

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

CAPE 誘發腫瘤細胞分化及其作用機制之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-027-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：曾翠華

計畫參與人員：郭星君 李維駿 方俊人

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 8 月 22 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

CAPE 誘發腫瘤細胞分化及其作用機制之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94- 2320-B -040 -027-

執行期間：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：曾翠華

共同主持人：

計畫參與人員：曾翠華 郭星君 李維駿 方俊人

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

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

中 華 民 國 九 十 五 年 八 月 二 十 二 日

一、前言

惡性腫瘤（癌症）連續蟬聯國人十大死因榜首，而血癌（Leukemia）就是俗稱的「白血病」。過去佔台灣癌症的第八位，小兒血癌更為小兒癌病之第一位，發病的人數更有逐年增加之勢，國內外均是如此。白血病的死亡人數佔全部癌症死亡人數的 2.61%；死亡率的排名男性為第八位，女性為第十位。白血病的成因是多重的，包括：基因突變、放射線污染的環境（如核爆、輻射屋）、病毒感染（如日本的 HTLV-I 病毒）、化學物品的刺激，以及病人體質因素（癌基因的表現型）等。白血病又可分為急性及慢性兩種，其成因及臨床表現皆不相同。分化治療廣義而言是讓惡性癌症回復，臨床上已成功應用於急性前骨髓性白血病，急性前骨髓性白血病於九十年代之前對血液病專家及患者都是個夢魘，但九十年代初期因為 ATRA (all-trans retinoic acid) 治療的報告改變了一切，隨著其特一性的 t(15;17) 中 RAR- α 及 PML 基因之組合所產生之特異蛋白造成前骨髓性細胞成熟終止被瞭解，確認了 ATRA 是一種促分化藥劑，更開創了癌症藥物治療之另一頁。但是後來又發現 ATRA 之使用會有不明原因之抗藥性，因此如何提升 ATRA 之敏感性，是一重要課題。

Retinoic acid (RA)，是維生素 A 的衍生物。維生素在體內代謝轉變產生 all-trans-retinoic acid (ATRA)、13-cis-retinoic acid (13C-RA) 和 9cRA 等幾種異構體，他們可與細胞內核受體 (RAR) 和核受體 (RXR) 結合，這些受體被啟動後與下游基因 DNA 序列 (retinoic acid response element, RARE) 結合，DNA 序列結合區中有兩個形成指狀突起的螺旋結構，每個螺旋結構結合一個鋅離子，形成“鋅指狀結構”，這種“鋅指狀結構”和下游基因的啟動區 DNA 序列結合，以時間、劑量依賴的方式調節下游基因的表達，從而調節細胞的正常分化。RA 核受體是一個大家族，包括 RAR 和 RXR 兩種類型，均由 α 、 β 、 γ 三個亞型構成，每個亞型均有一個以上的異構體，單個的受體亞型能控制有關細胞生長和分化的不同基因表達模式。RA 核受體可調控發育過程的關鍵步驟，調控體內動態的平衡，誘導或抑制細胞增生、分化和死亡的生理現象。又報告指出 RA 核受體之表現與活化與人類白血癥細胞 HL-60 細胞之分化有密切關係。

咖啡酸苯乙酯 (Caffeic acid phenethyl ester; CAPE) 是多酚抗氧化化合物，是蜂膠主要成分之一；過去文獻指出其具有抗發炎、抗氧化、抗病毒等作用，又於皮膚癌化動物模式中具有抗癌促進活性，另外又可抑制 azoxymethane 所導致結腸癌，且對被誘發轉型之細胞有誘發凋亡之作用，但對正常細胞只會造成生長遲緩作用，因此，CAPE 被認為是一種防癌物質。先前文獻指出 CAPE 對口腔癌細胞有選擇性毒殺作用，但等劑量下對正常細胞如口腔細胞 (BF cell) 則無毒殺作用；另可誘發人類 HL-60 白血癥細胞凋亡；過去我們研究中亦發現咖啡酸苯乙酯可透過 p38 MAPK 訊息路徑誘發神經膠質瘤 C6 細胞之凋亡。然其在誘導癌細胞分化之角色上仍然未知。由於人類白血癥細胞 HL-60 在分化研究方面提供了較為完整之研究模式，HL-60 細胞之分化可分為單核球細胞與多核球細胞兩類，因此本研究以 HL-60 細胞株進行相關實驗。

二、研究目的

癌症是國人居高不下之死亡病因之一，而治療之利器不外乎手術切除或放射治療、抗癌藥物或免疫藥物等之化學療法，然而後三者往往發生嚴重副作用，近年來分化治療法備受重視是一種新興癌症治療法，某些癌細胞乃分化未完全及急速增生，如能導引其完成分化將可抑制其不正常增生。因此誘發癌細胞分化或增強分化之物質可誘發癌細胞生長週期停滯及癌細胞完成分化，恢復為正常細胞，是抑制或防癌物質開發之另一方向。然而以 ATRA 治療其他白血病仍然具有抗藥性，或因副作用而受限。而替代方法是尋求另類藥劑，或是以天然物作為複合配方，以加強治療效用。因此近年來與 ATRA 合併使用以增強其使用效率之物質之開發逐受重視。

因此接下來我們想利用 CAPE 為藥劑來探索其是否抑制血癌細胞增生？是否誘導血癌細胞分化？是那一類之分化？是透過什麼分子路徑造成 HL-60 分化的進行？是否促進 ATRA 刺激血癌細胞分化的進行？與 RA 受體的關係又如何？

三、實驗方法

細胞培養 (Cell culture)

人類血癌細胞株 HL-60，培養於 RPMI，內含有 10% heat - inactivated fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL)、1% Penicillin-Strepto-mycin (PS: Gibco)、1% glutamine 的 RPMI 1640 (RPMI: Gibco)，培養箱設定 5% CO₂，37°C 恆溫的環境，細胞密度維持在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cell/ml，每週更換培養基 2~3 次。

細胞存活率分析 (Assessment of cell growth)

利用活細胞細胞膜具有調控物質進出之功能，而得以防止染劑通透進入活細胞，進而判斷細胞的存活率。將細胞培養後，將細胞由培養皿收下，用 PBS 沖洗，加培養基將細胞濃度調整成 5×10^4 cells/ml，培養於 10 公分的培養皿中，共 10 ml。待細胞均質後，更換新的培養基，同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA，及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組)，分別培養 0、24、48、72、96 小時後，收集細胞，PBS 沖洗後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，取沈澱細胞，以 1 ml 培養基使細胞懸浮，再從中取 100 μ l 細胞液與等量的 trypan blue 混勻，在顯微鏡下觀察，以計數器計算活細胞數。

細胞週期分析 (Cell cycle distribution analysis)

實驗方法：將細胞培養後，將細胞由培養皿收下，以 300g 離心 5 分鐘，除去培養液，加培養液將細胞濃度調整成 5×10^4 cell/ml，培養於 10 公分的培養皿中，共 10 ml。待細胞均質後，更換新的培養基，同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA，及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組)，分別培養 0、24、48、72、96 小時後作用，將細胞由培養皿收下，調整細胞濃度成 2×10^6 /ml，以 300g 離心，除去上層液，加入絕對酒精 (80%) 置入 -20°C 冰箱固定細胞至少 30 分鐘以上。接著以 300 g 離心 5 分鐘，倒除上層液，PBS 沖洗後，並加 0.1% tritonX-100，RNase A (40 μ g/ml) 1.0 ml 於 37°C 水浴槽中避光反應 60 分鐘。再次離心，倒除上層液，加 1m PI solution (10 μ g/ml)，於 37°C 水浴槽中避光反應 60 分鐘，最後置於冰上，以流式細胞儀 (FACACAN 雷射流式細胞儀分析) 測定，資料之分析使用 WinMDI2.8 版軟體。

形態學變化的觀察 (Wright-Giemsa stain)

加培養液將細胞濃度調整成 5×10^4 cell/ml，培養於 10 公分的培養皿中，共 10 ml。待細胞均質後，更換新的培養基，同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA，及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組)，分別培養 96 小時後作用，藥物作用細胞，取細胞懸液 cytopsin 離心貼壁載玻片上，Wright-Giemsa stain 染色，在顯微鏡下觀察細胞形態，計數 200 個細胞，算出成熟細胞百分數；分化的現象會導致細胞形態發生改變，細胞核縮小，偏向一邊，核漿比例減少，出現腎型核或是細胞質的空泡增多，呈現單核球外觀。

細胞表面抗原分析 (*Determination of differentiation markers*)

將細胞培養後，將細胞由培養皿收下，用 PBS 沖洗，加培養基將細胞濃度調整成 5×10^4 cells/ml，培養於 10 公分的培養皿中，共 10 ml。待細胞均質後，更換新的培養基，同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA，及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組)，藥物作用 96 h 後，取細胞懸液，將帶有螢光 (FITC anti-CD11b antibody、PE anti-CD14 antibody) 標定的表面抗原抗體與作用，以流式細胞儀來分析二萬顆細胞中，血球分化的表現型與其表面抗原的表現有關 CD11b, CD14。以流式細胞儀 (FACACAN 雷射流式細胞儀分析) 測定，資料之分析使用 WinMDI2.8 版軟體。

蛋白質與核酸的結合分析 (*electrophoretic mobility shift assay*)

實驗方法：將細胞培養後，將細胞由培養皿收下，用 PBS 沖洗，加培養基將細胞濃度調整成 5×10^4 cells/ml，培養於 10 公分的培養皿中，共 10 ml。待細胞均質後，更換新的培養基，同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA，及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組)，分別培養 0、24、48、72、96 小時後，收集細胞，PBS 沖洗後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，取沈澱細胞，PBS 沖洗離心後，萃取細胞核蛋白。將標地 Biotin 的探針 (oligonucleotides)，於 37°C 培養箱中避光反應 60 分鐘，用 6% native TBE gel 跑膠，將蛋白質與核酸轉至 nylon membranes，HRP 抗體反應後再 ECL substrate 的作用之下 [light shift chemiluminescent EMSA Kit (Pierce Light Shift kit)]，底片感光顯示核蛋白與 RARE (response elements) 的鍵節情形，於 LAS-1000 plus system 影像分析並定量之。

Retinoic acid response elements (RARE) sequence— oligonucleotide :
5'-CGGGATCACGCAGAGGTCA-GCAGAC-3' (MDBio, Inc., Taipei, Taiwan)

西方墨點法 (*Preparation of total cell extracts and immunoblots analysis*)

將細胞培養後，將細胞由培養皿收下，用 PBS 沖洗，加培養基將細胞濃度調整成 5×10^4 cells/ml，培養於 10 公分的培養皿中，共 10 ml。待細胞均質後，更換新的培養基，同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA，及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組)，分別培養 0、24、48、72、96 小時後，收集細胞，PBS 沖洗後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，取沈澱細胞，PBS 沖洗離心後，倒除上層液，加入 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM Tris - base, pH=7.5)，內含 1mM sodium orthovanadate, 100 μ g/ml PMSF, 170 μ g/ml leupeptin，於冰上震盪 30 分鐘後在 4°C 下以 10000 \times g 離心 10 分鐘，即得 Total cell lysate，取上層液定量蛋白濃度。將定量後之蛋白質取 50 μ g，加入等量的 Sample Buffer

2 ml 0.5 M Tris-HCl (pH=6.8) , 1.6 ml Glycerol, 3.2 ml 10%SDS, 0.8 ml 2- β -mercaptoethanol, 0.4 ml 0.5% bromophenol blue, 以 95°C 加熱 3 分鐘, 並快速置入冰中冷卻。以小型離心機將 Sample spin down 後再 loading 至每個 well 中。上層膠以 70 伏特, 下層 130 伏特跑電泳。待電泳結束後跟著進行蛋白質的轉漬, 也就是將膠上已依分子量分層的蛋白質轉漬到 Nitrocellular paper 上。以 5% 脫脂牛奶 PBS-non-fat milk powder 於室溫下進行 blocking 1 小時, 稍稍 wash 後, 將 NC paper (Millipore) 置於 4 度冰箱中與一級抗體反應 overnight, 之後用 washing buffer PBS with 0.5% tween-20 以 5'-5'-5'-5', 150rpm 的方式清洗 NC-paper, 再以 Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse/rabbit antibody 反應 50-60 分鐘, 以相同的方式 wash NC-paper, 最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應後, 於 LAS-1000 plus system 影像分析並定量之。

硝基四唑藍 (NBT) 還原試驗(nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay)

在誘導細胞分化前, 將細胞密度維持在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cell/ml, 再細胞由培養皿收下, 用 PBS 沖洗, 加培養基將細胞濃度調整成 5×10^4 cells/ml, 培養於 10 公分的培養皿中, 共 10 ml。待細胞均質後, 更換新的培養基, 同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA, 及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組), 分別培養 0、24、48、72、96 小時後, 收集細胞, PBS 沖洗後, 以 1000 rpm 離心 5 分鐘, 取沈澱細胞, PBS 沖洗離心後, 倒除上層液, 加反應液將細胞濃度調整成 1×10^5 cells/ml, 此反應液含有 TPA 的 nitroblue tetrazolium (NBT) 工作液 (含 2 mg/ml of Nitro-BT (Sigma); 20 ng/ml TPA (Sigma) in PBS), 於 37°C 水浴槽中避光反應 60 分鐘, 加入 2M HCL 停止反應; 之後以 700g 4°C 離心 10 分鐘, 移除上層液, 加入 1ml DMSO 溶解細胞 以 590nm 測吸光值, 以分光光度計得到的數值與對照組百分比表示之, 此還原反應做為白血病細胞分化之功能指標。

免疫沉降法 (Immunoprecipitation assay)

方法: 將細胞培養後, 將細胞由培養皿收下, 用 PBS 沖洗, 加培養基將細胞濃度調整成 5×10^4 cells/ml, 培養於 10 公分的培養皿中, 共 10 ml。待細胞均質後, 更換新的培養基, 同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA, 及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組), 分別培養 0、24、48、72、96 小時後, 收集細胞, PBS 沖洗後, 以 1000 rpm 離心 5 分鐘, 取沈澱細胞, PBS 沖洗離心後, 倒除上層液, 加入 RIPA buffer 震盪即得 Total cell lysate, 定量後之蛋白質取 0.5 mg, 加入 1 μ g 一次抗體在 4°C 冰箱中反應 overnight。隔日將 sample 和 15 μ l protein A/G -agarose beads 在 4°C 繼續作用 2-6 小時。之後以 1000g 4°C 離心 5 分鐘, 移除上層液再以冰的 PBS 洗重複三次, 最後離心取沉澱物, 加 10 μ l sample buffer 使之懸浮, 95°C 加熱 5 分鐘, 跑 SDS-PAGE, 並以不同抗體作用看結果。

免疫螢光染色 (Immunofluorescent stain)

將細胞培養後, 將細胞由培養皿收下, 用 PBS 沖洗, 加培養基將細胞濃度調整成 5×10^4 cells/ml, 培養於 10 公分的培養皿中, 共 10 ml。待細胞均質後, 更換新的培養基, 同時加入 CAPE (實驗組) 1.0 nM ATRA、1.0 μ M ATRA, 及 CAPE+1.0 nM ATRA (實驗組) 0.2% DMSO (對照組), 分別培養 96 小時後, 收集細胞, PBS 沖洗後, 以 1000 rpm 離心 5 分鐘, 以 PBS 洗數次, 將細胞以 4% 甲醛 (paraformaldehyde) 室溫固定 10 分鐘後, PBS 洗三次, 以抗體 (1:300) 染色 50 分鐘, 再以 washing buffer PBS with

0.5% tween-20 以 5'-5'-5'洗三次，以抗體(Ig G-FITC, 1:300) 染色 50 分鐘再以 washing buffer PBS with 0.5% tween-20 以 5'-5'-5'洗三次，利用螢光顯微鏡 (340/380 nm excitation) 波長觀察。在顯微鏡下觀察 (200X)，以計數器計算綠色螢光細胞數定量之。

RT-PCR分析(Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis)

檢體 total cellular RNA 是以傳統在 4M guanidine thiocyanate-acid phenol metho 以 RNA 萃取套組 RNA isolation Kit (Ultraspec™)進行分離；取 8 μg mRNA 利用 1 μM oligo-d(T)15 為 primer 以 MMLV-RTase (200units)在 70 μl 反應溶液中 (RT Buffer, 1 mM deoxyguanosine triphosphate, 1 mM deoxyadenosine triphosphate, 1 mM deoxycytidine triphosphate, 1 mM deoxythymidine triphosphate, 1 U/μL RNase inhibitor, 4 U/μL RTase (MMLV)進行 cDNA 合成，利用 Applied Biosystems GeneAmp PCR system 2700 儀器 at 42 °C for 60 minutes and then at 90 °C for 5 minutes and at 4 °C for 5 minutes；取 5 μl cDNA 至 PCR 反應溶液中(1 mM deoxyguanosine triphosphate, 1 mM deoxyadenosine triphosphate, 1 mM deoxycytidine triphosphate, 1 mM deoxythymidine triphosphate, Dyna PCR Buffer II, 2 U/μL AmpliTaq DNA polymerase, 0.5 μM concentration human RARα primers, 最終為 25 μL)以下表之 primers 資料的預估溫度，利用 Taq polymerase 進行 30 cycles PCR 反應 (300 seconds at 95 °C as an initial step, followed by 30 cycles of 60 seconds each at 95 °C and 60 seconds each at 51 °C and finally 2 minutes at 72 °C)，其產物再以 1.8 % agarose gel 電泳分離，以 ethidium bromide 染色並觀察，並運用軟體 Fujifilm Image Gauge program (version 3.1; Fuji)定量之。Primer 設計如下表一：

Enzyme	Sequence 5'→3'	Size (bp)	Temp (°C)
RARα	5'- GGGACACCTACCACAGTTT -3' 5'- ACGCACTCCAGCCCTCCAT -3'	328	62°C
RXRα	5'- TCACCTATGAACCCCGTCAG -3' 5'- TCGACTCCACCTCATTCTCG -3'	442	62°C
GADPH	5'- AGGGGTCTACATGGCAACTG -3' 5'- GTCAGTGGTGGACCTGACCT -3'	375	65°C

分析統計 (Statistical analysis)

試驗過程每組皆重複三次以上，mean ± standard deviation，所有數據將以電腦統計軟體 Sigmaplot (Jandel Scientific Software, USA)，採用 one-way analysis of variance(one-way ANOVA) 統計分析，凡* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，表示為有顯著的差異。

四、結果與討論

CAPE 與低劑量 ATRA 或作為複合配方處理對 HL-60 與 U-937 細胞在體外實驗中所引起的生長抑制之作用 生長抑制能力。所用的未成熟、低度分化白血病細胞 (HL-60)，由本實驗室繼代培養，HL-60 是一株急性前骨髓血癌細胞 (acute promyelocyte)，試驗設空白對照組 (0.2% DMSO)，天然物藥劑 (CAPE, 0.25~1.00 μM) 為用藥組。取對數生長的細胞，計數，用 RPMI-1640 培養液配制細胞懸液，細胞數為 $4.0 \times 10^5/\text{ml}$ ，細胞液加入 10 cm dish，置於 37°C 、 CO_2 培養箱，藥物作用 1~4 天，加 trypan blue 計數活細胞數，計算藥物對腫瘤細胞生長的抑制率。對細胞生長曲線抑制作用的動態觀察，每日計數細胞數，可知用藥組細胞生長受抑制。由 (圖 1A) 可知，CAPE 三種劑量 0.25, 0.5, 1.0 μM ，四個時間點 1~4 天所繪 2D 曲線圖，處理 HL-60 血癌細胞，發現 CAPE 具抑制生長效果，且在第四天的 IC₅₀ 劑量為 1.0 μM ，由 (圖 1B) 可知，1.0 μM CAPE 與低劑量 ATRA 0.001 μM 作為複合配方處理，更會加強抑制血癌細胞的增生，抑制生長效果與對照組相比達到 72%，可讓 ATRA 使用劑量大幅降低。

CAPE 與低劑量 ATRA 作為複合配方處理，促進誘導分化的現象 CAPE 與低劑量 ATRA 0.001 μM 處理，的確會加強抑制血癌細胞的增生；因此，想進一步了解是否有效誘導分化的現象。對照組 (0.2% DMSO) HL-60，型態為典型 myeloblast，大型橢圓細胞核和較小的細胞質外觀，而分化的現象會導致細胞型態發生改變，細胞核縮小，偏向一邊，核漿比例減少，出現腎型核；或是細胞質的空泡增多，呈現單核球外觀 (黑箭頭) 如圖 Vit D₃ 0.5 μM ；出現多核則為多形核白血球 (紅箭頭)，如圖 ATRA 1.0 μM 。1.0 μM CAPE 單獨處理，在型態上，有疑似多型核球與單核球，但與低劑量 ATRA 0.001 μM 合併處理，明顯看出多型核球增加，顯示細胞由不成熟往良性方向分化 (圖 2)。另外，利用 NBT 還原反應做為白血病細胞分化之功能指標，由 (圖 3) 得知：CAPE 能促進誘導低劑量 ATRA 分化的能力，NBT 還原反應與對照組相比達到 1.8 倍之多，還原效率高於處理劑量 ATRA 0.001 μM (1.2 倍)， $P < 0.01$ 。除此，血球分化的表現型與其表面抗原的表現有關 CD11b 與 CD14 藥物作用細胞幾天後，以流式細胞儀來分析二萬顆細胞中。由 (圖 4) 可知：不僅 CAPE 可誘導 CD 11b (62%) 及 CD 14 (23%) 的表達，而且更能加強低劑量 0.001 μM ATRA 的分化效果，CD 11b (89%) 和 CD 14 (28%) 的表達；CAPE 促進分化的能力與高劑量 1.0 μM 的 ATRA 相較之下 CD 11b (91%) 和 CD 14 (22%)，似乎呈現等量的結果。而圖 5 定量結果顯示，CAPE 1.0 μM 與低劑量 ATRA 0.001 μM 處理，加強血癌細胞分化其 CD 11b 表現程度高於 CD 14，因此，血癌細胞分化階段，將是朝向多形核白血球發展。

探討 CAPE 與 ATRA 作為複合配方處理所引起血癌細胞分化過程，細胞生長與細胞週期的關係 過去研究指出，HL-60 細胞分化過程裡，細胞週期的停滯 G1 期及分裂期 S 的降低扮演著決定角色；為此，CAPE 與低劑量 ATRA 0.001 μM 作為複合配方處理，進一步利用流式細胞儀分析其細胞週期 G1、S、G2/M 的分佈；由結果得知 (圖 5)，對照組 (0.2% DMSO) 其細胞週期 G1 為 465%，S 期為 40% 及 G2/M 為 14%；單獨 1.0 μM CAPE 處理，其細胞週期 G1 升高為 55%，S 期降為 30% 及 G2/M 為 15%，當 CAPE 與低劑量 ATRA 0.001 μM 作為複合配方處理，可看出其細胞週期 G1 升高為 67%，S 期降為 10% 及 G2/M 為 23%；CAPE 促進分化的能力與高劑量 1.0 μM 的 ATRA 相較之下其細胞週期 G1 為 70%，S 期為 5% 及 G2/M 為 25%，似乎呈現等量的結果，CAPE 加強抑制血癌細胞的增生，將造成細胞週期 G1 期停滯現象。除此之外，所引起的細胞週期 G1

期停滯現象，已被認為會影響 CDK2/cyclinE complex的交互作用，藉此相同方式的處理，進一步利用免疫沉降法測試 CDK2/cyclinE complex的相關性，由結果得知(圖6)，CAPE與低劑量 ATRA 0.001 μ M合併處理，CDK2的活性作用與對照組相比減少至 0.1倍，而與高劑量 1.0 μ M的 ATRA相較之下其CDK2/cyclinE complex 的交互作用，也呈現相同的抑制作用。CAPE與低劑量 ATRA處理的確抑制 CDK2/cyclinE的結合，證實分化的進行過程與細胞週期的相關性(圖3-6)。

探討 CAPE與低劑量 ATRA作為複合配方處理，血癌細胞分化過程，細胞核蛋白雙受體訊息路徑 而是否 CAPE與低劑量 ATRA處理，所引起血癌細胞分化過程，細胞核蛋白受體能誘發在細胞核內訊息路徑，鍵結下游基因promoters (RARE DR5)上，而啟動基因的轉錄過程，仍待進一步的分析與探討。利用 Electrophoresis Mobility Shift Analysis (EMSA)來偵測 CAPE誘導下，RAR/RXR雙或單受體與 RARE (retinoid acid response element) 鍵結的能力；由圖7顯示，單獨 1.0 μ M CAPE及 ATRA 0.001 μ M處理，皆會活化 RAR核蛋白的活性；然 CAPE (0.25~1.00 μ M)可促進 ATRA誘導 RAR核蛋白的活性。另外，當我們添加 RAR α 與 RAR β 特異性抗體後，由圖7之標號8及9可知，RAR α 呈現特異性的 supershift band，因此可推測，CAPE可促進 ATRA誘導 RAR α 核蛋白的活性(圖7)，而 CAPE加強 ATRA分化的能力，原來是透過細胞核蛋白受體，而促進其相關訊息路徑。

探討CAPE處理下所引起血癌細胞分化過程，促進其 ATRA下游基因的表達之影響

ATRA 誘導血癌細胞分化的能力，即是透過細胞核蛋白受體，而促進其相關基因的表達，造成細胞生長抑制有關的是 p21；朝向多形核白血球發展 調控專一性基因的表達是 C/EBP ϵ 。藉此，利用西方點墨法測試核蛋白 RAR α 、RXR α ，和半定量 RT-PCR 來測試 RAR α 、RXR α mRNA 的表達情形，單獨處理 CAPE 或與低劑量 ATRA 與作為複合配方處理，探討血癌細胞分化過程，細胞核蛋白雙受體訊息路徑 (RXR- α 、RAR- α)。由圖 8 得知：單獨處理 1.0 μ M CAPE 96 小時後，會隨劑量的增加而誘導 RAR- α 的表達，也會誘導其下游基因 C/EBP ϵ 與 p21 的表現；當與低劑量 ATRA 作為複合配方處理下，更專一增加誘導 RAR- α 、C/EBP ϵ 、和 p21 蛋白的表現，很有趣的是並不促進核蛋白 RXR- α 的表達。CAPE 加強 ATRA 分化的能力，原來是透過細胞核蛋白受體，而促進相關基因的表達。

CAPE 或與 ATRA 作為複合配方處理，探討血癌細胞分化過程，細胞核蛋白雙受體 RAR α 表達之影響 單獨處理 1.0 μ M CAPE 與 1.0 μ M ATRA 或作為複合配方處理，連續處理 HL-60 細胞 24-72 小時，利用西方點墨法測試細胞核受體 RAR α ，和半定量 RT-PCR 來測試 RAR α mRNA 的表達情形。由圖 9 得知：ATRA 連續處理 24-72 小時，RAR α mRNA 的表達情形是增加的，但細胞核受體 RAR α 隨著時間似乎逐漸降解；相反的，CAPE 與 ATRA 作為合併處理裡，隨著時間 24-72 小時，細胞核受體 RAR α 穩定表達增加。

由本研究我們發現 CAPE 是一 minor 之 differentiation inducer，其本身作用並不強，但其可增強 ATRA 之敏感性，使其於非常低之劑量即有作用，且由以上機制之研究推測其可能透過活化 cofactor 而有助於 RAR/RXR 之活化，進而促進血癌細胞之分化。又 CAPE 對其它癌細胞之分化影響，是將來有興趣之課題。

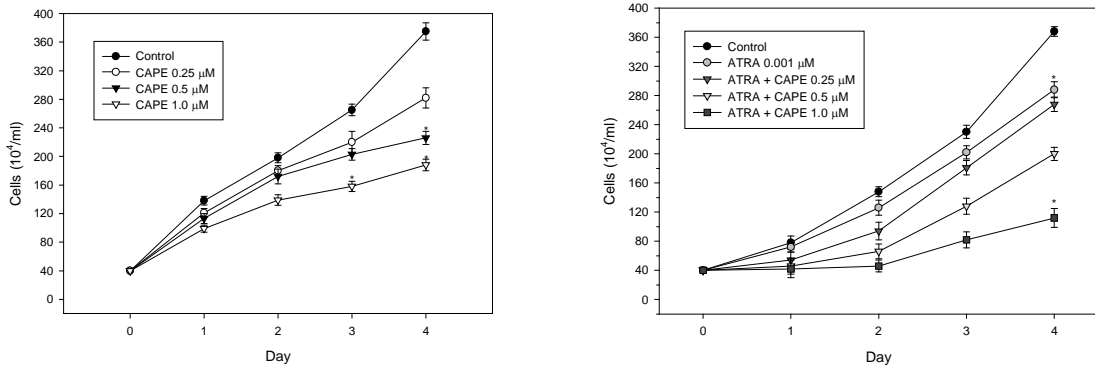


Figure 1: 觀察 CAPE與低劑量 ATRA或作為複合配方處理對 HL-60細胞在體外實驗中所引起的生長抑制之作用。Cell growth assay in HL-60 or U937 cells treated with CAPE and ATRA with or without CAPE. (A) Cells were incubated with indicated concentrations of CAPE for 1–4 days and then counted with a Coulter counter. Control cells were treated with vehicle (0.05% dimethyl sulfoxide DMSO). Cell number (40×10^4) was obtained before initiation of treatment (0 day). (B) HL-60 cells were treated with combinations of differentiation agent or DMSO (control) and then counted with a Coulter counter. Where indicated, 0.25, 0.5, 1.0 μM CAPE + 0.001 μM ATRA was used individually. The values are the averages \pm S.D. of three determinations. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with control.

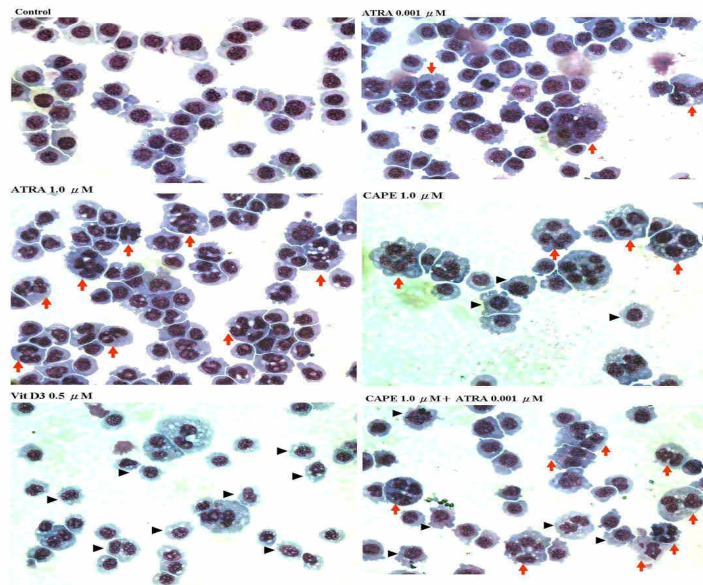


Figure 2 Effect of CAPE on morphological change induced by ATRA in HL-60 cells. (A) HL-60 cells were treated with CAPE, ATRA, 1,25D₃ and co-administration of CAPE and ATRA for 96 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO. Cells were collected by cyospin centrifugation and stained with Wright-Giemsa stain and observed by microscopy ($\times 400$). ATRA elicits a granulocytic lineage of differentiation (**arrow**) and 1,25D₃ causes macrophage-like cells (**arrow head**).

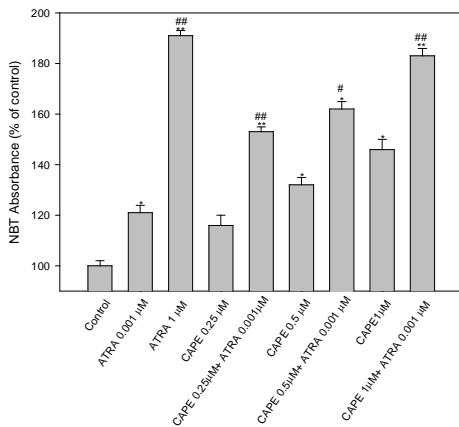


Figure 3: Effect of CAPE on NBT reduction induced by ATRA in HL-60 cells. HL-60 cells were cultured in the absence or presence of CAPE, ATRA or both for 96 hours. Differentiation of HL-60 cells was determined by the increase in NBT absorbance at 590 nm/10⁶ cells. The values are the means ±S.D. of three determinations. **P*<0.05 and ***P*<0.01, compared with control. #*P*<0.05 and ##*P*<0.01, compared with ATRA (0.001 μM).

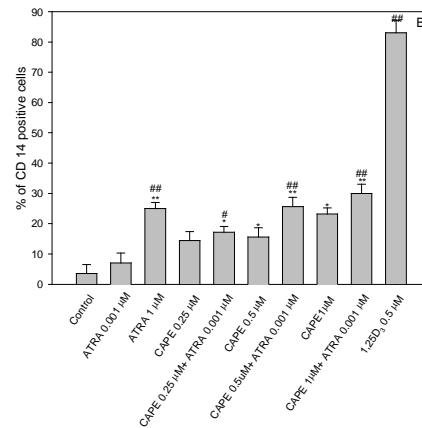
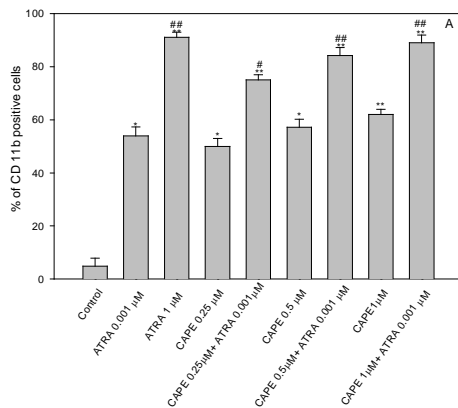


Figure 4: CAPE與低劑量 ATRA對表面蛋白 CD11b/CD14表達之定量。 Proportion of cells for (A) CD11b and (B) CD14 were quantified. Results are means ± S.D. of three independent determinations. **P*<0.05 and ***P*<0.01, compared with control. #*P*<0.05 and ##*P*<0.01, compared with ATRA treatment alone (0.001 μM).

Cell Cycle phase			
Conditions	G1	S	G2/M
Control	46±3	40±5	14±3
CAPE (1.0 μM)	55 ±3	30±2	15±2
ATRA (0.001μM)	52±3	32±2	16±2
CAPE + ATRA	67±2	10±2	23±2

ATRA (1.0 μ M)	70 \pm 2	5 \pm 1	25 \pm 3
1, 25D ₃ (0.5 μ M)	79 \pm 4	1 \pm 1	20 \pm 2

Figure 5: Effect of CAPE on ATRA-induced cell cycle arrest. (A) Cells were cultured in the presence of 1.0 μ M of CAPE, 0.001 μ M of ATRA, 1.0 μ M of ATRA, 0.5 μ M of 1,25D₃ alone and co-administration of 1.0 μ M of CAPE and 0.001 μ M of ATRA for 96 h. The cells were fixed and stained with propidium iodide, and the DNA content was analyzed by flow cytometry (FACS). The percentage of cells at different phases of the cell cycle were determined as G1, S, and G2/M.

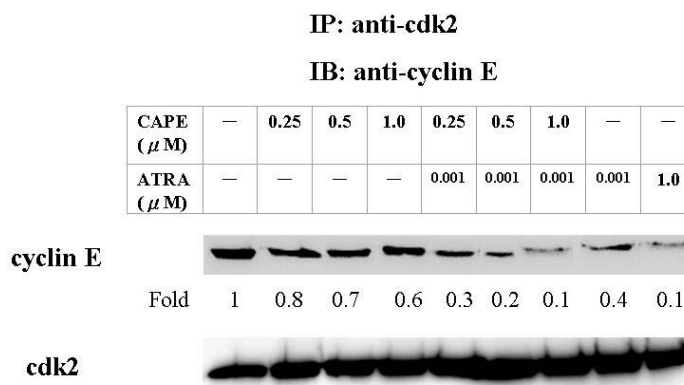


Figure 6: Effect of CAPE on CDK2/cyclin E complexes by ATRA. Cells were cultured in the presence of 1.0 μ M of CAPE, 0.001 μ M of ATRA, 1.0 μ M of ATRA, 0.5 μ M of 1,25D₃ alone and co-administration of 1.0 μ M of CAPE and 0.001 μ M of ATRA for 96 h. Whole cell extracts (0.5 mg protein) were immunoprecipitated with monoclonal anti-CDK2. The cell eluates were analyzed by immunoblotting using specific antibodies against cyclin E and CDK2.

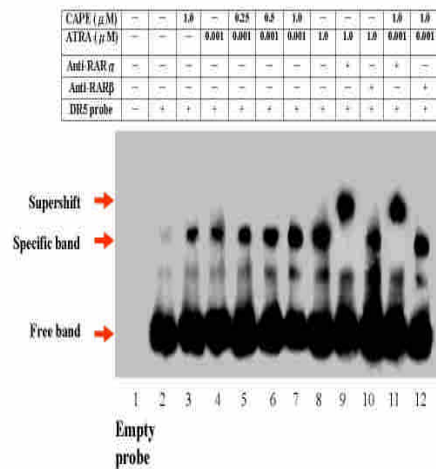


Figure 7: Effects of CAPE on ATRA-mediated nuclear transcription factors binding to DNA response elements. HL-60 cells were incubated with indicated agents at 96 h. The nuclear extracts was incubated with biotin labeled double-stranded DR5 RARE oligonucleotide and analyzed by electrophoretic mobility shift assays. Empty probe #1 was used to indicate the specific control in this assay.

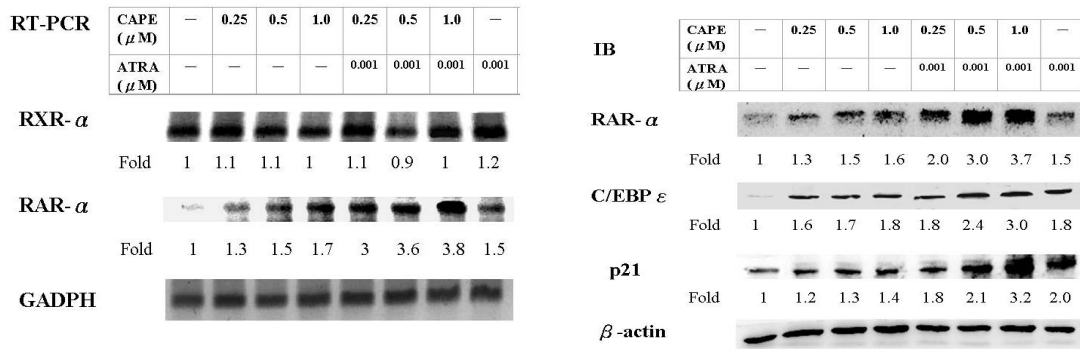


Figure 8: Effect of CAPE on ATRA-mediated expression of differentiation target genes. (A) HL-60 cells were exposed to indicate agents for 96 h and reverse transcription–polymerase chain reaction was performed as described in the “Materials and Methods” section. The levels of GADPH transcripts were determined in the sample as internal controls. (B) The cell eluates were analyzed by immunoblotting using specific antibodies against RAR α , C/EBP ϵ , and p21. The β -actin protein level is displayed to demonstrate similar loading and transfer of proteins to the membrane.

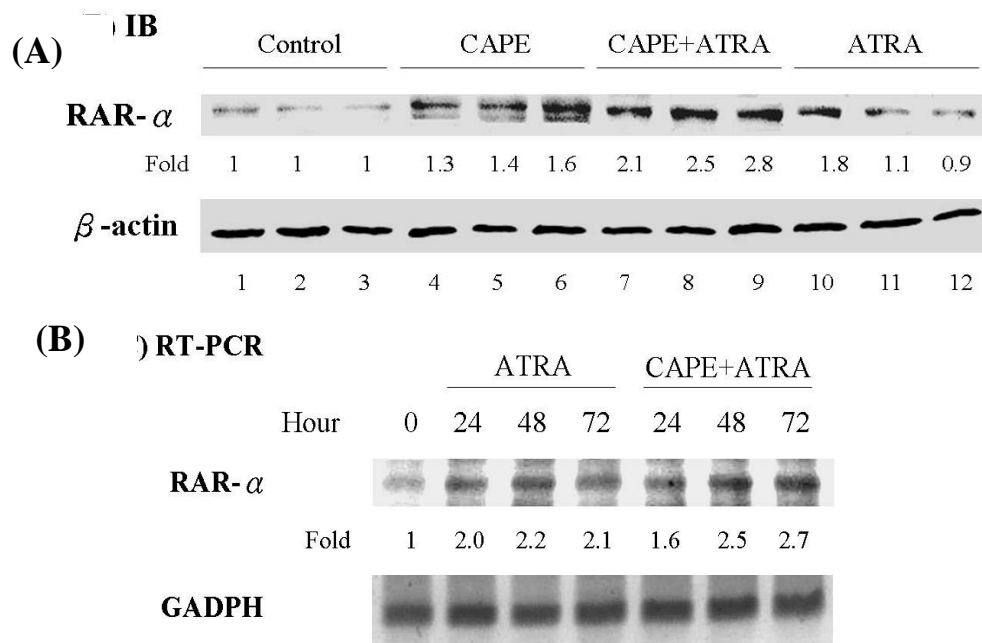


Figure 9: Effect of CAPE augments differentiation on level of nuclear receptor (RAR α) by ATRA. (A) Immunoblot analysis showed the effects of differentiating agents on HL-60 cells in the absence or presence of CAPE, or with the indicated agent combinations, CAPE (0.25, 0.50, 1.00 μM) and 1.0 μM ATRA for 24–72 h. β -actin protein level is displayed to demonstrate similar loading and transfer of proteins to the membrane. (B) HL-60 cells were exposed for indicated time to CAPE, 1.0 μM ATRA or differentiating agents combinations and reverse transcription–polymerase chain reaction was performed as described in the “Materials and Methods” section. The levels of GADPH transcripts were determined in the sample as internal controls.