

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫 Melittin 誘發人類口腔癌細胞凋亡之分子機轉(The *
* : molecular mechanism of melittin induced apoptosis *
* 名 稱 in human oral cancer cells)□ *
* *****

執行計畫學生： 林文淇
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-031-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 蔡蕙芳

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： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 99年03月31日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 Melittin 誘發人類口腔癌細胞凋亡之分子機轉 *

* : (The molecular mechanism of melittin *

* 名稱 induced apoptosis in human oral cancer cells) *

執行計畫學生：林文淇

學生計畫編號：NSC98-2815-C-040-031-B

研究期間：98年7月1日至99年2月底止，計8個月

指導教授：蔡蕙芳

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年 二年後
可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

中華民國 99 年 3 月 31 日

(一) 摘要：

蜜蜂蜂毒(Bee Venom)現今被廣泛地運用在許多疾病的治療中，它可以作用於心臟血管系統、免疫系統及內分泌系統，具有抗發炎、抗細菌及鎮痛的功能。蜂毒由多種成份組合而成，其中 melittin 為最主要的成份，約佔 40~60%，它也是蜂毒中主要的活性來源。已有研究報告指出蜂毒具有抑制腫瘤的功效，意指蜂毒會促使腫瘤細胞進行細胞凋亡作用(apoptosis)。然而，蜂毒誘發細胞凋亡之作用機制尚未清楚。所以本實驗設計主要在於探討蜜蜂蜂毒對於人類口腔癌細胞凋亡的分子機轉。利用細胞形態觀察、Hoechst 33258 染色或流式細胞儀的分析方式，證明 melittin 對於口腔癌細胞具有細胞毒性，並可以誘發細胞凋亡。然而細胞凋亡受到許多種蛋白質之調控，其中 MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinase)及 Akt 路徑參與調控細胞凋亡中許多功能。因此，接下來我們的研究著重於 melittin 對口腔癌細胞株造成細胞凋亡在細胞訊息傳遞上的影響，觀察細胞內主要幾個調節細胞存活相關的訊息蛋白 Akt/PKB 與 MAPK 家族分子等，利用西方點點法偵測口腔癌細胞中 Akt/PKB 及 MAPK 家族分子之磷酸化現象，進一步了解蜂毒誘發之細胞凋亡是否參與 Akt/PKB 及 MAPK 家族分子之路徑。

關鍵詞：Bee Venom、melittin、apoptosis、Akt/PKB、MAPK

(二) 研究動機與研究問題：

國際癌症研究總署(International Agency for Research on Cancer, IARC)於 2003 年研究報告顯示，2000 年口腔癌在全球常見癌症發生率排行榜中名列第 11。而近十年內，台灣每年罹患口腔癌的人數從一千七百位增加為四千七百位，成長幅度相當大(1)。目前有許多的研究學者致力於尋找天然物中有效的抗癌成份，並深入去探討它的分子機轉，期望可以找到有效且穩定而無不良副作用的治療藥劑。在近年來的文獻中，發現蜂毒可以有效的抑制異常增生的細胞，並促使其走向細胞

凋亡，有鑒於此，本實驗室和中興大學昆蟲學系合作，利用蜜蜂蜂毒中的主要成份 melittin 作用於人類口腔癌細胞，觀察此天然物對於癌細胞的作用為何？我們期望能找出治療癌症的天然藥物。並且讓此研究可以早日給予口腔癌病患一絲曙光。

由過去文獻中已知，melittin 會使許多種異常增生的細胞走向 apoptosis，包括 human hepatocellular carcinoma cell、rheumatoid synovial fibroblast 等(2、3)，但其在細胞層次的作用機制尚未明瞭。對此，我們著重研究 melittin 對口腔癌細胞株可否造成細胞凋亡，並了解其在細胞訊息傳遞上的作用機轉。

首先，我們要觀察 melittin 是否也會促使口腔癌細胞走向 apoptosis？melittin 對於正常的口腔細胞是否有不良的毒殺效果？而在與細胞凋亡相關的訊息蛋白像是 Akt/PKB 與 MAPK 家族分子，melittin 對這些蛋白表現量是否有影響？另外再利用 RT-PCR(Reverse Transcriptase-PCR)觀察對應蛋白的基因表現為何？，藉以了解 melittin 造成細胞凋亡的作用機制。

(三) 文獻回顧與探討：

近年來有報告指出，蜂毒於體外可引起細胞凋亡(4、5)，在老鼠的動物試驗中也發現蜂毒有抑制腫瘤細胞生長之功效(6)。更有研究指出，蜜蜂蜂毒誘發之腫瘤細胞凋亡作用，乃經由鈣離子轉訊相關之途徑(7)。這些研究結果顯示，蜂毒具有開發成為治療腫瘤藥物之潛力。然而，蜂毒誘發細胞凋亡之詳細機制尚未明瞭。

許多癌症的形成與細胞凋亡以及細胞存活的失調有關。細胞凋亡又被稱為計畫性細胞死亡(Programmed cell death)，是細胞本身原本就具備的自殺方式，不會引起周圍組織嚴重的發炎反應，為生物體移除多餘細胞以維持體內平衡的重要機制(8)。細胞凋亡受到許多種蛋白質之調控，其中 MAPK 及 Akt 路徑參與調控細胞凋亡中許多功能(9、10)。在本實驗中，我們著重研究 melittin 對口腔癌細胞株造

成細胞凋亡在細胞訊息傳遞上的影響，進一步了解 Akt 及 MAPK 家族分子是否參與蜂毒誘發之細胞凋亡。當細胞受到荷爾蒙及生長因子刺激時會活化 Akt，促進細胞增殖、分化及代謝，並保護細胞免於凋亡。在某些人類癌細胞中，發現 Akt 有異常活化之現象 (11)。MAPK 訊息傳遞路徑可分為三大類，一、Extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2)路徑二、stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK)路徑及三、p38 MAPK 路徑(8)。ERK 之活化多被認為與細胞生長有關(12)，但也有些報告指出 ERK 之活化與細胞凋亡有關(13)。而 JNK 與 p38 MAPK 路徑被活化會促進細胞凋亡 (12)。

目前 melittin 誘發各種癌細胞凋亡之能力仍需更進一步廣泛測試。melittin 可能具有發展為抗癌藥物之潛力，仍需要更多詳細之研究。

(四) 研究方法及步驟：

細胞培養 (Cell culture)：

將口腔癌細胞株 SAS、SCC-4，分別培養在 25T flask 中，所用的培養液各為 DMEM + F12(包含 1%PS、1%L-glutamine、10% FBS)以及 MEM (包含 1%PS、1%L-glutamine、10%FBS)。每 3 天拆一次細胞並更換細胞培養液，將培養皿置於 37°C，5%二氧化碳培養箱。

觀察細胞形態(Cell morphology):

將細胞培養於 dish 中，待其長至六分滿時，分別加入含有不同濃度 melittin 的 serum-free medium 至 dish 中作用 12 小時，以倒立顯微鏡觀察細胞的形態有無改變。

MTS assay：

將細胞種到 96 well plate 中 overnight(使細胞貼壁)，加入含有 melittin 的

serum-free medium 培養 12 小時，再於每個中 well 加入 20 μ l 的 MTS，置於 37°C、5%二氧化碳培養箱，待 3 小時後測定其吸光值(490nm)。

觀察細胞凋亡的型態(Hoechst 33258 Stain)：

將細胞種到玻片上 overnight(使細胞貼壁)，加入含有 melittin 的 serum-free medium 12 小時，以 PBS wash 2 次後，再以含有 4% paraformaldehyde 的 PBS 在室溫下固定 1 小時，以 Hoechst 33258 避光染 20~30 分鐘，用螢光顯微鏡觀察產生核濃縮或核分裂及 DNA 片段。並且計數 100 顆細胞觀察有多少核濃縮或核分裂及 DNA 片段。

細胞加藥物處理：

將口腔癌細胞株長至六分滿時分別加入 0、0.5、2.5 μ m Melittin(溶於 D_3H_2O)。待 12 小時後抽取細胞蛋白質，準備進行 Western blot analysis。

細胞蛋白質的抽取：

將長滿的細胞收取下來後，離心取沉澱物，將沉澱物懸浮於 30 μ l 的 cell lysis buffer 中，以超音波震盪器用頻率 8 連續震盪 30 秒之後停留 30 秒，重覆 12 次，之後以冷凍離心機設定溫度在 4°C 下以 15000rpm 離心 20 分鐘後取上清液，將此上清液以 Bio-Rad protein assay 定量方式來定量蛋白濃度，並將此上清液保存於 -80°C。

蛋白濃度測定：

蛋白質的定量採用 "Bradford's protein assay" 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物。測定方法:首先以一系列已知濃度 BSA，加入五分之一體積的 Bradford protein dye 以波長 595nm 之吸光度作一標準曲線，再以同樣的測定方法測得樣品之 O.D. 值，即可對照標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

西方點墨法 (Western blot)：

取30 μ g的蛋白進行10%或12%SDS-聚丙烯醯板膠電泳分析。

將10%或12% SDS-聚丙烯醯板膠電泳分析之膠體、硝化纖維紙(Hybond- ECL Nitrocellulose paper)及濾紙(filter paper)，以三明治方式夾起，置於Bio-Rad轉漬裝置中，加入轉印緩衝液(transfer buffer：25 mM Tris pH 8.3；192 mM Glycine；20 % Methanol)，以電壓90伏特進行1小時。轉漬後之硝化纖維紙浸泡於含5%脫脂牛奶的TTBS緩衝液(10 mM Tris-HCl pH 7.5；150 mM NaCl；0.05% Tween 20)進行blocking，於室溫下搖1小時。倒出blocking buffer，加入含有phospho-ERK、phospho-JNK、phospho-p38及phospho-Akt一級抗體的TTBS緩衝液(含1%脫脂牛奶)，於4 $^{\circ}$ C冰箱搖overnight。倒出一級抗體，以TTBS緩衝液洗5分鐘，重覆三次，然後加入含有二級抗體的TTBS緩衝液(含1%脫脂牛奶)，於室溫下搖晃1小時。倒出二級抗體，以TTBS緩衝液洗5分鐘，重覆三次，然後加入1:1的Working solution (Luminol /Enhancer solution：stable peroxide solution)，於冷光螢光影像分析儀下，利用冷光照射觀察抗原抗體結合反應。

抽RNA：

將收下的細胞用PBS洗2次，分別加入1ml TRIzol reagent，置於室溫5分鐘，之後移入Laminar Flow操作，加入200 μ l的chloroform，上下搖晃20下左右，於室溫靜置5分鐘，然後以冷凍離心機設定溫度在4 $^{\circ}$ C下以12000rpm離心15分鐘後取上清液(含RNA之水層)，接著加入500 μ l的isopropanol，上下輕晃20下，於室溫靜置10分鐘，然後以冷凍離心機設定溫度在4 $^{\circ}$ C下以12000rpm離心10分鐘後將上清液移除，留下底部的pellet，再加入1ml 75% ethanol，輕晃5下後，以冷凍離心機設定溫度在4 $^{\circ}$ C下以7500rpm離心5分鐘，倒掉上清液後，將pellet自然風乾，加入適量Depc水回溶，待測RNA濃度。回溶液冰於-80保存。

RT-PCR(Reverse Transcriptase-PCR)：

待RNA測完濃度後，以DEPC水稀釋為 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。先用PCR機器(PCR 2400)以 70°C 10分鐘去除hairpin的結構，再加入RT reaction的mixture(dNTP、oligo-dT、DTT、RT buffer、MMLV-RTase)，用PCR機器進行RT反應。

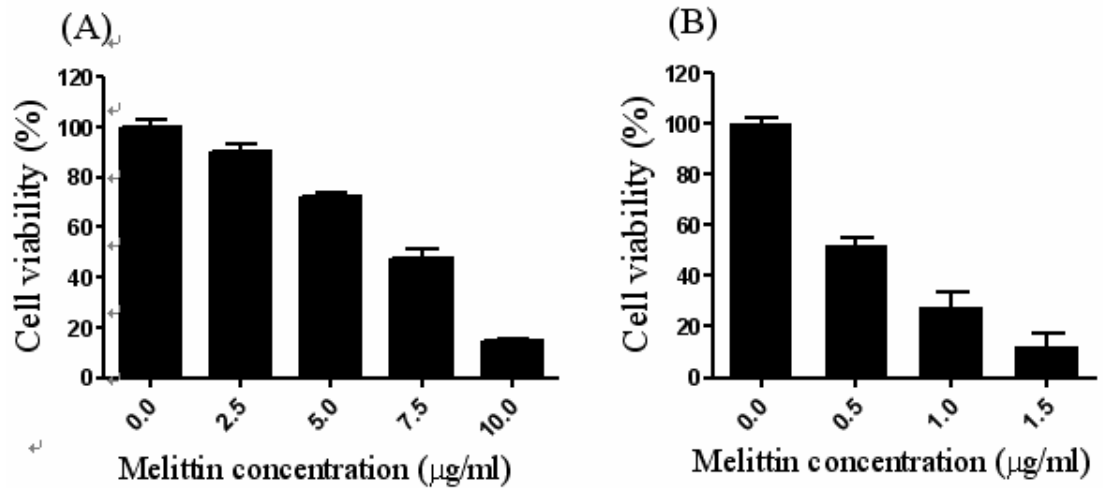
待RT反應完成後，接著做PCR的步驟，加入所需反應的mixture(dNTP、PCR buffer、primer、Taq polymerase)，然後用PCR機器進行PCR反應，待反應完畢後，即可用膠體電泳分析。

(五) 預期結果：

若 melittin 確實會抑制口腔癌細胞的生長，誘導其走向 apoptosis，在細胞型態上，我們可以看到有細胞核濃縮、細胞質濃縮及核分裂的現象。另外在蛋白表現上，我們預期隨著 melittin 濃度的上升會降低口腔癌細胞中 Akt 磷酸化的表現量；而在 MAPK 路徑中，JNK 與 p38 路徑會隨著 melittin 的濃度上升而增加活化。在 RNA 表現量上，和細胞凋亡相關的蛋白其 RNA 表現也應該隨著 melittin 的濃度而有所改變。最後，我們期盼在對癌細胞可造成毒殺反應的濃度下，不會對正常細胞的生長有所干擾，這也是 melittin 能否發展成抗癌藥物中，極需評估的項目之一。

(六) 結果：

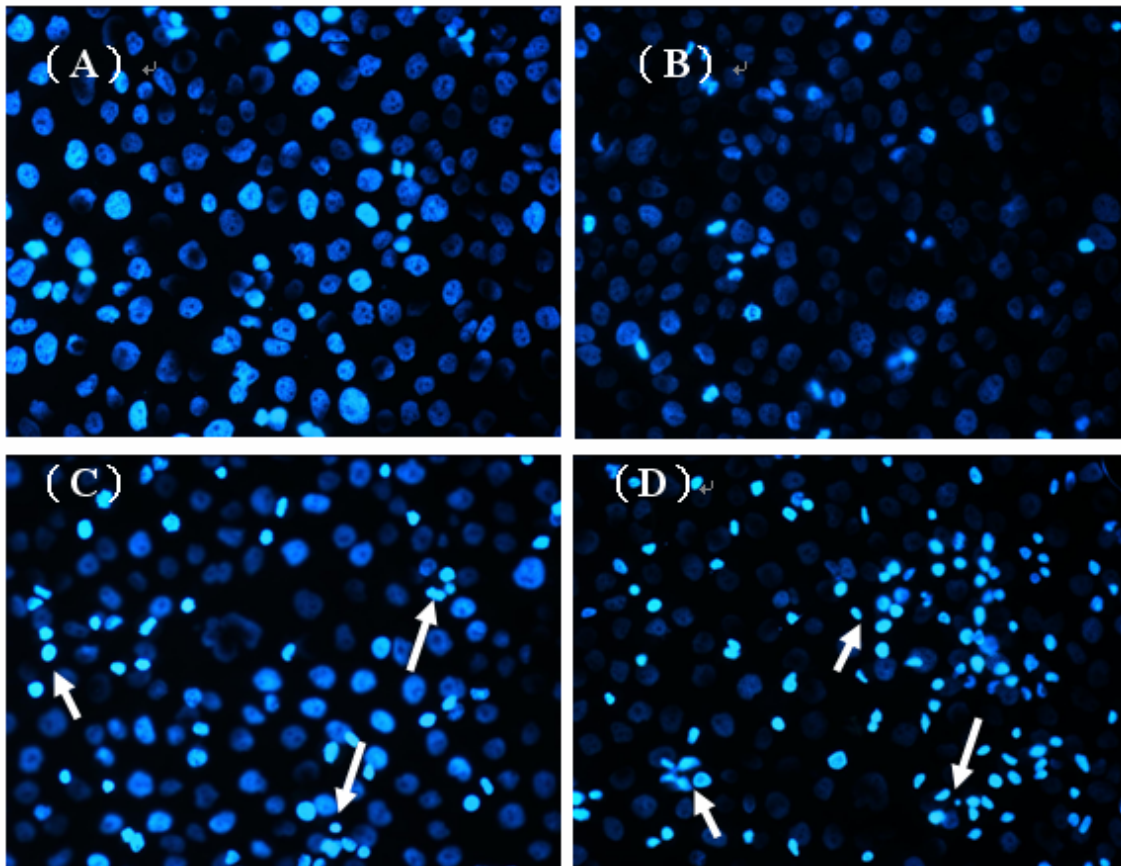
一、 Melittin 對口腔癌細胞株 SCC-4 細胞之存活試驗



圖一、Melittin 抑制人類口腔癌細胞生長。

(A) SCC-4 細胞以 1×10^4 cells/well 種於 96 孔盤中，最終濃度各為 2.5 µg/ml、5 µg/ml、7.5 µg/ml 與 10 µg/ml 的 Melittin 處理 12 小時後，以 MTS 方法分析細胞的存活率。(B) SAS 細胞以 5×10^3 cells/well 種於 96 孔盤中，以最終濃度為 0.5 µg/ml、1 µg/ml 與 1.5 µg/ml 的 Melittin 處理 12 小時後，以 MTS 方法分析細胞的存活率

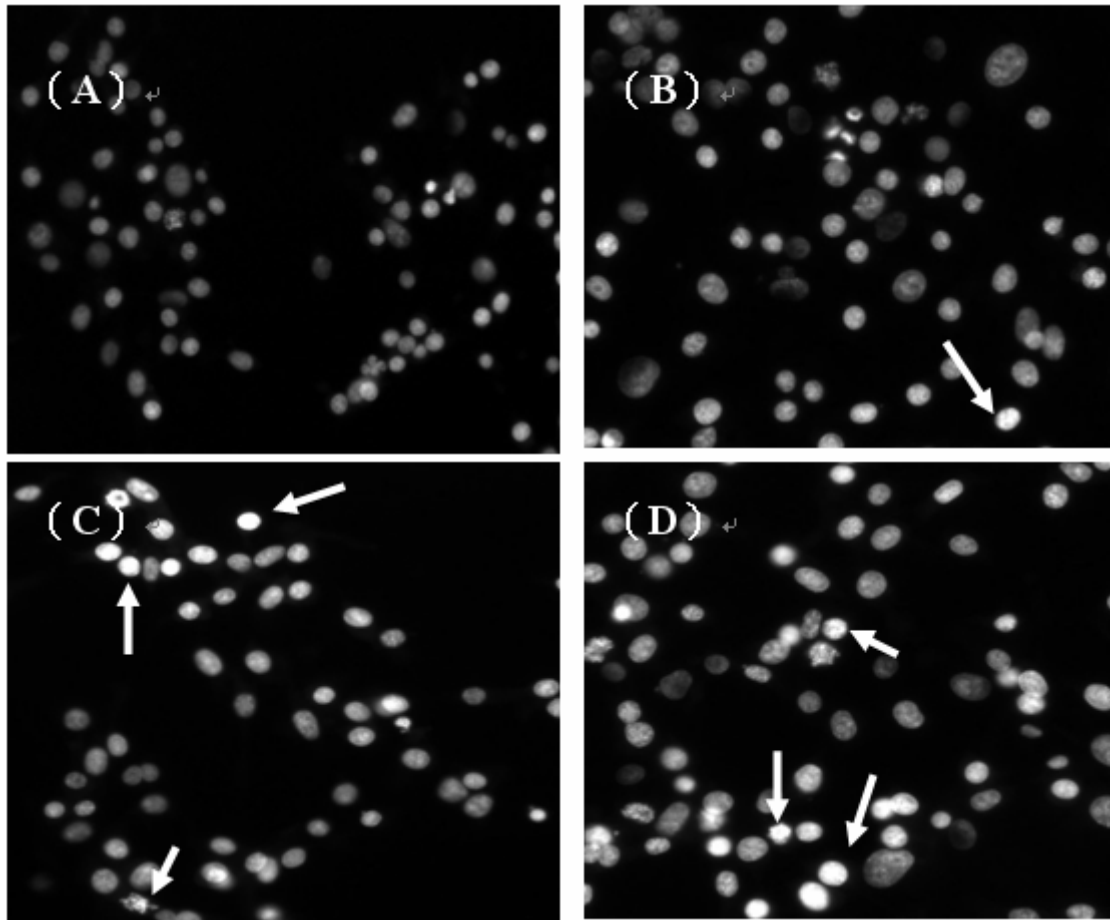
二、Melittin對口腔癌細胞SCC-4凋亡的型態觀察(Hoechst 33258 Stain)：



圖二、Melittin 誘發人類口腔癌細胞 SCC-4 細胞凋亡(200X)。

SCC-4 細胞以濃度各為 0 $\mu\text{g/ml}$ (A)、2.5 $\mu\text{g/ml}$ (B)、5 $\mu\text{g/ml}$ (C)與 7.5 $\mu\text{g/ml}$ (D) 的 Melittin 處理 12 小時後，利用 Hoechst 33258 進行細胞核染色分析，以倒立式螢光顯微鏡 200 倍放大倍率拍攝。箭號代表細胞核濃縮或細胞核斷裂為碎片的現象。

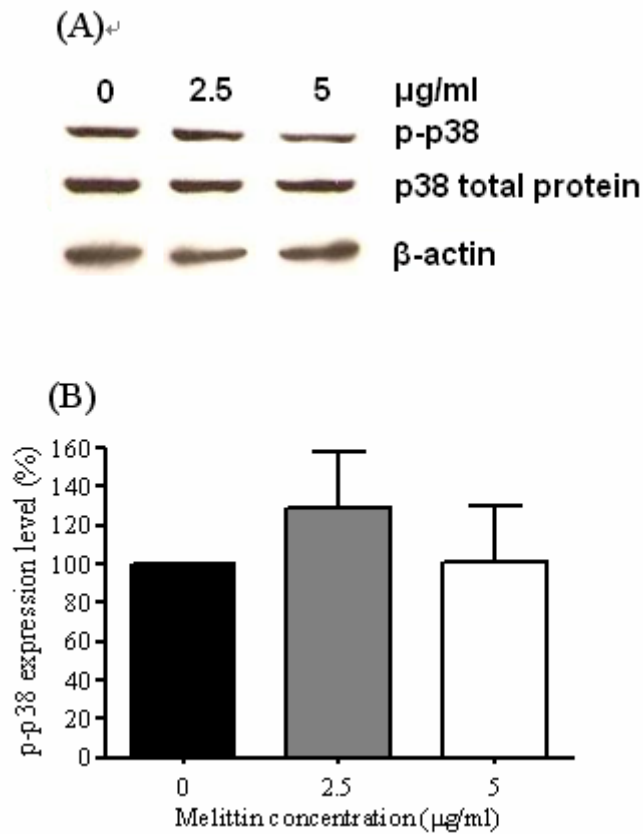
三、Melittin對口腔癌細胞SAS凋亡的型態觀察(Hoechst 33258 Stain)：



圖三、Melittin 誘發人類口腔癌細胞 SAS 細胞凋亡 (200X)。

SAS 細胞以濃度各為 0 µg/ml (A)、0.5 µg/ml (B)、1 µg/ml (C)與 1.5 µg/ml (D) 的 Melittin 處理 12 小時後，利用 Hoechst 33258 進行細胞核染色分析，以倒立式螢光顯微鏡 200 倍放大倍率拍攝。箭號代表細胞核濃縮或細胞核斷裂為碎片的現象。

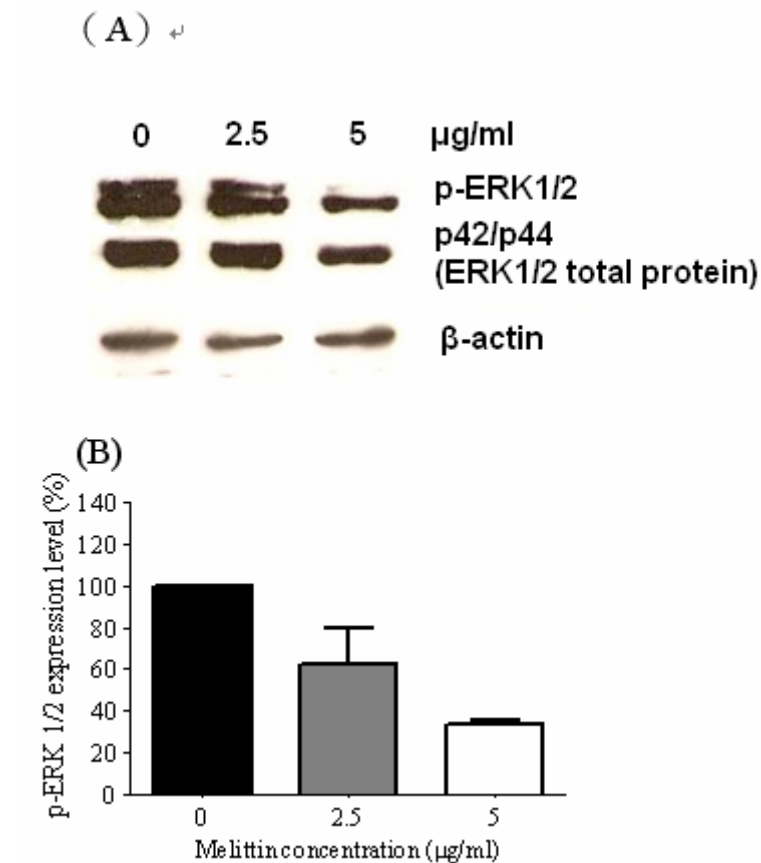
四、Melittin 促使口腔癌細胞 p38 蛋白磷酸化表現量增加：



圖四、Melittin 作用於口腔癌 SCC-4 細胞中 p38 MAPK 蛋白之表現。

(A) SCC-4 細胞經由 0 µg/ml、2.5 µg/ml 與 5 µg/ml 的 Melittin 作用 12 小時後，p38 MAPK 的蛋白表現量。(B) SCC-4 細胞經由 0 µg/ml、2.5 µg/ml 與 5 µg/ml 的 Melittin 作用 12 小時後，p38 MAPK 的蛋白表現量之量化圖。p-p38 代表 phosphorylation p38。β-actin 做為 internal control。

五、Melittin 促使口腔癌細胞 ERK1/2 蛋白磷酸化的表現量降低：



圖五、Melittin 作用於口腔癌 SCC-4 細胞中 ERK 1/2 MAPK 蛋白之表現。(A) SCC-4 細胞經由 0 µg/ml、2.5 µg/ml 與 5 µg/ml 的 Melittin 作用 12 小時後，ERK 1/2 MAPK 的蛋白表現量。(B) SCC-4 細胞經由 0 µg/ml、2.5 µg/ml 與 5 µg/ml 的 Melittin 作用 12 小時後，ERK 1/2 MAPK 的蛋白表現量之量化圖。p-ERK 1/2 代表 phosphorylation ERK 1/2。β-actin 做為 internal control。

(七) 結果討論：

經由MTS assay觀察melittin在人類口腔細胞株SCC-4與SAS的作用，從實驗結果得知melittin會抑制此兩種細胞的生長，melittin加藥濃度與細胞生長數目呈現反比的趨勢。在細胞型態觀察上(Hoechst 33258 Stain)，SCC-4與SAS此兩株細胞經melittin作用後看到有細胞核濃縮、細胞質濃縮及核分裂的現象，由此觀察出melittin誘發人類口腔癌細胞SCC-4與SAS細胞凋亡。然而細胞凋亡受到許多種蛋白質之調控，其中MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinase)路徑參與調控細胞凋亡中許多功能。經由文獻得知p38 MAPK路徑被活化會促進細胞凋亡，我們發現在melittin作用濃度2.5 µg/ml時p38路徑有增加活化的趨勢，而在melittin作用濃度5 µg/ml時與2.5 µg/ml濃度相比沒有明顯的差異。ERK之活化多被認為與細胞生長有關，melittin作用於口腔癌SCC-4細胞中ERK 1/2 MAPK蛋白之表現，實驗結果發現隨著melittin作用濃度的上升ERK 1/2 MAPK蛋白之表現量有下降的趨勢，此結果再次說明了melittin會抑制細胞生長。以上實驗結果，說明melittin會促使人類口腔癌細胞進行細胞凋亡現象，且此作用可能是經由MAPK家族調控。然而，目前melittin誘發各種癌細胞凋亡之能力仍需更進一步測試，melittin抑制癌細胞生長之能力有發展為抗癌藥物之潛力，仍需要更多詳細之研究。

(八) 參考文獻：

1. 行政院衛生署相關搜尋 http://www.doh.gov.tw/CHT2006/index_populace.aspx
2. B. Li; W. Gu; C. Zhang; X. Huang; K. Han; C. Ling. (2006) Growth Arrest and Apoptosis of the Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Bel-7402 Induced by Melittin. *Onkologie* 29:367-371
3. Seung-Jae Honga, Gyu Sung Rima, Hyung In Yangb, Chang Shik Yinc, Hyeong Gyun Kohc, Mi-Hyeon Jangd, Chang-Ju Kimd, Bong-Keun Choed, Joo-Ho Chungd. (2005) Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon* 46:39-45
4. Jang, M. H., M. C. Shin, S. Lim, S. M. Han, H. J. Park, I. Shin, J. S. Lee, K.A. Kim, E. H. Kim, and C. J. Kim. (2003) Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *J. Pharmacol. Sci.* 91: 95-104.
5. Orsolich, N., L. Sver, S. Verstovsek, S. Terzic, and I. Basic. (2003) Inhibition of

- mammary carcinoma cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* by bee venom. *Toxicol* 41: 861-870.
6. Liu, X., D. Chen, L. Xie, and R. Zhang. (2002) Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 1083-1089.
 7. Wu-Chun Tu, Chun-Chi Wu, Hui-Lien Hsieh, Chiu-Yuan Chen and Shih-Lan Hsu. (2008) Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicol* 52: 318–329.
 8. Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449.
 9. Johnson, G. L., and R. Lapadat. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
 10. Papatsoris, A. G., and A. G. Papavassiliou. (2001) Molecular ‘palpation’ of BPH: a tale of MAPK signalling? *Trends Mol. Med.* 7: 288-292
 11. Nicholson, K. M., and N. G. Anderson. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 14: 381-395.
 12. Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.
 13. Arany, I., J. K. Megyesi, H. Kaneto, P. M. Price, and R. L. Saffirstein. (2004) Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287: 543-549.