

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 原兒茶酸調控人類胃癌細胞生長週期之研究
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 何瑞彤
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-042-B
研究期間： 101年07月01日至102年02月28日止，計8個月
指導教授： 陳璟賢

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學營養學系（所）

中華民國 102年02月26日

目錄

壹、中文摘要.....	1
貳、英文摘要.....	2
參、前言.....	3
肆、緒論.....	4
伍、材料與方法.....	6
陸、結果.....	9
柒、討論.....	11
捌、參考資料.....	13-14
玖、實驗結果圖表.....	15-19

壹、中文摘要

原兒茶酸 (protocatechuic acid, PCA) 廣佈於蔬菜、水果、花和胡桃中，乃一多酚化合物 (polyphenols)。過去研究報告指出 PCA 具有抗氧化及抗癌之生物活性。過去我們實驗室已證實 PCA 可誘導人類胃癌細胞 (human gastric carcinoma cells) 凋亡 (apoptosis)。由於細胞週期 (cell cycle) 及其調控蛋白與癌細胞生長具相關性，因此我們進一步探討 PCA 對人類胃癌 AGS 細胞生長週期之影響，藉本次實驗釐清 PCA 是否影響細胞週期進而抑制 AGS 細胞之生長。實驗以 AGS 細胞為模式，施以不同劑量之 PCA 藉由細胞生長曲線分析 (cell growth assay) 及細胞毒性測試 (MTT assay) 觀察其對 AGS 細胞生長之影響。從結果得知於濃度 1-6mM 之 PCA 具有抑制細胞生長之效果，隨著 PCA 濃度升高，其抑制生長之現象亦趨於明顯。然而 6 mM PCA 已達 IC_{50} 並造成細胞凋亡表現，所以後續以濃度 3 mM PCA 進行細胞週期之分析。利用流式細胞儀 (Flow cytometric analysis) 觀察細胞週期分佈表現，AGS 細胞處理 3 mM PCA 24 小時後，細胞週期 G2/M 期之細胞顯著增多，推論 PCA 具有令 AGS 細胞之細胞週期停滯 (arrest) 於 G2/M 期之能力，直至 48 小時則開始出現細胞凋亡現象 (sub-G1 期細胞分佈增加)。以西方墨點法 (Western blotting) 分析其中分子調控之機制，發現 PCA 的確對 G2/M 期調控蛋白 cyclin B1 有抑制表現之效果。最後利用免疫沉澱法 (immunoprecipitation) 確認調控分子機制，結果顯示 PCA 抑制 cyclin B1 及 cdc2 之結合情況。綜合上述，PCA 的確具有誘導 AGS 細胞生長週期停滯之作用，進而抑制細胞生長。

關鍵字：原兒茶酸、多酚、胃癌、凋亡、細胞週期、停滯

Abstract

Protocatechuic acid (PCA) is discussed to represent antioxidative food components in a human diet rich in fruits and vegetables, and has been shown to prevent carcinogenesis or antitumor growth *in vivo*. However, the molecular mechanisms involved in chemopreventive activity of PCA are poorly understood. In recent years, our laboratory showed that PCA induced apoptosis in gastric carcinoma AGS cells. In this report we further investigate the mechanism of cell cycle arrest induced by PCA in AGS cells. The data from cell growth assay and cell viability assay showed PCA exhibited the anti-proliferation effect on AGS cells in a time- and dose-dependent manner. Flow cytometric results revealed the cells had an increase in the distribution of G2/M phase after a 24-h treatment with 3.0 mM of PCA. Molecular data showed the effect of PCA in AGS cells might be mediated via inactivation of cyclin B/cdc2 complex, but not G0/G1 phase-related regulatory proteins, resulted in inhibiting cell cycle entry. Taken together, our data present the first evidence of PCA as a cell cycle arrest inducer in AGS cells, and provide a new mechanism for its anticancer activity.

Key words : protocatechuic acid, gastric carcinoma cells, apoptosis, cell cycle arrest.

參、前言

腫瘤在國內外十大死因中排行首位，而胃癌在其中排名第四。目前臨床上治療胃癌的方式常因侵入性手術及化療藥物的副作用，有時候不但不能達到好的治療效果，反而對患者身上以及心理做成許多傷害。有鑑於此，從天然植物食品中找到有活性之化合物，既能有效抑制癌細胞但不會對身體內其他細胞組織受到傷害，將可令患者之痛苦減低而有效地治療癌症。許多研究顯示，藉由良好的日常生活與飲食習慣中預防疾病發生，進而提高免疫能力，所以開發天然食品中的化合物以降低藥物本身之副作用進而達到良好治療效果，或利用天然化合物作為化學預防試劑以達到保健之效果，將是未來在臨床治療或預防癌症上重要的一環。

原兒茶酸在過去研究發現其具有抗自由基、抗癌、降血脂以及做為抗氧化劑之功用。而原兒茶酸在抗癌之作用機轉所知仍然有限。就本實驗室過去研究得知原兒茶酸可誘導人類胃癌 AGS 細胞凋亡，但原兒茶酸對 AGS 細胞之生長週期是否具有調控作用尚未釐清。而近期許多研究亦指出在細胞週期中細胞素及其週節蛋白過度表現為誘發癌症的原因之一，抑制或調控細胞週期與癌症預防確實具有相關性[1]。因此本實驗探討原兒茶酸是否影響 AGS 細胞週期停滯，以及分析其參與之分子機轉。

肆、緒論

一、原兒茶酸(proto catechuic acid ; PCA)

PCA 別名為 3,4-二羥基苯甲酸(3,4-dihydroxybenzoic acid)屬多酚類 (polyphenols)，廣泛存在於廣佈於蔬菜、水果、花和胡桃中等植物中。由於多酚被研究指出具抗氧化等多種生物活性[2,3]。許多研究亦證明 PCA 能夠抗腫瘤 [2]、清除自由基[4]以及對於 tert-butylhydroperoxide (t-BHP)誘導鼠肝細胞毒性具有保護作用等效果。而細胞週期失調亦是引起癌症的原因之一，所以研究 PCA 調控細胞週期成為抗癌機制釐清不可或缺的一環。

二、胃癌(gastric cancer)

胃癌可由眾多因素而被誘發，包括細菌感染、環境因素、遺傳因素等等。根據世界衛生組織估計，胃癌是全世界盛行率排名第四，是最普遍被診斷出來的癌症，而且是所有癌症死亡率排名第二高，因此被視為國際間重要的健康危機。傳統胃癌療法主要分為三種：外科手術—胃癌的外科手術，包括切除整個或局部的胃。切除胃之後，食物將在小腸內被分解，而不是在胃內分解；化學治療—化學療法利用抗癌藥物殺死癌細胞；放射療法—治療胃癌很少用放射治療，因為胃部的的位置非常靠近其他重要的器官，在進行治療時，很難不會對其他的器官造成副作用，除化學治療外，外科手術與放射療法對自身帶有一定的傷害，導致胃癌治療產生較高之局限性。有鑑於此，尋找癌症化學預防物質(chemopreventive agent)為近年來研究之重點。韓國 lee 等人的研究表明，細胞週期調控因子的表達對晚期胃癌患者有臨床價值。細胞週期蛋白(cyclin)、細胞週期蛋白依賴性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)及細胞週期蛋白依賴性激酶抑制劑(cyclin dependent kinase inhibitor, CDKI/CDI)的失控在胃癌的發生及發展中起關鍵作用，但對胃癌病人的臨床意義仍不清楚[12]。

三、細胞週期(cell cycle)

細胞週期通常可劃分為分裂間期和分裂期，分裂間期是物質準備和累積階段，分裂期則是細胞增殖的實施過程。細胞週期亦可以分為四個階段：G0/G1、S、G2 及 M。G1 和 G2 期是細胞生長期；S 期是細胞將細胞核內的染色體複製的時期；M 期是細胞進行有絲分裂(mitosis)或減數分裂(meiosis)的時期[1]。細胞週期的進行是由不同之訊息蛋白所調控，如下分述之：

3-1 週期素(cyclin)

cyclin 或稱週期蛋白，是調節細胞週期的蛋白質家族。在各個時期各有不同的 cyclin 所調控，不同的 cyclin 在細胞週期的不同階段發生作用。細胞週期的主要 cyclin 有：cyclin A、cyclin B、cyclin Ds 及 cyclin E。在 G1 期→S 期調控蛋白為 cyclin D1 以及 cyclin E，S 期→G2 期調控蛋白為 cyclin A，G2 期→M 期調控

蛋白為 cyclin B。

3-2 細胞週期蛋白依賴性激酶(cyclin dependent kinase；CDK)

CDK 是以生物化學的方式控制細胞週期檢查點(check points)，協調細胞循環變化的確切時間。CDK 在細胞週期各種檢驗點的控制中發揮著重要作用，與相應的週期蛋白結合調控細胞週期的進程。在人體細胞中，控制 G1 期的主要是 CDK2、CDK4 和 CDK6；S 期和 G2 期依賴於 CDK2；而 M 期主要由 CDK1 負責。G1 到 S 的過程受到 cyclin D1、cyclin D2、cyclin D3、cyclin E、cyclin A 以及其所屬的激酶調節。G1 時期 CDK 的活性受到生長因子、細胞之間之聯繫及生長抑制因子之影響。

3-3 蛋白依賴性激酶抑制劑(cyclin dependent kinase inhibitor；CDKI/CDI)

CDKI 以其結構上和功能上的特性分為二家族。INK4 家族包括 p16、p15、p18 及 p19，最大表現於 S 期的中期於增殖細胞。INK4 proteins 的功能上活性取決於視網膜母細胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, RB)的存在與否。p15 及 p16 有著高頻率發生基因刪除(gene deletions)，以及 p16 基因也常會突變，表示這些基因可能擔任抑癌基因(tumor suppressors)的角色。另一個 CDKI 的家族 Cip/Kip family，包括 p21、p27 及 p57 這些蛋白質限制 G1 cyclins 的激酶活性。Cip/Kip proteins 與多種的 CDK complex 交互作用，像是 cyclin A、E 及 CDK。Kip proteins 的過度表現往往會導致細胞週期的停滯作用(arrest)。

伍、材料與方法

5.1 細胞培養(cell culture)

將人類胃癌 AGS 細胞培養於含有 10 % 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、5 % 丙酮酸鈉(sodium pyruvate)及 5 % 盤尼西林-鏈黴素(penicillin-streptomycin)的 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)中。培養條件為 37°C、5% CO₂，每日將細胞置於顯微鏡下觀察，並定期更換培養液。

5.2 細胞生長曲線分析(cell growth assay)

調整 AGS 細胞濃度約為 1×10^5 cell/ml 之細胞移至 24 well microtiter plate 培養，待細胞貼覆後，再以 serum free 的 DMEM 進行 Starvation，待 24 小時去除上清液後，再分別加入濃度 0、1.0、2.0、3.0、6.0 mM 的 PCA，再分別處理 0、12、24、48 小時。接著將細胞以 PBS 清洗 2 次，去除上清液，加入 trypsin-EDTA 將細胞打下並收集，接著以 1000 rpm 離心 5 分鐘，將收取下來的細胞與 trypan blue 1 : 1 混合均勻，以細胞計數盤(counting chamber)計算細胞數。

5.3 細胞毒性測試(MTT assay)

調整 AGS 細胞濃度約為 1×10^5 cell/ml 以細胞移至 24 well microtiter plate 培養，待細胞貼覆後，再以 serum free 的 DMEM 進行 Starvation，待 24 小時後，去除上清液後，分別加入濃度 0、1.0、2.0、3.0、6.0 mM 的 PCA 處理 24 小時。接著去除上清液後，加入 1 ml 含 10% MTT 之 DMEM 於培養箱靜置 4 小時，去掉含試劑之培養液後晾乾，並加入異丙醇 1 ml 溶出細胞內之紫色結晶，於固定波長 563 nm 下測定其吸光值。

5.4 流式細胞儀(flow cytometric analysis)

調整 AGS 細胞濃度約為 5×10^5 cell/ml 以之細胞移至 6 well microtiter plate 培養，待細胞貼覆後，再以 serum free 的 DMEM 進行 Starvation，待 24 小時後去除上清液，再分別加入濃度 0、1.0、2.0、3.0、6.0 mM 的 PCA，再分別處理 0、12、24、48 小時。於處理時間後，收集上清液，再以 PBS 進行 Wash。接著利用 trypsin-EDTA 將細胞從培養皿分離，離心後去除上清液，重覆進行 Wash 離心後得到細胞沉澱物。再緩慢加入冰的 70%酒精進行固定，並打散細胞，最後放置於 -20°C overnight。隨後，以 1000 rpm 進行離心五分鐘，再次以 PBS 進行 Wash 兩次，接著加入 1 ml PI/Triton-100 溶液(0.02 mg/ml Propidium Iodide、0.02 mg/ml RNase 以及 0.1% Triton-100 溶於 PBS 中)並打散細胞，並避光染色 15 分鐘。隨後將細胞打散後並以 35 μ m 尼龍篩網進行過濾，即可進行流式細胞儀分析。

5.5 西方點墨法(Western blotting ; WB)

5.5.1 細胞溶解物

調整 AGS 細胞濃度約為 2×10^6 cell/ml 之細胞移至 10 cm dish 培養，待細胞貼壁後，再以 serum free 的 DMEM 進行 Starvation 24 小時，將處理 3 mM PCA 以及沒有 PCA 處理的細胞於 0、12、24 小時收取。把細胞收集後接著加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer)與蛋白質水解酶抑制劑(NaVO₄、PMSF、leupeptin)於 4°C 下震盪 4 小時後高速離心(4°C, 12000 rpm, 30 min)取得蛋白質，並取得上清液，儲存於-20°C。

5.5.2 蛋白定量

以 Coomassie brilliant blue G-250 進行蛋白定量，Coomassie brilliant blue G-250 與蛋白質之藍色複合物於 595nm 有較大之吸光值，以此作定量蛋白，並以胎牛血清蛋白(Bovine serum albumin ; BSA)為蛋白質標準溶液，製備為不同濃度之 BSA 作為標準曲線後用以換算各細胞萃取液內之蛋白質濃度，以製備各種蛋白於固定濃度下取得不同體積後進行蛋白電泳。

5.5.3 鑄膠

電泳前可先將電泳所用之 1.0 mm 或 1.50 mm 玻璃洗淨並拭乾，並以鑄膠器固定於電泳座，欲做小分子量之蛋白，則配製(2%)當濃度之下層 separating gel，並將 separating gel 注入鑄膠器中至玻璃上緣 2 cm 左右，加入二次水覆蓋液面，待 1 小時左右讓其下層膠凝固後再將上層之二次水去掉吸乾，即可配置上層 stacking gel，並將電泳齒槽置入上層 stacking gel 中待其凝固後可拔出齒槽，並用二次水沖洗其齒槽後架至電泳槽中，待其檢體加入 well 中可開始進行電泳。

5.5.4 製備樣品及電泳

將蛋白濃度調整為 50 µg，以 ddH₂O 補至 10 µl 並外加 2.5µl 之 5 倍 loading dye，加熱 100°C 10 分鐘後放置於冰上 10 分鐘，再進行離心，即可進行電泳。首先將電泳液(running buffer)入電泳槽內槽中，再將已處理之樣品小心注入 well 中，注意不要令樣本溢出 well 中，其中一個 well 注入 protein standard marker，待樣品完全注入 well，則於最內側之玻璃上緣加入新的 running buffer 直至蓋過最內側玻璃上緣。利用電壓 70 V 使樣品集中上層 stacking gel 跑到與 separating gel 之分界線，再調整電壓 100 V 進行蛋白質分離，直至 loading dye 跑至底限停止電泳。

5.5.5 蛋白質之轉漬

電泳完畢後取出膠體，去除上層 stacking gel 後將膠體依次置於經轉漬液 (transfer buffer)潤之陰極板、海綿、濾紙、膠、硝化纖維膜、濾紙、海綿、陽極

板中，且注意各層中間不可含氣泡，若有氣泡則以玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後夾板鎖緊即可置於轉漬槽中進行 transfer，連接後電源線，置於冰上以電壓 100V 進行 2 小時進行 transfer。

5.5.6 免疫墨點法

完成 transfer 後取出硝化纖維膜取出，並以麗春紅(ponceau S)染色進行蛋白質初步觀察後，以 TBS buffer 洗乾淨並加入 5% blocking buffer 進行 blocking 1 小時，接著以 TBS-tween 漂洗 10 分鐘 3 次並加入一級抗體，置放於 4°C 搖晃隔夜。回收一級抗體並以 TBS-tween 漂洗 10 分鐘 3 次後加入二級抗體於常溫中溫和反應 1 小時，再次利用 TBS-tween 漂洗 10 分鐘 3 次後，使用顯影劑完整覆蓋硝化纖維膜後使用冷光儀(GE ImageQuant LAS 4000 mini)觀察細胞週期相關調控蛋白的表現量。

5.6. 免疫沉澱法(immunoprecipitation, IP)

調整 AGS 細胞濃度約為 2×10^6 cell/ml 之細胞移至 10 cm dish 培養，待細胞長至八分滿後，再以 serum free 的 DMEM 進行 Starvation，加入 3 mM PCA 處理 0、12、24 小時，以 trypsin-EDTA 將細胞及培養皿分離，離心得細胞沉澱物後萃取蛋白質並將其定量。定量完成後取適當量蛋白(500 μ g/ml)，利用免疫沉澱法分析，加入 3 μ l 一級抗體(CDK)，先在 4°C 下反應 overnight。隔日，將樣品和 30 mg protein A-agarose beads 混合。接著在 4°C 下繼續作用 4 小時。然後以 10,000 rpm 離心 5 分鐘，小心移除上清液，加入 500 μ l RIPA buffer 清洗，如此重複至少三次，最後離心小心去除上清液，加 35 μ l 2 倍 sample dye，加上防爆蓋置於 100°C 加熱 3 分鐘後，立刻置於冰上 5 分鐘，待其冷卻後去除防爆蓋並 4°C 下離心 10000rpm 5 分鐘，準備新的 eppendorf 小心取其上清液，可儲於 -80°C 或儲於 -20°C，而後進行 western blot 分析 cyclin 之蛋白表現。

陸、結果

6.1. PCA 對 AGS 細胞生長之影響

本研究計畫藉由細胞生長曲線(cell growth assay) (Fig. 1)與及細胞毒性測試(MTT assay)(Fig. 2)可以證明 AGS 細胞處理不同濃度 PCA 之生長有被抑制之情形。從 Fig. 1 中可見未經 PCA 處理之 AGS 細胞生長顯著上升作為控制組，而經 DMSO 處理之 AGS 細胞其生長曲線則與控制組無異，此組別為 DMSO 溶劑控制組，代表 0.2% DMSO 並不影響 AGS 細胞生長。而經由不同濃度 PCA (0、1、2、3 和 6 mM)處理過之 AGS 細胞於 12、24 和 48 小時其生長曲線顯示均有受到抑制的現象，而 PCA 濃度處於 3 mM 時 12 至 24 小時細胞幾乎處於不生長之狀態。

為確認此結果，同樣將 AGS 細胞處理不同濃度之 PCA (0、1、2、3 和 6 mM)進行 MTT 測試。從 Fig. 2 中可見，PCA 濃度約 3 mM 已可抑制約 25% AGS 細胞生長，而 PCA 在 6 mM 濃度則為 AGS 細胞出現半致死劑量時 (IC_{50})。綜合 Fig. 1 及 Fig. 2 結果，以 3 mM PCA 處理 AGS 細胞雖可使部分細胞死亡，但生長停滯現象亦趨於明顯，後續實驗以濃度 3 mM PCA 進行細胞週期之分析。

6.2. PCA 對 AGS 細胞生長週期之影響

為探討 PCA 是否經由調控 AGS 細胞生長週期，進而抑制細胞生長，我們進一步使用流式細胞儀(flow cytometry)分析細胞週期分布情形(Fig. 3)。以 3 mM PCA 處理 AGS 細胞 0、12、24 和 48 小時後，收集細胞進行細胞週期之分析。實驗結果指出，AGS 細胞處理 3 mM PCA 24 小時後，與 control 比較，細胞週期明顯停滯於 G2/M 期。初步推論 PCA 可能具有令細胞週期停滯於 G2/M 期之能力。而在 3 mM PCA 處理 48 小時後，AGS 細胞則有 sub G1 期增加，顯示細胞進行凋亡反應。

6.3 PCA 對部分細胞週期調控蛋白的影響

細胞週期是經由許多蛋白互相協調進而調控細胞週期進行。由 Fig. 3 結果得知 AGS 細胞經 3 mM PCA 處理 24 小時後，造成細胞週期停滯於 G2/M 期。為了瞭解 PCA 經由影響那些細胞週期調控蛋白，進而使 AGS 細胞生長受到抑制，本實驗更進一步使用 Western blotting 分析 PCA 對於調控細胞週期相關蛋白表現的影響。Fig. 4 觀察結果得知細胞週期 G0/G1 期相關調控蛋白 p53、p21、p27 和 p16 均不受到 PCA 影響，顯示 PCA 並不是經由影響這些蛋白表現來抑制 AGS 細胞之生長。進一步分析細胞週期 G2/M 期調控蛋白，在 Fig. 5(A)結果中，可觀察到控制組細胞內 Cyclin B1 在 12 以及 24 小時蛋白表現持續上升；而 PCA 試驗組 Cyclin B1 蛋白表現卻在 12-24 小時明顯被抑制。過去研究指出 p-cdc 2(Tyr 15)之去磷酸化為活化態，可與 Cyclin B1 共同作用調節 G2 期進入有絲分裂期。而結果指出 PCA 並沒有作用於 p-cdc 2 (Tyr 15) 去活化。而其他相關蛋白 p-cdc 2(Thr

161)、cdc2 及 cdc25c 之表現量都無明顯之變化，顯示出 p-cdc 2(Tyr 15)、p-cdc 2(Thr 161)、cdc2 及 cdc25c 並不受 PCA 之調控。為更確認 PCA 抑制 Cyclin B1 而使細胞週期停滯在 G2/M 期，我們利用免疫沉澱法(IP)將細胞中的 Cdc2 先浸行純化，再以 Western blotting 分析 CyclinB1 之表現，以觀察 CyclinB1/Cdc2 complex 結合情形。由 Fig. 5(B)結果發現，PCA 試驗組在 12 小時以及 24 小時明顯抑制 CyclinB1 表現，證實 PCA 經由抑制了 CyclinB1/Cdc2 complex 的結合，進而使細胞週期停滯於 G2/M 期。

柒、討論

7.1. PCA 之背景

近年來，全世界由癌症所引起之死亡率逐漸提高，胃癌更佔全球癌症致死率中第四位，但因其治療方法具有局限性，祈可開發更好之藥物以輔助治療。原兒茶酸 (protocatechuic acid, PCA) 廣泛存在於蔬果植物中，乃一簡單結構之多酚化合物。PCA 具有多種生物活性，在過去研究中已被證實具有抗氧化及抗自由基之能力[5][6]，由於自由基的累積會導致活性氧的增加，PCA 則可抑制活性氧的堆積從而達到抗氧化作用。PCA 也具有誘導癌細胞凋亡 (apoptosis) 的活性，研究顯示 PCA 藉由抑制細胞週期調控蛋白 RB (retinoblastoma) 過度磷酸化，可降低血癌細胞 (promyelocytic leukemia HL-60 cells) 之存活[5][7]；PCA 亦被證明具有抑制癌細胞轉移之能力[8]。本計劃我們以研究 PCA 之濃度及其作用時間評估其對人類胃癌 AGS 細胞生長週期之影響，研究初步指出 PCA 可導致癌細胞生長停滯，進而達到抗癌之效果。

7.2. PCA 之劑量毒性

PCA 具有抗氧化、抗癌、減少自由基等功能，低劑量之 PCA 對正常細胞是無害的，但 PCA 劑量過高則會導致細胞毒性產生。過去研究指出老鼠攝入 500 mg/kg 之 PCA 後會令抗氧化酵素 GSH 加速消耗，即造成 PCA 之抗氧化能力下降，進而引發肝毒性及神經毒性[9]。研究表明可使用親電性毒物質 (electrophilic toxicants) 或降低 PCA 之劑量可達到去除毒性從而發揮其該有之生物功能。本實驗則使用後者方法以弭除高劑量毒性之虞，透過細胞生長曲線 (Fig. 1) 及細胞毒性檢測 (Fig. 2) 實驗結果顯示：以不同濃度之 PCA (0、1、2、3 和 6 mM) 處理之 AGS 細胞於 12、24 和 48 小時其生長曲線顯示均有受到抑制的現象，PCA 濃度 3 mM 處於 12 至 24 小時細胞幾乎處於不生長之狀態。而 PCA 在 6 mM 濃度下，則可抑制 AGS 細胞生長 50% ($IC_{50}=6\text{ mM}$)。綜合 Fig. 1-2 結果，以 3 mM PCA 處理 AGS 細胞可使部分細胞死亡，但生長停滯現象是否是經由影響細胞週期所致為後續研究之重點。

7.3. PCA 影響 AGS 細胞之生長週期

過去許多研究報告均指出 PCA 是具有令細胞凋亡之能力，但於此實驗模式中以研究 PCA 影響細胞週期變化為主軸。當 AGS 細胞處理 3.0 mM PCA 培養 24 小時，可見到 AGS 細胞生長受抑制，為探究 PCA 是否影響 AGS 細胞生長週期，所以使用流式細胞儀 (flow cytometry) 分析其細胞週期之分佈。實驗結果得知 PCA 作用下之細胞處於 G2/M 期之比例隨時間增加而變多，顯示 PCA 誘導此時期之細胞 G2/M 期停滯作用。但隨著時間由 24 小時到 48 小時，細胞分佈隨之於 sub G1 期變多，顯示出 3 mM PCA 作用時間長達 48 小時則可能導致細胞走向凋亡。

7.4. PCA 影響細胞週期調控蛋白之分子機制

首先，透過流式細胞儀分析結果得知 3 mM PCA 作用 24 小時造成 AGS 細胞停滯於 G2/M 時期之現象，後續利用西方墨點法 (Western blotting) 進行分析該時期之蛋白表現。

7.4.1. Cyclin B1 及 CDK1(Cdc2)蛋白

Cyclin B1/CDK1(Cdc2)為促進細胞進行細胞分裂之調控蛋白複合體，令細胞週期進入有絲分裂期(mitosis)。從 cyclin B1 可見未處理 PCA 之控制組別於 12 小時及 24 小時有增加之趨勢，但 PCA 處理後則於 12 小時及 24 小時有明顯之下降現象，表明 PCA 之作用可能抑制 Cyclin B1 之增加從而達到抑制 G2 時期進入 M 期。而 Cdc2 於 PCA 之作用下則無明顯下降表現，可推論 PCA 於 G2/M 期主要影響 Cyclin B1 蛋白。

7.4.2. p-cdc2(Tyr-15)蛋白

p-cdc2(Tyr-15)於細胞週期進行時抑制 G2/M 期之運行，即 p-cdc2(Tyr-15)可藉由 Cdc 25C 蛋白將其去磷酸化變成 Cdc2 才可令細胞週期運行至有絲分裂期。根據 Fig. 5 顯示 p-cdc2(Tyr-15)蛋白於 PCA 處理後並沒有明顯上升，所以推論 p-cdc2(Tyr-15)可能不是 PCA 令細胞週期停止於 G2/M 期之調控蛋白。

7.4.3. Cdc25c 蛋白

Cdc25c 蛋白可將 p-cdc2(Tyr-15)進行去磷酸化後進入細胞有絲分裂期，但西方墨點法顯示出此蛋白在控制組和 PCA 試驗組相比亦沒有明顯之變化，PCA 非作用於 Cdc25c 蛋白之調控。

7.4.4. p-cdc 2(Thr 161)

Cdc2 有 Thr14、Tyr15 及 Thr161 位置可進行磷酸化，藉此調控細胞週期之進行，為調控細胞週期 G2/M 期之蛋白之一。當 DNA 受到損害，p21 蛋白會令細胞週期停滯於 G2 期，而調控之機制則是將 Cdc2 進行磷酸化，其磷酸化之位點為 Thr 161[10]。但由於 Fig. 4 之 p21 表現不受 PCA 調控(增加其表現量)，導致 p-cdc 2(Thr161)亦沒有增加之現象(令細胞週期停滯)，顯示 p-cdc2(Thr161)沒有受到 PCA 之影響。

從上述結果討論中推論 PCA 主要透過抑制 cyclin B1 蛋白而令其細胞週期停滯於 G2/M 期，抑制細胞週期之運行(Fig. 6)。而 PCA 則不影響其他作用於 G2/M 期之調控蛋白 Cdc2、p-cdc2(Tyr-15)、p-cdc 2(Thr-161)、Cdc25C 以及 G0/G1 期蛋白之表現。本計畫初步結果表明 PCA 的確具有誘導癌細胞生長週期停滯之作用，進而抑制細胞生長。然而，PCA 誘導 AGS 細胞週期 G2/M 停滯之分子機制仍需進一步證實及釐清。

捌、參考文獻

1. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-49.
2. 許振東；陳滄澤；江惠卿；楊孟元；王朝鐘 洛神花萃取物抑制兔子動脈硬化之作用 中山醫學雜誌 15 卷 2 期。
3. 陳靜儀 Studies on the Mechanisms of atherosclerosis by high molecular Protocatechuic acid polymers 中國醫藥大學 營養研究所 2004。
4. 羅佳紋 探討洛神花萃取物及成分抑制血管病變之機制:對血管平滑肌增生以及移動能力之影響 中山醫學大學 生化暨生物科技研究所 2009。
5. Shui Guan, Bao YM, Bo Jiang, An LJ. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Eur J Pharmacol.* 2006 May 24;538(1-3):73-9.
6. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyaphatsara N, Sato H, Herunsalee A, Suthisisang C. Antioxidant Effects of Aqueous Extracts from Dried Calyx of *Hibiscus sabdariffa* LINN.(Roselle) in Vitro Using Rat Low-Density Lipoprotein(LDL). *Biol Pharm Bull.* 2005 Mar;28(3):481-4.
7. Tseng TH, Kao TW, Chu CY, Chou FP, Lin WL, Wang CJ. Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol.* 2000 Aug 1;60(3):307-15.
8. Lin HH, Chen JH, Chou FP, Wang CJ. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation *Br J Pharmacol.* 2011 Jan;162(1):237-54.
9. Nakamura Y, Torikai K, Ohigashi H. Toxic dose of a simple phenolic antioxidant, protocatechuic acid, attenuates the glutathione level in ICR mouse liver and kidney. *J Agric Food Chem.* 2001 Nov;49(11):5674-8.
10. Smits VA, Klompaker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkela TP, Medema RH. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30638-43.
11. 曾翠華 洛神花成分及保健機能之評估(三) 行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度科技研究發展計劃。
12. Hui-Hsuan Lin Studies of the anti-gastric cancer effect and molecular mechanisms of Hibiscus components 中山醫學大學 生化暨生物科技研究所 博士論文 2007。
13. 張莘儀 台灣蔬果及藥材之自由基清除與乳癌生長之活性探討 台北醫學大學 藥學研究所 2010。
14. Chewonarin T, Kinouchi T, Kataoka K, Arimochi H, Kuwahara T, Vinitketkumnuen U, Ohnishi Y. Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in F344 rats. *Food Chem*

- Toxicol. 1999. 37:591-601
15. Chang X, Wang D, Chen B, Feng Y, Wen S, Zhan P. Adsorption and desorption properties of macroporous resins for anthocyanins from the calyces extract of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J Agric Food Chem*. 2012 Mar 7;60(9):2368-76.
 16. Yin MC, Chao CY. Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. *Int J Food Microbiol*. 2008;127:73-7.
 17. Gao LL, Feng L, Yao ST, Jiao P, Qin SC, Zhang W, Zhang YB, Li FR. Molecular Mechanisms of Celery Seed Extract Induced Apoptosis via S Phase Cell Cycle Arrest in the BGC-823 Human Stomach Cancer Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011. 12:2601-6.
 18. Lee DH, Park KI, Park HS, Kang SR, Nagappan A, Kim JA, Kim EH, Lee WS, Hah YS, Chung HJ, An SJ, Kim GS. Flavonoids Isolated from Korea Citrus aurantium L. Induce G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Human Gastric Cancer AGS Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012. 2012:515901.
 19. Wen S, So Y, Singh K, Slingerland JM, Resnick MB, Zhang S, Ruiz V, Moss SF. Promotion of cytoplasmic mislocalization of p27 by *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Oncogene*. 2011. 15.
 20. Dong Y, Ji G, Cao A, Shi J, Shi H, Xie J, Wu D. Effects of sinensetin on proliferation and apoptosis of human gastric cancer AGS cells. *ZhongguoZhong Yao Za Zhi*. 2011. 36:790-4.

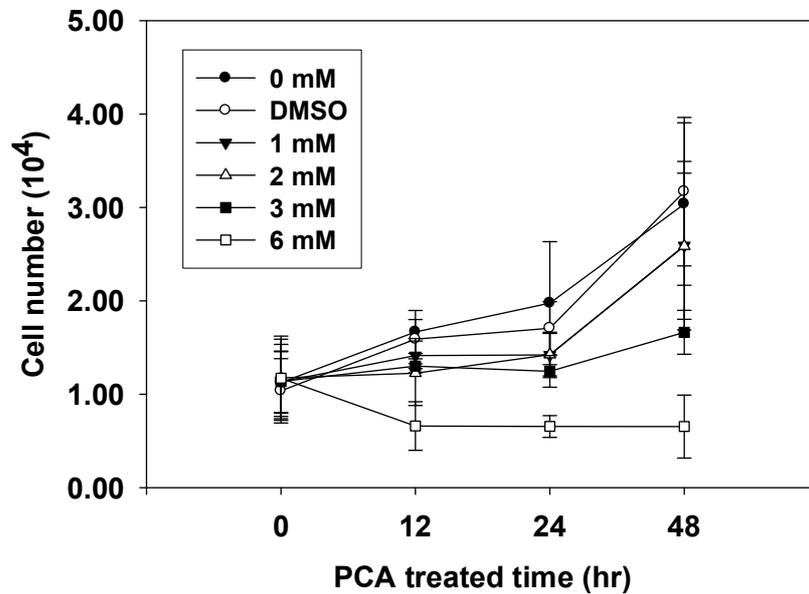


Fig. 1. AGS 細胞處理 PCA 之細胞生長曲線。AGS 細胞利用不同濃度之 PCA (0、1、2、3、6 mM) 及 DMSO 處理 24 小時細胞生長曲線之變化。細胞生長數目之統計採用 cell grow assay。各濃度之 PCA 與控制組(0 mM) 各時間點作對比。

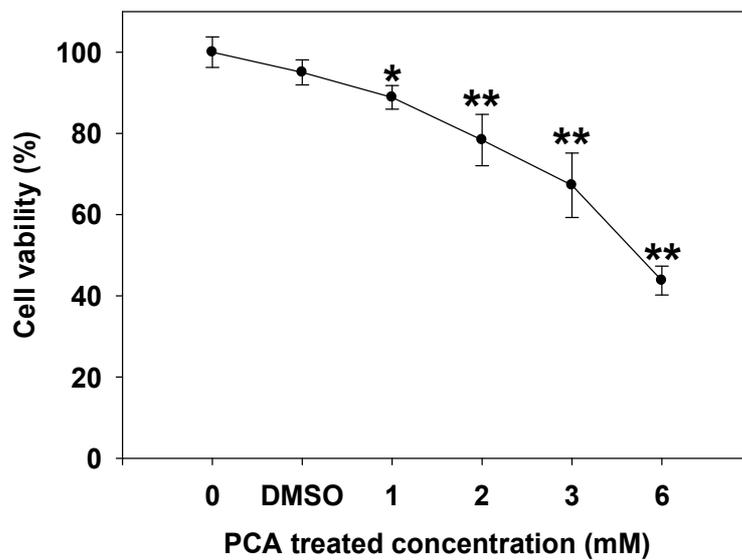
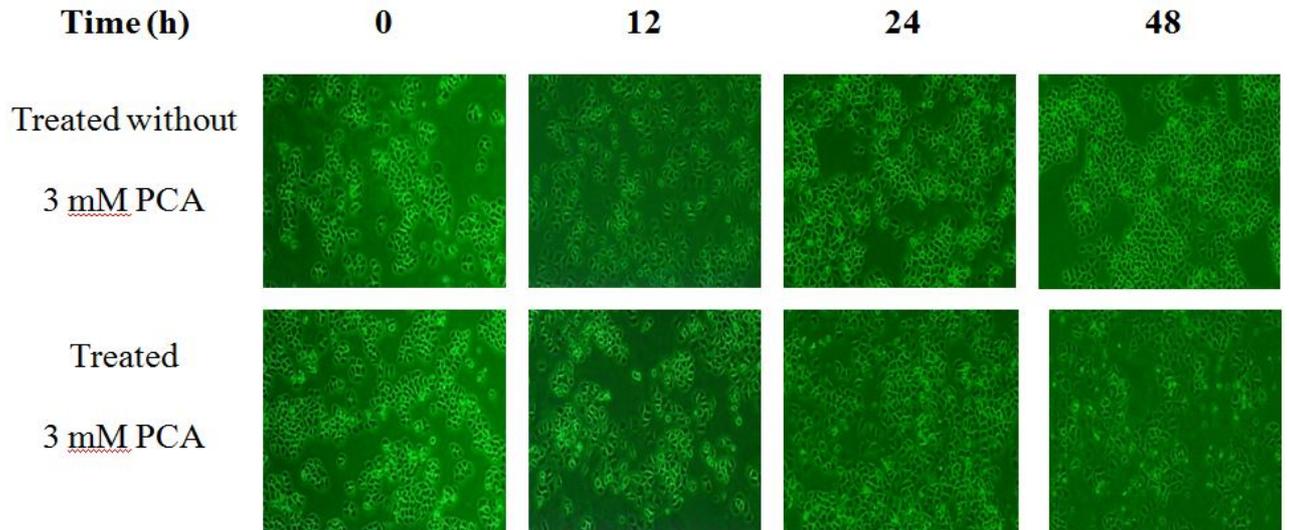


Fig. 2. AGS 細胞處理 PCA 之細胞存活率。AGS 細胞利用不同濃度之 PCA (0、1、2、3、6 mM) 及 DMSO 處理 24 小時後細胞存活率之變化。細胞存活率之測定採用 MTT assay。各濃度之 PCA 與控制組(0 mM) 作對比。*P<0.05, **P<0.01。

(A)



(B)

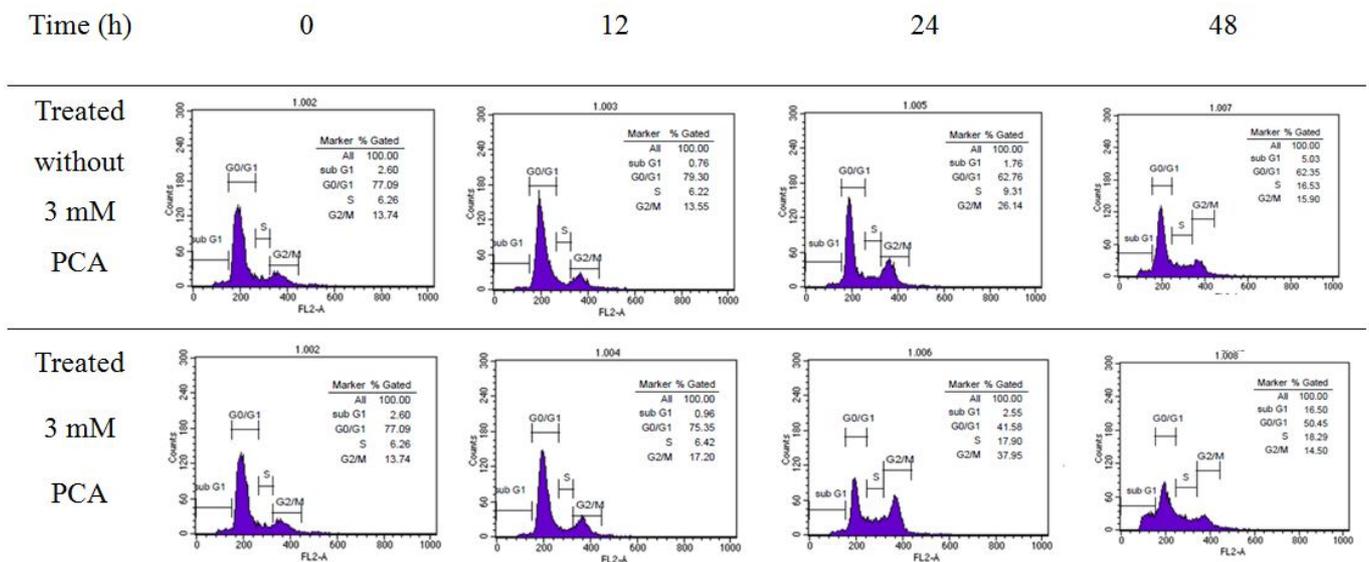


Fig. 3. AGS 細胞處理 PCA 之細胞生長型態以及細胞週期分析。AGS 細胞利用 3 mM PCA 分別處理 12、24、48 小時。(A)細胞型態利用倒立顯微鏡觀察並拍照。(B)細胞週期則利用流式細胞儀進行偵測。

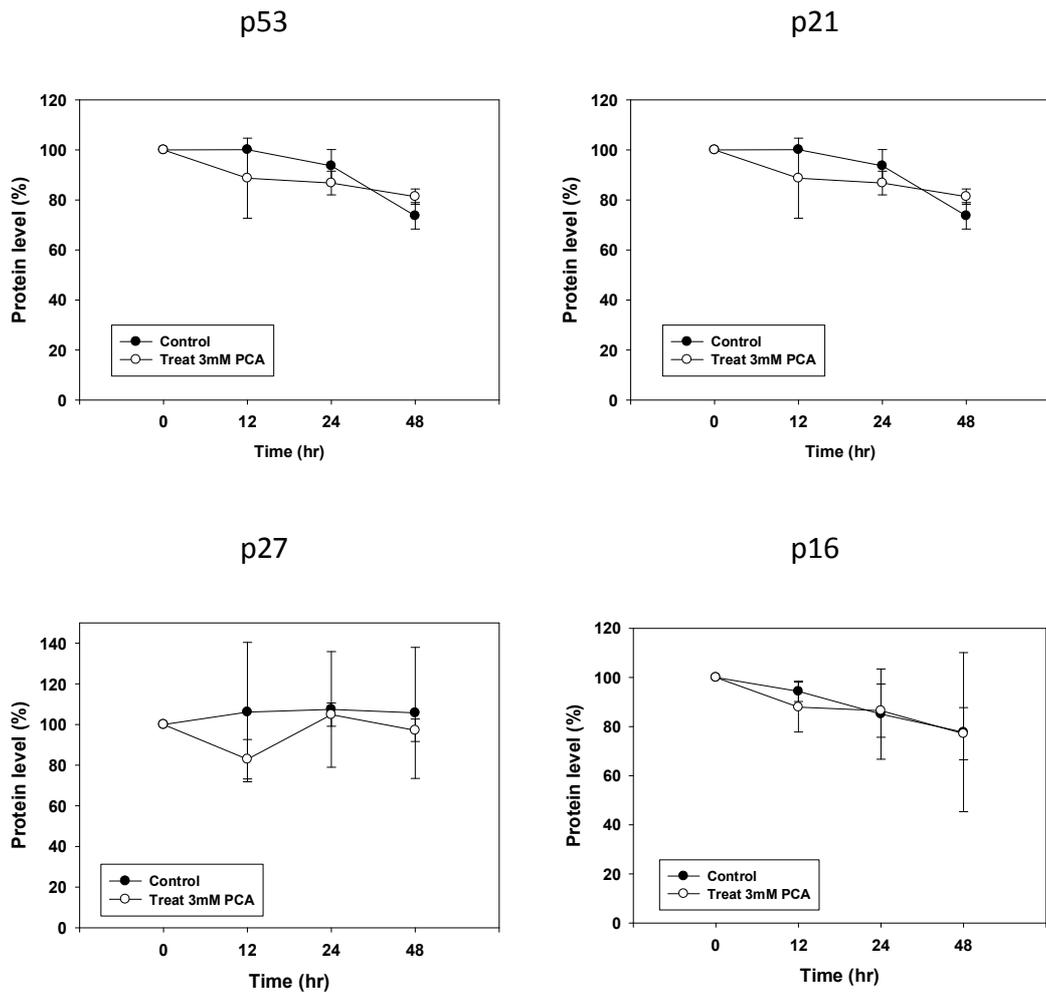
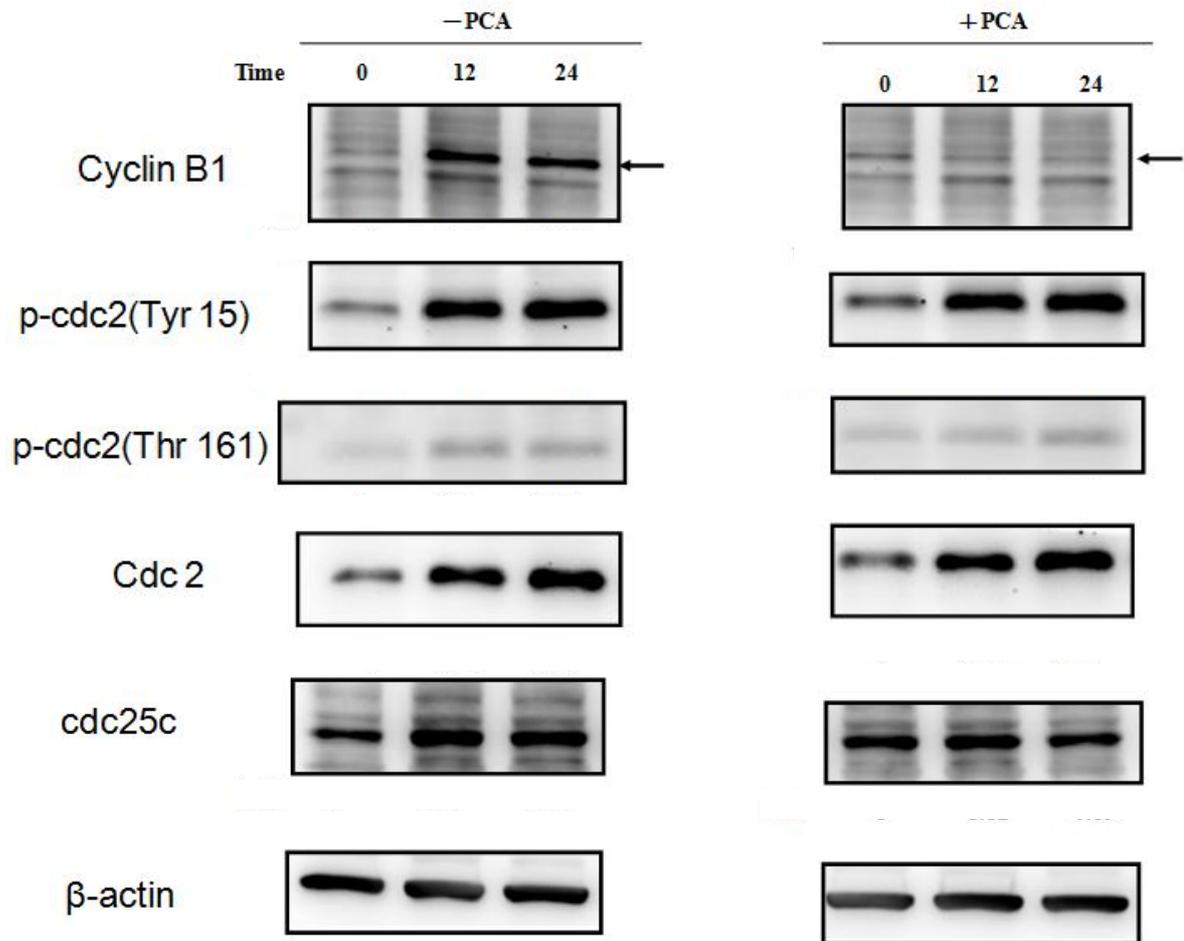


Fig. 4. AGS 細胞處理 PCA 之細胞週期相關蛋白分析。AGS 細胞利用 3 mM PCA 分別處理 0、12、24、48 小時。利用西方點墨法進行分析 G0/G1 相關蛋白 p53、p21、p27、p16 表現，再進行量化。

(A)



(B)

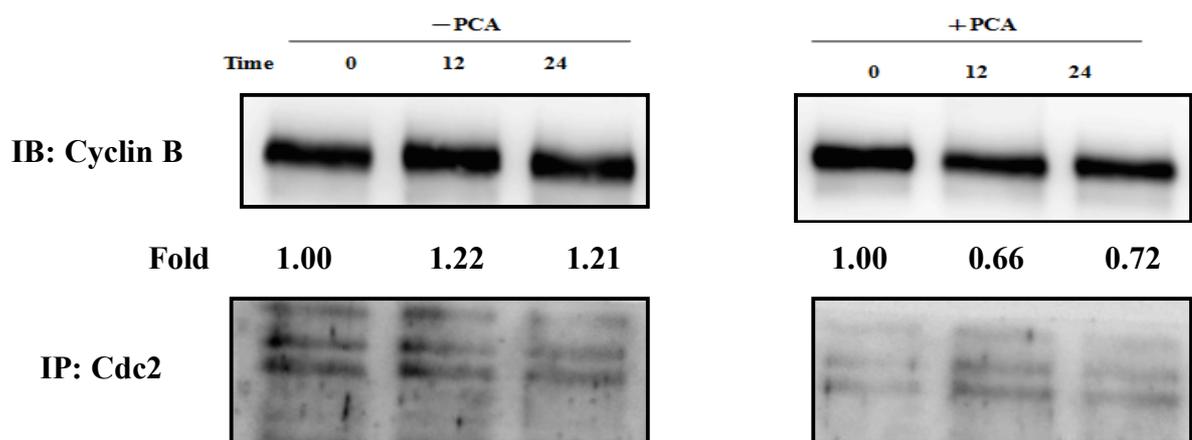


Fig. 5. AGS 細胞處理 PCA 之細胞週期相關蛋白分析。AGS 細胞利用 3 mM PCA 分別處理 0、12、24 小時。(A)利用西方點墨法進行分析 G2/M 相關蛋白 Cyclin B1、p-cdc2(tyr-15)、p-cdc2(thr-161)、Cdc2、cdc25c。(B)利用免疫沉澱法進行分析，先進行 Cdc2 純化(IP)後，再以西方點墨法觀察 CyclinB 之蛋白表現(IB)。

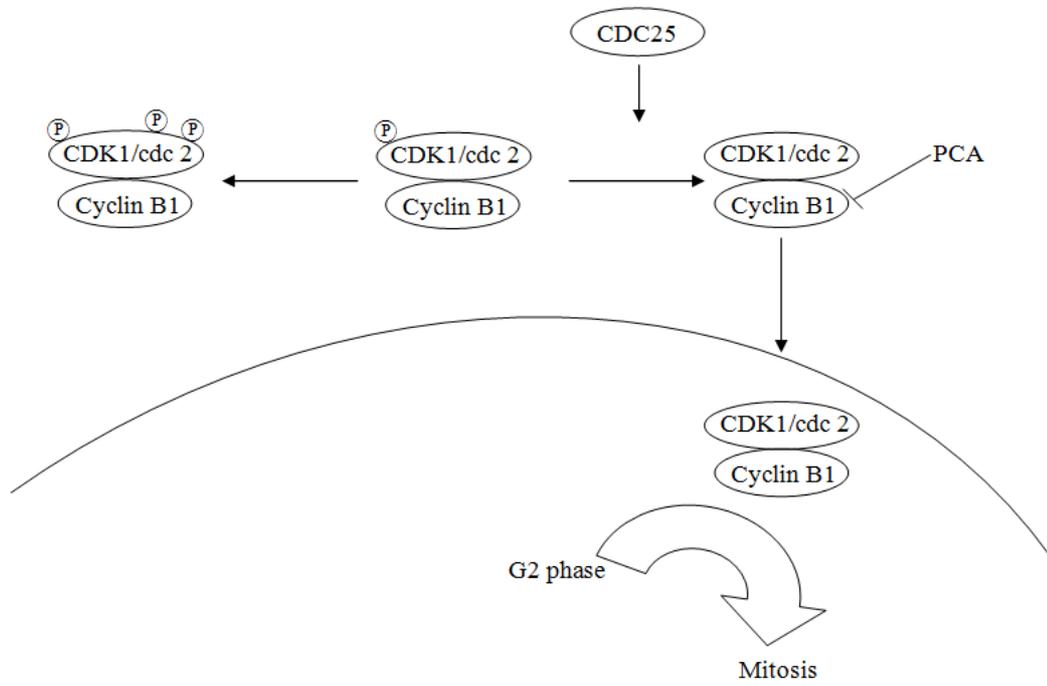


Fig. 6. 原兒茶酸(PCA) 抑制細胞週期 G2/M 期調控蛋白，進而造成制人類胃癌 AGS 細胞生長停滯之可能機轉。