 338-345.

Takaki, T., *et al.* (2008) Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis--cytokinesis, DNA damage response, and development, *Current Opinion in Cell Biology*, **20**, 650-660.

Taylor, W.R. and Stark, G.R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53, *Oncogene*, **20**, 1803-1815.

Van de Craen, M., *et al.* (1998) Identification of a new caspase homologue: caspase-14, *Cell Death and Differentiation*, **5**, 838-846.

van Vugt, M.A. and Yaffe, M.B. (2010) Cell cycle re-entry mechanisms

after DNA damage checkpoints: giving it some gas to shut off the breaks!, *Cell Cycle*, **9**, 2097-2101.

Videira, M., Almeida, A.J. and Fabra, A. (2011) Preclinical evaluation of a pulmonary delivered paclitaxel-loaded lipid nanocarrier antitumor effect, *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1-8.

Wajed, S.A., Laird, P.W. and DeMeester, T.R. (2001) DNA methylation: an alternative pathway to cancer, *Annals of Surgery*, **234**, 10-20.

Wang, F., *et al.* (2003) Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression, *Journal of Pharmacological Sciences*, **93**, 197-203.

Wu, F.Y.-H. and Pecq, J.-B.L. (1982) Mechanistic studies of a novel antitumor drug, α-1,3,5- Triglycidyl-s- Triazinetrion, *Molecular Pharmacology*, **23**, 182-189.

Wu, H.C., Chang, D.K. and Huang, C.T. (2006) Targeted therapy for cancer, *Journal of Cancer Molecules* **2**, 57-66.

Yamada, M., *et al.* (2001) Effect of microsome-liposome fusion on the rotational mobility of cytochrome P450IIB4 in rabbit liver microsomes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **83**, 261-268.

Yang, S., *et al.* (2003) Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors, *Molecular Cancer Therapeutics*, **2**, 65-72.

Youle, R.J. and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **9**, 47-59.

Yvon, A.M., Wadsworth, P. and Jordan, M.A. (1999) Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells, *Molecular Biology of The Cell*, **10**, 947-959.

Zaffaroni, N., *et al.* (1998) Induction of apoptosis by taxol and cisplatin

and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cells, *British Journal Cancer*, **77**, 1378-1385.

Zou, S., *et al.* (2011) Identification of dAven, a Drosophila melanogaster ortholog of the cell cycle regulator Aven, *Cell Cycle*, **10**, 989-998.

行政院衛生署 (2012) 100 年國人主要死因統計.

http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_p01.aspx?class_no=25&level_no=1&doc_no=84788.

婦癌基金會 (2012) 台灣 100 年 10 大癌症死因.

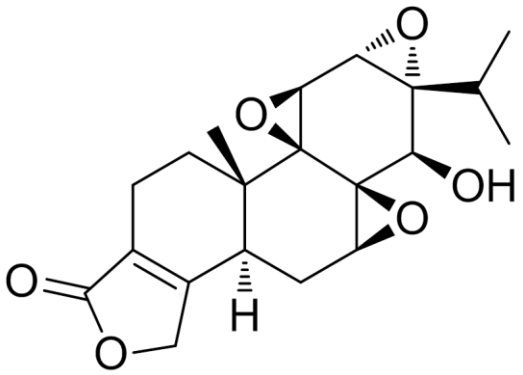
http://www.femalecancer.org.tw/index.php?option=com_content&task=view&id=483&Itemid=31.

聯合新聞網 (2012) 健康醫藥.

http://mag.udn.com/mag/life/itempage.jsp?f_SUB_ID=2778.

六. 圖

(A) Triprolide



(B) Teroxirone

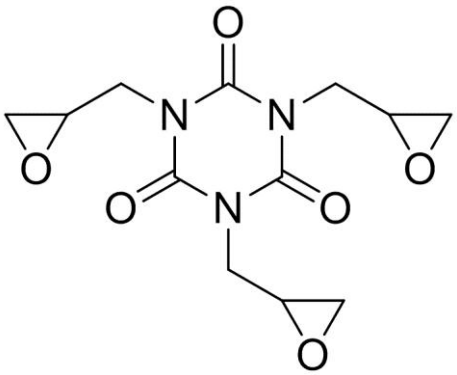
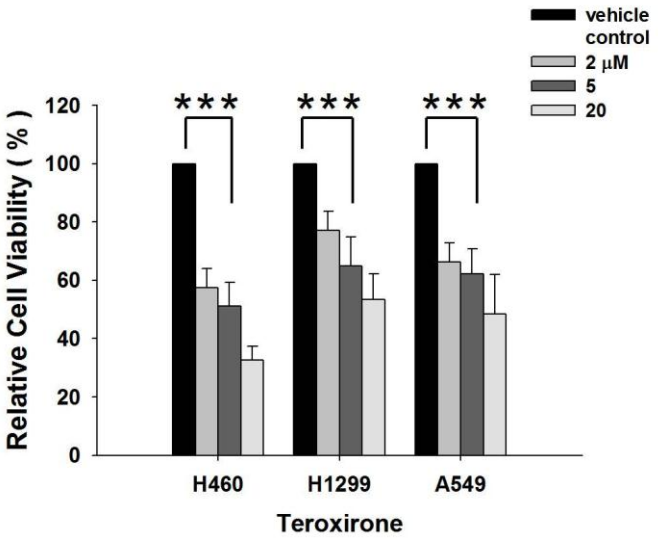
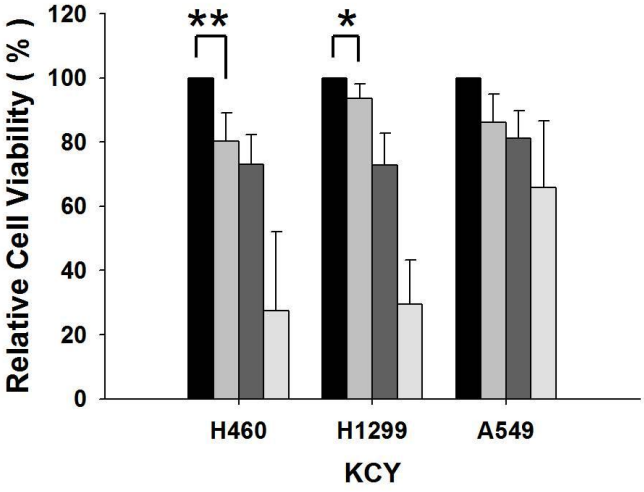


Fig 1. 三環氧化物結構圖 **(A) Triptolide (B) Teroxirone**

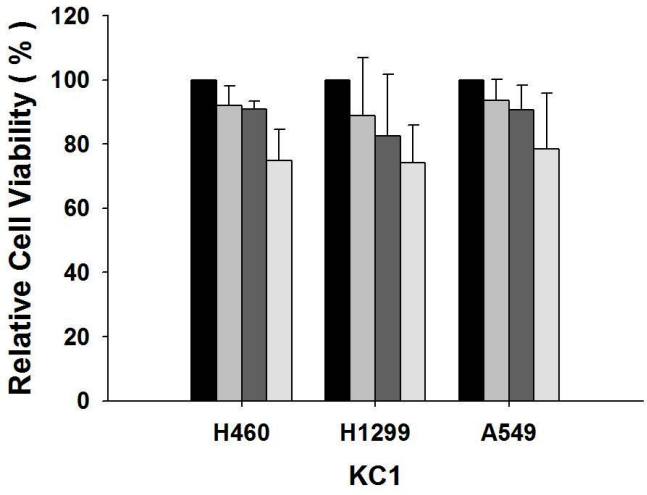
(A) Teroxirone



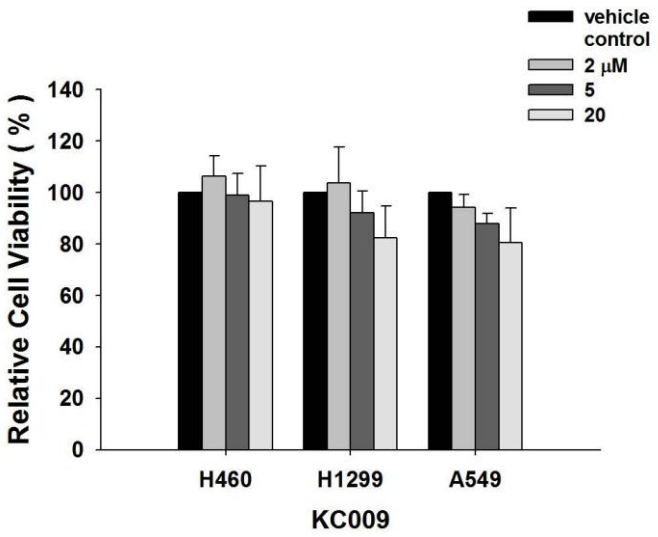
(B)KCY



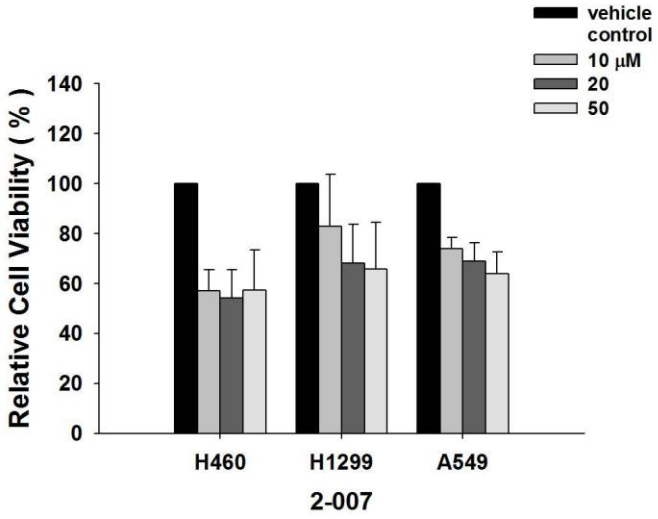
(C)KC1



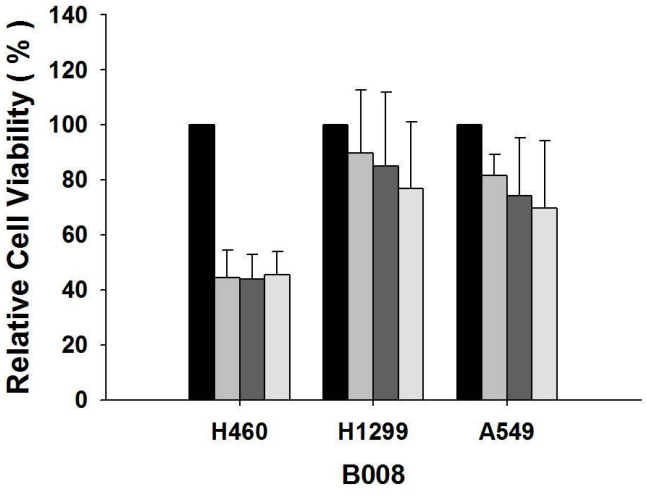
(D)KC009



(E) 2-007



(F) B008



(G) B011

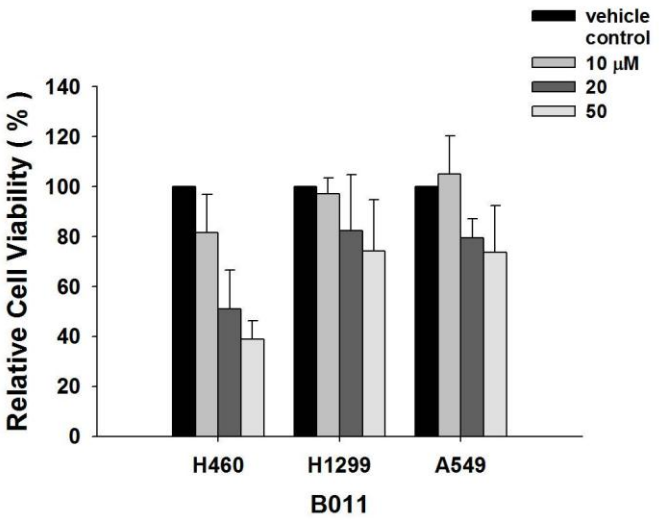
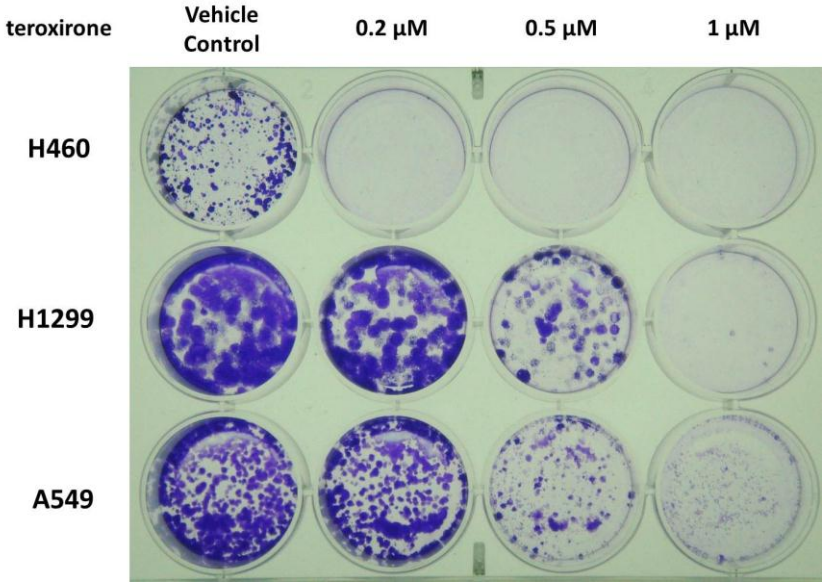


Fig 2. 測試不同的化合物抑制非小細胞肺癌細胞增生的程度。 (A) teroxirone (B) KCY (C) KC1 (D) KC009 (E) 2-007 (F) B008 (G) B011

(A) 至 (D) 是以 2、5 及 20 μM 的濃度做測試，(E) 至 (G) 的部分，以 10、20 及 50 μM 的濃度做測試，分別都作用 48 小時之後，以 MTT assay 檢測細胞的存活率。實驗顯示只有 teroxirone 能在低濃度的時候就有效抑制非小細胞肺癌細胞的增生。Teroxirone、KC009、KCY 及 KC1 是以五次獨立實驗的平均；2-007、B008、B011 為四次獨立實驗的平均。以 paired Student's t-test 計算 *P* 值，* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$。

(A)



(B)

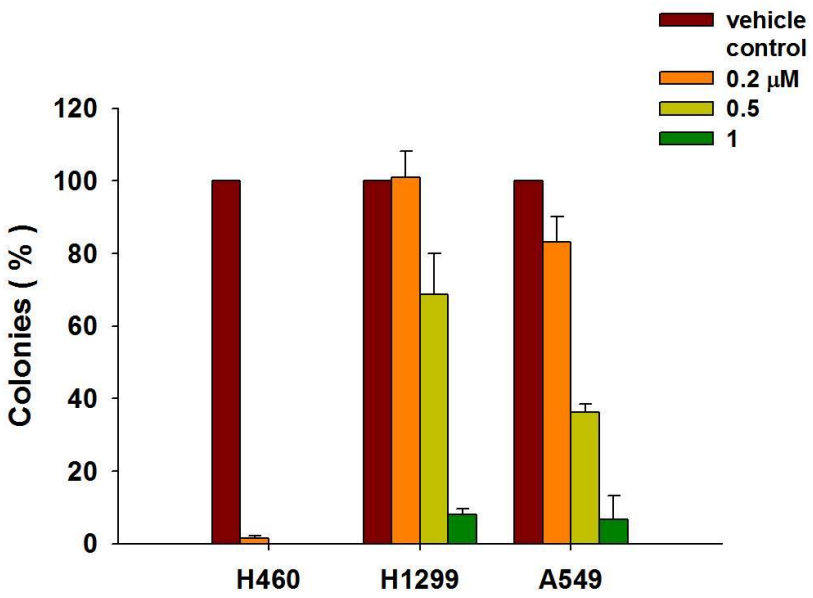
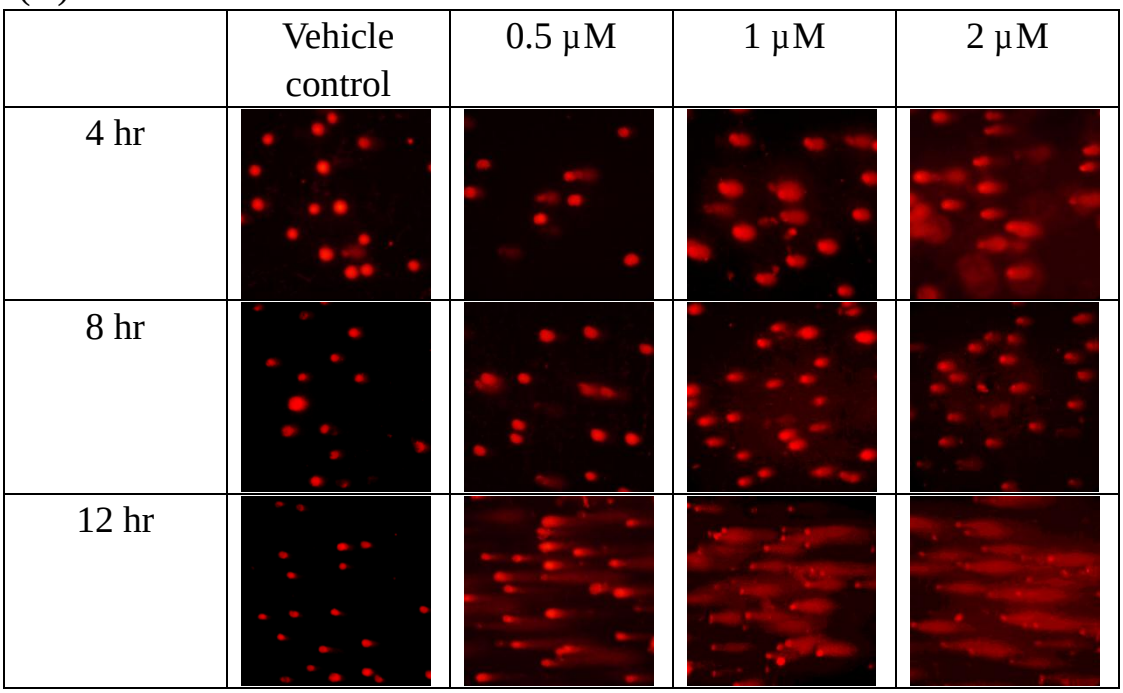


Fig 3. Teroxirone 具有抑制非小細胞肺癌細胞增生的功效。 (A) 0.2、0.5 及 1 μM 的 teroxirone 作用 48 小時 (B) 細胞群落數統計圖

以 0.2、0.5 及 1 μM 的 teroxirone 對 H460、H1299 及 A549 這三株細胞作用 48 小時，teroxirone 這三株細胞都具有抑制增生的能力。以肉眼觀察細胞群落數並計數，為二次獨立實驗的平均。

(A)



(B)

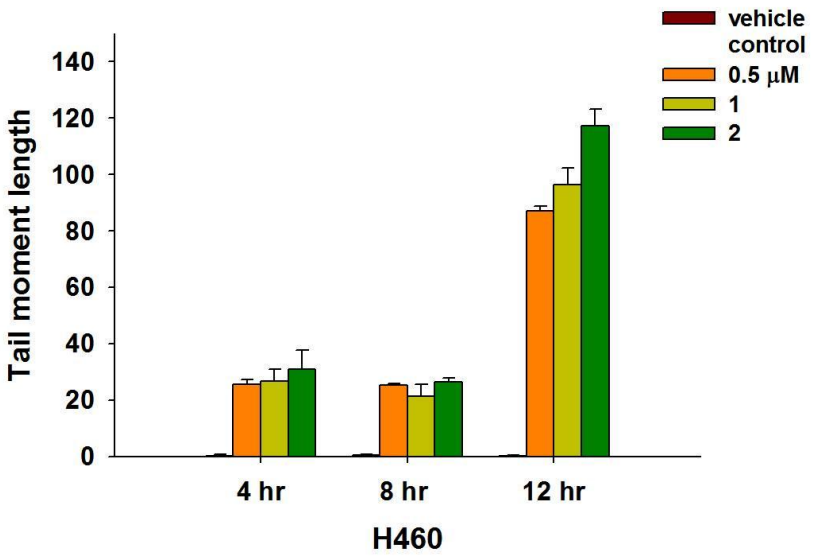
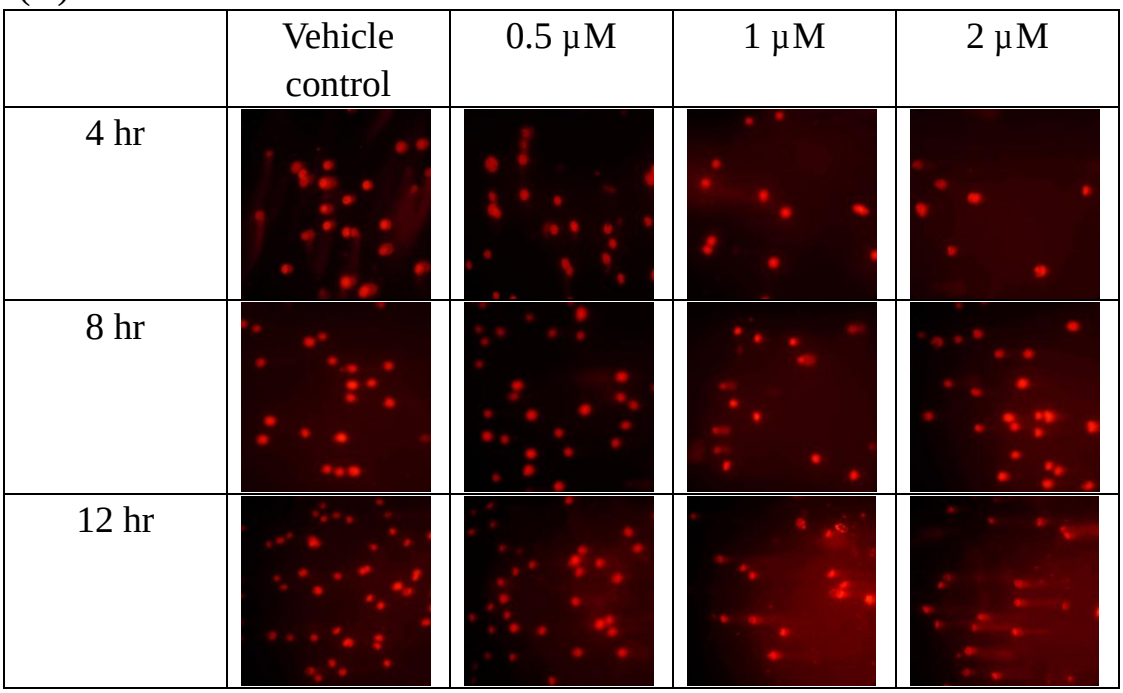


Fig 4. Teroxirone 會使 H460 細胞產 DNA 損傷。 (A) 0.5、1 及 2 µM 的 teroxirone 作用 4、8 及 12 小時 (B) 細胞拖尾長度的統計圖

以 0.5、1、2 µM 的 teroxirone 作用 4、8、12 小時之後，發現 teroxirone 從 4 小時開始就會使 H460 細胞產生 DNA 損傷，而在 12 小時最為明顯。為兩次獨立實驗的平均。

(A)



(B)

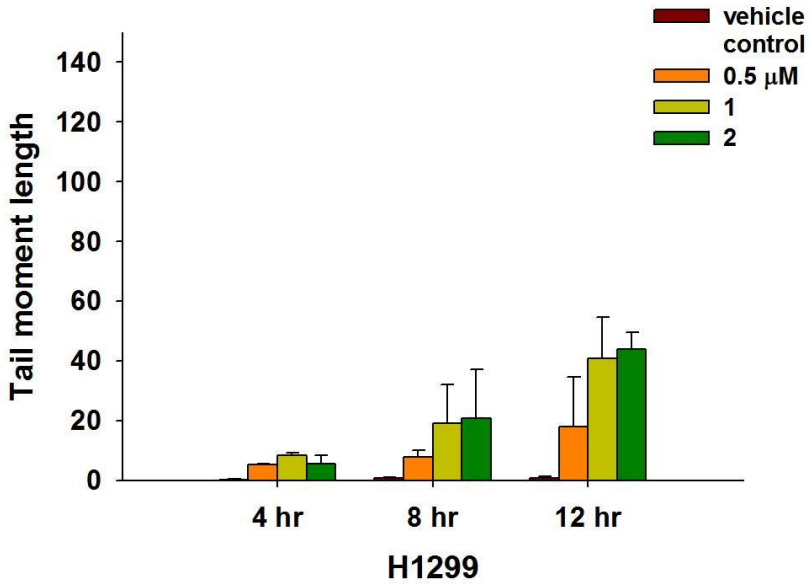
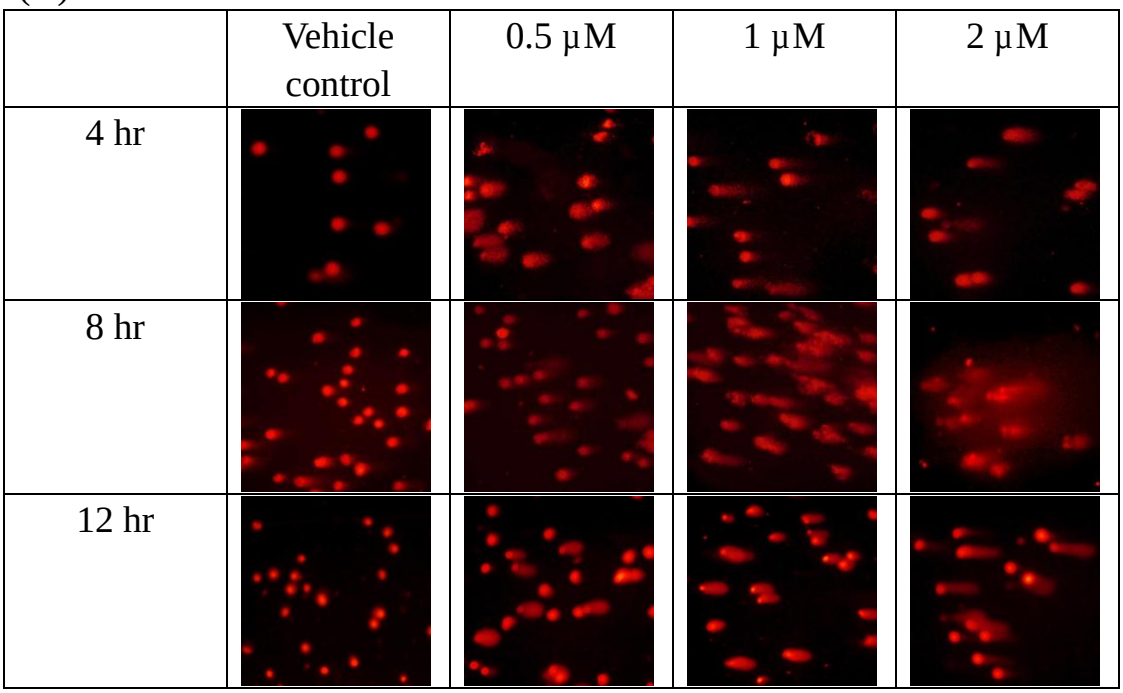


Fig 5. Teroxirone 會使 H1299 細胞產 DNA 損傷。 (A) 0.5 及 1、2 µM 的 teroxirone 作用 4、8 及 12 小時 (B) 細胞拖尾長度的統計圖

相對於 H460 細胞，H1299 細胞對 teroxirone 較不敏感，作用時間需到 8 小時，才可以看到細胞拖尾的現象，在 12 小時也沒有看到明顯的拖尾現象。為兩次獨立實驗的平均。

(A)



(B)

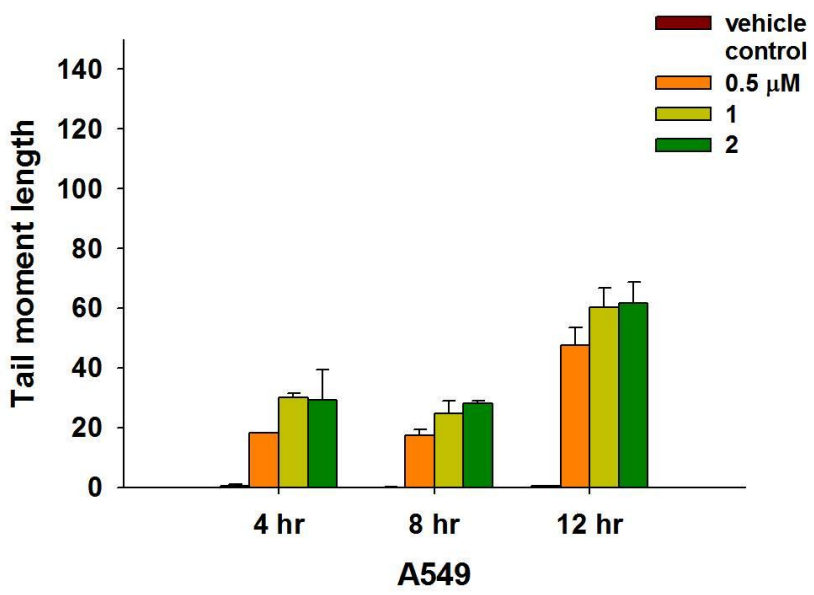
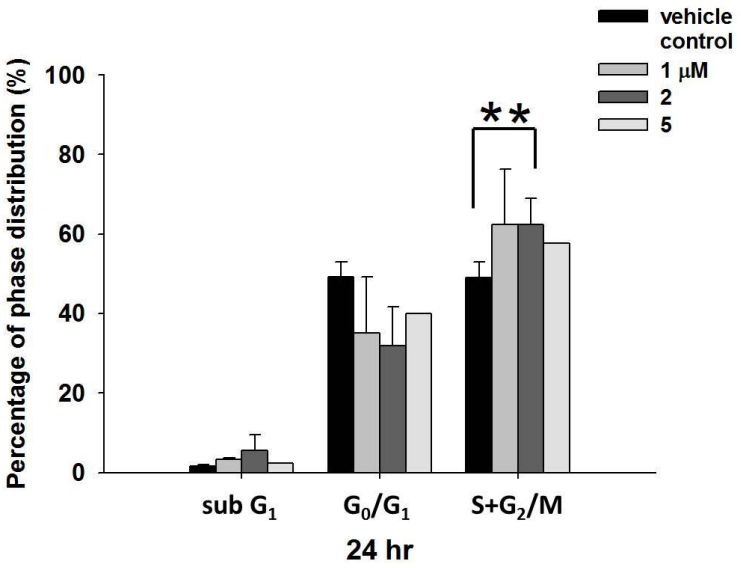


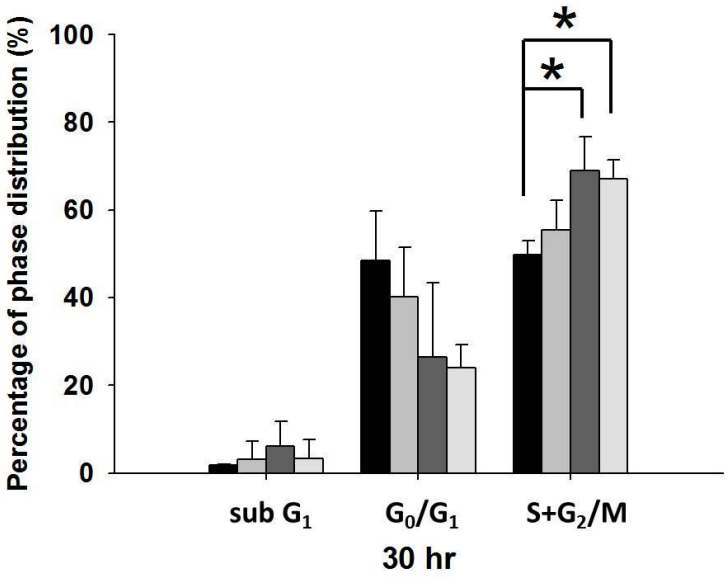
Fig 6. Teroxirone 會使 A549 細胞產 DNA 損傷。 (A) 0.5、1 及 2 µM 的 teroxirone 作用 4、8 及 12 小時 (B) 細胞拖尾長度的統計圖

A549 細胞以 teroxirone 作用 4 小時就會產生 DNA 損傷，作用 12 小時，會使 A549 細胞產生最明顯的拖尾現象。為兩次獨立實驗的平均。

(A) 24 小時



(B) 30 小時



(C) 36 小時

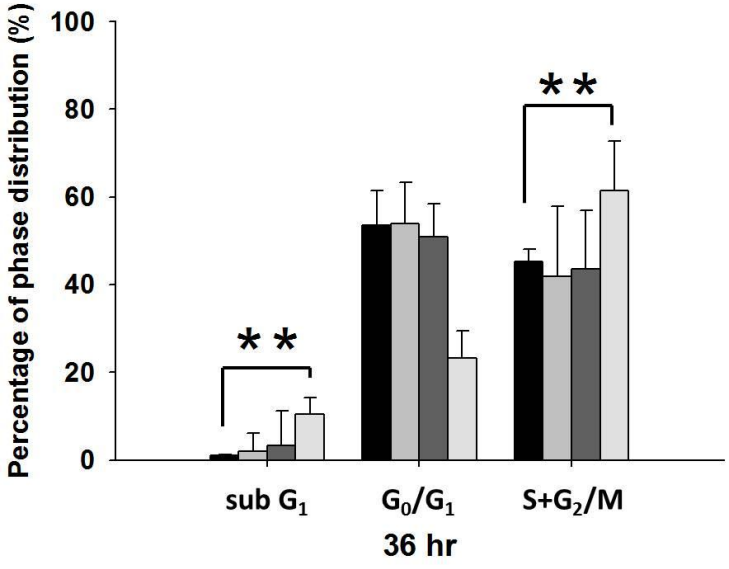
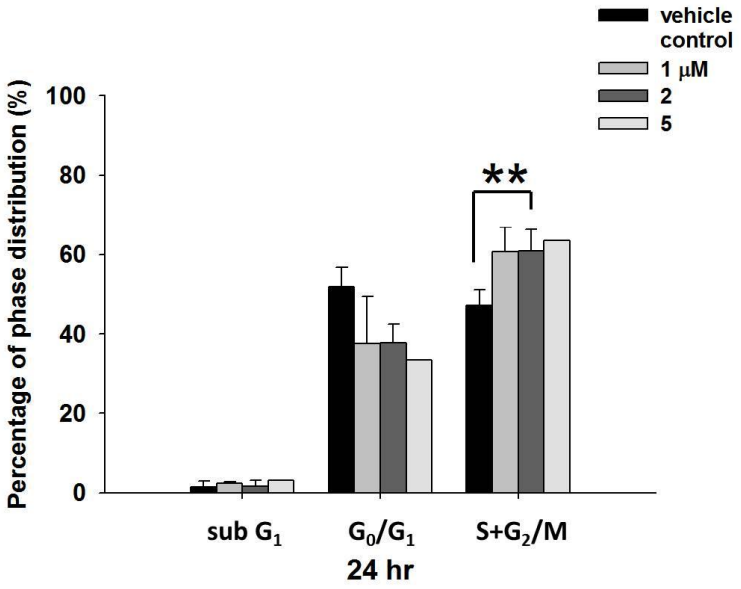


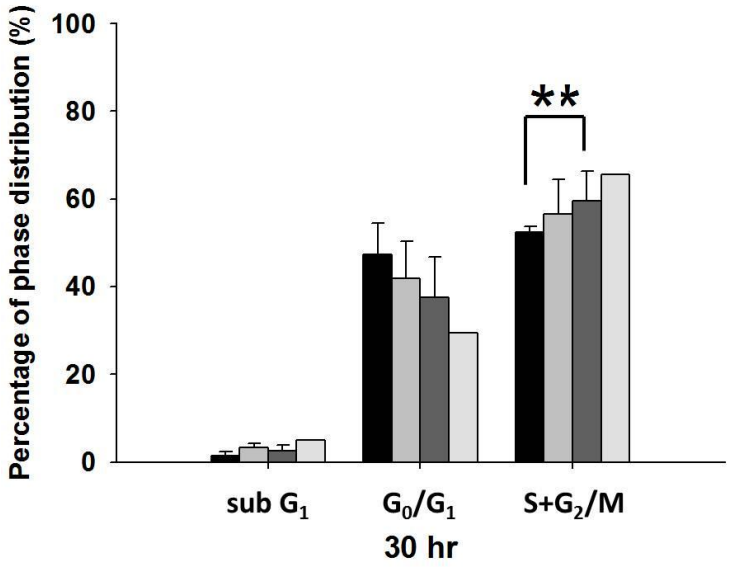
Fig 7. Teroxirone 會使 H460 細胞的細胞週期停滯在 S 及 G_2/M 期，並使 sub G_1 細胞數目增加。 (A) 不同濃度的 teroxirone 作用 24 小時 (B) 不同濃度的 teroxirone 作用 30 小時 (C) 不同濃度的 teroxirone 作用 36 小時

以 1、2 及 5 μM 的 teroxirone 分別作用 24、30 及 36 小時。5 μM 的 teroxirone 對 H460 細胞作用 24 小時，就會使 S 及 G_2/M 的細胞數明顯增加。到了 36 小時，還看到 sub G_1 細胞數也有明顯增加。為五次獨立實驗的平均。以 paired Student's t-test 計算 *P* 值，* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$。

(A) 24 小時



(B) 30 小時



(C) 36 小時

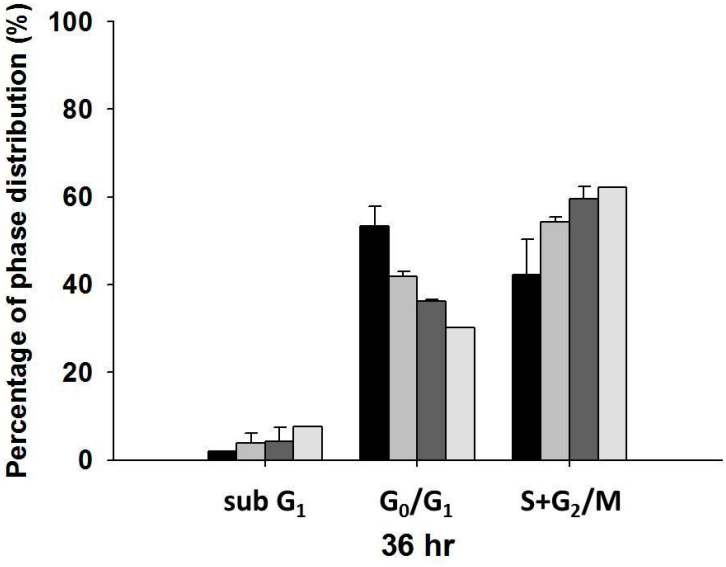
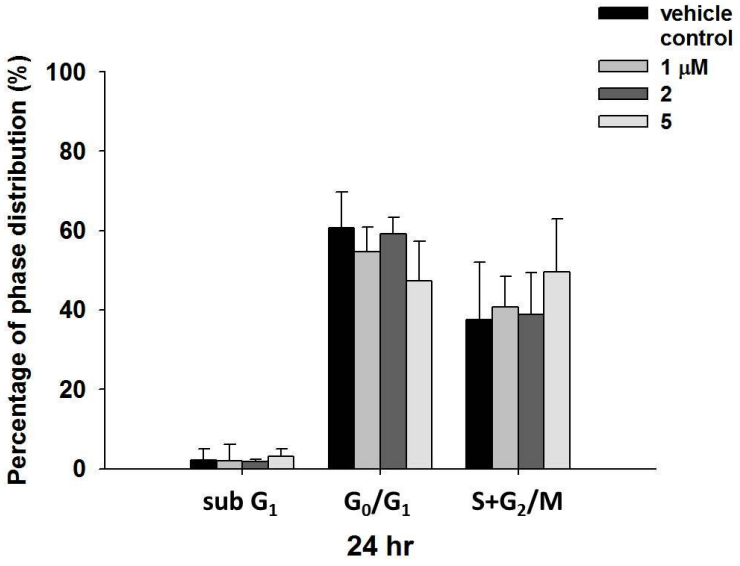


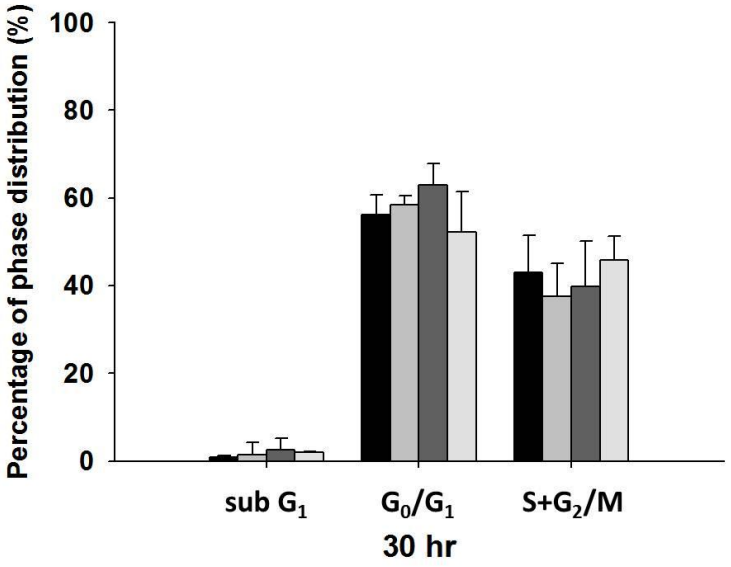
Fig 8. Teroxirone 會使 H1299 細胞的細胞週期停滯在 S 及 G_2/M 期，但不會使 sub G_1 細胞數目上升。 (A) 不同濃度的 teroxirone 作用 24 小時 (B) 不同濃度的 teroxirone 作用 30 小時 (C) 不同濃度的 teroxirone 作用 36 小時

以 1、2 及 5 μM 的 teroxirone 分別作用 24、30 和 36 小時。Teroxirone 對 H1299 細胞作用 24 小時，就可使 S 及 G_2/M 的細胞數明顯增加。但是 teroxirone 不會使 H1299 細胞的 sub G_1 細胞數增加。24 小時及 30 小時為四次獨立實驗的平均，36 小時為三次獨立實驗的平均。以 paired Student's t-test 計算 *P* 值，* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$。

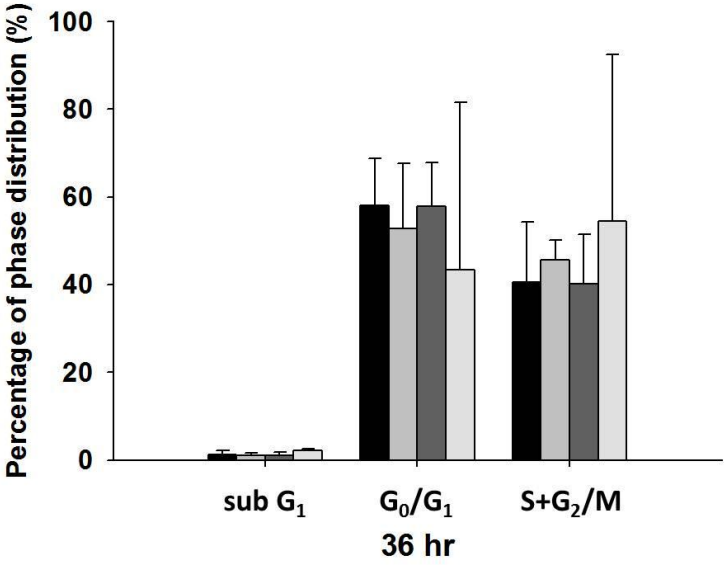
(A) 24 小時



(B) 30 小時



(C) 36 小時



(D) 48 小時

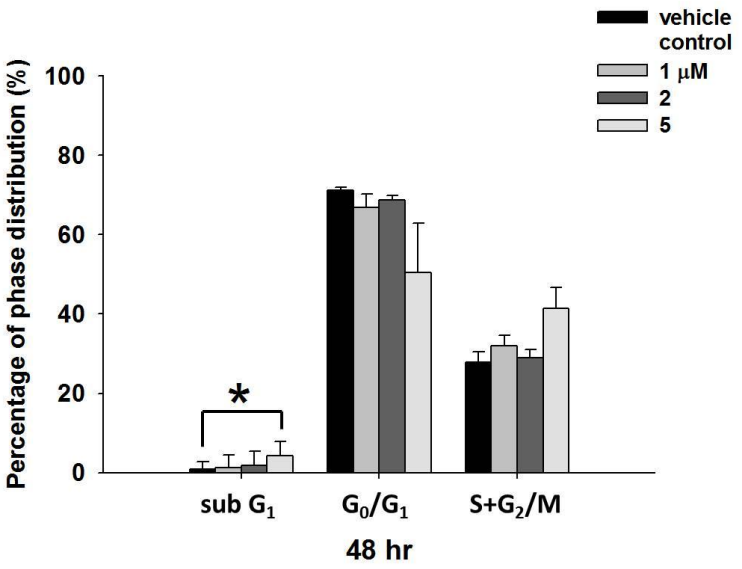
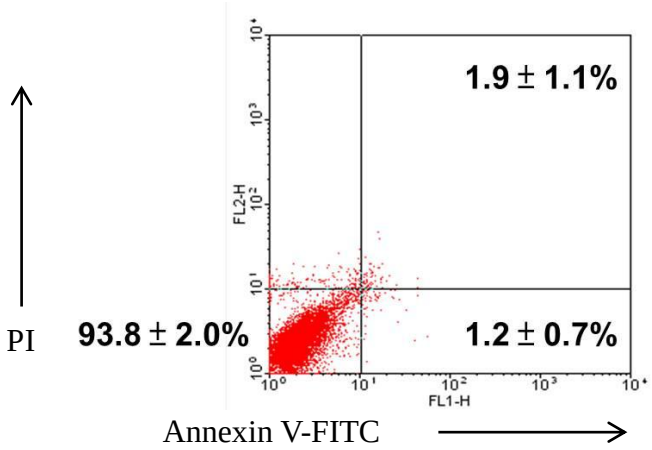


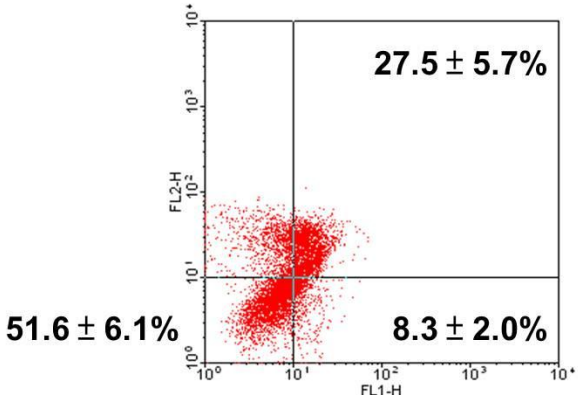
Fig 9. Teroxirone 對 A549 細胞作用 48 小時，sub G_1 細胞數目增加。(A) 不同濃度的 teroxirone 作用 24 小時 (B) 不同濃度的 teroxirone 作用 30 小時 (C) 不同濃度的 teroxirone 作用 36 小時 (D) 不同濃度的 teroxirone 作用 48 小時

以 1、2 及 5 μM 的 teroxirone 分別作用 24、30 和 36 小時。Teroxirone 對 A549 細胞作用從 24 小時到 36 小時，細胞週期沒有改變，在 48 小時，sub G_1 細胞數有明顯增加。24 及 30 小時為四次獨立實驗的平均； 36 及 48 小時為四次獨立實驗的平均。以 paired Student's t-test 計算 *P* 值，* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$。

(A) Vehicle control



(B) 5 μM



(C) 10 μM

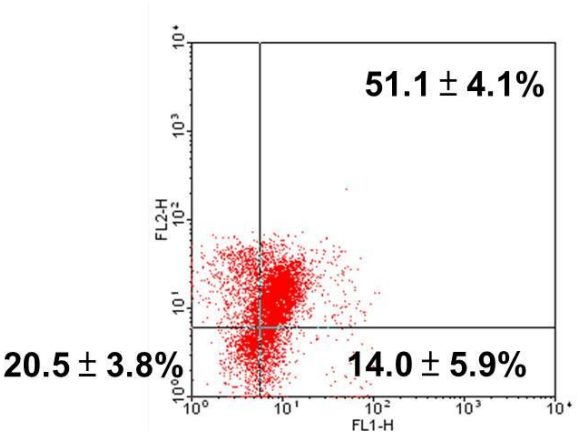
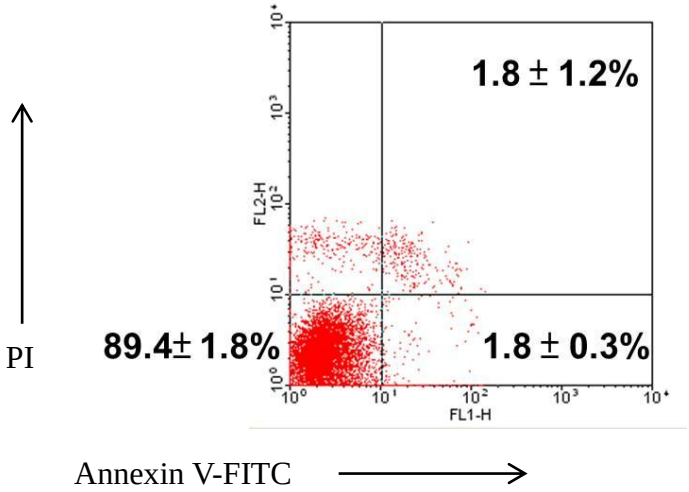


Fig 10. Teroxirone 會使 H460 細胞產生細胞凋亡。(A) Vehicle control

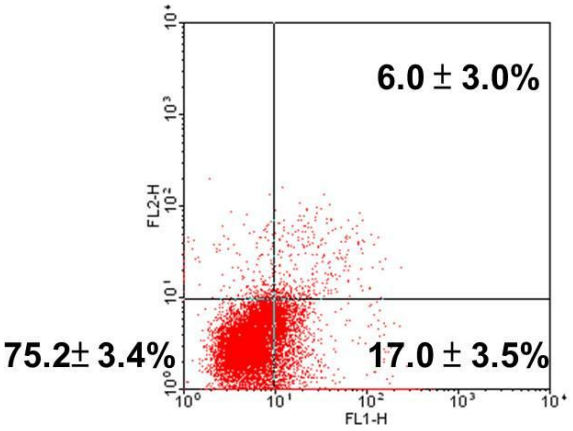
(B) 5 μM 的 teroxirone 作用 48 小時 (C) 10 μM 的 teroxirone 作用 48 小時

以 5 及 10 μM 的 teroxirone 作用 48 小時，teroxirone 確實會使 H460 細胞產生細胞凋亡，且主要是晚期的細胞凋亡 。為三次獨立實驗的平均 (平均值 ± 標準誤差)。

(A) Vehicle control



(B) 5 µM



(C) 10 µM

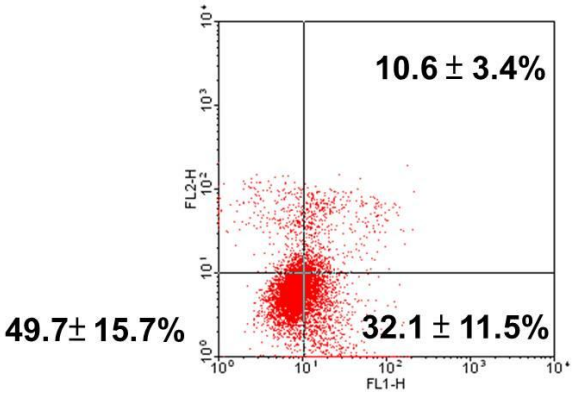
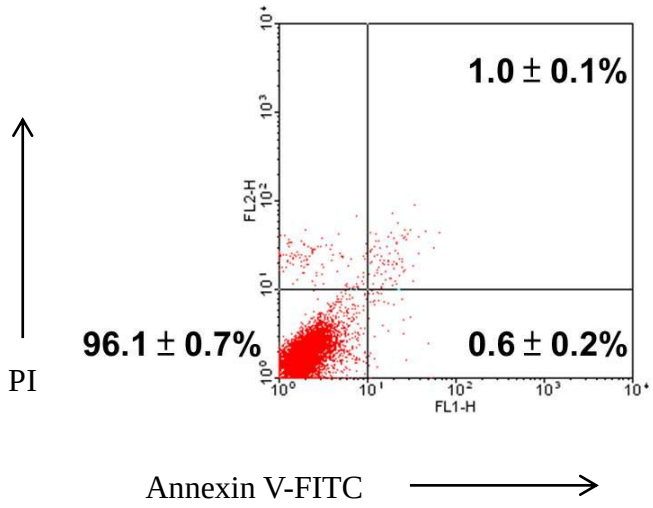


Fig 11. Teroxirone 會使 A549 細胞產生細胞凋亡。(A) Vehicle control

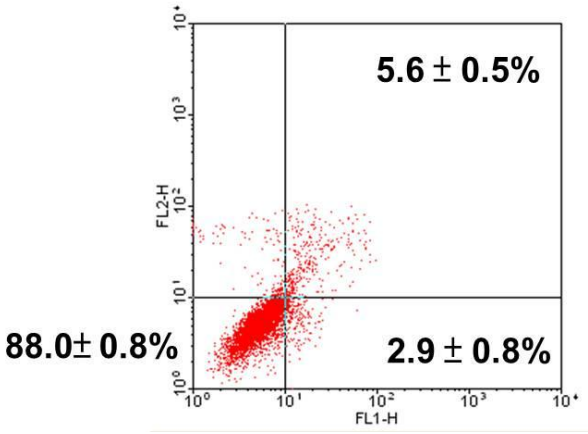
(B) 5 μM 的 teroxirone 作用 48 小時 (C) 10 μM 的 teroxirone 作用 48 小時

以 5 及 10 μM 的 teroxirone 作用 48 小時，teroxirone 確實會使 A549 細胞產生細胞凋亡，且主要是早期的細胞凋亡。三次獨立實驗的平均 (平均值 ± 標準誤差)。

(A) Vehicle control



(B) 5 μM



(C) 10 μM

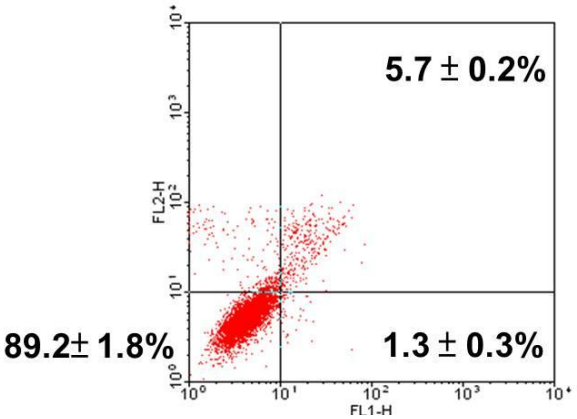


Fig 12. Teroxirone 不會使 H1299 細胞產生細胞凋亡。 (A) Vehicle control (B) 5 μM 的 teroxirone 作用 48 小時 (C) 10 μM 的 teroxirone

作用 **48** 小時

以 5 及 10 μM 的 teroxirone 作用 48 小時，teroxirone 不會使 H1299 細胞產生細胞凋亡。為三次獨立實驗的平均 (平均值 ± 標準誤差)。

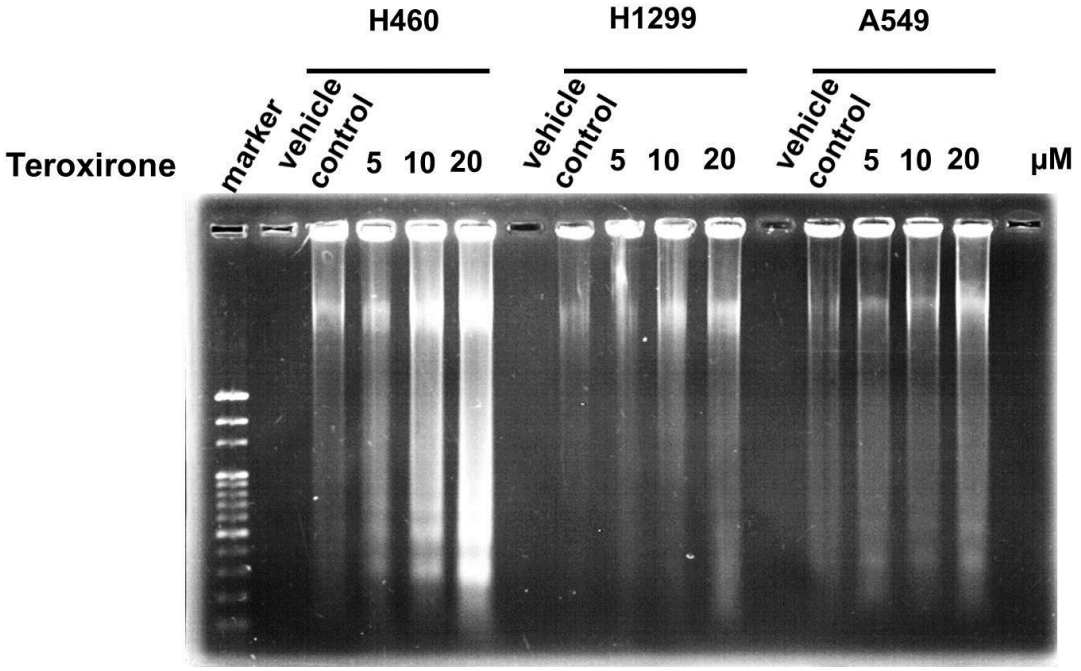
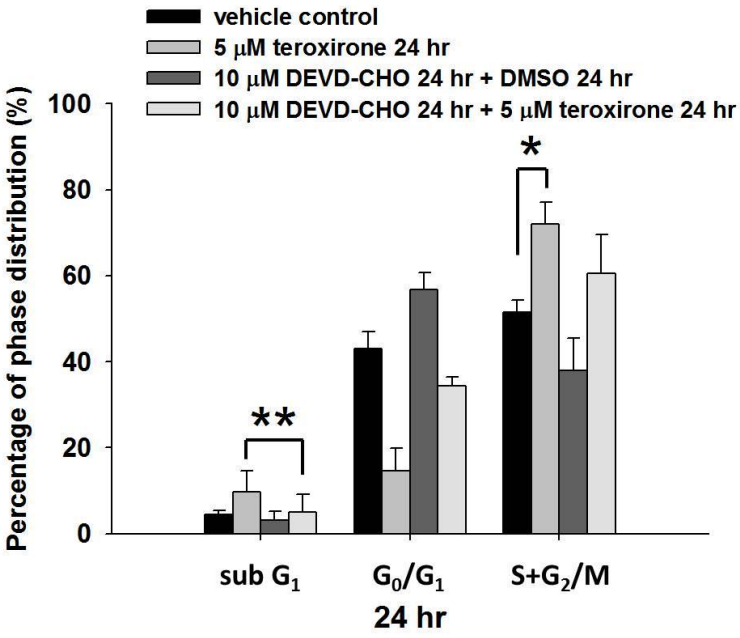


Fig 13. Teroxirone 使非小細胞肺癌細胞產生細胞凋亡，而造成 DNA 片段化。

以 5、10 及 20 μM 的 teroxirone 對 H460、H1299 及 A549 細胞作用 48 小時。Teroxirone 會使 H460 及 A549 細胞因為細胞凋亡，而產生 DNA 片段化，經由 DNA 電泳可以看到 DNA 階梯。

(A) 24 小時



(B) 36 小時

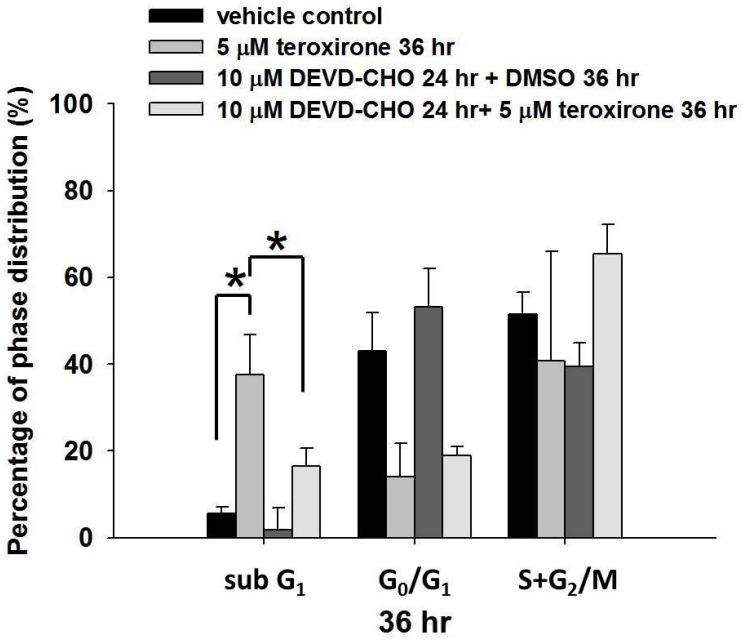
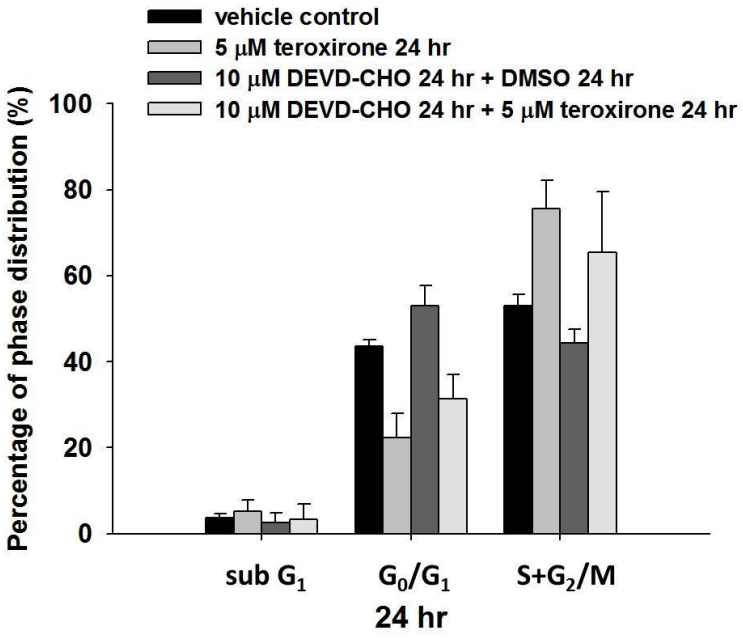


Fig 14. DEVD-CHO 可以使 H460 細胞的 sub G_1 和 S 及 G_2/M 的細胞數減少。 (A) 24 小時 (B) 36 小時。

H460 細胞先以 10 μM DEVD-CHO 作用 24 小時，再加 5 μM

teroxirone 反應，可以看到 sub G_1 和 S 及 G_2/M 的細胞數減少。顯示 DEVD-CHO 有抑制由 teroxirone 所誘導的 H460 細胞凋亡的趨勢。為三次獨立實驗的結果。以 paired Student's t-test 計算 *P* 值，* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$。

(A) 24 小時



(B) 36 小時

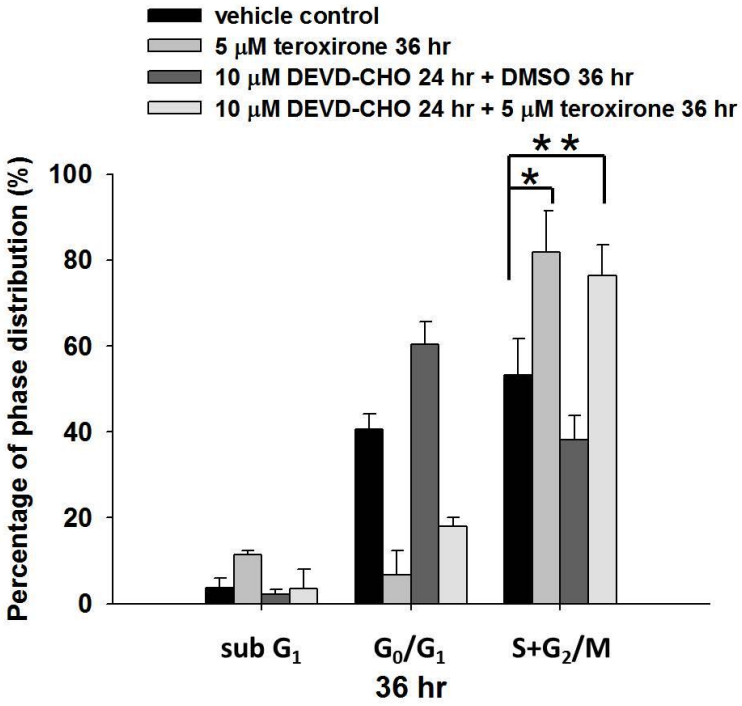
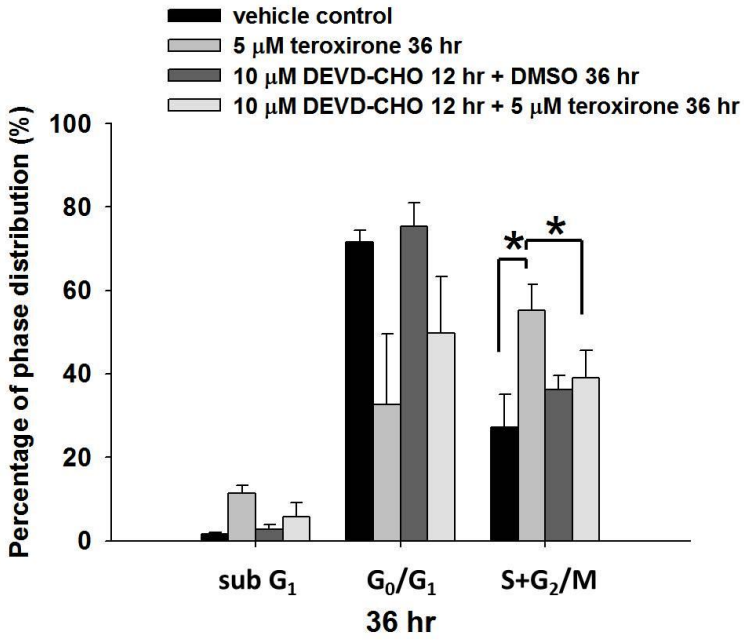


Fig 15. DEVD-CHO 對 H1299 細胞沒有影響。 (A) 24 小時 (B) 36 小時。

H1299 細胞先以 10 μM DEVD-CHO 作用，再加 5 μM teroxirone，

結果 S 及 G_2/M 的細胞數都沒有下降。顯示 DEVD-CHO 沒有抑制 H1299 細胞的效果。為三次獨立實驗的結果。以 Paired t-test 計算 *P* 值，* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$。

(A) 36 小時



(B) 48 小時

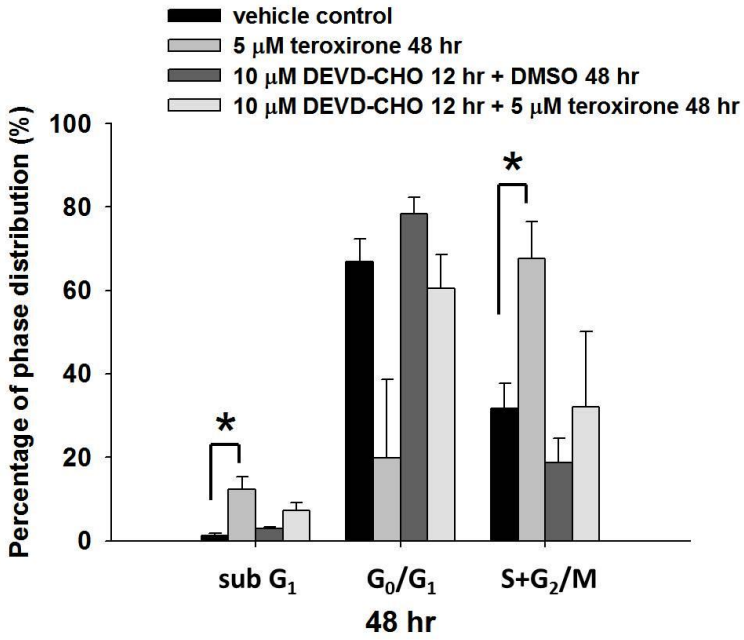


Fig 16. DEVD-CHO 可以使 A549 細胞的 sub G_1 和 S 及 G_2/M 的細胞數下降。

A549 細胞先以 10 μM DEVD-CHO 作用 12 小時，再加 5 μM

teroxirone 反應，可以看到 sub G_1 和 S 及 G_2/M 的細胞數減少。顯示 DEVD-CHO 有抑制由 teroxirone 所誘導的 H460 細胞凋亡。為三次獨立實驗的結果。以 paired Student's t-test 計算 *P* 值，* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$。