

編號：CCMP97-RD-010

蟾蜍靈及華蟾精抑制人類前列腺癌細胞生長之作用機轉

王錫崗
台灣調適科學會

摘要

前列腺癌已成為美國男性最普遍且年齡相關的癌症之一，在亞洲，近年來男性罹患前列腺癌的發生率及死亡率逐年增高。前人研究顯示，蟾酥類強心藥物可導致不同腫瘤細胞停止生長或凋亡，但此種藥物對於前列腺癌細胞之影響的探討則不清楚。本研究選用蟾酥類強心藥物中的蟾蜍靈 (bufalin) 及華蟾精 (cinobufagin)，探討藥物對雄性素依賴性人類前列腺癌細胞株 LNCaP 及非雄性素依賴性人類前列腺癌細胞株 DU145 及 PC3 之抗增殖和誘發細胞凋亡的效應與作用機轉。人類前列腺癌細胞 (LNCaP, DU145 和 PC) 之增殖情況是利用 MTT 法來測量，並且計算蟾蜍靈及華蟾精抑制細胞增殖 50% 所需之濃度 (50% inhibition concentration, IC_{50})，以及細胞倍增時間 (doubling time, tD) 的改變。呈色檢測套組用來分析 caspase 3 之活性，而西方墨點分析法則用來檢測與細胞凋亡相關蛋白的表現量。本研究利用 siRNA-Fas 轉殖法以及免疫螢光染色法觀察細胞膜 Fas 的表現，進一步檢測 Fas 是否為蟾蜍靈及華蟾精造成細胞凋亡的主要分子。三種人類前列腺癌細胞株之倍增速率顯著受到蟾蜍靈或華蟾精之抑制，此抑制效果在前列腺癌細胞比在正常人類腎小球細胞顯著。蟾蜍靈對於三種細胞株的 IC_{50} 皆比華蟾精小，表示蟾蜍靈對於前列腺癌細胞的抑制生長效果比華蟾精強。細胞內 caspases 活性、caspases 蛋白表現量、caspase 上游調控細胞凋亡機轉的 Bax 及 cytochrome c 蛋白表現量皆因藥物作用而增加。只有在 LNCaP 細胞中，p53 的表現會因藥物處理而增加，然而，細胞表面 Fas 的表現則是在 p53 突變的 DU145 和 PC3 細胞中較為顯著。將細胞轉殖 siRNA-Fas 則可部分回復蟾蜍靈和華蟾精所造成的抑制細胞存活之效應。由上述結果可推測，蟾蜍靈或華蟾

精對於三種前列腺癌細胞株都有抑制生長和促進細胞凋亡的作用，唯此三種細胞株對藥物之反應程度不盡相同。藥物促進前列腺癌細胞凋亡的可能路徑為透過 Bax 插到粒腺體外膜，改變粒腺體膜電位而釋放 cytochrome *c*，最後活化一連串 caspases 酵素，造成細胞凋亡。在此上游的調控因子在雄性素依賴性前列腺癌 LNCaP 細胞為 p53 和 Fas；而在非雄性素依賴性前列腺癌 DU145 和 PC3 細胞中則為 Fas。

關鍵詞：蟾蜍二烯羧酸內酯，前列腺癌，細胞凋亡

編號：CCMP97-RD-010

Inhibitory Mechanisms of Bufalin and Cinobufagin on the Growth of Human Prostate Cancer Cell Lines

Paulus S. Wang
Society of Adaptive Science in Taiwan

ABSTRACT

Prostate cancer reveals the highest incidence in the United States, and becomes the major concern in Asian countries. Bufadienolides are extracts of toxic glands from toads, and used as anticancer agents mainly on leukemia cells. In this study, the antiproliferative and the apoptotic mechanism of bufalin and cinobufagin on the prostate cancer cells were investigated. Cell proliferation of LNCaP, DU145 and PC3 cells was measured by MTT assay, and calculated for the 50% inhibition concentration (IC_{50}) and the doubling time (tD). The caspase 3 activity was examined by colorimetric kit. The expressions of caspases and other apoptotic-related proteins were determined by Western blot. To further investigate whether Fas was the major mediator of bufalin- and cinobufagin-induced cell apoptosis, transfection of siRNA-*Fas* and immunofluorescent staining of cell membrane Fas were employed. Bufalin and cinobufagin caused the changes of tD in three prostate cancer cell lines, which were more significant than that in human mesangial cells (HMC). After treatment, the caspase 3 activity and protein expressions of caspase-3, -8, and -9 were elevated. Other expressions of apoptotic modulators including mitochondrial Bax and cytosolic cytochrome *c* were also increased. However, expression of p53 was only enhanced in LNCaP cells. Furthermore, the increased expression of Fas was more significant in DU145 and PC3 cells with mutant p53 than LNCaP cells. Transfection of siRNA-*Fas* restored the cell viability in bufadienolides-treated cells. These results suggested that bufalin and cinobufagin suppressed the

proliferation and caused cell apoptosis in prostate cancer cells via a sequence of apoptotic modulators, including Bax, cytochrome *c*, and caspases. The upstream mediators might be p53 and Fas in androgen-dependent LNCaP cells and Fas in androgen-independent DU145 and PC3 cells.

Keywords: Bufadienolides, Prostate cancer, Apoptosis, Fas

壹、前言

一、蟾酥的來源與應用

蟾酥是一種常用的傳統中藥，主要作用為強心和局部麻醉。在日本，救心是一種常用的傳統心臟病用藥，其中之主要成分即為蟾酥。蟾酥是由中華大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans Gantor*)或黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus Schneider*)的耳後腺及皮膚腺所分泌的白色漿液經乾燥而成。蟾酥除了具有上述強心、局部麻醉的作用外，尚有使呼吸興奮、血管收縮、血壓上升及利尿的功能。基於以上的特性，蟾酥在中醫上被用來治療心力衰竭、齩齒、過敏、發炎等疾病。除此之外，蟾酥對於癌症的治療在中醫也有悠久的歷史，其機轉是：1. 增強免疫力；2. 抑制血管新生；3. 直接毒殺腫瘤細胞，可治療的癌症如胃癌、食道癌、肝癌、乳癌、子宮頸癌、淋巴瘤及白血病。

蟾酥的主要成分可分為四種：1. 具心臟活性之類固醇 (cardioactive sterols)；2. 兒茶酚胺 (catecholamines)；3. 吲哚烷基胺 (indolealkylamines)；4. 不具心臟活性之類固醇 (noncardioactive sterols)。本計畫所使用的藥物蟾蜍靈 (bufalin)及華蟾精 (cinobufagin)則是屬於具心臟活性之類固醇。蟾蜍靈是一種 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 抑制劑，其與細胞膜結合位置之親和力較哇巴因 (ouabain)為高 (Brownlee, et al., 1990; Jing, et al., 1994)，可用於降低肝癌病患疼痛之用，具有止痛效果 (Wang, et al., 1994)，此原理除了蟾蜍靈是局部麻醉劑之外，也有讓肝部血流增加以代謝污血之作用。另一方面，蟾蜍靈有抗血癌、黑色素細胞瘤及前列腺癌之特性 (Jing, et al., 1994; Yeh, et al., 2003)，其機轉除了造成細胞壞死外也啟動了造成癌細胞株的凋亡機制，其中包括細胞凋亡之調控基因如 *bcl-2* 及 *c-myc*，和一些蛋白磷酸酶如 *rac 1*、*p21-activated kinase (PAK)*、*protein kinase C (PKC)* 及 *c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)* (Kawazoe, et al., 1999)。也有學者指出，蟾蜍靈在 10^{-8} M 可以使白血病細胞株 HL-60 產生細胞凋亡，機制為抑制細胞拓撲異構酶 II (topoisomerase II) 的活性，而造成 DNA 之斷裂 (Hashimoto, et al., 1997)，比起一些抗腫瘤細胞藥物如 cisplatin 及 etoposide 所使用的劑量要低。高劑量 cinobufagin 則可以降低感染以及因化療所造成之顆粒性球減少症。所以此藥物有極大潛力可用來降低惡性血液疾病患者因化學療法所造成感染及顆粒性球減少症之危險。

二、前列腺癌之流行病學

促使癌症發生率提高的主要因子不外乎遺傳基因、生活形態、種

族、年齡、病毒感染及環境因子等，部分上述因子也參與在前列腺癌的發生過程中。早在 1970 年代，前列腺癌就是美國男性發生率最高的癌症，近年來，前列腺癌在西方國家更是發生率僅次於皮膚癌的癌症，其死亡率則只次於肺癌 (Hsing, et al., 2001)。在 2008 年，被預測有 28,660 美國男性死於前列腺癌，並且有 186,320 人被新檢測出罹患前列腺癌 (Jemal, et al., 2008)。前列腺癌的發生率在東、西方國家有近 90 倍的差異，造成差異的原因除了遺傳因子的不同外，環境因子及高脂飲食也有很大的關連。根據學者的統計，移民到美國的日本人罹患前列腺癌的機率會是本土日本人的四倍高 (Haenszel and Kurihara, 1968)。

前列腺癌已成為全世界重要的健康問題之一，無論是在高危險群或低危險群的國家中，前列腺癌的發生率皆有提高的現象，部份原因是前列腺特異抗原 (prostate specific antigen, PSA) 檢測的技術廣被運用，有助於前列腺癌的檢測 (Hsing, et al., 2001)。另外，隨著資訊傳播愈來愈發達，台灣的飲食及生活形態漸趨西化，男性罹患前列腺癌的趨勢也有逐漸升高的現象 (Chang, et al., 1997)。再者，隨著醫療的進步以及台灣人口結構老化的趨勢，前列腺癌的發生也逐年上升。根據行政院衛生署的統計顯示，前列腺癌在台灣男性的死亡率由民國 70 年每十萬人有 75 人死亡、民國 80 年每十萬人有 233 人死亡、民國 90 年每十萬人有 693 人死亡，增加至民國 96 年每十萬人中有 1,003 人死於前列腺癌，與十年前 (民國 86 年) 的 531 人相比，死亡率就增加了近一倍！而前列腺癌在男性癌症死亡率排名也從民國 70 年的第 16 名躍升為第 7 名。以上的數據顯示，前列腺癌在台灣的重程度雖然不及歐美國家，但是逐年增加的發生率及死亡率，卻讓我們不能輕忽此問題。

三、前列腺癌之診斷與治療

在前列腺癌的診斷與治療方面就是根據上述雄性素與前列腺癌的關係而設計的。在診斷上，多用 PSA 檢測作為初步的篩檢，PSA 在 1990 年代初期被發現可以作為前列腺癌的專屬腫瘤指標分子 (tumor marker)，使得初診斷為前列腺癌末期的機率自 1990 年代起大幅減少。其原理為當前列腺組織增生時，PSA 的分泌量也隨之增加，使得在血漿中會測得高於正常值 (0~4 ng/ml) 之 PSA，增生的組織有三分之一的機會為癌症組織，如此簡易的檢測方式可大大提高早期發現及治癒的機會。另外，在治療的過程中 PSA 的檢測也可代表前列腺癌細胞的生

長指標及其雄性素受體活性的高低 (Lee and Oestering, 1995; Chu, 1997), 以便因應病程調整治療的方式。在前列腺癌的治療方面, 若癌細胞仍存留在前列腺中, 有四分之一的病人會選擇前列腺切除手術, 而健康狀況不適合的病人則可給予局部放射線療法, 上述兩種方式對於原位之前列腺癌皆有 75% 的治癒效果, 並且伴隨給予荷爾蒙療法治癒比例更為提升。荷爾蒙療法的原理是, 既然雄性素為前列腺癌細胞增生所必須, 臨床醫生則利用去勢 (少用) 或給予 LHRH 的拮抗劑 (agonists) (Marumo, et al., 1999), 移除患者體內的雄性素或是阻止殘留的雄性素進入癌細胞, 因而抑制前列腺癌細胞的生長; 此時的癌細胞屬於雄性素依賴性癌細胞。然而, 臨床上卻常常發現為早期發現的病患, 在接受移除雄性素治療後十八個月左右會發生癌細胞再度增生並有轉移的現象, 雖然血中已測不到雄性素, 但是腫瘤快速長大, 並伴隨著血中 PSA 濃度再度增加, 此時癌細胞的增殖已經不受雄性素的調控 (Ornstein, et al., 1998), 是為非雄性素依賴性癌細胞。對於非雄性素依賴性癌細胞, 目前尚無有效之對策, 只知道對於有非雄性素依賴性癌細胞的病人, 仍然需要接受移除雄性素的治療, 因為這些癌細胞對於雄性素的敏感度比雄性素依賴性癌細胞更好, 可利用體內腎上腺所產生的 DHEA, 而形成高於正常細胞的增生曲線 (Hara, et al., 2003)。唯一可以試用的一些化學治療, 不但會傷害正常細胞而產生副作用, 而且效果並不理想。

四、毛地黃類藥物之介紹

近年來許多的科學家嘗試許多不同的角度研究癌症的治療及預防, 包括飲食的改善、荷爾蒙的影響、藥物的開發及基因的療法等等。其中毛地黃 (*digitalis purpurea*) 類藥物, 是廣泛用來治療心臟衰竭和處理某些心律不整的疾病, 其作用機轉是抑制細胞膜上之鈉-鉀幫浦 ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase), 促使細胞內鈣離子增加, 進而增加心肌之收縮力。 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 普遍存在於各種細胞之細胞膜上, 主要是維持細胞的靜止膜電位, 其結構由 α 及 β 兩個次單元所組成, 而毛地黃類藥物即是與 α 次單元結合, 但是在不同物種中 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 之 α 次單位胺基酸表現不同, 故與毛地黃類藥物之親和力也有所不同, 例如: 在人類, 血液中之毛地黃含量在 nmole 濃度, 而齧齒類則在 μ mole 濃度才會看到預期的療效 (Antonipillai, et al., 1996)。由本實驗室的研究發現, 毛地黃會抑制睪丸分泌睪酮 (Lin, et al., 1998), 又有其他的研究指出毛地黃具有抑制乳癌細胞的生長的作用 (Stenkivist, 1999)。而本實驗室的研

究也證實了毛地黃類藥物，包括了毛地黃中的毛地黃毒苷 (digitoxin)、長葉毛地黃苷 (digoxin) 及哇巴因 (ouabain) 和蟾酥中的蟾蜍靈 (bufaline) 及華蟾精 (cinobufagin) 對於前列腺癌增殖具有抑制的效果，並且會造成癌細胞凋亡 (apoptosis) (Yeh, et al., 2001; Yeh, et al., 2003)。因此，本研究計畫擬以三種前列腺癌細胞株，包括了雄性素依賴性之癌細胞株-LNCAp，以及非雄性素依賴性之癌細胞株-DU145、PC3，以離體的實驗設計，探討蟾蜍靈及華蟾精對前列腺癌細胞增殖之毒理效應，以及蟾酥類藥物造成細胞凋亡的作用機轉，以期進一步應用在活體動物實驗上，最後對前列腺癌之治療有所幫助。

五、細胞凋亡的定義

細胞從複製、老化到死亡，這一連串的過程都由嚴謹而精密的機制逐一調控著，使得器官的功能得到良好的發揮，體內的細胞數目也能得到恆定。但是，若有部份的細胞因為受到致癌物的破壞或是自行產生突變，造成了基因體的改變，而使細胞產生變性 (transformation) 的現象，這會造成細胞不正常地快速增生 (Michalides, 1999)，這些生長不受到限制的細胞就稱為癌細胞 (tumor cells)，癌細胞與正常細胞不同的地方是在(一)、失去了生長增殖的調控，也就是癌細胞的細胞週期失去了控制；(二)、失去細胞凋亡的控制，也就是細胞並不會進行計畫性的死亡過程，而有不死的現象。在過去的 20 年，由分子生物學家以及細胞生物學家的研究，已經對於細胞凋亡 (apoptosis, programmed cell death) 的機制已有相當的了解。

在前人的研究中，細胞死亡的方式可分為兩種：分別為細胞壞死 (necrosis) 及細胞凋亡 (apoptosis)。細胞壞死是當細胞受到急性、大量的非生理性損傷時而導致的現象 (Steven, 1998)。細胞壞死的特徵有：細胞膨脹、分解、細胞核以及細胞質的內含物被釋放至細胞外、粒腺體漲大破裂且 DNA、RNA 均被水解等現象。然而在正常的生理狀況之下細胞死亡並不沿循這條途徑 (Steven, 1998)。在正常的生理狀況或是受到壓力傷害的作用下，身體會對細胞進行篩選，當細胞受傷或衰老時，細胞為了整個個體的利益，會誘發細胞內的死亡訊息而發生死亡，稱為細胞凋亡或是程式細胞死亡 (apoptosis, programmed cell death)。細胞凋亡的特徵是：細胞膜會萎縮形成縐摺，但細胞膜及粒腺體仍保持完整；再者，染色質濃縮並且 DNA 斷裂成 185 bp 大小的片段又稱 oligonucleosomal ladders；最後，細胞膜會將各種胞器及斷裂的 DNA 包成細胞凋亡小體 (apoptotic bodies)，而被巨噬細胞所吞

噬。影響細胞凋亡的機制主要透過三條途徑：1. 活化細胞內質網而提升細胞內的鈣離子濃度 (Nakagawa, et al., 1999)；2. tumor necrosis factor (TNF)及 Fas ligand (FasL)所誘發的 caspase 酵素活性增加 (Baker and Reddy, 1998)；3. 一些生長因子及細胞介白素所造成的粒腺體功能及蛋白表現的改變 (Budihardjo, et al., 1999; Sellers and Fisher, 1999)。

六、Caspases 路徑

目前知道在執行細胞凋亡過程的主要機轉為一組蛋白水解酶家族，稱為 caspases。caspases 是 cysteine requiring aspartate-specific proteases之簡稱，平時這些酵素是以不活化態的形式 (inactive form/zymogen)存在細胞質。Caspases可分成兩類即 initiator caspases及 effector caspases。initiator caspases指的是在細胞凋亡的過程中負責傳遞細胞凋亡訊息，如caspase 8、9；effector caspases可直接將蛋白質分解，或是活化其他分解蛋白質或是DNA的酵素，如caspase 3、6、7 (Thornberry and Lazebnik, 1998)。當訊息由細胞外傳遞而來時，caspases的活性會受到細胞內的一些adaptor分子調控，如Fas-associated death domain (FADD)會與caspases形成複合物而將之活化；相對的inhibitor of apoptosis protein (IAPs)則會抑制caspases的活性。另外，caspases之間也會進行自我活化，例如caspase 8、9、10、12會活化下游的caspase 3、6、7。

七、粒腺體路徑

細胞凋亡除了有細胞質的 caspases 活化之外，粒腺體也是調控細胞凋亡的重要胞器，有許多調控凋亡的訊息分子會在此處做整合，如Bcl-2 家族。Bcl-2 家族部分屬於 proapoptotic proteins 如：Bcl-Xs、Bid、Bad、Bax，另一部分則屬於 anti-apoptotic proteins 如：Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-W 等。當細胞凋亡發生時，Bax 會由細胞質轉移並且插入粒腺體外膜上 (Goping, et al., 1998)，Bax 會在粒腺體外膜形成 homodimer 利用：1. 在外膜上形成孔道；2. 改變已存在孔道之活性，來改變粒腺體的通透性。當粒腺體的通透性改變時，會影響粒腺體膜上需要電位調控的陰離子孔道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)，進而釋放 cytochrome c、以及大量產生活化態之氧自由基 (Green and Reed, 1998)；另外，當 Bcl-2 從細胞質插入粒腺體外膜後，會與 Bax 形成 heterodimer，抑制 Bax 造成粒腺體通透性增加的情形 (Oltvai, et al., 1993)。再者，以 TNF 及 FasL 調控的路徑看來，活化的

caspase 8 會將 Bid 裂解形成 tBid (truncated Bid)，tBid 由細胞質轉移到粒腺體上可使粒腺體釋放 cytochrome c (Li, et al., 1998)。當 cytochrome c 釋放使得下游分子 Apaf-1 被活化後，則可進一步將 caspase 9 活化，活化態 caspase 9 會切割其下游的 caspase 3，而 caspase 8 也可直接活化 caspase 3。Caspase 3 再與其受質作用以進行細胞凋亡 (Mancini, et al., 1998; Kuida, et al., 1996)。

根據針對細胞凋亡之文獻探討，本研究利用 MTT 檢測法、流式細胞儀、colorimetric assay、西方墨點法、共軛焦螢光顯微鏡...等技術來研究參與調控此機制之蛋白質，包括調控細胞凋亡之分子傳遞路徑，如 caspases、Bcl-2 family、cytochrome c 和 Fas 等。藉由這些結果可以瞭解蟾酥對於人類前列腺癌細胞生長之影響及其機轉，提供了臨床醫學另一種治療前列腺癌的方式，以期為預後狀況差、已經轉變成非雄性素依賴性前列腺癌的病人提供更多的幫助。

貳、材料與方法

一、材料

蟾酥是由中華大蟾蜍或黑眶蟾蜍的耳後腺及皮膚腺所分泌的白色漿液經乾燥而成。蟾蜍靈 (bufalin)及華蟾精 (cinobufagin)為其主要活性成分，為了做更明確的研究，本計畫所使用的蟾蜍靈及華蟾精購自美國 Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA)公司，編號分別為 B0261 和 C1272 的純物質。

二、前列腺癌細胞株及培養方法

三種前列腺癌細胞株為 LNCaP (CCRC60088)，DU145 及 PC3，皆購自新竹食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI)菌種保存及開發中心 (Culture Collection and Research Center, CCRC)。LNCaP 細胞株培養於 RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Buffalo, Grand Island, NY, USA)培養基；DU145 及 PC3 則培養於 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Laboratories, Buffalo, Grand Island, NY, USA)培養基。培養基皆含 10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS; KBH, Israel)，100 $\mu\text{g/ml}$ 青黴素 (penicillin, Sigma, St. Louis, MO, USA)及 100 IU/ml 鏈黴素 (streptomycin, Sigma, St. Louis, MO, USA)。培養環境為 37°C，5% CO₂ & 95% 大氣之培養箱。每三天更換一次培養基，每週進行一次繼代培養。

三、前列腺癌細胞外觀型態之觀察

利用倒立相位差顯微鏡 (Nikon, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan)接上銜接器 (adaptor, optima)，再以數位相機 (Coolpix 995, Nikon, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan)在長葉毛地黃苷、毛地黃毒苷及哇巴因處理的特定時間攝影，藥物處理時間決定於細胞對於藥物的反應程度，以觀察藥物對於細胞外觀的影響。

實驗一：蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞型態之影響。

目的：探討蟾蜍靈及華蟾精對於雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞型態之影響。

取 1×10^4 細胞培養於 60 mm 培養盤，每孔加入 4 ml 含 10% FCS 之培養液，48 小時後，待細胞吸附於底部，移除培養液，再加入 4 ml

含有以下藥物的培養液：

1. vehicle (專作對照組)
2. bufalin (10^{-7} ~ 10^{-5} M)
3. cinobufagin (10^{-7} ~ 10^{-5} M)

再繼續培養 8、12、18 及 24 小時。各培養時間到達時，放置顯微鏡下觀察細胞型態並拍攝之。

四、前列腺癌細胞增殖分析法-MTT assay

細胞生長增殖之量化採用 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma, St. Louis, MO, USA) 分析法檢測。MTT 本呈黃橙色，被活細胞還原後之產物為可溶於 dimethylsulfoxide (DMSO) 呈現藍紫色之 formazan。故藍紫色愈深代表相對之細胞數目愈多。

實驗二：蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞增殖之 IC_{50} 。
目的：探討蟾蜍靈及華蟾精對於抑制雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞達控制組之一半 (IC_{50}) 時所需要的藥物濃度。

取 2×10^3 細胞培養於 96 孔培養盤，每孔加入 200 μ l 含 10% FCS 之培養液，48 小時後，待細胞吸附於底部，移除培養液，再加入 200 μ l 含有以下藥物的培養液：

1. vehicle (專作對照組)
2. bufalin (10^{-9} ~ 10^{-6} M)
3. cinobufagin (10^{-9} ~ 10^{-6} M)

再繼續培養 24、48、72、及 96 小時。各培養時間到達時，將培養液移除，每孔加入 50 μ l 溶於培養液之 MTT 溶液 (1 mg/ml) 繼續培養 4 小時後，將培養盤以 500 \times g 之轉速離心 5 分鐘，傾棄上清液避光晾乾後，每一培養孔加入 50 μ l DMSO，搖振均勻，以酵素免疫分析測讀儀 (Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA) 讀取波長 570 nm 之吸光值為測定值，並以波長 630 nm 之吸光值為參考值。讀值愈高，表示相對之細胞數目愈多，處理藥物當時的細胞數 (第零天) 之吸光值作為分母，再將 24、48、72 及 96 小時之吸光值做為分子而算得的數值視為增殖指數 (proliferation index)。將其增殖指數繪圖，取其直線部分做出方程式，則可分別算出藥物處理 24、48、72 及 96 小時造成 IC_{50} 的藥物濃度。本實驗將重複至少 3 次。

實驗三：蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞倍增時間之影響。

目的：探討蟾蜍靈及華蟾精對於雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞倍增時間之影響。

仿實驗二，將 2×10^3 細胞培養於 96 孔培養盤，每孔加入 200 μ l 含 10% FCS 之培養液，48 小時後，待細胞吸附於底部，移除培養液，再加入 200 μ l 含有以下藥物的培養液：

1. vehicle (專作對照組)
2. bufalin (10^{-7} M)
3. cinobufagin (10^{-7} M)

分別培養了 24、48、72、及 96 小時後，將培養液移除，每孔加入 50 μ l 溶於培養液之 MTT 溶液 (1 mg/ml) 繼續培養 4 小時後，將培養盤以 500 \times g 之轉速離心 5 分鐘，傾棄上清液避光晾乾後，每一培養孔加入 50 μ l DMSO，搖振均勻，以酵素免疫分析測讀儀 (Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA) 讀取波長 570 nm 之吸光值為測定值，並以波長 630 nm 之吸光值為參考值。讀值愈高，表示相對之細胞數目愈多。而倍增時間的計算是將 24、48、72 及 96 小時的增殖指數做出直線方程式後，再帶入數值以算出倍增時間，以小時表示。本實驗將重複至少 3 次。

五、細胞凋亡

抑制細胞增殖的機制，除了阻斷細胞週期之外，細胞凋亡亦是另一個可能參與的機制。細胞凋亡乃一連串生化步驟之結果。當細胞進行細胞凋亡的過程時，會將內生性的核酸內切酶(endogenous endonucleases)活化，將染色體 DNA 進行切割，而產生大量的 DNA 片段。進行凋亡細胞中之染色體 DNA 會被切成約 180-200bp 之片段。而這些由核酸內切酶所切出來之 DNA 片段多帶有一 polyA 之單股尾段。利用此種性質，即可藉 TdT 酵素(terminal deoxynucleotidyl transferase)將螢光標定之 dUTP 嵌入上述之單股尾段。之後可用螢光顯微鏡觀察細胞凋亡情形，或用螢光流式細胞儀量化細胞凋亡程度，螢光強度愈強表示 DNA 斷裂程度愈厲害。細胞凋亡檢測套組由美國 Promega 公司(Promega Corporation, Madison, WI, USA)購得。

實驗四：蟾蜍靈及華蟾精是否引起 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞 DNA 斷裂。

目的：蟾蜍靈及華蟾精是導致雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞株進行細胞凋亡之效應。

將 1.5×10^6 細胞培養於 100 mm 的培養皿中 48 小時後，加入含有以下藥物的培養液

1. vehicle (專作對照組)
2. bufalin ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M)
3. cinobufagin ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M)

藥物處理 12、24 及 48 小時後，收集細胞以 5 ml 冰冷的 PBS 洗 2 次，再以 1% 的甲醛在冰浴上，固定細胞 20 分鐘，繼用 5 ml 冰冷的 PBS 清洗 2 次，加入 5 ml 的 70% 乙醇，在 -20°C 的環境中固定 4 小時之後，將細胞離心並傾棄上清液，以 PBS 清洗 2 次，隨後將細胞轉移至 1.5 ml 微量離心管中，加入 80 μl 之平衡緩衝液(200 mM potassium cacodylate; 25 mM Tris-HCl; 0.2 mM dithiothreitol DTT; 0.25 mg/ml bovine serum albumin; 2.5 mM cobalt chloride)在室溫下反應 5 分鐘，離心並丟棄上清液，加入 50 μl 之 TdT 反應緩衝溶液混合物。此混合物內含有平衡溶液、核苷酸混合物(50 μM fluorescein-12-dUTP, 100 μM dATP, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA,)以及 1 μl TdT 酵素(25 U)。在 37°C 避光反應 60 分鐘之後，加入含有 20 mM EDTA 之 PBS 終止反應，接著離心 $300 \times g$, 5 分鐘，丟棄上清液並加入含有 0.1% Triton X100, 及 5 mg/ml 牛蛋白血清之 PBS 清洗兩次，最後加入 0.5 ml 含有 5 mg/ml propidium iodide 及 250 μg RNase 之 PBS 將細胞打散並置於 4°C 、避光環境之下作用 30 分鐘，用螢光流式細胞儀以 488 nm 波長氬雷射光為激發光，分析由 fluorescein-dUTP 所發出之 520 nm 波長放射光強度及 propidium iodide 所發出之 630 nm 波長為之放射光強度。藉此方法分析毛地黃類藥物導致 LNCaP 細胞進行細胞凋亡之效應。本實驗將重複至少 3 次。

六、Caspase 之活性

Caspases 是 cysteine requiring aspartate-specific proteases 之簡稱。在細胞有計劃地分解成凋亡小體過程中扮演非常重要的角色。當死亡的訊息開始傳遞時，細胞內的 death domain 會將一連串的 caspases 予以活化，以繼續傳遞細胞凋亡的訊息。現知 caspases 通常以不具活性的酶原 (pro-enzyme) 型式存在，而經過蛋白質分解之方式而被活化。其 caspase-8, caspase-9 及 caspase-3 在整個細胞凋亡過程中扮演樞紐連接之角色。本實驗即是檢測這四種酵素之活性，藉以瞭解本研究所採用

之藥物在引發細胞凋亡過程中所影響之層面。將Western Blot 觀察前列腺癌細胞經由藥物處理之後，細胞內caspases之pro-enzyme以及cleavage form的表現變化。並將處理藥物之後的細胞溶解物與caspase-8, caspase-9 及caspase-3 三種酵素之專一受質反應，這些專一受質帶有呈色物質”p-nitroaniline (p-NA)” ，當這些專一性的受質被caspases分解並釋放出p-NA後，即可以波長 405 nm之光譜讀取吸光值，吸光值愈大，即被caspases分解而釋放出之p-NA越多，代表caspases酵素活性愈大。

實驗五：蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞中 caspase-3, -8, -9 活性之影響。

目的：探討蟾蜍靈及華蟾精對於雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞中 caspase-3, -8, -9 活性之影響。

將 1.5×10^6 細胞培養於 100 mm 的培養皿中，48 小時後待細胞附著於培養皿後，將原來之培養液換成含有以下藥物之培養液：

1. vehicle (專作對照組)
2. bufalin ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M)
3. cinobufagin ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M)

培養了 8、12、18、24 小時後，將培養液移除，利用 saline 將細胞清洗兩次之後，利用 caspase kit，包括 caspase-3, -8, -9 (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA) 來測量細胞中 caspases 活性。首先將細胞溶解之後，再以 14000 \times g 離心 10 分鐘，收集上清液，利用 Bradford assay 進行蛋白質含量的分析。取 200 μ g 之蛋白質，加入 50 μ l 之 reaction buffer 及 caspase 專一受質(substrate)，反應 100 分鐘之後，以酵素免疫分析測讀儀 (Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA) 讀取波長 405 nm 之吸光值為測定值。讀值愈高，表示 caspase 之活性愈高。本實驗將重複至少 3 次。

七、細胞凋亡相關蛋白之表現

細胞凋亡除了有細胞質的 caspases 活化之外，粒腺體也是調控細胞凋亡的重要胞器，有許多調控凋亡的訊息分子會在此處做整合，如 Bcl-2 家族。Bcl-2 家族部分屬於 proapoptotic proteins 如：Bcl-Xs、Bid、Bad、Bax，另一部分則屬於 anti-apoptotic proteins 如：Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-W 等。當細胞凋亡發生時，Bax 會由細胞質轉移並且插

入粒腺體外膜上，Bax 會在粒腺體外膜形成 homodimer 利用：1. 在外膜上形成孔道；2. 改變已存在孔道之活性，來改變粒腺體的通透性。當粒腺體的通透性改變時，會影響粒腺體膜上需要電位調控的陰離子孔道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)，進而釋放 cytochrome c、以及大量產生活化態之氧自由基；另外，當 Bcl-2 從細胞質插入粒腺體外膜後，會與 Bax 形成 heterodimer，抑制 Bax 造成粒腺體通透性增加的情形。再者，以 TNF 及 FasL 調控的路徑看來，活化的 caspase 8 會將 Bid 裂解形成 tBid (truncated Bid)，tBid 由細胞質轉移到粒腺體上可使粒腺體釋放 cytochrome c。當 cytochrome c 釋放使得下游分子 Apaf-1 被活化後，則可進一步將 caspase 9 活化，活化態 caspase 9 會切割其下游的 caspase 3，而 caspase 8 也可直接活化 caspase 3。Caspase 3 再與其受質作用以進行細胞凋亡。

實驗六：蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞中調控細胞凋亡之蛋白表現的影響。

目的：探討蟾蜍靈及華蟾精對於雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞調控細胞凋亡調節蛋白表現之效應。

將 1.5×10^6 細胞培養於 100 mm 的培養皿中，48 小時後待細胞附著於培養皿後，將原來之培養液換成含有以下藥物之培養液：

1. vehicle (專作對照組)
2. bufalin ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M)
3. cinobufagin ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M)

培養了 8、12、18、24 小時後，將培養液移除，利用 saline 將細胞清洗兩次之後，加入溶解細胞的溶液(RIPA lysis buffer: 50 mM Tri-HCl [pH 7.4], 1 % NP-40, 0.25 % Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 1 mM Na-orthovanadate, 1 mM NaF)，在 4°C 下作用 30 分鐘，再以 14000 \times g 離心 10 分鐘，收集上清液，利用 Bradford assay 進行蛋白質含量的分析。隨後利用 SDS-PAGE 將蛋白質依分子量大小不同將其分開，再將 SDS-PAGE 上之蛋白質轉移至 PVDF 膜上。先利用 5%的脫脂牛奶進行 blocking 1 小時後，再分別與 Bax、p53、cytochrome c、caspase 3、caspase 8、caspase 9 之初級抗體，在 4°C 的環境之下反應隔夜。再將膜用 TBST(20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 135 mM NaCl; 0.1 % Tween 20)清洗 3 次，隨後與第二抗體

anti-rabbit IgG 或是 anti-mouse IgG 一起反應 2 小時，再以 TBST 清洗 3 次之後，以 enhanced chemiluminescence detection (ECL) 系統偵測蛋白質的表現量並加以定量。本實驗將重複至少 3 次。

實驗七：蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞表面表現 Fas (death receptor) 的影響。

目的：探討蟾蜍靈及華蟾精對於雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞表面 Fas 表現之效應。

1. 免疫螢光染色——以流式細胞儀觀察

前列腺癌細胞以 2×10^6 之數目種於 100 毫米細胞培養皿，經過 24 或 48 小時後，將培養液換成含有以下物質的培養液：

- 1.vehicle group
- 2.蟾蜍靈 (10 μ M)
- 3.華蟾精 (10 μ M)

再處理 18 和 24 小時後收取細胞，以染色緩衝液清洗兩次後，將細胞與一級抗體 (anti-human Fas monoclonal antibody, 1 μ g/ml, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) 或 negative control 的 mouse IgG 培養後，將細胞與帶有螢光的二級抗體 (FITC-conjugated rat anti-mouse IgG, 10 μ g/ml, eBioscience, San Diego, CA, USA) 在 4°C 且避光的環境反應，以染色緩衝液清洗後，再以流式細胞儀 (BD FACSCalibur, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 觀察細胞表面蛋白的表現情形 (Shimada, et al., 2003)。

2. 免疫螢光染色——以共軛焦顯微鏡觀察

將前列腺癌細胞接種在放有蓋玻片的 24 孔盤中，待細胞貼附後將培養液換成含有以下物質的培養液：

- 1.vehicle group
- 2.etoposide (4×10^{-6} μ M)
- 3.蟾蜍靈 (10 μ M)
- 4.華蟾精 (10 μ M)

再處理 18 和 24 小時後將細胞清洗、固定、打洞後，以 Fas 單株抗體 (1:50, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) 和 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:50, Jackson Immunolab, West Grove, PA, USA) 反應。其中 mouse IgG 之處理作為 negative control；

etoposide 處理則為 positive control，DAPI 則做為細胞核之染劑。滴上 Mounting Medium (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) 並封片，待風乾後利用共軛焦顯微鏡 (confocal microscope, Leica TCS SP2, Bannockburn, IL, USA) 觀察螢光影像。

實驗八：轉殖 Fas siRNA 並且處理蟾蜍靈和華蟾精對於 LNCaP、DU145、PC3 細胞表面 Fas 表現和 Fas mRNA 表現之影響。

目的：探討轉殖 Fas siRNA 並處理蟾蜍靈和華蟾精是否調控雄性素依賴性及非雄性素依賴性前列腺癌細胞中 Fas 蛋白質和 mRNA 之表現。

1. 細胞表面蛋白 Fas 之表現

取 5×10^4 細胞培養於 24 孔培養盤，每盤加入 500 μ l 不含抗生素之培養液，並同時配製轉殖溶液。先將細胞分為以下兩組：

1. 轉殖非特定序列 siRNA 組別
2. 轉殖 siRNA-Fas 組別

繼續培養 48 小時後，將上述組別再分為以下六組：

1. 轉殖非特定序列 siRNA 組別
2. 轉殖 siRNA-Fas 組別
3. 轉殖非特定序列 siRNA 組別 + 蟾蜍靈 (10 μ M)
4. 轉殖非特定序列 siRNA 組別 + 華蟾精 (10 μ M)
5. 轉殖 siRNA-Fas 組別 + 蟾蜍靈 (10 μ M)
6. 轉殖 siRNA-Fas 組別 + 華蟾精 (10 μ M)

再處理 18 和 24 小時後將細胞清洗、固定、打洞後，以 Fas 單株抗體 (1:50, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) 和 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:50, Jackson Immunolab, West Grove, PA, USA) 反應。其中 mouse IgG 之處理作為 negative control，DAPI 則做為細胞核之染劑。滴上 Mounting Medium (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) 並封片，待風乾後利用共軛焦顯微鏡 (confocal microscope, Leica TCS SP2, Bannockburn, IL, USA) 觀察螢光影像。

2. 細胞內 Fas mRNA 之表現

取 5×10^5 細胞培養於 60 毫米細胞培養皿，每盤加入 5 ml 不含抗生素之培養液，同時配製轉殖溶液。先將細胞分為以下兩組：

1. 轉殖非特定序列 siRNA 組別

2.轉殖 siRNA-*Fas* 組別

繼續培養 48 小時後，將上述組別再分為以下六組：

- 1.轉殖非特定序列 siRNA 組別
- 2.轉殖 siRNA-*Fas* 組別
- 3.轉殖非特定序列 siRNA 組別 + 蟾蜍靈 (10 μ M)
- 4.轉殖非特定序列 siRNA 組別 + 華蟾精 (10 μ M)
- 5.轉殖 siRNA-*Fas* 組別 + 蟾蜍靈 (10 μ M)
- 6.轉殖 siRNA-*Fas* 組別 + 華蟾精 (10 μ M)

待處理 18 或 24 小時後將細胞以 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)處理並收取細胞，進一步萃取全部 RNA，再利用反轉錄酶將 mRNA 轉為 cDNA，cDNA 再與 *Fas* 之引子和 Taq DNA 聚合酶進行聚合酶鏈式反應，產物於 2% 洋菜膠上進行電泳分離，和溴化乙菲錠 (ethidium bromide)作用後，在 UV 照射下取得影像，即得知經過不同處理後 mRNA 的表現量。培養 8、12、18、24 小時後，將細胞收下，利用 DEPC saline 將細胞清洗兩次後去除上清液，利用 TRizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)萃取 total RNA，將 RNA 定量後，取等量之 RNA 轉換為 cDNA，再經由 dNTP 以及 *Fas* 或 GAPDH primers 進行 PCR，得到之產物再經過電泳、量化，即可得知經過毛地黃類藥物處理後，前列腺癌細胞中 *Fas* mRNA 的表現情形。本實驗將重複至少 3 次。*Fas* gene (275 bp), 33 cycles, forward 5'-CTGTTTCAGGATTTAAGGTTGGAGATT-3' and reverse 5'-GACCCAGAATACCAAGTGCAGATGTA-3', annealing temperature 60 °C; housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (230 bp), 25 cycles, forward 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3' and reverse 5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATG-3', annealing temperature 55 °C.

實驗九：經由 *Fas* siRNA 處理後蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞存活之影響。

目的：探討蟾蜍靈及華蟾精是否經由 *Fas* 調控雄性素依賴性及非依賴性前列腺癌細胞凋亡之現象。

取 8×10^3 細胞培養於 96 孔培養盤中，每孔加入 100 μ l 不含抗生素之培養液，同時配製轉殖溶液。先將細胞分為以下兩組：

- 1.轉殖非特定序列 siRNA 組別
- 2.轉殖 siRNA-*Fas* 組別

繼續培養 48 小時後，將上述組別再分為以下六組：

- 1.轉殖非特定序列 siRNA 組別
- 2.轉殖 siRNA-*Fas* 組別
- 3.轉殖非特定序列 siRNA 組別 + 蟾蜍靈 (10 μ M)
- 4.轉殖非特定序列 siRNA 組別 + 華蟾精 (10 μ M)
- 5.轉殖 siRNA-*Fas* 組別 + 蟾蜍靈 (10 μ M)
- 6.轉殖 siRNA-*Fas* 組別 + 華蟾精 (10 μ M)

繼續培養 24 小時。培養時間到達時，將培養液移除，每孔加入 50 μ l 溶於培養液之 MTT 溶液 (1 mg/ml)4 小時後，將培養盤以 500 \times g 之轉速離心 5 分鐘，吸除上清液後，每一培養孔加入 50 μ l DMSO，搖振均勻，以酵素免疫分析測讀儀 (Powerwave X340, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)讀取波長 570 nm 之吸光值為測定值，並以波長 630 nm 之吸光值為參考值。讀值愈高，代表相對之細胞數目愈多。

統計分析

各組數據均以平均 \pm 標準誤差表示。先以變方分析處理 (ANOVA)，若呈顯著，再以多變域測驗分析兩組間的差異，以 $P < 0.05$ 為顯著差異， $P < 0.01$ 為極顯著差異 (Steel and Torrie, 1960)。

參、結果

一、蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞型態之影響。

圖一顯示三種細胞株經蟾蜍靈或華蟾精 10^{-5} M 濃度處理後，在不同時間點以倒立相位差顯微鏡和數位相機觀察並拍攝所得到的結果。三種細胞株在藥物處理後皆有細胞數目減少的情形，其中以蟾蜍靈處理細胞造成單位面積的細胞數目減少的效果比華蟾精強。並且在 LNCaP 的情形最明顯，而在 PC3 細胞減少的情況較不顯著，必須到處理了 48 小時之後，才有如圖所示細胞減少之情況。此外，在 LNCaP 可看到細胞情形最較差，在藥物處理 24 小時後，細胞會完全圓起 (round up) 並懸浮，並且細胞膜出現不完整之情形。在 DU145，細胞有些許圓起的現象，也有細胞膜不完整之情形。上述細胞圓起及細胞膜不完整的現象在 PC3 細胞中也有發生，但是較其餘兩種細胞不顯著。經過三次拍攝結果皆呈相似情形。

二、蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞增殖之 IC_{50} 。

表一分別表示 LNCaP，DU145 及 PC3 在藥物濃度為蟾蜍靈 (LNCaP, 10^{-8} ~ 10^{-6} M; DU145 和 PC3, 10^{-9} ~ 10^{-7} M); 華蟾精 (LNCaP, DU145 和 PC3, 10^{-8} ~ 10^{-6} M) 處理下，在一至四天分別以 MTT 法測得吸光度並計算出增殖指數，再畫出其迴歸方程式。在 LNCaP，DU145 及 PC3 皆可測得隨著藥物處理時間愈久，迴歸方程式的斜率也越小。利用迴歸方程式算出每一天之 IC_{50} (定義成藥物處理組別的增殖指數為控制組之一半時所使用的藥物濃度)，結果如表。可以看到無論在 LNCaP，DU145 及 PC3，蟾蜍靈所造成的 IC_{50} 皆比華蟾精來得低且結果成顯著差異 ($P<0.05$)。隨著藥物處理的培養天數增加，第二至第四天之 IC_{50} 皆比第一天小，為顯著差異 ($P<0.01$)。

三、蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞倍增時間之影響。

圖二顯示經蟾蜍靈或華蟾精處理濃度為 10^{-7} M，以 MTT 法在一至四天分別檢測 LNCaP，DU145，PC3 及 HMC 的增殖狀態，將測得之吸光度計算出增殖指數，再畫出其迴歸方程式，並計算倍增時間的結果。整體來說，蟾蜍靈在四種細胞中造成的倍增時間增加的效果皆

比華蟾精來得大。藥物對於倍增時間的改變在前列腺癌細胞株 DU145 及 PC3 可看到的效果最為顯著，而對 LNCaP 的影響則較少。藥物雖對於人類正常腎小球環間膜細胞倍增時間有增加的影響，但效果遠小於藥物對於前列腺癌細胞的作用。

四、蟾蜍靈及華蟾精是否引起 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞 DNA 斷裂。

經過蟾酥類藥物處理 24 小時，檢測三種細胞之凋亡程度。圖三顯示三種細胞在經過蟾蜍靈和華蟾精處理後以 TUNEL 加上螢光流式細胞儀所得之四象限等高線代表圖。將未經藥物處理之細胞侷限於右下象限，將此象限座標定為標準座標，而將落在左上及右上象限之細胞定義為凋亡細胞。每一圖之 x 軸代表 propidium iodide (PI) 之螢光強度，y 軸則表 fluorescein 之螢光強度。Y 軸數值愈高代表細胞凋亡程度愈厲害。由此代表圖可看出隨著藥物處理濃度增加，三種細胞之凋亡程度愈厲害。

五、蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞中 caspase-3, -8, -9 活性之影響。

圖四為 LNCaP、DU145 及 PC3 經蟾蜍靈或華蟾精 10^{-7} ~ 10^{-5} M 處理，LNCaP&DU145 (8、12、18 或 24 小時)；PC3 (18、24、36 或 48 小時) 後，利用呈色性 caspases 酵素活性檢測套組測得吸光值，以控制組為 100% 換算而得之值。整體來說，蟾蜍靈在 LNCaP 及 DU145 中所造成的 caspases 酵素活性增加之效果皆比華蟾精造成的增加效果大；在 PC3 中，兩種藥物促使酵素活性增加的幅度則無顯著差異。

在 LNCaP 細胞中，蟾蜍靈在 10^{-5} M 可以造成 caspase 3、caspase 8 及 caspase 9 酵素活性增加為 200% 至 250% ($P < 0.01$)，且從藥物處理 12 小時後就可看到此現象，其中以 caspase 3 有最大的效應，而 caspase 8 增加的比例最小；蟾蜍靈在 10^{-6} M 可使 caspases 酵素活性增加為 150% 至 200% ($P < 0.05$)，同樣在處理藥物後的 12 小時看到此情形。在 caspase 3 可以看到酵素活性隨著藥物處理的時間和劑量的增加成正比增加，而在 caspase 8 及 caspase 9 則酵素活性隨著劑量的提升而增加外，在藥物處理 18 小時後高劑量藥物就無法再造成活性的增加。華蟾精對 LNCaP 細胞 caspases 酵素活性的影響也有相似的效應，只是增加的幅度比起處理蟾蜍靈來得少。DU145 與 LNCaP 的結果相似。

在細胞株 PC3 中，蟾蜍靈濃度在 10^{-6} 、 10^{-5} M 可使 caspase 3 酵素活性增加為 200% 至 280% ($P < 0.01$)，且從藥物處理 18 小時後就可看到此現象，並且在藥物處理 36 小時後增加效應最為顯著。Caspase 3 酵素活性會隨著藥物處理劑量的增加成正比增加，而在 caspase 8 及 caspase 9 則酵素活性增加之比例較小且少有顯著效應，但 caspase 8 在藥物處理 18 小時後及 caspase 9 處理 48 小時後會有小比例的隨著藥物濃度增加而酵素活性增加之效應 ($P < 0.05$)。華蟾精的濃度在 10^{-6} 、 10^{-5} M，處理 18 小時後可使 caspase 3、8 及 9 酵素活性增加為 200% 至 300% ($P < 0.01$)，並且在藥物處理 24 小時後，caspase 3 之酵素活性增加為 200% 至 300%，但隨著藥物處理的時間愈久，caspase 3 酵素活性增加的效果則減少了，另外，在華蟾精處理 PC3 24、36 或 48 小時後，caspase 8 及 caspase 9 酵素活性增加的比例顯著少於藥物處理 18 小時後所增加的藥物活性，並且增加的比例也不似 caspase 3 明顯。

六、蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞中調控細胞凋亡之蛋白表現的影響。

圖五 A 表示經蟾蜍靈或華蟾精 ($0.1 \sim 10$ M) 處理 LNCaP、DU145，18 小時；PC3，24 小時之後，收取整個細胞之萃取液，以西方墨漬法 (caspase 3、8 利用 15% 膠體分析；caspase 9 則以 10% 膠體分析) 測量 caspases 酵素蛋白質表現情形。分別觀察 procaspase 3、8 及 9 和活化態之 caspase 3、8 及 9，另外，以 β -Actin 作為組間控制組。在 LNCaP 細胞中，經藥物處理 18 小時後，可看到 procaspases 蛋白隨著藥物濃度增加而減少的趨勢，而活化態之 caspases 蛋白則有隨藥物濃度增加成正比增加的趨勢。結果呈顯著差異 ($P < 0.05$)。在 DU145 及 PC3 也可看到相似的情形。

圖五 B 和 C 分別表示經蟾蜍靈或華蟾精 ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M) 處理 LNCaP，8、12 小時；DU145，8、12 或 18 小時；PC3，18 或 24 小時之後，分別取其粒腺體層及細胞質濃縮液，以西方墨漬法 (Bax、cytochrome *c* 及 COX IV 利用 15% 膠體分析；p53 則以 10% 膠體分析) 測量細胞凋亡路徑中 caspases 上游調控因子，如 p53、Bax 及 cytochrome *c* 蛋白質表現情形。另外測量細胞質濃縮液中 COX IV (oxidative phosphorylation complex IV) 的表現情形，COX IV 是位於粒腺體內膜上擔任電子傳遞作用之蛋白，測量之可確認在將粒腺體及細胞質分層時是否有將粒腺體打破之情形。觀察得 COX IV 在三種前列腺癌細胞

株之細胞質濃縮液中皆無表現 (結果未呈現), 表示有將粒腺體及細胞質正確的分離。整體說來, 蟾蜍靈及華蟾精對於此三種訊息傳遞因子之蛋白質表現量增加的影響皆比華蟾精的效果大。Bax 及 cytochrome *c* 之蛋白質表現量在三種細胞株皆會隨著藥物濃度的增加而成正比增加 ($P < 0.05$), 而 cytochrome *c* 之蛋白質表現量也會隨著處理時間的增加而增加。

多種化療藥物都會經過 p53 參與調控之細胞凋亡路徑而達到抑癌效果。為了檢測 p53 是否參與調控蟾蜍靈和華蟾精誘發的細胞凋亡路徑, 處理藥物 12 和 18 小時的 LNCaP 細胞蛋白質, 以西方墨點法分析 p53 蛋白質的表現 (圖五 C)。經過蟾蜍靈或華蟾精處理 12 小時後, p53 之蛋白質表現量會增加, 而此效應在處理 18 小時後會更明顯。

七、蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞表面表現 Fas (death receptor) 的影響。

為了探討 Fas 在沒有 p53 或 p53 為突變型式的前列腺癌細胞中, 是否會受到蟾蜍靈和華蟾精的刺激而導致細胞凋亡, 此章節分別利用細胞表面螢光染色 (流式細胞儀) 和免疫螢光染色 (共軛焦顯微鏡) 兩種方式, 觀察經過藥物處理 18 小時 (LNCaP 和 DU145) 或 24 小時 (PC3) 後, Fas 在細胞表面的表現情形。在圖六 A 中, 以流式細胞儀的觀察結果得知, 較為惡性的非雄性素依賴性前列腺癌細胞中, 經過蟾蜍靈或華蟾精 (10 μ M) 處理後, 細胞表面 Fas 的增加情形為: 在 DU145 細胞中, 從控制組的 19% 增加為 42% (蟾蜍靈) 和 37% (華蟾精), 增加倍數分別為 2.2 倍和 1.9 倍; 在 PC3 細胞中, 從控制組的 7% 增加為 25% (蟾蜍靈) 和 16% (華蟾精), 增加倍數分別為 3.6 倍和 2.3 倍。與雄性素依賴性 LNCaP 細胞從控制組的 22% 增加為 31% (蟾蜍靈) 和 26% (華蟾精), 增加倍數分別為 1.4 倍和 1.2 倍相比較, Fas 蛋白較能受到蟾蜍靈和華蟾精的誘發而表現於 DU145 和 PC3 之細胞表面。

圖六 B 同樣為經過蟾蜍靈或華蟾精 (10 μ M) 處理後, 在共軛焦顯微鏡下得到的結果。其中 negative control 是將細胞與 mouse IgG 反應而非 Fas 之專一抗體, 前人的研究指出化療藥物 etoposide, 可藉由增加 Fas 細胞表面蛋白的表現而誘發癌細胞的凋亡 (Shimada *et al.*, 2003), 故本實驗之 positive control 則利用 etoposide 處理前列腺癌細胞

後，進行免疫螢光染色。經過蟾蜍靈和華蟾精處理 18 或 24 小時後，細胞表面的 Fas（綠色螢光）皆有增加的現象，與流式細胞儀觀察的結果相仿，此現象在 DU145 和 PC3 細胞中比在 LNCaP 細胞中顯著。

八、經由 Fas siRNA 處理後蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞表現 Fas 蛋白和 Fas mRNA 之影響。

上述結果發現細胞表面死亡接受器 Fas 會因蟾蜍靈和華蟾精的處理而增加，為了檢測 Fas 蛋白是否為蟾蜍靈和華蟾精誘發前列腺癌細胞凋亡的重要因子，將 50 nM 之 siRNA-Fas 轉殖入三株前列腺癌細胞中，以抑制 Fas mRNA 的轉錄，控制組的細胞則轉殖非特定序列之 siRNA。待轉殖 48 小時後，處理 10 μ M 之蟾蜍靈或華蟾精，以免疫螢光染色在共軛焦顯微鏡下觀察 Fas 蛋白於細胞膜上的表現情形，結果如圖七 A 所示，與圖六的結果相同，處理蟾蜍靈和華蟾精後，Fas 蛋白的表現量會增加，但是轉殖 siRNA-Fas 後再處理藥物，Fas 蛋白表現增加的情形則大大減少。

另外也將轉殖並處理藥物後的細胞收集、萃取 mRNA，以 RT-PCR 的方式觀察細胞 Fas mRNA 的表現量（圖七 B），經轉殖 siRNA-Fas 後，Fas mRNA 表現與控制組相比，有些許減少 (lane 2)，但蟾蜍靈和華蟾精的處理會誘發前列腺癌細胞表現 Fas mRNA (lane 3 and 4)。經轉殖後的細胞在給予藥物處理，可抑制 Fas mRNA 的表現 (lane 5 and 6)。

九、經由 Fas siRNA 處理後蟾蜍靈及華蟾精對於 LNCaP、DU145 及 PC3 細胞存活之影響。

圖七 C 顯示，轉殖 siRNA-Fas 可抑制蟾蜍靈和華蟾精處理後，Fas 蛋白和 mRNA 表現增加的效應，因此進一步探討降低了經藥物處理後的 Fas 表現，是否會影響前列腺癌細胞的存活能力，以驗證 Fas 在蟾蜍靈和華蟾精造成細胞凋亡的角色。當細胞經過轉殖和藥物處理後，以 MTT 檢測法觀察細胞存活能力，空心直方圖為轉殖非特定序列 siRNA 之組別，而斜線直方圖則為轉殖 siRNA-Fas 之組別，當處理 10 μ M 之蟾蜍靈或華蟾精後，LNCaP、DU145 和 PC3 三種細胞之存活能力則分別從控制組的 100%降為約 47%、30%和 28% ($P < 0.01$) (bars 2 and 3)。當轉殖後再給予藥物處理，此降低存活力的現象則被抑制，細胞存活力分別增加為約 67% (LNCaP)、60% (DU145) 和 63%

(PC3)(bars 5 and 6)。雖然轉殖 siRNA-*Fas* 會影響細胞的存活能力（比較 bar 1 和 bar 4，由 100%降至約 80%， $P<0.05$ ），但是減少 *Fas* 的表現，的確會降低蟾蜍靈和華蟾精所誘發的細胞存活降低現象（比較 bars 2, 3 和 bars 5, 6， $P<0.01$ ）。

肆、討論

本計畫的主要發現為 (一)蟾蜍靈及華蟾精可延長前列腺癌細胞的倍增時間，並且不會影響正常腎小球細胞的倍增時間；(二)蟾蜍靈及華蟾精會透過增加 DNA 斷裂和 caspases 活性而造成前列腺癌細胞凋亡；(三)蟾蜍靈及華蟾精對於人類前列腺癌細胞之細胞凋亡效應，是藉由調控細胞凋亡相關蛋白的表現，包括 p53、Fas、Bax、cytochrome c 和 caspases。

有學者指出毛地黃類藥物可以用來毒殺前列腺癌細胞株 LNCaP、DU145 及 PC3 (McConkey, et al., 2000; Yeh, et al., 2001)。屬於動物性來源的類毛地黃類藥物的蟾蜍靈和華蟾精，除了在中醫被用來廣泛的醫治癌症之外，學者的研究也指出蟾蜍靈具有促進多種人類癌細胞株凋亡的作用 (Kawazoe, et al., 1999)，例如在血癌細胞上會藉由活化 AP-1 或者藉由 c-Jun 的 N 端磷酸酶 (c-Jun N-terminal protein kinase, c-JNK)、Rac1 而表現 Tiam1 來造成血癌細胞的凋亡 (Watabe, et al., 1998)。在前列腺癌細胞株 LNCaP、DU145 及 PC3 上，蟾蜍靈及華蟾精這兩種蟾酥的重要萃取純化物，皆會促使細胞啟動凋亡的機轉 (Yeh, et al., 2003)。

前列腺癌細胞會表現 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ，可作為毛地黃類藥物的作用目標 (McConkey, et al., 2000)，蟾蜍靈和華蟾精也屬於 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制劑，並且會造成前列腺癌細胞內鈣離子濃度的上升，隨著鈣離子的濃度過渡上升，細胞通常會走向凋亡 (Trump and Berezesky, 1995; Furuya, et al., 1994)。本實驗室的先前研究也指出，毛地黃類藥物的確會造成前列腺癌細胞內的鈣離子濃度增加 (Lin, et al., 2004; Yeh, et al., 2001, 2003)。除此之外，蟾蜍靈和華蟾精也是拓撲異構酶 II (topoisomerase II) 的抑制劑。拓撲異構酶 II 常被用作抗癌藥物的目標分子，例如 etoposide、adriamycin、genistein 和 ICRF-193 (Chen and Lin, 1994)，藉著抑制拓撲異構酶 II 的活性，雙股 DNA 會斷裂而造成 DNA 傷害，DNA 受損的細胞會被辨識而走向細胞凋亡。

蟾酥類藥物蟾蜍靈及華蟾精在 $10^{-7}\sim 10^{-5}$ M 濃度下，對三種癌細胞株皆有顯著隨著時間及劑量之增加而成正比抑制增殖之現象，並且蟾蜍靈的效果比華蟾精來得強 (Yeh, et al., 2001)，其中 LNCaP 細胞被抑制增生的結果最不顯著。由細胞外觀上則得到相反的效應，這是由於 LNCaP 細胞屬於微貼的特性，故可清楚的觀察到細胞會因藥物的處理而有圓起的情況，此現象在 PC3 及 DU145 這兩種屬於緊貼的細胞株

中，較不易觀察到（圖一）。蟾蜍靈及華蟾精對於三種細胞株的 IC_{50} 如表一，可以看到隨著藥物培養的時間愈久，可以利用愈少的藥物濃度而造成細胞少於控制組的一半，需要藥物濃度的細胞株由低到高的排列為 PC3、DU145 及 LNCaP，與先前測量細胞增殖的結果相符。

毛地黃類藥物的治療範圍窄，在病人的血漿中約在 0.8~2.0 ng/ml (Panesar, 1992)。蟾蜍靈與毛地黃藥物有類似的毒性，故圖二則檢測蟾蜍靈和華蟾精對於前列腺癌細胞和正常人類細胞的毒性。蟾蜍靈及華蟾精在 10^{-7} M 濃度，會使得 DU145 及 PC3 細胞趨於不增殖的狀態，對 LNCaP 細胞也有顯著的抑制倍增時間的作用，藥物在正常腎小球環間膜細胞 HMC 上雖然會造成細胞倍增速度的減緩，但比起前列腺癌細胞株所受到的抑制作用少得多。先前的研究指出，毛地黃藥物對於正常腎小管上皮細胞也沒有顯著的抑制效應 (Yeh, et al., 2001)，另外 Jing 等人也指出，蟾蜍靈對於正常的單核與多型核細胞，並不會造成細胞凋亡 (Jing, et al. 1994)，這顯示了蟾蜍靈及華蟾精可以特異的促使癌細胞死亡，對於正常細胞的毒殺較少。由於癌細胞的細胞分化和細胞凋亡機轉不正常，通常是因為負責調控的基因或是蛋白層面出了問題，若是給予藥物刺激使機轉正常進行，癌細胞的生長就會受控制。而正常細胞的分化和凋亡機轉本來就正常的在調控細胞的生或死，故雖會受到藥物的刺激而加強機轉的運行，但卻不似癌細胞的反應明顯。蟾蜍精即為一種促進細胞分化及凋亡的因子 (Jing, et al., 1994)，故對於前列腺癌細胞增殖的抑制效應會比對於正常細胞明顯。除此之外，蟾蜍靈和華蟾精對於生長較快的非雄性素依賴性前列腺癌細胞有較顯著的抑制增生效應，這也可能是因為對於生長週期較短的細胞所造成的 DNA 傷害會大於週期較長的 LNCaP 細胞所致。雖然人類腎小球細胞不能代表全部的正常人類細胞，但可推論，蟾蜍靈和華蟾精對於生長週期較快的癌細胞之抑制增生效應，應該比生長週期長的正常細胞來得顯著。

誘發細胞凋亡的化學藥物包括 cisplatin、paclitaxel、camptothecin、etoposide 和 all-trans-retinoic acid，都有機會發展為抗癌藥物，因為程式性細胞凋亡路徑不會誘發身體的發炎反應 (van Brussel, et al., 1999)。前人的研究指出蟾蜍靈及華蟾精可以用來治療血癌、黑色素細胞瘤及前列腺癌 (Jing, et al., 1994; Yeh, et al., 2003)，除了藥物具有的細胞毒性之外，也會引發細胞凋亡。細胞凋亡的過程中會啟動一連串的 caspases，進而切割 DNA 並造成細胞死亡，蟾蜍靈及華蟾精所造成的細胞凋亡也有 caspases 活化的現象 (Yeh, et al., 2003)。在 LNCaP 及

DU145 細胞中，蟾蜍靈造成 caspases 活性上升的效應皆較華蟾精來得強，且在藥物培養 12 小時後，可看到顯著的增加；在 PC3 則需要藥物培養 18 小時後才有顯著活性上升的效果，上述的結果在 caspases 蛋白的表現量上也可以觀察到。由於 caspases 在正常的狀態下是以原酶的狀態存在，當啟動細胞凋亡的程式後，原酶會被上游因子切割而減少，活化態的 caspases 則會隨之增加並且去執行其功能，故三種細胞株之 procaspases 會因蟾蜍靈及華蟾精活化細胞凋亡路徑而隨藥物濃度增加漸趨減少，反之活化態之 caspases 則有增加的效應。

以上述結果看來，蟾蜍靈對於 caspase 3 上游之 caspase 9 活性的增加的影響比起 caspase 8 大，進而觀察調控粒腺體上的 Bax 及粒腺體所釋放到細胞質的 cytochrome *c* 這兩種蛋白在藥物處理後的表現情形，發現這兩種蛋白在三種細胞株中皆會受到藥物的刺激而增加其表現量，表示蟾蜍靈及華蟾精可能會透過將原本在細胞質的 Bax 轉移而插入粒腺體的外膜，使得 Bax 在粒腺體外膜上形成 homodimer，進而改變粒腺體膜電位而促使粒腺體內膜上的 cytochrome *c* 釋放到細胞質中 (Goping, et al., 1998; Green and Reed, 1998)。調控 BAX 基因表現的蛋白為 p53 (Huang, et al., 2000)，人類 BAX 基因上有 p53 的結合位置，當 p53 被 DNA 蛋白磷酸酶 (DNA protein kinase, DNA-PK) 磷酸化後，可進而活化其下游基因，如 BAX 及 *p21* (Karpnich, et al., 2002)。p53 會因細胞受到如化療藥物、氧化壓力、低氧等因子的刺激，使細胞的 DNA 受到傷害，此時 p53 會去促使下由基因如 *p21* 的表現，進而造成細胞週期 G₂ arrest (Bunz, et al., 1998)，若是 DNA 被破壞得太嚴重，p53 則會去活化 BAX 進而促使細胞凋亡，因此觀察 p53 在三種細胞株經藥物作用的表現情形。蟾蜍靈等毛地黃類藥物所誘發的細胞凋亡皆會導致 caspase 活化 (Lin, et al., 2004; Yeh, et al., 2003, 2001)，但先前的研究成果顯示，蟾蜍靈和華蟾精在三種不同前列腺癌細胞株中，誘發的 caspase 活化情形不盡相同，這可能與癌細胞特性不同有關。LNCaP 細胞會表現野生型 (wild type) p53，並且會分泌前列腺特異抗原 (prostate specific antigen, PSA)，故對於化療藥物較帶有突變型 p53 之前列腺癌細胞來得敏感 (Li, et al., 2003)。當細胞產生 DNA 受損訊息而無法修復時，p53 會將此訊息透過粒線體路徑，傳達到 caspases 而造成細胞凋亡 (Vogelstein, et al., 2000)。活化態的 p53 會被磷酸化，促使 Bax 轉移到粒線體和 cytochrome *c* 的釋放 (Goping, et al., 1998)，圖 5 C 顯示，p53 的確參與在蟾蜍靈和華蟾精誘發的細胞凋亡路徑中。

蟾蜍靈與華蟾精究竟是調控何種路徑而造成前列腺癌細胞凋

亡？目前的研究尚不足為此下定論，最早研究毛地黃類藥物對前列腺癌細胞作用的學者指出，毛地黃類藥物會因其為細胞膜上 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 的抑制劑，而提升細胞內鈉離子的濃度，再經由細胞膜上的鈉、鈣離子交換孔道而提升細胞內的鈣離子濃度，進一步造成細胞凋亡 (McConkey, et al., 2000; Yeh, et al., 2001)，至少鈣離子濃度升高會部分的參與在蟾蜍靈及華蟾精所造成的前列腺癌細胞凋亡機轉中 (Yeh, et al., 2003)。細胞內鈣離子平衡失調會導致細胞內許多訊息傳遞路徑之活化，諸如細胞結構及基因表現等，持續提高細胞內鈣離子濃度會活化許多水解酶，包括蛋白質水解酶，核水解酶以及脂肪酶 (Nicotera and Orrenius, 1998)，這些酵素活性之增加被認為是造成細胞凋亡的關鍵因素 (Trump and Berezsky, 1995)。因為這些水解酶過度活化會造成細胞能量不正常的損耗，使得能量製造不足，細胞骨骼開始崩解，磷脂質製造減少，細胞膜、細胞骨骼蛋白質及核染色質遭破壞，最後導致細胞凋亡。

另一方面，也有學者發現毛地黃類藥物造成細胞凋亡的機轉並不透過抑制 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase，哇巴因對於具有哇巴因阻抗性的 trophoblast 細胞仍有抑制其 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 的能力，但是不會造成細胞死亡 (Ho, et al., 2000)，因此，蟾蜍靈與華蟾精所造成的細胞凋亡，也可能經由除了抑制 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 以外的路徑調控。前人的研究指出，癌細胞在蟾蜍靈的作用下，會促使一些癌基因和抑癌基因的表現如 *Ras* 及 *p53*，當 *Ras* 活化後，其下游 MAPKK、MAPK 及 Raf-1 的活性也會增加，同時，細胞內的 cAMP 含量顯著上升，進而造成下游蛋白質磷酸酶的活化，再去調控 Bcl-2 家族，最後造成細胞凋亡 (Watabe, et al., 1996)。

類毛地黃類藥物在世界各地使用已有一段悠久的歷史，蟾蜍靈及華蟾精兩種藥物在癌症的治療及其機轉上已有一些探討，但卻鮮有研究顯示這種藥物對前列腺癌之影響。本研究證明蟾蜍靈及華蟾精對前列腺癌細胞的確抑制其增殖，並且導致前列腺癌細胞的凋亡。其機轉部分是透過細胞內鈣離子濃度上升的調控 (Yeh, et al., 2003)，本研究也發現蟾蜍靈及華蟾精所造成的細胞凋亡，除了引發細胞內一連串 caspases 酵素系統的活化外，其上游會有 p53 蛋白表現的增加，又促進 Bax 轉移到粒腺體上，進而促使粒腺體內膜上的 cytochrome *c* 釋放到細胞質中，接著活化 caspases 酵素系統，導致細胞凋亡。

在細胞膜上有兩個細胞素的受器：CD 95 (Fas/APO-1) 以及 TNFR-1，這些受器是屬於 tumor necrosis receptor 的家族。這些受器與 ligands 結合時，會與細胞內特定的分子產生交互作用，驅動細胞

凋亡的進行，這些分子為 Fas-associated death domain (FADD) 以及 TNFR1-associated death domain (TADD)。FADD 以及 TADD 包含 death domain 以及 death effector domain 兩大部分 (Muzio, et al., 1996)。一旦 FADD 上的 death domain 被 ligand 活化時，接著 procaspase 8 則會與 death effector domain 結合形成 death-inducing signal complex (DISC)，並藉由將 procaspase 8 切割而活化 (Boldin, et al., 1996)，活化的 caspase 8 會直接活化 caspase 3 或是藉由改變粒線體的功能，釋放 cytochrome c 而導致細胞凋亡 (Wolf and Green, 1999)。

由於 p53 基因是一個腫瘤抑制基因 (tumour suppressor gene)，在癌細胞中，為了阻斷細胞凋亡路徑而能無限制的增生，癌細胞中腫瘤抑制基因所表現的蛋白會被去活化，以 p53 來說可能為：[1]. p53 與 DNA 結合位置的突變；[2]. p53 C 端的缺失；[3]. p53 抑制因子 (Mdm 2) 的增加；[4]. 將 p53 限制在細胞質中 (Vogelstein, et al., 2000)，上述四種方式可造成 p53 在癌細胞內的功能異常。DU145 細胞是表現突變型的 p53，而 PC3 細胞中的 p53 為 null 型式，p53 所調控的細胞凋亡路徑，在這些較為惡性的前列腺癌細胞中並沒有顯著作用 (Carroll, et al., 1993)。因此，觀察在 p53 突變的非雄性素依賴性前列腺癌細胞中，蟾蜍靈和華蟾精是否會透過 Fas 的活化而導致細胞凋亡。

圖六顯示，Fas 的確在蟾蜍靈與華蟾精所造成的細胞凋亡路徑中扮演調控的角色，且此情形在 p53 突變的非雄性素依賴性前列腺癌細胞中較為顯著。蟾蜍靈和華蟾精皆為拓扑異構酶 II 的抑制劑，許多化療藥物，例如 etoposide 也有這種特性。根據先前的研究指出，etoposide 所導致的細胞凋亡並不需要 Fas ligand 的參與 (Fukazawa, et al., 1999)，表現突變型 p53 的前列腺癌細胞中，可能是藉由活化 JNK 進而促使 Fas 聚集後，形成 DISC 而造成細胞凋亡 (Toyoshima, et al., 1997)。若有 Fas ligand 的參與則可能是透過與鄰近細胞的交互作用而導致細胞凋亡 (Chen, et al., 1998)。蟾蜍靈和華蟾精所造成的細胞凋亡刺激，在表現野生型 p53 之 LNCaP 細胞中，則可透過 p53 調控或是 Fas 調控的路徑，因此 LNCaP 細胞的 Fas 表現情形較低。當轉殖 siRNA-Fas 後，蟾蜍靈和華蟾精所誘發的 Fas mRNA 和蛋白表現皆被抑制 (圖七 A 和 B)，以 MTT 方式觀察細胞的存活情形發現，當抑制了 Fas 的表現，因蟾蜍靈和華蟾精導致細胞凋亡的現象也被抑制，同樣的，此現象在 DU145 和 PC3 細胞中較為顯著 (圖七 C)。故在 p53 突變的非雄性素依賴性前列腺癌細胞中，Fas 在蟾蜍靈和華蟾精誘發的細胞凋亡路徑扮演重要的角色。

伍、結論與建議

本研究在於蟾酥類藥物包括蟾蜍靈及華蟾精對雄性素依賴性細胞株 LNCaP，及非雄性素依賴性細胞株 DU145、PC3，三種前列腺癌細胞株增殖之影響並探討其機轉。結果顯示，蟾酥中的蟾蜍靈和華蟾精能藉由誘發細胞凋亡路徑抑制前列腺癌細胞生長，參與調控的因子包括 Bax、cytochrome c 和 caspases。在可表現野生型 p53 的 LNCaP 細胞中，p53 和 Fas 都會參與在蟾蜍靈和華蟾精誘發的細胞凋亡機轉中；而在 p53 突變的 DU145 和 PC3 細胞中，Fas 則扮演了調控細胞凋亡的重要角色。

蟾蜍靈和華蟾精對於癌細胞的相關治療研究已經十分深入，並瞭解其作用機轉。唯這些實驗尚侷限於細胞實驗，人未有動物試驗的結果被發表，故這些治療效果，仍須經過長期的動物試驗進而進入人體試驗，才可以真正為病人所使用。蟾蜍靈和華蟾精等毛地黃類藥物的使用範圍窄，民眾切勿自行服用！

陸、誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會（計畫編號：CCMP97-RD-010）提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

柒、參考文獻

1. Antonipillai I, Schich K, and Horton R: Ouabain is a potent inhibitor of aldosterone secretion and angiotensin action in the human adrenal. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2335-2337.
2. Baker SJ, and Reddy EP: Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 17: 3261-3270.
3. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, and Wallach D: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815.
4. Brownlee AA, Johnson P, and Mills IH: Actions of bufalin and cinobufotolin, two bufadienolides respectively more active and less active than ouabain, on ouabain binding and 86Rb uptake by human erythrocytes. *Clin Sci* 1990; 78: 169-174.
5. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, and Wang X: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-290.
6. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, and Vogelstein B: Requirement for p53 and p21 to sustain G₂ arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-1501.
7. Carroll AG, Voeller HJ, Sugars L, and Gelmann EP: p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1993; 23: 123-134.
8. Chang CK, Yu HJ, Chan KW, and Lai MK: Secular trend and age-period-cohort analysis of prostate cancer mortality in Taiwan. *J Urol* 1997; 158: 1845-1848.
9. Chen AY, and Lin LF: DNA topoisomerase: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994; 34: 191-218.
10. Chen JJ, Sun Y, and Nabel GJ: Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998; 282: 1714-1717.
11. Chu TM: Prostate-specific antigen and early detection of prostate cancer. *Tumor Biol* 1997; 18: 123-134.
12. Fukazawa T, Fujiwara T, Morimoto Y, Shao J, Nishizaki M, Kadowaki Y, Hizuta A, Owen-Schaub LB, Roth JA, and Tanaka N: Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis

- induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 2189-2199.
13. Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, and Isaacs JT: The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostate cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res* 1994; 54: 6167-6175.
 14. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, and Shore GC: Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 1998; 143: 207-215.
 15. Green DR, and Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
 16. Haenszel W, and Kurihara: Studies of Japanese migrants. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40: 43-68.
 17. Hara T, Nakamura K, Araki H, Kusaka M, and Yamaoka M: Enhanced androgen receptor signaling correlates with the androgen-refractory growth in a newly established MDA PCa 2b-hr human prostate cancer cell subline. *Cancer Res* 2003; 63: 5622-5628.
 18. Hashimoto S, Jing Y, Kawazoe N, Masuda Y, Nakajo S, Yoshida T, Kuroiwa Y, and Nakaya K: Bufalin reduces the topoisomerase II in human leukemia cells and affects the anticancer drugs. *Leuk Res* 1997; 21: 875-883.
 19. Ho CK, Chen SM, and Wang SY: Ouabain resistance of a human trophoblast cell line is not related to its reactivity to ouabain. *Eur J Cell Biol* 2000; 79: 765-770.
 20. Hsing AW: Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev* 2001; 23: 42-58.
 21. Hsing AW, Chang L, Nomura AM, Isaacs WB, and Armenian HK: A glimpse into the future. *Epidemiol Rev* 2001; 23: 2.
 22. Huang TG, Ip SM, Yeung WS, and Ngan HY: Changes in p21WAF1, pRB, Mdm-2., Bax, and Bcl-2 expression in cervical cancer cell line transfected with a p53 expressing adenovirus. *Eur J Cancer* 2000; 36: 249-256.
 23. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, and Thun MJ: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
 24. Jing Y, Ohizumi H, Kawazoe N, Hashimoto S, Masuda Y, Nakajo S,

- Yoshida T, Kuroiwa Y, and Nakaya K: Selective inhibitory effect of bufalin on growth of human tumor cells in vitro: association with the induction of apoptosis in leukemia HL-60 cells. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 645-651.
25. Jing Y, Watabe M, Hashimoto S, Nakajo S, and Nakayo K: Cell cycle arrest and protein kinase modulation effect of bufalin on human leukemia ML1 cells. *Anticancer Res* 1994; 14: 1193-1198.
26. Karpinich NO, Tafani M, Rothman RJ, and Russo MA: The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome *c*. *J Biol Chem* 2002; 277: 16547-16552.
27. Kawazoe N, Watabe M, Masuda Y, Nakajo S, and Nakaya K: Tiam 1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene* 1999; 18: 2413-2421.
28. Kuida K, Zheng T, Na S, Kaun C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, and Flavell RA: Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996; 384: 368-372.
29. Lee CT, and Oesterline JE: Diagnostic markers of prostate cancer: utility of prostate-specific antigen in diagnosis and staging. *Seminars Surg Oncol* 1995; 11: 23-35.
30. Li H, Zhu H, Xu CJ, and Yuan J: Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
31. Li Y, Raffo AJ, Drew L, Mao Y, Tran A, Petrylak DP, and Fine RL: Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143. *Cancer Res* 2003; 63: 1527-1533.
32. Lin H, Wang SW, Tsai SC, Chen JJ, Chiao YC, Lu CC, Huang WJS, Wang GJ, Chen CF, and Wang PS: Inhibitory effect of digoxin on testosterone secretion through mechanisms involving decreases of cyclic AMP production and cytochrome P450scc activity in rat testicular interstitial cells. *Brit J Pharmacol* 1998; 125: 1635-1640.
33. Lin H, Juang JL, and Wang PS: Involvement of Cdk5/p25 in digoxin-triggered prostate cancer cell apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 29302-29307.

34. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, and Rosen A: The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998; 140: 1485-1495.
35. Marumo K, Bara S, and Murai M: Erectile function and nocturnal penile tumescence in patients with prostate cancer undergoing luteinizing hormone-releasing hormone agonist therapy. *Internat J Urol* 1999; 6: 19-23.
36. McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, and Newman RA: Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 3807-3812.
37. Michalides RJ: Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, progresis and treatment of cancer. *J Clin Pathol* 1999; 52: 555-568.
38. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, and Dixit VM: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827.
39. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, and Yuan J: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 1999; 403: 98-103.
40. Nicotera P, and Orrenius S: The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1998; 23: 173-180.
41. Oltvai ZN, Milliman CL, and Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
42. Ornstein DK, Oh J, Herschman JD, and Andriole GL: Evaluation and management of the man who has failed primary curative therapy for prostate cancer. *Urol Clin North Am* 1998; 25: 591-601.
43. Panesar NS: Bufalin and unidentified substances in traditional Chinese medicine cross react in commercial digoxin assay. *Clin Chem* 1992; 38: 2155-2156.
44. Sellers WR, and Fisher DE: Apoptosis and cancer targeting. *J Clin Invest*

45. Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M, Yonehara S, and Konishi N: c-Jun NH₂-terminal kinase-dependent Fas activation contributes to etoposide-induced apoptosis in p53-mutated prostate cancer cells. *Prostate* 2003; 55: 265–280.
46. Steel RGD, and Torrie JH: Principles and Procedures of Statistics. New York: McGraw-Hill; 1960.
47. Stenkvist B: Is digitalis a therapy for breast carcinoma ?. *Oncol. Rep* 1999; 6: 493-496.
48. Steven WH: To die or not to die. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
49. Thronberry NA, and Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
50. Toyoshima F, Moriguchi T, and Nishida E: Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. *J Cell Biol* 1997; 139: 1005-1015.
51. Trump BF, and Berezsky IK: Calcium mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995; 9: 219-228.
52. van Brussel JP, van Steenbrugge GJ, Romijn JC, Schroder FH, and Mickisch GH: Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *Eur J Cancer* 1999; 35: 664-671.
53. Vogelstein B, Lane D, and Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310.
54. Wang G, Sun G, Tang W, and Pau X: The application of traditional Chinese medicine to the management of hepatic cancerous pain. *J Tradit Chin Med* 1994; 14: 132-138.
55. Watabe M, Ito K, Masuda Y, Nakajo S, and Nakaya K: Activation of AP-1 is required for bufalin-induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *Oncogene* 1998; 16: 779–787.
56. Watabe, M., Masuda Y, Nakajo S, Yoshida T, Kuroiwa Y, and Nakaya K: The cooperative interaction of two different signaling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukemia U937 cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 14067-14072.
57. Wolf BB, and Green DR: Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 20049-20052.

58. Yeh JY, Huang WJ, Kan SF, and Wang PS: Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Prostate* 2003; 54: 112–124.
59. Yeh JY, Huang WJ, Kan SF, and Wang PS: Inhibitory effects of digitalis on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *J Urol* 2001; 166: 1937-1942.

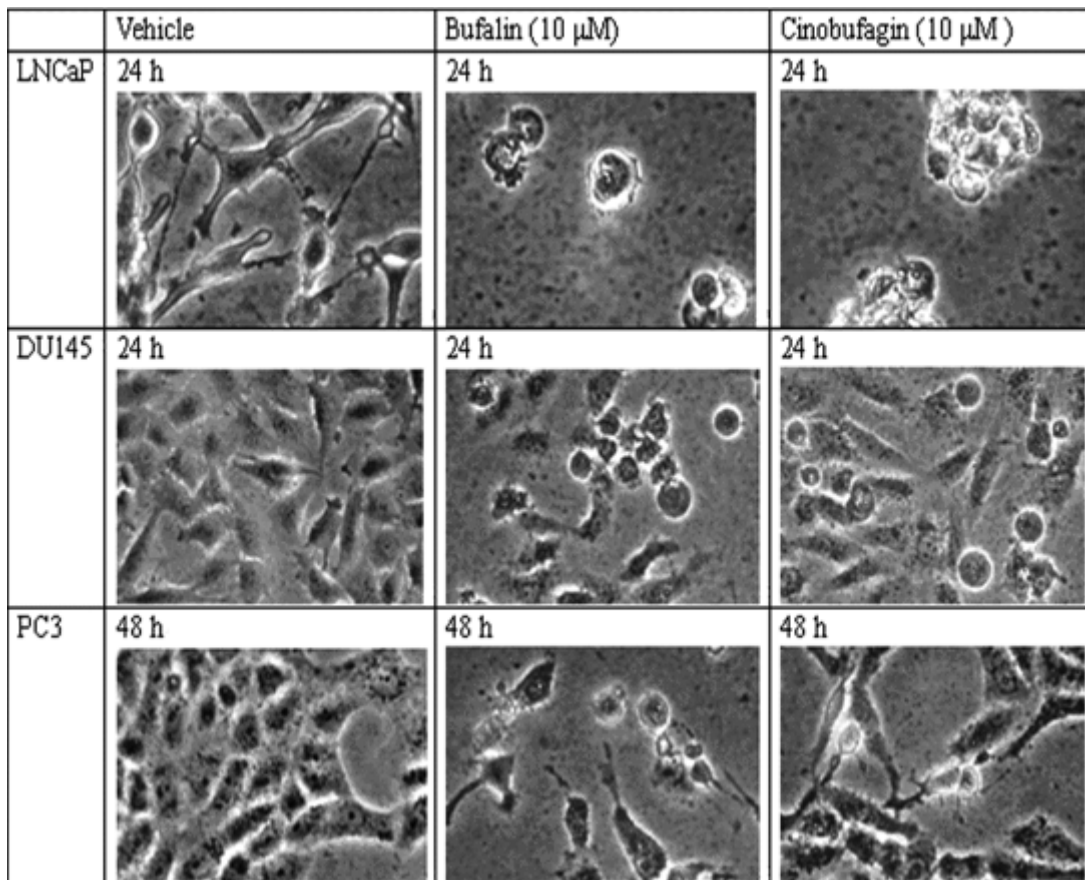
捌、圖表

表一、蟾蜍靈和華蟾精處理前列腺癌細胞株 LNCaP、PC3、DU145 第一天到第四天造成抑制細胞增值 50% 所需之濃度 (IC₅₀)。

Table 1. The IC₅₀ of bufalin or cinobufagin on LNCaP, DU145 and PC3 cells. The incubation period was from 1 to 4 days. IC₅₀ was calculated from the regression equation of the proliferation index each incubation day. The data were presented as mean ± SEM. ^b *P*<0.05 compared with cinobufagin treatment, ^c *P*<0.01 compared with incubation of time day 1.

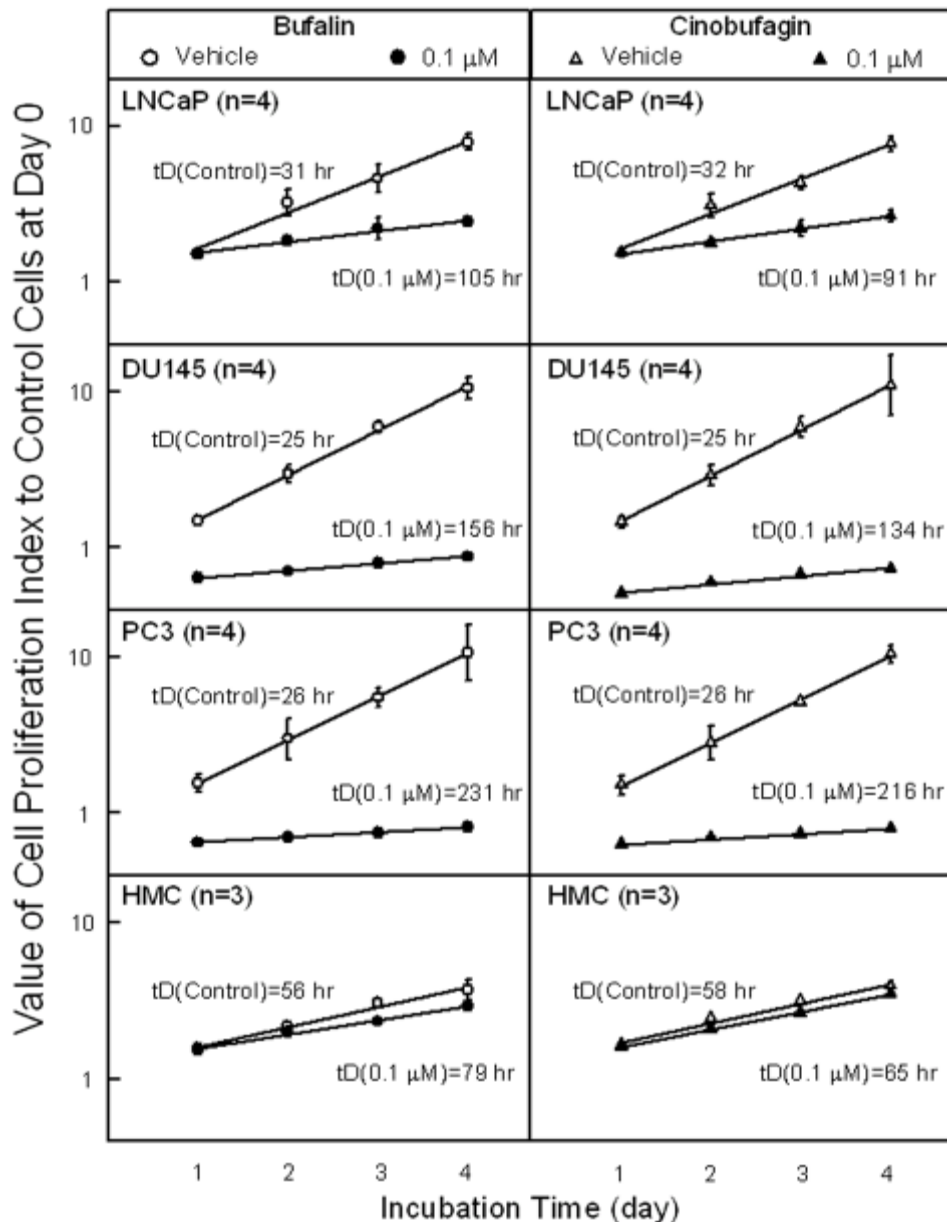
	Incubation Time (day)	Bufalin, IC ₅₀ (nM)	Cinobufagin, IC ₅₀ (nM)
LNCaP	1	832.22 ± 28.49	1061.71 ± 44.81
	2	298.46 ± 24.49 [*]	299.80 ± 28.22 [*]
	3	90.51 ± 19.74 [*]	128.74 ± 16.86 [*]
	4	63.71 ± 8.43 [*]	74.90 ± 7.61 [*]
DU145	1	85.76 ± 2.41	108.76 ± 1.67
	2	15.12 ± 2.71 [*]	30.86 ± 1.54 [*]
	3	14.28 ± 1.51 [*]	27.88 ± 1.47 [*]
	4	13.59 ± 2.32 [*]	25.25 ± 1.20 [*]
PC3	1	92.68 ± 4.60	100.11 ± 2.01
	2	12.73 ± 2.22 [*]	21.56 ± 1.39 [*]
	3	10.10 ± 0.79 [*]	18.92 ± 1.16 [*]
	4	8.96 ± 1.24 [*]	17.46 ± 1.53 [*]

^{*} *P*<0.01 compared with incubation time of day 1



圖一、蟾蜍靈和華蟾精對前列腺癌細胞株外觀型態之影響。

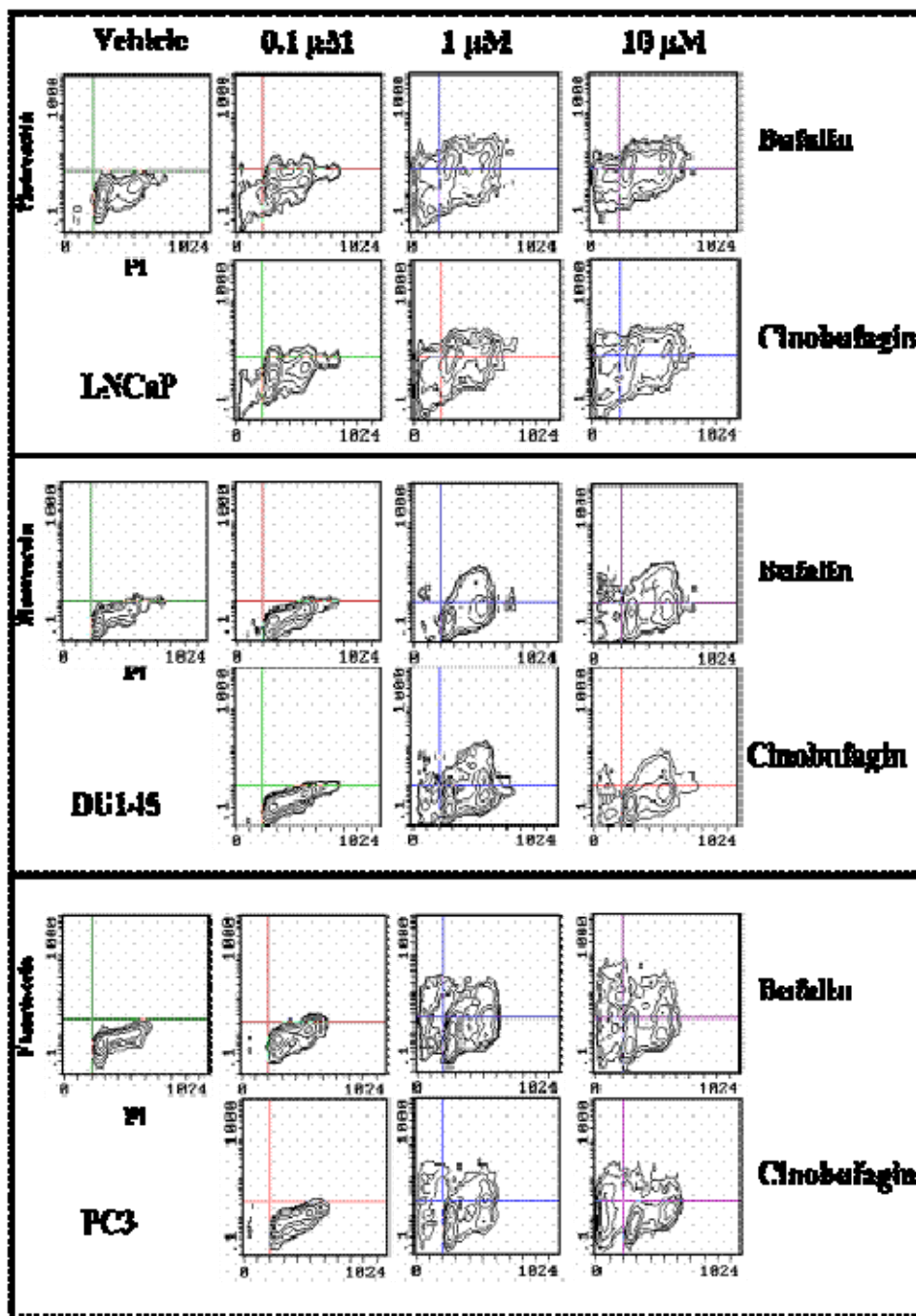
Fig. 1. Effects of bufalin or cinobufagin on the morphology of LNCaP, DU145 and PC3 cell lines.



圖二、蟾蜍靈和華蟾精處理 1 至 4 天，對前列腺癌細胞株及人類正常腎小球細胞倍增時間之影響。

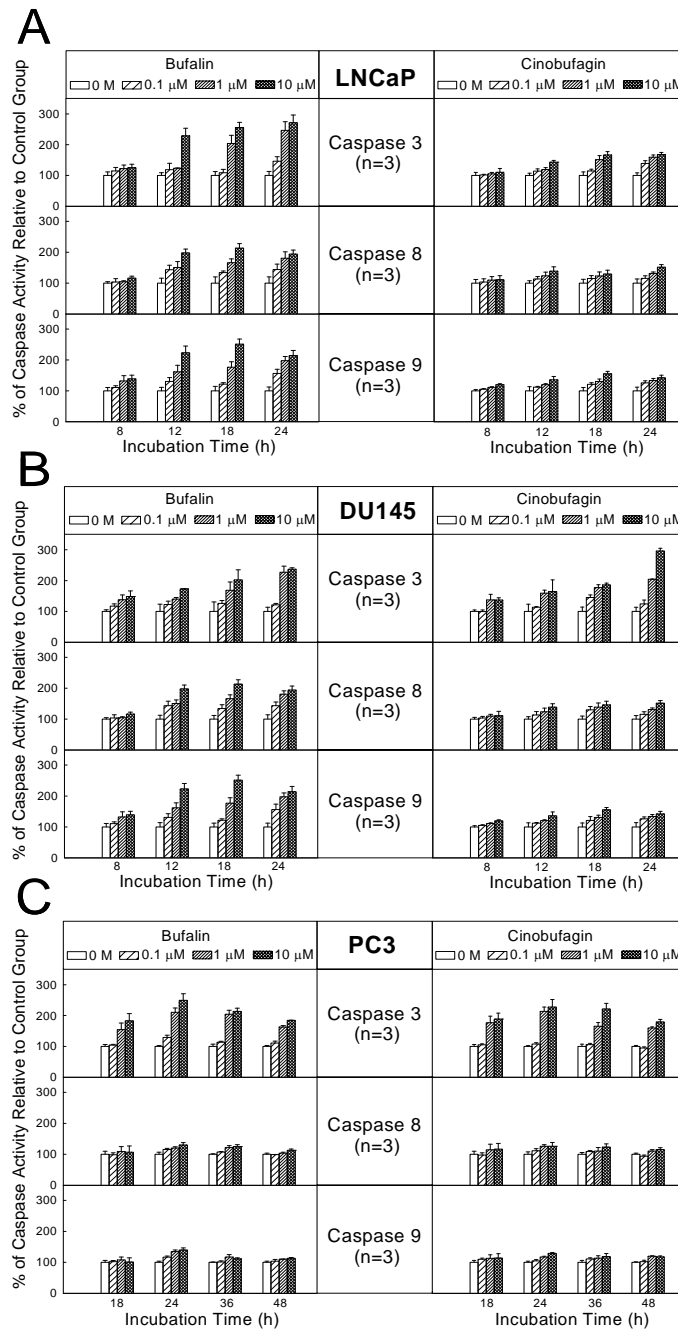
Fig. 2. Effects of bufalin and cinobufagin on the change of doubling time in LNCaP, DU145, PC3 and HMC cells. Cells were treated with bufalin and cinobufagin at the concentration of 0.1 μM following an incubation period from 1 to 4 days. The doubling time was calculated from the regression equation of the proliferation index. The applied equation was $y = \log(OD_t/OD_0) = (\log 2/tD)t$, where OD_t and OD_0 represented the optical density at day t or at day 0, respectively; tD stood for doubling time. The doubling time was calculated by $tD = \text{Log}2/S$ (days), where S was the slope of the regression line. Each value represents mean \pm SEM.

圖



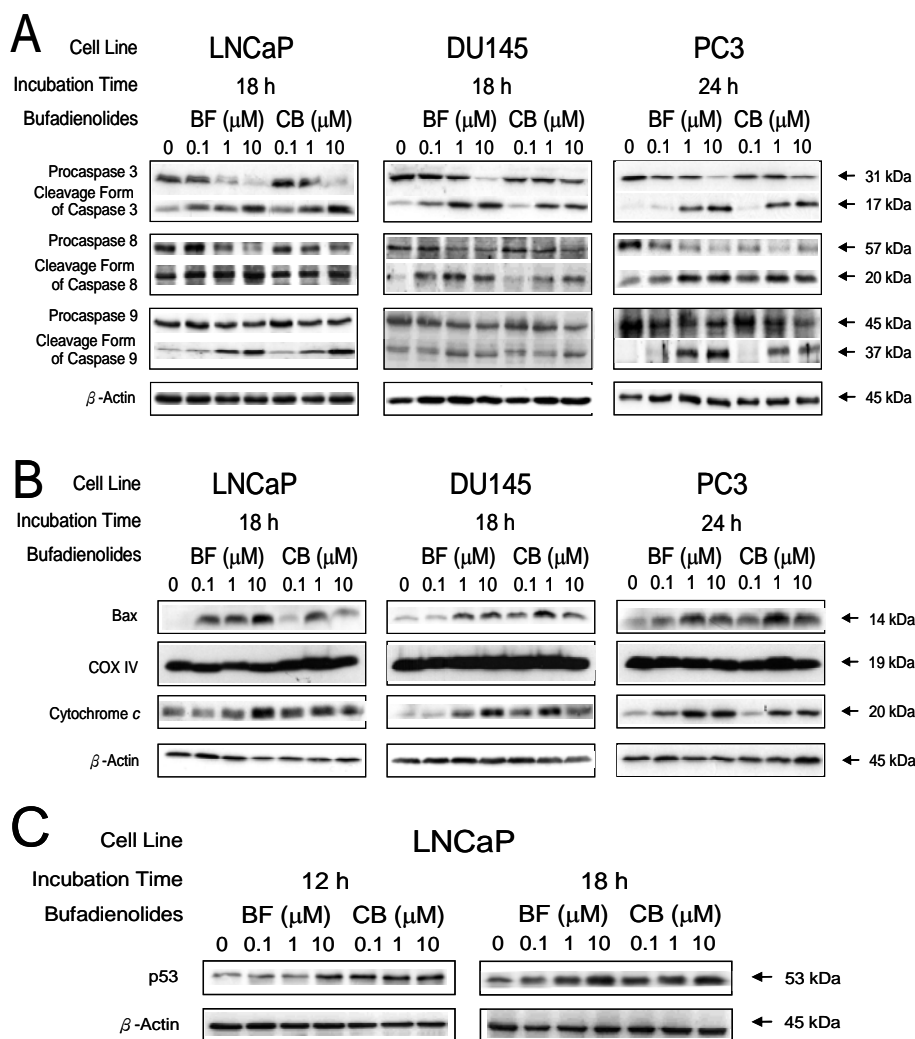
三、蟾蜍靈和華蟾精處理對於前列腺癌細胞株 DNA 斷裂之影響。

Fig. 3. Effects of bufalin and cinobufagin on the DNA fragmentation in LNCaP, PC3 and DU145 cells. Contour diagram of fluorescein-dUTP/PI flowcytometry of LNCaP, DU145, and PC3 cells after bufalin or cinobufagin treatment at various doses. Cell populations in the upper left and right quadrants of each panel represent the apoptotic cells.



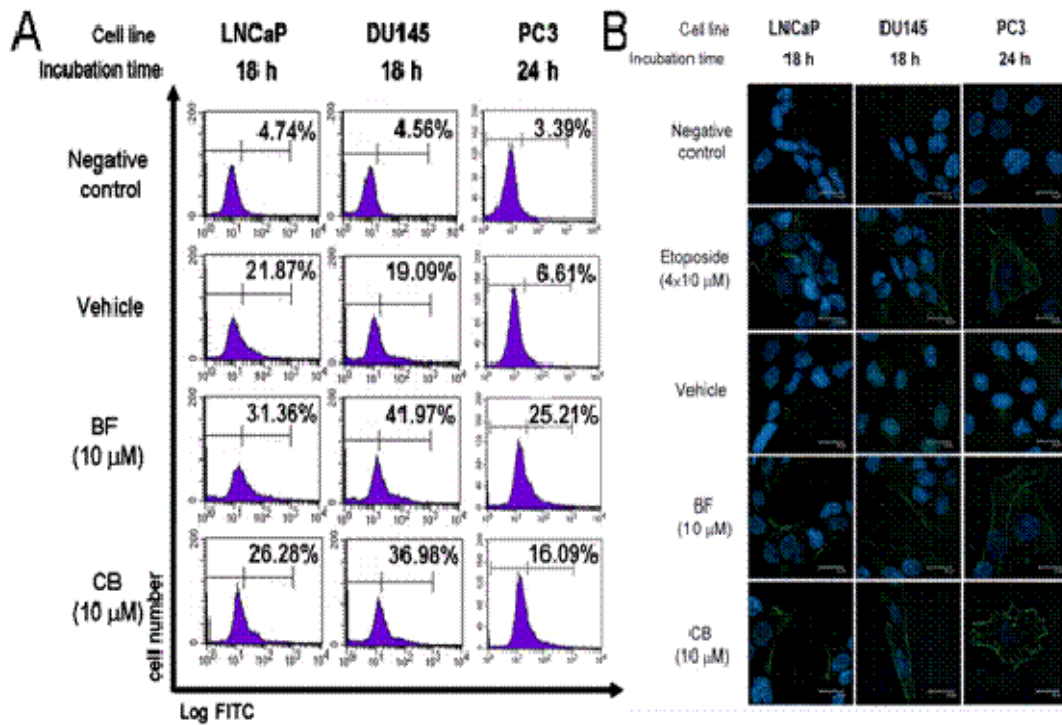
圖四、經蟾蜍靈和華蟾精處理 LNCaP 和 DU145 細胞 8、12、18 及 24 小時後，以及處理 PC3 細胞株 18、24、36 和 48 小時後 caspase-3，8，及 9 之活性表現。

Fig. 4. Activities of caspase 3, 8, and 9 in LNCaP (A), DU145 (B) and PC3 (C) cell lines after administration of bufalin or cinobufagin. Activities of caspase 3, 8 and 9 was assayed by a colorimetric kit, and was determined after treatment at the concentration of 0, 0.1, 1, and 10 μ M for 8, 12, 18, and 24 h in LNCaP and DU145 cell lines, and for 18, 24, 36 and 48 h in PC3 cells. Each value represents mean \pm SEM. Control value = 100%.



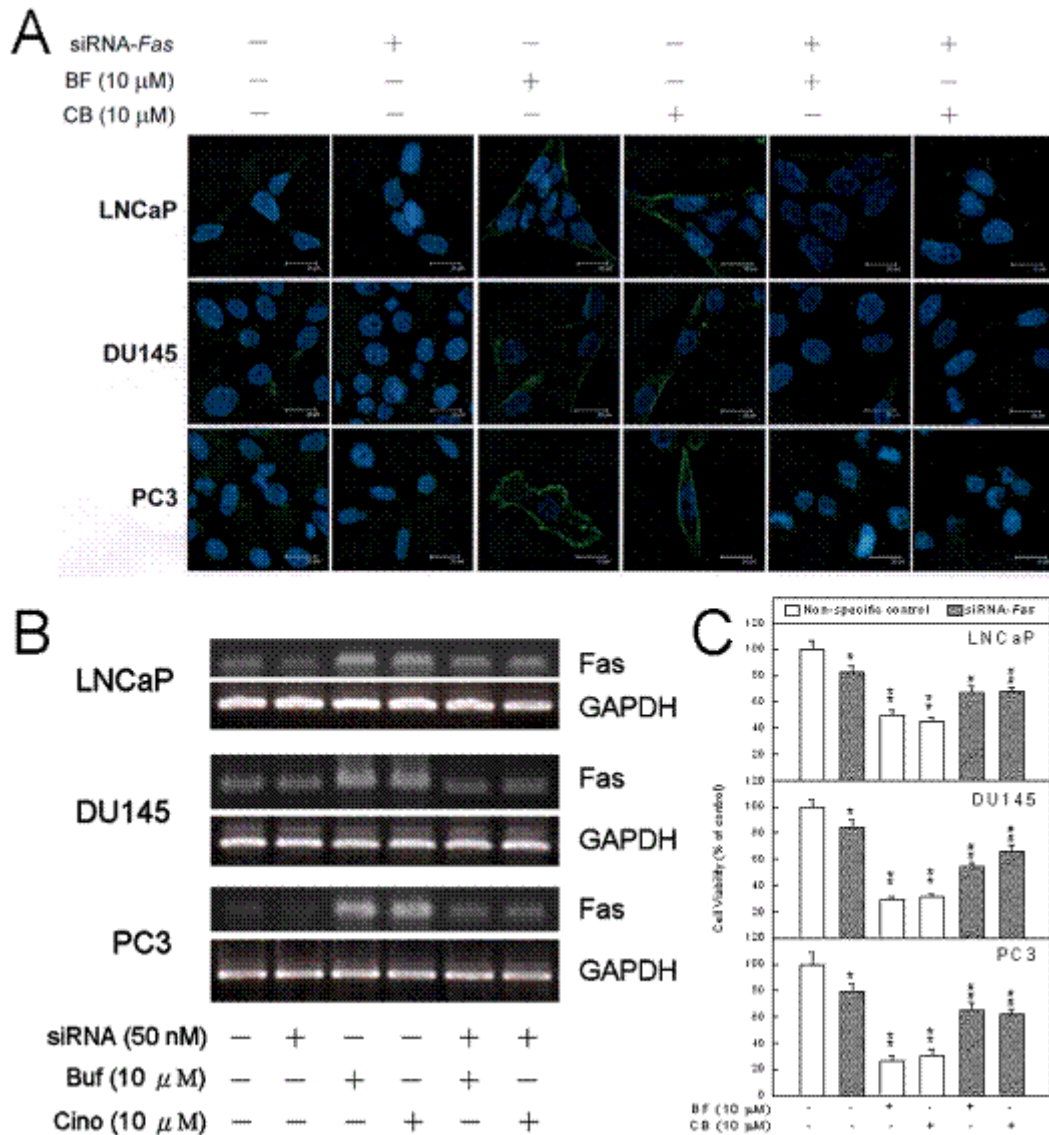
圖五、經蟾蜍靈和華蟾精處理 18 及 24 小時後，LNCaP、DU145 和 PC3 細胞株 caspases 蛋白質、Bax 和 cytochrome c 之表現。另外觀察表現野生型 p53 蛋白的 LNCaP 細胞經藥物處理 12 及 18 小時後 p53 蛋白之表現。

Fig. 5. The protein expression of apoptosis-related molecules in LNCaP, DU145, and PC3 cell lines after administration of bufalin or cinobufagin. (A) After the treatment of bufalin or cinobufagin for 18 h (LNCaP and DU145) or 24 h (PC3), cell lysates were sized in 10% (caspase 9) or 15% (caspase 3, and 8) SDS-PAGE. (B) Cell lysates were separated into mitochondrial and cytosolic fractions and subjected to 15% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Each lane was loaded with 40 μ g protein of samples. (C) LNCaP cells were treated with bufalin or cinobufagin at the concentration of 0, 0.1, 1, and 10 μ M for 12 h and 18 h. Whole cell lysates were sized in 10% SDS-PAGE. Similar results were obtained in three other experiments. BF, bufalin; CB, cinobufagin.



圖六、以流式細胞儀觀察及免疫螢光染色分析蟾蜍零及華蟾精對於前列腺癌細胞表面死亡接受器 (death receptor, Fas)表現之影響。

Fig.6. The expression of Fas on cell surface of bufalin- and cinobufagin-treated prostate cancer cells. (A) Prostate cancer cells were incubated with bufalin or cinobufagin at the concentration of 10 μM for 18 h (LNCaP and DU145) or 24 h (PC3). Cells were washed and incubated with mouse anti-human Fas monoclonal antibody or with anti-mouse IgG as negative control at 4°C for 2 h. After washing twice, cells were further incubated with FITC-conjugated rat anti-mouse IgG and analyzed by flow cytometry. Similar results were obtained in three other experiments. (B) After administration, cancer cells on the cover slips were fixed and permeabilized. Cover slips were then sequentially incubated with anti-Fas antibody and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG. Fluorescent image was observed by confocal microscope. Cells treated with etoposide were considered as the positive control group. Scale bar = 20 μm; BF, bufalin; CB, cinobufagin.



圖七、轉殖 Fas 之 siRNA 對於處理蟾酥之前列腺癌細胞細胞表面 Fas 蛋白表現及 Fas mRNA 表現之影響，以及轉殖 Fas 之 siRNA 對於處理蟾酥之前列腺癌細胞存活能力之影響。

Fig. 7. The Fas expression and cell viability in siRNA-*Fas*-transfected prostate cancer cells after the treatment of bufalin and cinobufagin. (A) Cells were transfected with 50 nM siRNA for 48 h, and then treated with bufalin or cinobufagin at the concentration of 10 μ M for 18 h (LNCaP and DU145) or 24 h (PC3). The protein expression of Fas induced by bufalin and cinobufagin were inhibited after siRNA-*Fas* transfection. Scale bar = 20 μ m. (B) The mRNA of transfected cells were extracted and analyzed by RT-PCR. The mRNA expression of Fas elevated by bufalin and cinobufagin were downregulated. (C) Cell viability was measured by MTT assay. Bufalin and cinobufagin were added in the medium after a 48 h-transfection. White columns represent non-specific siRNA-transfected group; hatched columns indicated siRNA-*Fas*-treated group. Control value = 100%; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ versus non-specific siRNA-control group; #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$ versus non-specific siRNA plus BF or CB groups; BF, bufalin. CB; cinobufagin.