

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 探討沒食子酸及其衍生物誘發抗藥性肺癌細胞死亡的機轉 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 99-2320-B-040-008-  
執行期間：99年08月01日至100年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：吳俊錡

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳詠晴

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

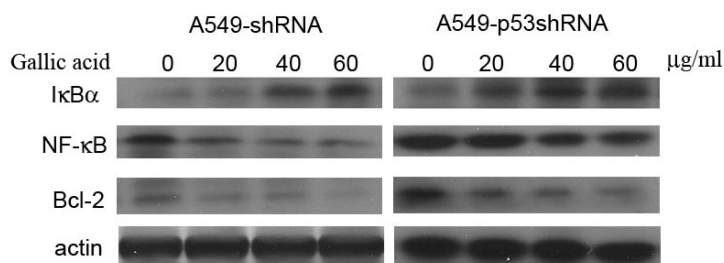
中華民國 100 年 09 月 30 日

## 分析沒食子酸促進 A549-shRNA 與 A549-p53shRNA 肺癌細胞死亡的關鍵蛋白

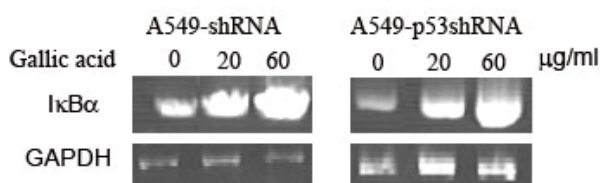
### 結果

一、沒食子酸可以誘發野生型與 p53 致弱表現的 A549 肺癌細胞株內 I $\kappa$ B $\alpha$  表現量的增加與 NF- $\kappa$ B 的減少，並進而減弱 Bcl-2 等分子的表現。

我們先前的實驗結果顯示了沒食子酸的處理可以誘發 A549 細胞株的死亡（野生與 p53 致弱型，A549-shRNA 與 A549-p53shRNA），進一步的分析其內部關鍵分子的表現，結果顯示了沒食子酸會誘發 I $\kappa$ B $\alpha$  表現量的增加與 NF- $\kappa$ B 的減少（圖一 a）。而 NF- $\kappa$ B 其下游對抗程式化死亡的標的性基因 Bcl-2 表現也有同時減少的現象（圖一 a）。有趣的是我們發現到的在野生型 A549 細胞中 NF- $\kappa$ B 與 Bcl-2 的減少的速度遠大於 p53 致弱型的 A549 細胞株，這可能是由於在 p53 致弱型細胞中 A549 細胞株中舉有較穩定的 NF- $\kappa$ B 所導致[1]，進一步的分析 I $\kappa$ B $\alpha$  的 mRNA 表現量，結果顯示了沒食子酸可以有效的增加 I $\kappa$ B $\alpha$  的 mRNA 表現量（圖一 b），由此可知沒食子酸是以一種增加蛋白重新合成的方式來誘發 I $\kappa$ B $\alpha$  量的增加，並進而增加其與 NF- $\kappa$ B 的結合比例並加速 NF- $\kappa$ B 的降解速率，而這也可能是導致 Bcl-2 減少的可能原因之一。同時，雖然在 p53 表現致弱型的 A549 細胞株中具有較低量的 I $\kappa$ B $\alpha$  與較多核型 NF- $\kappa$ B 的存在，對於沒食子酸的抗性與野生型比較起有著較好的存活率，由此可知，NF- $\kappa$ B 或為肺癌細胞中對抗藥物毒性的一個指標性分子。



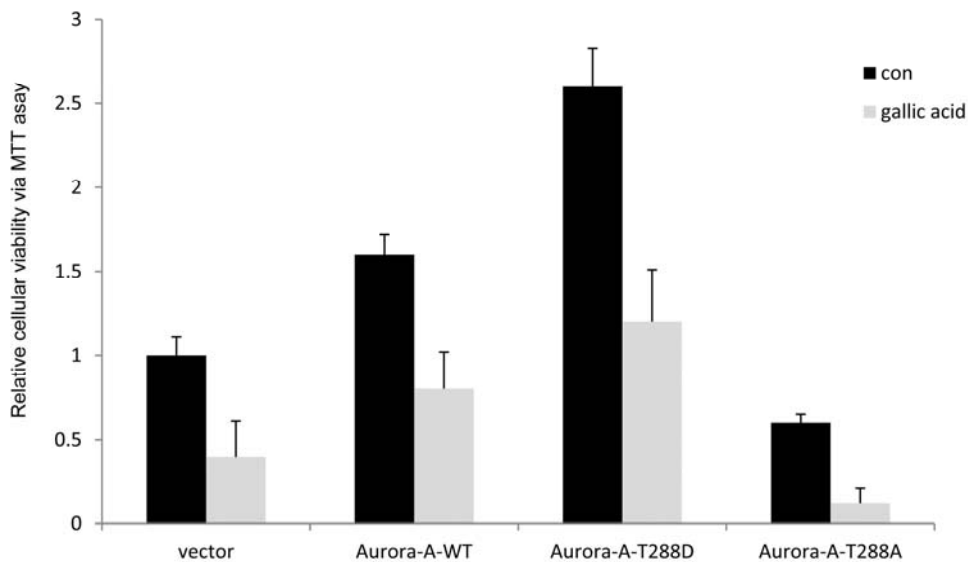
圖一 a、沒食子酸誘發 A549 肺癌細胞株中（野生型或 p53 致弱表現型）NF- $\kappa$ B 路徑表現量或活性的變化。



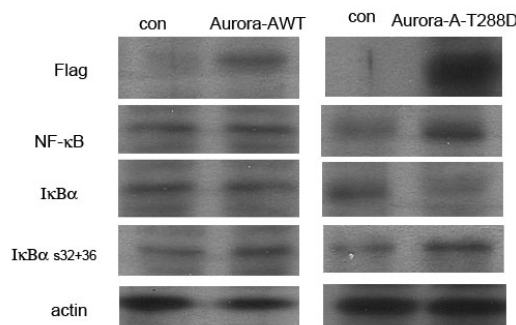
圖一 b、沒食子酸誘發 A549 肺癌細胞株中（野生型或 p53 致弱表現型）I $\kappa$ B $\alpha$  分子 mRNA 的增加。

二、外源性表達 Aurora-A 基因可增加 A549 肺腺癌細胞對於沒食子酸的抗性。

我們先前的研究顯示了 Aurora-A 參與了對 Gefitinib 的抗性 [1]，其機轉是透過增加 NF- $\kappa$ B 的總表現量與核表現型，因此，在此實驗中我們亦測試了改變 Aurora-A 的活性表現量對於 A549 肺癌細胞株對抗沒食子酸的影響。結果顯示了外源性表達持續性活化的 (T288D) 可以比野生型 (wild type) 之 Aurora-A 提供 A549 肺癌細胞株有更多的抗沒食子酸所誘發細胞死亡的功能 (圖二 a)。而且分析細胞內部關鍵分子的表現也顯示了 I $\kappa$ B $\alpha$  的減少與 NF- $\kappa$ B 的增加等現象 (圖二 b)。而 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化在 Aurora-A-T288D 轉染組中亦有明顯增加的趨勢 (圖二 b)。這顯示了 Aurora-A-T288D 可以有效的促進 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解。在另一方面，我們亦將 A549-p53shRNA 肺癌細胞株的內源性 Aurora-A 以 siRNA 的方法致弱其表現，結果顯示 A549-p53 shRNA 對於沒食子酸的抗性會急劇的降低，這結果顯示了 Aurora-A 具有增加肺癌細胞株 A549 對於沒食子酸能力，同時我們亦偵測到 I $\kappa$ B $\alpha$  的增加與 NF- $\kappa$ B 的減少情況 (圖二 c)。因此經些實驗我們瞭解到 NF- $\kappa$ B 路徑為細胞內部對抗外界毒性物質致死反應的重要媒介之一。

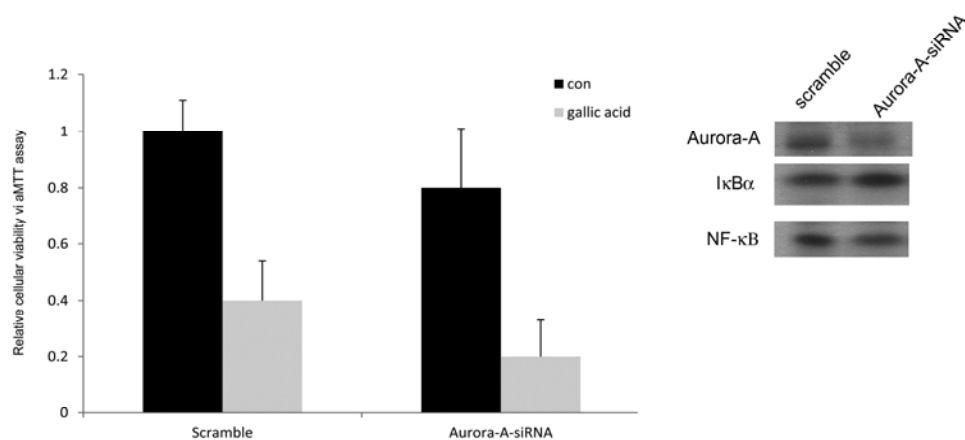


圖二 a、沒食子酸誘發表現不同活性 Aurora-A 基因之 A549 肺癌細胞株中死亡的程度。



圖二 b、外源性表達野生型或活化型 Aurora-A 於 A549 肺癌細胞株中對於 NF- $\kappa$ B

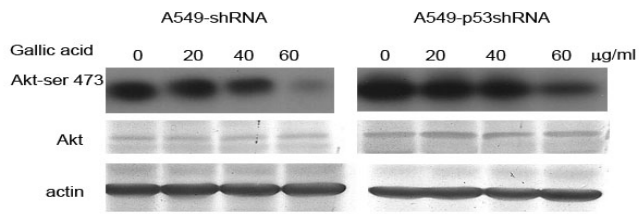
## 路徑分子的影響



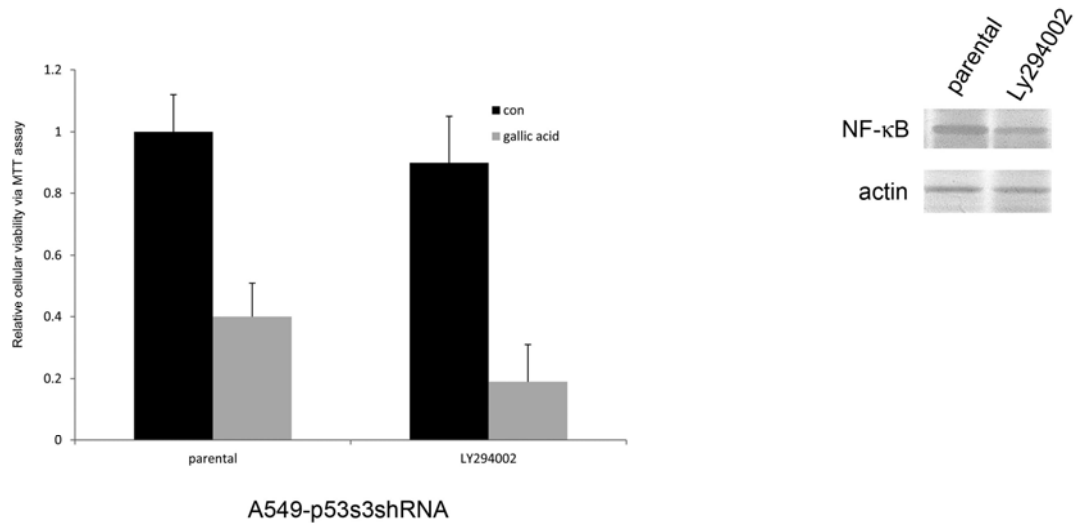
圖二 c、在 A549-p53shRNA 細胞株中致弱 Aurora-A 表現減弱了細胞株對於沒食子酸的抗性與 NF- $\kappa$ B 路徑分子的活性。

### 三、加入 Akt 抑制劑可更有效的促進沒食子酸抑制野生型與 p53 致弱表現

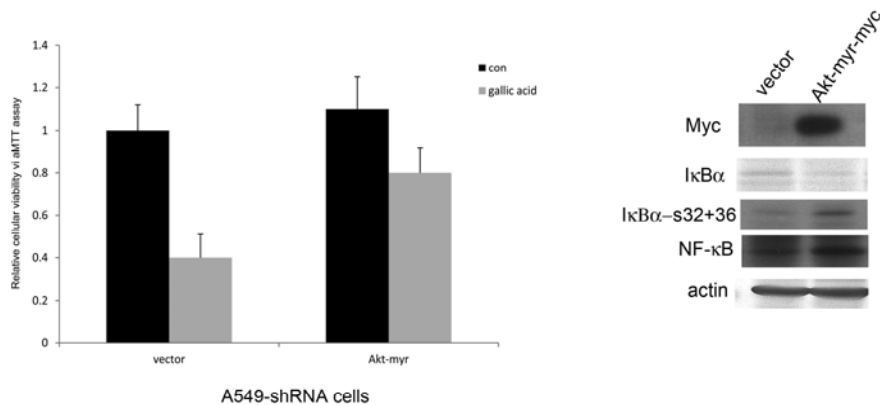
**A549 細胞株其內部 NF- $\kappa$ B 路徑的活化及誘發與提高細胞死亡率。** Akt 為維持細胞存活對抗細胞程式化死亡訊號傳遞之重要關鍵分子，接下來，我們進一步的瞭解 Akt 分子在沒食子酸誘發肺癌細胞死亡中所扮演的角色，實驗結果發現，沒食子酸處理會同時降低野生型與 p53 致弱表現的 A549 肺癌細胞株的 Akt Ser473 磷酸化現象，而且是劑量依賴性的存在（圖三 a）。在 p53 致弱表現 A549 細胞株中其 Akt 磷酸化減少的現象是要比野生型的 A549 細胞來得慢，為瞭解 Akt 活性的變化是否與細胞的死亡有直接關連性，我們將 Akt 抑制劑 LY294002 預處理細胞之後，再加入不同劑量之沒食子酸，結果顯示加入抑制劑的 A549 肺癌細胞株（野生與 p53 致弱表現）對於沒食子酸的毒性更為敏感。同時，細胞內部 NF- $\kappa$ B 路徑的活性亦快速減弱（圖三 b）。相反的，如預先轉染持續活化型的 Akt-my $\mu$ r 進入兩種細胞株中，則能有效的延長在處理沒食子酸之後細胞存活的時間與比例（圖三 c）與較明顯的 NF- $\kappa$ B 活化現象。這些結果與在 Aurora-A 所看到現象是類似的，也顯示了在肺癌細胞中某些關鍵分子的表現量或是活性的多寡，會決定了細胞對於外界藥物的反應能力，也因此對於這些分子表現量或是活性增加的原因也就值得去加以探討。



圖三 a、沒食子酸同時誘發野生型與 p53 致弱表現之 A549 肺癌細胞株中 Akt 在 ser-473 的磷酸化。

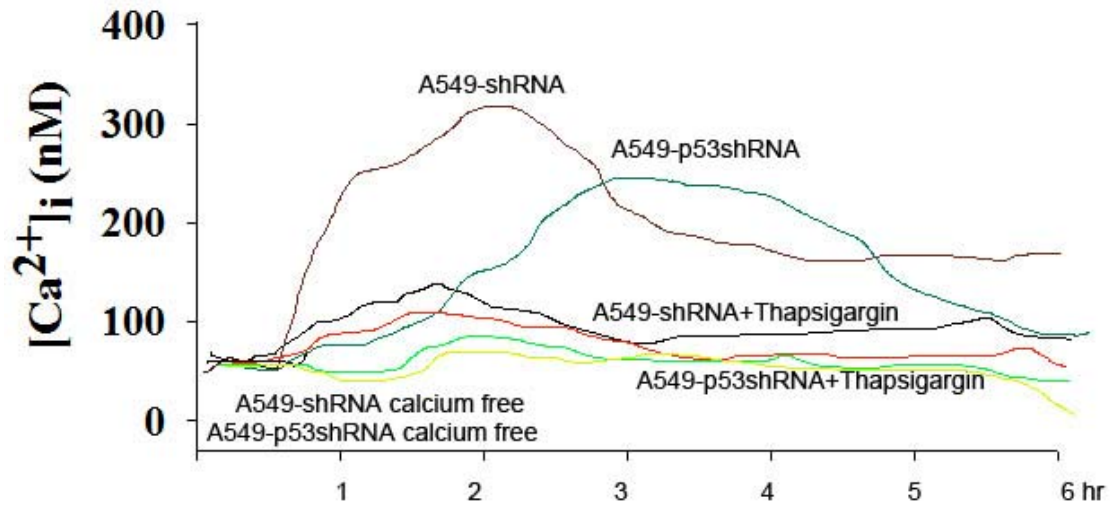


圖三 b、加入 Akt 抑制劑會減弱 NF- $\kappa$ B 表現與 p53 表現致弱型 A549 肺癌細胞株對於沒食子酸的抗性。

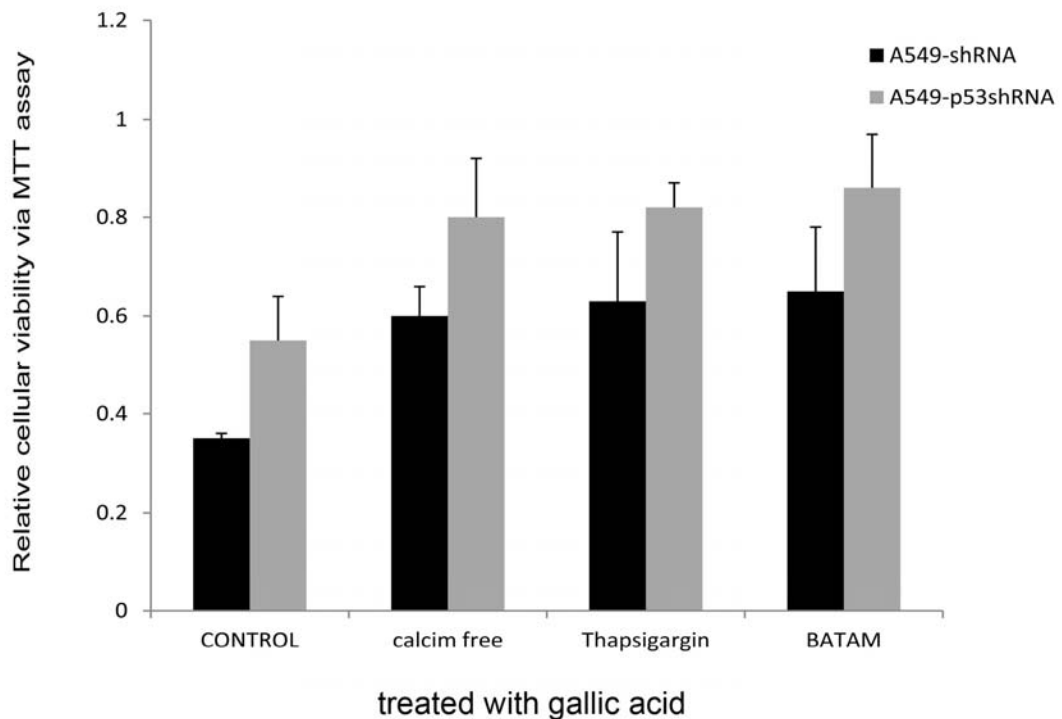


圖三 c、外源性表達活化態之 Akt 可增加 NF- $\kappa$ B 路徑之活化與 A549 肺癌細胞株對於沒食子酸的抗性

**四 沒食子酸處理會誘發 A549 肺癌細胞株內部鈣離子的堆積。**鈣離子為細胞正常功能所需的正要調控因子，除此之外，其對於維持細胞內外子濃度的平衡與生理環境的恆定性扮演著重要的角色，已知有些化學物質會誘發細胞內外鈣離子的失衡而導致細胞死亡，因此我們亦檢測了沒食子酸對於 A549 肺癌細胞株鈣離子濃度的影響，而實驗結果顯示了加入沒食子酸會誘發肺癌細胞內鈣離子的增加，在 p53 致弱表現中上升的時間與幅度較野生型 A549 要來得小（圖四 a）。為了進一步確認鈣離子在此過程中所扮演的角色，我們使用了不含有鈣離子的培養液來培養細胞，經過同樣的沒食子酸處理之後，結果顯示了細胞內鈣離子的增加有減緩的現象，同時也減低了沒食子酸對於肺癌細胞的毒殺能力。重新加入鈣離子之後，則可有效的恢復沒食子酸對肺癌細胞株 A549 的毒殺作用（圖四 ab）。另一方面，如果加入內質網鈣離子通道抑制劑 Thapsigargin，亦有同樣的效果出現（圖四 ab），另一方面，單純的加入鈣離子螯合劑 BATAM 也是可以減緩沒食子酸所誘發的細胞死亡現象（圖四 b），由此可知沒食子酸可以誘發細胞內鈣離子的增加並進而導致肺癌細胞株 A549 的死亡，而此程序是同時透過胞外與內質網中鈣離子的流入所導致的。

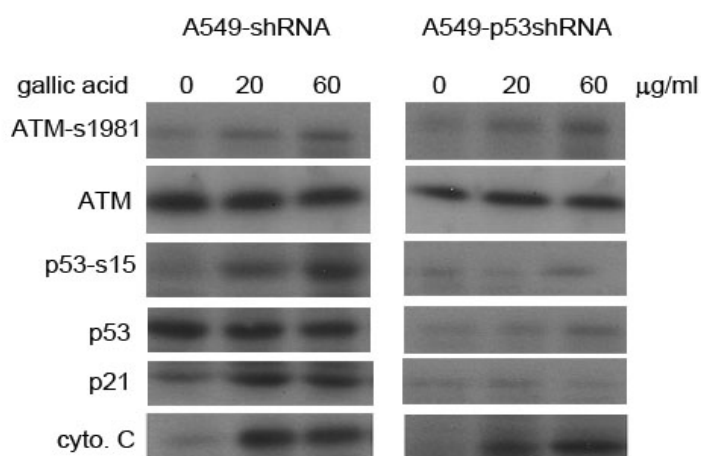


圖四 a, A549-shRNA 與 A549-p53shRNA 肺癌細胞株在不同鈣離子螯合劑或是缺鈣培養液培養情況下，沒食子酸誘發其細胞鈣離子濃度變化的情況。



圖四 b, A549-shRNA 與 A549-p53shRNA 肺癌細胞株在不同鈣離子螯合劑或是缺鈣培養液培養情況下，沒食子酸誘發其細胞死亡的能力。

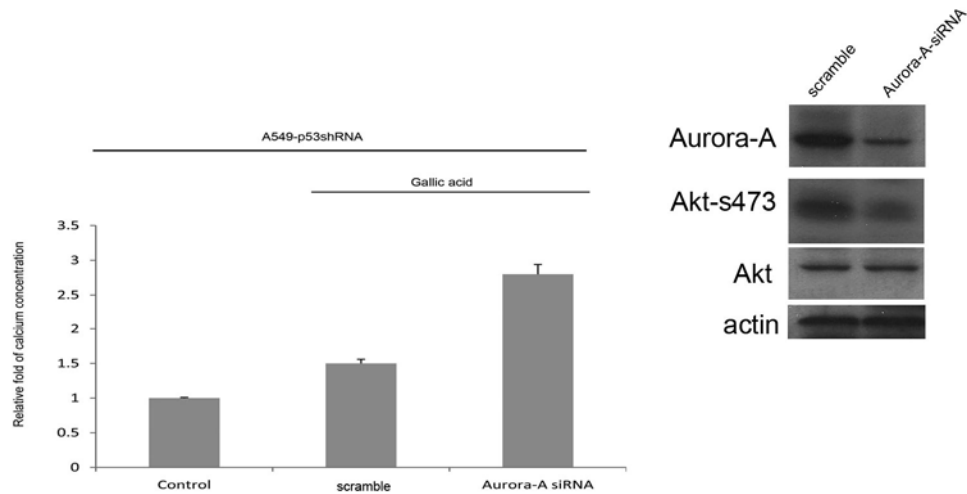
**五 處理沒食子酸可誘發野生型但非 p53 致弱表現的 A549 肺癌細胞株的 DNA 受損反應路徑。** 由於先前實驗已提到沒食子酸可以誘發肺癌細胞株進行 p53 依賴性的程式化死亡途徑，在此實驗中，我們亦觀察到沒食子酸的確可以引發野生型與 p53 致弱表現的 A549 細胞株凋亡相關分子如 ATM 的磷酸化，但是在 p53 致弱表現的細胞株中則是無法觀察到 p53 的磷酸化與 p21 的表現增加趨勢（圖五），有趣的是處理沒食子酸仍舊會造成在野生型與 p53 致弱表現的 A549 細胞株中 cytochrome c 的釋放（圖五），顯示了沒食子酸是透過多重路徑來誘發肺癌細胞的死亡，除外在此過程中過氧化分子的釋放與 p53 路徑無太大關連性，可能透過直接活化創傷系統的活化來誘發肺癌細胞的死亡，然而，就先前沒食子酸毒性誘發肺癌細胞株死亡所需時間與程度來看，p53 致弱表現還是某些程度的保護了 A549 細胞對於沒食子酸的抗性作用。



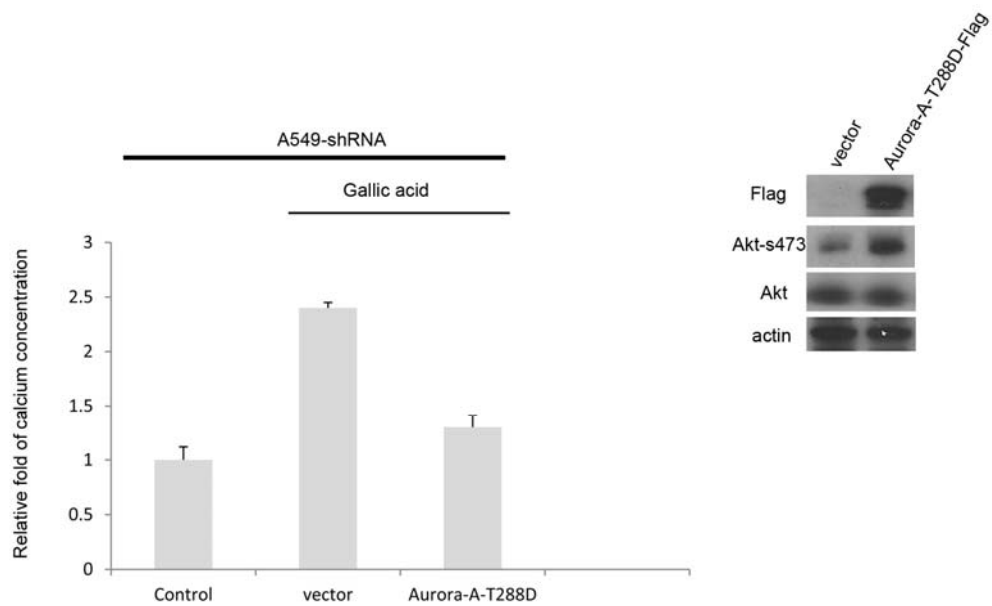
**圖五、處理沒食子酸對於野生型或 p53 致弱表現型 A549 肺癌細胞株中 ATM, p53, p21 磷酸化或表現量與 cytochrome c 釋放的變化影響。**

**六 改變 Aurora-A 的表現可以影響沒食子酸調控 Akt 的磷酸化與鈣離子的堆積並進而調控了肺癌細胞株對於沒食子酸的抗藥性。**我們得實驗已顯示了 Aurora-A 的活性或是表現量會影響到肺癌細胞對於沒食子酸的抗性，主要是透過 NF-κB 的路徑，在接下來的實驗，我們進一步的發現到 Aurora-A 表現量降低後，會導致 Akt 磷酸化的降低，同時也會增加沒食子酸誘發 A549 肺癌細胞中鈣離子的堆積(圖六 a)，相反的，外緣性表達 Aurora-A-T288D 則是增加了 Akt 的磷酸與減弱鈣離子堆積的現象(圖六 b)。這些結果顯示了 Aurora-A 或具有調控 A K T 活性與鈣離子濃度調整並藉此去改變細胞對於外來藥物的致死反應





圖六 a，在 A549-p53shRNA 細胞株中致弱 Aurora-A 表現會降低 Akt 磷酸化與增加沒食子酸誘發細胞內部鈣離子堆積的程度。



圖六 b，在 A549-shRNA 細胞株中表達活性態之 Aurora-A 表現會增加 Akt 磷酸化與減少沒食子酸誘發細胞內部鈣離子堆積的程度。

1. Wu, C.C., et al., *Aurora-A promotes gefitinib resistance via a NF- $\kappa$ B signaling pathway in p53 knockdown lung cancer cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011.



# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/09/30

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討沒食子酸及其衍生物誘發抗藥性肺癌細胞死亡的機轉
	計畫主持人: 吳俊錡
	計畫編號: 99-2320-B-040-008- 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：吳俊錡		計畫編號：99-2320-B-040-008-				計畫名稱：探討沒食子酸及其衍生物誘發抗藥性肺癌細胞死亡的機轉	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本計畫主要可提供一個的植物成分因子於肺癌細胞的廣效性毒殺作用