

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	: 抗精神疾病藥物抑制肝癌細胞之新應用
------------	---------------------

執行計畫學生：葉雅瑄  
學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-085-B  
研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月  
指導教授：曾博修

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：中山醫學大學醫學系生化學科

中華民國 108年03月19日

## (一)摘要

肝細胞癌(HCC)為全球癌症相關死亡的主因之一。HCC 對化療及放療都有一定的抗性，現行主要的治療方法—手術，在經過治療後也會有一定程度的復發機率，所以目前急需新的對抗 HCC 的方法。我們利用大資料庫的分析研究發現，服用抗精神病藥物的病患族群，HCC 比例較低，這是一個新發現。而實驗室另一些測試也發現，某些抗精神疾病藥物對於癌細胞株有毒殺作用。依據健保資料庫的分析，我們選擇了抗精神病藥物 Risperidone、Quetiapine、Clozapine 來進行測試，透過實驗可以有效地得到肝細胞癌的治療效果。首先利用 MTT 試驗來測試細胞的存活率，使用正常人類肝臟細胞 THLE-3 當作控制組加入不同濃度藥物測試細胞毒性，再使用 HepG2 這種肝癌細胞測試細胞存活率。接下來為驗證細胞死亡的途徑，先利用細胞免疫螢光觀察細胞是否行細胞自噬途徑，再利用西方點墨法來觀測細胞自噬的影響的蛋白質。我們目前發現，這三種抗精神疾病藥物 Risperidone、Quetiapine、Clozapine，以 Risperidone 效果最佳，對於肝癌細胞會有生長抑制的現象，並且再 Atg7、Atg5、LC3 等細胞自噬相關蛋白質有表現量上升之結果。

## (二)研究動機與研究問題

目前癌症是全世界極嚴重的疾病之一。肝細胞癌(統稱肝癌，Hepatocellular carcinoma, 縮寫 HCC),是現在全球癌症相關死亡的主要原因之一(全世界最常見癌症的第五位，而致命癌症的第二位)，也是台灣成年人罹患的主要癌症之一，它所造成的原因大多為酗酒或是肝炎導致的肝硬化。HCC 它是個是不容易治癒的癌症，因為 HCC 它對化學療法及放射性療法都會產生一定的抗性，現行最主要的方法是手術切除，包括經皮消融及肝臟移植，且手術切除還須評估腫瘤大小及肝臟所剩體積是否可以支持病人正常生理功能，所以只有 10-15%病人可使

用此治療方法，但經過手術後腫瘤還是有很高的機率會再復發，經皮消融只適合小腫瘤之患者，肝臟移植則須考慮肝臟提供者與病人的合適度，且取得較不易，這些都是我們目前急需發展對 HCC 有效療法的原因。

目前已有許多研究針對抗精神病藥物對癌症抑制方面作探討，也有許多有效的成果呈現，發現有些抗精神病藥物對癌症是有抑制的效用，假使抗精神病藥物與抗癌藥物合用，對癌症也可能會產生更高度的療效。目前所被選擇的抗精神病藥物及抗癌藥物都是臨床上已有使用，並且副作用較低的藥物，是個舊藥新用的概念，讓我們不用再擔心開發新藥物產生的種種問題。

這次我們想要利用肝癌細胞得出我們所選定的抗精神病藥物 Risperidone、Quetiapine、Clozapine，它們是否對肝癌有治療抑制的效用。選擇這三種藥物的主因是，現在發現有些癌症與多巴胺受體有所關連，肝癌也被發現肝癌細胞上有多巴胺的受體。像是 Risperidone、Quetiapine 這兩種藥物就分別對 Dopaminergic D2 受體；Dopaminergic D1、D2 受體有抑制的效用。Clozapine 雖然不是作用在多巴胺受體上的藥物，但是它在其他癌症上，像是肺癌，被發現可以使癌細胞進行細胞自噬作用，進而抑制腫瘤生長。我們將利用不同濃度藥物通過 MTT 試驗進行細胞存活率的分析，得出最有效的治療濃度，且在正常人類肝臟細胞確認此濃度的藥物是否會造成細胞毒性。以及運用西方點墨法檢測在經過藥物的作用後，肝癌細胞是否會走向細胞凋亡或是細胞自噬的途徑。假設這些實驗成功，有得到我們所想的結果，我們將可以初步推定，這個藥物對肝癌的治療及抑制可能是有療效的。

### (三)文獻回顧與探討

抗精神病藥物(Antipsychotics)在現代是治療精神病的主要療法之一，主要用於治療及消除精神病所引發的症狀，它可改善的症狀包括妄想、幻覺、激動、

嘔吐、不自主運動等情況，大部分用於思覺失調症，也就是我們常稱的精神分裂症，還有雙向性精神障礙的治療(1)。抗精神病藥物主要是透過對多巴胺系統中的受體 D2 產生拮抗作用，並產生治療的效用。抗精神病藥物可分為兩大類，第一是典型的抗精神病藥物；第二則是非典型的抗精神病藥物。他們兩者的差別在於，非典型的抗精神病藥物他們傾向誘發錐體外系症狀和遲緩性障礙，在二十世紀的 90 年代較常被使用於治療精神分裂症的病患。現在的研究發現，抗精神病藥物不只用於精神病的治療，像是嚴重的抑鬱症也可透過此藥物的治療。有趣的是，在流行病學的研究方面，精神分裂症的患者癌症的發病率較低(2,3)，且已有些實驗證明，抗精神病藥物對於癌症的治療、腫瘤的消退是有效用的(4,5,6)。

在流行病學的統計上顯示，精神分裂症的患者在某些癌症的發生上有較低的比例，例如直腸癌、結腸癌及前列腺癌(7)。但也有一些證據表明，臨床上和實驗上所選擇的抗精神病藥物有矛盾的結果——抗精神病藥物可能是有致癌性的(8,9)。有研究指出，精神分裂患者較不容易發展出癌症，即使患者在癌症的致病原因風險較一般人高，例如缺乏運動，或是因壓力所產生的酗酒、抽菸及飲食不當，但在文獻上的統計分析卻出現，它們的癌症發病率並沒有顯著的增加，進而推測這可能癌症與精神分裂症的基因彼此有所關聯，還有在表觀遺傳學方面的關係，且抗精神病藥物的治療也是其中一個降低癌症風險的可能原因之一(10)。

有研究發現抗精神病的藥物在治療癌症腫瘤方面也有顯著的效益，目前已有各種抗精神病藥物對不同癌症有高度的療效，像是有人利用治療精神分裂症的藥物 Clozapine 對肺癌進行研究，發現它可以抑制肺癌細胞的生長，具有抗增殖的效用，也可以停滯細胞週期 G0/G1 期，最重要的是它可以誘導細胞自噬，引發細胞的死亡，以達到治療肺癌的效果，這項實驗結果可以說明精神分裂症患者在小細胞的肺癌發病率較低，且在臨床也有觀察到相似的結果(5)。

Thioridazine，它主要是作為一種抗精神病或是抗微生物的藥物，在實驗的結果發現它還可以引發腫瘤細胞的細胞凋亡、抑制血管生成、細胞的轉移，進一步抑制腫瘤細胞的生長，Carboplatin(卡鉑)它可以與 DNA 結合，抑制細胞的複製轉錄，導致細胞死亡，是個常用於頭頸癌、子宮內膜癌和小細胞肺癌的化學治療藥物，雖然 Carboplatin 具有些許的副作用，但也已經發現，藉著改變信號傳導的途徑或者和其它的抗癌藥物一起作用，就可降低它的副作用。所以在一篇研究中，作者將 Thioridazine 和 Carboplatin 聯合應用後觀察到，它們一同作用可以誘導頭頸部鱗狀細胞癌細胞的 caspase，誘導細胞凋亡(11)。

現在已有許多研究利用各種方式從抗精神疾病藥物找出可能為肝細胞癌(HCC)治療的藥物。像是利用電腦識別模擬分析找出 CDK2，這個與細胞週期有關的重要調節因子的抑制劑，去抑制細胞週期的 G1 到 S 期，他們發現的藥物是已在精神病治療使用的 Fluspirilene，可以當作抗癌的潛在藥物，並且它們進一步的發現，抗精神病藥物與抗癌藥物的聯用對癌症的治療具有顯著的效果，所以 Fluspirilene 與 5-fluorouracil 這個抗癌藥物在細胞實驗及動物實驗對肝癌的治療是有高度療效的，這兩種藥物的聯用抑制了肝癌細胞的細胞週期，還有促進細胞凋亡的效果，而且沒有嚴重的副作用(12)。也有人從肝癌細胞的基因表達方面下手，篩選出有可能的抗精神病藥物，進而進行 MTT 細胞存活率實驗及克隆測試，得到的結果是 Chlorpromazine，Trifluoperazine 這兩種藥物可以抑制肝癌細胞腫瘤的生長，但此方法也只是一個可參考的方法，因為這個研究使用的是 CMAP 的方法，它的資料庫遠不及臨床的數據，此原因造成了限制(13)。

Thioridazine 作為多巴胺受體拮抗劑的抗精神病藥物，可停滯細胞 G0/G1 週期，並且可以降低癌症轉移的風險。一些研究發現，有些癌症含有多巴胺的受體，像是肝癌細胞 Huh-7 就含有多巴胺受體，可使 Thioridazine 作用，達到治療功效(14)。

## (四)研究方法及步驟

### 一、細胞培養

本次所使用的細胞有肝上皮細胞系的 THLE-3，當作對照組以測試此藥物是否會對正常肝臟造成傷害。肝癌細胞所選擇的則是肝細胞系的 HepG2，分別培養在含有 10 % 胎牛血清、5 % 的 Penicillin、5 % 的 Glutamate 的 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium)培養液中，其中肝癌細胞的培養液多添加了非必需胺基酸(NEAA)5 %、Sodium pyruvate 5 %。培養箱的條件為 37 °C；5 % CO<sub>2</sub>；濕度為 95 %。細胞繼代於 10 公分的培養盤中。

### 二、MTT 試驗

將細胞分別以 1 孔  $1 \times 10^5$  的細胞數培養在 24 孔盤中，待 16 小時細胞貼附盤上後，加入不同濃度藥物，分別為 0.01；0.02；0.05；0.1；0.2 mM/ml。等到 24 及 48 小時後，加入 MTT assay dye，靜置培養箱四小時，待紫色結晶生成，用甲醇回溶結晶，以 595 nm 測量吸光值，換算成細胞存活率，吸光值越高，代表細胞存活率越高。

### 三、細胞免疫螢光(IFA)

將肝癌細胞 HepG2 以  $5 \times 10^4$  的細胞數分注至 8 well chamber 中，待細胞貼附後，加入不同濃度之 Risperidone、Quetiapine、Clozapine 藥物(0，0.05，0.1，0.2 mM)的培養液，放於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 24 小時，24 小時後將培養液去除，以 DPBS 清洗，再用 4% 的 Paraformaldehyde 固定細胞 15 分鐘，之後再以 DPBS 清洗；接著以 0.3% 的 Triton X-100 與細胞作用 5 分鐘後再以 DPBS 清洗；然後用 1% 的 BSA 將細胞 Blocking 1 小時，然後用 DPBS 清洗後加入一級抗體 LC3 與細胞雜交作用 1 小時後再回收抗體，並以 DPBS 清洗；接著加入

二級抗體(Abcam Ltd.)與其作用 1 小時後，回收二級抗體，用 DPBS 清洗細胞；最後將螢光染劑 DAPI 加入作用 5 分鐘，用 DPBS 清洗後即可用螢光顯微鏡觀察拍照。

#### 四、十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺膠體電泳(SDS-PAGE)

將 HepG2 細胞培養至 10 公分的培養盤，待細胞貼盤生長至八分滿，在每一盤中分別加入藥物 Risperidone，濃度分別是 0.05；0.1；0.2 mM，等待藥物作用 24 小時後收下細胞，將細胞中的蛋白質定量並配置成相同體積濃度之樣品。接下來將配置好的樣品以上膠 50V/20 分鐘，下膠 100V/110 分鐘之條件進行 SDS 膠體電泳。

#### 五、西方點墨法 (Western blotting)

使用轉置設備將膠片上的蛋白質以 100V/80 分鐘之條件轉印至硝化纖維膜上。我們所要觀察的蛋白為細胞自噬途徑的 Atg7、Atg5，以及 LC-3，把它們分別加入抗體，並用 HRP substrate 呈色反應，再到冷光影像擷取系統下進行拍攝。

### (五) 結果與討論

#### 一、抗精神疾病藥物抑制肝癌細胞生長

利用 MTT 測試抗精神疾病藥物 Risperidone，是否會影響肝癌細胞 HepG2 的生長，分別使用不同濃度(0，0.01，0.05，0.1，0.2 mM)處理細胞，經過 24 小時。

我們可以發現以 Risperidone 處理的組別在藥物濃度為 0.1 mM 時細胞存活率有下降的趨勢(圖一 A、B)，再觀察 48 小時的細胞，與 24 小時相比較，Risperidone 抑制肝癌細胞生長的情況更為明顯，在高濃度藥物的處理下，細胞的型態也顯得更加不正常，有皺縮飄起無服貼等現象(圖一 C、D)。

## 二、抗精神疾病藥物誘發細胞自噬

### I、細胞免疫螢光

為了觀察肝癌細胞是否進行細胞自噬的路徑，我們首先觀察了細胞自噬路徑上 LC3-II 的免疫螢光，在螢光顯微鏡下可以看到，以 Risperidone 藥物處理的細胞，在 0.1 及 0.2 mM 的濃度下，有較明顯的螢光表現(圖四 A)；Quetiapine 處理的細胞也在 0.1 及 0.2 mM 的濃度比未加藥物處理的細胞有更明顯的綠色螢光(圖四 B)；而用 Clozapine 處理之細胞則在 0.2 mM 的濃度時有明顯的螢光表現(圖四 C)。

### II、西方墨點法

為了證實肝癌細胞是否在藥物處理下行細胞自噬，我們選擇了以下幾種細胞自噬路徑上的蛋白質觀察。

#### 1. Atg7

首先我們先觀察在細胞自噬途徑上的 Atg7，我們發現以 Risperidone 處理 24 小時之細胞在濃度為 0.2 mM 時表現量有上升之趨勢(圖三 B)；處理 48 小時之細胞在 Atg7 的表現量有上升的情況(圖四 B)。

#### 2. Atg5

在藥物 Risperidone 的處理下，Atg5 在 24 小時的表現量有顯著上升之趨勢(圖三 C)，但在 48 小時只有 0.2 mM 有上升之情況(圖四 C)。

#### 3. LC3

以 Risperidone 處理的細胞，可以看到我們的 LC3 在 24 小時及 48 小時都有顯著上升的趨勢，但在 48 小時方面只有 0.2 mM 較有明顯表現(圖三 D、圖四 D)。

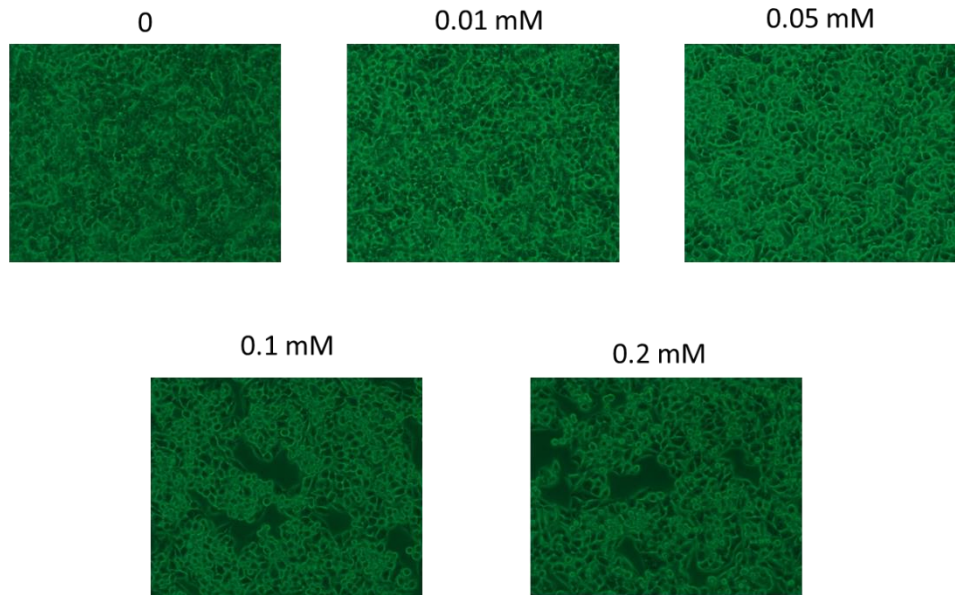


綜合上述結果，我們可以發現肝癌細胞在 MTT 試驗中對於抗精神疾病藥物 Risperidone 是會有生長被抑制的現象；然後將免疫螢光和西方墨點法一起觀察可以發現，在螢光的 LC3 表現量與西方墨點法的趨勢相同；從西方墨點法的方面來看，Risperidone 藥物處理的肝癌細胞基本上是行細胞自噬路徑，使細胞生長被抑制甚至死亡。

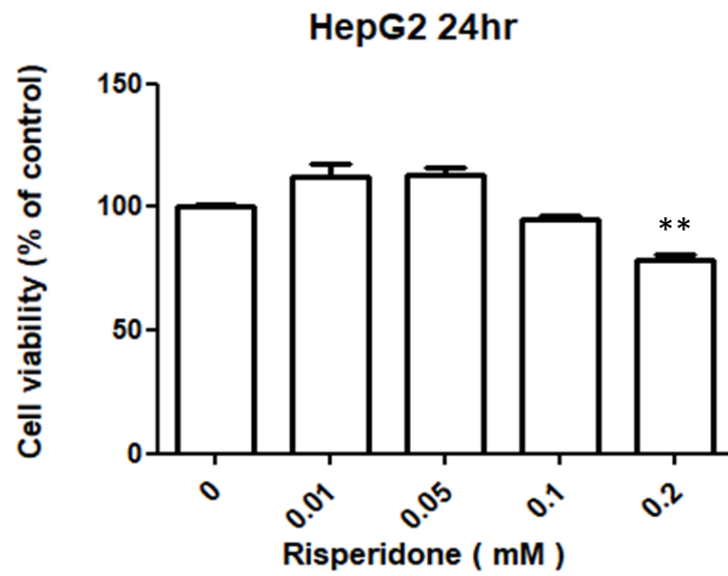
Quetiapine、Clozapine 藥物方面，我們進行了細胞螢光免疫，初步的確認了藥物處理的肝癌細胞有 LC-3 的螢光反應，代表細胞的死亡是行細胞自噬途徑。而此兩種藥物具體的作用機制與實際對肝癌細胞之影響還要再另外操作其他的實驗才可更進一步的探討。

**A**

**HepG2 Risperidone**

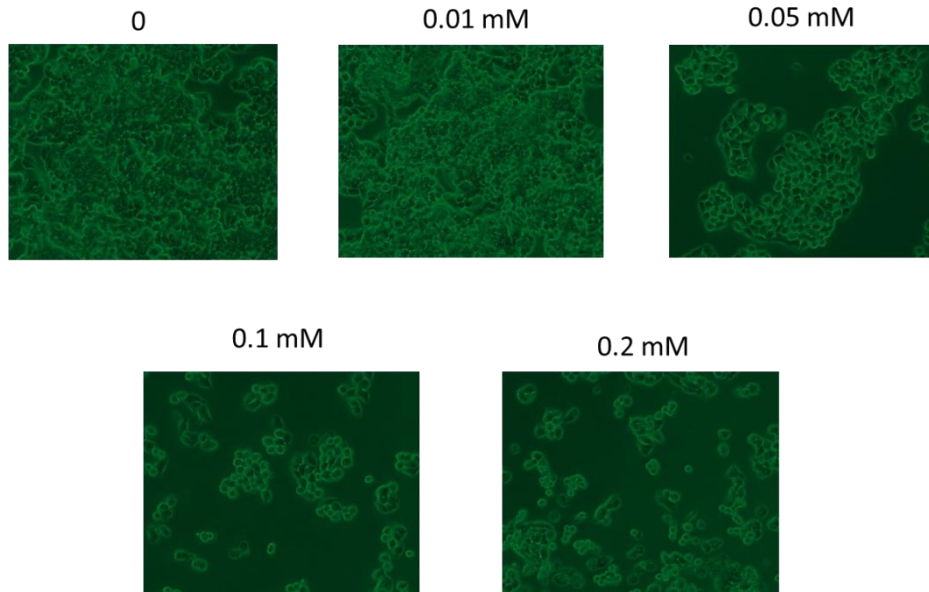


**B**

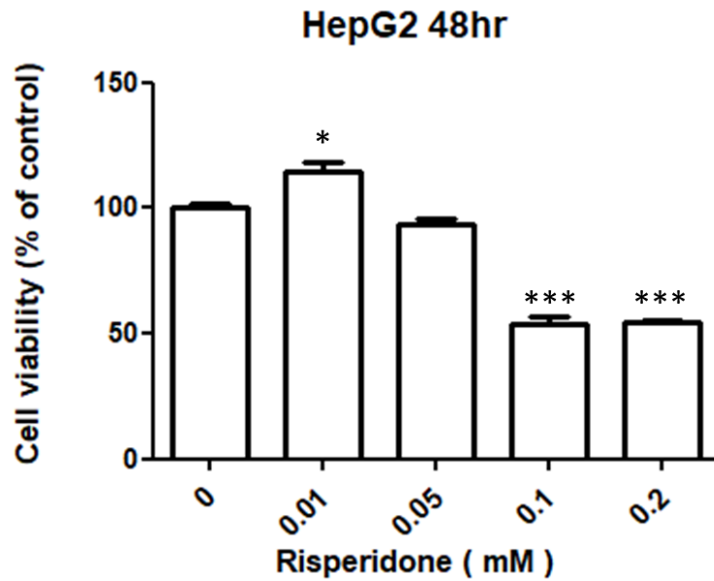


C

HepG2 Risperidone



D



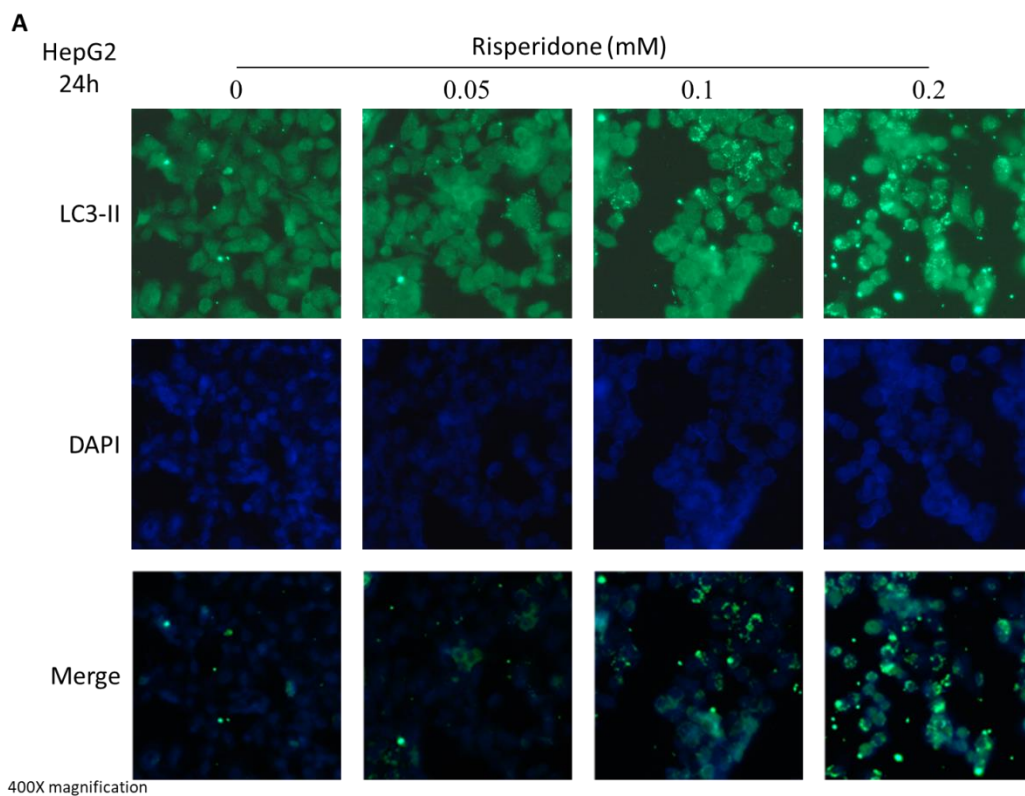
圖一、肝癌細胞 HepG2 細胞處理 Risperidone 後 MTT assay 之結果

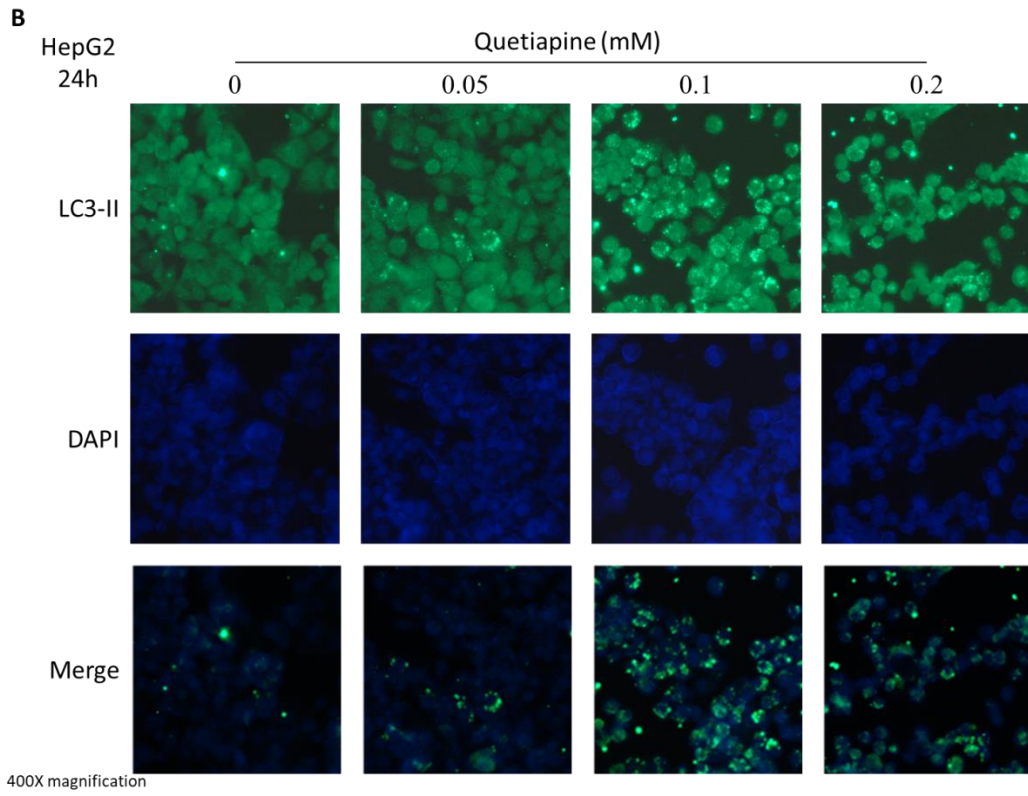
(A)處理 Risperidone 24 小時後細胞相位差影像(200x)；(B)定量結果(means±SD)

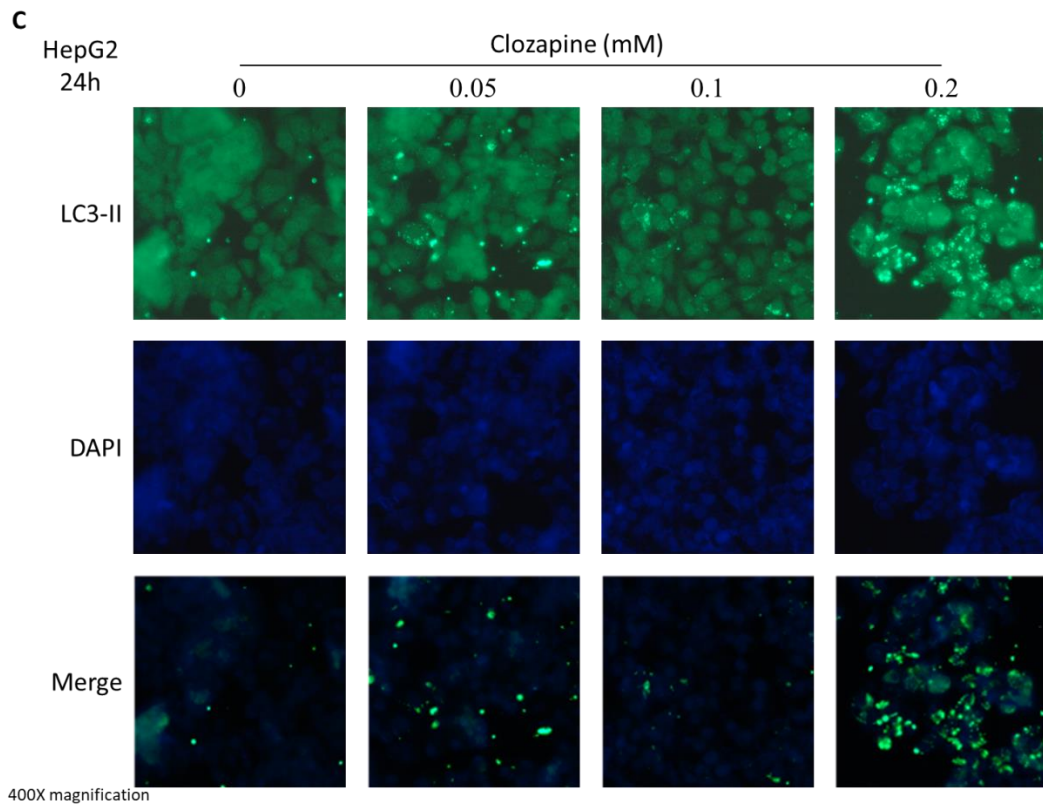
( $P < 0.05$ )

(C)處理 Risperidone 48 小時後細胞相位差影像(200x)；(D)定量結果(means±SD)

( $P < 0.05$ )





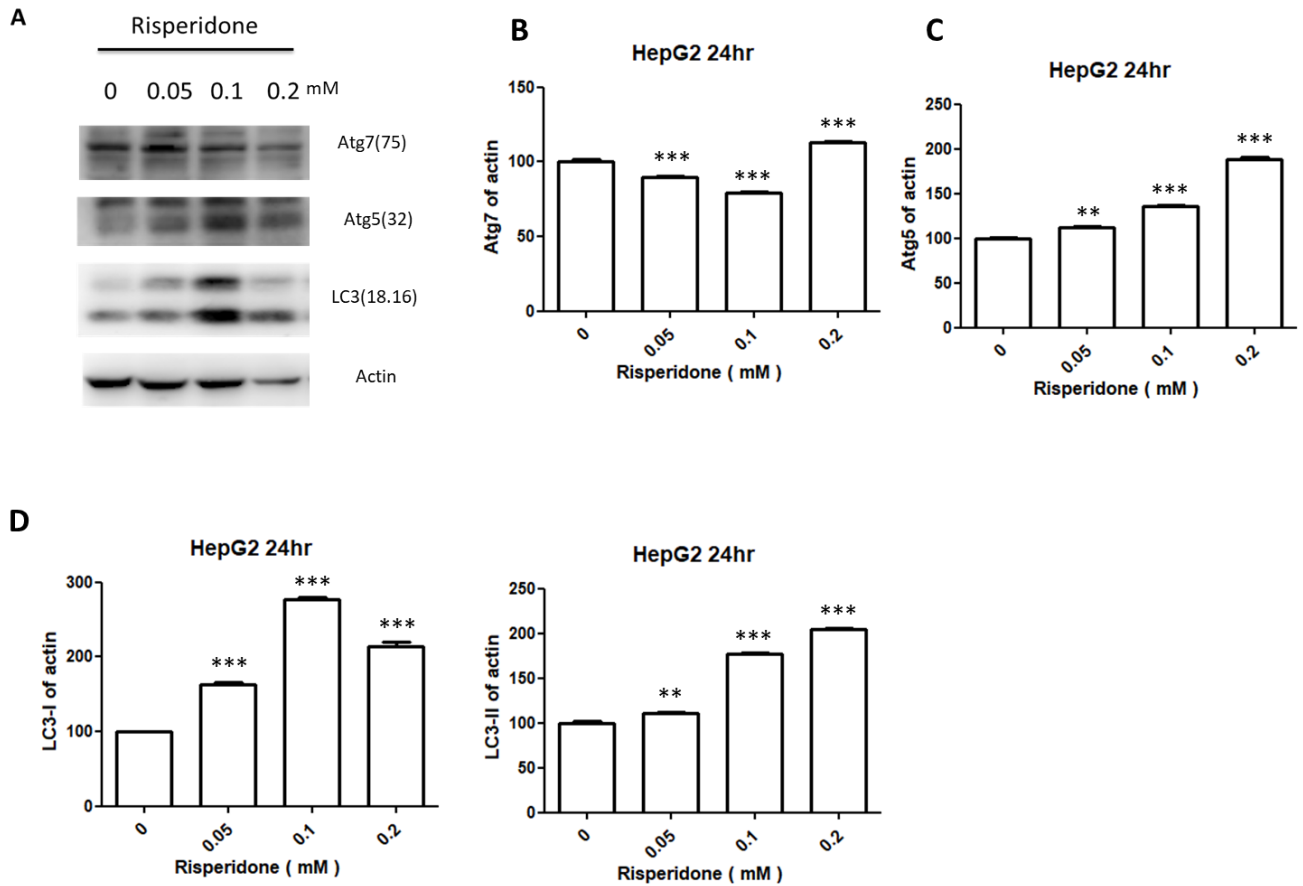


圖二、細胞螢光免疫之結果

(A) 肝癌細胞 HepG2 細胞處理 Risperidone 24 小時

(B) 肝癌細胞 HepG2 細胞處理 Quetiapine 24 小時

(C) 肝癌細胞 HepG2 細胞處理 Clozapine 24 小時



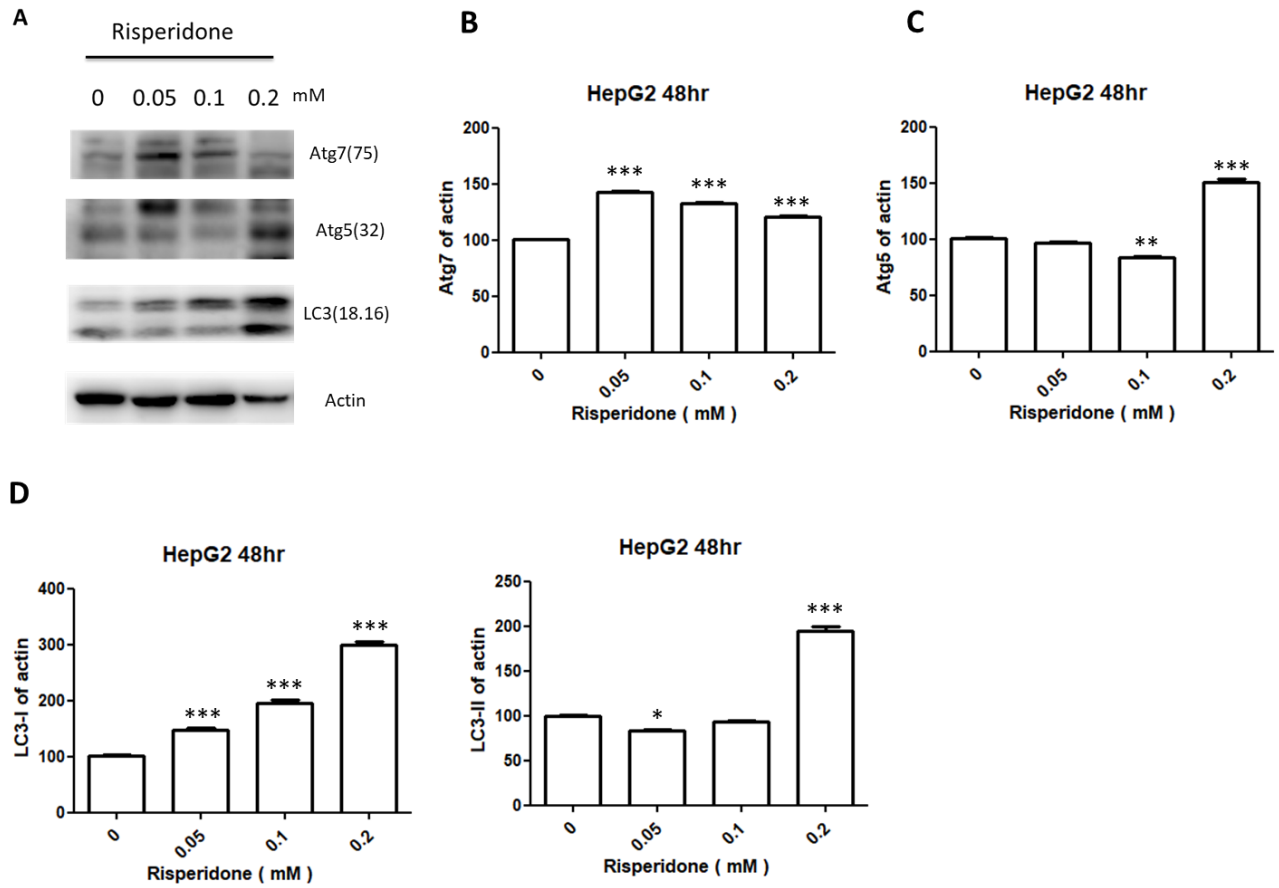
圖三、抗精神疾病藥物處理肝癌細胞 HepG2 24 小時後西方墨點法結果

(A) 西方墨點法的冷光影像分析後的結果

(B) Atg7 定量結果(means±SD) ( $P < 0.05$ )

(C) Atg5 定量結果(means±SD) ( $P < 0.05$ )

(D) LC3 定量結果(means±SD) ( $P < 0.05$ )



圖四、抗精神疾病藥物處理肝癌細胞 HepG2 48 小時後西方墨點法結果

(A) 西方墨點法的冷光影像分析後的結果

(B) Atg7 定量結果(means±SD) (P< 0.05)

(C) Atg5 定量結果(means±SD) (P< 0.05)

(D) LC3 定量結果(means±SD) (P< 0.05)



## (六)參考文獻

- (1) Citrome L, Kalsekar I, Guo Z, Laubmeier K, Hebden T. Diagnoses associated with use of atypical antipsychotics in a commercial health plan: a claims database analysis. *Clin Ther* 2013;35:1867-1875.
- (2) Chou FH, Tsai KY, Su CY, Lee CC. The incidence and relative risk factors for developing cancer among patients with schizophrenia: a nine-year follow-up study. *Schizophr Res* 2011;129:97-103.
- (3) Grinshpoon A, Barchana M, Ponizovsky A, Lipshitz I, Nahon D, Tal O, Weizman A, et al. Cancer in schizophrenia: is the risk higher or lower? *Schizophr Res* 2005;73:333-341.
- (4) Cheng HW, Liang YH, Kuo YL, Chuu CP, Lin CY, Lee MH, Wu AT, et al. Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. *Cell Death Dis* 2015;6:e1753.
- (5) Yin YC, Lin CC, Chen TT, Chen JY, Tsai HJ, Wang CY, Chen SY. Clozapine induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:945-956.
- (6) Lu M, Li J, Luo Z, Zhang S, Xue S, Wang K, Shi Y, et al. Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *Onco Targets Ther* 2015;8:1543-1552.
- (7) Dalton SO, Johansen C, Poulsen AH, Nørgaard M, Sørensen HT, McLaughlin JK, Mortensen PB, Friis S. Cancer risk among users of neuroleptic medication: a population-based cohort study. *Br J Cancer*. 2006 Oct 9;95(7):934-9. Epub 2006 Aug 22.
- (8) Amerio A, Galvez JF, Odone A, Dalley SA, Ghaemi SN. Carcinogenicity of psychotropic drugs: A systematic review of US Food and Drug Administration-required preclinical in vivo studies. *Aust N Z J Psychiatry* 2015;49:686-696.
- (9) Brambilla G, Mattioli F, Martelli A. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. *Toxicology* 2009;261:77-88.
- (10) Richard Hodgson, Hiram J Wildgust, and Chris J Bushe. Cancer and schizophrenia: is there a paradox? *J Psychopharmacol*. 2010 Nov;24(4 Suppl):51-60. doi: 10.1177/1359786810385489.
- (11) Seung Un Seo, Hyuk Ki Cho, Kyoung-jin Min, Seon Min Woo, Shin Kim, Jong-Wook Park, Sang Hyun Kim, Yung Hyun Choi, Young Sam Keum, Jin Won Hyun, Hyun Ho Park, Sang-Han Lee, Dong Eun Kim, and Taeg Kyu Kwon. Thioridazine enhances sensitivity to carboplatin in human head and neck cancer cells through downregulation of c-FLIP and

- Mcl-1 expression. Cell Death Dis. 2017 Feb 9;8(2):e2599. doi: 10.1038/cddis.2017.8.
- (12) Shi XN, Li H, Yao H, Liu X, Li L, Leung KS, Kung HF, Lu D, Wong MH, Lin MC. In Silico Identification and In Vitro and In Vivo Validation of Anti-Psychotic Drug Fluspirilene as a Potential CDK2 Inhibitor and a Candidate Anti-Cancer Drug. PLoS One. 2015 Jul 6;10(7):e0132072. doi: 10.1371/journal.pone.0132072. eCollection 2015.
- (13) Chen MH, Yang WL, Lin KT, Liu CH, Liu YW, Huang KW, Chang PM, Lai JM, Hsu CN, Chao KM, Kao CY, Huang CY. Gene expression-based chemical genomics identifies potential therapeutic drugs in hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2011;6(11):e27186. doi: 10.1371/journal.pone.0027186. Epub 2011 Nov 7.
- (14) Meiling Lu, Jinghua Li, Zaili Luo, Shuai Zhang, Shaobo Xue, Kesheng Wang, Yan Shi, Cunzhen Zhang, Haiyang Chen, and Zhong Li. Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. Onco Targets Ther. 2015 Jun 22;8:1543-52. doi: 10.2147/OTT.S77373. eCollection 2015.