

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：肉桂酒精萃取物抑制癌細胞增生及誘導細胞程序性死亡之研究 *
* ***** *

執行計畫學生：黃于嫻
學生計畫編號：MOST 104-2815-C-040-024-B
研究期間：104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授：陳霽霓

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 105年03月30日

目錄

(一) 摘要

(二) 研究目的

(三) 實驗材料與方法

(四) 實驗結果

(五) 討論

(六) 參考文獻

摘要

肉桂，學名 *Cinnamomum cassia*，是樟科肉桂屬的一個種，我們將其內容物萃取出來，即為本篇所應用之藥物 *Cinnamomum cassia* extract (簡稱 CCE)。本實驗將口腔癌細胞 SASVO3 處理 CCE 24 小時後，可發現細胞數隨著藥物濃度增加而減少，此外，透過流式細胞儀分析細胞可能走向細胞凋亡，也利用西方點墨法觀察相關蛋白(例如:Bcl-2、Bax、caspase 家族蛋白等等)，證實細胞被誘導走向細胞凋亡。另外，在初步結果也已發現，隨著加入的藥物濃度提升，酸性囊泡數量會隨之增加，再觀察其相關蛋白(例如:Atg 家族蛋白、LC3A、LC3B 等等)表現之情形，證明細胞走向自體吞噬作用。因此，從這些結果看來，CCE 可以誘導口腔癌細胞走向細胞凋亡及細胞自噬兩條路徑，未來，在治療口腔癌的藥物中能夠增添「肉桂」一中藥材，達到治療或預防之效果。

關鍵字:癌症、細胞自噬、細胞凋亡、口腔癌

Abstract

Cinnamon, scientific name called *Cinnamomum cassia*, is the member of the genus *Cinnamomum* in the family Lauraceae. Its contents will be extracted, and the drug is applied Benpian of *Cinnamomum cassia* extract (referred to as CCE). In this report, CCE elicited a strong cytotoxic effect on SASVO3, a highly malignant head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line. This mechanisms of cytotoxic effect is dependent on concentration of drug after treating 24 h. CCE also induced apoptotic cell death in dependent because of analysis of flow cytometry and apoptotic related protein like Bcl-2 、 Bax 、 caspase family protein. Moreover, The exposed cells also showed increased levels of autophagic vacuoles and LC3-II proteins, which are specific autophagy markers. These findings indicated that CCE induced cell death in oral cancer cells via two distinct anti-neoplastic activities that can induce apoptosis and autophagy. Therefore, CCE is a promising candidate in phytochemical-based, mechanistic, and pathway-targeted cancer prevention strategies.

研究目的

頭頸鱗狀細胞癌(Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC)，包含口腔鱗狀細胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)，頭頸癌可包含四個部位的癌症：口腔、喉咽部、舌下咽部及喉部，其惡性程度於全世界排名第六，而在開發中國家為發生率排名第三的癌症(1, 2)。2006 年期間在台灣 OSCC 已經成為常見癌症中第六名，而男性癌症病患死因中排行第四，每年約有 1560 人死於此疾病(3)。造成 OSCC 的可能原因為嚼食檳榔、抽菸、喝酒。早期 OSCC 的臨床治療方法為手術切除或放射治療，化療及化療與放射治療合併使用已被採用於治療晚期 OSCC 中(4)。雖然隨著醫療技術、診斷的進步，OSCC 似乎受到控制，但長期存活率最多也只能延長十年(3)，而且預後很差，超過 50 % 的病患在五年內死於此疾病或其併發症(5)。推測造成此結果主要原因可能是腫瘤細胞具有異質性，以及傳統治療的目標或許不是主要產生腫瘤的癌細胞族群(6, 7)。

實驗材料與方法

一. 細胞株種類

SASVO3, a highly malignant head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line.

二. 實驗方法

1. Cell Culture

(1) 解凍細胞

在無菌操作台中，利用 10cm 培養皿盛裝好 10mL DMEM 培養液(內含 10% 胎牛血及 1% penicillin/streptomycin)備用。由液態氮中取出 SASVO3 細胞株的冷凍管，立即使用 37°C 水浴槽解凍，解凍後利用 pipement 吸出細胞液至已備好的 10cm 培養皿中，放入 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中 8-12 小時，待細胞貼附後更換新的培養液，再放回培養箱中培養。

(2) 繼代培養

當細胞長滿後，將舊的培養液吸除，利用 7mL PBS 清洗兩次。接著取 1mL 0.05% trypsin-EDTA，並使之覆蓋所有細胞，放入培養箱中反應 7 分鐘，取出後輕輕拍打培養皿幫助細胞能完全脫離培養皿。加入 7mL 培養液抑制 trypsin 之活性，經 14000rpm 5 分鐘後，去除上清液，以新鮮的培養液將細胞打散並繼續培養之。

2. Colonogenic assay

將細胞株 SASVO3 以 5×10^3 分至 6 孔盤中，每孔為 3mL 的培養液，並立即加入肉桂酒精萃取物(CCE)，放入培養箱 7 天後，每孔先用 PBS 清洗，接著加入 paraformaldehyde 反應 20 分鐘，再用 PBS 清洗一次，最後加入 Giemsa 染色 40 分鐘，即可觀察之。

3. Western Blot

(1) 細胞溶解物之製備

處理不同濃度之 SASV03(0、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24 小時後，以 PBS 沖洗細胞，依細胞多決定加入多少 Ripa buffer，拿刮棒將細胞刮下收集於 eppendorf 中，開始 vortex 及刮 rack 50 次以上，插在冰上 10~30 分鐘，最後再拿到 4°C 以 12000rpm 離心 10 分鐘，上清液即為所需要之蛋白。

(2) 蛋白質之定量

利用 bradford protein assay 方法，原理為 coomassie brilliant blue G-250 可與蛋白質形成藍色復合物，蛋白質越多則藍色越深，再以分光光度計(波長:595nm)偵測。

(3) 樣品的製備與電泳

取等量的蛋白質樣品，加入含有 β -MSH 的 4 種濃度染劑混合均勻。在 95°C 下加熱 10 分鐘後，至於 0°C 碎冰中 5 分鐘，經過快速離心後，將樣品注入 SDS-PAGE 電泳膠中，接著分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分離。

(4) 電泳膠片的轉漬與 blocking

將 NC paper 置於 transfer buffer 中浸潤 3 分鐘，再將膠片放在 NC paper 上，。在 4°C 下，以 100V 電壓轉漬 1.5 小時。轉漬後，浸泡於 5% 脫脂奶粉在室溫下近 blocking 1 小時。

(5) 一級與二級抗體之雜交

Blocking 完成後，加入一級抗體定放置冷房中搖晃反應 16 小時，在以 TBST buffer 沖洗 3 次各 15 分鐘。加入二級抗體並在是問溫下反應 1 小時，接著用 TBST buffer 沖洗 3 次各 15 分鐘。最後以冷光

螢光顯影系統(LAS-4000)拍照。

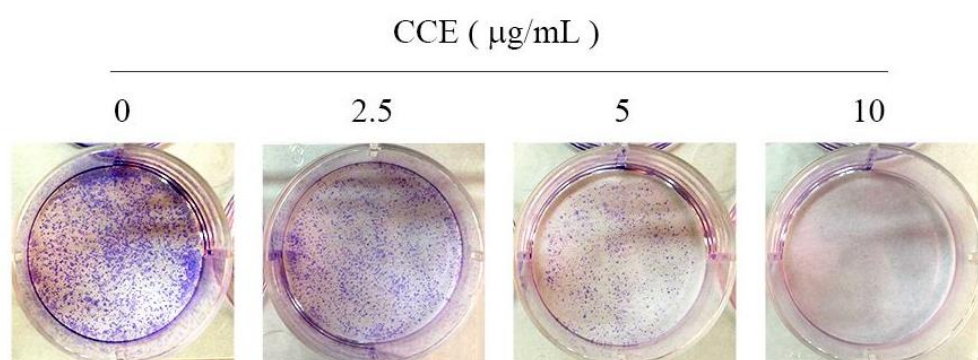
4. Annexin V-FITC and PI staining assay

處理不同濃度之 SASVO3(0、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24 小時後，回收舊的培養液，以 PBS 清洗 1~2 次並加入 trypsin-EDTA 反應 7 分鐘，用舊的培養液終止 trypsin-EDTA 並吸取回原先得離心管，以 14000rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 1.5mL PBS 清洗兩次並打散細胞。接著照著 protocol 的方法，加入 annexin V 及 PI 染劑各反應 10 分鐘，最後上流式細胞儀觀察之。

實驗結果

一. 肉桂(*Cinnamomum cassia* extract ; CCE) 對人類口腔癌細胞株 SASVO3 的影響

本實驗分別以 0、2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 處理口腔癌細胞株 SASVO3 並於細胞培養箱中反應七天，之後利用 Geimsa stain 觀察 SASVO3 之生長數量變化，發現 CCE 確實對 SASVO3 有抑制細胞生長之作用，此外，隨著 CCE 的濃度增加，口腔癌細胞株 SASVO3 的存活率開始減少(圖 1)。



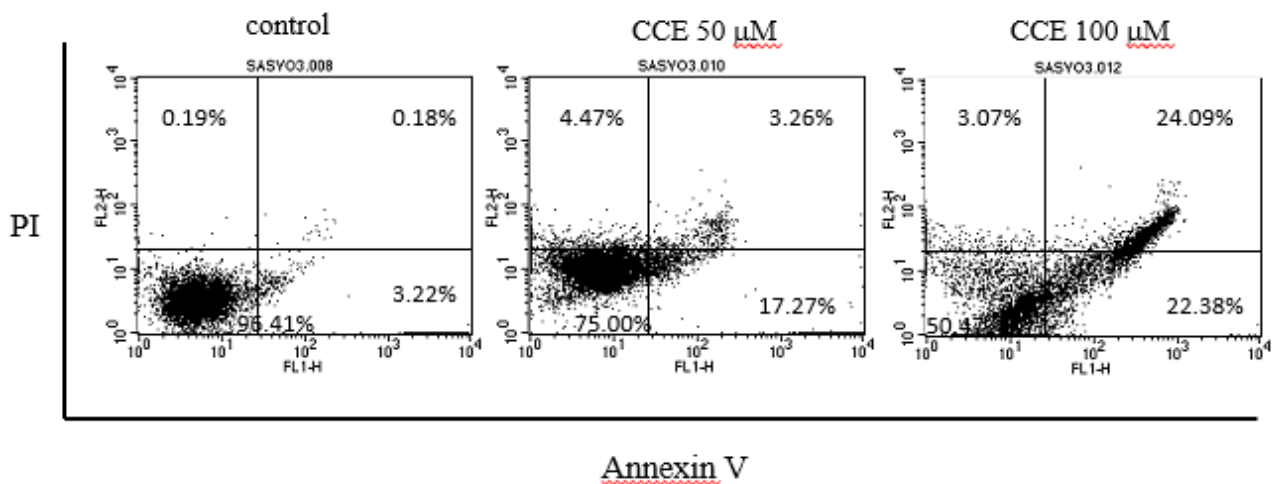
<圖一>

二. CCE 會誘導口腔癌細胞株 SASVO3 走向細胞凋亡(apoptosis)

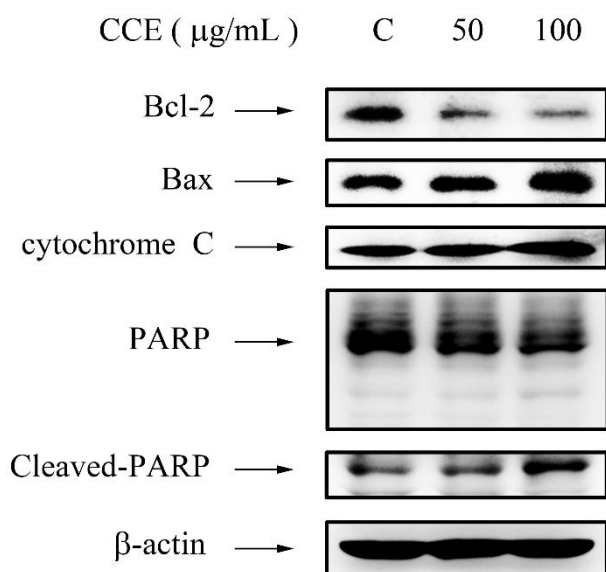
首先以不同劑量 CCE 處理 SASVO3 處理後，利用 Annexin V/PI staining assay 觀察細胞狀態，發現隨著藥物濃度增加，細胞會由左下移動到右上，表示 SASVO3 透過藥物處理會使細胞膜表面的磷脂酰絲氨酸(PS)從細胞膜內轉移到細胞膜外，進而讓 annexin V 標記到，另外，當細胞死亡後，PI 染劑會穿越細胞膜與核酸接上，因此，我們初步推測 CCE 可能是透過誘導 SASVO3 細胞凋亡來抑制細胞生長(圖 2-1)。另外在 caspase-independent apoptosis 的凋亡路徑中，當死亡訊號刺激時，藉由 Bcl-2 家族蛋白 Bid 與 Bim 的作用，將促使於粒線體內膜間隙(intermembrane space)的 Endo-G (endonuclease G) 與 AIF (apoptosis-inducing factor) 由粒線體釋放，並且移到細胞核內與 DNA 結合，促使 DNA 斷裂而導致細胞凋亡(9, 13)。

Bcl-2 家族蛋白對細胞凋亡是一群很重要的調節蛋白，其中分為兩派，一

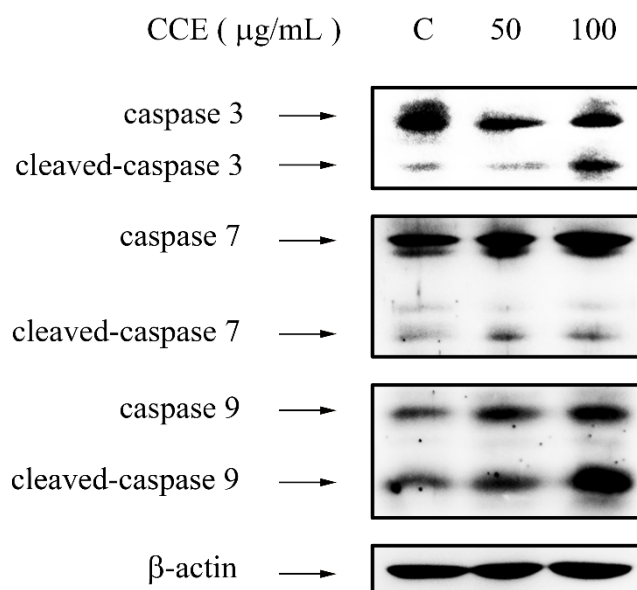
派會促進細胞發生凋亡(ex:Bax)；另一派則會抑制凋亡發生(ex:Bcl-2)，進而決定下游的半胱胺酸蛋白酶(caspase)是否會被活化。Western Blot 結果顯示經過 CCE 處理 24 小時後的 Bax 有明顯上升，而 Bcl-2 則明顯下降(圖 2-2)，證明 SASVO3 可能走向細胞凋亡；此外，我們也偵測到 cytochrome C 的蛋白量有上升趨勢，可能是因為受到 Bax 的影響，導致 cytochrome C 由粒線體內釋放到粒線體外(8)。由於 cytochrome C 釋放到細胞質中會與 Apaf-1 結合，促使 caspase-9 結構改變形成 cleaved-form，促使 caspase9 活化，進而活化下游的 caspase3，使細胞內許多蛋白質裂解而導致細胞凋亡(9-11)。在西方點墨法中確實也發現處理 CCE 24 小時後 cleaved-caspase-9 的表現量增加。我又進一步去探討更下游的其他 caspase 是否受到 caspase-9 的增加而影響，結果顯示隨著 CCE 的濃度增加，造成 caspase-3、PARP、caspase-7 的表現量皆有增加(圖 2-3)。因此，藉由 Bcl-2 家族蛋白的活化，促進下游一連串的細胞凋亡路徑，明確證實透過 CCE 24 小時處理過的人類口腔細胞株 SASVO3 能夠被誘導走向細胞凋亡。



<圖 2-1>



<圖 2-2>

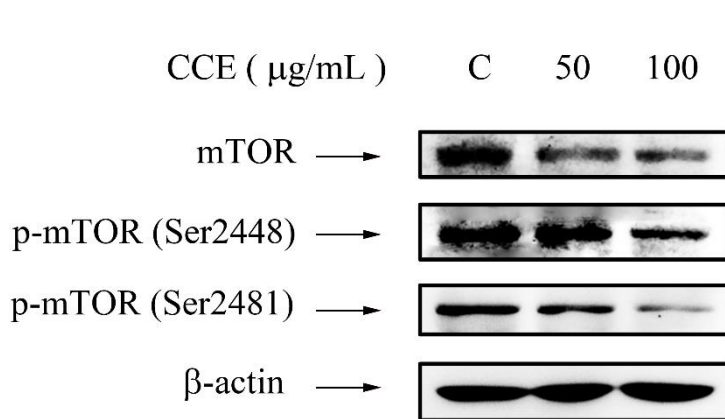


<圖 2-3>

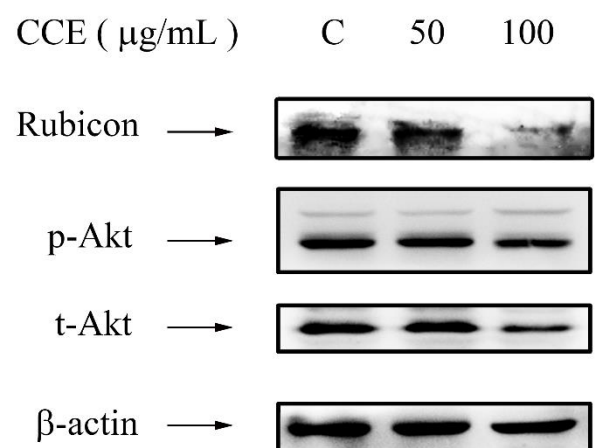
三. CCE 會誘導口腔癌細胞株 SASVO3 走向細胞自體吞噬(autophagy)

誘發癌細胞產生細胞凋亡一直是開發抗癌藥物的首要方向。但是癌細胞能透過啟動許多訊息路徑，如抑制凋亡基因的表現與活化，來逃避細胞凋亡機制的啟動(12)。因此導致針對細胞凋亡開發的藥物無法有效殺死癌細胞。細胞自體吞噬 (autophagy)，顧名思義就是一種細胞自我消化細胞質內物質的機制。在細胞自噬啟動時，細胞質中會先出現一個小片段的雙層膜構造，稱為隔離膜(isolation membrane)。隔離膜可來自於內質網或是細胞膜。隔離膜會與許多稱為細胞自噬基因所表現的蛋白結合，例如 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)，這些蛋白會促使隔離膜延展與包裹細胞質中要消化的物質，最終形成完整的雙層膜胞器構造，稱為細胞自噬小體(autophagosome)。細胞自噬小體會 docking 在細胞中溶酶體(lysosome)的膜壁上，並與溶酶體融合(fusion)，形成單層膜胞器結構，稱為細胞自噬溶酶體(autolysosome)。此時，被包裹的物質，通常是一些摺疊錯誤的蛋白質或是受損的細胞胞器，會受溶酶體體中的水解酵素降解，回到原始的胺基酸及磷脂質狀態，提供細胞回收再利用(14)。細胞自體吞噬已知

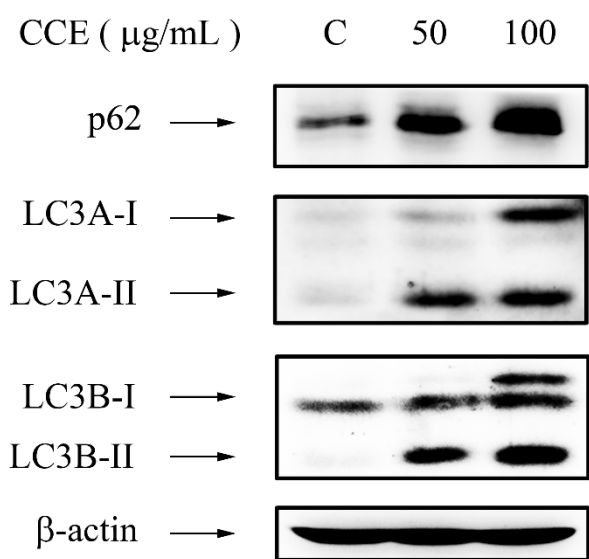
能促進細胞死亡，近幾年已成為治療癌症的熱門研究方向。初步結果已利用 AVO stain(可染 autophagy 過程中所產生之酸性囊泡 acetic vesicular organelle)證實 CCE 會促進酸性囊泡之形成，並推測 CCE 有可能誘導口腔癌細胞走向 autophagy，因此，我們進一步利用西方點墨法去觀察細胞自噬相關蛋白之表現量。我們知道 Beclin-1、Class IIIPI3K complex、Rubicon、Atg 家族蛋白都和自噬小體(autophagosome)的形成以及啟動細胞自噬作用有關，一旦細胞自噬作用被啟動，原本存在於細胞質的 LC3-I 蛋白會被轉譯後修飾成 LC3-II 蛋白質，並且會與 p62 結合後，聚集在 autophagosome 膜上。此外，PI3K-mTOR-Akt pathway 是細胞內調控細胞週期的重要路徑，專門維持細胞存活，會負調控細胞自噬作用。明顯地，mTOR、磷酸化的 mTOR (ser2481、ser2448)、Akt、磷酸化的 Akt (p-Akt)、PI3K 皆隨著 CCE 濃度上升而蛋白表現量顯著下降(圖 3-1、圖 3-2)；相反地，LC3A、LC3B、p62 則隨著 CCE 濃度增加而蛋白表現量顯著上升(圖 3-3、圖 3-4)，明確證實 CCE 確實會誘導口腔癌細胞株 SASVO3 走向細胞自體吞噬。另外，其他共同參與細胞自噬作用的相關蛋白，Rubicon、Atg5、Atg3 的表現量有些微上升，Atg7、Beclin-1 則無變化。



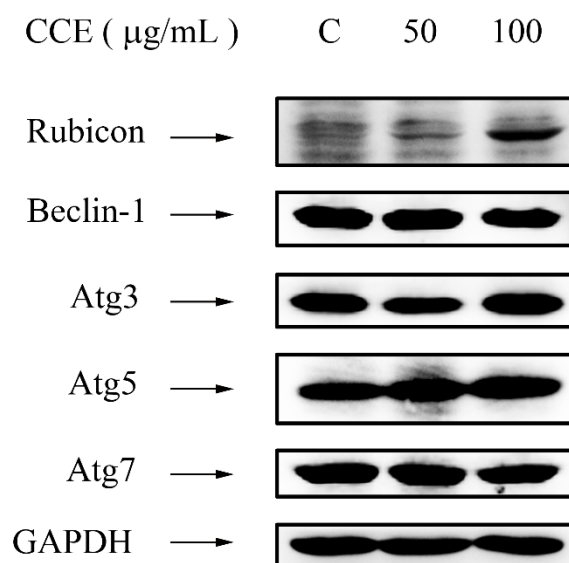
<圖 3-1>



<圖 3-2>



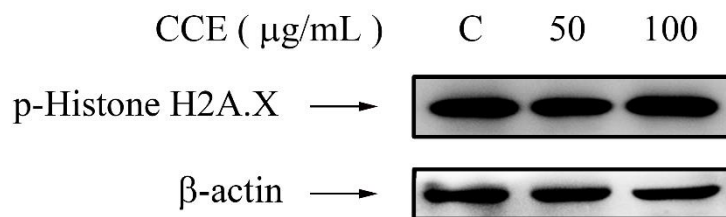
<圖 3-3>



<圖 3-4>

討論

1. 細胞凋亡為一種細胞程序性死亡。相對於細胞壞死 (necrosis)，細胞凋亡是細胞主動實施的。細胞凋亡一般由生理或病理性因素引起。而細胞壞死則主要為缺氧造成，兩者可以很容易通過觀察區分開來。在細胞凋亡過程中，細胞縮小，DNA 被核酸內切酶降解成 180bp-200bp 片段屬於有層次之斷裂，而細胞壞死時，細胞腫脹，細胞膜被破壞，通透性改變。其中我們有利用西方點墨法去看 H2AX 蛋白，若 DNA 受到降解可由此蛋白作為標定，然而，我們卻發現此蛋白表現量並無明顯增加(圖 4-1)，推測 CCE 所作用的地方不在此，接下來會繼續利用 Western Blot 觀察其他與 DNA 片段化之相關蛋白的表現情形。



<圖 4-1>

2. 為了再次確認 CCE 確實會誘導口腔癌細胞走向 apoptosis 及 autophagy，往後的實驗會繼續探討，若加入 autophagy inhibitor (Baf A1)，是否能夠防止口腔癌細胞走向 autophagy；若加入 caspase inhibitor (z-VAP-FMK)，可否讓口腔癌細胞不走 apoptosis 而能起死回生。

參考文獻

1. Chen, Y. J.; Lin, S. C.; Kao, T.; Chang, C. S.; Hong, P. S.; Shieh, T. M.; Chang, K. W., Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2004, 204, 326-32.
2. Pentenero, M.; Gandolfo, S.; Carrozzo, M., Importance of tumor thickness and depth of invasion in nodal involvement and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. *Head Neck* 2005, 27, 1080-91.
3. Chen, Y. J.; Chang, J. T.; Liao, C. T.; Wang, H. M.; Yen, T. C.; Chiu, C. C.; Lu, Y. C.; Li, H. F.; Cheng, A. J., Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008, 99, 1507-14.
4. Forastiere, A. A.; Goepfert, H.; Maor, M.; Pajak, T. F.; Weber, R.; Morrison, W.; Glisson, B.; Trotti, A.; Ridge, J. A.; Chao, C.; Peters, G.; Lee, D. J.; Leaf, A.; Ensley, J.; Cooper, J., Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 2003, 349, 2091-8.
5. Liao, C. T.; Chang, J. T.; Wang, H. M.; Ng, S. H.; Hsueh, C.; Lee, L. Y.; Lin, C. H.; Chen, I. H.; Huang, S. F.; Cheng, A. J.; Yen, T. C., Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. *Ann Surg Oncol* 2008, 15, 915-22.
6. Costea, D. E.; Tsinkalovsky, O.; Vintermyr, O. K.; Johannessen, A. C.; Mackenzie, I. C., Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2006, 12, 443-54.
7. Locke, M.; Heywood, M.; Fawell, S.; Mackenzie, I. C., Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* 2005, 65, 8944-50.
8. Green, D. R.; Reed, J. C., Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281, 1309-12.

9. Green, D. R.; Knight, R. A.; Melino, G.; Finazzi-Agro, A.; Orrenius, S., Ten years of publication in cell death. *Cell death and differentiation* 2004, 11, 2-3.
10. Fadeel, B.; Orrenius, S., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of internal medicine* 2005, 258, 479-517.
11. Shi, Y., Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell* 2002, 9,459-70.
12. Fujitani, Y.; Watada, H., [The cutting-edge of medicine; autophagy in pancreatic beta cell--a novel pathogenic factor in diabetes]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi* 100, 2282-8.
13. Widlak, P.; Garrard, W. T., Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of cellular biochemistry* 2005, 94, 1078-87
14. Kimmelman, A. C., The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 25, 1999-2010.