

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 ： 名 稱	探討原薯蕷皂苷誘導多型性膠質母細胞瘤細胞自噬-凋亡之機轉
-----------------	------------------------------

報 告 類 別 : 成果報告  
執行計畫學生 : 吳采芸  
學生計畫編號 : MOST 110-2813-C-040-011-B  
研 究 期 間 : 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月  
指 導 教 授 : 邱慧玲

處 理 方 式 : 本計畫可公開查詢

執 行 單 位 : 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中 華 民 國 111年02月21日

## 中文摘要

多形性膠質母細胞瘤(GBM)在腦癌分類中屬於第IV級，是最惡性也具有侵襲性腦瘤，好發於成年人，患者比例男性通常多於女性，關於腦癌發生和危險因子目前仍需更多研究證實。在臨床上，針對GBM的標準治療方式未能有效根治，此外，根據調查在治療後存活時間大多只有一年，因此尋找其他治療藥物相當重要。原薯蕷皂苷(Protodioscin,PD)，為天然中草藥蒺藜中萃取出化合物，具有抗發炎、抗血脂等功效。近期研究中發現Protodioscin能改善葡萄糖耐量、對多種癌細胞產生毒性、促使細胞凋亡等多樣化的功能。因此本篇研究欲分析是否能以Protodioscin誘導GBM細胞產生細胞凋亡或細胞自噬，抑制腦癌的生成並用於治療頑強的多形性膠質母細胞瘤。

首先，為了解PD是否能抑制GBM細胞株生長，利用MTT實驗分析不同濃度下細胞株存活率，結果顯示，當PD濃度高時，細胞存活率約在50%左右。接著透過流式細胞儀進行分析，發現GBM-8401及M059K在12-18 $\mu$ M時，細胞凋亡比例及粒線體膜電位去極化均出現明顯改變，代表PD能啟動細胞凋亡機制是透過改變粒線體膜電位，透過西方墨點法也有得到相關的印證，cleaved-caspase3、cleaved-PARP等蛋白表現隨藥物濃度上升。為了釐清PD是否有促進自噬作用產生，透過AO染色發現當藥物濃度升高，細胞內的酸性囊泡表現也上升，進一步證實PD濃度上升時發生自噬作用，透過西方墨點法也證實細胞自噬的發生，LC3 $\beta$ 、p62蛋白表現隨藥物濃度上升。為了探討細胞產生自噬與凋亡的原因，分析細胞週期的改變與測定細胞內活性氧表現，顯示PD對GBM-8401會造成G2/M arrest；PD會導致GBM-8401、M059K細胞內ROS比例上升，推測PD導致細胞週期改變與細胞內ROS增加可能與細胞凋亡與細胞自噬的產生有關。另外，西方墨點法的結果顯示PD會使PI3K/AKT/mTOR pathway中的p-AKT表現下降、抑制Mcl-1的表現；在si-LC3B與PD共同處理的情況下相較單純PD處理細胞凋亡比例、粒線體膜電位、PARP表現皆無明顯變化，推測PD促使細胞自噬的作用並非避免細胞凋亡的保護機制。根據以上結果，初步推測PD會透過細胞週期改變、活化ROS，藉由PI3K/AKT/mTOR pathway的途徑促使細胞凋亡與細胞自噬，根據其他研究指出，抗凋亡蛋白Mcl-1也具有調節細胞自噬的能力，未來或許能進一步對Mcl-1的表現進行實驗與探討Mcl-1對PD誘導的細胞凋亡與細胞自噬的關聯性。

## Abstract

### Backgrounds:

Glioblastoma multiforme (GBM), a malignant grade IV tumor, is the most common malignant primary brain carcinoma, with an incidence of low 5 year survival rate and high replase rate. Currently, standard treatments in the clinic such as surgery, chemotherapy and radiation therapy are mostly limited by low therapeutic efficiency. Protodioscin (PD), a saponin extracted from rhizomes of *Tribulus terrestris* (Chinese herbal). Previous research indicated that PD can protected PC12 cells against ROS-mediated apoptosis through activating PI3K/AKT/Nrf2 pathway and miR-124 modulation. According to cancer research, PD is cytotoxic effect to cancer cell, particularly in leukamia, prostate and colon cancer. Taken together, PD is a possible treatment options for anti-tumor mechanism. However, the molecular interaction related to the apoptosis and autophagy of GBM is still unknown. This study project will focus on the molecular mechanism of PD induce cell apoptosis and autophagy.

### Materials & Methods:

Cell viability of GBM-8401 and M059K was detected via MTT assay. Apoptosis, mitochondrial membrane potential and cell cycle were detected by Flow cytometry. The acidic vesicular organelle and cellular ROS level were analyzed by ImageXpress PICO via staining with Acridine Orange, hoechst 33342 and DCFDA dye, respectively. The expression of related protein after treated with PD (0, 6, 12, 18 $\mu$ M) were measured by western blot.

### Results:

The results of MTT assay suggested that cellular viability obviously decreased after treated with PD in 24 hrs, particularly on the 12-18 $\mu$ M dose range. The ratio of late apoptosis, total depolaration and number of autophagic vesicles were increased in direcet prportion to PD concentration. Additionally, the western blot has confirmed that apoptosis related protein(cleaved-PARP, cleaved-caspase 3) and autophagy related protein(LC3B-II) were increased via treatment with PD. Moreover, the ROS level was enhanced by PD treatment in GBM-8401 and M059K, which induce cell apoptosis. However, in the case of co-treatment of si-LC3B and PD, there was no significant change in the proportion of apoptosis, mitochondrial membrane potential, and PARP expression compared with PD treatment alone. It is demonstrated that PD play in the role of promoting autophagy is not a protective mechanism to avoid apoptosis. Moreover, the expression of Mcl-1 and p-AKT were decreased in high dose PD treatment via western blot.

### Conclusions:

Above results demonstrated that PD can inhibit cell growth via apoptois and autophagy. In addition, the increasing ROS level and cell cycle arrest promoted the progression of apoptosis. Moreover, the case of co-treatment of si-LC3B and PD showed that the role of PD in promoting autophagy is not a protective mechanism to avoid apoptosis. At last, the relation between apoptosis and autophagy was upregualted by PI3K/AKT/mTOR pathway. Previous research indicated that released BECN1 from Mcl-1-complex can lower expression of Mcl-1, which enhanced apoptosis and induced autophagy. Although the regulation between apoptosis and autophagy via decreasing expression of Mcl-1 is still unclear, PD can decrease cellular viability via the mechanism of apoptosis and autophagy has certainly confirm.

## (一) 研究動機與研究問題

在癌症中腦癌並非名列前茅，但存活率卻非常渺茫，更具有極大復發機率，根據研究顯示，多形性膠質母細胞瘤(GBM)為成人腦癌中最常見也是最具侵襲性的腦癌[1]，儘管採用目前標準方法，在手術切除後進行聯合放療並用替莫唑胺(TMZ)輔以治療，效果仍有其侷限性，患者(中位年齡 53 歲)經過治療後的存活率中位數僅有一年[2]，此外人類血清中的外泌體 lncSFB2-AS1 能促使 GBM 具有化療耐藥性[3]，對於目前 GBM 治療造成困境。為此，許多學者都在找尋能取代 TMZ 進行治療的藥物或者其他合併使用藥物以降低 GBM 患者對藥物的抗藥性並提高患者存活率，目前發現 MEK、Aurora-A 激酶等抑制劑能增強 TMZ 的功效，亦有其他療法的發展如免疫療法、抗血管生成療法[4]，然而運用天然中草藥治療 GBM 的研究仍未受重視。本次研究將以天然化合物-原薯蕷皂苷(Protodioscin)進行實驗，分析具有抗發炎、促細胞凋亡功能的原薯蕷皂苷是否也能抑制 GBM 生長並研究其相關調控機制，為 GBM 的治療另闢蹊徑。

## (二) 文獻回顧與探討

### 一、多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)

#### 1. 簡介

在癌症比例中，腦癌僅佔有 2% [5]，然而由於大腦解剖學及生理學對其治療產生障礙，因此腦癌被認為是最強大的癌症[6]，在腦癌中以膠質瘤所占比例最高，根據組織學外觀，WHO 將其以級數分類為 I-IV 級，表示不同程度的惡性腫瘤(級數越高惡性程度也越高)，傳統上將它們分類為星形細胞性，少突膠質細胞或室管膜腫瘤[7]，多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)歸類屬於級數 IV，是原發性腦癌中最常見也是惡性度最高，能夠影響組織範圍較遠，即使經過手術切除也無法完全根治，復發率高存活率低，經手術或藥物治療後患者存活時間大多不超過一年。流行病學的統計中，患病年齡層廣泛，發生於 45-70 歲比例最高，另外男性患者比例較高，為女性的 1.6 倍。[8]

#### 2. 危險因子

罹患神經膠質瘤風險的相關因子很多，如：遺傳、職業、環境致癌物、飲食等，目前研究中提出具有相關性是治療性 X 射線及遺傳因子，其餘因子相關性仍待進一步研究報告。1. 治療性 X 射線：尤其是接受 X 線照射治療的急性淋巴細胞白血病的兒童通常在治療後 10 年內，出現神經膠質瘤和原始神經外胚層腫瘤 (PNET) 的風險顯著升高[9]。2. 遺傳因子：透過全基因組關聯分析(genome-wide association study)，發現有七個與腦癌風險上升相關的等位基因，包括：*NF1*、*NF2*、*TSC1*、*TSC2*、*MSH2*、*MLH1*、*p16/CDKN2A*、*IDH1/IDH2*。[10]另外部分的遺傳疾病也能提高罹患腦癌的機率，例如考登氏症候群(Cowden Syndrome)、透克氏症(Turcot Syndrome)及家族性神經鞘瘤等[11]。3. 職業暴露：根據調查醫師、消防人員、農夫等職業相較於其他行業，具有較高的 GBM 發生率，但其關聯性目前尚有待研究。4. 免疫疾病：部分疾病與神經膠質瘤的發生有關，例如：氣喘、濕疹、花粉熱等免疫相關疾病，[11]但目前還不清楚兩者間的相互作用及機制。

#### 3. 診斷

罹患腦癌的患者常見症狀有頭痛、視乳頭水腫、認知困難、人格改變等[11]，在臨床上主要用影像學的方式檢查，包含：電腦斷層(CT)、核磁造影(magnetic resonance imaging, MRI)以及較新的正子攝影搭配顯像劑(FET PET)用以區分腫瘤和正常組織，在影像學中，腦癌的特色為

組織邊界模糊、顯影劑分布不均且周邊血管水腫等。如今用來區分 GBM 的方式為 MRI，特性有不規則顯影的腫瘤外殼、大量腫瘤浸潤且內部壞死組織等，除了臨床使用影像學檢查，目前也有研究利用腦癌的發生可能與部分基因調控相關，因此分別使用 miRNA、mRNA 偵測 [12]，希望能提供利用較不具侵略性的檢體或危險因子較低的診斷方法。

#### 4. 治療方法

目前醫療技術中並無完全治癒方法，臨床上針對 GBM 治療方式只能延長患者生存時間，標準療法包含手術切除腫瘤、每周五次放射線治療及口服化療藥物 Temozolomide(TMZ)進行輔助治療[13]，手術切除及放射線治療主要目的是清除腫瘤和阻止癌細胞擴散，而 TMZ 雖能作用於GBM 但可能損害其他正常組織及細胞且常伴隨副作用造成患者不適，另外 TMZ 有抗藥性，為此臨床需要更有專一性治療方式，近年來有研究使用 THC 及 TMZ 混合治療抑制GBM 生長[14]、發現 IL-13RA2 具有腫瘤細胞特異性且與腦癌發生相關[15]等做為未來治療GBM 方針，但都需進一步研究證實，針對 GBM 患者是否具有治療效果還不確定。

#### 二、細胞凋亡(apoptosis)

細胞凋亡是正常細胞生理機制之一，為一種細胞程序性死亡，由細胞主動進行，參與調控因子包含半胱胺酸蛋白酶(Caspase)、TRAIL、FAS、腫瘤壞死因子(TNF)等。細胞凋亡在生物體內主要分為兩種途徑，內在途徑(Intrinsic pathway)及外在途徑(Extrinsic pathway)，外在途徑中 TRAIL、FAS、TNF 會與細胞膜上的 Death receptors 結合與 FADD(Fas-associated death domain)活化 Caspase-8、-10；內在途徑則由細胞受刺激產生，常見刺激原因有 DNA 破壞、ER Stress、病毒感染、缺氧等，會使促凋亡蛋白被活化(Bax、Bak)及BH3 訊息分子釋放，當粒線體受器結合 Bax 及Bak 後，細胞色素(Cytochrome C)會與 APAF1 一同活化Caspase-9，最後內在與外在路徑都會活化 Effector Caspase(Caspase-3、-6、-7)使細胞收縮、核濃縮、核碎裂、蛋白質被破壞，最後細胞走向死亡，殘骸由白血球吞噬清除。細胞凋亡調控常見於腫瘤發生，腫瘤細胞透過抑制促凋亡蛋白使細胞不斷增長，因此細胞凋亡在癌症研究中有重要作用。[16]

#### 三、細胞自噬(autophagy)

是一種自我降解過程，電子顯微鏡顯示細胞將物質送到溶酶體(lysosomes)進行分解，主要功能有清除胞內老舊胞器、降解毒性蛋白及不必需成分，能為細胞提供乾淨的生理環境，亦能在短暫壓力出現時為細胞提供能量維持細胞存活。體中巨噬細胞及白血球含有較多溶酶體，能將外來感染源透過內吞作用進入細胞，隨後與溶酶體結合並分解；胞內自噬作用則會先形成不含水解酶自噬小體(Autophagosome)[17]。自噬作用形成始於吞噬泡(Phagophore)，受許多基因及訊息傳遞路徑調控，如:PI3K complex、mTORC1 complex、Unc-51-like kinase 1(ULK1)等[18]，PI3K-III能促使吞噬泡延伸和吸引 ATG 蛋白[19]，隨著 ATG、LC3 等蛋白活化，形成能包覆胞器及廢物自噬小體，最終與溶酶體結合，使自噬小體內容物被分解。近年來許多研究認為細胞自噬調控具有抗癌潛力，細胞自噬在癌症有兩種完全不同作用，能夠抑制良性腫瘤生長，也有助於晚期癌細胞存活[20]，據觀察 40~75% 乳腺癌、卵巢癌及前列腺癌因缺失 BECN1(ATG6)等位基因造成自噬作用減少及腫瘤細胞增多[21]。另有研究指出，包括肺癌、前列腺癌、胰腺癌及肝癌，部分侵襲性腫瘤 SQSTM1(p62)表現量上升，因此 SQSTM1(p62)的表現可用於評估自噬抑制劑用於癌症療效。[22]

#### 四、氧化壓力(Oxidative stress)

活性氧類(Reactive oxygen species,ROS)包含過氧化物、氧離子及含氧自由基等，正常細胞

內粒腺體及酵素反應都會產生，當細胞受到氧化應激時，產生抗氧化反應失效及 ROS 水平失衡，造成細胞內帶有電子的活性氧類含量上升，藉由調控細胞凋亡、造成蛋白質或 DNA 損傷等方式影響細胞生長，許多研究中也透過 ROS 有效誘導癌細胞死亡例子[23, 24]。ROS 能透過改變基因表達促進腫瘤生長，其中鳥糞嘌呤修飾異常造成基因突變可能引發促癌基因活化[25]誘導 *Ras*、*TP53* 等促癌基因表達[26]，另外 ROS 亦能透過調控蛋白質路徑方式調控腫瘤生長，相關蛋白包含:ERK、p53、JNK 等，透過 ROS 的作用抑制癌細胞增生，因此氧化壓力也常用於癌症治療。

## 五、原薯蕷皂苷(Protodioscin)

原薯蕷皂苷(Protodioscin,PD)是一種皂苷化合物(saponin)，化學式為  $C_{51}H_{84}O_{22}$ ，萃取自蒺藜、葫蘆巴(fenugreek)等中草藥根莖部，據中醫典籍中記載屬於瘀血藥，其主要功能為壯陽，也用於肝病、止癢、去除癍痕等。過去研究中 PD 用於抗發炎、抗血脂及誘導細胞凋亡，近年來發現PD 能透過增加 PI3K / AKT / Nrf2 途徑活性並增強 miR-124 表達，抑制氧化壓力造成細胞凋亡，減緩葡萄糖剝奪對嗜鉻細胞瘤(PC12)造成損傷[27]，在高果糖飲食的代謝綜合症和腎損傷中，抑制 NF- $\kappa$ B, c-Jun N-terminal kinase, p38 mitogen-activated protein kinase 活化能顯著改善葡萄糖耐受量[28]，癌症研究中，原薯蕷皂苷對許多癌細胞均具有細胞毒性，特別是白血病、前列腺癌及結腸癌[29]，子宮頸癌研究中，PD 透過誘導 JNK/p38 路徑導致粒線體功能缺失及細胞凋亡，顯示PD 用於子宮頸癌治療中具有未來性[30]，此外PD 也用於白血病治療，能造成 HL-60 細胞凋亡及有效抑制生長[31]，但對於 PD 用於腦癌治療效果及作用機制尚不清楚，因此本次的究選用 PD 作為 GBM 治療藥物進行探討。

### (三) 研究方法及步驟

#### 細胞培養

GBM-8401、M059K 細胞株在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養條件下，分別用兩種培養液培養於 10cm dish，GBM-8401 用 RPMI 含有 10 % fetal bovine serum、100 units/mL penicillin 和 100  $\mu$ g/mL streptomycin；M059K 則用 F12 含 10 % fetal bovine serum、100 units/mL penicillin 和 100  $\mu$ g/mL streptomycin、2.2 g/L sodium pyruvate、2.5 ml Non-Essential Amino Acids Solution，兩者都須定時觀察確認細胞狀況並更換培養液。

#### MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

在 24-well plate(CELLSTAR®)中分別接種  $6 \times 10^4$  細胞/well 的 GBM-8401 及  $3 \times 10^4$  細胞/well 的 M059K 培養 24 小時後加入不同濃度 Protodioscin(0、3、6、12、18、24  $\mu$ M)並於 24 小時後吸除培養液，每 well 加入 200  $\mu$ l 的 MTT 試劑及細胞培養液混合溶液(兩者比例為 1:9)，於培養箱內靜置 2 小時後吸除上清液，加入 500  $\mu$ l 異丙醇(isopropanol)用 ELISA reader 以波長 570nm 讀取吸光值，並將結果整理繪製出圖表。

#### Annexin V/PI

GBM-8401、M059K 細胞株分別接種  $6 \times 10^5$  個/dish 及  $3 \times 10^5$  個/dish 於 6cm dish 內，經過一天後，在每個 dish 加入不同濃度 Protodioscin(0、6、12、18  $\mu$ M)，24 小時後，觀察細胞型態及數目，確認與 MTT 結果相似後用 Trypsin 將細胞與 dish 分離，離心 2000rpm 5min 後吸除上清液並用 PBS 回溶後再次離心吸除上清液，使用 Muse<sup>R</sup> Annexin V & Dead cell kit 避光染色 10 分鐘後用流式細胞儀上機分析。

### **粒線體膜電位(Mitochondrial membrane potential,MMP)**

在染色前的處理方式皆與 Annexin V/PI 相同，差別在於離心吸除 PBS 後需使用 Muse<sup>R</sup> MitoPotential kit 進行避光染色 20 分鐘，最後用流式細胞儀上機分析。

### **細胞內酸性囊狀胞器 (Acidic vesicular organelles,AVOs) 測定**

將GBM-8401 接種  $3 \times 10^5$  個細胞/well 在 6-well plate 中培養 24 小時，每格加入不同濃度 Protodioscin(0、6、12、18  $\mu$ M)培養 24 小時後加入吡啶橙 (acridine orange, AO) 及 hoechst 33342 染色 30 分鐘，再用 PBS wash 兩次後用多重螢光細胞組織掃描系統上機。

### **氧化壓力分析(Reactive Oxygen Species,ROS)**

將GBM-8401 接種  $6 \times 10^5$  於 6cm dish 內，經過一天培養及 24 小時加藥處理後加入 DCF-DA 染劑，避光染色 30 分鐘後收細胞，使細胞溶於 PBS 內，用流式細胞儀上機分析結果。

### **蛋白萃取定量**

GBM-8401、M059K 細胞株分別接種  $6 \times 10^5$  個/dish 及  $3 \times 10^5$  個/dish 於 6cm dish 內，經過一天的培養及 Protodioscin(0、6、12、18  $\mu$ M)加藥處理後，Trypsin 收細胞，用 PBS 清洗並離心 3000 rpm 5 min，加入 NETN 破壞細胞膜及阻止蛋白降解，在超音波震碎細胞後於 4°C 條件下離心 13000 rpm 20 min，最終取出上清液用 Bradford 法進行蛋白質定量，Coomassie BrilliantBlue G-250(CBG)與蛋白質結合後會從紅棕色轉變成藍色，混合均勻後用 ELISA reader 波長設定為 595nm 測量吸光值，用內插法換算對應的蛋白質濃度，最終用取得的蛋白質、NETN 及 loading dye 配置成相同濃度的樣品。

### **西方墨點法**

依照蛋白質分子量配置膠體(8-12% SDS-PAGE)，以特定比的 1M tris pH=6.8、1.5 M tris pH=8.8，30% acrylamide、10% SDS、10% APS、TEMED 分別配置上膠與下膠，並依序加入 marker 及樣品，並設定 80 V 120 min 進行電泳，隨後設定 100 V 90 min 將膠體上的蛋白轉漬到 PVDF 膜上，配置 blocking buffer(TBST 及奶粉比例為 20:1)混合均勻後放入轉漬完的 PVDF 膜進行 blocking 一小時，TBST(TBS+0.1% Tween-20)清洗後加入稀釋的一級抗體(1:2500)，並放置在 4°C 環境下反應至隔天，吸除一級抗體後用 TBST 清洗 10 分鐘重複 3 次，加入與一級抗體對應二級抗體 (1:2500) 反應 2 小時，接著用 TBST 重複清洗 3 次，用 Immobilon<sup>R</sup> Western(Chemiluminescent HRP Substrate)呈色，用化學冷光儀(ImageQuant LAS 4000 Mini)進行分析。

#### (四) 結果

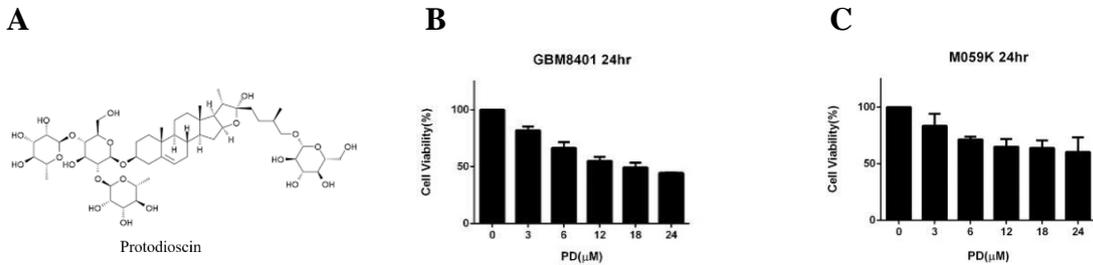
##### -實驗設計

本研究一開始先測定 Protodioscin 是否影響 GBM 細胞毒性及生長速率，分別利用以下方式進行研究，進而得到初步研究成果：

細胞生長及毒性測試	1. <b>MTT</b> : GBM-8401、M059K 用 Protodioscin 加入不同濃度(0-24 $\mu$ M)分別放置 24 小時，以 MTT 方式探討藥物濃度與細胞株敏感度關係。 2. <b>細胞型態</b> :利用顯微鏡觀察 GBM-8401 及M059K 細胞型態經過藥物處理後的變化。
細胞自噬/細胞凋亡	3. <b>Annexin V/PI</b> :利用 Annexin V 實驗分析，在不同濃度 Protodioscin 情況下(0,6,12,18 $\mu$ M)處理 24 小時，分析 Protodioscin 是否導致細胞凋亡。 4. <b>粒線體膜電位分析</b> :流式細胞儀上機分析不同Protodioscin 濃度處理是否能促使粒線體膜電位發生改變。 5. <b>細胞自噬作用</b> :將Protodioscin 處理後的細胞進行 AO 染色，探討 Protodioscin 是否引發細胞株產生自噬作用。 6. <b>ROS</b> : 利用DCF-DA 分析Protodioscin 對細胞內自由基影響。
凋亡自噬訊息傳遞路徑	7. <b>凋亡相關蛋白</b> :利用西方墨點法分析Protodioscin 是否造成細胞凋亡相關蛋白(如:caspase-3/-9/-8、PARP)表現量變化。 8. <b>自噬相關蛋白</b> :利用西方墨點法分析Protodioscin 是否影響細胞自噬調控蛋白表現(如:LC3 $\beta$ 、p62、ATG)。 9. <b>PI3K / AKT / mTOR 途徑</b> :利用西方墨點法分析 Protodioscin 是否影響此訊息傳遞路徑，並促進細胞凋亡/細胞自噬。

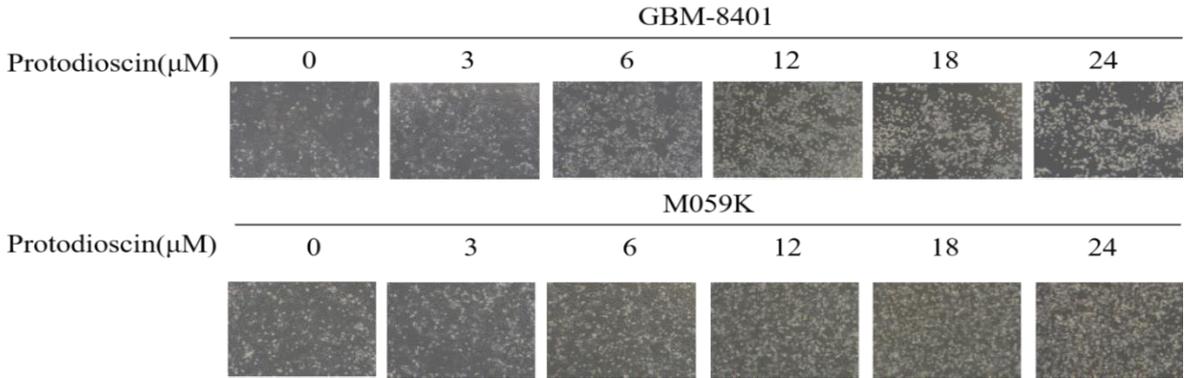
**-實驗結果**

1. 利用 MTT 試驗分析 Protodioscin(圖一，Protodioscin 化學結構圖)對GBM-8401(圖一-B)及M059K(圖一-C)的細胞存活率變化。結果發現當 Protodioscin 濃度上升時，GBM 細胞株存活率隨之下降，可以推測Protodioscin 對GBM-8401 及M059K 具細胞毒性。



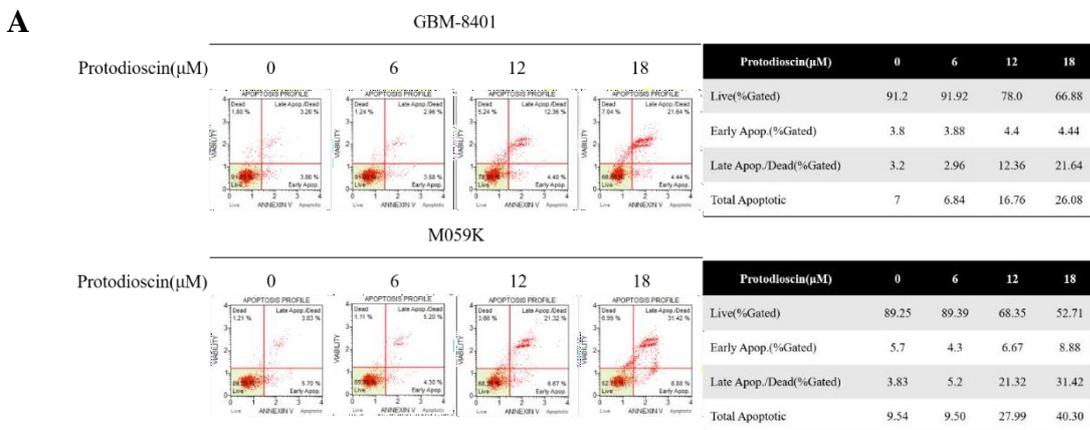
(圖一)

2. 利用顯微鏡觀察在 100 倍視野下細胞型態及數量變化，可以發現當藥物濃度上升時細胞數量明顯下降且有形態改變，GBM-8401 及M059K 細胞膜明顯皺縮。

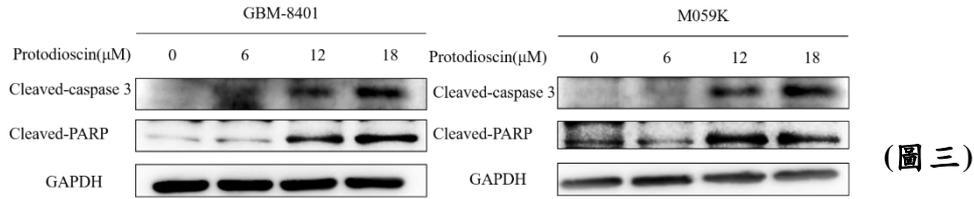


(圖二)

3. 利用 Annexin V/PI 實驗，觀察 GBM-8401 及M059K 細胞用 Protodioscin(0,6,12,18μM)處理後細胞凋亡比例變化，可知在藥物濃度為 12μM、18Mm 時凋亡比例明顯上升，其中以晚期凋亡比例數值變化最明顯，在西方墨點法中也可以獲得相同的印證，cleaved-caspase 3、cleaved-PARP 蛋白在濃度為 12μM、18Mm 時表現明顯上升(圖三B)。

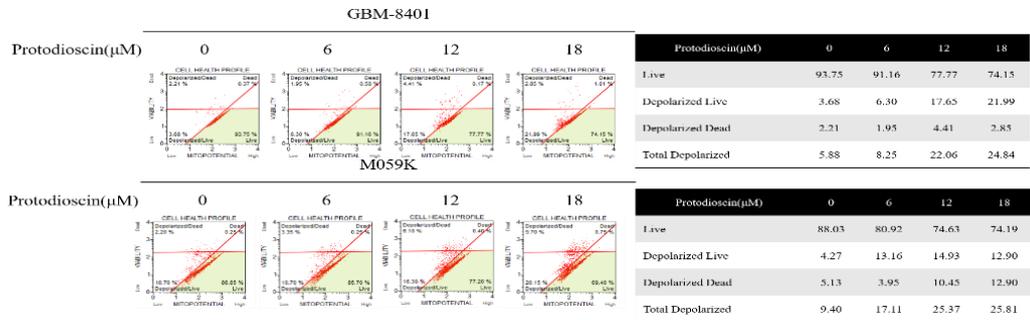


**B**

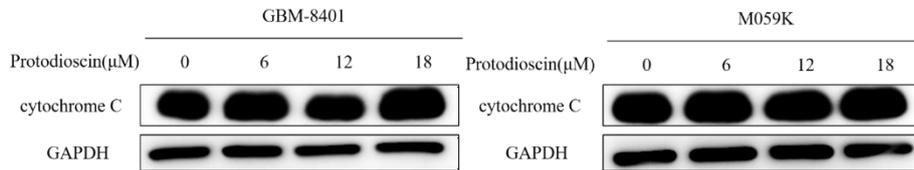


4. 透過粒線體膜電位實驗可以發現，當 Protodioscin 濃度上升時，GBM-8401 及 M059K 細胞的粒線體膜去極化的比例也上升，尤其是高濃度時(12μM、18μM)與未加藥處理有明顯區別(皆相差10%以上，圖四A)，然而西方墨點法中 cytochrome C 並沒有變化。(圖四B)

**A**

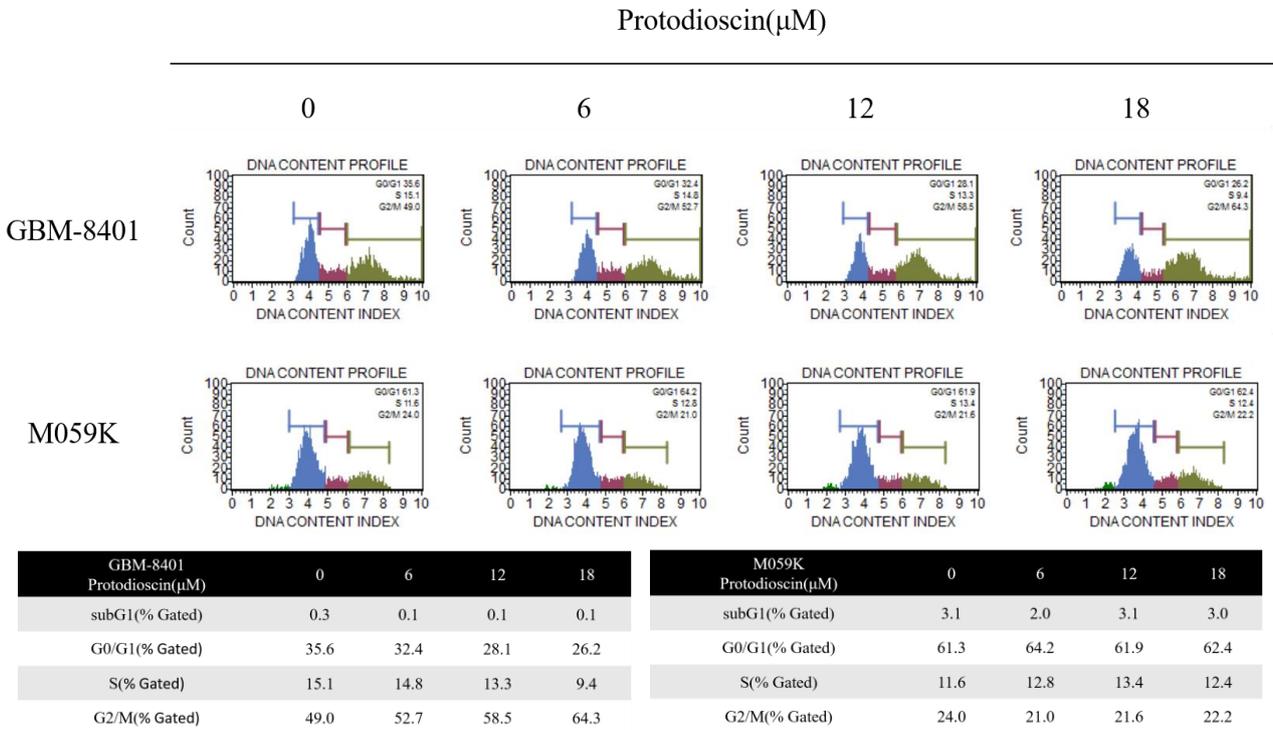


**B**



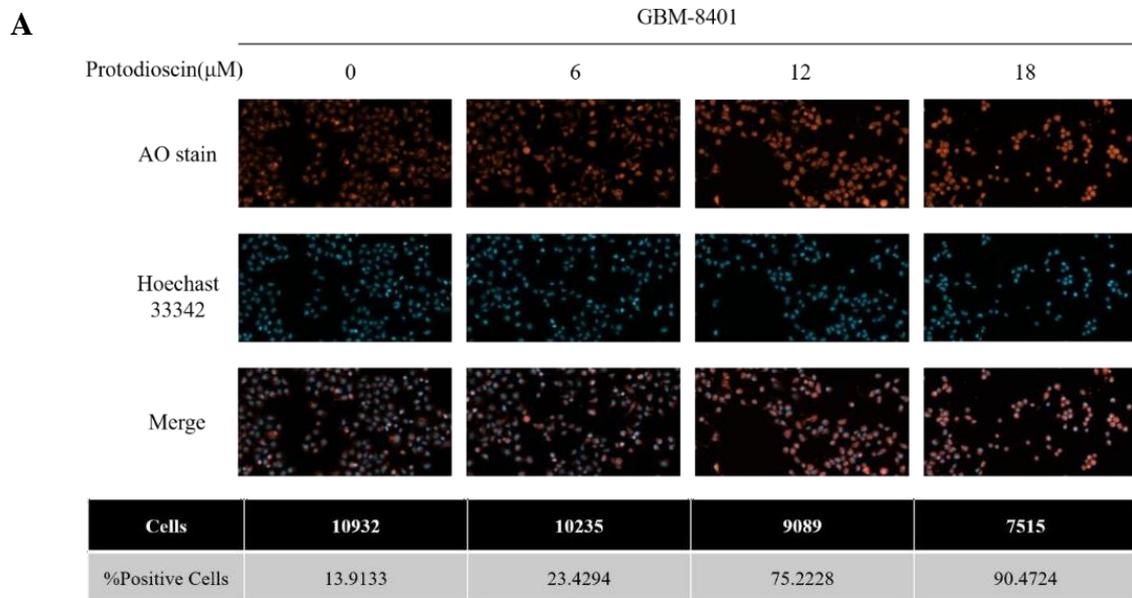
(圖四)

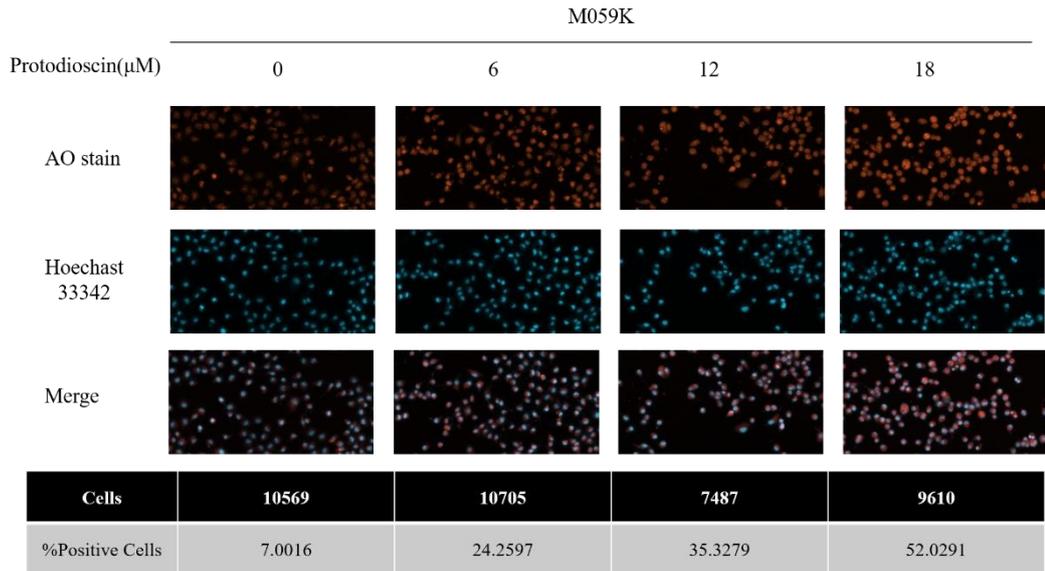
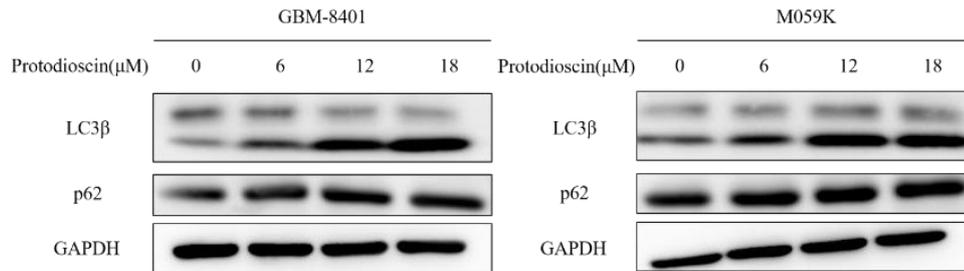
5. 以PI染色並透過流式細胞儀分析PD對細胞週期的影響，依據實驗結果，可以發現PD對GBM-8401與M059K的影響有差異，GBM-8401在PD處理下G2/M期上升約10%，而M059K並無明顯差異。



(圖五)

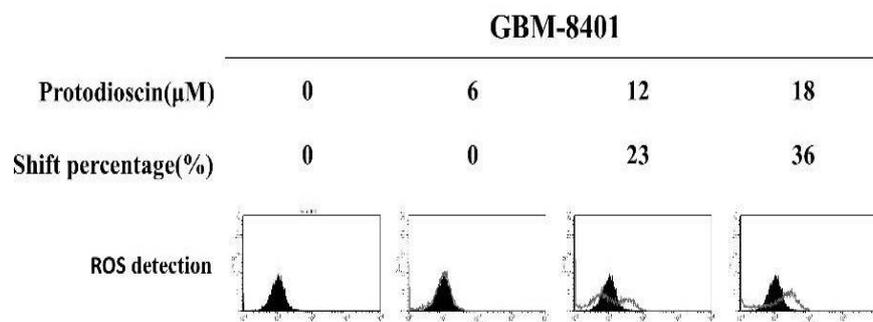
6. 用AO染色處理，多重螢光細胞組織掃描分析GBM-8401與M059K在經過Protodioscin處理後細胞自噬作用的變化，橘紅色為細胞酸性囊泡，藍色為核，加藥濃度越高，橘紅色螢光強度越強(% Positive Cells 比例上升，圖六A、圖六B)；西方墨點法中LC3 $\beta$ 表現量在高濃度時上升，p62則無明顯變化(圖六B)。

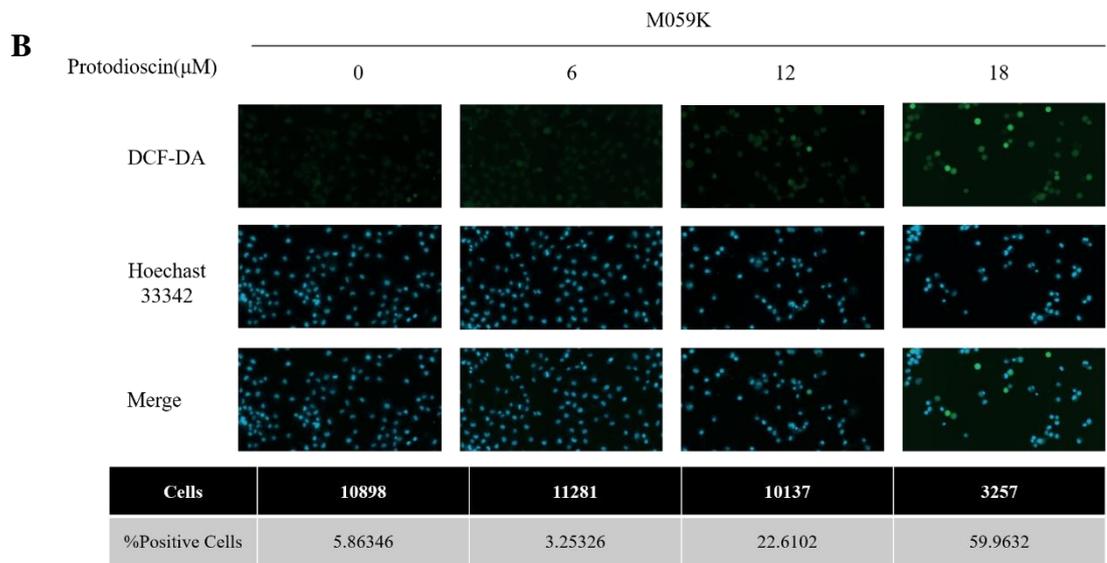


**B****C**

(圖六)

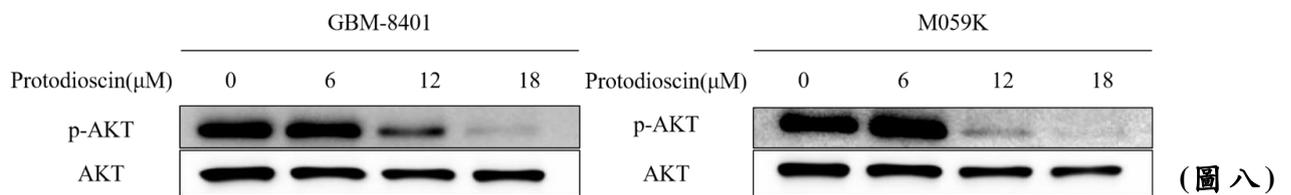
7. 為了探討藥物是否透過引起細胞內 ROS 大量累積，因而導致細胞凋亡與自噬作用，細胞加藥處理後，利用 DCF-DA 染劑並使用流式細胞儀上機偵測，以及使用多重螢光細胞組織掃描分析(藍色螢光為細胞核，綠色螢光為ROS累積)。實驗結果均顯示 Protodioscin 確實有效引起細胞內 ROS 堆積，但詳細機制仍待探討。

**A**

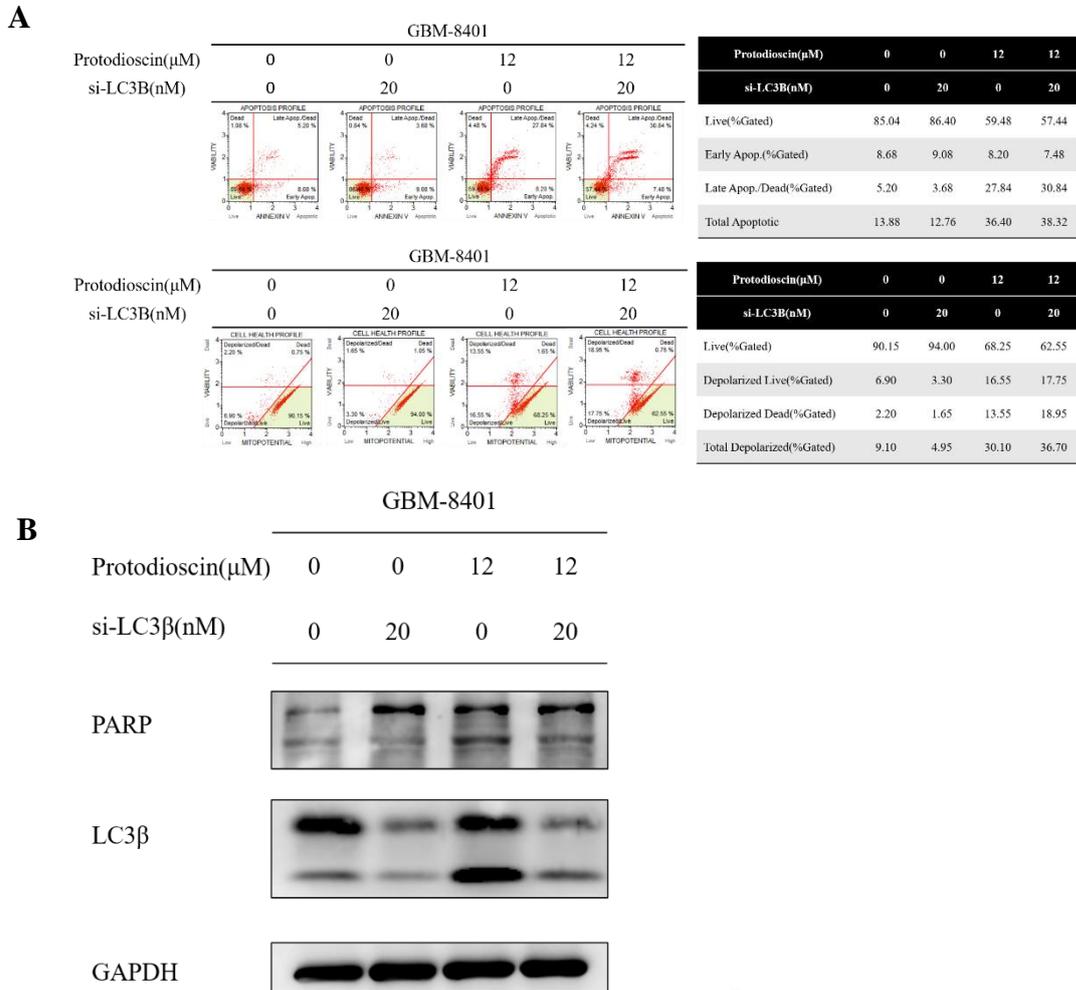


(圖七)

8. 運用西方墨點法探討 GBM-8401 及 M059K 的 PI3K / AKT / mTOR 途徑，結果顯示在濃度 12 $\mu$ M、18 $\mu$ M 狀況下磷酸化的 AKT 表現明顯下降。(圖八)

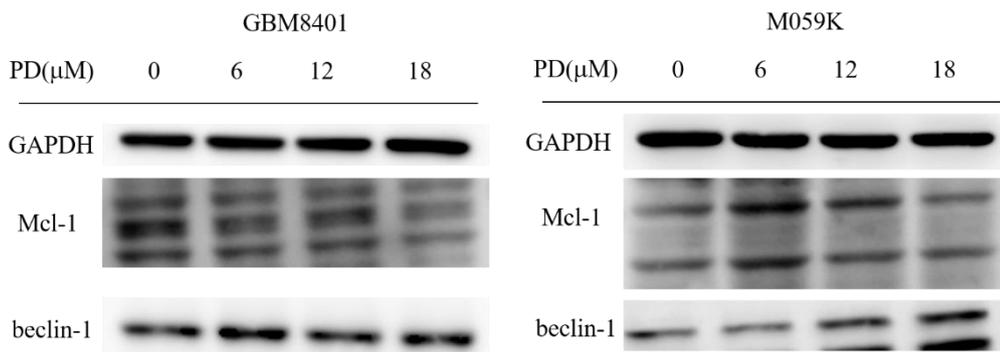


9. 為了探討PD造成細胞自噬與細胞凋亡的相關性，以si-LC3B與PD共同處理，並利用流式細胞儀觀察細胞凋亡比例與細胞膜電位的變化，可以發現西方墨點法及流式細胞儀分析si-LC3B與PD同時處理與只用PD處理均無明顯差異，可以推測PD造成的細胞自噬不是避免細胞凋亡的保護機制。(圖九)



(圖九)

10. 在西方墨點法的實驗結果中，發現在18 $\mu$ M PD處理的狀況下Mcl-1蛋白表現下降，而 beclin-1(BECN1)表現無明顯變化。(圖十)



(圖十)

## (五) 討論

在所有癌症中，罹患多形性膠質母細胞瘤比例並不高，卻是常見的惡性腫瘤之一，具有惡性程度高及五年內存活率低等特性，儘管目前有手術治療、放射線治療、化學療法治療方式，在臨床治療中仍相當棘手，為此許多學者仍努力研發新的治療藥物與治療方式，天然藥物的研發在其中便具有一席之地。本篇研究計畫以天然中草藥萃取物—原薯蕷皂苷(Protodioscin,PD)作為治療藥物，觀察對膠質母細胞瘤造成的影響與探討相關分子機制，在過去的文獻中可以發現Protodioscin具有抑制細胞生長、促使細胞凋亡、破壞粒線體功能等作用，然而尚未發現Protodioscin對膠質母細胞瘤的相關作用方式。

根據本次實驗結果，在MTT試驗中印證Protodioscin能夠產生細胞毒性，細胞存活率隨著Protodioscin濃度上升而下降，另外在顯微鏡觀察中可以發現細胞型態皺縮，因此透過流式細胞儀進行Annexin V/PI、Mitochondrial membrane potential的實驗，並運用西方墨點法進行印證(凋亡相關細胞:cleaved-PARP、cleaved-caspase 3蛋白表現上升；cytochrome C蛋白表現量無明顯差異)，可以推測出在高濃度的Protodioscin狀況下，細胞有晚期凋亡的現象與粒線體膜電位的變化。而在藥物作用下GBM-8401、M059K兩者細胞週期的變化並不相同，GBM-8401在高濃度Protodioscin作用下會G2/M arrest、M059K則無差別，但相關原因與機制尚不清楚。另外以AO stain進行觀察，發現細胞在Protodioscin作用下也有自噬的現象(西方墨點法LC3B蛋白表現上升、p62蛋白表現無明顯差異)，為探討造成細胞凋亡與細胞自噬的途徑是否與細胞內自由基有關，利用DCF-DA處理，證實細胞內的氧化壓力會隨著藥物濃度上升。根據其他研究發現GBM能透過PI3K / AKT / mTOR途徑誘導細胞凋亡與細胞自噬，回顧實驗結果圖八磷酸化的AKT表現下降，推測Protodioscin亦是透過相同途徑同時誘導細胞凋亡與細胞自噬。細胞凋亡與細胞自噬的相關性也是本篇研究計畫想探討的重點，利用Transfection的方式，加入si-LC3B抑制細胞自噬並觀察細胞凋亡的相關因素，發現在si-LC3B與Protodioscin共同處理下，細胞凋亡比例、細胞膜電位、凋亡相關蛋白表現均無明顯差異，證實Protodioscin誘導的細胞自噬現象並非避免細胞進行凋亡的保護機制；Mcl-1為抗凋亡蛋白，在其他研究中指出Mcl-1蛋白表現下降會誘導beclin-1/Mcl-1 complex 解離，使beclin-1促使細胞自噬 [32]，結合圖十實驗結果發現Mcl-1的表現在Protodioscin濃度增加時下降，beclin-1無明顯改變，因此推測Mcl-1與beclin-1的交互作用可能在細胞凋亡與細胞自噬的調節中具有關鍵的地位，綜合以上敘述，PI3K / AKT / mTOR途徑是否影響Mcl-1表現下降與beclin-1/Mcl-1 complex對於細胞凋亡與細胞自噬的調節仍需要進一步的研究進行印證。

未來的實驗將印證詳細的分子機制，透過抑制劑、si-RNA等方式觀察西方墨點法蛋白質表現變化進行印證，並透過qPCR尋找是否有相關基因參與細胞凋亡與細胞自噬路徑的調控；在動物實驗的層次，與現今的腦癌治療藥物進行比較，評估Protodioscin對於腦癌的治療效果與生物安全性。

1. 選用細胞凋亡或細胞自噬抑制劑、si-RNA、NAC處理等抑制方式，反向證明上述實驗所推測的結果，並找出分子間的確切交互作用。
2. 以qPCR分析Protodioscin對細胞凋亡、細胞自噬相關基因的表現，分析關鍵調控基因與該基因如何調控相關分子的表現。

3. 利用動物實驗，將 GBM以背部注射進入老鼠體內，觀察經 Protodioscin治療後的小鼠背部腫瘤的變化及有無造成癌細胞凋亡。
4. 根據相關研究發現TMZ無法改善約 50% 患者的存活率 [33](例如 :1p/19q gene deletion[34]、且治療後生存率時間短，為此有相關學者將其他藥物與 TMZ合併用於治療，希望找出能提高存活率的方式 [35]，將這個觀點用於本次實驗，將小鼠進行分組，比較混合使用 Protodioscin與 TMZ(目前腦癌標準化療藥)與單純使用單一藥物何者較能有效抑制腫瘤生長，或者在合併使用的狀況下是否能對 GBM的治療做出改變，尋找新的治療方式。

## (六) 參考文獻

1. Davis, M.E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. Clin J Oncol Nurs, 2016. **20**(5 Suppl): p. S2-8.
2. Witthayanuwat, S., et al., *Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(9): p. 2613-2617.
3. Zhang, Z., et al., *Exosomal transfer of long non-coding RNA SBF2-AS1 enhances chemoresistance to temozolomide in glioblastoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 166.
4. Jiapaer, S., et al., *Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma*. Neurol Med Chir (Tokyo), 2018. **58**(10): p. 405-421.
5. Gould, J., *Breaking down the epidemiology of brain cancer*. Nature, 2018. **561**(7724): p. S40-S41.
6. Shah, V. and P. Kochar, *Brain Cancer: Implication to Disease, Therapeutic Strategies and Tumor Targeted Drug Delivery Approaches*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2018. **13**(1):p. 70-85.
7. Weller, M., et al., *Glioma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15017.
8. Tamimi, A.F. and M. Juweid, *Epidemiology and Outcome of Glioblastoma*, in *Glioblastoma*, S.De Vleeschouwer, Editor. 2017, Codon Publications
9. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
10. Ostrom, Q.T., et al., *The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review*. Neuro Oncol, 2014. **16**(7): p. 896-913.
11. Omuro, A. and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. Jama, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
12. Basu, B. and M.K. Ghosh, *Extracellular Vesicles in Glioma: From Diagnosis to Therapy*. Bioessays, 2019. **41**(7): p. e1800245.
13. Alifieris, C. and D.T. Trafalis, *Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment*. Pharmacol Ther, 2015. **152**: p. 63-82.
14. López-Valero, I., et al., *Targeting Glioma Initiating Cells with A combined therapy of cannabinoids and temozolomide*. Biochem Pharmacol, 2018. **157**: p. 266-274.
15. Sharma, P. and W. Debinski, *Receptor-Targeted Glial Brain Tumor Therapies*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
16. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**(1): p. 87.
17. Ohsumi, Y., *Historical landmarks of autophagy research*. Cell Res, 2014. **24**(1): p. 9-23.
18. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 3-12.
19. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.

20. Onorati, A.V., et al., *Targeting autophagy in cancer*. *Cancer*, 2018. **124**(16): p. 3307-3318.
21. White, E., J.M. Mehnert, and C.S. Chan, *Autophagy, Metabolism, and Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(22): p. 5037-46.
22. Amaravadi, R.K., A.C. Kimmelman, and J. Debnath, *Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions*. *Cancer Discov*, 2019. **9**(9): p. 1167-1181.
23. Ma, Y., et al., *High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(222): p. 222ra18.
24. Zulato, E., et al., *LKB1 loss is associated with glutathione deficiency under oxidative stress and sensitivity of cancer cells to cytotoxic drugs and  $\gamma$ -irradiation*. *Biochem Pharmacol*, 2018. **156**: p. 479-490.
25. Lunec, J., et al., *Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo?* *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(7): p. 875-85.
26. Tudek, B., et al., *Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging*. *Am J Transl Res*, 2010. **2**(3): p. 254-84.
27. Shu, K. and Y. Zhang, *Protodioscin protects PC12 cells against oxygen and glucose deprivation-induced injury through miR-124/AKT/Nrf2 pathway*. *Cell Stress Chaperones*, 2019. **24**(6): p. 1091-1099.
28. Shen, J., et al., *Protodioscin ameliorates fructose-induced renal injury via inhibition of the mitogen activated protein kinase pathway*. *Phytomedicine*, 2016. **23**(12): p. 1504-1510.
29. Hu, K. and X. Yao, *Protodioscin (NSC-698 796): its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel*. *Planta Med*, 2002. **68**(4): p. 297-301.
30. Lin, C.L., et al., *Protodioscin Induces Apoptosis Through ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress via the JNK/p38 Activation Pathways in Human Cervical Cancer Cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **46**(1): p. 322-334.
31. Oyama, M., et al., *Protodioscin, Isolated from the Rhizome of Dioscorea tokoro Collected in Northern Japan is the Major Antiproliferative Compound to HL-60 Leukemic Cells*. *Curr Bioact Compd*, 2017. **13**(2): p. 170-174.
32. Sharma A, Singh K, Mazumder S, Hill BT, Kalaycio M, Almasan A. *BECN1 and BIM interactions with MCL-1 determine fludarabine resistance in leukemic B cells*. *Cell Death Dis*. 2013 May 16;4(5):e628. doi: 10.1038/cddis.2013.155. PMID: 23681223; PMCID: PMC3674362.
33. Karachi, A., et al., *Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2018. **20**(12): p. 1566-1572.
34. McDuff, S.G.R., et al., *Radiation and chemotherapy for high-risk lower grade gliomas: Choosing between temozolomide and PCV*. *Cancer Med*, 2020. **9**(1): p. 3-11.
35. Prados, M.D., et al., *Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(4): p. 579-84.

### (七) 需要指導教授指導內容

實驗原理與設計	實驗方法與操作
<ol style="list-style-type: none"><li>1. 研究目標：討論研究目標並定期討論可行的研究方向及相關的實驗。</li><li>2. 文獻搜索：了解實驗原理目的，學習使用學校及網路的資源進行自主學習。</li><li>3. 數據整理：將實驗結果進行統整，並學習分析與判讀實驗結果，討論可能影響實驗結果的原因。</li><li>4. 實驗結果：理清實驗架構及因果關係，並系統性運用所學分析實驗成果。期望未來能研究更透徹，並發表於國際期刊，甚至能於臨床進行使用造福社會。</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 實驗儀器:掌握各類分析儀器的操作，包含:流式細胞儀、冷光呈色儀、ELISA 等儀器。</li><li>2. 實驗方法：熟悉實驗步驟及實驗注意事項，如:細胞培養、蛋白質定量、西方墨點法等實驗流程。</li></ol>