

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫：楊梅素(myricetin)抑制腫瘤促進因子 ODC 細胞分子機 *
* 名稱：制 *
* *****

執行計畫學生： 李建志
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-030-B
研究期間： 101年07月01日至102年02月28日止，計8個月
指導教授： 劉光耀

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： 中山醫學大學微生物免疫研究所

中華民國 102年03月25日

Abstract

Ornithine decarboxylase (ODC) is the rate-limiting enzyme in polyamine biosynthesis and a target for chemoprevention. Myricetin is a naturally occurring flavonoid has been suggested to play a role in inhibition of proliferation and transformation of carcinogenic cell. However, the underlying molecular mechanisms of its activity have not yet to be revealed. In this paper, we investigated whether myricetin could inhibit the ODC pathway to enhance apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. We found ODC enzyme activity was reduced during myricetin treatment. Overexpression of ODC in HL-60 parental cells could reduce myricetin-induced apoptosis, which leads to the reduction of tumor suppressor protein p53. Furthermore, ODC overexpression protected the activation of caspase-3 following myricetin treatment. The results demonstrated myricetin-induced apoptosis was through a mechanism of down-regulation of ODC and occurred along a p53-dependent mitochondria-mediated pathway.

前言

白血病俗稱血癌，是一種造血組織的惡性腫瘤，成因為造血幹細胞分化異常導致骨髓及全身器官組織充斥白血病細胞，使正常造血功能減少，漸漸產生各種病變。白血病有多種類型，主要區分依據為血液內異常血球細胞之類型，臨床上一般分急性與慢性白血病，其中急性白血病的特徵為未成熟白血球劇增，這些未成熟的白血球一般在骨髓中約佔 5% 以下；此現象使得骨髓無法製造健康的血球細胞，而由未成熟之白血球取代。急性白血病在青少年和兒童中比較普遍。由於惡性細胞的劇增和擴散，因此急性白血病必須立即治療；在不治療的情況下，病人在數月甚至數周內將死亡。據統計，全世界每十萬人中就有二至九人罹患白血病，從嬰兒至老年人皆有；慢性白血病雖可活上數年，但其治療費用及照料的苦心，將是家庭沈重的負擔。近十年來，科學家除了在治療癌症上繼續投入研究外，更積極開發癌症化學預防藥劑 (cancer chemopreventive agents) 策略，找尋具預防癌症特性之天然物及中草藥成分，用以預防人體免於致癌物質的侵犯；其藥劑的類別大約可分為：維生素A酸衍生物、類黃酮、抗氧化劑、癌化作用酵素抑制劑、非類固醇性抗炎劑等。

在天然物成分中，以多酚類化合物為最大的族群，多酚類化合物又可分成類黃酮、酚酸、木質素等，其中又以類黃酮 (Flavonoids) 為最大族群，根據前人研究指出類黃酮具有許多特殊生物活性包括抗發炎、抗癌化、抗病毒、預防腫瘤形成以及預防心血管疾病等功用。食物 (柳橙、番茄、茶、咖啡、可可、紅酒等) 中皆發現含有高量類黃酮；而其他像是槲皮素 (Quercetin)、芸香苷 (Rutin)、山柰酚 (Kaempferol)、橙皮素 (Hesperetin)、芹黃素 (Apigenin) 等皆同屬於類黃酮化合物。楊梅素 (Myricetin) 又稱為楊梅黃酮，為類黃酮中的黃酮醇，可發現於蘋果、漿果、茴香、葡萄、紅酒、核桃等食物中。楊梅素廣泛應用於現今的生活中，並且在許多疾病上具有治癒的功效，於前人文獻中提及與許多癌症之相互作用的機制與抗癌的研究，其中白血病亦是主要研究方向之一。人類急性前骨髓白血病細胞株 (HL-60 Cell) 為一種早期白血球前趨細胞，以懸浮式細胞培養方式於體外培養，廣泛應用於觀察血球生成過程；在處理 Myricetin 後，誘導 HL-60 呈現細胞凋亡 (apoptosis)。活化 caspase-9 和 caspase-3，導致 PARP 的裂解，亦能誘導粒線體膜電位的減少、活性氧 (ROS) 的生產 (Ko et al., 2005)。

鳥胺酸去羧化酶 (Ornithine decarboxylase, ODC) 為多胺類 (polyamine) 合成途徑的起始與速率決定步驟之酵素，此酵素在細胞增殖的調節及腫瘤的生長中扮演重要角色 (Mohan, et al., 1999)。前人研究指出在 ODC 轉殖小鼠的比較實驗中，ODC 酵素活性非正常性的增加與腫瘤誘發形成現象存在正相關性 (Kontusaari, et al., 2001)；細胞接受癌化刺激後，發現 ODC 的活性提高 (Shantz, and Levin, 2007)。但若抑制 ODC 的活性，則可防止細胞轉型，並減緩腫瘤的增生現象 (Auvinen, et al., 1992; O'Brien, 1976)。由此可知，抑制細胞內 ODC 的過量表現應是壓制腫瘤生成的方法之一。

腫瘤增生現象與細胞凋亡受抑制有關，鳥胺酸去羧化酶合成的多胺類參與抑制細胞凋亡的途徑有兩種，一是藉由多胺類增強 NF- κ B (Shah, et al., 1999) 活化 Bcl-xL，而 Bcl-xL 可以阻止粒線體釋放細胞色素 c (cytochrome c)，進而無法活化下游的 caspase-9 及 caspase-3，因此降低誘發細胞凋亡；另一種路徑為多胺類抑制 p53 (Bhattacharya, et al., 2009)，受 p53 影響的 Bax 無法抑制粒線體膜蛋白 Bcl-xL，使得 Bcl-xL 阻止粒線體釋放 cytochrome c 而抑制細胞凋亡。此外，過量之活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 堆積亦會造成 DNA 損害並導致細胞凋亡。而由鳥胺酸去羧化酶催化合成之多胺類，尤其是腐胺 (Putrescine) 可以減少 ROS 的堆積並阻止 cytochrome c 的釋放，抑制細胞凋亡的產生 (Hung, et al., 2005 & Liu, et al., 2005)。因此針對抑制腫瘤促進因子 ODC 來誘發細胞凋亡以達到阻斷或預防癌症的發生被視為重要的策略。

研究目的及方向

本研究探討楊梅素 Myricetin 是否藉由抑制 ODC 而導致 HL-60 細胞凋亡並分析作用機制。研究方向有以下幾點：(1) 純化 ODC 重組蛋白，利用 ODC 酵素活性測定法分析在試管中楊梅素是否抑制 ODC 酵素活性。(2) 比較 HL-60 野生型與 ODC 高度表達之細胞株在楊梅素誘發之細胞凋亡差異：細胞存活分析、Acridine orange 染色法、去氧核糖核酸的片斷化與西方墨點法。

材料與方法

細胞培養與處理

使用人類前骨髓白血球癌母細胞 (Human promyelocytic leukemia HL-60 cell) 細胞株做為研究對象，分別穩定轉染鳥胺酸去羧化酶及其對照組，在含有 10% 的去活性胎牛血清 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 的 RPMI 1640 (Invitrogen) 培養基培養於 37°C 下含 5% 二氧化碳培養箱。

構築表達鳥胺酸去羧化酶載體轉染真核細胞

本研究之基礎在於建立鳥胺酸去羧化酶高度表達之細胞，基因源自於 Hep2 細胞 (人類喉癌上皮細胞)，抽取其 RNA 進行逆轉錄酶聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 得到 cDNA，之後利用設計的引子以便得到鳥胺酸去羧化酶 cDNA，將 PCR 產物進行 0.8% agarose gel 電泳，確定 PCR 產物是否正確，並使用 Viogene gel extraction kit 純化 PCR，將回收的 DNA 溶於水中，接下來先與 pUC-T 載體進行接合作用，轉殖於勝任細胞 (competent cell) 內，鳥胺酸去羧化酶 cDNA 進入 pUC-T 載體後進行藍白篩選細胞株。為了能在真核細胞表現，將鳥胺酸去羧化酶 cDNA 1415bp 用 EcoRI 與 BamHI 限制酶由 pUC-T 載體轉入真核細胞表現載體 (pCMV-Taq 2b-ODC; WT-ODC)。使用磷酸鈣方法將 pCMV-Taq 載體分別轉染入 HL-60，為了穩定性轉染實驗利用 G418 抗性細胞株。穩定性轉染成功之細胞株用逆轉錄酶連鎖反應、西方點墨法及酶活性分析確定鳥胺酸去羧化酶表現。

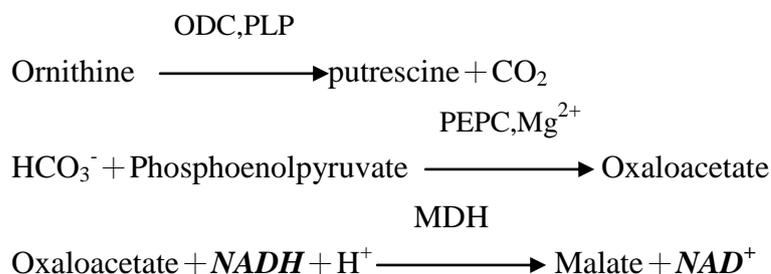
細胞存活分析與 Acridine orange 染色法

培養皿中每毫升用 1×10^6 顆細胞，經處理不同濃度及不同時間後收集並且以一倍濃度 PBS (phosphate buffered saline ;137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4mM KH_2PO_4 和 4.3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 洗滌一次，測定細胞存亡利用 trypsin blue 排除法，trypsin blue 會直接進入死細胞，將死細胞染成藍色，而活細胞因細胞膜完整具選擇性通透性，trypsin blue 會無法通過完整細胞膜，因此活細胞無法被染上顏色；所以把細胞懸浮液先用 0.2% trypsin blue 染色處理後，再來計算沒有被染劑染上的細胞數目，計算細胞存活率。細胞懸浮液與等量的 acridine orange 溶液 (10ul/ml PBS) 混合均勻，放在玻片上並蓋上蓋玻片，利用綠色螢光 (500-525nm) 於正立螢光顯微鏡 (Axioskop 2 plus microscope; Zeiss) 下觀察外形是否具有細胞凋亡之特徵如染色質濃縮及凋亡小體的產生並照相存檔。

蛋白質活性分析 ODC

進行催化反應後會得到兩個產物，分別為腐胺與二氧化碳。腐胺的定量必須經過繁複程序以達到呈色效果，並不適合使用於酵素動力學的連續性分析。而若

是利用放射性標定的方式觀察二氧化碳的變化也無法進行連續性分析。參考過去有學者串連 Phosphoenol pyruvate decarboxylase (PEPC) 及 Malate dehydrogenase (MDH) 兩個酵素參與的催化反應以進行定量 (Balbo et al., 2003) 而得以分析這類去羧化酵素在 Steady-state 下的酵素活性。其反應式如下：



藉由測量 NADH 轉變為 NAD 時吸光值的變化，就可得知反應時有多少的二氧化碳產生，在化學反應式中二氧化碳和 NADH 的莫耳數比恰為 1:1 所以只要後面兩個反應的速率夠快就可以將訊號直接當作 ODC 的活性表示。

本實驗所採用的試劑組為 carbon dioxide-L3K assay kit (Diagnostic Chemical Limited)。試劑中有緩衝溶液 pH=7.5、12.5mM phosphoenolpyruvate、>400U/L PEPC (microbial)、>4100 U/L MDH (mammalian)、0.6mM NADH analog、活化劑、穩定劑、界面活性劑及防腐劑。取 400ul kit buffer，額外加入 100ul 的分析樣品使其內含 20uM PLP 及 10mM 的受質 ornithine。固定 ODC 濃度為 0.02ug/ul，在 ODC 催化反應的溶液中分別加入不同種類不同濃度的藥品再進行 ODC 反應活性分析，分析時以光波長 405nm 進行測定。生成 1 莫耳的二氧化碳可讓 1 莫耳的 NADH analog 氧化成 NAD，吸光值將會隨著時間逐漸下降，擷取並計算吸光變化曲線的斜率，以正常反應的 ODC 當做對照組，定為活性 100%，計算出 ODC 受不同種類不同濃度的藥品抑制後的相對百分比。之後計算數據使用 sigma Plot 10.0 軟體進行分析，在利用下列的 IC₅₀ 方程式進行回歸計算：

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + ([\text{Drug}] / \text{IC}_{50})^{\text{Hillslope}})$$

Min 是最小值，Max 為最大值，Hillslope 為曲線最大斜率的絕對值，Y 是 ODC 相對的酵素活性；IC₅₀ 代表抑制到百分之五十所需的抑制藥物的濃度。

去氧核糖核酸的片段化

細胞處理後，收集 5×10^6 顆細胞進行分析。細胞用一倍濃度 PBS 洗滌一次，1000×g 離心取得沉澱的細胞，加入 50ul 標凋亡 DNA ladder 溶解性溶液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA 和 0.5% Sarkosyl) 和 5ul 蛋白分解酶 K (0.5mg/ml)

後，放56°C水浴，隔夜再加入1ul RNase A (5ug/ml) 反應兩小時，之後萃取去氧核糖核酸加入等量的 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)混合均勻後，以12000×g離心十分鐘，將上清液加上DNA loading溶液 (10x;20%Ficoll 400,0.1M Na₂EDTA,1%SDS,0.25%bromophenol blue和 0.25% xylene cyanol)，使用2% agarose 以五十伏特進行電泳分析。

比較楊梅素處理 HL-60 cell wild type 與 ODC 高度表達之細胞株誘發的細胞凋亡現象

構築表達鳥胺酸去羧化酶載體 (pCMV-Taq 2b-ODC,WT-ODC) 並利用磷酸鈣轉染方法將表達載體轉染進入 HL-60 細胞，為了穩定性轉染，利用 G418 篩選獲得抗性細胞株。穩定性轉染成功之細胞株用逆轉錄酶連鎖反應、西方點墨法及酶活性分析確定鳥胺酸去羧化酶表現。穩定轉染鳥胺酸去羧化酶及其對照組，在含有10%的去活性胎牛血清之 RPMI 1640 培養基培養於 37°C 下含 5% 的二氧化碳培養箱。

將轉染鳥胺酸去羧化酶之實驗組與其對照組於細胞穩定培養過程中添加楊梅素，分析細胞凋亡現象。利用 trypan blue 排除法配合血球記數盤測定細胞存活率，而 Acridine orange 染色法搭配螢光顯微鏡觀察綠色螢光 (500-525 nm) 呈像，細胞核產生濃縮則可判斷為細胞凋亡的定性依據並照相存檔。收集細胞利用萃取與電泳法觀察去氧核糖核酸的片斷化現象。利用西方墨點法分析細胞凋亡之標誌蛋白 (cytochrome c、caspase-9、caspase-3 與 PARP等...) 含量，並比較兩組間相對差異。

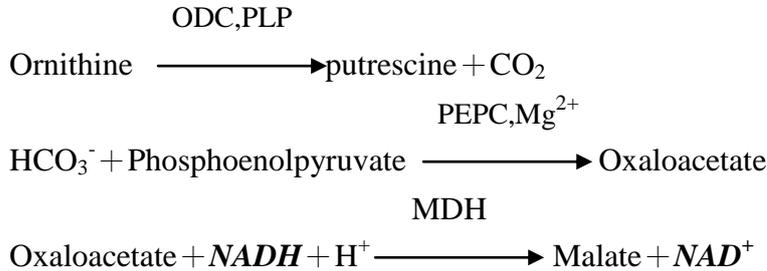
西方墨點法

細胞經過冰的PBS洗滌後，加入50µl的lysis溶液後 (10% v/v glycerol,1% v/v Triton X-100,1 mM sodium orthovanadate,1 mM EGTA,10 mM NaF,1 Mm sodium pyrophosphate,20 mM Tris,pH 7.9,100µM β-glycerophosphate,137 mM NaCl,5 mM EDTA,1 Mm PMSF,10 µg/ml aprotinin and 10 µg/ml leupeptin)，靜置冰上三十分鐘，接著12,000×g離心二十分鐘後吸取上清液，加入6X sample dye於上清液中，同時95°C加熱十分鐘，取其混合溶液於8% SDS-polyacrylamide gel中進行電泳，然後轉漬到polyvinylidene fluoride (PVDF)，使用含有0.1% Tween 20及5% 脫脂牛奶的PBS溶液填塞多餘的空間一個小時後，用只含有0.1% Tween 20的PBS溶液洗滌三次，將第一個抗體加進並且反應六小時，再用含有0.1% Tween 20的PBS溶液洗滌三次，接下來用有標定horseradish peroxidase (HRP)之第二個抗體作用一個小時，用含有0.1% Tween 20的PBS溶液洗滌三次後，抗體與抗原複合物利用增強化學冷光法測定 (ECL detection system;Amersham)。

結果

楊梅素抑制鳥胺酸去羧化酶之 IN VITRO 酵素活性

ODC 酵素催化反應式如下：



當後面兩個反應的反應速率比 ODC 催化反應快時，就能藉由測量 NADH 轉變為 NAD 時吸光值的變化當作 ODC 活性反應速率的指標。固定酵素 ODC、輔因子 PLP 及受質 Ornithine 的濃度，並加入不同濃度楊梅素的濃度進行對 ODC 酵素活性影響的觀察實驗。當藥物濃度遞增時，405nm 吸光曲線的斜率的呈現遞減的現象，說明了 Myricetin 抑制 ODC 的催化反應，隨著 Myricetin 濃度遞增，ODC 反應的速率則遞減。計算出 IC_{50} ，代表抑制 ODC 酵素到百分之五十所需的 Myricetin 的濃度，其為 12 μM ，更高濃度的藥量並不會繼續降低 ODC 的活性，在大約 40% 時已經到達一個穩定的飽和水平。

楊梅素誘導 HL60 細胞株凋亡

過去已有研究指出楊梅素能使白血病骨髓細胞 HL60 細胞凋亡。實驗結果證實 HL60 在處理楊梅素後會造成細胞凋亡現象，與前人的研究相符。為了測試楊梅素使用的最適合劑量以及處理時間，將 HL60 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 用楊梅素處以不同劑量 (fig.2) 及時間點 (fig.3)，結果顯示以楊梅素 $75 \mu\text{M}$ 處理 12 小時後所造成細胞核酸片段化的情形最明顯，而核酸片段化代表細胞正在進行計畫性死亡，即凋亡效果最為顯著。

ODC 高度表達之 HL60 細胞株可對抗楊梅素所造成的細胞凋亡

將轉染高度表現 ODC 之 pCMV-2B 質體的 HL60 (稱為 pCMV-Taq 2b-ODC, WT-ODC) 以及轉染點突變 pCMV-2A 質體的 HL60 (稱為 mODC)，兩者與正常 HL60 一起進行加藥實驗，條件即為以楊梅素 $75 \mu\text{M}$ 處理 12 小時，並比較三者間的差異。mODC 由於轉染的質體為點突變質體，故不具有大量表現 ODC 的能力，其 ODC 表現量理論上應與正常 HL60 相同，目的在於確定轉染的過程中不會對 HL60 的生理狀態造成影響，作為 WT-ODC 的對照組。加藥結果顯示

WT-ODC 的核酸片段化現象比起 HL60，顯得很不清晰，證明了 WT-ODC 能夠有效地對抗由楊梅素所引發的細胞凋亡機制，且 mODC 的凋亡情形與 HL60 相似，更證實了楊梅素所造成的細胞凋亡與 ODC 的存在有相當大的關聯 (fig.4)。

楊梅素藉由抑制 ODC 所影響之 p53 路徑所導致的細胞凋亡機制探討

在我所屬的實驗室，過去已有研究指出 ODC 會藉由抑制 p53 進而阻止下游的細胞凋亡機制 (fig.6)。若楊梅素確實會對 ODC 造成抑制進而引發細胞凋亡，則藉由 p53 這條路徑來引發的機會很高。因此將 HL60、mODC、WT-ODC 三個細胞株以楊梅素 75 μ M 處理 12 小時後，離心收集細胞並加入 Golden Lysis Buffer (GLY) 破細胞，經由高速離心收集細胞內的 total protein 來執行 SDS-PAGE，觀察並比較 p53 下游調控因子的相對變化量。Bax 為促凋亡因子，Apaf-1 與 cytochrome C 和 caspase-9 合稱為 apoptosome，Apaf-1 表現量上升表示細胞受到促死刺激，進而切割活化 caspase-9 與 caspase-3。而結果可觀察到在 HL60 及 mODC 中 Bax 與 Apaf-1 在加藥後都有增加的趨勢，且 caspase-9、caspase-3 在加藥後都有受到裁切。反觀 WT-ODC 無論加藥與否，上述因子都維持不變 (fig.5)。

討論

細胞凋亡是細胞生理的重要機制之一，當細胞受到病原感染、DNA 發生突變或損害時，生物體內即進行細胞凋亡。當此機制發生問題時，受損的細胞不會被分解，使細胞癌化形成腫瘤；因此細胞凋亡在人體疾病形成上扮演極重要的角色。細胞凋亡的調控分為兩種途徑：(一) 經死亡接受器傳遞死亡訊息的途徑（外因式途徑），例如：CD95 (Fas)、TNFR1 (TNF receptor-1) 和 TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)。此種路徑是指細胞膜表面存在著接受死亡訊息的受器，細胞接受死亡訊息以引發細胞凋亡，當死亡接受器的 ligand 與死亡受器結合之後，便可活化位於細胞膜下的死亡區域 (Death domain，例如 FADD) 使得 procaspase-8 被切割成 caspase-8，活化後的 caspase-8 可以促進其他 caspases 的活化，進入經粒線體途徑的細胞凋亡，從而執行細胞凋亡的指令。(二) 與粒線體相關的死亡途徑（內因式途徑），與 Bcl-2 家族有關 (Bcl-2 家族分為兩類，一類是抗凋亡的 anti-apoptotic，如：Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1；一類是促進凋亡的 pro-apoptotic，如：Bax、Bak、Bad、Bid、Bim)，並且與 cytochrome c 釋放有關。

凋亡誘導因素也會通過信號傳導通路啟動凋亡基因，細胞即按死亡程式逐步走向細胞凋亡。例如：p53 是一個抑癌基因，具有促進細胞凋亡的功能。p53 在細胞週期的 G₁ 期發揮監視的功能。若修復失敗則啟動細胞凋亡機制誘導細胞凋亡。p53 基因發生突變後反而會抑制細胞凋亡，這是由於突變型 p53 失去了對細胞的監視作用，使帶有 DNA 損傷的細胞進入 S 期，使這些細胞產生突變和染色體畸變，最後引起細胞癌變。在 TNF- α 所引發的細胞凋亡中，伴隨著 ROS 的增加及粒線體膜電位的下降，之後使用不同活性氧的清除劑 (Scavenger) 如觸酶 (catalase)、N-acetylation、glutathione (GSH) 等來對抗 TNF- α 所誘發的細胞凋亡，證實與 TNF- α 相關的細胞凋亡路徑中，過量之 ROS 堆積也是細胞凋亡的原因之一。而鳥胺酸去羧化酶能夠產生多胺類可以減少 ROS 的堆積並阻止 cytochrome c 的釋放，以防止細胞凋亡的產生 (Liu, et al., 2005)。

腫瘤治療過程中，引發腫瘤細胞死亡是其中一種方法。科學家尋找有效抗癌藥物利用對鳥胺酸去羧化酶抑制效用當作評估，並且鳥胺酸去羧化酶也是一種腫瘤進展的標籤 (Sharma, et al., 1994)。抑制 ODC 的活性被視為抑制癌症的標靶機制 (Pegg, et al., 1988)。

本研究證實了楊梅素對於人類白血病骨髓細胞 HL60 的促凋亡功效，並確定楊梅素對 HL60 的抑制作用是藉由抑制 ODC 所引發。進一步探討了與 ODC 相關的抗凋亡機轉後，發現楊梅素透過抑制 ODC 阻止 ODC 對於抑癌因子 p53 的抑制，從而啟動 p53 下游調控的細胞凋亡機轉。綜合上述，可將楊梅素視為相當有潛力的 ODC 抑制劑。而楊梅素對於細胞週期停滯、ROS 堆積以及粒線體膜電位的影響還尚待研究釐清。

圖表

Figure 1

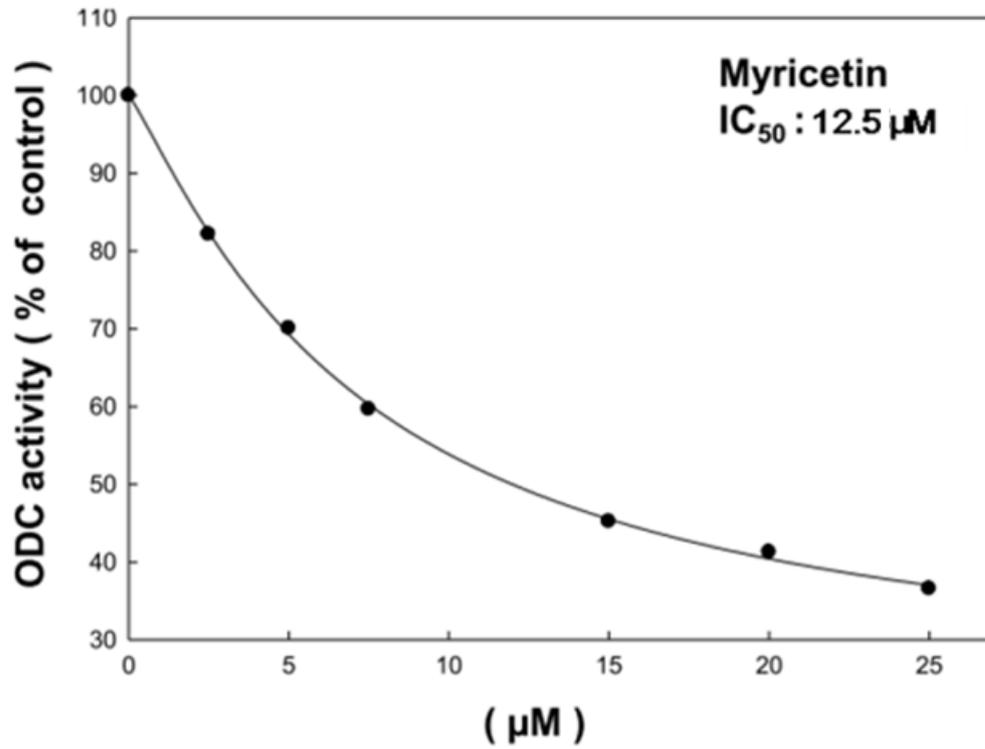
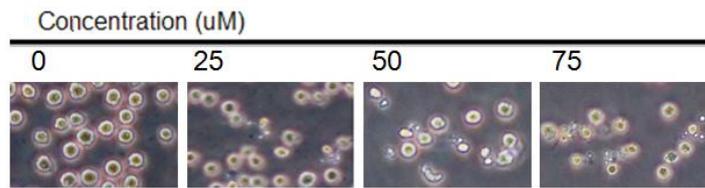


Fig. 1 楊梅素 (Myricetin) 抑制 ODC 的活性

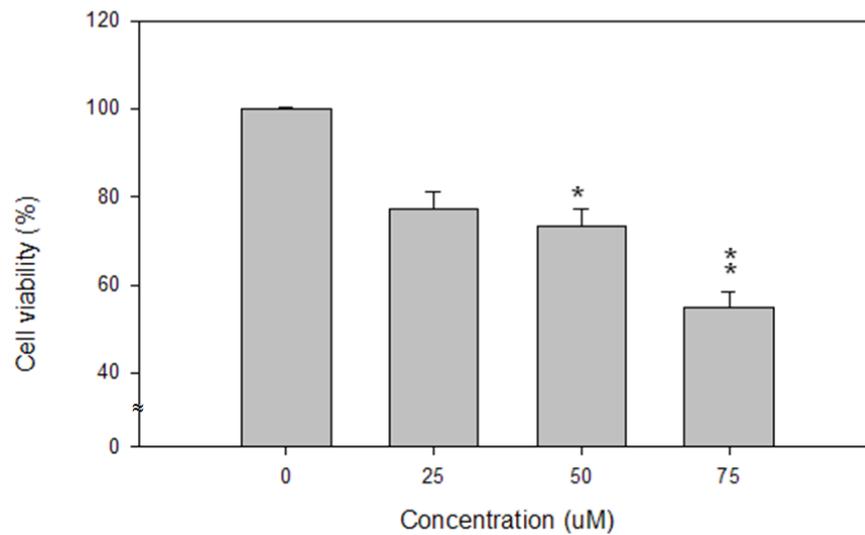
以不同劑量的楊梅素執行 ODC 的活性分析，畫出濃度對活性的標準曲線並推算得知 IC₅₀。

Figure 2

A.



B.



C.

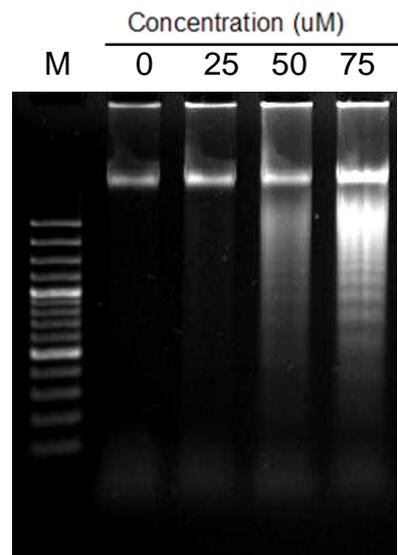
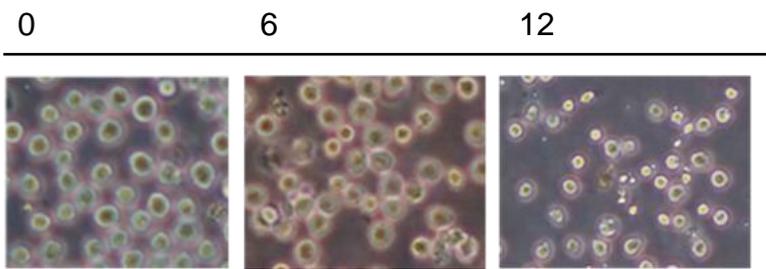


Fig.2 楊梅素 (Myricetin) 促進白血病骨髓細胞 HL60 凋亡現象

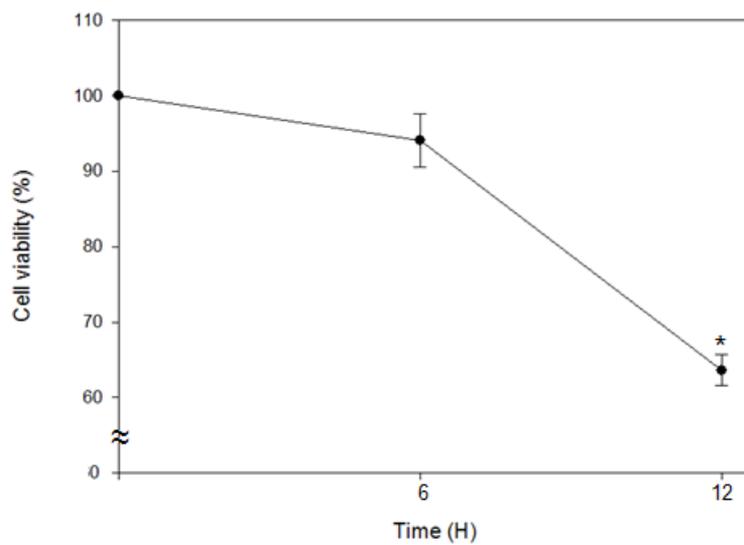
(A) HL60 分別以楊梅素 0, 25, 50, 75 μ M 處理後放置 12 小時並拍照 (B) 不同濃度放置 12 小時後細胞計數的生存率直方圖 (C) 不同濃度放置 12 小時後抽取 DNA 片段的電泳圖。

Figure 3

A. Time (H)



B.



C.

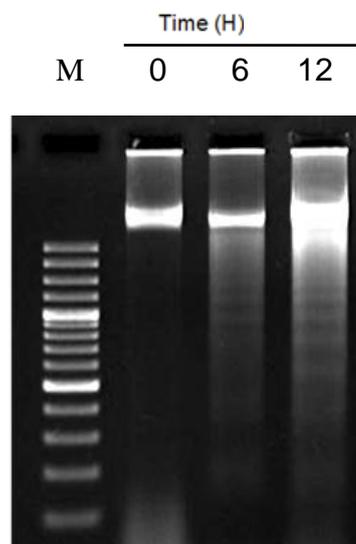
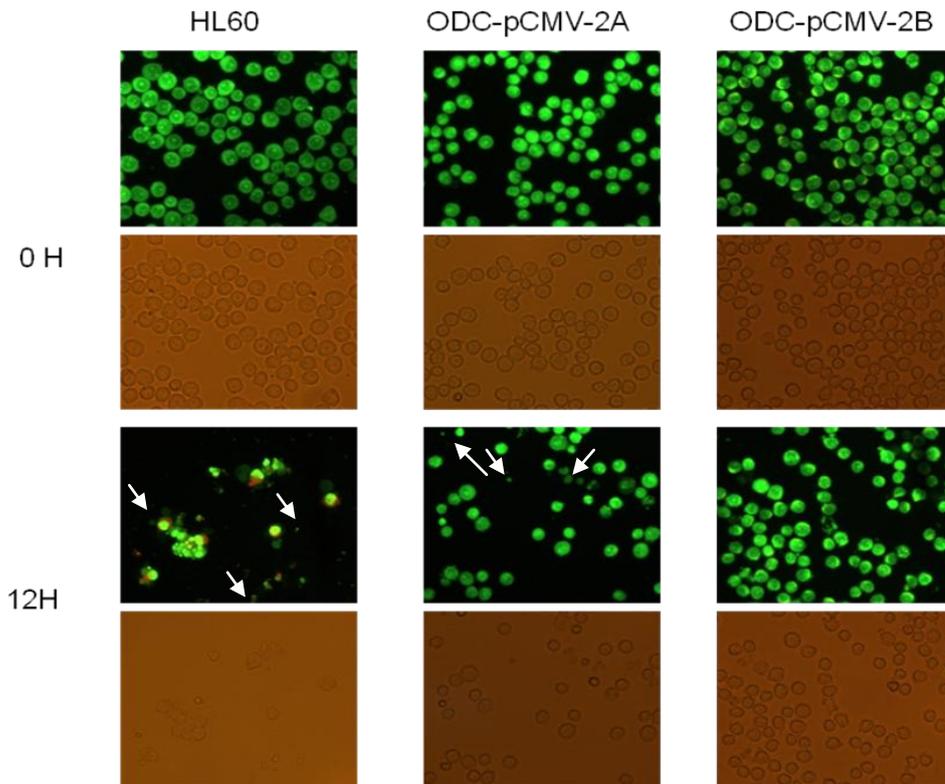


Fig. 3 楊梅素 (Myricetin) 促進白血病骨髓細胞 HL60 凋亡現象。

(A) HL60 以楊梅素 75 μ M 處理後在 0, 6, 12 小時三個時間點拍照 (B) 75 μ M 不同時間點細胞存活率折線圖 (C) 75 μ M 不同時間點抽取 DNA 片段的電泳圖。

Figure 4

A.



B.

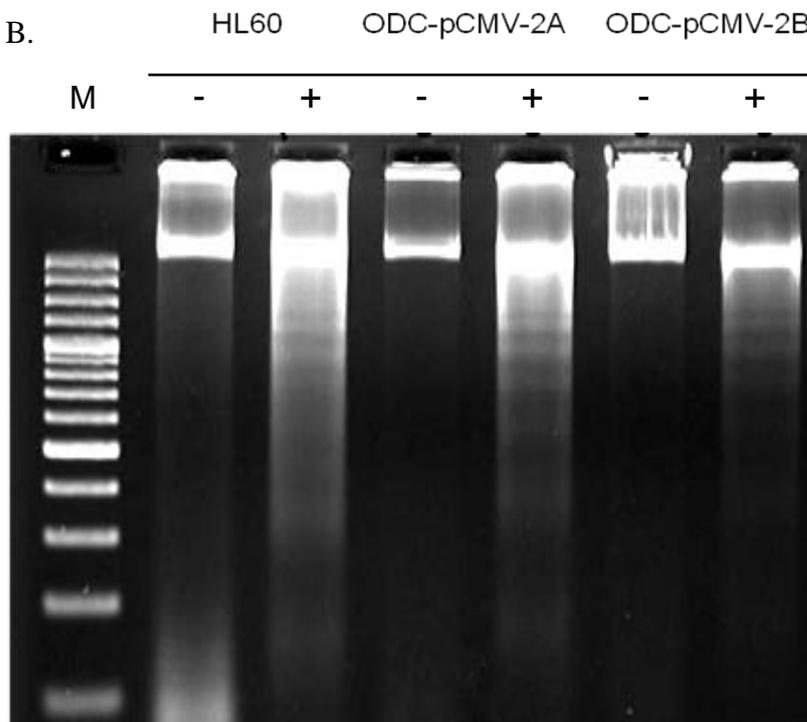


Fig. 4 ODC 過度表現可以減緩由楊梅素所引發的細胞凋亡現象。將 HL60 轉染 ODC-pCMV -2B 質體，使 HL60 大量表現 ODC。另外再將不會表現 ODC 的點

突變質體 ODC-pCMV -2A 轉染 HL60 作為對照組，與 HL60 比較。

(A)三種細胞株在以楊梅素 75 μ M 處理 12 小時後的 AO 染色。(白色箭頭指向形態改變的細胞)(B) 三種細胞株在以楊梅素 75 μ M 處理 12 小時後抽取 DNA 片段的電泳圖。

Figure 5.

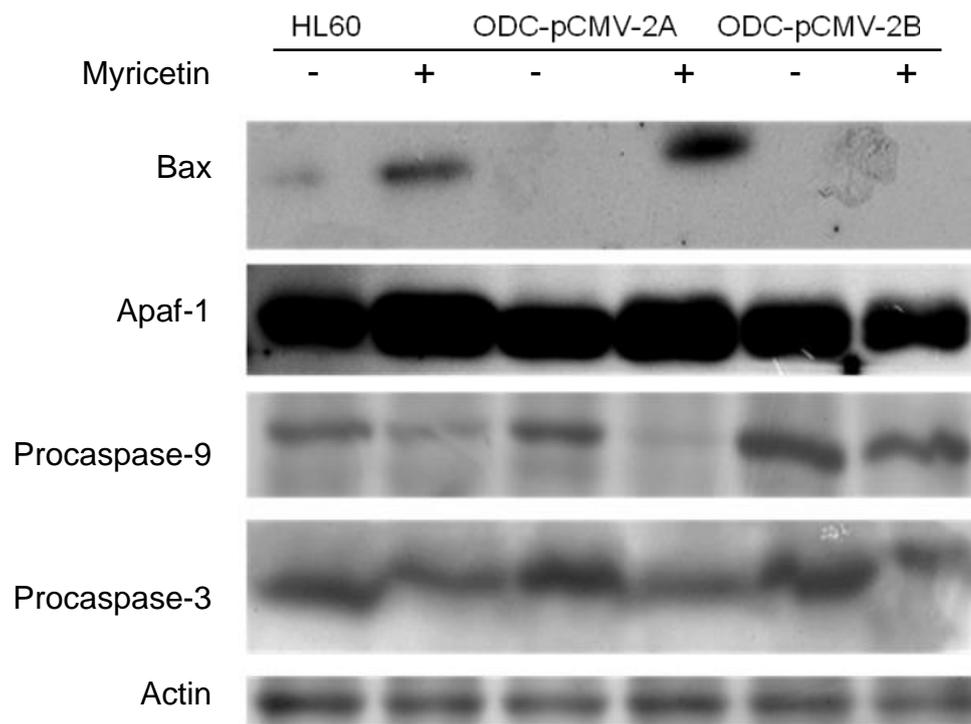


Fig. 5 楊梅素 (Myricetin) 抑制 ODC 所影響的 p53 下游路徑。
三種細胞株在以楊梅素 75 μ M 處理 12 小時後執行西方點墨法。

Figure 6

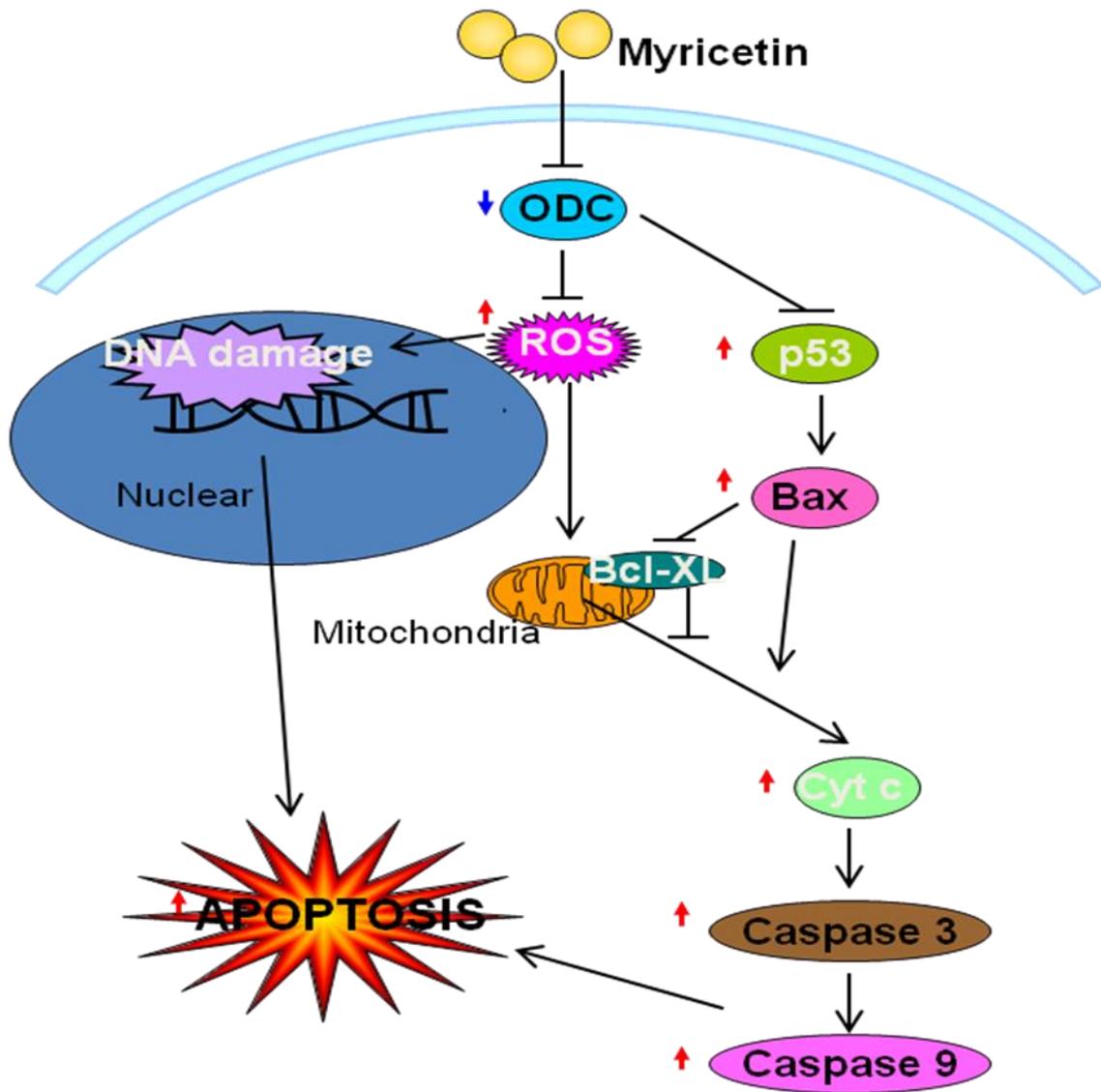


Fig. 6 楊梅素 (Myricetin) 抑制 ODC 導致細胞凋亡機制圖

參考文獻

Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L.C., & Holtta, E. (1992): Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature*. 360, 355-358.

Balasundaram, D. & Tyagi, A.K. (1991). Polyamine-DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol Cell Biochem*. 100, 129-140.

Bhattacharya, S., Ray, R.M., & Johnson, L.R. (2009). Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Signal*. 21, 509-522.

Chen, V., Staub, R.E., Baggett, S., Chimmani, R, Tagliaferri, M., Cohen, I., & Shtivelman, E(2012). Identification and analysis of the active phytochemicals from the anti-cancer botanical extract bezielle. *PLoS One*. 7(1), e30107.

Giardiello, F.M., Hamilton, S.R., Hylind, L.M., Yang, V.W., Tamez, P., & Casero, R.A. (1997). Ornithine decarboxylase and polyamines in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*. 15, 57(2),199-201.

Huang, C.C., Hsu, P.C., Hung, Y.C., Liao, Y.F., Liu, C.C., Hour, C.T., Kao, M.C., Tsay, G.J., Hung, H.C., & Liu, G.Y. (2005). Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production. *Apoptosis*. 10, 895-907.

Kandil, F.E, Smith, M.A, Rogers, R.B, Pépin, M.F, Song, L.L, Pezzuto, J.M, & Seigler, D.S(2002). Composition of a chemopreventive proanthocyanidin-rich fraction from cranberry fruits responsible for the inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity. *J Agric Food Chem*.27, 50(5), 1063-1069.

Kilpeläinen, P.T., Saarimies, J., Kontusaari, S.I., Järvinen, M.J., Soler, A.P., Kallioinen, M.J. & Hietala, O.A. (2001). Abnormal ornithine decarboxylase activity in transgenic mice increases tumor formation and infertility. *Int J Biochem Cell*. 33,

507-520.

Ko, C.H., Shen, S.C., Hsu, C.S., & Chen, Y.C. (2005). Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade. *Biochem. Pharmacol.*, 69, 913-927.

Liu, G.Y., Hung, Y.C., Hsu, P.C., Liao, Y.F., Chang, W.H., Tsay, G.J., & Hung, H.C. (2005). Ornithine decarboxylase prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by decreasing intracellular reactive oxygen species. *Apoptosis*. 10, 569-581.

Mangold, U. & Leberer, E. (2005). Regulation of all members of the antizyme family by antizyme inhibitor. *Biochem J.* 385, 21-28.

Manni, A., Mauger, D., Gimotty, P., & Badger, B. (1996). Prognostic influence on survival of Increased ornithine decarboxylase activity in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2(11),1901-1906.

Mohan, R.R., Challa, A., Gupta, S., Bostwick, D.C., Ahmad, N., Agarwal, R., Marengo, S.R., Amini, S.B., Paras, F., MacLennan, G.T., Resnick, M.I., & Mukhtar, H. (1999). Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans. *Clin. Cancer Res.* 5, 143-147.

Nemoto, T., Kamei, S., Seyama, Y., & Kubota, S. (2001). p53 independent G(1) arrest induced by DL-alpha-difluoromethylornithine. *Biochem Biophys Res Commun.* 280, 848-854.

O'Brien, T.G. (1976). The induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly obligatory, event in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 36, 2644-2653.

Park, J.K., Chung, Y.M., Kang, S., Kim, J.U., Kim, Y.T., Kim, H.J., Kim, Y.H., Kim, J.S., & Yoo, Y.D. (2002). c-Myc exerts a protective function through ornithine decarboxylase against cellular insults. *Mol Pharmacol.* 62, 1400-1408.

Pegg, A.E., Madhubala, R., Kameji, T., & Bergeron, R.J. (1988). Control of ornithine decarboxylase activity in alpha-difluoromethylornithine-resistant L1210 cells by polyamines and synthetic analogues. *J Biol Chem.* 5;263(22), 11008-11014.

Ploszaj, T., Motyl, T., Zimowska, W., Skierski, J. & Zwierzchowski, L. (2000). Inhibition of ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine induces apoptosis of HC11 mouse mammary epithelial cells. *Amino Acids.*19, 483-496.

Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P., & Pegg, A.E. (1992). Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J Biol Chem.* 267, 150-158.

Shah, N., Thomas, T., Shirahata, A., Sigal, L.H., & Thomas, T.J. (1999). Activation of nuclear factor κ B by polyamines in breast cancer cells. *Biochemistry.* 38, 14763–14774.

Shantz, L.M. & Levin, V.A. (2007). Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. *Amino Acids.* 33, 213-223.

Sharma, S., Stutzman, J.D., Kelloff, G.J., & Steele, V.E. (1994). Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 54, 5848-5855.

Zou, C., Vlastos, A.T., Yang, L., Wang, J., Nishioka, K., & Follen, M. (2002). Effects

of difluoromethylornithine on growth inhibition and apoptosis in human cervical epithelial and cancerous cell lines. *Gynecol Oncol.* 85, 266-273.