

編號：CCMP93-RD-104

中草藥成分在抗癌及抗血管新生的作用研究與活性成分來源之基原鑑定 (3-3)

顧記華

國立台灣大學

摘 要

在過去的這一年度，本計畫已完成超過 70 種中草藥、台灣特有植物、天然物等成分物質對於人類腫瘤細胞的抗癌活性分析（原預計執行 50 種）。研究結果發現數種成分具有不錯的抗癌活性，其中以 IC316(兔兒菜)、Bromovulone III 及 YCS-IQ 的作用最好，其作用肝癌細胞的 IC₅₀ 值分別為 4.6、0.45 及 3.9 μM。再經由深入分析發現，Bromovulone III 及 YCS-IQ 的抗癌作用濃度範圍較廣，對正常細胞也較沒有毒性，因而更進一步分析其抗癌作用機轉。以電子顯微鏡觀察及染色體濃聚分析發現，Bromovulone III 可有效的造成肝癌細胞凋亡作用 (Apoptosis)，再經由多項的生化實驗分析結果得知，Bromovulone III 會有效的引發肝癌細胞的凋亡作用，可能是經由內質網受迫力 (ER stress)，進而造成 caspase-7 與 caspase-12 的活化，以及促進轉錄因子 GADD153/CHOP 的作用而造成的結果。另一種抗癌成分 YCS-IQ，其抗癌作用經實驗分析後發現，主要是經由抑制腫瘤細胞的 NF-κB 的 DNA 結合活性，以及促進轉錄因子 CHOP/GADD153 的作用，而抑制腫瘤細胞的生長進而達到其抗癌作用。此外，YCS-IQ 的來源物質之基原鑑定部分也順利完成。

關鍵詞：抗癌作用、內質網受迫力、轉錄因子 NF-κB、轉錄因子 CHOP/GADD153

Number: CCMP93-RD-104

Studies of Chinese Herbal Medicines on Anticancer and Antiangiogenic Effects and Analysis of Genetic Variance of Active Ingredients (3-3)

Jih-Hwa Guh

National Taiwan University

ABSTRACT

We have done a screening test on the examination of anticancer effect in various components from natural products, Chinese herbal medicines and plants in Taiwan. In this project, we have screened 70 compounds and found several active components. Among these compounds, IC316, bromovulone III and YCS-IQ displayed effective anti-tumor activities against several human tumor cell lines. In a further study, the data demonstrated that bromovulone III and YCS-IQ had little cytotoxic effects to normal cells. The anti-tumor mechanisms of these two compounds are identified in this project. After several biochemical, immunohistological and immuno-precipitation assays, we found that bromovulone III induces ER stress and leads to activation of CHOP/GADD153 and caspase-12 in Hep3B cells. Furthermore, we also found that YCS-IQ displays anti-tumor activity. After further identification, it is suggested that the regulation of two transcription factors, including the inhibition of NF- κ B DNA binding and the induction of protein expression and nuclear translocation of CHOP/GADD153, might explain ilimaquinone-induced anti-tumor effect. The genetic identification of the parent source of YCS-IQ has also been finished.

Keywords : Anti-tumor activity, ER stress, NF- κ B, CHOP/GADD153

壹、前言

自民國七十一年起，惡性腫瘤便已成為國人十大死因之首。根據衛生署於去年所公佈，國人罹患惡性腫瘤而死亡的人數，在八十九年為 31,554 人、九十年為 32,993 人，而去年則為 34,342 人；也就是說惡性腫瘤在近幾年當中，每天奪走近 100 條人命，且其死亡人數以每年約 1,500 人之速度在增加中。由此可見，惡性腫瘤實是國人健康之第一殺手。造成癌症的原因甚多，如荷爾蒙的調節與改變、年齡、種族、家族及遺傳等因素有關，此外，飲食與環境的改變及週遭生活壓力變大，也被認為是造成癌症的主要原因之一。不僅是國內如此，在許多開發中及已開發國家，癌症皆是人類生命的主要殺手，基於這項理由，對於癌症的治療，已成為國際上生物醫學界的主要課題。癌症之成因，簡單來說便是細胞不正常的增生繁殖成為癌細胞，而這癌細胞會佔據並侵蝕周圍的正常組織，更可能經由血液和淋巴系統擴散至其他重要部位，即所謂的轉移，而這也是造成患者死亡的主要原因之一。癌症的治療主要有手術、放射線療法及化療藥物的使用。然而，並非每一個患者皆適合手術治療，此外，許多手術及放射線療法皆須有後續的化療藥物的配合使用，因此，化療藥物的研究與開發，便成為現今生物科技發展應用的主要課題。傳統的化療藥物大多有選擇性差、副作用大、易產生抗藥性及病人難以忍受等缺點，而導致病人免疫力降低、正常細胞組織受嚴重影響及配合度低，因而治療失敗。基於上述種種理由，以及拜生物科技發展之賜，我們對於腫瘤細胞愈來愈了解，便能從中找出其專一性蛋白，研發新的化療藥物，予以致命性攻擊，如此不但能提高藥物的選擇性，降低藥物的副作用，並能提高藥物的作用能力，斬草除根，使其不易產生抗藥性，如此便能大大的提高治療效果，使癌症確實不再是絕症。這是現今生物科技的努力目標，也是生物醫學界的最大期望。

在腫瘤醫學的研究及藥物研發，有三個主要的發展方向：一、發展診斷技術及腫瘤專一性 Marker 的研究，期能早期發現早期治療；二、發展化療藥物，即針對腫瘤細胞來進行毒殺作用，這也是早期抗癌藥物的發展方向，例如 alkylating agents、methotrexate、pyrimidine analogs、purine analogs 及 vinca alkaloids，然而，這些抗癌藥物卻也常引發一些嚴重與不適的副作用，並且對一般正常細胞也造成毒性作用。現今生物科技發達，也找出一些調控腫瘤細胞的基因及蛋白，針對這些特殊的調控因子加以研究，並發展出相關的藥物，這樣不僅可加強抗癌藥物藥效，並可降低正常細胞的影響，並減少許多嚴重的副作用。三、發展出

抗血管新生的藥物。由前段敘述得知，因 solid tumor 而致死的人數，佔了所有惡性腫瘤死亡的 90%以上，而癌細胞轉移 (metastasis) 即是 solid tumor 高致死率之主因，而血管新生便是這些 solid tumor 變大及轉移之主因之一。過去幾十年來，對於抗癌藥物的發展，大多發展直接毒殺腫瘤細胞的化療藥物。然而，其最大的缺點 (副作用) 即是藥物大多沒有選擇性，其在毒殺腫瘤細胞的同時，也會造成正常細胞的死亡。現今生物科技發達，在腫瘤相關的生物醫學也有很大的進步，這其中有幾項很重要的發現，諸如：p53、Fas、Bcl-2、Bcl_{XL} 及 Bax 等等調控細胞生存及死亡的基因及蛋白的發現、Caspase 家族等等執行細胞死亡的酵素的發現、Cyclin 及 Cyclin-dependent protein kinase (Cdk) 等等調控細胞週期的蛋白及酵素的發現、Ras 家族中 K-Ras 異常活化的發現等等，使得研究者對於腫瘤細胞與正常細胞的差異，有了更重大的發現與了解。經由這些差異，我們可以研究及發現更有選擇性的抗癌藥物，來增進治療效果並減低嚴重的副作用。

本計畫在今年度的目標，是希望能完成下述工作：一、完成 50 種以上之中草藥或台灣特有植物成分的抗癌活性篩選工作，並完成上述篩選資料的建檔工作，提供給相關的合作單位；二、預期能發現有抗癌活性成分，並進而研究其抗癌作用機轉；三、建立相關研究技術平台，以利進一步藥物開發的後續工作；四、完成活性成分來源之基原鑑定。

貳、材料與方法

一、腫瘤細胞之培養

人類腫瘤細胞購自食品工業研究所，以 RPMI-1640 為培養液，外加 10% FCS, Penicillin (100U/mL) 及 Streptomycin (100 μ g/mL)。將細胞培養於 75cm² 之培養皿中，並置於 37°C 恆溫箱通以氣體 95% air/5% CO₂，每 2-3 天換一次培養液，待細胞長滿後，以 1:3—1:4 的比例做繼代培養或進行相關實驗。

二、SRB 測定法

利用此方法來定量細胞的生長作用，並測定藥物的影響程度。將細胞培養在 96-well 培養盤 (5,000 cells/well in 5% serum-containing medium)，經 24 小時的附著後，加入所需藥物濃度，使其作用 48 小時。最後以 TCA (final 10%) 來固定細胞並終止反應，於室溫下加入 Sulforhodamine B (SRB) solution (100 μ L at 0.4% (w/v) in 1% acetic acid) 10 分鐘，並以 1% acetic acid 洗四次並風乾，最後以 10 mM trizma base 溶解細胞，於 515 nm 測定吸光。

三、Hoechst33342 染色法 (In situ labeling of apoptotic cell)

Hoechst33342 螢光染色，其原理是利用 Hoechst33342 會與 AT rich 的 DNA 片段結合的特性，當細胞進行細胞凋亡的時候，染色體會濃縮凝聚的現象，所以使用 Hoechst33342 螢光染色會有亮點產生，因此可藉由觀察螢光反應，以偵測細胞內染色體濃縮的情形。本實驗是將細胞種在 chamber slide 上，隔天待細胞完整附著後，加入藥物反應，終止反應後以 200 μ L 的冰 PBS 潤洗兩次。加入 200 μ L 的 Hoechst33342 solution 作用 15 分鐘後以 200 μ L 的冰 PBS 潤洗兩次，加入 200 μ L 4% 的冰 formaldehyde 固定 10 分鐘，之後再以 PBS 潤洗兩次後晾乾封片，即可在螢光顯微鏡下觀察並拍照，Hoechst33342 staining 必須在避光的環境下操作。

四、流式細胞儀 (flow cytometry) 測定細胞凋亡與細胞週期

細胞以藥物處理後，將收集的細胞以冰的 70% v/v ethanol 再懸浮 (resuspension) 後放置於 -20°C，30 分鐘以上。細胞在室溫下加入 0.2 mL DNA 萃取液 (0.2M Na₂HPO₄-0.1 M citric acid buffer (pH 7.8)) 30 分鐘後離心，再加入 1 mL DNA 染色液—propidium iodide staining buffer (0.1% Triton X-100, 100 μ g/mL RNase A, 80 μ g/mL propidium

iodide (PI) in PBS) , 避光下染色 30 分鐘。將細胞過濾後跑流氏細胞儀, 以 FACScan 和 CellQuest program (Becton Dickinson) 分析細胞週期。同時, 分析 DNA 含量低於 G_0/G_1 peak (2N) 的區域, 代表細胞凋亡所造成的 DNA 斷裂。每個樣本皆收集 10,000 個細胞來分析結果。

五、西方點墨法

取一定量的蛋白質樣品加入 1/4 體積的 5X sample buffer, 於滾水中煮沸 5 分鐘。將此蛋白質混合液注入電泳膠片內, 以 7-15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) 作垂直電泳。蛋白質樣品用 SDS-PAGE 法分離後, 取下電泳膠片, 將其緊密貼合於 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 上, 並依序疊上 3M papers 及海綿, 然後裝置於轉印槽中。注意膠片、PVDF membrane、3M papers 及海棉均須用 transfer buffer 充分潤濕。在轉印槽內注滿 transfer buffer, 以 350mA 的固定電流進行蛋白質轉印, 過程中須冰浴, 2 小時後將 PVDF membrane 取出, 進行免疫顯色。首先將 PVDF membrane 浸泡在含 3% BSA in TBST buffer (20mM Tris pH7.4, 150mM sodium orthovanadate 和 0.05% Tween-20) 中至少 1 小時, 以阻斷非特異性結合。接著, 用 TBST 溶液清洗並搖晃 30 分鐘, 再注入以 3%BSA 溶液適當稀釋的第一抗體, 輕搖至隔天, 同樣以 TBST 溶液洗去殘餘的第一抗體, 再加入合適的第二抗體作用 1 小時後, 再以 TBST 溶液浸洗 30 分鐘, 加入 ECLTM 溶液以 X 光片偵測特定蛋白質。

六、中草藥或其來源植物 (以及仿似物) 樣本之收集

對經前述活性分析發現可能含有抗癌或是抑制血管新生成分的中草藥或其來源植物 (如研究設計中所提, 含有具抗癌或抑制血管新生潛能之成分, 且難以由形態區分不同種原者), 進行真偽品之收集, 每一種 (species) 又各取約 10 樣本以區分 inter-或 intra-species 之多形性 (polymorphism)。

七、基原判定

初步以鏡檢及 TLC 判定藥材之基原, 進一步利用 HPLC 之層析指紋鑑定藥材。必要時並將利用 LC/MS 建立藥材之基本圖譜資料庫以利爾後之藥材鑑定。LC/MS 的 LC 將用 Reverse phase HPLC, 並使用長的 C18 管柱與高比例之水相、緩升之 CH_3CN 或 CH_3OH 流動相梯度來增加物質分離度, 並加添加劑如醋酸銨。MS 部分使用的游離

法包括電灑游離 (Electrospray Ionization, ESI) 及大氣壓化學游離 (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 以確保能觀察到最多之物質。

八、基因體 DNA 之抽提與純化

我們將利用經過改良之 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 方法進行基因體 DNA 之抽提與純化。生藥樣本將在液態氮中搗碎，以 CTAB 緩衝液 (含 100mM Tris·HCl pH 8.0, 2% w/v CTAB, 1.42M NaCl, 20mM EDTA, 2% w/v PVP 40, 5mM Ascorbic acid 及 4mM DIECA) 加上 2-mercaptoethanol 進行 DNA 之抽提。抽提產物經 isopropanol 沉澱後將再懸浮於 TE 緩衝液中以供 PCR 分析之用。

九、決定用於核苷酸指紋鑑定之分子標記

利用 “random-amplified polymorphic DNA”(RAPD) 及 “microsatellite-primed PCR”(MP-PCR) 兩種方法，來初步訂定可用作基原鑑定之分子標記。原則上，我們將使用約 20 個 arbitrary 10-mer primers 及約 10 個 microsatellite-complementary primers 進行 PCR 實驗，PCR 所得產物將以 1.4% agarose gel 進行電泳分析，並據以選出能區分 inter-species polymorphism(s) 之分子標記，相對應之 primer sets 將被應用於未來此種生藥之核苷酸指紋鑑定之用，必要時我們將配合進行 “random-amplified microsatellite polymorphism”(RAMPO)，其較前述兩方法多了一個點墨及雜交 (blotting and hybridization) 步驟，以得到更可靠之結果。

參、結果與討論

本年度的計畫已完成 70 種成分對於人類腫瘤細胞的抗癌活性分析 (如下表一), 研究結果發現數種成分具有不錯的抗癌活性, 其中以 IC316 (兔兒菜)、Bromovulone III 及 YCS-IQ 的作用最好, 其作用肝癌細胞的 IC_{50} 值分別為 4.6、0.45 及 $3.9\mu\text{M}$ 。再經由深入分析發現, Bromovulone III 及 YCS-IQ 的抗癌作用濃度範圍較廣, 對正常細胞也較沒有毒性, 因而更進一步分析其抗癌作用機轉。

細胞死亡的方式主要分為兩種, 分別為細胞凋亡 (apoptosis) 與細胞壞死 (necrosis)。生理上, 體內細胞凋亡的主要功能為: 維持生理恆定、調節組織發育與生長。就病理上而言, 細胞凋亡機制失衡則與癌症、自體免疫疾病、神經退化疾病的產生有關。在生化上及型態上的變化與細胞壞死截然不同。細胞凋亡又稱為計畫性細胞壞死 (programmed cell death), 產生的變化特徵如細胞染色體濃縮凝聚 (condensation of chromosome)、細胞萎縮 (cell shrinkage)、細胞微絨毛 (microvilli) 消失與 DNA 列解 (DNA cleavage) 為 50-200 base pair 以下的 DNA 片段, 最後形成凋亡小體, 此過程需 ATP 的參與。凋亡小體可被吞噬細胞或鄰近上皮細胞吞噬清除。產生凋亡的細胞, 細胞膜完整, 以限制細胞內容物的釋放。因此, 凋亡細胞被清除的過程並不會引起發炎反應。細胞壞死又稱為意外性細胞死亡 (accidental cell death), 主要是由急性物理性或化學性傷害產生細胞膜破裂。此過程並不需 ATP 的參與, 但壞死細胞因細胞膜破裂, 造成細胞質中一些細胞激素的外流, 所以, 在清除的過程會引起發炎物質 (inflammatory mediator) 的大量釋放, 因此會產生全身性免疫反應。

Bcl-2 蛋白家族依其功能分類, 可分成三類。第一類為擁有 Bcl-2 homology 1 (BH1)、BH2、BH3、BH4 序列區與疏水性 C 端和貫穿胞膜序列區 (transmembrane domain, TM), 此類蛋白如 Bcl-2 和 Bcl-X_L, 主要的功能為抑制細胞凋亡。第二類為擁有 BH1、BH2 和 BH3 序列區, TM 與疏水性 C 端。此類蛋白如 Bax 和 Bad, 主要的功能為促進細胞凋亡。第三類為只擁有 BH3 序列區, 可以藉此序列區和 Bax 等協同, 在粒線體的膜上形成孔道促使 cytochrome c 的釋放 (Cory and Adams, 2002; Tsujimoto and Shimizu, 2000)。然而許多癌症均因 Bcl-2 與 Bcl-X_L 過度表現造成細胞凋亡路徑被抑制, 而導致癌細胞異常增生。若當 Bcl-2 與 Bcl-X_L 蛋白表現受到抑制時, 則可促進癌細胞凋亡。Bcl-2 蛋白家族可

經由下列的調控路徑與粒線體一起誘發細胞凋亡。1. 粒線體膜形成孔道：使粒線體膜內的粒線體蛋白，如 cytochrome *c*、apoptosis-inducing-factor (AIF) 釋放於細胞質中 (Tsujimoto and Shimizu, 2000)；2. 促凋亡 (如 Bax) 和抗凋亡 (如 Bcl-2) 蛋白在粒線體膜上形成雙聚合 (dimer)，進而抑制抗凋亡蛋白的作用 (Cory and Adams, 2002; Tsujimoto and Shimizu, 2000)；3. 與粒線體膜上蛋白電位相關的陰離子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 及腺嘌呤核苷酸運轉體 (adenosine nucleotide transport, ANT) 作用，進而影響粒線體平衡 (homeostasis) (Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003)；4. 直接經由轉接蛋白 (adaptor protein) 來調節 procaspase (Danial and Korsmeyer, 2004)。

Caspase 為一種 cysteine protease，一般以不活化型 (pro-caspases) 存於體內，當它被活化為活化型 (caspases)，會切除胞內蛋白中 aspartic acid 之後的鍵結。使得胞內蛋白產生活化或者去活化作用。例如，活化 nuclease，會使 DNA 斷裂。各種 Caspases 之間也能藉由此活化過程來影響彼此的活性，當上游弱活性的 initiator caspase 發生聚合時，會產生自我活化反應 (autoactivation)，再活化下游的 effector caspase。這一系列活化過程，是藉由 proteolysis 來達成細胞凋亡機制 (Van de Craen et al., 1999)。

目前已知有三大凋亡路徑：內在性、外在性凋亡路徑、內質網迫力 (ER stress)：

- 一、外在性凋亡路徑：作用於細胞膜受體，啟動下游 caspase 路徑。例如：CD95 (APO/FAS) 作用於受體上促使 CD95 受體聚集，其造成死亡的序列區互相活化後再活化 procaspase-8，使其形成 caspase-8。caspase-8 形成後，會活化下游 procaspase-3 形成 caspase-3。當 caspase-3 進入細胞核內，則作用於標的蛋白亦即作用於 ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase I) 與 CAD 的複合體，使 CAD 游離出並活化 DNase I，而將 DNA 分解成片段 (de Vries et al., 2003)。
- 二、內在性凋亡路徑：此凋亡路徑大多與粒線體相關，其主要的生化反應分別為：1. 粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 的改變。2. cytochrome *c*、AIF 及 Smac/DIABLO 由粒線體釋放到細胞質。3. Bcl-2 家族蛋白的表現量或位置的改變。然而當 cytochrome *c* 釋放後，會與 dATP、Apaf-1、procaspase-9 結合形成 Apoptosome，進而形成 caspase-9。caspase-9 再活化下 procaspase-3 進而形成 caspase-3。因細胞質中

的 IAPs (inhibitor of apoptosis protein) 能抑制 caspase 活性，而 Smac/DIABLO 這類蛋白會抑制 IAPs，進而促使細胞凋亡。AIF 主要是經由與 caspase 無關的路徑進入細胞核內引起細胞凋亡 (Cory and Adams, 2002; Tsujimoto and Shimizu, 2000)。經由 caspase-8 活化促凋亡的 Bcl-2 家族蛋白 Bid：Bid 會促使 cytochrome *c* 由粒線體釋放出來。因此，死亡受體及粒線體的訊息傳遞路徑是會相互影響的。

三、經由內質網迫力所引發的凋亡作用：當內質網遭受到刺激或傷害的時候，會從內質網內釋放出鈣離子造成胞內的鈣離子濃度急速上升，這種情形會導致下列幾種情況產生：1. *m-calpain* 的活化，*m-calpain* 的活化會引發下游 caspase-12 的活化，再藉由 caspase-12 活化下游 caspase 相關的凋亡途徑 (Momoi, 2004)。2. 胞內高濃度的鈣離子會導致細胞膜上鈣離子相關的鉀離子通道 (calcium-sensitive potassium channel) 的開啟，鉀離子會向胞外流失而造成細胞膜的再極化現象 (Scorrano et al., 2003)。3. 經由內質網所造成的細胞凋亡會有粒線體充水的情形，而造成粒線體的破裂 (Hoek, et al., 1995)。Caspase-12 分佈在內質網上的細胞質那一側，所以當內質網受到迫力的時候，能夠很快的活化 caspase-12，caspase-12 跟其他的 caspase 一樣，平時處於無活性的狀態，*m-calpain* 在 caspase-12 的活化中扮演了重要的角色，*m-calpain* 會在 caspase-12 的 T132 與 K158 的位置上造成裂解，使 caspase-12 上的 prodomain 被釋放出去後在自行裂解成有活性的型態。Caspase-12 本身便會自行聚合產生裂解，但是若沒有 *m-calpain* 使 prodomain 被切掉，含有 prodomain 的 caspase-12 並不具有細胞凋亡的能力。Caspase-12 活化後，有研究是指出 caspase-12 會直接轉移到細胞核當中造成細胞的凋亡，也有研究指出，caspase-12 會進而活化 caspase-9 以及 caspase-3 等其他 effector caspase，進而造成細胞的凋亡。GADD153 是 C/EBP 的同源蛋白所以又稱為 CHOP，是一種轉錄因子。在一般的生理狀態下 GADD153/CHOP 的表現非常的少，但是當內質網遭受到迫力的時候，GADD153/CHOP 會大量的表現出來 (Oyadomari and Mori, 2004)。當 GADD153/CHOP 大量表現的時候，可藉由使 Bcl-2 家族蛋白，例如 Bad 的去磷酸化進而使 Bad 轉移到粒線體或是細胞核內引起細胞的凋亡。也有研究指出，GADD153/CHOP 會使一些抑制細胞凋亡的 Bcl-2 家族蛋白表現降低，藉此使細胞的內質網對外在迫力更加敏感而造成細胞的凋亡 (McCullough et al.,

2001)。

在我們長時期的針對多種化學合成化合物及天然物質成分所做的抗腫瘤活性評估試驗中發現，絕大多數的活性成分物質對於肝腫瘤細胞（如 hepatocellular carcinoma Hep3B cells）的作用較差；比較上，這些活性成分物質對於其他腫瘤細胞（如結直腸癌細胞 HT-29、前列腺腫瘤細胞 PC-3、血癌細胞 CCRF-CEM、乳癌細胞 MCF-7 等等）的作用則較好，有時作用程度相差近百倍。這些結果也與一些學術上的研究相符合，這結果被統稱為「肝腫瘤細胞具有抗藥性」。然而，其抗藥性的作用機制為何，則沒有一個定論。值得注意的是，在我們近來的研究中發現一些成分物質及某些類前列腺素對於肝腫瘤細胞的作用活性不錯，甚至比其他類的腫瘤細胞要來得好。雖然這些物質大都從海洋生物中分離出來，不是本計畫中的中草藥成分，然而，基於其對於肝癌細胞的特殊性，在本計畫中，我們也針對這種物質進行深入研究。研究結果及討論如下：

類前列腺素 Bromovulone III 作用於人類肝腫瘤細胞 Hep 3B 24 小時後，會造成 Hep 3B 細胞產生 DNA 濃縮的現象 (Fig.1A)。以電子顯微鏡直接觀察也發現細胞產生凋亡作用 (Fig.1B)。由此可證明此成分物質確實具有抗癌活性。類前列腺素 Bromovulone III 對於人類肝腫瘤細胞 Hep 3B 的多種 Bcl-2 家族蛋白（如 Bad、Bax 以及 Bcl-xL）的表現都沒有顯著的影響，但是會促使 Mcl-1 的蛋白表現增加 (Fig.2)。此外，Bromovulone III 對於人類肝腫瘤細胞 Hep 3B 的 Caspase-3、Caspase-8 以及 Caspase-9 也都沒有明顯的作用（亦即不會造成裂解活化）(Fig.3A)；相較之下，Bromovulone III 卻會造成人類前列腺腫瘤細胞 PC-3 的 Caspase-3 及 Caspase-9 的裂解與活化作用 (Fig.3B)。因此，可以看出 Bromovulone III 作用於人類肝腫瘤細胞 Hep 3B，所造成的凋亡作用有其特殊的機轉。

經更進一步的研究發現，bromovulone III 作用於人類肝癌細胞 Hep 3B 會使 Caspase-7 有明顯被裂解活化的跡象 (Fig.4A)。此外，在更久的作用時間下，bromovulone III 也會明顯的造成 Caspase-12 的裂解活化 (Fig.4A)。由於有研究報告指出，Caspas-7 及 caspase-12 皆會經由內質網的迫力作用而活化（特別是 caspase-12）(Chan et al., 2002; Rao et al., 2001)，因此，我們也檢視了內質網的迫力作用的另一個指標蛋白—CHOP/GADD153。結果也發現 bromovulone III 對於人類肝癌細胞 Hep 3B 作用的第 5 個小時開始，CHOP/

GADD153 蛋白的表現便有明顯的增加 (Fig.4B)。這些證據皆顯示 bromovulone III 確實會造成人類肝癌細胞 Hep 3B 的內質網迫力作用，進而造成細胞的凋亡作用。

在這些研究中，我們也檢視了許多與細胞凋亡相關的蛋白，想藉此找出人類肝癌細胞的抗藥性(蛋白)來源。我們檢視了 Apaf-1、XIAP 及 cIAP-1，其中，Apaf-1 是凋亡體 (Apoptosome) 產生的中心蛋白，而 XIAP 及 cIAP-1 則是抗凋亡蛋白。結果發現，在 Bromovulone III 的作用下，凋亡體還是會產生 (Fig.5A)，而 XIAP 及 cIAP-1 也不會因 Bromovulone III 的作用而減少，反而是蛋白表現增加 (Fig.5A)。這些結果顯示 Apaf-1、XIAP 及 cIAP-1 都不是本實驗中的抗藥性 (蛋白) 來源。值得注意的是，在我們的研究中發現 Bromovulone III 的作用下會使細胞的 Mcl-1 蛋白表現明顯增加 (Fig.2)。有研究顯示，某些 Bcl-2 家族蛋白會與 Apaf-1 結合，進而抑制 caspase-9 的活化作用 (Hu et al., 1998)。因此，在我們的實驗中，我們以免疫沉澱法將 Apaf-1 抓下來，並觀察與其結合的蛋白。結果發現，Mcl-1 會顯著的與 Apaf-1 結合，並且抑制 caspase-9 的活化作用 (Fig.5B)，這些結果也顯示 Mcl-1 有可能是人類肝癌細胞的一種抗藥性蛋白來源。

由上述的結果知道，Bromovulone III 可有效的造成肝癌細胞凋亡作用 (Apoptosis)，再經由多項的生化實驗分析結果得知，Bromovulone III 會有效的引發肝癌細胞的凋亡作用，可能是經由內質網受迫力 (ER stress)，進而造成 caspase-7 與 caspase-12 的活化，以及促進轉錄因子 GADD153/CHOP 的作用而造成的結果。

本計畫中，第二種有效的成分物質為 YCS-IQ，是一種由海綿所純化出來的物質。由 Sulforhodamine B 的分析方法得知，YCS-IQ 具有不錯的抗癌活性，可以有效的抑制腫瘤細胞的生長 (Fig.6)。為了進一步了解 YCS-IQ 的抗癌作用機轉，我們以電泳分析法來分析 YCS-IQ 對於 ERK 及 PI 3-kinase 的活性，因為這兩種 Kinases 的活性與細胞的生長及存活非常相關。然而，經研究結果發現，YCS-IQ 並不會影響這兩種 Kinases 的活性 (Fig.7)。我們因而進一步研究另一種與細胞生存及死亡相關的因子—轉殖因子 NF- κ B。我們將腫瘤細胞處理 YCS-IQ 後，抽取出腫瘤細胞的細胞核，進行 NF- κ B 的 DNA 結合活性試驗。研究結果顯示，YCS-IQ 在作用 2 個小時後，可有效的抑制 NF- κ B 的 DNA 結合活性 (Fig.8)。

我們接著以免疫螢光分析法偵測整顆腫瘤細胞內的 NF- κ B 轉移到細胞核的作用。結果顯示 YCS-IQ (10 μ M) 可有效的抑制 NF- κ B 轉移到細胞核的作用 (Fig.9)，但這抑制作用似乎為短暫性的，因為在 YCS-IQ 作用 18 小時後，這樣的抑制作用便消失了 (Fig.9)，這結果與 Fig.8 的實驗結果是一致的。此外，我們也探討了另一種與細胞生長相關的轉殖因子—CHOP/GADD153。由電泳分析試驗的研究結果顯示，YCS-IQ (10 μ M) 可有效的增加 CHOP/GADD153 的蛋白含量 (Fig.10A)。以免疫螢光分析法偵測整顆腫瘤細胞內的 CHOP/GADD153 轉移到細胞核的作用。結果也顯示 YCS-IQ (10 μ M) 在處理 6 個小時後，可有效的促進 CHOP/GADD153 轉移到細胞核的作用 (Fig.10B)。由於有研究顯示，這類海綿的抽出物會造成細胞 Golgi apparatus 的 Vasiculation 作用，也就是會造成 Golgi apparatus 片段化使其功能喪失。由 Fig.11 的實驗結果也證明 YCS-IQ 確實會造成 Golgi apparatus 的 Vasiculation 作用。為了證明這種作用是否與 YCS-IQ 的抗癌活性有關，我們做了一個平行證明的實驗。我們以 NaF 來造成同樣的結果，也就是 NaF 也會造成 Golgi apparatus 的 Vasiculation 作用 (Fig.11D、E、F)。然而，我們也以 Sulforhodamine B 的分析方法得知，NaF 並不能有效的抑制腫瘤細胞的生長 (data not shown)，因此，我們認為 YCS-IQ 的抗癌作用機轉可能與 NF- κ B 及 CHOP/GADD153 這兩種轉殖因子較有關，而與 Golgi apparatus 的 Vasiculation 作用較無關。由上述結果知道，*Clavularia* 屬海洋軟珊瑚的萃取物 Bromovulone III 具有細胞毒殺、抗細胞增生、及抗病毒等作用。然而，不同種或同種但生長環境不同的本屬軟珊瑚，在藥效方面可能會有所差異。我們以 *Clavularia viridis* 和 *Clavularia inflata* 兩種軟珊瑚為樣本，嘗試以 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 方法，找出合適的 gene marker 以做為進行基原鑑定之依據。經試驗九種不同序列的 10-nucleotide 引子 (primers)，我們已經找出一個合適的引子，能使來自不同種軟珊瑚之基因體 DNA 樣本，在 PCR 反應後，在洋菜膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 膠上產生顯著不同的 band patterns，可提供日後研究 *Clavularia* 屬海洋軟珊瑚，在基原鑑定上的一個快速有效的方法。此外，十五種海綿樣本也同步進行基原鑑定實驗，並完成在 GenBank 資料庫進行核酸序列比對之工作。

由一些研究結果得知，有好幾種自 *Clavularia* 屬的軟珊瑚中分離的 prostanoids (包括 clavulone、chlorovulone、bromovulone、iodovulone

等)，有細胞毒殺、抗細胞增生及抗病毒作用，使此屬軟珊瑚具有醫藥價值，有可能成為新型海洋保健食品之原料。然而，不同種或同種但生長環境不同的本屬軟珊瑚，在藥效方面可能會有所差異。因此，我們希望能利用 RAPD 方法，找出不同種或同種但生長環境不同的 *Clavularia* 屬軟珊瑚在基因體核酸序列上的差異點，也就是要找出可用於區分不同種源生物之 gene markers，提供日後鑑別含有抗癌活性成分之 *Clavularia viridis* 和 *Clavularia inflata* 軟珊瑚的一種快速、簡便的方法。十五種海綿樣本原本也要做 RAPD 實驗，但由於不確定樣本的正確學名，同時由於每一種海綿的樣本數過少，進行 RAPD 分析的意義不大，我們決定改以對在不同物種生物間常有顯著差異的 rDNA 之 ITS 區段，進行初步分析。利用可夾出 rDNA 片段（含 18S、ITS1、5.8S、ITS2、28S）的引子，進行 PCR 反應，再將數量放大之 rDNA 片段分離純化後定序，依據 GenBank 資料庫現有的核酸序列資料嘗試對樣本的 rDNA 序列加以註解（annotation），待日後取得較多樣本後再進行 DNA 指紋鑑定。以 phenol-chloroform extraction 方法萃取基因體 DNA。萃取前先以 SDS 和 proteinase K 使蛋白質變性，再加入高濃度的鹽類（5 M NaCl_(aq)）。其中，Na⁺可中和 DNA 帶負電的磷酸根，減少 DNA 結構上磷酸根的負電荷排斥；Cl⁻可以高濃度競爭，使帶正電的 histones 脫離 DNA。CTAB（cetyltrimethylammonium bromide）在高鹽濃度下，可使多醣（polysaccharides）脫離 DNA。接著，加入 phenol/chloroform/isoamyl alcohol（25：24：1）溶液萃取 DNA。Phenol、chloroform 和 isoamylalcohol 之密度分別為 1.071、1.481 和 0.813。Phenol 促使 DNA-protein 分離（蛋白質溶於 phenol 有機層；DNA 溶於水層）；chloroform 高密度將 phenol 和 isoamylalcohol 帶離水層，留在下層的有機層溶液；isoamylalcohol 可避免有機層和水層交界面起泡（foaming），使分層清楚。重複萃取 4 次是為了要提高純度，以 isopropanol 粗沉澱 DNA 之後，再以 ethanol 沉澱 DNA。加入 sodium acetate 一方面可中和穩定 DNA；另一方面，可避免在沒有鹽類的情況下 DNA 會溶於 ethanol 溶液。最後以二次水而不以 TE buffer 溶解沉澱的 DNA，是為了避免 TE buffer 中的 EDTA 鉗和 PCR 反應溶液中的 Mg²⁺ 而影響 PCR 效果。

RAPD 方法中，影響實驗結果的變因很多，主要是對特定 PCR 放大產物的 preference 產生影響。不同的實驗對象，需要不同的 PCR 反應條件，以呈現最清晰可辨且再現性高的 band patterns。在確定

反應條件後，我們選出一個引子（實驗室編號 29），發現在固定條件下使用此引子進行 PCR 反應後能使 *C. viridis* 和 *C. inflata* 呈現有顯著差異的 band patterns (Fig.12)。由圖上可看出，*C. viridis* 在約 290 bp 及 420 bp 處各有一條 bands，這兩個 bands 在 *C. inflata* 的 PCR 產物中並沒有出現或是相對較不明亮（箭頭所示）；另外，*C. inflata* 在略大於 600 bp 處有一條 additional band；而這兩種軟珊瑚表現在 700 及大於 800 bp 處的 band patterns 也有所不同。

此實驗結果若要有良好的再現性，除必須使用固定反應試劑，還要固定 PCR 反應時，在加入 DNA 聚合酶前的預熱條件以及反應中各反應試劑之量和加入順序，任一變數若不能維持一定，所得的 band patterns 將會或多或少有所不同，影響最後之判斷。RAPD 之各項變數對 band patterns 的影響以及其再現性之不穩定等情形，在參考資料中可循。因此，若採集到 *C. viridis* 或 *C. inflata* 的樣本，欲以本實驗的電泳結果圖做參考對照來檢驗採樣樣本，就必須要完全遵循上述的實驗步驟、條件、試劑選擇等等。在此前提之下的比較，才有一定的可信度。

對於十五種海綿樣本的實驗，此實驗和軟珊瑚實驗最大的不同在於引子的選擇（我們選用特別設計而非隨機選取的短引子（表 2）與 PCR 反應條件的調整。比較不同真核生物的 rDNA 序列，會發現其中 18S、5.8S、28S 序列大致相同，但是 ITS1 和 ITS2 序列有顯著差異。由於軟珊瑚和海綿實驗是同時進行，在海綿樣本還不確定正確學名但軟珊瑚樣本學名已知的情況下，我們利用 BLAST program 對 GenBank 資料庫中數個 *Clavularia* 屬軟珊瑚的 rDNA 序列做比對分析，找出位於 18S 和 28S rDNA 序列上的高保守性序列，再依此設計出適合做為引子的短段核酸序列。由此兩個引子所夾出的序列大約可包含 ITS1、5.8S、ITS2 和部分的 28S 序列。以 *C. viridis* 和 *C. inflata* 為樣本所夾出的片段，在洋菜膠電泳上的位置大約在 650 bp 處 (Fig.13)。我們本來計畫要對這些 PCR 放大片段進行 RFLP 分析，但是在選用八種不同的限制酶進行切割後，都無法觀察到 length-polymorphism 的情形 (Fig.13)。所以我們決定對接下來的海綿樣本只進行 PCR 反應，再以 DNA 定序方式來判斷這些樣本間是否有序列上的差異。我們同時也做了兩個軟珊瑚 rDNA 序列的定序，並發現在 GenBank 資料庫中尚未有 *C. inflata* rDNA 序列資料，若日後取得更多樣本能進一步確定這些序列上的

差異是由於物種間的差異而非個體間的差異所造成，我們就能將本實驗所得之 *C. inflata* rDNA 序列加入 GenBank 資料庫中建檔。另外，由海綿樣本所得之 PCR 產物 band patterns 較軟珊瑚樣本複雜許多，無法確定哪個 band 才是 rDNA 放大片段，所以我們挑選和軟珊瑚樣本一樣位於 650 bp 處的 DNA 片段純化後定序，發現確實含有完整的 5.8S 序列。實驗中純化的位於其他位置之片段，無法順利再以本實驗的前引子做出定序，故不採用。根據此二引子的生化特性，設計新的 PCR 反應條件，並依 A（兩種軟珊瑚實驗）中所述方法嘗試調整到最佳反應條件後，在同一 PCR 反應條件下，可以將十五個海綿樣本中的七個樣本之 rDNA 序列片段成功地放大並加以定序（Fig.14，Lanes 1-16），將這些片段之序列對 GenBank 資料庫進行比對，試圖找出其可能的物種學名。比對後發現，此七個樣本之序列與珊瑚物種的序列之相似度竟比與海綿動物門在 GenBank 上的資料相似度還要大。由於無法由樣本來源處獲得確認並且樣本數過少，所以無法繼續進行接下來的分析。若日後能再進一步獲得樣本來源處的確認，且能有更大量樣本提供實驗，十五種海綿樣本實驗應能順利完成最後實驗結果，得到 RAPD 不同 band patterns 或 rDNA 之 ITS 序列中 ITS 序列的差異處，以提供日後種原鑑定之參考。

肆、結論與建議

由上述的結果知道，Bromovulone III 可有效的造成肝癌細胞凋亡作用 (Apoptosis)，再經由多項的生化實驗分析結果得知，Bromovulone III 會有效的引發肝癌細胞的凋亡作用，可能是經由內質網受迫力 (ER stress)，進而造成 caspase-7 與 caspase-12 的活化，以及促進轉殖因子 GADD153/CHOP 的作用而造成的結果。YCS-IQ 也具有不錯的抗癌活性，可以有效的抑制腫瘤細胞的生長，進一步了解 YCS-IQ 的抗癌作用機轉發現，YCS-IQ 的抗癌作用機轉可能與 NF- κ B 及 CHOP/GADD153 這兩種轉殖因子較有關，而與 Golgi apparatus 的 Vasiculation 作用較無關。

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 CCMP93-RD-104 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. Chan SL, Culmsee C, Haughey N, Klapper W, Mattson MP. Presenilin-1 mutations sensitize neurons to DNA damage-induced death by a mechanism involving perturbed calcium homeostasis and activation of calpains and caspase-12. *Neurobiol Dis* 2002; 11: 2-19.
2. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 647-656.
3. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004; 116: 205-219.
4. de Vries EG, Timmer T, Mulder NH, van Geelen CM, van der Graaf WT, Spierings DC, de Hooge MN, Gietema JA, de Jong S. Modulation of death receptor pathways in oncology. *Drugs Today (Barc)*. 2003; 39 Suppl C: 95-109.
5. Hoek JB, Farber JL, Thomas AP, Wang X. Calcium ion-dependent signalling and mitochondrial dysfunction: mitochondrial calcium uptake during hormonal stimulation in intact liver cells and its implication for the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1271: 93-102.
6. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4386-4391.
7. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 1249-1259.
8. Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat*. 2004; 28: 101-105.
9. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004; 11: 381-389.
10. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 33869-33874.
11. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a

- control point for apoptosis. *Science*. 2003; 300: 135-139.
12. Shoshan-Barmatz V, Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys*. 2003; 39: 279-292.
 13. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*. 2000; 466: 6-10.
 14. Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenabeele P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 1117-1124.

陸、圖表

表 1

No.	Compound or extract	A549 cells (SRB) (% Inhibition of cell growth)	Hep3B cells (SRB) (% Inhibition of cell growth)
1	GSSP3	48.9	41.7
2	GSSP3-1	37.1	38.0
3	GSSP3-2	11.2	5.8
4	GSSP3-3	12.8	6.7
5	GSSP3-4	58.3	48.8
6	GSSP3-5	33.4	21.9
7	GSSP3-6	28.5	22.1
8	GSSP3-7	56.6	55.4
9	GSSP3-8	59.7	49.2
10	GSSP3-9	29.8	33.5
11	GSSP3-10	5.6	3.7
12	GSSP3-11	4.2	ND
13	GSSP3-12	10.4	ND
14	GSSP3-n-BaOH	3.7	ND
15	GSSP3-15	ND	ND
16	GSSP 8-100	18.9	10.8
17	Tax-W-a1	ND	ND
18	Tax-W-a2	ND	ND
19	Tax-W-a3	ND	ND
20	Tax-W-a4	1.2	ND
21	Tax-W-a5	ND	ND
22	Tax-W-a6	10.9	11.0
23	Tax-W-a7	ND	ND
24	Tax-W-a8	80.3	76.7
25	Tax-W-a9	11.0	ND
26	Tax-W-a10	88.9	80.1

表 1 (續)

No.	Compound or extract	A549 cells (SRB) (% Inhibition of cell growth)	Hep3B cells (SRB) (% Inhibition of cell growth)
27	Tax-W-a11	35.4	27.1
28	IC316 兔兒菜	75.4 IC ₅₀ = 2.0	69.8 IC ₅₀ = 4.6
29	IC755	ND	ND
30	IC3192	11.6	6.6
31	IC4303	33.0	24.2
32	IC4336	18.9	7.9
33	IC51924	4.6	ND
34	Bromovulone III	91.3 IC ₅₀ = 0.18	89.6 IC ₅₀ = 0.45
35	CMRE32	33.0	26.4
36	CMRE33	48.6	41.7
37	CMRE34	44.8	45.8
38	CMRE37	65.1	52.5
39	CMRE38	60.0	48.2
40	CMRE39	60.7	49.6
41	CMRE40	ND	2.3
42	CMRE41	15.3	12.9
43	CMRE42	ND	ND
44	CMRE43	7.8	10.0
45	CMRE45	ND	ND
46	CMRE46	ND	ND
47	YcsGBB	ND	ND
48	Ycs-DA-1	27.1	12.2
49	Ycs-XEQ	9.0	ND
50	Ycs-IQ	93.2 IC ₅₀ = 1.7	88.8 IC ₅₀ = 3.9
51	YcsT-1	2.4	ND

表 1 (續)

No.	Compound or extract	A549 cells (SRB) (% Inhibition of cell growth)	Hep3B cells (SRB) (% Inhibition of cell growth)
52	YcsT-2	30.6	28.1
53	YcsT-3	11.1	6.6
54	YcsT-4	13.8	6.8
55	YcsT-5	16.2	11.3
56	YcsT-6	33.9	29.0
57	Cas21-61e	10.5	11.2
58	Cas6-35	3.4	ND
59	Shen-MeO-1	48.9	28.1
60	IC-316	13.2	ND
61	KadsumarineA	1.2	ND
62	TRI2	2.1	ND
63	KP13	3.7	ND
64	KP17	ND	ND
65	KP32	5.5	1.2
66	KP212	ND	ND
67	KP20-5-8	ND	ND
68	KP2	9.8	3.7
69	KP9P	ND	ND
70	TRI1	5.2	ND

The concentration of 3 to 10 μ g/mL is used.

ND, no inhibition of anti-tumor activity

表 2 實驗中所使用之 primers

Lab #	Sequence (5'-3')	Length (bp)	GC (%)	Tm (°C)
53(forward)	GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC	23	57	59
54(reverse)	TTGCCTGATCTGAGGTTAAGATG	23	43	53

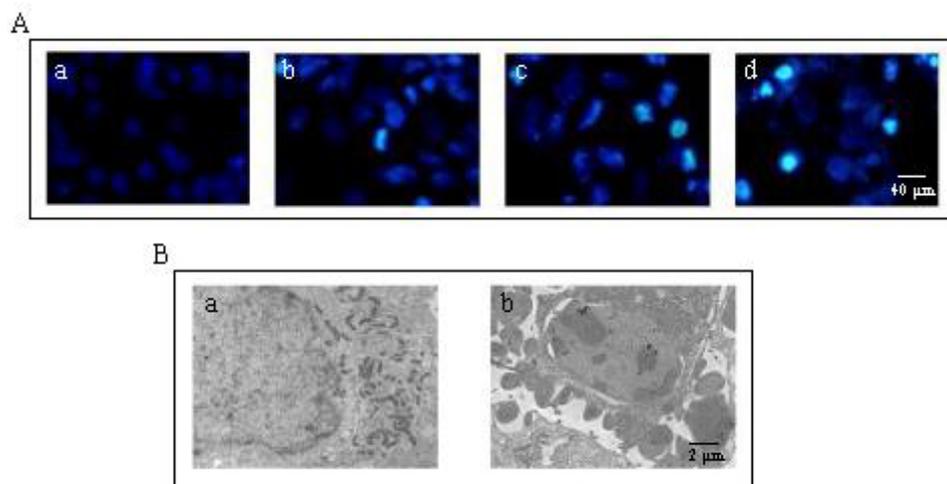


Fig.1 Identification of Bromovulone III-induced anti-tumor effect in Hep3B cells. (A) Cells were cultured in chamber slides for 24 hours and then treated with graded concentrations (a. control; b. 0.3 μ M; c. 1 μ M; d. 3 μ M) of Bromovulone III for another 24 hours. After the incubation period, cells were washed and stained with Hoechst 33342, and examined under a fluorescence microscope. (B) In a parallel experiment, cells were incubated in the absence (a) or presence of 3 μ M Bromovulone III (b) for 48 hours. Then, the electron microscopic examination was carried out as described in the Materials and methods section.

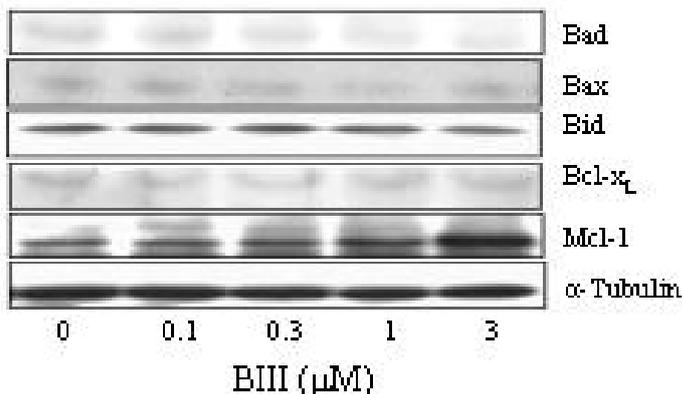


Fig.2 Detection of expressions of Bcl-2 family member proteins in Hep3B cells. Cells were incubated in the indicated concentration of Bromovulone III for 24 hours. Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis as described in the Materials and methods section.

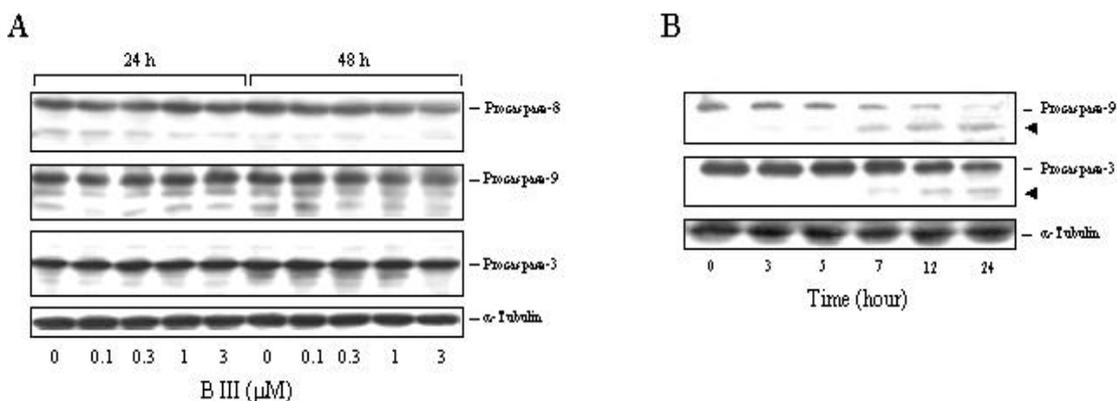


Fig.3 Detection of expressions of several caspases in different tumor types. Hep3B cells were incubated in the indicated concentration of Bromovulone III for 24 or 48 hours (A) or PC-3 cells were incubated in 3μM Bromovulone III for the indicated time courses (B). Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis as described in the Materials and methods section. The arrowhead indicates the cleaved forms of caspases.

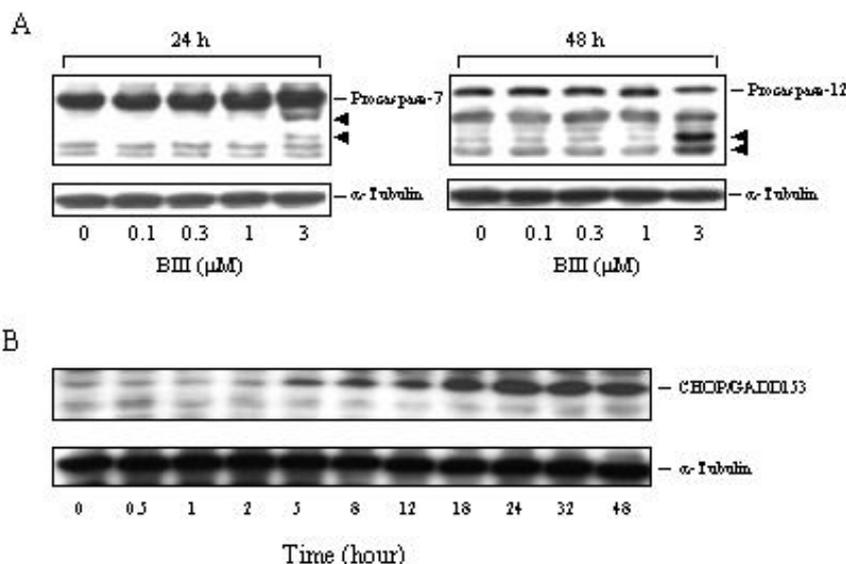


Fig.4 Detection of expressions of several caspases and CHOP/GADD153 in Hep3B cells. Cells were incubated in the indicated concentration of Bromovulone III for 24 or 48 hours (A) or 3 μ M Bromovulone III for the indicated time courses (B). Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis as described in the Materials and methods section. The arrowhead indicates the cleaved forms of caspases.

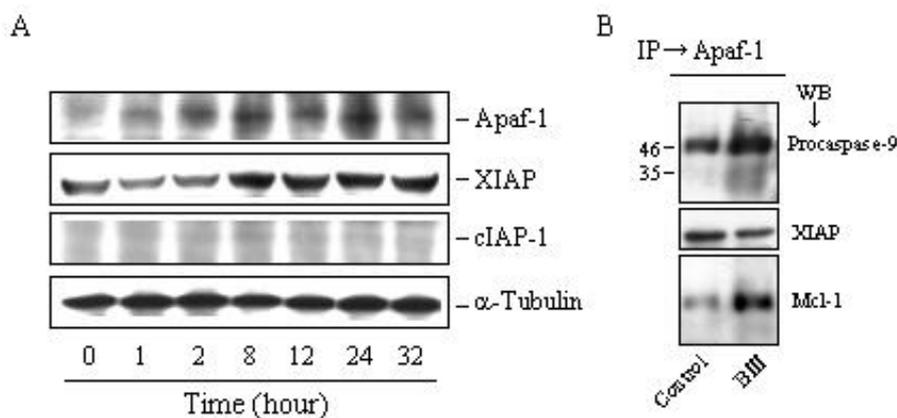


Fig.5 Detection of several apoptosis-related protein expressions in Hep3B cells. (A) Cells were incubated with 3 μ M Bromovulone III for the indicated time courses. Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis as described in the Materials and methods section. (B) To detect the proteins associated with Apaf-1, the cells were incubated with 3 μ M Bromovulone III for 24 hours and the immunoprecipitation analysis was performed as described in the Materials and methods section. The Western blot analysis of immunoprecipitated protein complexes with the indicated antibodies shows the expression of peocaspase-9, XIAP and Mcl-1. IP: immunoprecipitation, WB: Western blot analysis.

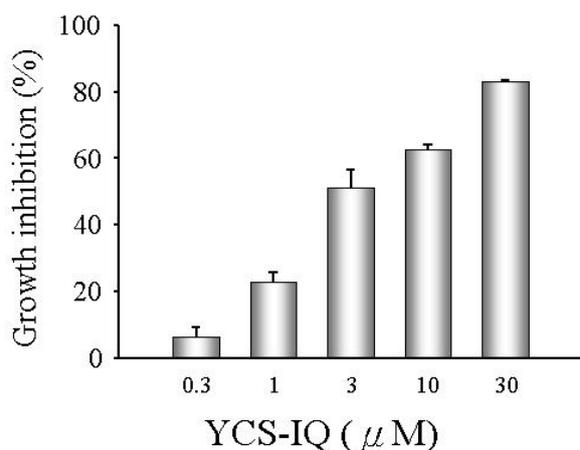


Fig.6 Identification of YCS-IQ-induced anti-tumor effect. The graded concentrations of YCS-IQ were added to cells for 48 hours. Then, cells were fixed and stained with sulforhodamine B (SRB). After a series of washing, bound SRB was subsequently solubilized and the absorbance was read at a wavelength of 515 nm. Data are expressed as mean±SEM of four determinations (each in triplicate).

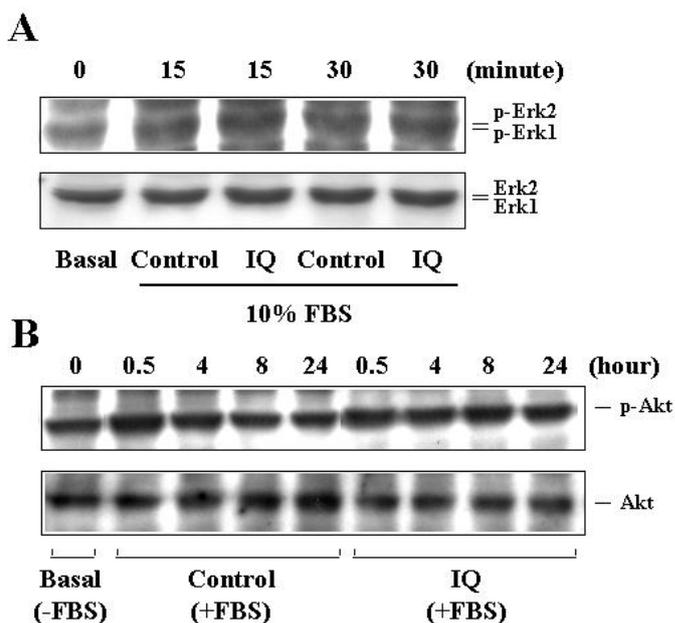


Fig.7 Effect of YCS-IQ on the expression of phospho-Erk and phospho-Akt. Cells were incubated in the vehicle or YCS-IQ (10μM) for the indicated time course. Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis.

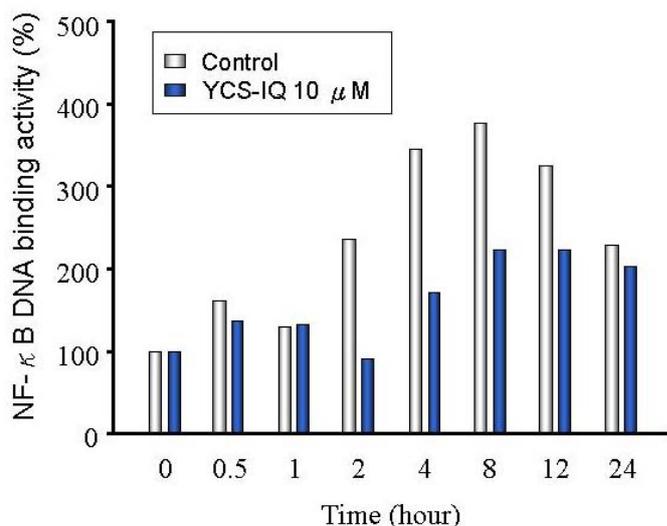


Fig.8 Effect of YCS-IQ on NF-κDNA binding activity. Cells were incubated in the vehicle or YCS-IQ (10μM) for the indicated time course. Then, the nucleus were extracted from cells for the binding assays. Analysis of p65 binding to its consensus oligonucleotide was performed using an ELISA-based Trans-AMTM NF-κB p65 kit (Active Motif Europe, Rixensart, Belgium). In this assay, an oligonucleotide containing the NF-κB consensus site is attached to a 96-well plate. Nuclear extracts were analyzed for p65 binding to κB oligonucleotide according to the manufacturer’s instructions.

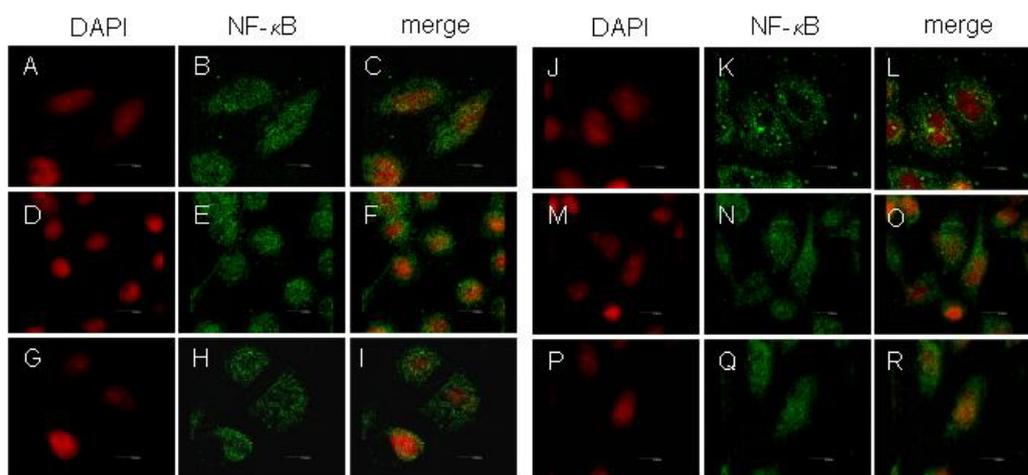


Fig.9 Effect of YCS-IQ on NF-κnuclear translocation. Cells were incubated in the vehicle (control, A, B and C) or 10μM YCS-IQ for the indicated time course (1 hr, D, E and F; 2 hr, G, H and I; 4 hr, J, K and L; 18 hr, M, N and O; 24 hr, P, Q and R). Then, the cells were washed, fixed and immuno-stained with NF-κB. The nuclei were counterstained with DAPI.

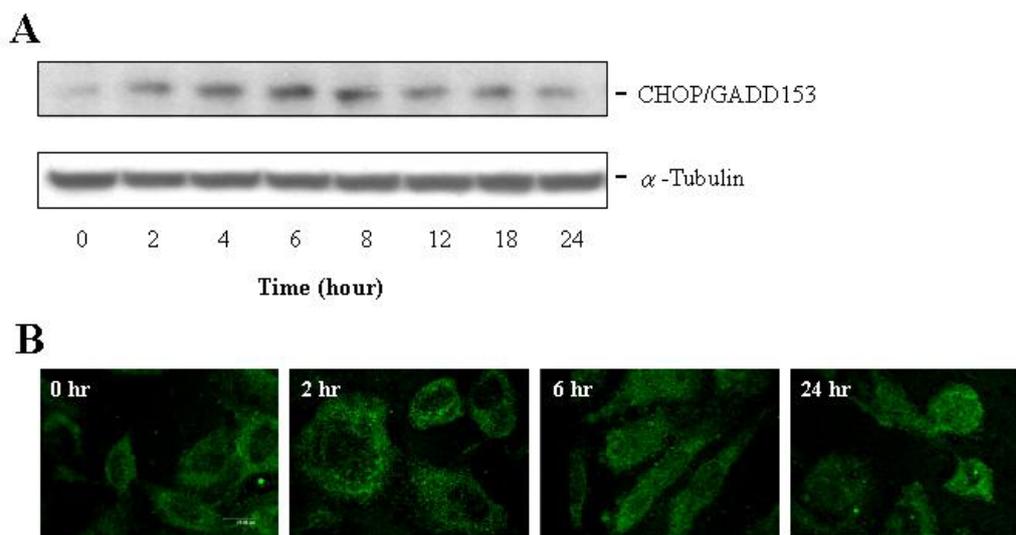


Fig.10 Effect of YCS-IQ on CHOP/GADD153 expression and nuclear translocation. Cells were incubated in the vehicle (zero time) or 10 μ M YCS-IQ for the indicated time course. Then, the cells were harvested for the detection of protein expression by Western blot analysis or fixed for the detection of nuclear translocation by immuno-histochemical staining.

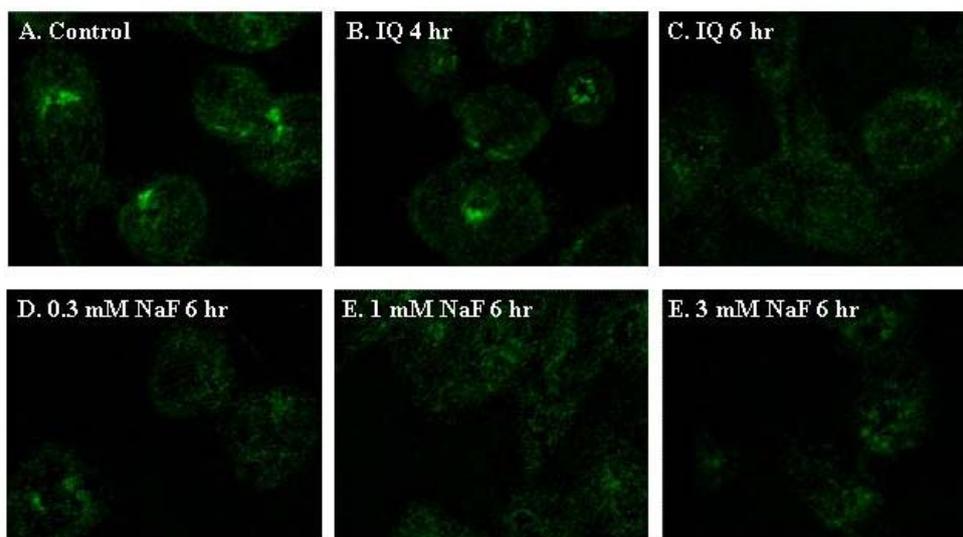


Fig.11 Effect of YCS-IQ and NaF on Golgi vesiculation. Cells were incubated in the vehicle (A, control), 10 μ M YCS-IQ (B, 4 hr; C, 6 hr) or NaF (D, 0.3 mM for 6 hr; E, 1mM for 6 hr; F, 3mM for 6 hr) for the indicated concentration and time course. Then, the cells were fixed for the detection of Golgi vesiculation by immuno-histochemical staining of cis-Golgi marker GM130.

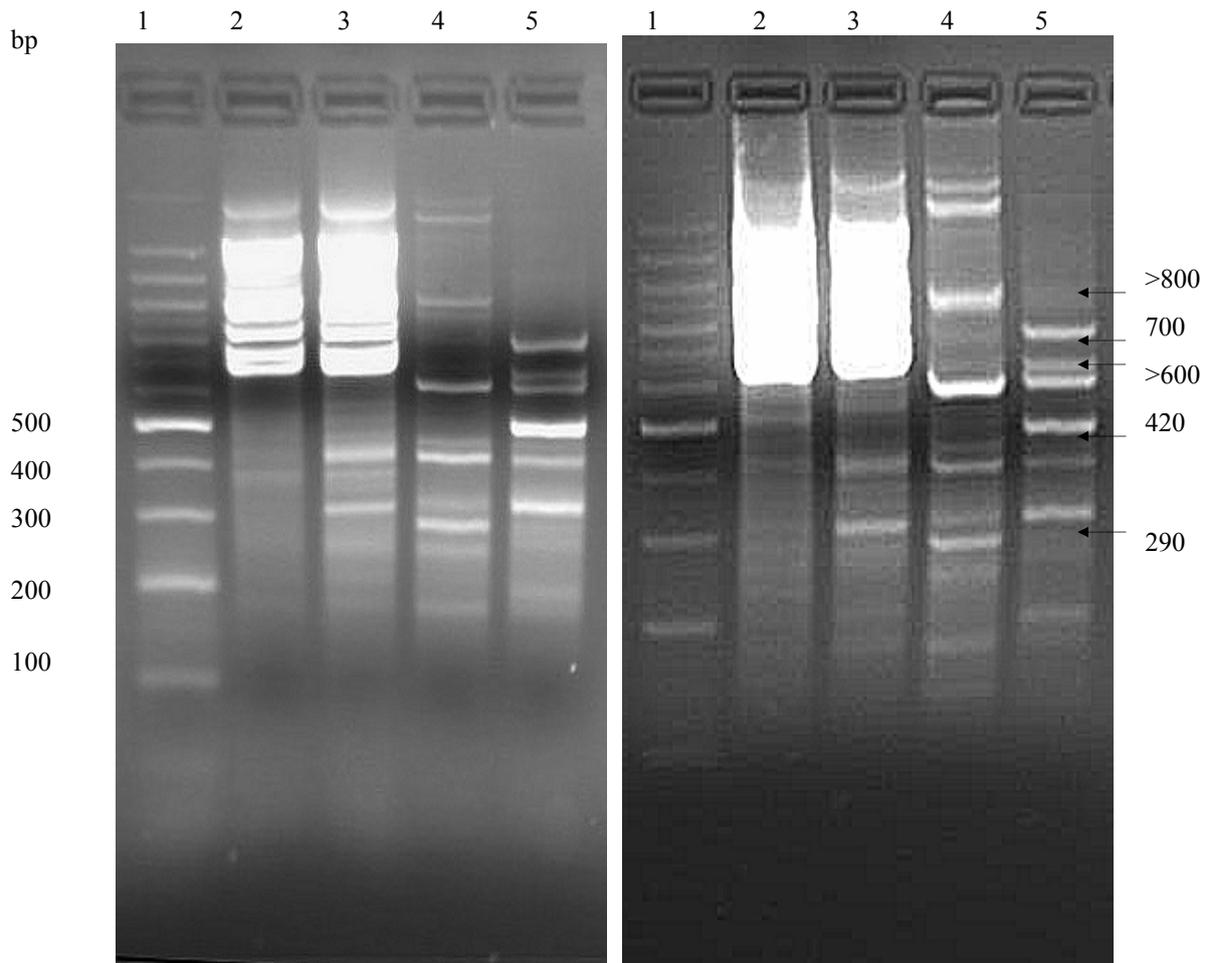


Fig.12 以洋菜膠電泳對軟珊瑚之 RAPD 產物進行分析

左圖和右圖是同反應條件下的兩次獨立實驗。Lane 1 是 100 bp DNA ladder；Lanes 2、3 分別是以 Lab #26 為引子所呈現出 *C. viridis* 和 *C. inflata* 的 band patterns，差異處較不明顯；Lanes 4、5 是以 Lab #29 為引子所呈現 *C. viridis* 和 *C. inflata* 的 band patterns。

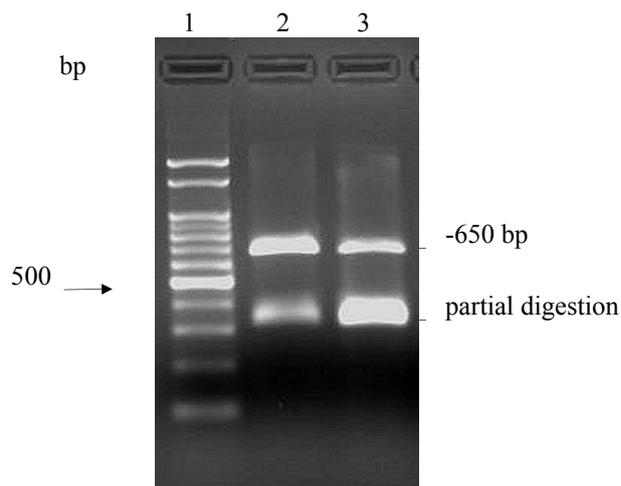


Fig.13 以洋菜膠電泳軟珊瑚的 rDNA 放大片段進行分析

Lane 1 是 100 bp DNA ladder ; Lane 2、3 分別是 *C. viridis* 和 *C. inflata* 之 PCR 產物(約 650 bp)經 *EcoR* I 進行 partial digestion 切割的結果(*EcoR* I site 約在 PCR 產物之中間位置)。

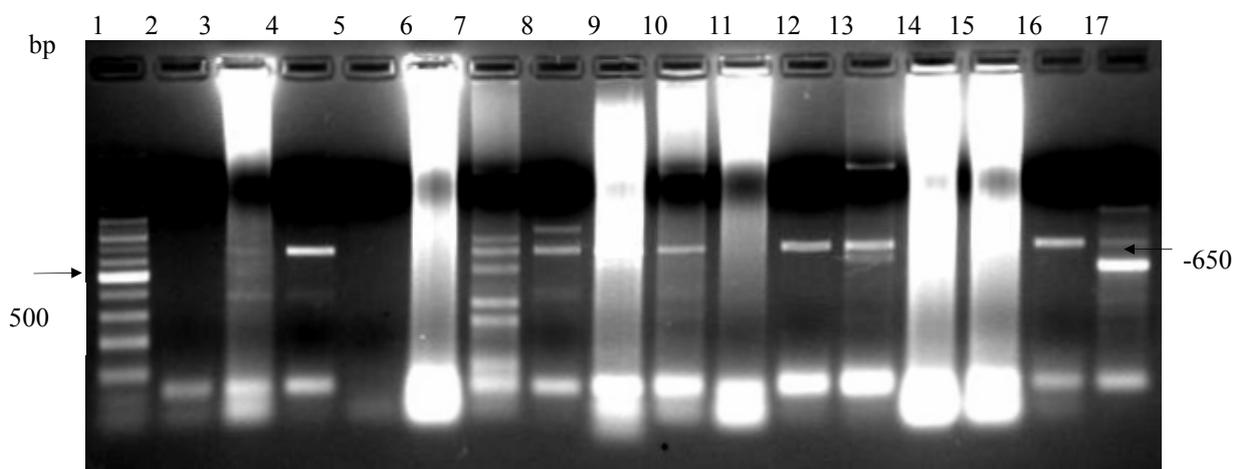


Fig.14 以洋菜膠電泳對海綿 (Lanes 2-16) 的 rDNA 放大片段進行分析

Lane 1 是 100 bp DNA ladder ; 選擇對七種海綿樣本 (Lanes 4、7、8、9、10、12、13) 之 PCR 產物做定序分析。