

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用藥物誘發口腔癌細胞凋亡並探討其熱休克蛋白的生物 調控機制

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2314-B-040-022-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

計畫主持人：蔡蕙芳

共同主持人：張育超

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 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

利用藥物誘發口腔癌細胞凋亡並探討其熱休克蛋白的生物調控機制

**Drug-induced apoptosis in oral cancer cell line is associated with
heat shock protein**

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2314-B-040-022

執行期間：94年8月1日至95年7月31日

計畫主持人：蔡蕙芳

共同主持人：張育超

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

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

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：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

中華民國 95 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

利用藥物誘發口腔癌細胞凋亡並探討其熱休克蛋白的生物調控機制

**Drug-induced apoptosis in oral cancer cell line is associated with
heat shock protein**

計劃編號：NSC 94-2314-B-040-022

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：蔡蕙芳 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

共同主持人：張育超 中山醫學大學牙醫學系

一、中文摘要

口腔癌是一種高致死率的疾病，在全世界中也是一種十分普遍的癌症。目前最常被提出和癌症研究有相關的是細胞凋亡，它是一種漸進式的細胞死亡，為細胞正常的生理功能反應。最近有報告指出引導細胞凋亡可以有效的將癌細胞除去，所以可以利用促使細胞凋亡的藥物來治療癌症。本計劃的研究目的主要利用 Staurosporine (STS) 是一種 Protein Kinase C 抑制劑它可以促使細胞凋亡，作用於 OC2 口腔鱗狀癌細胞，在 Time-course 和 Dose-depend 的實驗分析中，發現口腔癌細胞株(OC2)於 $1 \mu\text{M}$ Staurosporine 濃度，作用 12 小時，OC2 細胞數目變少並且細胞型態明顯改變，在細胞核中觀察到核濃縮或形成核分裂的現象。所以我們又探討這些在參與調控粒線體細胞凋亡路徑中 Bcl-2 family members 蛋白表現量為何？結果在 $1 \mu\text{M}$ staurosporines 濃度作用 12 小時的 OC2 口腔癌細胞，其 Bcl-2(抗細胞凋亡蛋白)的蛋白表達量下降，而 Bad 和 Bax (促細胞凋亡蛋白) 蛋白表達量增加，並且發現熱休克蛋白 27 和熱休克蛋白 70 蛋白質表達量下降，其中又以熱休克蛋白 27 下降量

最顯著。熱休克蛋白 27 它也扮演著抗細胞凋亡 (anti-apoptosis) 的功能，於細胞凋亡訊息傳遞路徑中 (apoptotic signaling pathways)，調節許多步驟，包括細胞粒線體所造成的細胞凋亡路徑 (mitochondrial cell death pathways)。此結果更證明 staurosporines 會促使口腔癌細胞凋亡。

關鍵詞：細胞凋亡、口腔鱗狀癌細胞、熱休克蛋白

Abstract

Oral cancer is one of the ten most common cancers worldwide with a high morbidity and mortality. It is currently considered that dysregulated cell proliferation and apoptosis leads to the development of cancer. The aim of this study was to investigate the biological role of heat shock protein 27 (Hsp27) in oral tumorigenesis. An oral cancer cell line, OC2, was treated with staurosporine (STS) for 12h and then subjected to Hotech33258 staining, DNA fragmentation assay, RT-PCR and Western blot analysis for apoptosis. Results showed that OC2 cells exhibited

apoptotic features and fragmentation of DNA after being treated with STS for 12 h. Furthermore, such STS induced apoptosis was through an increased expression of proapoptotic protein Bad and Bax together with a decreased expression of antiapoptotic protein Bcl-2. In addition, STS reduced the heat shock response, leading to decreased levels of Hsp27 and Hsp70. Our data suggested that STS specifically suppresses Hsp27 expression in oral OC2 cells and blocks the inhibitory effects of this molecular chaperone on apoptotic cell death. It is suggested that Hsp27 may participate in the STS -induced sensitization of oral OC2 cells to anticancer drugs, which warrants further studies.

二、緣由與目的

口腔癌是一種高致死率的疾病，台灣地區口腔癌近年來也已進入國人十大癌症死亡原因之一。在許多的文獻研究報告中指出有些癌症(乳癌、子宮頸癌、肺癌、卵巢癌、肝癌、血癌、口腔癌)其熱休克蛋白有大量表達的情形(Ramirez et al., 2001; Kaur et al., 1998)，這些熱休克蛋白或許和癌細胞的存活具有相關性(Creagh et al., 2000; Jolly et al., 2000)。熱休克蛋白(heat shock proteins; Hsp)，於細胞中扮演著蛋白質的防護者 (protein chaperones)。這些熱休克蛋白或壓力蛋白參與蛋白質的合成、摺疊、運輸及細胞轉位 (translocalization) 過程。文獻指出熱休克蛋白，例如熱休克蛋白 27和熱休克蛋白 70，它們會和其它蛋

白參與調控，進而抑制細胞凋亡 (Creagh et al., 2000; Xanthoudakis and Nicholson, 2000)。熱休克蛋白 27 (Hsp27)，一種小分子熱休克蛋白 (small Hsps)，是一個ATP非依賴性的白防護者 (ATP-independent chaperone)，可有效抑制胞內聚集現象及促進受損蛋白重新摺疊 (Ganea, 2001)。它也扮演著抗細胞凋亡 (anti-apoptosis) 的功能，於細胞凋亡訊息傳遞路徑中 (apoptotic signaling pathways)，調節許多步驟 (Parcellier et al., 2003)。

最近有報告指出引導細胞凋亡可以有效的將癌細胞除去，尤其對於攻擊口腔鱗狀癌細胞是一種有效的策略，所以可以利用促使細胞凋亡的藥物來治療癌症。Staurosporine (STS) 是一種Protein Kinase C抑制劑它可以促使細胞凋亡，前人文獻中指出利用STS可以使口腔癌細胞 (tongue squamous cell carcinoma; TSCC) 凋亡，並且活化細胞內的caspase 3 (Zhang et al., 2005) 但是並未深入的探討其機制。所以本年度計畫則是以OC2口腔鱗狀癌細胞為模式，探討在STS藥物作用下對於OC2之促使細胞凋亡的影響性及熱休克蛋白表現量。

三、結果與討論

1. STS對OC2口腔鱗狀癌細胞存活的影响

首先探討STS對於OC2口腔鱗狀癌細胞是否會影響細胞的存活，利用MTS assay，分析Time-course 和Dose-depend的實驗，結果發現口腔癌細胞株(OC2)於 $1 \mu M$ Staurosporine濃度，作用12小時，OC2細胞數目變少並

且細胞型態明顯改變，在細胞核中觀察到核濃縮或形成核分裂的現象。此細胞型態的變化為證明細胞凋亡的主要證據。

2. STS對抗細胞凋亡蛋白Bcl2表達量下降，對於促細胞凋亡蛋白Bax表達量增加

根據上述實驗，證明STS會影響OC2口腔鱗狀癌細胞的存活，因此接著希望了解STS藥物促使細胞凋亡的機制。結果發現口腔癌細胞株(OC2)於1 μ M Staurosporine濃度，作用12小時，其Bcl-2(抗細胞凋亡蛋白)的蛋白表達量下降，而Bad和Bax(促細胞凋亡蛋白)蛋白表達量增加。這是細胞凋亡的一個重要指標，在此證明STS可以促使口腔癌細胞凋亡。

3. STS作用於OC2細胞對於熱休克蛋白的蛋白表達量的影響性

熱休克蛋白它也扮演著抗細胞凋亡(anti-apoptosis)的功能，於細胞凋亡訊息傳遞路徑中，調節許多步驟。為了解熱休克蛋白是否也在STS藥物作用下影響其抗細胞凋亡的功能，根據上述條件作用口腔癌細胞株(OC2)於1 μ M Staurosporine濃度，作用12小時，結果發現熱休克蛋白27和熱休克蛋白70蛋白表現量皆有下降的趨勢；尤其熱休克蛋白27有明顯下降約60%的趨勢，而熱休克蛋白60的蛋白表現量並未受到影響。

4. STS作用於OC2細胞對於熱休克蛋白27和70其mRNA表現量的影響性

再此為了解STS藥物主要是影響在熱休克蛋白蛋白質表達或基因的表

現量，所以根據上述條件作用口腔癌細胞株(OC2)於1 μ M Staurosporine濃度，作用12小時，抽取細胞的RNA並做RT-PCR的實驗，結果發現熱休克蛋白27和熱休克蛋白70的mRNA表現量皆有下降的趨勢；尤其熱休克蛋白27的mRNA表現量明顯下降，比照Western blot的結果是具有一致性。此結果表示STS藥物會影響到熱休克蛋白基因的表達及調控，這也是未來我們想要研究的另一個計劃。

四、計劃成果自評

總而言之，目前研究進度符合計劃中所規劃的研究目的，證實STS會促使口腔鱗狀癌細胞凋亡，並且使得抗細胞凋亡蛋白Bcl2, Hsp27的蛋白表達量降低。主持人認為研究成果內容已達成相當的預期目標並可作為後續研究之用。藥物處理這一部分的研究結果若可經口腔鱗狀癌細胞系統實驗的證實。此研究成果將具相當學術價值適合在學術期刊發表。目前實驗及論文正積極進行中。

五、參考文獻

1. Ramirez J.R., Ortiz S., Valenzuela M. et al. *Rev. Esp. Pathol* 2001; **34**:9-17.
2. Kaur J., Das S.N., Srivastava A. et al. *Oral Oncol.* 1998; **34**:93-98.
3. Creagh E. M., Sheehan D and Cotter T. *G. Leukemia* 2000; **14**: 1161-1173.
4. Jolly C. and Morimoto R. I. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; **92**:1564-1572.
5. Xanthoudakis S. and Nicholson D. W. *Nat. Cell Biol.* 2000; **2**: E163-E165.

6. Ganea, E. *Curr Protein Pept Sci.*, 2001; **2**, 205-25.
7. Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., et al. *Mol Cell Biol.*, 2003; **23**, 5790-802.
8. Zhang YX, Yu SB, Ou-Yang JP, Xia D, Wang M, Li JR. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; **26**, 1365-72.