

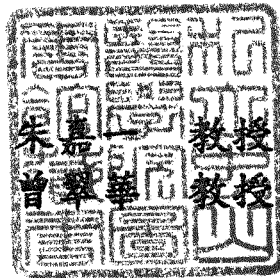
R
008.8
0032

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

原兒茶酸(*Protocatechuic acid*)誘發人類白血癌
細胞(HL-60)凋謝死亡之機制探討

Induction of Apoptosis by *Protocatechuic acid* in
Human Leukemia cells

指導教授:



(Chia-Yih Chu)

(Tsui-Hwa Tseng)

研究生 : 高達偉 (Ta-Wei Kao)

中華民國八十六年六月

中山醫學院圖書館



C046158

目錄

授權書	1~2
口試委員簽名單	3
指導教授同意書	4
誌謝	5
中文摘要	6
英文摘要	7
原兒茶酸結構式	8
緒論	9~13
材料與方法	14~20
結果	21~25
討論	26~29
圖表	30~48
參考資料	49~53

~W2Z2;授權書~W1Z1;
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
_____ 組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 原兒茶酸誘發人類白血癌細胞凋謝死亡之機制探討

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要, 授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心, 得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路, 並與台灣學術網路及科技網路連線, 得不限地域時間與次數, 以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料, 授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心, 得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行, 並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請, 請將本論文全文延後至民國 88 年 6 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料, 授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館, 為學術研究之目的以各種方法重製, 或為上述目的再授權他人以各種方法重製, 不限時間與地域, 惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 曾翠華

研究生簽名: 高遠偉 學號: R84208

(親筆正楷)

日期: 民國 86 年 6 月 13 日

備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選, 本人同意視同授權。

2. 授權第二項者, 請再交論文一本予承辦人員。

3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

~W2Z2;簽署人須知~W1Z1;

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。

2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。

3. 授權人的權利與義務:

在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10%的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。

義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。

4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益:

在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成

裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞

地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 高連偉 聯絡電話: (07) 3345779

地址: 高市民權一路 26 巷 29 號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員：

臺灣大學醫學院
生物化學研究所教授

林仁混

臺灣大學醫學院
毒理學研究所副教授

郭明良

中山醫學院
生物化學研究所教授兼所長

王朝錫

中山醫學院
生物化學研究所教授
(本論文指導教授)

朱嘉一

中山醫學院
生物化學研究所教授
(本論文指導教授)

曾翠華

中華民國八十六年六月

學生高達偉，論文題目為原兒茶酸誘發人類白血癌細胞凋謝死亡之機制探討，其論文已經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：

朱嘉一 教授

簽名：

朱嘉一

曾翠華 教授

簽名：

曾翠華

中華民國八十六年六月

誌謝

兩年的研究生生活即將結束，一直很慶幸能有機會參與癌生化的研究工作，讓我對癌症發生與預防能有所認識，也對研究工作更感興趣，期待今日於生化所所紮下的基礎，將會是明日的起點。

畢業之際，由衷感謝我的指導教授曾翠華、朱嘉一及王朝鐘教授，不論在學業或精神上都給予極大勉勵，同時感謝生化所周芬碧老師、林玉玲老師、李妙真老師、黃俊明學長、黃惠珮學姐、周秀琴小姐於實驗技術的指導與器材上的協助。另外對於胡超群老師、羅銘香學姐、王建德同學、林華彬同學、陳怡君同學、張明誠同學、黃祈舜學弟、蔡育英學妹、黃朝祿學弟、林吳宣煒學弟、邱思綺學妹於實驗過程的協助，致與無比的謝意。此外，感謝附設醫院小兒免疫室曾碧緣小姐，於細胞週期測定上的協助，及病理科林偉隆醫師與檢驗科林惠生先生於細胞型態的幫忙，同時也感謝台大毒理所郭明良博士提供細胞來源。

本論文承蒙台大生化所林仁混博士，與台大毒理所郭明良博士，於百忙之中撥冗審查，並提供諸多寶貴意見，使我獲益良多。另一方面，對於高雄扶輪社與中華扶輪教育基金會的支持，在此一併感謝。

特別感謝怡莉對我的支持與關懷，讓我如願完成學業。此外，感謝建慶、孟訓、容奇、志達、玉澤、及富妙於生活上的許多幫忙。

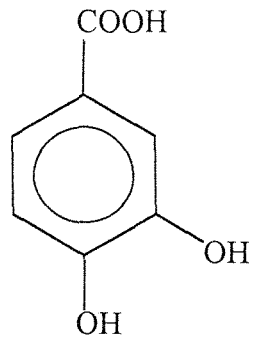
最後，謹將此論文獻給辛苦培育我的父母，及我最愛的家人。

摘要

原兒茶酸 (*Protocatechuic acid*, PCA) 為一多酚化合物，廣布於蔬菜、水果、花、核桃中，過去報告指出其具抗氧化活性，及對化學致癌物誘導之消化臟器癌化具有保護作用，本研究發現其對人類白血癌細胞 (human leukemia cells, HL-60) 的生長有抑制的作用，當細胞以 PCA (> 0.75 mM) 處理時，細胞形態會改變，其細胞會萎縮、細胞膜有泡狀突出 (blebbing)、細胞核濃染，再由 DNA 電泳觀察發現有片斷 DNA 的形成，因此判斷其發生了凋謝死亡。處理過 PCA (2 mM) 的 HL-60 細胞以 flow cytometry 偵測發現其周期被阻擋在 G1 phase，且 apoptotic peak 於 6 小時後明顯增加。除此之外 PCA 能降低細胞內 GSH 含量與膜電位，另外也降低了 BCL-2 蛋白質的表現與不正常的 RB protein 去磷酸化。因此綜合以上結果推測 PCA 所誘導的 HL-60 凋謝死亡經由破壞粒線體完整之功能、抑制 BCL-2 protein 的表現，與改變 RB protein 的磷酸化程度。

Abstract

Protocatechuic acid (PCA), a phenolic compound, exhibited antioxidant, antimutagenic activity and anticarcinogenic effect previously. In the present study, it showed significantly inhibitory effect on the proliferation of human leukemia cells (HL-60) at the concentration above 0.75 mM. Treatment with PCA resulted in morphology changes, including reduction of cell volume, condensation of nuclear chromatin, loss of membrane integrity, generation of apoptotic bodies as well as formation internucleosomal DNA fragmentation. In addition, the hypodiploid DNA peaks of propidium iodide-stained nuclei was revealed, and cell cycle was arrest at G₁ phase. To explore possible mechanisms of PCA-induced apoptosis, we investigated the RB protein, BCL-2 protein, GSH and membrane potential. We proposed that PCA induced apoptosis by inhibition of BCL-2 protein expression and destruction of mitochondria. In addition, unusual phosphorylation and dephosphorylation of RB protein might play another role in induction of apoptosis.



Protocatechuic acid structure

緒論

由於科技進步，工業過度發展的結果，使得人類生活環境日益惡化，不當曝露於化學物質或紫外線之下、過度食用加工食品，以及嚴重的空氣污染，都是導致癌症的誘因，而對於癌症的預防與治療，除了正常的飲食與藥物的控制之外，近年來科學家更是著重於天然抗癌物的發展，希望人們能藉由食物的攝取，來達到防癌或抗癌作用。目前臨床所用之抗癌藥物或選擇性不佳、或毒性及副作用太大，使用上須嚴格限制，因此開發新的理想抗癌藥物仍是醫界努力的目標。近年來在癌症用藥的篩選方面，有越來越多的趨勢，走向於選擇具引發癌細胞行凋謝死亡 (apoptosis) 能力的天然物。

本篇論文主要簡述原兒茶酸 (*Protocatechuic acid, PCA*) 誘導癌細胞進行凋謝死亡之現象，及其可能的作用機轉，進而了解其在抗癌、防癌上之潛力。

一. 原兒茶酸簡介

PCA 為一結構簡單的 phenolic compound，廣布於蔬菜、水果及花中，本研究室過去在洛神花成份及活性分析中亦發現之，並証實其具抗氧化活性(1)，近年來對於其在癌症的預防效果，漸漸受到重視，更有多位學者指出，其在動物實驗上確實有抗癌的能力，例如，PCA 具有 antimutagenicity 的功能(2)，也對由 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 所引起的 buccal pouch carcinogenesis (3)、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 所誘發的 bladder carcinogenesis (4)、4-nitroquinoline 1-oxide 引發的 oral carcinogenesis、N-methyl-N-nitrosourea 誘導的 glandular stomach carcinogenesis、azoxymethane 導致的 colon aberrant crypt foci 及 diethylnitrosamine 引起的 hepato-carcinogenesis (5) 具有抑制作用，而其主要預防機制仍不甚清楚，可能為抑制癌症發展階段中的 initiation 與

postinitiation 步驟，並且可能與抗氧化及抑制細胞的生長有關。

由於 PCA 在癌症預防的研究上，已初步證明有其應用的價值，因此本實驗利用一癌細胞株(Human Leukemia cell, HL-60)為研究對象，朝細胞毒殺與癌症治療的方向，進一步探討其抑癌的效果與機制。

二. 人類白血癌細胞 (HL-60)

HL-60 細胞株(人類白血癌細胞)由 Collins 等人於 1977 年首先建立，此細胞株是從 acute promyelocytic leukaemia patient 身上的週邊白血球所獲得，形態上、組織化學上與成熟的 myeloid cells (granulocytes) 截然不同(6)。相較於 granulocytes，HL-60 缺乏完整的 receptors、不具吞噬能力(phagocytosis)、無法以 PMA 誘導產生 superoxide。但若以 DMSO 培養 5-7 天，則此細胞會分化為 mature myelocytes、metamyelocytes 及 neutrophils(7)，且具備大至完整的化學趨化反應(chemoattractants)與正常的特徵。其他如以 retinoic acid、PMA or vit. D₃ 則也會使細胞分化為 neutrophils 與 monocyte/macrophage-like cells(8, 9)。

而未分化的 HL-60 細胞，其本身就有多項的基因缺陷，包括染色體的倍數異常、p53 gene deletion 與 c-myc gene amplification.... 等等(10,11)。由於其被認為本身已處於 apoptosis 的準備狀態，因此在探討凋謝性死亡的過程中，此細胞實為一良好研究材料。

三. 細胞凋謝性死亡 (Apoptosis)

Apoptosis 又稱 programmed cell death，是細胞一種自我毀滅(self-destruct)的行為，通常經由啟動細胞內自殺程序(self-intrinsic suicide program)來達成，這種現象可能發生於生理成長階段，如生物體於變態時期之幼體器官的



退化；另一則是在外力刺激下所引起的細胞反應，如在細胞受嚴重傷害，或患有免疫缺乏症候群，及老化或退化疾病時出現。細胞進行 apoptosis 時，其特徵為細胞核與細胞質會聚合(condense)、DNA 退化分解或斷裂，而後細胞分裂為數個由細胞膜所包含的小體(apoptotic bodies)，此 apoptotic bodies 若存於生物體內，則會迅速的由 macrophage 所吞噬並消化，以防止有害物質繼續擴散。同樣的情形也存在於淋巴球，當 lymphocytes 受到病毒感染、細胞數目過多或發生自體反應(self-reactive)時，細胞便會啟動此程序，以調控成適當的狀況；但就另一方面來說，不當的活化凋謝死亡程序，卻往往導致諸如 ischemic stroke 與 AIDS.....等疾病。因此 apoptosis 對於生物體的成長發展與平衡(12, 13, 14, 15)，確有其重要的功能，而近年來許多文獻更指出，癌細胞凋謝死亡與抗癌藥物的作用機轉有很大關聯性，例如以 Retinoic acid 治療急性前髓性白血病患，其作用即誘導細胞分化成熟後進入凋謝死亡，而達到治療效果。除此之外，藉由誘導 cell cycle 調控蛋白來打亂細胞之細胞週期，或改變 proto-oncogene、endonuclease protein 的表現與活性使細胞進入凋謝死亡，都可能是抗癌藥物的作用機轉，可做為抗癌藥物篩選與發展之方向。

至於 apoptosis 的啟動，主要可分幾方面來討論。就免疫方面而言，當毒殺性 T 淋巴球(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)與自然殺手細胞(natural killer, NK)無法接收到細胞外的 survival signals 時，由於無法抑制內在的自殺程序(intrinsic cell suicide program)，或已被病毒感染，則健康的 CTLs 或 NK 便會分泌一種可溶性 cytokin：Fas-ligand (FasL)，FasL 藉著與表面蛋白 Fas 的結合，會快速誘發 ceramide 的產生，而 ceramide 可能透過調節 protein kinase C 的活性，來引起 apoptosis 的發生；同樣的情形，Tumor necrosis factor (TNF)也可藉由與 TNF-receptor 的結合，並透過訊息傳遞來產生 Reactive oxygen species (ROS)，進而使細胞走向 apoptosis 或 necrosis(16, 17,

18,19)。

另一方面，就細胞本身而言，缺乏生長因子(例如 nerve growth factor, NGF)，則有可能因為誘導 ROS 的增加，而使細胞進行 apoptosis(19)。若是細胞受到外來的傷害，例如以 UV 或 ionizing irradiation 照射後會造成 DNA damage，另外細胞缺氧(hypoxia)、oncogene activation、hormone 刺激、抗癌藥物、virus infection...等，都會使細胞生長停滯，以利細胞進行修復或死亡。因此，cell-cycle checkpoints 在 cell proliferation 的調控中，是一個相當重要的一環，而其中 p53 protein 更是一主要 checkpoint，其為許多蛋白質的 inducer，例如 p21^{WAF1/CIP1/SDI1}、GADD45、BAX (20, 21)。p21 能抑制 cyclin-dependent kinase(CDKs)活性，使 retinoblastoma protein RB 無法正常調控 transcription factor E2F，因此 S-phase-specific genes 無法表現，細胞因而停滯於 G₁ phase。另一方面，p53 也能活化 BAX 或抑制 BCL-2 的表現，導致細胞的 apoptosis。至於 p53 如何調控 apoptosis，至今仍無法徹底了解，一般相信與 protease 的作用、BAX 及 bcl-2 的表現有關(21, 22)。因此 p53 的 loss 或 inactivation 對導致細胞的癌化與惡性轉型有很大的關聯(23)。

另一方面，近年來許多文獻指出，apoptosis 經由 p53-independent pathway 來進行，也能 induce p21 與 RB phosphatase 的表現，使細胞生長停滯(24, 25, 26)，使 apoptosis 的研究更加複雜，但卻為癌症治療開啟另一條途徑。

而到底是哪些因子參與 apoptosis 的調控?至今尚無明確的答案，但由對線蟲類 *Caenorhabditis elegans* 的研究，大致上可得知，至少有 14 個 gene 在 *C. elegans* 的 apoptosis 過程中具有影響力，其中 *ced-3* 與 *ced-4* 對細胞的死亡是一關鍵，*ced-9* 則能防禦 apoptosis 的進行(12, 27)，顯然這三個 gene 對 apoptosis 的進行的確扮演著決定者的角色；相對於 mammalian cells，*ced-3* 與 interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)有同源性，而 *ced-9*

與 proto-oncogene *bcl-2* 也有同源性(12, 28)，因此在 mammalian apoptosis 的研究上，ICE 與 *bcl-2* 就顯得格外重要。

ICE 屬於 cysteine proteases 類，在哺乳動物尚有其他類似蛋白，如 Yama/ CPP32 β 、Nedd2。過度表現 ICE/ CED-3-like-protease activity 往往導致 apoptosis 的產生，但若加入一種 ICE inhibitor：cowpox virus protein - CrmA protein，則能廣泛抑制許多不同途徑引發的 apoptosis，顯示 apoptosis 與 ICE 確實有極大關聯(29)。由於 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 為 ICE 的 substrates，而 PARP 又與 DNA repair、genome surveillance 與 genome integrity 有關，因此在 chemotherapy drugs 的篩選上，proteolytic cleavage of PARP 可做為一項 early maker(30)。

至於 *BCL-2* protein 方面，此蛋白質在以往的研究中，發現其對於 DNA damage、TNF-mediated cytotoxicity、Retinoid-N-(4-hydroxyphenyl)Retinamide、Nitric Oxide 與 ROS 所引起的 apoptosis，具有預防的功能，因此除了推測其本身為一抗氧化劑外(19, 31, 32,)，還分別參與 *p53*-dependent 或 *p53*-independent apoptosis pathway，並且與抑制 ICE activity 有關(33, 34)。另外，*BCL-2* 尚與其 family 中的其他成員(如 *BAX*)有交互作用，因此其在 apoptosis 的防禦機制，仍須進一步闡明。

材料與方法

材料

儀器

1. 蛋白質電泳槽: Mini protein II cell (Bio-Rad)
2. 核酸電泳槽: Horizontal gel electrophoresis system (Life Technology)
3. 轉印槽: semi-dry electrophoresis transfer apparatus (Bio-Rad)
4. 分光光度儀: Spectrophotometer U-2000 (Hitachi)
5. 螢光光度儀: F-2000 (Hitachi)
6. 密度儀: AlphaImager 2000
7. 倒立顯微鏡: Diaphot 300 (Nikon)
8. 螢光顯微鏡: UFX-II A (Nikon)
9. 紫外光光源: TFX-20M (Vilber Lourmat)
10. 核酸電泳照相系統: DS-34 Camera system (Polaroid)
11. 核酸電泳照相系統底片: Polaroid
12. X光感光底片: Kodak scientific imaging film BIOMAX
13. 均質機: EYELA Mazela-Z (Tokyo Rikakikai)
14. 冷凍離心機: Sigma 2K15
15. 流動細胞儀: Becton Dickinson Immunocytometry system (FACS)

藥品

1. 以下購自 SIGMA 公司: Protocatechuic acid、MTT、Proteinase k、RNase A、Cycloheximine、Actinomycin D、Leupeptin、Aprotinin、PMSF、sodium orthovanadate。
2. 以下購自 Bio-Rad 公司: Ammonium Persulfate、TEMED、Acrylamide、prestained SDS-PAGE standard。
3. 以下購自 E. Merck 公司: SDS。
4. 以下購自 NeoMarkers 公司: RB Mouse monoclonal antibody。

5. 以下購自 Santa cruz 公司: BCL-2 Mouse monoclonal antibody。

方法

[一] 細胞培養

人類白血癌細胞 HL-60 懸浮於 10% Fetal bovine serum-RPMI 1640 培養液中 (內含 1% PSN、1% Glutamine)，培養箱維持 5% CO₂、37°C 恆溫。細胞培養至一定數量時，以 900 rpm、10 分鐘離心去除培養液，於實驗前 24 小時更換培養液，並調整細胞濃度為 2×10^5 /ml；實驗進行時再次調整細胞濃度與更換培養液。

[二] 細胞型態觀察與核染色

細胞培養液中含 2 mM PCA，培養 24 小時後，以倒立式顯微鏡於 100 倍拍照；而核內染色則是先以 PBS wash 細胞，再將細胞懸浮於冰冷的 PBS 中，細胞濃度調整為 5×10^5 /ml，取 0.5 ml 滴入 cytospin cup 內，以 850 rpm、5 分鐘將細胞均勻離心打至玻片上，之後用絕對酒精固定，以 0.1% haematoxylin 或 50 µg/ml propidium iodide 染色 5 分鐘，最後經蒸餾水沖洗、蓋上蓋玻片，於顯微鏡下觀察。

[三] MTT assay (Microculture Tetrazolium Assay)

調整細胞濃度為 2×10^5 /ml，將 2 ml 的細胞種至 microtiter plate，加入各種濃度的 PCA，培養 44 小時後，以 900 rpm、10 分鐘離心將培養液丟棄，加入 2 ml RPMI-1640 (no serum) 與 200 µl MTT (5 mg/ml)，繼續培養 4 小時，爾後以 2000g、3 分鐘離心去掉培養液，加入 1.5 ml isopropanol 並均勻打散細胞後，再次以 2000 × g、5 分鐘離心，取 1 ml 上清液於分光光度計波長 563 nm 下測吸光值。

[四] 細胞生長曲線測定

主要以 Tryphan blue dye exclusion 來測定，取細胞懸浮液與 tryphan blue dye 以 1:1 體積混合，於血球計數盤計數

五大格黃色活細胞，帶入(total survival cell number) $\div 5 \times 2 \times 10^5/\text{ml}$ ，即可求得活細胞總數。本生長曲線的測定，是以 total cell number 來表示。

[五]DNA 抽取與 *Agarose electrophoresis*

將 6×10^6 cells 收集並以 PBS(含 1 mM ZnCl_2) wash 後，以 500 μl lysis buffer(0.5 % SDS、100 mM EDTA、10 mM Tris、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A、pH8.0)於 37°C 下反應 1 小時，接著加入 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K，於 50°C 下反應 12~24 小時。

待反應液呈清澈狀後，於室溫下以 1:1 比例加入 phenol 萃取，之後以 10,000 rpm、10 分鐘離心取上層液，重覆此步驟。接著以 1:1 比例加入 chloroform-isoamylalcohol(24:1) 萃取，之後以 10,000 rpm、10 分鐘離心取上層液，重覆此步驟後再以 1:1 比例加入 phenol - chloroform - isoamylalcohol (25:24:1) 萃取，之後以 10,000 rpm、10 分鐘離心取上層液，重覆此步驟後，加入 1/10 體積 3 M sodium acetate(pH 7.2) 與 2 倍體積冰冷的絕對酒精，置於 -80°C 冰箱 overnight。

以 14,000 rpm、20 分鐘離心將 DNA 沉澱後，丟棄上清液並加入 70 % alcohol，再次以 14,000 rpm、20 分鐘離心，去除上清液後以真空幫浦去掉殘餘 alcohol(5 分鐘，不要完全乾燥)，將 DNA 沉澱物以 RNase-TE buffer(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase、10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0)溶解，於 37°C 下反應 6 小時。

將 DNA 以二次水稀釋 100~1000 倍，於 $\text{OD}_{260/280\text{nm}}$ 下測定純度與含量，取相同含量的 DNA 於 0.5 \times TBE buffer、100V 下進行電泳。

待電泳結束後，將 agarose gel 置於 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidium bromide 下染色 30 分鐘，再以二次水退染 30 分鐘，將 agarose gel 置於 UV 燈上以拍立得照相。

[六]細胞週期測定

本實驗主要採用 *BECTON DICKINSON* 公司所生產的 *CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit* 來完成。

細胞(5×10^5)以 900 rpm、5 分鐘離心去除培養液後，以 PBS(含 1mM $ZnCl_2$)wash 細胞一次。加入 250 μ l Solution A(trypsin buffer)，25°C 輕緩混合 10 分鐘之後，再加入 200 μ l Solution B(trypsin inhibitor and RNase buffer)，於 25°C 輕搖混合反應 10 分鐘，接著於 4°C 下加入 200 μ l Solution C(propidium iodide)，避光反應 10 分鐘，最後以 Flow cytometer (FACS)測定。

[七]細胞 DNA 片斷 ELISA

測定細胞內 DNA 碎片的方法，主要利用 *BOEHRINGER MANNHEIM* 公司所生產的 Cellular DNA Fragmentation ELISA kit. 來完成。首先細胞培養於含 10 μ mol/ml BrdU labeling reagent 的 RPMI-1640 medium 中，37°C 培養 24 小時，之後以 900 rpm、10 分鐘離心並換上新鮮的培養液，調整細胞濃度為 1×10^5 /ml，取 200 μ l 的細胞種於 microtiter plate，加入各種濃度的 PCA 培養 9~12 小時；或預先處理 Cycloheximide、Actinomycin D、Aphidicholin 與 Okadic acid 30 分鐘，再加入 2 mM PCA 繼續培養 9 小時。

準備一滅菌的 96 well microtiter plate，每一 well 加入 100 μ l coating solution(內含 Anti-DNA antibody)，蓋上 adhesive cover foil 於 4°C 反應 overnight。於測定時先丟棄此 solution，加入 200 μ l incubation solution，於室溫反應 30 分鐘，丟掉 solution，以 250 μ l washing solution 洗 3 次，每次 3 分鐘，再丟掉此 solution。

Sample 於一定時間後，加入 20 μ l washing buffer concentration 於每個 well 內，反應 30 分鐘將細胞於 well 內直接 lyse，之後以 900 rpm、10 分鐘離心取 100 μ l 上清液，將此上清液暫時保存於 -80°C。

將之前準備好的 sample 於 37°C 急速解凍，取 100 μ l 加入由 Anti-DNA antibody coated 的 microtiter plate，37°C 反應 60 分鐘，丟掉反應液，再以 250 μ l washing solution 洗 3 次，每次 3 分鐘，再丟掉此 solution，將此 microtiter plate 不加蓋放入微波爐，500~1000 W 作用 5 分鐘，接著以 -20°C 冷卻 10 分鐘。

取 100 μ l conjugation solution (內含 Peroxidase-labeled anti-BrdU antibody) 加於此 plate，於 37°C 反應 60 分鐘，丟掉反應液，再以 250 μ l washing solution 洗 3 次，每次 3 分鐘，再丟掉此 solution，緊接著加入 100 μ l substrate solution 以 250 rpm 搖盪 10~30 分鐘，最後加入 25 μ l 1M H₂SO₄ stop solution，以 250 rpm 搖盪 1 分鐘，於 450 nm 波長下在 5 分鐘內完成吸光值之測定。

[八]粒線體胞膜通透性測定

細胞(1×10^6)預先處理 1 μ M Rodamine123 三十分鐘，再加入 PCA，以 PBS wash 細胞後，加入 3ml 含 1% Triton 100 的 PBS 將細胞 lyse，最後以 6000 \times g、15 分鐘離心取 2 ml 上清液，於螢光光度儀 Ex/Em_{490/515nm} 下測定。

[九]GSH 測定

細胞(3×10^6)培養於含 PCA 的培養液在各種不同時間後，以 900 rpm、10 分鐘離心將培養液丟棄，加入 1 ml buffer(5% meta-phosphoric acid、0.1 M Na₂HPO₄、0.005 M EDTA、pH8.0)，經均質化後以 3000 rpm、10 分鐘離心取上清液，其中 25 μ l 用以測定 protein 含量；另取 400 μ l 上清液，加入 1.5 ml phosphate-EDTA(0.1 M Na₂HPO₄、0.005 M EDTA、pH8.0)與 100 μ l *o*-phthaldehyde (1 mg/ml)，於室溫避光反應 15 分鐘，以螢光光度儀 Ex/Em_{350/420nm} 下測定。

[十]Protein 抽取與 Western blotting

細胞(1.5×10^7)以 900 rpm、10 分鐘離心去除培養液，再以 PBS(含 1 mM $ZnCl_2$)wash 細胞一次，加入 500~700 μ l RIPA buffer (150 mM NaCl、1 % NP40、0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM Tris、pH 7.5)，內含新加入的 1 mM sodium orthovanadate、81 μ g/ml aprotinine、170 μ g/ml leupeptin、100 μ g/ml PMSF，於冰上充分 mix 反應 30 分鐘，再次加入 100 μ g/ml PMSF 後，於 $10,000 \times g$ (12,500 rpm)、10 分鐘、 $4^\circ C$ 下離心取上層液，即可得到 total cell lysate。

蛋白質定量則是以 *BIO-RAD* 公司所生產的 Bio-Rad Protein Assay 來完成。

首先以 BSA standards 做出一標準曲線，再取 sample 與 Bio-Rad protein assay dye 混合避光反應 5 分鐘，最後在 OD_{595} 下測定，即可獲得 protein 含量。

取一定量 protein 與 loading buffer(4 ml 2d-water、1 ml 0.5 M Tris、0.8 ml Glycerol、1.6 ml 10 % SDS、0.4 ml 2- β -mercaptoethanol、0.2 ml 0.05 % bromophenol blue、pH 6.8) 1:1 比例混合，於 $95^\circ C$ 加熱 10 分鐘，待冷卻後以小型離心機 spin down。

將 sample 加入每個 well 內，以上層膠 100V，下層膠 150 V 進行電泳。待電泳結束後，準備六片 filter paper(Whatman 3MM) 與一張 nitrocellulose membrane(Sartorius Nitrocellulose Blotting Membrane)，filter paper 與 nitrocellulose membrane 分別預先浸於 transfer buffer(5.8 g Tris、2.9 g Glycine、0.37 g SDS、200 ml Methanol、800 ml 2d-water)與 2d-water 15 分鐘，以 SEMI-DRY ELECTROPHORESIS TRANSFER apparatus(*BIO-RAD*)進行蛋白質轉印(0.2 A、70 min)。

將轉印過的 NC paper 浸潤在含 5 % 脫脂奶粉的 TBS buffer(10 mM Tris、150 mM NaCl、0.05 % Tween-20、pH 8.0)內，室溫下振盪 30 分鐘。接著將 NC paper 置入含 0.5~1 μ g primary antibody、1 % BSA 與 3 % 脫脂奶粉的 TBS buffer，於 $4^\circ C$ 冰箱反應至少 16 小時。反應完成後以

TBS buffer 清洗 NC paper 四次(15、10、5、5 分鐘)。將 NC paper 置入含 2200 倍稀釋的 Horseradish Peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody(以 TBS dilute)，室溫下反應 45~60 分鐘，接著以 TBS wash 三次(15、10、10 分鐘)。

將 Amersham ECL reagents 兩瓶溶液混合後，加入適量於 NC paper 上，反應 2 分鐘後，從邊緣吸走過多的液體，最後於暗房內以 Kodak film 曝光 3~10 分鐘，經沖片機沖洗後，即可獲得影像。

[十一] Establishment of HL-60-bcl-2 Clones

將一帶有 human BCL-2 cDNA 的 pCΔj-bcl-2 expression vector 殖入 HL-60 細胞內，使細胞 overexpress BCL-2 protein，此 BCL-2 overexpression HL-60 cells 係由台大毒理所郭明良老師所提供。

[十二] Statistical analysis

統計方法係以至少三組不同的實驗組，利用 *t-test* 來完成分析，於 $p < 0.05$ 則為有意義差異。

結果

[一]細胞毒性

以不同濃度的 PCA (0、0.05、0.1、1、2 mM) 處理細胞 44 小時後，以 MTT assay (total 48 h) 來定量細胞毒性，活細胞會將 MTT 還原成 Formazan，以 isopropanol 將 crystal 溶解後，於波長 563 nm 測其吸光值，以無 PCA 者之吸光值為 100 % 存活率，其餘給藥者與之比較，結果發現 PCA 濃度在 1 mM 與 2 mM 時，細胞存活率有意義的下降為 82 % 及 55 %。(Fig. 1)

[二]細胞生長曲線

本次實驗採用 HL-60 細胞株，以含 0.1 % DMSO 的培養液中培養之細胞當控制組時，其細胞總數於 24 小時時，達到起始的 2.4 倍，48 小時則達到 5.5 倍；而以 0.1 mM PCA 處理則對細胞無影響；以 0.5 與 1.0 mM 處理者，於 24 小時內對細胞生長僅有些微抑制；但處理 1.0 mM 者，在 48 小時時則抑制 60 % 的細胞生長(與相同時間 control 組比較)；而處理 2 mM 者於 24 小時後對細胞生長抑制明顯增加，48 小時時更抑制 72 % 的細胞生長。(Fig. 2)

[三]細胞形態

以培養基培養 24 小時後，control 組細胞維持其圓形的形態。而以 2 mM PCA 處理的細胞，其細胞本身有萎縮的現象，形狀變得不規則，細胞周圍並有泡狀物 (apoptotic bodies)，細胞膜有泡狀突起 (blebbing)。另一方面，以 haematoxylin 與 propidium iodide 做染色後，可看到 control 組細胞核分別呈現出均勻的紫色與橘紅色，細胞核保持圓且大的形狀。而處理 2 mM PCA 的細胞，則可看濃染的深紫色或亮橘黃色的核，且不規則狀的細胞內核濃染發生於多處。(Fig. 3, Fig. 4)

[四]DNA 斷裂

以 2 mM PCA 分別處理細胞 1.5~24 小時後，經 DNA 抽取與電泳，可明顯看到於 9 小時開始有 DNA ladder 的出現，且 DNA 斷裂成 180bp 的倍數。而以各種濃度的 PCA 處理後，發現只有 PCA 濃度大於 0.75 mM 以上時，細胞 DNA 才會有 ladder 的出現。(Fig. 5, Fig. 6)

為了進一步定量 DNA 片斷，我們利用 ELISA 的方式來進行，細胞首先經過一定程序的步驟處理後，再加入各種不同濃度的 PCA，繼續培養 12 小時。結果 PCA 濃度在 0.1 mM 與 0.5 mM 時，其 DNA 斷裂仍然也有增加的情況，但在統計學上卻沒有明顯的差異；而濃度在 1 mM 以上時，DNA 片段則較 control 組增加 4~5 倍。(Fig. 7)

[五]細胞週期

當 HL-60 細胞處理 2 mM 的 PCA 之後，於各個不同時間將細胞收集，再以 Flow cytometer (FACS) 來分析細胞週期。

實驗所用的細胞於指數生長期時，約有 49 % 的細胞處於 G₁ phase，少部份(3.3 %)屬於 hypodiploid cells，其餘 29% 與 22% 則分別為 S phase 與 G₂/M phase。當加入 PCA 12 小時以內，G₁ phase 的細胞一直增加到 64 %，而 G₂/M 與 S phase 的細胞則減少；直到 24 小時的時候，G₁ phase 的細胞降至 42%，S phase 與 G₂/M phase 細胞數稍微提高可能是部分細胞重新進行另一次 cell cycle。而在細胞周期圖上可看到 apoptotic peak 約在 9 小時開始出現。(Fig. 8, Fig. 9)

[六]GSH

GSH 是細胞內含量最多的 thiol compound，其含量會影響細胞對凋謝死亡之敏感性，因此本實驗同時也測定細胞內 GSH 的含量。結果發覺以 2 mM PCA 處理過的細胞，其 GSH 含量於 1 小時之後有減少的趨向，且在 1.5 及 3 小時

以後達到有意義的減少現象(與相同時間 control 組比較,約減少 4%與 10%)。(Fig. 10)

[七]Membrane potential

由文獻得知,粒線體可能是細胞凋謝死亡過程中之 primary target,我們利用 Rhodamine 123 滯留於細胞內的多寡來評估膜電位的大小。而以 2 mM PCA 處理後,Rhodamine 123 滯留情況於 0.5 小時開始有抑制作用,在 1.5 小時的時候,更達到抑制了 37.4 % Rhodamine 123 滯留量(與相同時間 control 組比較);劑量方面則是 1mM 以上有抑制效果(與相同時間 control 組比較,減少 31%),因此 PCA 對於細胞膜的去極化確實有影響。(Fig. 11, Fig. 12)

[八]各種抑制劑對 PCA 的影響

為了解 PCA 誘發 HL-60 cells 進行凋謝死亡的機制,我們將細胞預先處理 Cycloheximide (cyclo ; 蛋白質合成抑制劑)、Actinomycin D (Acti-D ; RNA 合成抑制劑)、Aphidicholin (AP ; DNA 合成抑制劑)與 Okadaic acid (OA ; phosphatase inhibitor) 30 分鐘,再加入 2 mM PCA 繼續培養 12 小時,最後以 ELISA 方式定量 DNA 斷裂情況。

結果在只有 2 mM PCA 存在的情況下, DNA 斷裂較 control 組多 5.2 倍;預先加入 OA 200 nM 與 400 nM 者,則增加 4.2~6.7 倍;而事先加入 Cyclo 0.5 μ g/ml、AP 0.05 μ g/ml 與 Acti-D 0.25 ng/ml 者, DNA 片段則分別增加 5.7、5.2 與 4.3 倍。(Fig. 13)

由於預先加入的 inhibitors 其本身多半已造成細胞毒性,因此我們嘗試將 inhibitors 的劑量與 PCA 處理的時間減少,經過 9 小時 PCA 的培養之後,單獨以 2 mM PCA 處理的細胞,其 DNA 片段較 control 組多 1.9 倍;預先處理 Acti-D 0.1 ng/ml 與 Cyclo 0.05 μ g/ml 者,其本身對細胞有些少毒性(DNA 片段較 control 組多 0.2 與 0.8 倍,但統計學上呈現無意義差異),在處理 PCA 之後, DNA 片段則增加 0.9

倍(統計學上呈無意義差異)，與 inhibitors 本身所造成的情況相去不遠，故推測 PCA 誘發的 apoptosis 需一些新的 RNA 與 protein 合成；而低劑量的 AP (0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 本身也使 DNA 片段增加 0.7 倍(呈無意義差異)，加入 PCA 後，片段則增加 2 倍(呈有意義差異)；另外，50 nM OA 對細胞甚具毒性，單獨以 OA 培養時 DNA 片段較 control 組多 1.4 倍(呈有意義差異)，PCA 再培養 9 小時之後，片段則較 control 組增加 1.7 倍(但與 OA alone 比較，呈無意義差異)，後兩者雖說對 apoptosis 的進行沒有抑制作用，但由於 DNA 斷裂的量並無加成效果，因此 AP 與 OA 的影響我們並無法確切得知，而預先加以 Actinomycin D 或 Cycloheximide 後再處理 PCA，較僅以 PCA 單獨處理，其 DNA fragment 有減少現象，故推測在 PCA 誘發的凋謝死亡過程中，是需要新合成的 RNA 與蛋白質之參與。(Fig. 14)

[九]細胞內蛋白質的表現

(a) *BCL-2* protein

BCL-2 已被報告可以抑制凋謝死亡的發生，因此我們想了解 PCA 是否透過影響 *BCL-2* 之表現，而引起細胞程序性死亡。以 2 mM PCA 處理後，測 24 小時內(0、1.5、3、6、9、12、24 h) *BCL-2* protein 的表現量，每次實驗並以 Bio-Rad protein assay kit 來確定蛋白質含量之一致，結果發現細胞在 1.5 小時就有 26~32 % 的 *BCL-2* protein 受到抑制，其抑制效果並不隨時間延長而增加，*BCL-2* protein 表現始終維持在 69~73 %。另一方面，以不同濃度的 PCA 處理 12 小時之後，濃度為 0.5 mM 者只些微抑制 2 %，而 1 mM 與 2 mM PCA 則分別抑制 22 % 與 26 %。(Fig. 15, Fig. 16)

(b) *RB* protein

另外，近年來有報告指出，hypo-phosphorylated 型 (p105-115/hypo) 之 *Rb* protein 與抑制細胞生長、促進細胞分化或衰亡有關，因此我們也想了解 PCA 是否影響 *Rb* protein 磷酸化之變化。以 2 mM PCA 處理的細胞，於 3 小時後

hypo-RB 明顯增加，且 hyper-RB 相對減少，9 小時時 hyper-RB 及 hypo-RB 皆明顯減少，推測 PCA 誘導的細胞周期停滯與 RB 不正常去磷酸化有關。(Fig. 17)

[+] *bcl-2* transgene cells

由以上得知，以 2 mM PCA 處理的 HL-60 cells 其 *BCL-2* protein 一直維持在 26~32% 的抑制作用，因此想利用基因轉殖的工程，進一步來探討 *BCL-2* 在 PCA 存在下，是否有能力來預防 apoptosis 的進行。同樣，我們以 ELISA 的方法來定量其效果。

在細胞處理 2 mM PCA 12 小時之後，DNA 斷裂為 control 組的 5.74 倍；而載入一段大量表現 *BCL-2* protein 的基因的 HL-60 細胞，其在 12 小時的時候，細胞本身僅有些微 DNA 片段的產生(與 control 組之差異並無意義)，加入 PCA 者則其斷裂情況增為 3.4 倍(即比 control 組多 2.4 倍的 DNA fragment)，由上得知 PCA 誘發的 apoptosis 與轉殖細胞之 *BCL-2* 表現的多寡有密切關係。(Fig. 18)

討論

近年來對於 apoptosis 的引發機制，仍然不是很清楚，最近一位學者 Pierre Golstein，將凋謝死亡訂出三個過程，分別為 signalization、control and execution 及 structural alteration。細胞收到死亡訊息後，可能藉由改變 caspases、*BCL-2* family 或 mitochondria 來使細胞進入凋謝死亡(35)。由本實驗 HL-60 細胞形態改變與 DNA ladder 的出現(圖五，圖六)，我們證明了高濃度的 PCA (> 0.75 mM)，會引起細胞程序性死亡的進行。而藉由各種 time course 的測定，HL-60 細胞株細胞周期在前 12 小時被 block 於 G_1 phase(Fig. 8)，第 9 小時之後 hypodiploid cells 突然大量增加，24 小時之後部分細胞似乎繼續進行另一次 cell cycle；DNA ladder 同樣是在第九小時後出現；*BCL-2* protein 於 1.5 小時後持續維持一固定的 level，*Rb* protein 則於 3 小時後 hypo form 漸漸增加，9 小時後明顯減少；另外以 Rhodamine 123 滯留量的分析法得知 membrane potential (mitochondria) 於 0.5 小時後有受到破壞，1.5 小時則有較明顯的傷害；細胞內 GSH 則於 1.5 小時後有減少的現象。因此由 apoptosis 發生的時間推測，PCA 引發的 cell cycle arrest 與 apoptosis 可能與造成粒線體異常及細胞內調控因子失調有關。

由於 PCA 對細胞內 GSH 的量有減少的現象，而 GSH 的減少往往引起細胞內氧化還原狀態不穩及 Ca^{2+} 濃度失去平衡，因此被認為與凋謝死亡有關(49, 50)，由於 GSH 存在於粒線體，是否粒線體亦受到傷害？由 data 顯示 mitochondria 可能是 PCA 攻擊的一個 target，文獻曾報告 membrane potential 的損毀可能會引起凋謝死亡(36, 37)，在 mitochondrial membrane 上有兩個被認為與 apoptosis 有關的 protein，一是 *BCL-2* family，其位於 outer mitochondrial membrane；另一個是 cytochrome c，位於 mitochondrial intermembrane space。cytochrome c 主要由核內基因轉錄後運送至 cytosol，再由 ribosome 轉譯成 apocytochrome c

並運回粒線體，在過去的研究中曾利用 cytosolic cytochrome c 與 ICE family、dATP 共同反應，結果發現 ICE family 會被活化，且 DNA fragment 也會出現，因此 cytosolic cytochrome c 被認為與 apoptosis initiation 有關，而 *BCL-2* 則具備防止 cytosolic cytochrome c 從 mitochondria 流失至 cytosol 的能力(38, 39, 40, 41)。

根據最近的文獻報告(35)，指出 mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) 的去極化(depolarization)會引起膜的 permeability transition，使粒線體膜形成非特異通道，並釋放 apoptosis-inducing factor (AIF)，AIF 同樣會引起凋謝死亡，但由於 $\Delta\psi$ 的改變並不影響 cytochrome c 的 realse(35, 38)，因此 PCA 對 *BCL-2* 的減少可能使 cytochrome c release 到 cytosol，進而使 apoptosis 發生；另一方面，PCA 對於 mitochondria $\Delta\psi$ 的改變，也可能誘發另一條細胞凋謝死亡途徑。

由於從 FACS 上得知以 PCA 處理後，細胞被 block 在 G_1 phase，而 mammalian cells 細胞周期是由不同的 checkpoints 來調控，其中 G_1 checkpoint 包括 D-type cyclins(D_1 、 D_2 、 D_3)、E-type cyclin、A-type cyclin、cyclin-dependent kinase (cdk4、cdk6、cdk2)、cdk inhibitory proteins (CKIs: p21、p27....)與 retinoblastoma protein (*Rb*)，其中 D-type cyclins 在整個 cell cycle 中除了 G_0 phase 外，其表現為持續性的，而 E-type cyclin 於 late G_1 phase 開始大量表現，進入 S phase 後即迅速消逝，A-type cyclin 則於 late G_1 phase 有表現，並在進入 M phase 前迅速消逝。在 cdk4,6-Cyclin D 與 cdk2-Cyclin E 對 *Rb* protein 行磷酸化後，*Rb* protein 會與 transcription factors (E2F)解開，形成 hyperphosphorylated *Rb* protein(p120)，使 S phase 得以繼續進行(42, 43, 44, 45)。但若是細胞受到傷害(如 DNA damage、radiation)，則 p53 protein 會大量表現並 induce p21 protein 的出現，p21 藉由抑制 cdk4,6-CyclinD 或 cdk2-Cyclin E 的磷酸化能力，使細胞 block 於 G_1 phase(21,

46, 47)。但由於 p53 protein 及 cdk4,6-Cyclin D 在 HL-60 cells 中測不到(48)，且文獻報告指出 p53-independent apoptosis 所引起的 G₁ arrest 可藉由誘導 Rb phosphatase activity 或 p53-independent p21/p16/p27 對 cdk4,6-Cyclin 及 cdk2-Cyclin E 的磷酸化能力的抑制作用，或降低 Rb kinase 的活性來使細胞生長停滯(26, 34)。由於以 PCA 處理細胞 3 小時後，Rb protein 有去磷酸化的現象，但分析 FACS 上的 apoptotic cells 卻僅有 3% (與 0 小時相同)，且預先加以 okadaic acid (用以抑制 protein-serine/threonine phosphatase 活性)，也無法抑制 DNA fragment 的產生，雖然 okadaic acid 本身可能引起 apoptosis，但根據 Qing Ping Dou 等人描述，抑制 protein-serine/threonine phosphatase 活性後，30 分鐘內 hypodiploid cells 馬上會出現(26)，因此推論 PCA 經由直接造成 DNA damage 而使 Rb protein dephosphorylation，進而引發 apoptosis 的可能性相當少，而 RB protein 於 9 小時大量減少，根據 Qing Ping Dou 於 1996 年時(52)指出，hypophosphorylated RB protein 會迅速的被 ICE family 切成至少兩個片斷(p48 & p68)，因此以 PCA 處理過的 HL-60 細胞，其 ICE family protein 的表現是否被活化，以及 PCA 是否能誘導 CKIs 表現或降低 Rb kinase activity 以使 cell arrest，則是我們未來的工作。

在本次的實驗中，由於 BCL-2 protein 的表現有被抑制的現象，為了進一步確認 BCL-2 protein 的被抑制作用，在 PCA 誘發的凋謝死亡中是否為一項因素，因此我們嘗試將 BCL-2 protein overexpression 的 transgene HL-60 cells 同樣以 PCA 處理，結果細胞內的 DNA fragment 確實有降低的現象，但凋謝死亡依然發生，無法完全抑制。

由於 BCL-2 只是 BCL-2 family 中的其中一員，BCL-2 family 尚包括有 BCL-xL、BCL-w、MCL-1、BAX、BIK、BAK、BAD 與 BCL-xs，前三者功能與 BCL-2 同樣具有抑制凋謝死亡的能力；後五者其功能則是相反，但諸

多的 *BCL-2* family 成員能藉由彼此形成 dimer 來調控細胞的生長，例如 *BAD* 與 *BCL-2* 或 *BCL-xL* 結合後能誘導凋謝死亡的發生，但 *BAD* 若先被磷酸化(如經由 *Raf-1* kinase)，則其會喪失與 *BCL-2* 的結合，使 *BCL-2* 調控的 cell survival 得以繼續。此外 *BCL-xL* 被認為與粒線體上 pore-forming 有關，粒線體膜的 permeability transition 會導致 apoptosis，但能被 *BCL-2* 抑制(35, 51)，因此 PCA 與 *BCL-2* family 之關係與作用機制仍有待了解。

由於 *BCL-2* 可能藉由 cytochrome c、AIF 的釋出，來調控其下游的 ICE/caspase，以進行凋謝死亡；另一方面細胞也能不經 *BCL-2* pathway，而直接誘導 ICE/caspases (35)，但根據實驗 data，顯示 overexpression *BCL-2* HL-60 cells 仍然會進行凋謝死亡，因此是否 PCA 能直接誘發 ICE family，則有待進一步探討。

因此我們推論 PCA 除了引起粒線體傷害，並抑制 *BCL-2* 的表現，使 *BCL-2* 無法執行對細胞保護的功能，而誘導凋謝死亡的進行之外，另一方面也可能透過抑制 RB protein 的磷酸化或使 RB protein 去磷酸化來使細胞 block 於 G₁ phase(Fig. 19)，而 PCA 是否對 ICE/caspase protease 有直接或間接的影響，則是我們將繼續探討的。

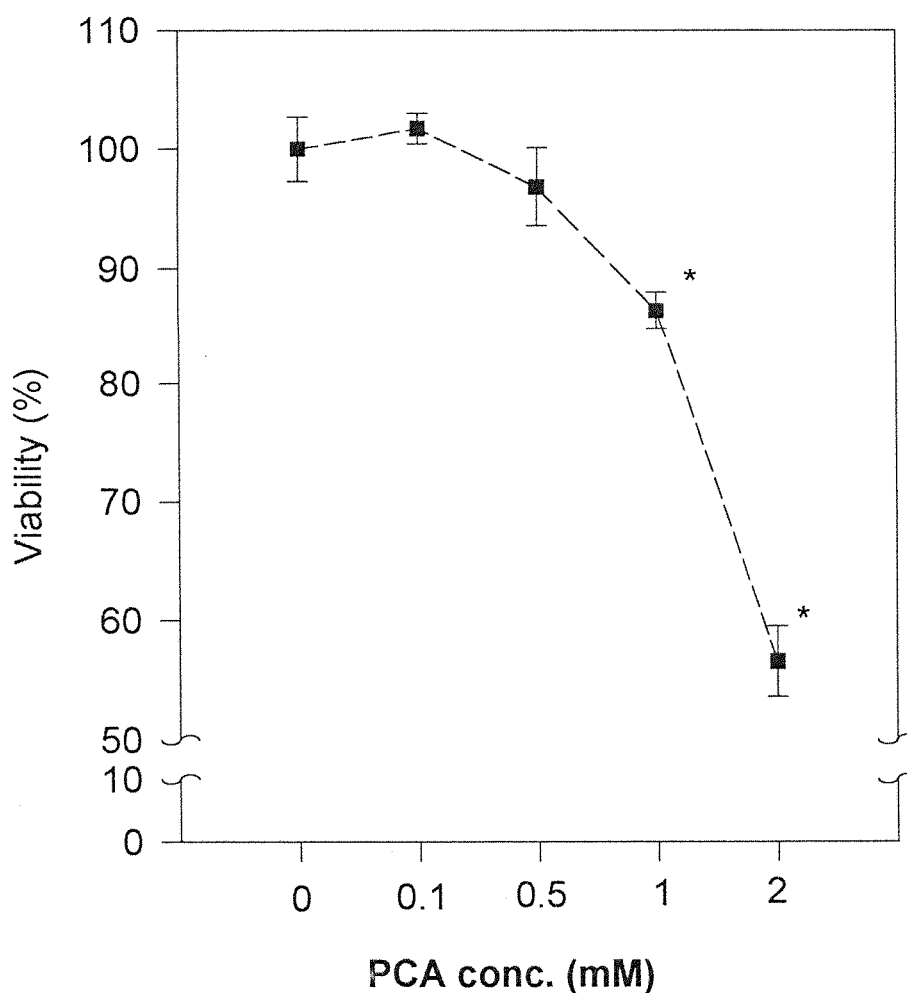


Fig. 1 Cytotoxicity of PCA in HL-60. HL-60 cells were treated with various doses of PCA for 44 h, then incubated with thiazolyl blue (MTT) for 4 h (total 48 h). Data represented as percent of 0 mM PCA. * $p < 0.05$ compared with 0 mM PCA (control group, 0.1% DMSO).

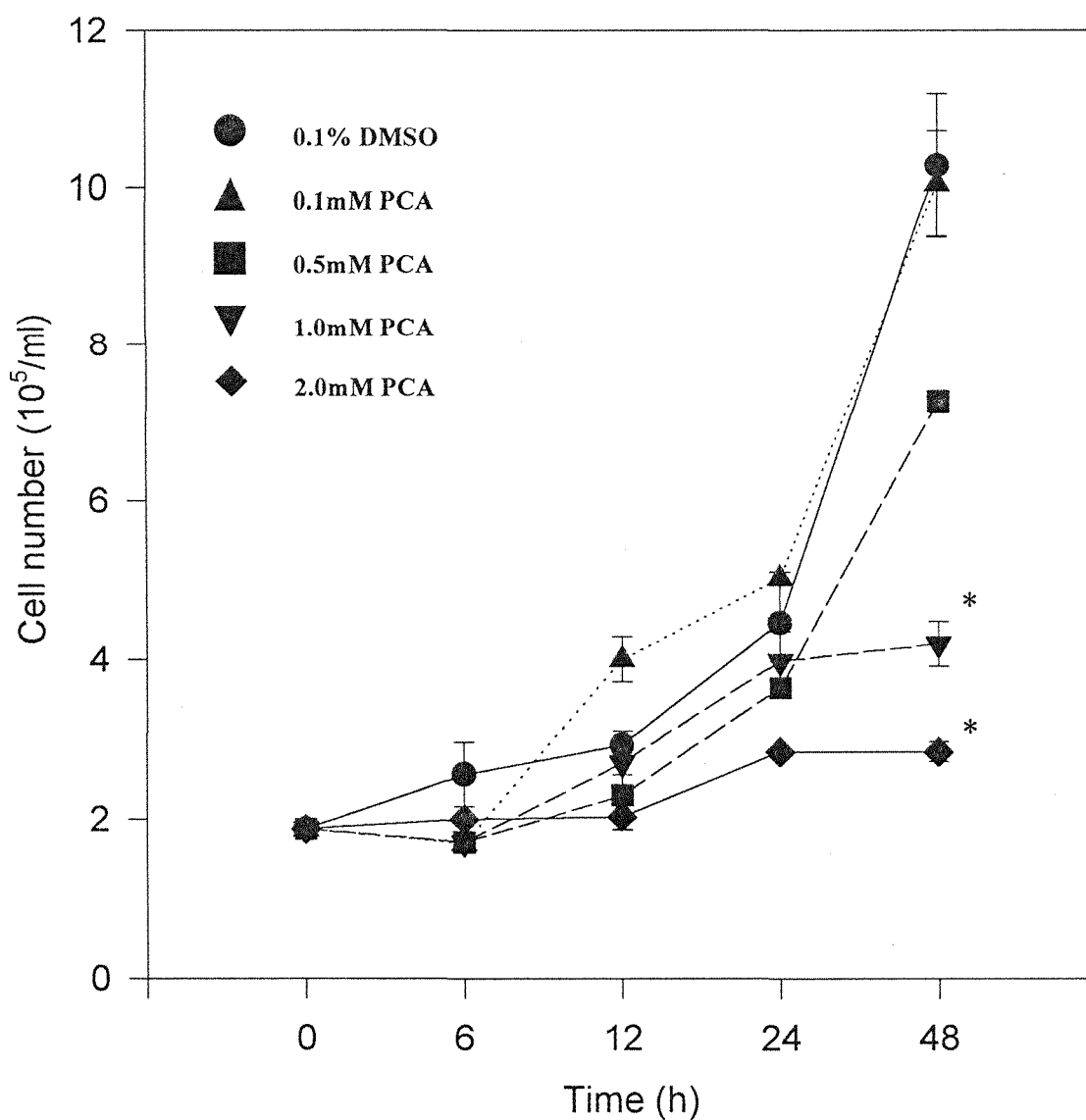
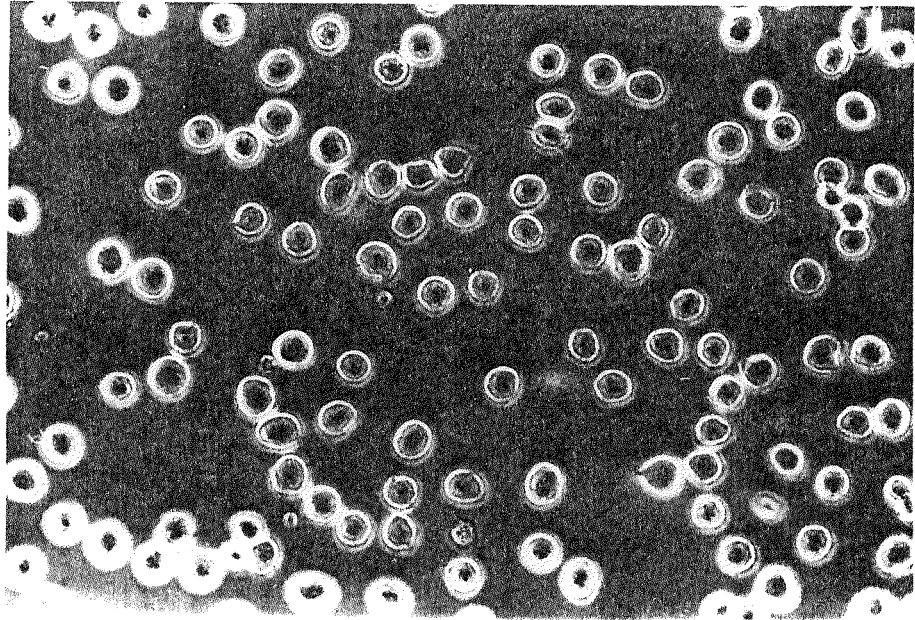


Fig. 2 Effect of PCA on HL-60 cell proliferation. Cells were incubated in various concentration of PCA, after indicated time total cells were calculated. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments.

(a)



(b)

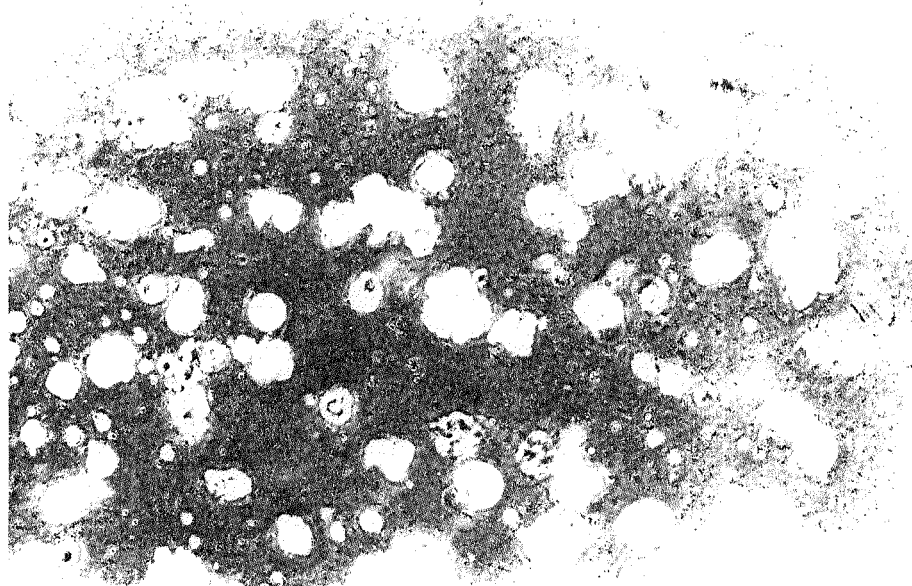


Fig. 3 Morphology of HL-60 with or without 2 mM PCA treatment. Cells were treated with 0.1% DMSO (a) or 2 mM PCA (b) for 24 h. Cells treated with PCA showing membrane blebbing, cell shrinkage and apoptotic bodies appearance.

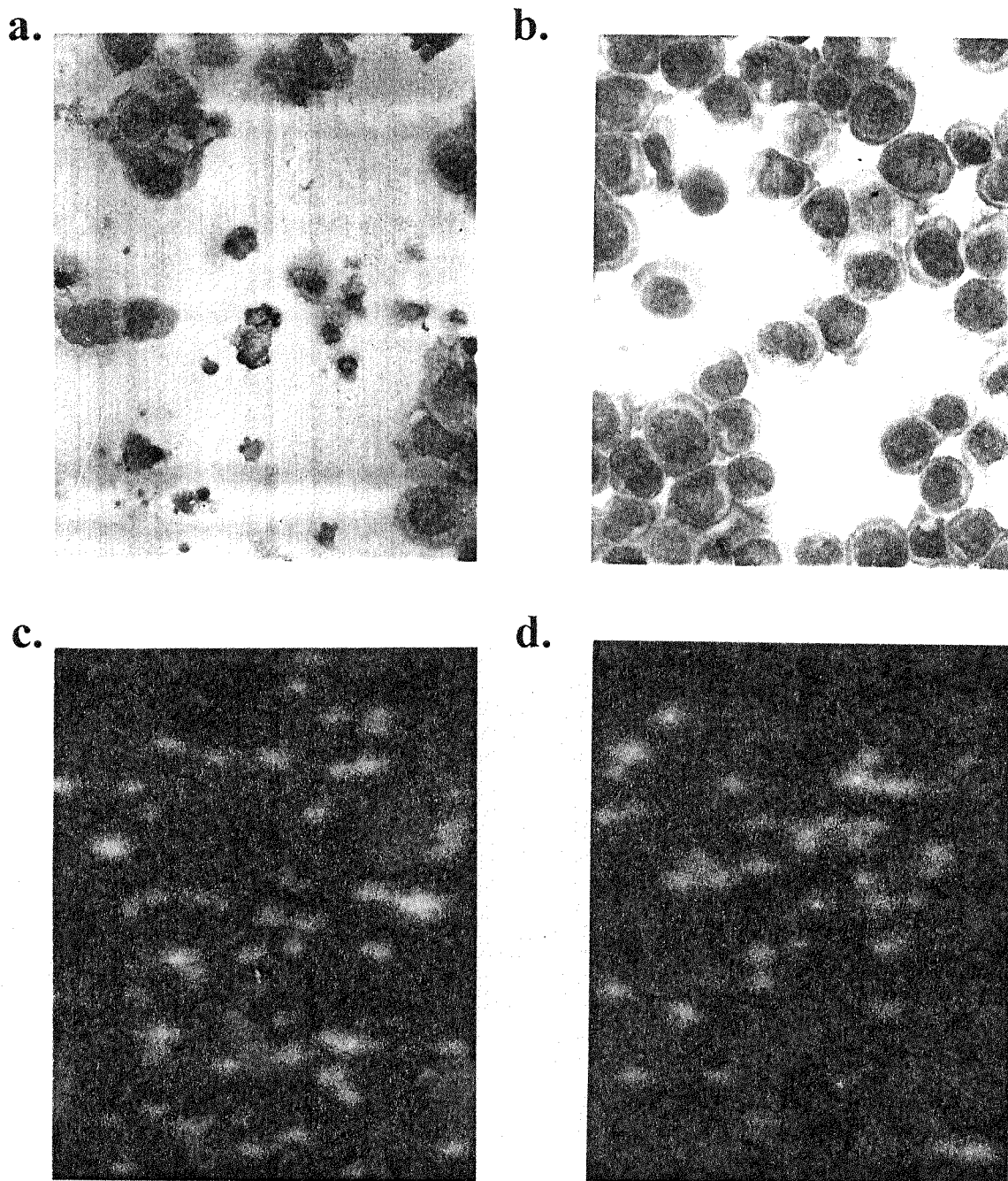


Fig. 4 Morphology of HL-60 with or without PCA treatment. Cell were treated with 2 mM PCA(a, c) or 0.1% DMSO (b, d) for 24 h, then stained by haematoxylin (a, b) or P.I. (c, d). Cells treated with PCA showing DNA condensation and fragmentation.

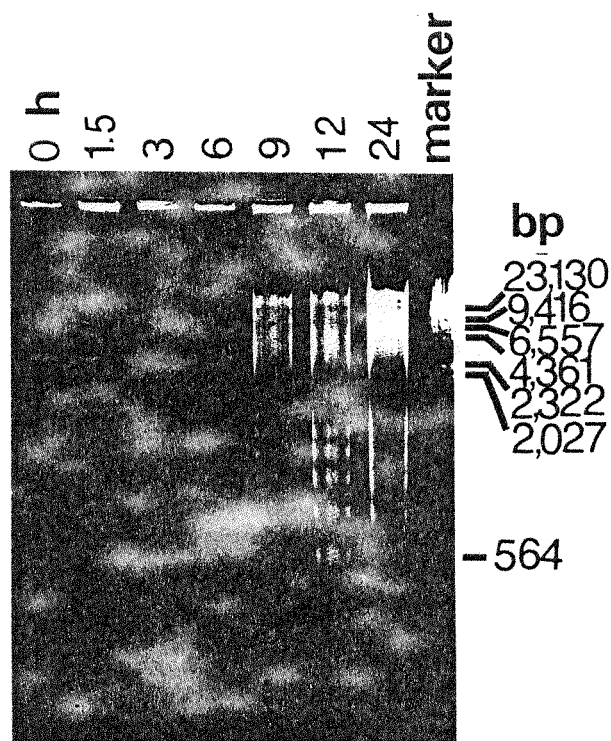


Fig. 5 DNA fragmentation of HL-60 cells induced by PCA. Agarose gel electrophoretic patterns of DNA were isolated from PCA-treated and untreated HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 2 mM PCA for various times. After extraction, pure DNAs (20 μ g) were electrophored in a 1.5 % agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination.

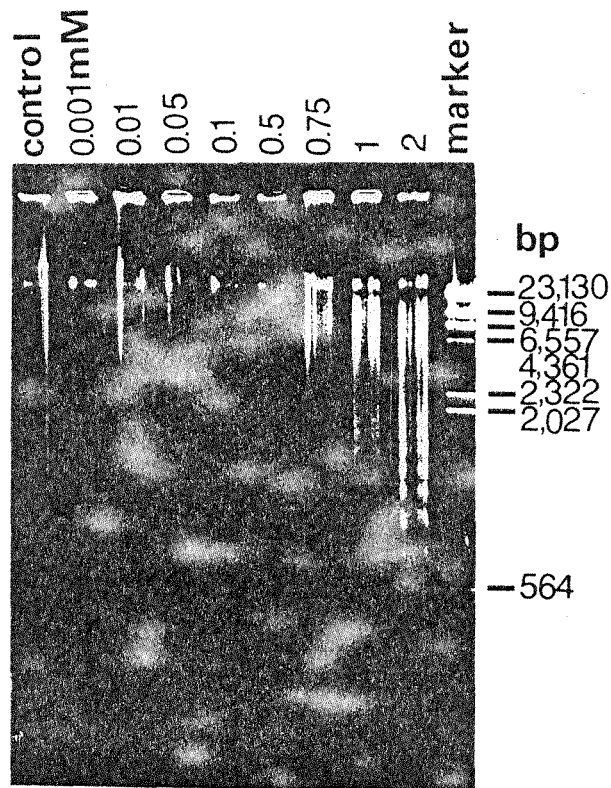


Fig. 6 Dose response of DNA fragmentation induced by PCA. HL-60 cells were treated with various concentration of PCA for 24 h. After extraction, pure DNAs were electrophoresed in a 1.5 % agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination.

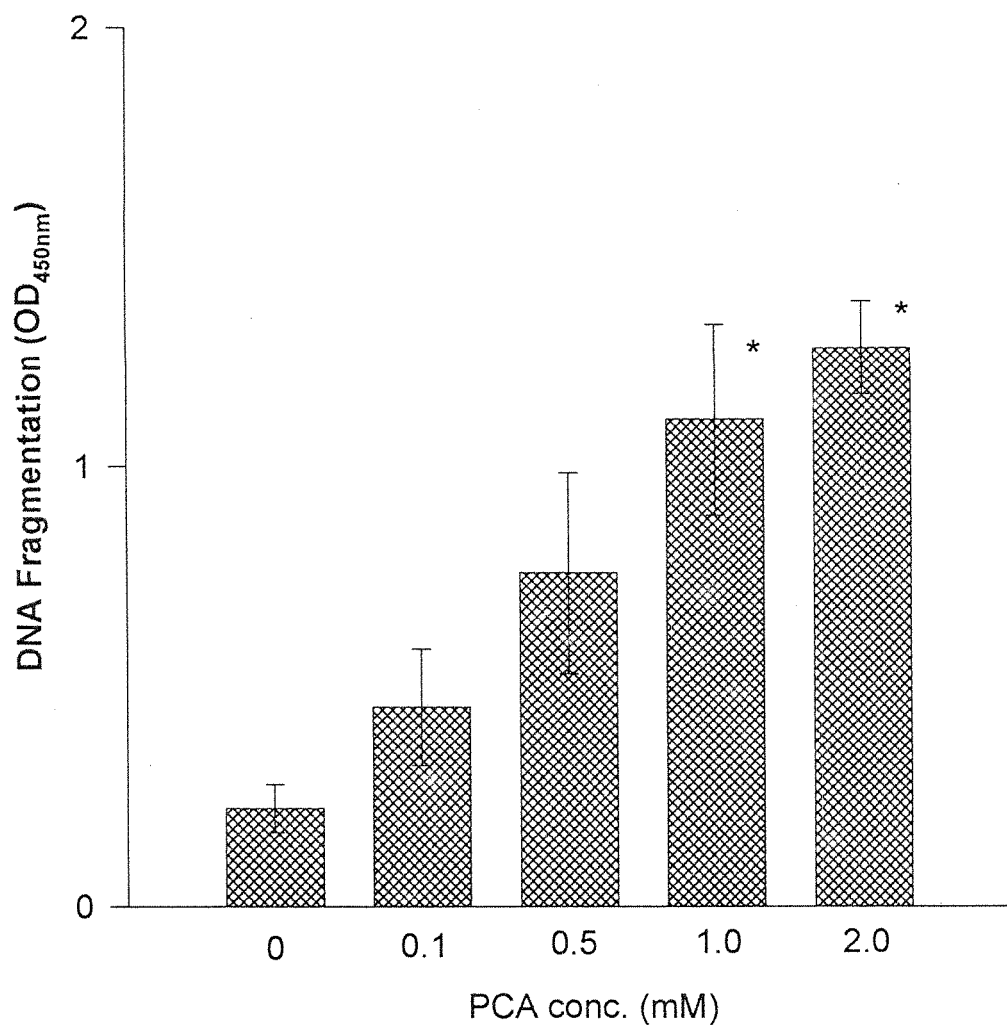


Fig. 7 Dose response of DNA fragmentation induced by PCA in HL-60 cells. 2×10^4 cells/well were incubated in the present or absence of PCA for 12 h. After the time indicated, cells were directly lysed in the wells and cytoplasmic DNA fragments were removed for testing by ELISA. Data represent the mean \pm SD of three independent determinations. $*p < 0.05$ compared with control group(0.1% DMSO treatment alone).

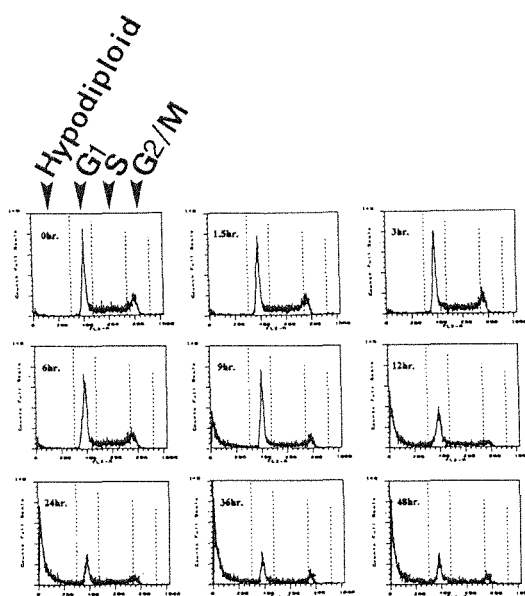


Fig. 8 Redistribution of cell cycle induced by PCA. HL-60 cells were incubated with 2 mM PCA for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide (P.I.) and the DNA content was analysis (including apoptotic and nonapoptotic cells) by flow cytometry.

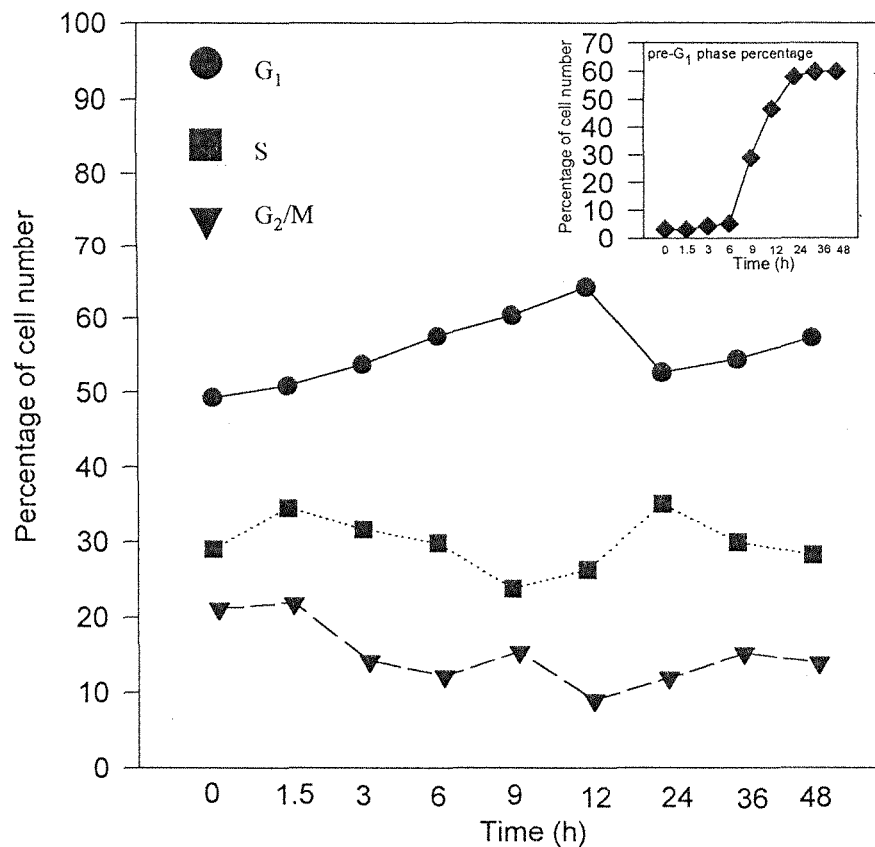


Fig. 9 Redistribution of cell cycle induced by PCA. Cells were incubated with 2mM PCA for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide (P.I.) and the DNA content was analyzed (including apoptotic and nonapoptotic cells) by flow cytometry. The number of cells in each phase of the cell cycle was calculated.

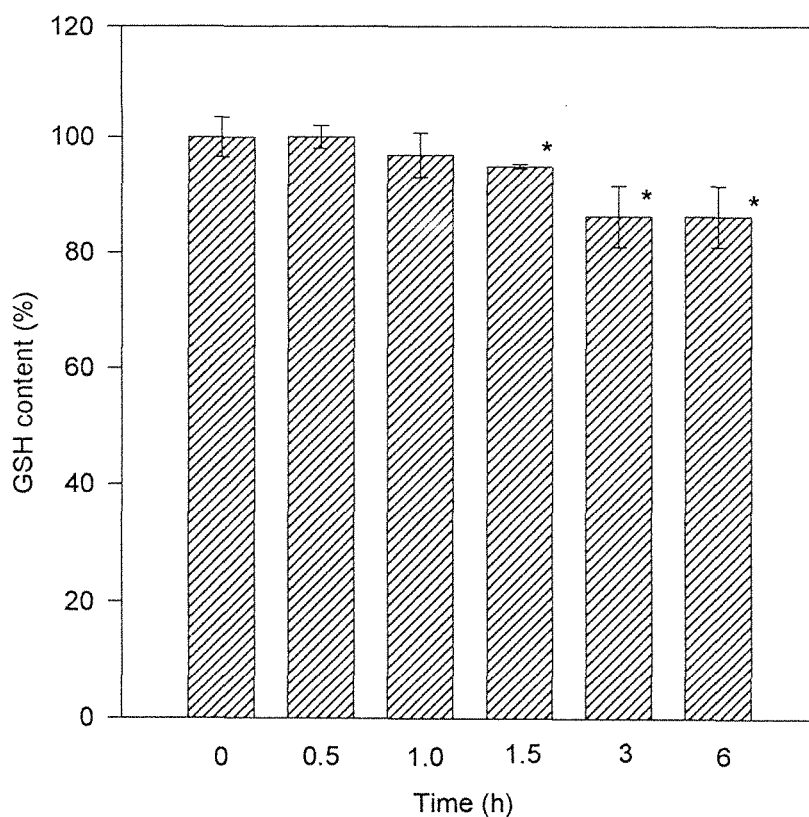


Fig. 10 Effect of PCA on cellular GSH content. Cells were treated with 2 mM PCA or 0.1% DMSO. Data represented as percentage (compared with control group at indicated time). * $p < 0.05$, compared with control group (0.1% DMSO).

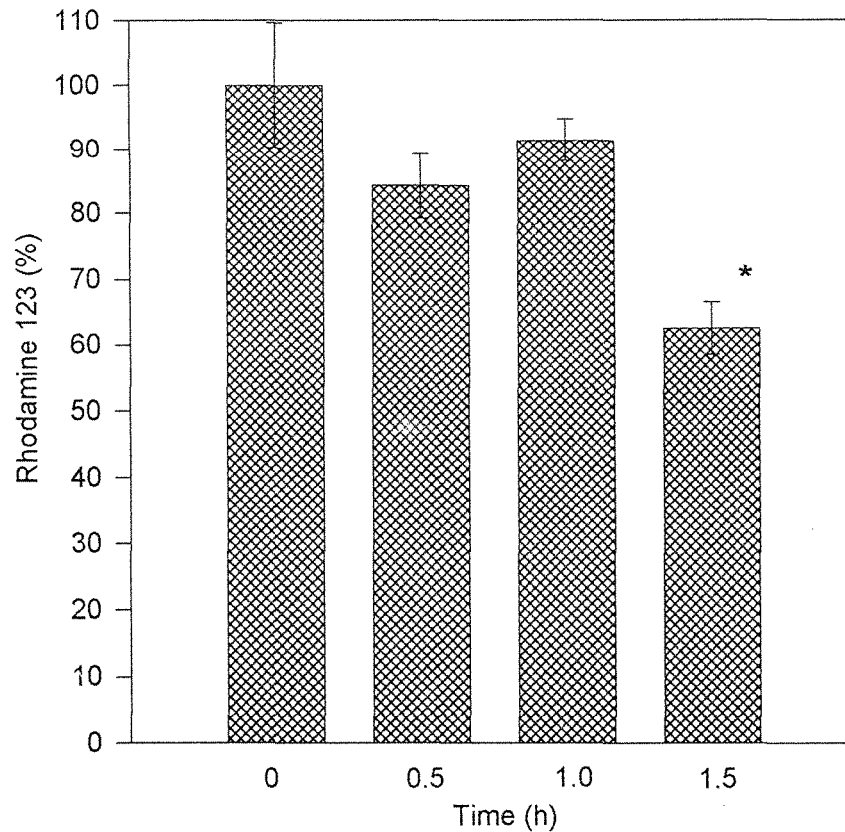


Fig. 11 Time course of membrane potential . HL-60 cells were pretreated with rhodamine 123 for 30 mins, then treated with 2 mM PCA or 0.1% DMSO for various times. Data were determined by measuring the fluorescence of rhodamin 123, and represented as percentage (compared with control at indicated time). * $p < 0.05$ versus control group.

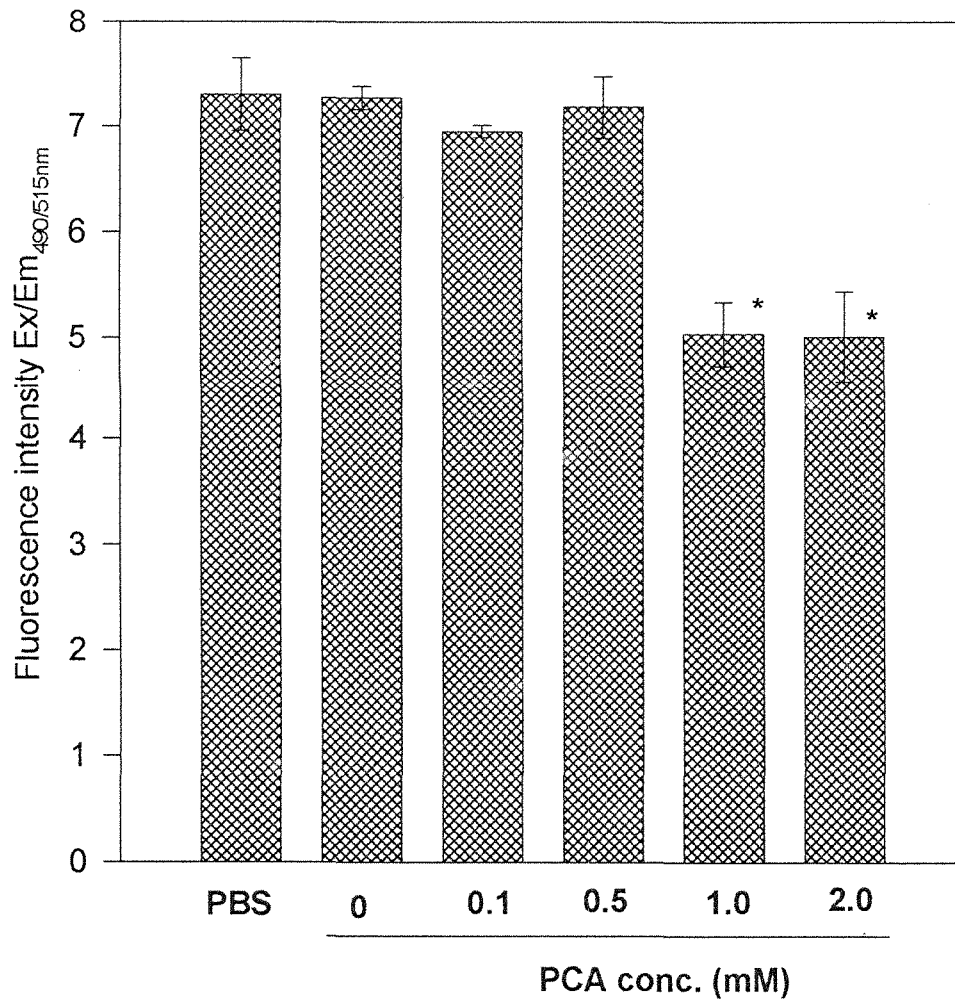


Fig. 12 Dose response of membrane potential. Cells were pretreated with 1 μ M rhodamine 123 for 30 mins, then incubated with various doses of PCA for 1.5 h. Data were represented by measuring fluorescence intensity of rhodamine 123. * $p < 0.05$ versus 0 mM PCA (0.1% DMSO, control group).

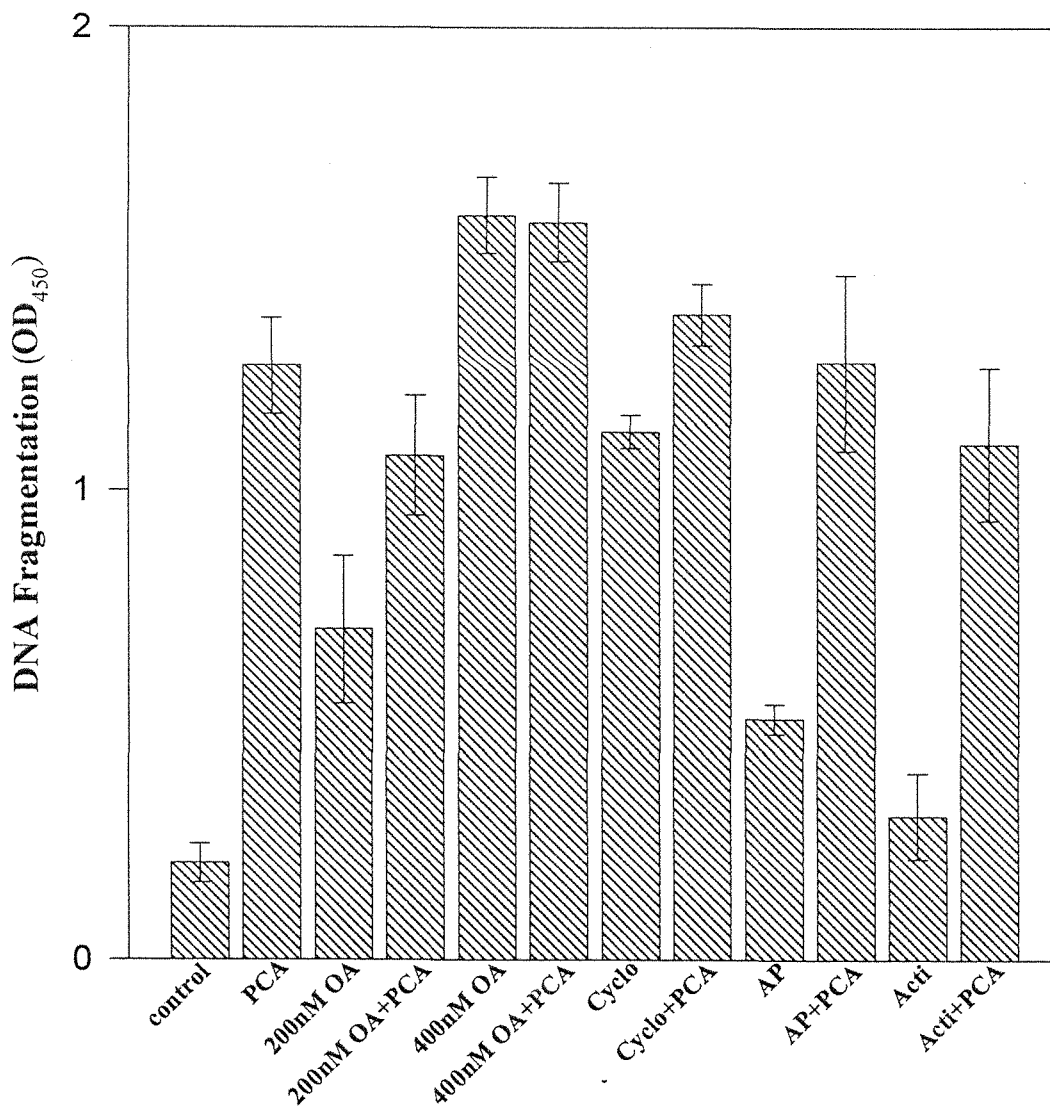


Fig. 13 Effect of modulators on PCA-induced HL-60 apoptosis. Cells were pretreated for 30 min with various dose of agents, and for a further 12 h incubation with 2 mM PCA. DNA fragmentation were quantitated by ELISA methods.

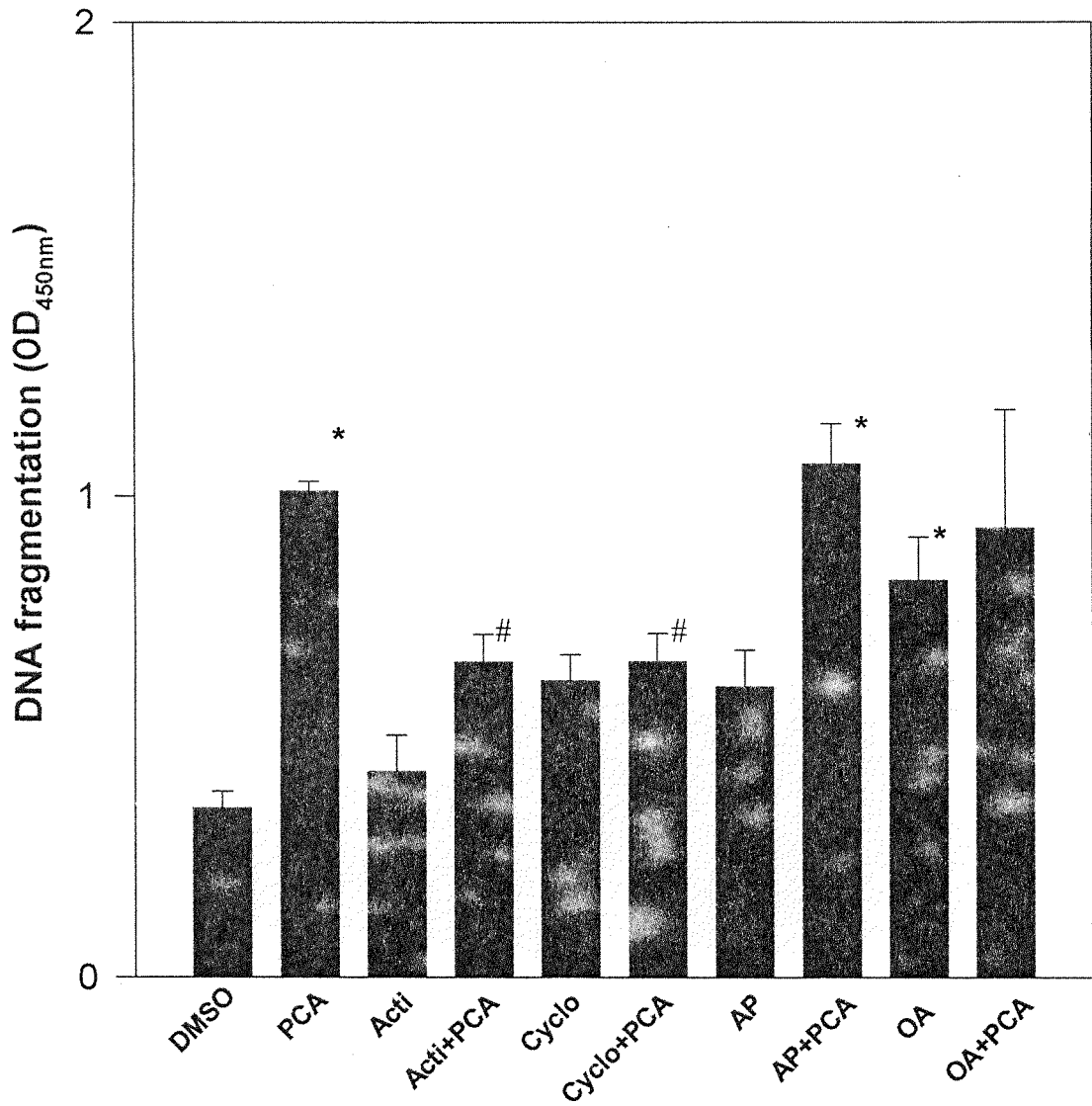


Fig. 14 Effects of modulators on PCA-induced HL-60 apoptosis. Cells were pretreated for 30 mins with previously determined noncytotoxic dose of Cycloheximide (Cyclo, 0.05 $\mu\text{g/ml}$), Actinomycin D (Acti, 0.1 ng/ml), Aphidicholin (AP, 0.025 $\mu\text{g/ml}$), Okadiac Acid (OA, 50 nM) and for a further 9 h incubation with 2 mM PCA. DNA fragmentations were quantitated by ELISA Methods.

* $p < 0.05$ (compared with DMSO)

$p < 0.05$ (compared with PCA treated alone)

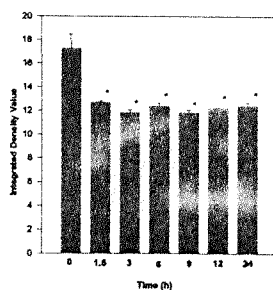
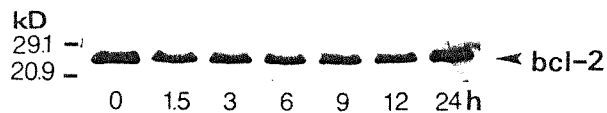


Fig. 15 Time course of PCA on bcl-2 protein expression. Cells were treated with 2 mM PCA for various times. Total cell lysates extraction were performed as described in methods. Lysates (15 μ g) were electrophoresed on 12% SDS-PAGE, and blotted. Results were expressed in densitometric units. * $p < 0.05$, compared with initiate protein expression.

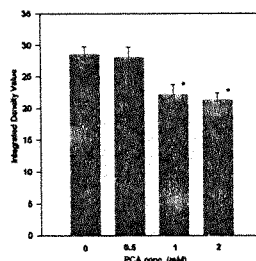
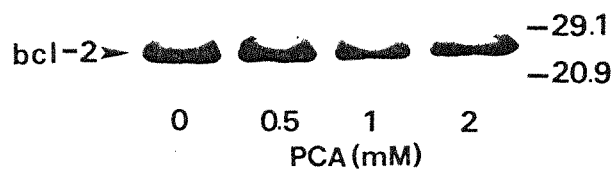


Fig. 16 Dose response of PCA on bcl-2 protein expression. Cell were treated with various dose of PCA at indicated times. Total cell lysates extraction were performed as described in methods. Lysates (15 μ g) were electrophoresed on 12% SDS-PAGE, and blotted. Results were expressed in densitometric units. * $p < 0.05$, compared with initiate protein expression.

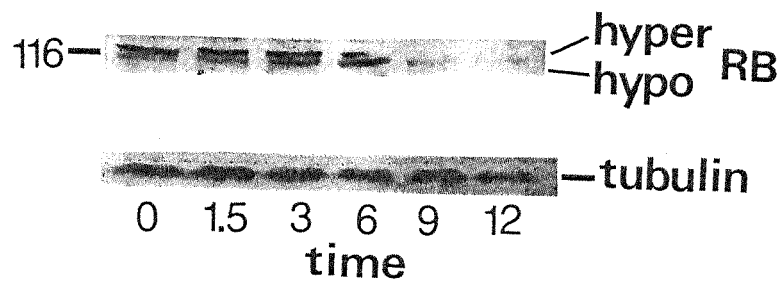


Fig. 17 Effects of PCA on Rb protein expression in HL-60 cells. Cells were treated with 2 mM PCA for various times. After extraction, Equal cell lysates (20 μ g protein) were electrophoresed on 8% SDS-PAGE, and blotted.

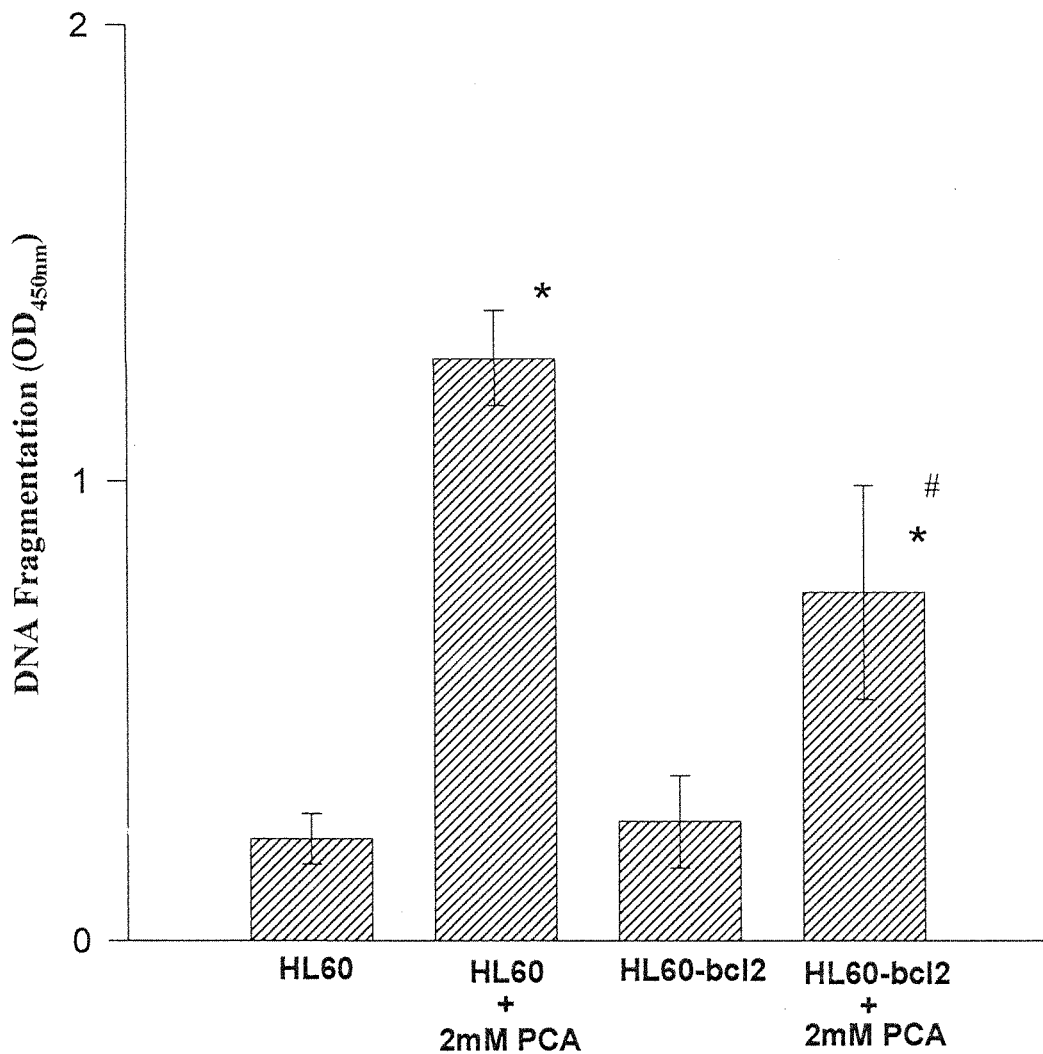


Fig. 18 Comparison of DNA fragmentation between HL-60 cells and Bcl-2 transfected HL-60 cells induced by PCA. 2×10^4 cells/well were incubated with PCA or 0.1% DMSO (control) for 12 h, then cells were directly lysed in the wells and cytoplasmic DNA were removed for testing by ELISA. Data represent the mean \pm SD of three independent determinations. * $p < 0.05$ compared with 0.1% DMSO treatment alone. # $p < 0.05$, compared with PCA-treated HL-60

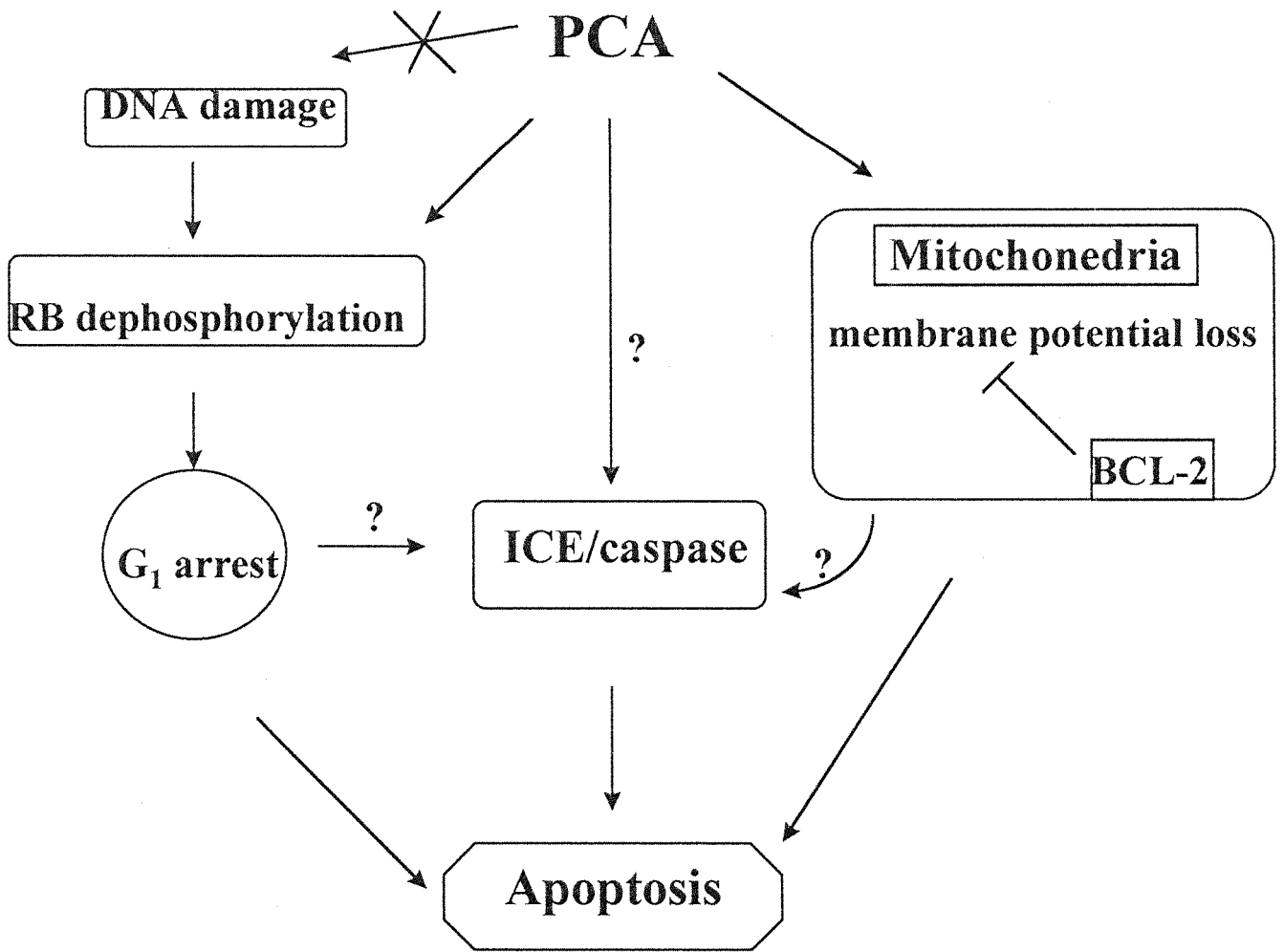


Fig. 19 Possible mechanisms of apoptosis induced by PCA.

參考資料

- (1) Tsui-Hwa Tseng, Chau-Jong Wang, Erl-Shyl Kao, Hia-Yih Chu. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemi. Biol. Inter.* 101: 137-148, 1996.
- (2) Nakamura T., Nakauawa Y., Onizuka S., Satoh S., Chiba A., Sekihashi K., Miura A., Yasugahira N., Sasaki Y.. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutat. Res.* 388: 7-20, 1995.
- (3) Ohnishi M., Yoshimi N., Kawamori T., Ino N., Hirose Y., Yanaka T., Yamahara J., Miyata H., Mori H. . Inhibitory effects of dietary protocatechuic acid and costunolide on 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 111-119, 1997.
- (4) Hirose Y., Tanaka T., Kawamori T., Ohinishi M., Makita H., Mori H., Satoh K., Hara A. . Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis* 16: 2337-42, 1995.
- (5) Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Mori H. . Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer* 75: 1433-9, 1995.
- (6) Collins S. J., Gallo C., and Gallagher R. E.. Continuous growth and differentiation of myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270: 347-349, 1977.
- (7) Collins S. J., Ruscetti F. W., Gallagher R. E., and Gallo R. C.. Terminal differentiation of human promyelocytic leukaemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 2458-2462, 1978.
- (8) Collins S. J., Ruscetti F. W., Gallagher R. E., and Gallo R. C.. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. exp. med.* 149: 969-974, 1979.
- (9) Murao. S. I., Gemmell. M. A., Callahan. M. F., Anderson. N. L. and Huberman. E. Control of macrophage cell differentiaion in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Res.* 43: 4989-4996, 1983.
- (10) Wolf D.. Major deletion in the gene encoding p53 tumor antigen cause

- lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 790-794, 1985.
- (11) Nowell P., Finan J., Dalla-Favera R., Gallo RC., ar-Rushdi A., Romanczuk H., Selden JR., Emanuel BS., Rovera G., Croce CM.. Association of amplified oncogene c-myc with an abnormally banded chromosome 8 in a human leukaemia cell line. *Nature* 306: 494-497, 1983.
- (12) Hermann S. . Mechanisms and Genes of Cellur Suicide. *Science* 267: 1445-1449, 1995.
- (13) Raff M. C.. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400, 1992.
- (14) Raff M. C., Barbara A. B., Julia F. B., Harriet S. C., Yasuki I., Michael D. J. . Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262: 695-700, 1993.
- (15) David L. V., Georg H., Andreas S. . An Evolutionary Perspective on Apoptosis. *Cell* 76: 777-779, 1994.
- (16) Shigekazu N. and Pierre G. . The Fas Death Factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995.
- (17) Roberta A. G., Judy N., Evan S., and Bernard M. B. . Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 654-658, 1996.
- (18) Lina M. O., Corinne M. L., Linda A K., and Yusuf A. H. . Programmed Cell Death Induced by Ceramide. *Science* 259: 1769-1771, 1993.
- (19) Michael D. J. . Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* 21: 83-86, 1996.
- (20) Tyler J. and Robert A. W. . Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 381: 643-644, 1996.
- (21) Tamar E. and Chris N. . Cellular responses to DNA damage: cell cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem. Sci.* 20: 426-430, 1995.
- (22) Slebos RJ., Lee MH., Plunkett BS., Kesis TD., Williams BO., Jack T., Hedrick L., Kastan MB., Cho KR.. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91: 5320-5324, 1994.
- (23) Donehower. L. A. and Bradley. A.. The tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta.* 1155: 181-205, 1993.
- (24) Paolo M., Marcio C., David L., Jacalyn H. P., Mercer W. E., and David G. . Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway.

Cancer Res. 54: 3391-3395, 1994.

(25) Wei Z., Luigi G., Craig D. M., Anne M. G., Ying C., Salvatore T., Albert B. D., and Mercer W. E. . P53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Res.* 55: 668-674, 1995.

(26) Qing P. D., Bing A. and Patricia L. W. . Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G1 arrest and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9019-9023, 1995.

(27) Hengartner M. O., Ellis R. E., Horvitz H. R.. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499, 1992.

(28) Donald W. N., Ambereen A., Nancy A. T., John P. V., Connie K. D., Michel G., Yves G., Patrick R. G., Marc L., Yuri A. L., Neil A M., Sayyaparaju M. R., Mark E. S., Ting-Ting Y., Violeta L. Y. & Douglas K. M. . Identification and inhibition of ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43, 1995.

(29) Muneesh T., Long T. Q., Karen O'Rourke, Serge D., Zhi Z., David R. B., Guy G. P., Guy S. S., and Vishva M. D. . Yama/ CPP32 β , a mammalian homolog of *ced-3*, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-Ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809, 1995.

(30) Scott H. K., Serge D., Yvonne O., Nancy E. D., and Guy G. P. . Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-Ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53: 3976-3985, 1993.

(31) Thierry H., Giuseppe B., Christoph R., and Ernst P. . Expression of *bcl-2* protein enhances the survival of mouse fibrosarcoma cells in tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 53: 1456-1460, 1993.

(32) Udo K. M., John C. R., and Bernhard B. . *Bcl-2* protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 20192-20197, 1996.

(33) Domenico D., Antonella A., Franca F., Enrico F., Alberto C., Toshiyuki M., John C. R., and Marco A. P. . Regulation of apoptosis induced by the Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl) Retinamide and effect of deregulated *bcl-2*. *Blood* 85: 359-367, 1995.

(34) Andress S., Alan W. H., Tyler J., and Suzanne C. . DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by *bcl-2*. *Cell* 79: 329-339, 1994.

- (35) Pierre G. . Controlling Cell Death. *Science* 275: 1081-1082, 1997.
- (36) Yoshihiro S., Noriaki N., Hisataka M., and Yasutoshi M. . Rapid loss in the mitochondria membrane potential during geranylgeranoic acid-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 58-63, 1997.
- (37) Krippner A., Matsuno-Yagi A., Gottlieb RA., Babior BM.. Loss of function of cytochrome c in jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 21629-23636, 1996.
- (38) Ruth M. K., Ella B.-W., Douglas R. G., and Donald D. N. . The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136, 1997.
- (39) Jie Y., Xuesong L., Kapil B., Caryn N. K., Ana M. I., Jiyang C., Tsung-I P., Dean P. J., and Xiaodong W. . Prevention of apoptosis by bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132, 1997.
- (40) Liu X., Kim CN, Yang J., Jcmerson R., Wang X.. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157, 1996.
- (41) Stanislaw K., Shigeki T., Shinichi T., Matthew J. S., Wayne F., and John C. R. . Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, Endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membrane. *Cancer Res.* 53: 4701-4714, 1993.
- (42) Mark E. E., Hayla K. S., Charles J. S., Hitoshi M., Jun-ya K., and David M. L. . Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: 487-497, 1993.
- (43) Yoichi T.. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends biochem. Sci.* 22: 14-17, 1997.
- (44) Charies J. S. . Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73: 1059-1065, 1993.
- (45) Charles J. S. . Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996.
- (46) Amanda G. P., David P. T., and Leland H. H. . When checkpoints fail. *Cell* 88: 315-321, 1997.
- (47) Natalia S. P., Ronald J. A., Redpath J. L., and Eric J. S. . DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15209-15214, 1996.
- (48) Burgen C., Wick M., and Miller R.. Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. *J. cell sci.* 107: 2047-2054, 1994.
- (49) Antonio F., Jeff K., Lisa F., and David J. M. . Oxygen radical production and thiol depletion are required for Ca²⁺-mediated endogenous

endonuclease activation in apoptotic thymocytes. *J. immun.* 155: 5133-5139, 1995.

(50) Satoshi I., Toshiyuki H., Norihito S., Kiichi H., Tetsuro S., Akira M., Tadashi H., and Junji Y. . Adult T cell leukemia (ATL) derived factor/human thioredoxin prevent apoptosis of lymphoid cells induced by L-cystine and glutathione depletion. *J. immun.* 158: 3108-3117, 1997.

(51) Shigekazu N. . Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.

(52) An B., Dou Q. P.. Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* 56:438-442, 1996.