

編號：DOH91-TD-1162, CCMP92-RD-114, 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總報告

顧記華

國立台灣大學

摘要

在過去的三年內，本計畫已完成超過 250 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 3 年執行 200 種）。研究結果發現數種成分具有不錯的抗癌活性，其中以 91 年度的台灣嘉賜木成分 CMB、92 年度的台灣嘉賜木的 clerodane 雙萜類化合物中的 12 種成分 JCM1-12、93 年度的兔兒菜成分、Bromovulone III 及 YCS-IQ 的作用最好，其作用於人類肝癌細胞 HA22T 及 Hep3B 細胞、肺癌細胞 A549、前列腺癌細胞 PC-3 都有不錯的抗癌活性。以電子顯微鏡觀察、染色體濃聚分析、多項生化實驗分析結果得知，這些活性成分都能經由一些作用機制導致腫瘤細胞的凋亡作用（Apoptosis）。這些研究成果大多於近幾年內陸續發表。此外，這些成分的來源物質之基原鑑定部分也順利完成。

關鍵詞：抗癌作用、雙萜類化合物、凋亡作用

Number: DOH91-TD-1162, CCMP92-RD-114, CCMP93-RD-104

Studies of Chinese Herbal Medicines on Anticancer and Antiangiogenic Effects and Analysis of Genetic Variance of Active Ingredients

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 the past three years. In this project, we have screened more than 250 compounds and found several active components, such as the CMB compound from *Casearia membranacea* (the 1st year project), the clerodane diterpenoids JCM1 to JCM12 from *Casearia membranacea* (the 2nd year project) and the 兔兒菜 compound, bromovulone III and YCS-IQ (the 3rd year project). The anti-tumor activities of these components have been examined in several human cancer cell lines, including hepatocellular carcinoma HA22T and Hep3B cells, non-small lung cancer cell A549 and hormone-resistant prostate cancer PC-3. The anti-tumor mechanisms of these compounds have been identified using several biochemical analysis methods. Most of the studies have been published in these years. Additionally, the genetic identification of the parent sources of these compounds has also been finished.

Keywords : Anti-tumor activity, Diterpenoid, Apoptosis

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 3 年內的目標，是希望能完成下述工作：一、完成 200 種以上之中草藥、台灣特有植物成分、天然物的抗癌活性篩選工作；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)。將細培養於 75cm² 之培養皿中，並置於 37°C 恒溫箱通以氣體 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 10mM trizma base 溶解細胞，於 515nm 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，染色體會有濃縮凝聚的現象，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、*In situ* 標定凋亡細胞

將細胞種在 Slide chamber 中使其附著及生長 24 小時後，將細胞以 PBS 洗兩次，並將其置於不含 FCS 的 RPMI-1640 培養液中 24 小時；待藥物處理後，將培養液吸走，並以 PBS 洗兩次，再以 ice-cold ethanol/acetic acid (1:1) 固定 1 分鐘，再以 PBS 洗三次後，再以 0.2% Triton X-100 處理 5 分鐘，最後再以 PBS 洗三次。TUNEL 的螢光染

色，則是依 kit 所提的步驟進行，其原理乃是利用 terminal deoxynucleotidyl transferase 將 biotin-dUTP 移轉至遭切斷的 DNA 的 3'-OH，這 biotin 標定的切除位置，乃與螢光標定的 avidin (avidin-fluorescein isothiocyanate) 結合而可觀察螢光反應，最後以螢光顯微鏡照相。

五、細胞破裂死亡 (cell necrosis) 的測定

此測定方法是測定培養液中 LDH 的含量，因細胞若進行 necrosis，則其 LDH 便會釋放至培養液中而測得。若培養液中有 LDH，則 LDH 會將 tetrazolium 轉變成紅色的 formazan 產物，再以 ELISA reader 測得吸光值；本實驗並以 0.5% Triton X-100 處理細胞 10 分鐘，經上述作用所得的吸光值當 maximal LDH release，來計算個別的 LDH 釋放量。

六、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 0.2mL 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, 100µg/mL RNase A, 80µg/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 G₀/G₁ 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。

七、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 及海綿均須用 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，過程中須冰溶，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。

八、Caspase-3 的活性測定

利用此方法來測定凋亡作用，是否與 caspase-3 的活化有關。經藥物處理後之細胞，以 ice-cold PBS 洗兩次後，將其刮下並離心 (200xg, 5 分鐘, 4°C)，得到的細胞並以 lysis buffer (25µL/10⁶ cells) 於冰上靜置 10 分鐘，所得到的 cell homogenates 以高速離心(10,000xg) 1 分鐘，所得到的上清液拿做 caspase-3 活性測定。將 50µL 的上清液加入 50µL 的 reaction buffer 及 5µL DEVD-pNA 混合，置於 37°C 1 至 2 小時，所產生的 p-nitroanilide 以 ELISA reader 在 405nm 吸光處測得。

九、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) 。

十、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 CH₃CN 或 CH₃OH 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。

十一、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，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。

十二、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

91 年度的計畫中發現 CMB compound 具有不錯的抗癌活性成分，其作用機制也經進一步的探討。

一、CMB 對於細胞週期的影響及 taxol 存在下的作用情形

我們以流式細胞儀來偵測細胞 DNA 含量變化，藉以了解 CMB 作用下的細胞週期變化。由 Fig.1 的結果知道，CMB 的作用下會明顯的增加細胞的 sub-G₀/G₁ 期，表示了 CMB 會使 PC-3 細胞產生凋亡作用。但 CMB 對於細胞的 G₂/M 期則沒有顯著的影響，初步研判 CMB 應不會作用於細胞的 tubulin/microtubule。因為像 taxol 這類會結合於 tubulin/microtubule 的作用劑，皆會顯著的促使腫瘤細胞停留在細胞週期的 G₂/M 期（如 Fig.1B 的 taxol 單獨存在下）。然而，CMB 是否會促使 PC-3 細胞停留在細胞週期的 G₁ 期，則需要鑑定細胞週期的相關蛋白及 kinase 的活性來確認。

二、CMB 對於 Bcl-2 家族蛋白的影響

近幾年來對於許多促進細胞凋亡（apoptosis）及抑制細胞凋亡（anti-apoptosis）基因的研究，讓我們更加明瞭癌細胞的生長及死亡機制，也使得癌症治療露出一線曙光。在眾多調控細胞生長及死亡的基因中，Bcl-2 家族蛋白可說是其中最重要的成員。有許多的研究報告指出，Bcl-2 及 Bax 蛋白的表現密切的調控著細胞的凋亡作用。其中，Bcl-2 是細胞的生存蛋白，而 Bax 則是促使細胞凋亡的蛋白。我們的研究發現，CMB 對於 PC-3 細胞的 Bax 蛋白的表現，以及其細胞質到粒線體的轉移（translocation）皆沒有影響（Fig.2），然而，CMB 却可隨著濃度的增加而來抑制 Bcl-2 的表現（Fig.2），這適可解釋 CMB 引起 PC-3 細胞凋亡的原因。

三、CMB 對於粒線體 cytochrome c 釋放作用的影響

粒線體 cytochrome c 釋放作用在細胞凋亡作用中也扮演著非常重要的角色。我們的研究也發現，CMB 能隨著時間的增加而引起 PC-3 細胞的粒線體 cytochrome c 釋放作用（Fig.3），這也解釋了 CMB 引起 PC-3 細胞凋亡的原因。

四、CMB 對於氧化自由基（ROS）及 p38 MAPK 的影響

為了探討 CMB 引發 PC-3 細胞凋亡的作用，是否與氧化自由基（ROS）及 p38 MAPK 的調控有關；因此，我們以功能性的研究，也就是以抗氧化劑 trolox 及 p38 MAPK 的抑制劑 SB203580 來觀察 CMB 的作用，結果發現 trolox 及 SB203580 皆能有意義的來抑制 CMB 的作用（Fig.4）。這結果說明了 CMB 所引發 PC-3 細胞凋亡的作用，與氧化自由基及 p38 MAPK 的調控有關。

五、CMB 對於血管新生作用的影響

由於有愈來愈多的研究顯示，抑制腫瘤的血管新生作用可有效的抑制腫瘤的生長；也因此，抑制腫瘤的血管新生作用遂成為抗腫瘤的重要策略之一。有很多的研究顯示，有許多的抗癌藥物同時具有抑制血管新生的作用。因此，我們也研究了 CMB compound 對於血管新生作用的影響。結果得知，CMB 以濃度有關的方式來抑制裸鼠的血管新生作用（Fig.5）。然而，此作用是否經由特定機轉來抑制內皮細胞的生長或是單純的促使內皮細胞的死亡，則有待進一步的研究。

91 年度計畫共完成了 131 種中草藥或其他天然物的純化物質或 mixtures，在三種人類腫瘤細胞的抗癌活性篩選。由結果得知，從台灣嘉賜樹分離出的成分，其抗癌作用最不錯。其中又以 CMB compound 的作用最好，因此，我們也針對 CMB compound 加以深入探討。經由各種研究分析的結果發現，CMB 的作用下會明顯的增加細胞的 sub-G₀/G₁ 期，表示了 CMB 會使 PC-3 細胞產生凋亡作用。但 CMB 對於細胞的 G₂/M 期則沒有顯著的影響，初步研判 CMB 應不會作用於細胞的 tubulin/microtubule。經由更深入的研究發現，CMB 對於 PC-3 細胞的 Bax 蛋白的表現，以及其細胞質到粒線體的轉移（translocation）皆沒有影響，但卻可隨著濃度的增加而來抑制 Bcl-2 的表現及引起細胞的粒線體 cytochrome c 釋放作用，這也解釋了 CMB 引起 PC-3 細胞凋亡的原因。此外，我們以功能性的研究發現 CMB 所引發 PC-3 細胞凋亡的作用，與氧化自由基及 p38 MAPK 的調控有關。本計畫中，我們也研究了 CMB compound 對於血管新生作用的影響，結果得知，CMB 以濃度有關的方式來抑制裸鼠的血管新生作用。然而，此作用是否經由特定機轉來抑制內皮細胞的生長，或是單純的促使內皮細胞的死亡，則有待進一步的研究。

經由上述的研究，我們知道 CMB compound 是一個不錯的 candidate 可利用來做更進一步的發展，也因此，我們將進一步的來進行 CMB compound 來源植物的基原鑑定。

92 年度的計畫是完成 50 種成分對於人類腫瘤細胞的抗癌活性分析，研究結果發現數種植物成分具有抗癌活性，其中又以台灣嘉賜樹 (*Casearia membranacea*) 所純化的數種化合物具有不錯的抗癌活性，這些化合物為 Caseamembrin A-F、[rel-(2S,5R,6R,8S,10R,18S,19R)-diacetoxy-18-19-epoxy-6-hydroxy-2-(2-methylbutanoyloxy)cleroda-3,13(16),14-triene] 及 JCM-9、-10 及 -12。他們是一些新的 clerodane diterpenoids (Fig.6)。以 TUNEL-reaction technique 的實驗方法發現，這些化合物皆可有效的促使腫瘤細胞進行凋亡作用 (Apoptosis) (Fig.7)，其半致死濃度 (IC_{50}) 分別為 1.2、24.2、0.5、1.4、1.9、2.6、2.1、1.8、13.7 及 $>30\mu M$ ，由結果也可看出 Caseamembrin C 是其中最強的一個成分 (Fig.8)。因此，我們也積極的探討其抗癌作用機轉。

六、Caseamembrin C 對於 Bcl-2 家族蛋白表現的影響

Bcl-2 家族蛋白有非常多的成員，依其結構及作用特性可分為抑制細胞凋亡及促進細胞凋亡兩大類。本篇研究主要是集中於幾個家族成員，如促進細胞凋亡的成員 Bax、Bad 及最近被發現的 Mcl-1S (Bae et al., 2000) 以及抑制細胞凋亡的成員 Bcl-2、Bcl-xL 及 Mcl-1L。由研究結果顯示，caseamembrin C 能夠顯著的增加 Mcl-1S 的蛋白表現，但對於 Bax 及 Bad 的表現則沒有影響 (Fig.9)；此外，對於抑制細胞凋亡的成員方面，caseamembrin C 則能夠顯著的減少 Bcl-2 及 Bcl-xL 的蛋白表現，但是卻也會增加 Mcl-1L 的表現 (Fig.9)。由這些結果分析，增加 Mcl-1S 的表現及減少 Bcl-2 及 Bcl-xL 的蛋白表現，可能部分解釋腫瘤細胞凋亡的原因。然而，增加 Mcl-1L 的表現則與細胞凋亡的現象相違背。有一個可能的解釋是 Mcl-1L 會被 Mcl-1S 拮抗掉，因為有研究指出 Mcl-1S 會和 Mcl-1L 聚合在一起，進而拮抗掉 Mcl-1L 的作用 (Bae et al., 2000)。此外，Mcl-1S 的表現約為 Mcl-1L 的兩倍，因此，導致細胞凋亡是合理的。

七、Caseamembrin C 對於 Caspase 活性的影響

我們從內在性及外在性的細胞凋亡路徑著手 (Intrinsic and extrinsic apoptosis pathways) (Chen and Wang, 2002; Budihardjo et al.,

1999; Cain et al., 2002; Petak and Houghton, 2001; Scaffidi et al., 1998)。凋亡受體作用劑（例如 TNF 及 FasL）和他們個別的受體結合後會引發細胞的凋亡作用，此為外在性細胞凋亡路徑。在本研究裡，Caseamembrin C 會依濃度有關的方式引起 FasL 的蛋白表現增加 (Fig.10)；此外，Caseamembrin C 也能夠有效的引發 Caspase-8 及其下游的 Caspase-3 的活化 (Fig.11)，這些 Caspases 的活化皆可促使腫瘤細胞進行凋亡作用，而這也在證明 Caseamembrin C 引發腫瘤細胞凋亡與外在性細胞凋亡路徑有關。此外，Caseamembrin C 也會引起 Bid (Caspase-8 的受質) (Fig.12) 的分解作用以及 Caspase-9 的活化 (Fig.11)。然而，Caspase-9 既是內在性細胞凋亡路徑，也是外在性的細胞凋亡路徑的共同活化因子，上述這些證據暗示著 Caseamembrin C 的作用下，內在性及外在性的細胞凋亡路徑的相互影響 (cross activation) (Petak and Houghton, 2001)，或是其中之一個路徑為最主要？也因此，我們使用了一種選擇性的 Caspase-8 的抑制劑「z-IETD-FMK」，來探討這兩個路徑。由研究結果知道，z-IETD-FMK 幾乎可以完全抑制掉 Caspase-8 的活性及其下游的 Bid 的裂解作用，但是卻對 Caspase-9 的活性影響不大 (Fig.12)。因此，我們認為 Caseamembrin C 所引起的凋亡作用，主要是經由活化內在性細胞凋亡路徑而來。然而，有趣的是外在路徑既已被活化，卻又不佔太大的角色？有一個理由可以針對此來做說明。有文獻報告指出，Fas 所活化的訊息傳遞有兩類 (Petak and Houghton, 2001; Sun et al., 1999; Kuwana et al., 1998)：在 Type I 細胞，Fas 結合到它的受體後會引起強烈的 Caspase-8 的活化；但在 Type II 細胞，Fas 所引起的 Caspase-8 的活化較輕微。由於 PC-3 是屬於 Type II 細胞，因此，Caseamembrin C 引起的 Fas 以及 Caspase 8 的活化相對較輕微，也較不佔重要角色。

這篇研究顯示，Caseamembrins A 到 F 能表現出不錯的抗癌能力，而 Caseamembrin C 則是其中最強的一個。由結果顯示，增加 Mcl-1S 的表現及減少 Bcl-2 及 Bcl-xL 的蛋白表現，可能部分解釋腫瘤細胞凋亡的原因。此外，Caseamembrin C 也會活化內在性及外在性的細胞凋亡路徑，而內在性的路徑中，活化 Caspase-9 及 -3 可能是造成細胞凋亡最主要的原因。93 年度的計畫完成 70 種成分對於人類腫瘤細胞的抗癌活性分析，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 $3.9\mu M$ 。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。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.13A)。以電子顯微鏡直接觀察也發現細胞產生凋亡作用 (Fig.13B)。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.14)。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.15A)；相較之下，Bromovulone III 却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.15B)。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.16A)。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.16A)。由於有研究報告指出，Caspase-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.16B)。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.17A)，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.17A)。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.14)。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.17B)，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.18)。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.19)。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-κB。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-κB 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-κB 的 DNA 結合活性 (Fig.20)。我們接著以免疫螢光分析法偵測整顆腫瘤細胞內的 NF-κB 轉移到細胞核的作用。結果顯示 YCS-IQ ($10\mu\text{M}$) 可有效的抑制 NF-κB 轉移到細胞核的作用 (Fig.21)，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.21)，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 ($10\mu\text{M}$) 可有效的增加 CHOP/GADD153 的蛋白含量 (Fig.22A)。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 ($10\mu\text{M}$) 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.22B)。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.23 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.23D、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-κB 及 CHOP/GADD153 這兩種轉殖因子較有關，而與 Golgi apparatus 的 Vasiculation 作用較無關。

肆、結論與建議

由上述的結果知道，在過去的三年內，本計畫已完成超過 250 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 3 年執行 200 種）。研究結果發現數種成分具有不錯的抗癌活性：從台灣嘉賜樹分離出的成分，CMB compound 的作用很不錯。經由各種研究分析的結果發現，CMB 的作用下會明顯的增加細胞的 sub-G₀/G₁ 期，表示了 CMB 會使 PC-3 細胞產生凋亡作用。CMB 對於 PC-3 細胞的 Bax 蛋白的表現，以及其細胞質到粒線體的轉移（translocation）皆沒有影響，但卻可隨著濃度的增加而來抑制 Bcl-2 的表現及引起細胞的粒線體 cytochrome c 釋放作用，這也解釋了 CMB 引起 PC-3 細胞凋亡的原因。此外，CMB 以濃度有關的方式來抑制裸鼠的血管新生作用。第二年的研究中，Caseamembrins A 到 F 能表現出不錯的抗癌能力，而 Caseamembrin C 則是其中最強的一個。由結果顯示，增加 Mcl-1S 的表現及減少 Bcl-2 及 Bcl-xL 的蛋白表現，可能部分解釋腫瘤細胞凋亡的原因。此外，Caseamembrin C 也會活化內在性及外在性的細胞凋亡路徑，而內在性的路徑中，活化 Caspase-9 及 -3 可能是造成細胞凋亡最主要的原因。第三年的研究中，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-κB 及 CHOP/GADD153 這兩種轉殖因子較有關，而與 Golgi apparatus 的 Vesiculation 作用較無關。這些研究成果大多於近幾年內陸續發表。

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. Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J., 2000. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J. Biol. Chem.* 275, 25255-25261.
2. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.
3. Cain, K., Bratton, S.B., Cohen, G.M., 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* 84, 203-214.
4. 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.
5. Chen, M., Wang, J., 2002. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7, 313-319.
6. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2: 647-656.
7. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004; 116: 205-219.
8. 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.
9. Hoek JB, Farber JL, Thomas AP, Wang X. Calcium ion-dependent signaling 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.
10. 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.
11. Kuwana, T., Smith, J.J., Muzio, M., Dixit, V., Newmeyer, D.D., Kornbluth, S., 1998. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial

- release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 273, 16589-16594.
12. 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.
13. Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat.* 2004; 28: 101-105.
14. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 381-389.
15. Petak, I., Houghton, J.A., 2001. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol. Oncol. Res.* 7, 95-106.
16. 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.
17. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
18. 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.
19. 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.
20. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
21. Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R., Cohen, G.M., 1999. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 5053-5060.
22. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 2000; 466: 6-10.
23. Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenebeele P. The

proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 1117-1124.

陸、圖

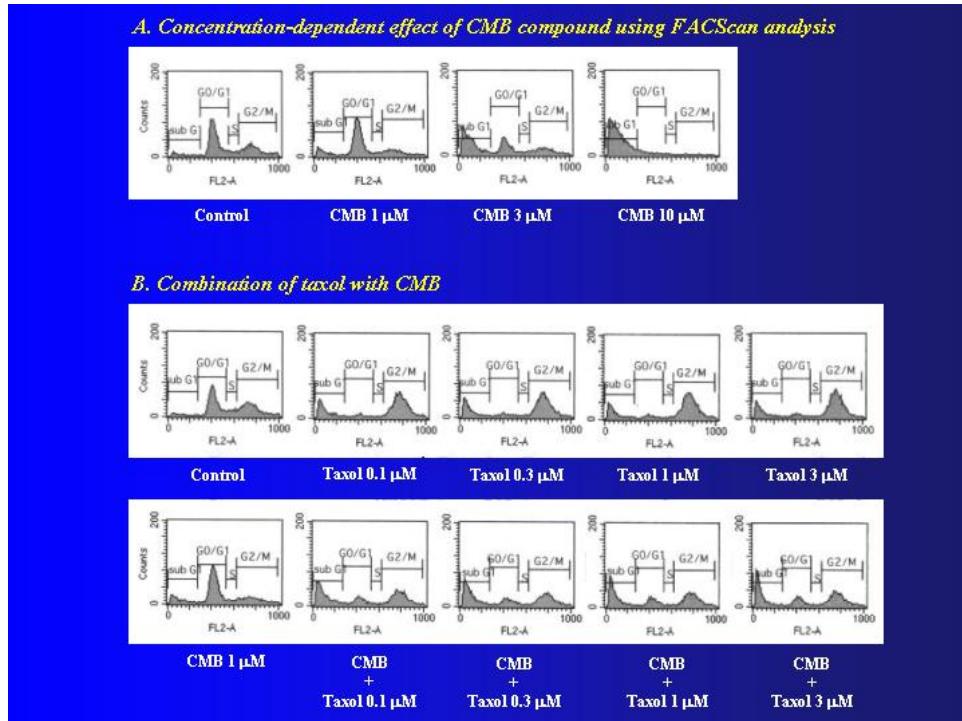


Fig.1 Effect of CMB compound on the cell cycle distribution in PC-3 cells. Cells were plated in 6-well plate for the adhesion for 24 hr. Then, the cells were incubated with CMB, taxol, or CMB plus taxol, and allowed for further 24-hr incubation. The cell cycle distribution was assessed by the FACS analysis by propidium iodide staining as described in the Methods section.

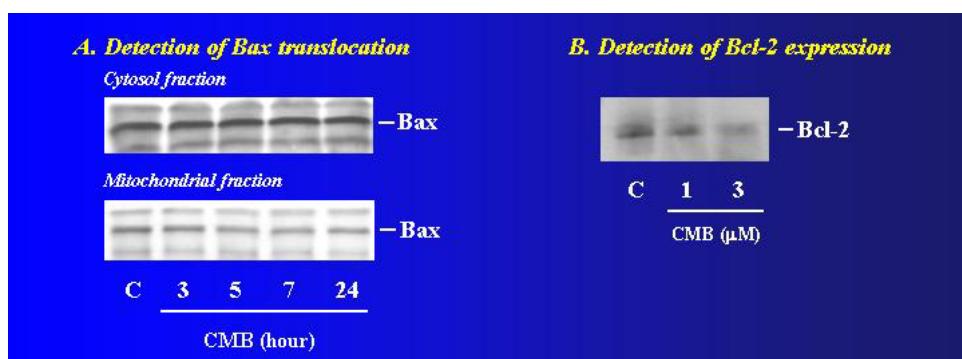


Fig.2 Effect of CMB compound on Bax mitochondrial translocation and Bcl-2 expression in PC-3 cells. Cells were treated with CMB compound as the indicated concentration and time course. Then, the cells were harvested for the detection of Bax mitochondrial translocation and Bcl-2 expression by Western blot as described in the Methods section.

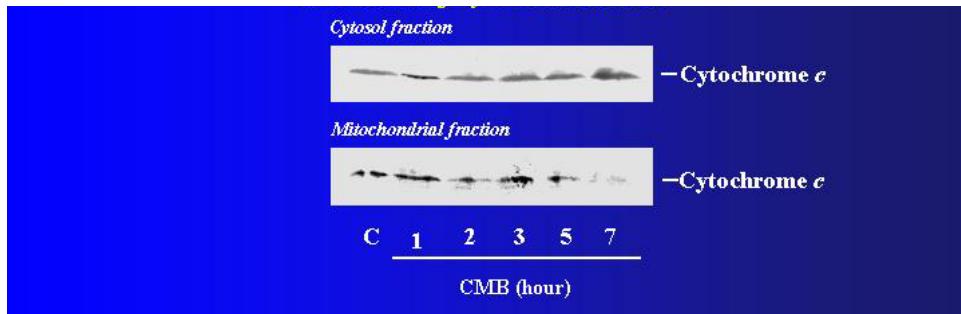


Fig.3 Effect of CMB compound on cytochrome c release reaction in PC-3 cells. Cells were treated with CMB compound ($3\mu\text{M}$) as the indicated time course. Then, the cells were harvested for the detection of cytochrome *c* release reaction by Western blot as described in the Methods section.

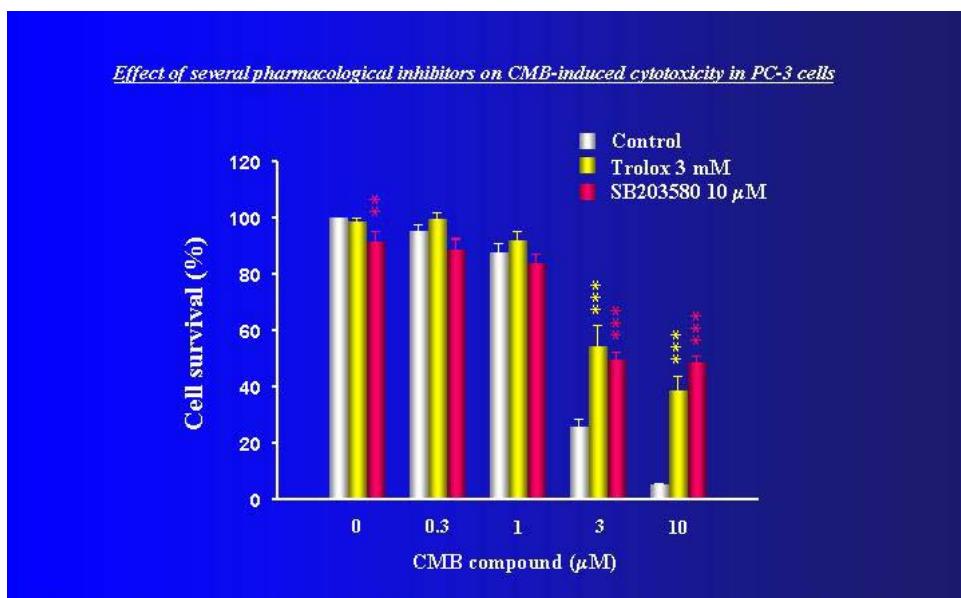


Fig.4 Effect of trolox and SB203580 on CMB-induced cytotoxicity in PC-3 cells. Cells were plated in 96-well plate for the adhesion for 24 hr. The cells were pre-incubated in the absence or presence of trolox or SB203580, and then CMB was added to the cells in a concentration-dependent manner to induce the cytotoxic effect. The cytotoxic effect was assessed by the MTT assay method as described in the Methods section. Data are expressed as mean \pm SEM of three determinations.

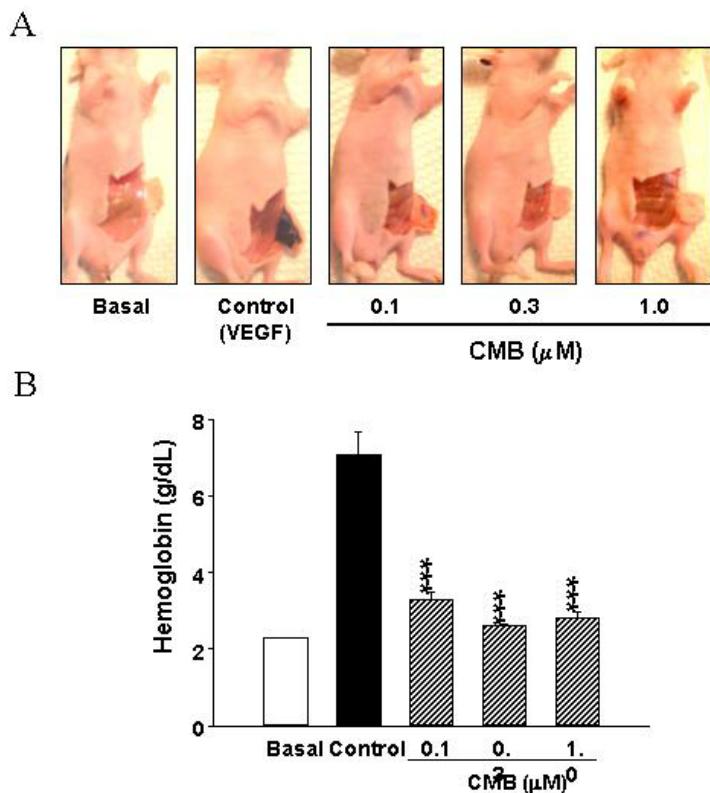


Fig.5 Effect of CMB compound on VEGF-induced angiogenesis in an in vivo assay.

The nude mice were subcutaneously injected with 500 μL of Matrigel at 4°C containing vehicle (basal), VEGF control (150ng/mL), or VEGF plus CMB compound. After 6 days, the animals were euthanatized for the detection of angiogenic effects using the hemoglobin detection assay kits. The data are expressed as mean \pm SEM of three determinations.

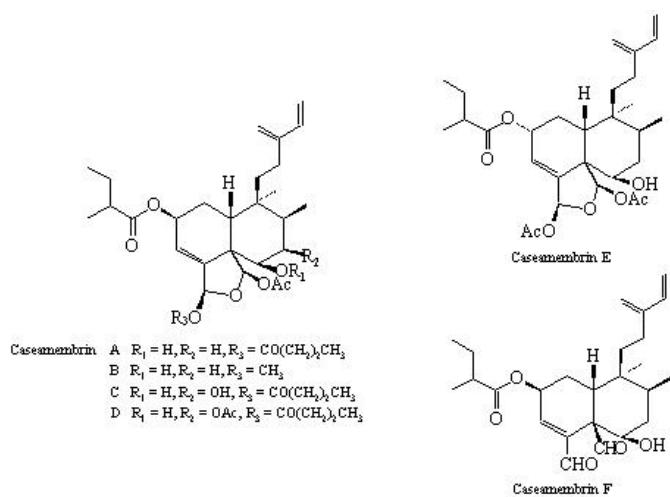


Fig.6 Caseamembrin A 到 F 的化學結構式。

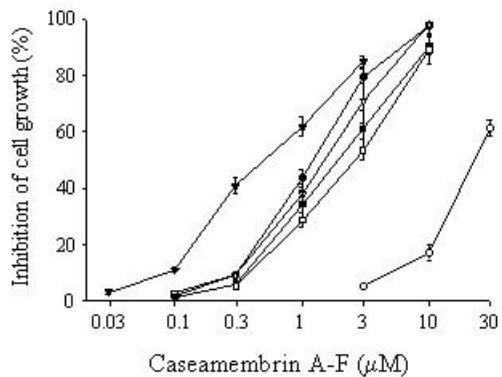


Fig.7 Caseamembrins 抑制腫瘤細胞生長的作用情形。將人類前列腺腫瘤細胞 PC-3 以各種不同濃度的 Caseamembrins 處理 48 小時後，再將細胞固定及染色，其方法如實驗方法一節中的 SRB 測定法所述。實驗結果以五次分別的實驗及 mean±S.E.M. (each in quadruplicate) 的結果表示出。

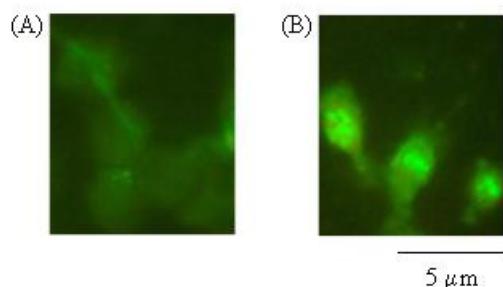


Fig.8 Caseamembrin C 引發腫瘤細胞凋亡的鑑定。將細胞培養於玻片槽裡 24 小時之後，加入 0.1% DMSO (A) 或是 3 μM caseamembrin C (B)，經過 24 小時的作用後，以實驗方法一節中的 *In situ* 標定凋亡細胞的方法，應用 TUNEL 技術及螢光免疫標定凋亡細胞 (1,000x 放大)。

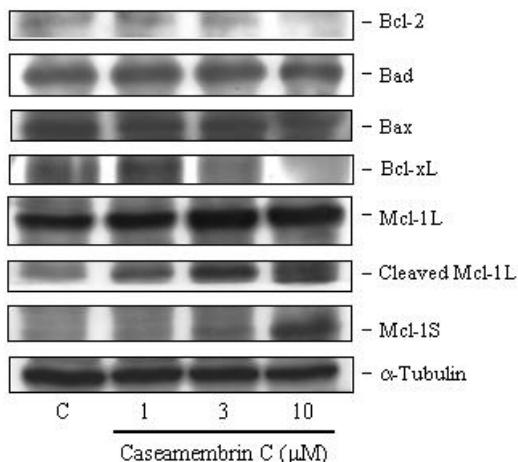


Fig.9 Caseamembrin C 對於 Bcl-2 家族蛋白表現的影響。以各種不同濃度的 Caseamembrin C 作用 16 小時後，再將細胞收集起來做西方式點墨法偵測 Bcl-2 家族蛋白的表現。詳細情形請見方法一節。

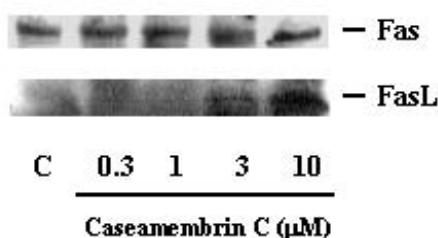


Fig.10 Caseamembrin C 對於 Fas 及 FasL 表現的影響。將細胞以 Caseamembrin C 處理 24 小時後，再將細胞收集起來做西方式點墨法偵測 Fas 及 FasL 的表現。詳細情形請見方法一節。

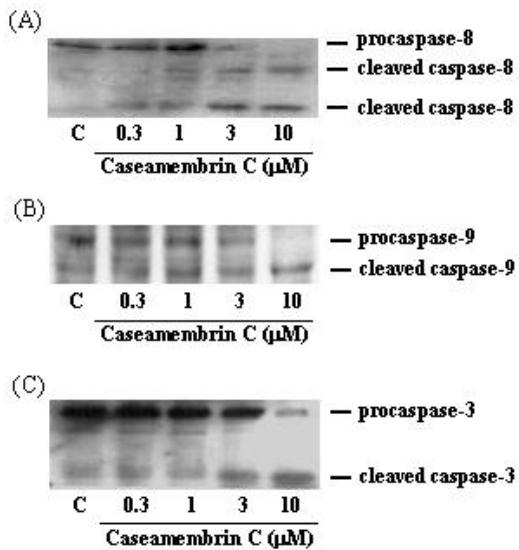


Fig.11 Caseamembrin C 對於數種 Caspases 活化的影響。將細胞以 Caseamembrin C 處理 24 小時後，再將細胞收集起來做西方式點墨法偵測數種 Caspases 的表現及其裂解情形。詳細情形請見方法一節。

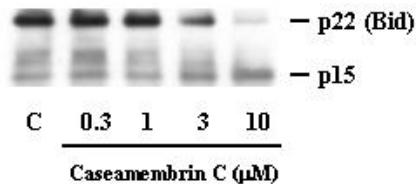


Fig.12 Caseamembrin C 對於 Bid 活性的影響。將細胞以 Caseamembrin C 處理 24 小時後，再將細胞收集起來做西方式點墨法偵測 Bid 的表現及其裂解情形。詳細情形請見方法一節。

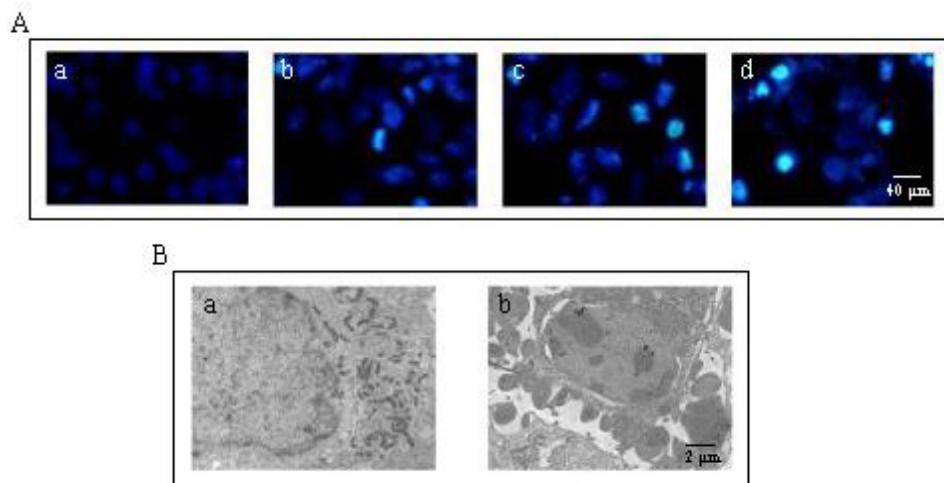


Fig.13 Identification of bromovulone III-induced anti-tumor effect in Hep3B cells.

(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.

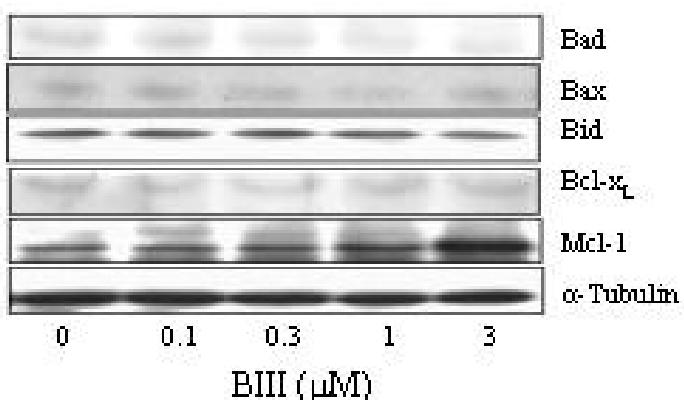


Fig.14 Detection of expressions of Bcl-2 family member proteins in Hep3B cells.

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.

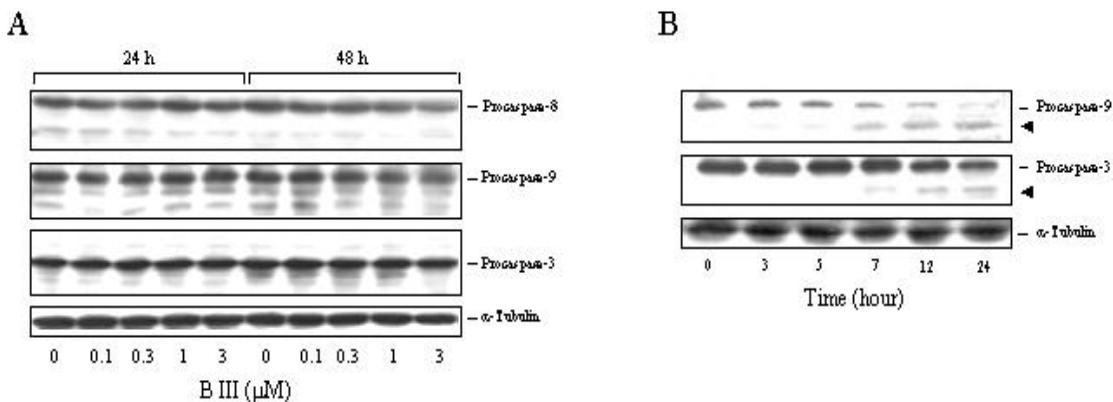


Fig.15 Detection of expressions of several caspases in different tumor types. Hep3B cells were incubated in the indicated concentration of Bromovulone III for 24 or 48 hours (A) or PC-3 cells were incubated in 3μM Bromovulone III for the indicated time courses (B). Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis as described in the Materials and methods section. The arrowhead indicates the cleavaged forms of caspases.

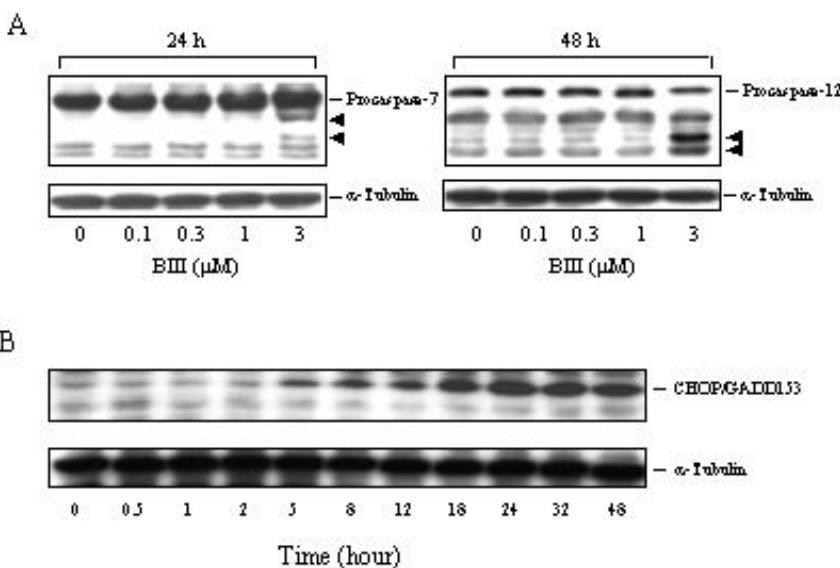


Fig.16 Detection of expressions of several caspases and CHOP/GADD153 in Hep3B cells. Cells were incubated in the indicated concentration of Bromovulone III for 24 or 48 hours (A) or 3μM Bromovulone III for the indicated time courses (B). Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis as described in the Materials and methods section. The arrowhead indicates the cleavaged forms of caspases.

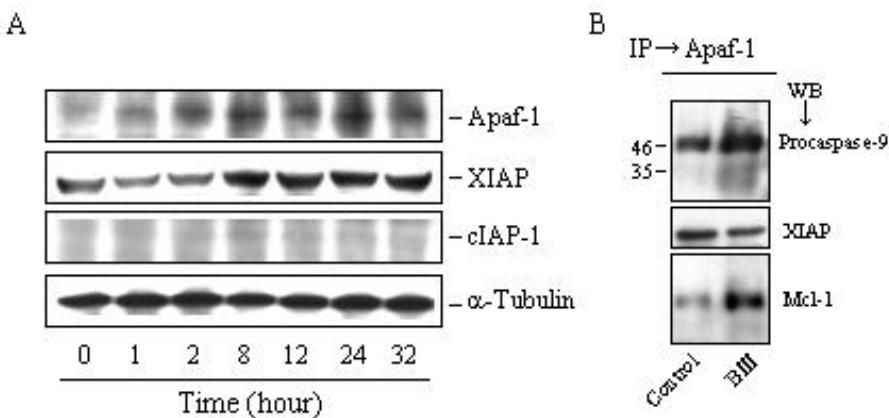


Fig.17 Detection of several apoptosis-related protein expressions in Hep3B cells. (A) Cells were incubated with 3 μM Bromovulone III for the indicated time courses. Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis as described in the Materials and methods section. (B) To detect the proteins associated with Apaf-1, the cells were incubated with 3 μM 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.

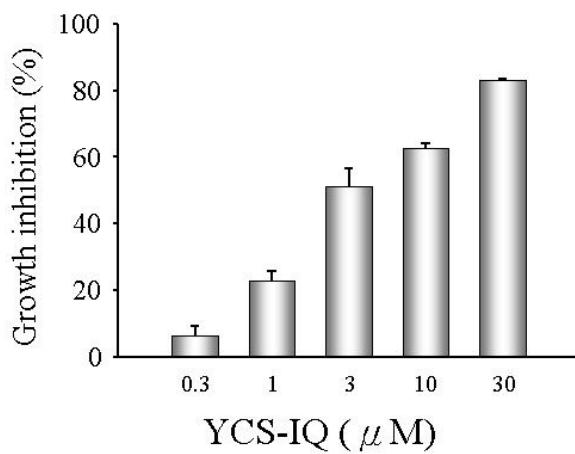


Fig.18 Identification of YCS-IQ-induced anti-tumor effect. The graded concentrations of YCS-IQ were added to cells for 48 hours. Then, cells were fixed and stained with sulforhodamine B (SRB). After a series of washing, bound SRB was subsequently solubilized and the absorbance was read at a wavelength of 515nm. Data are expressed as mean \pm SEM of four determinations (each in triplicate).

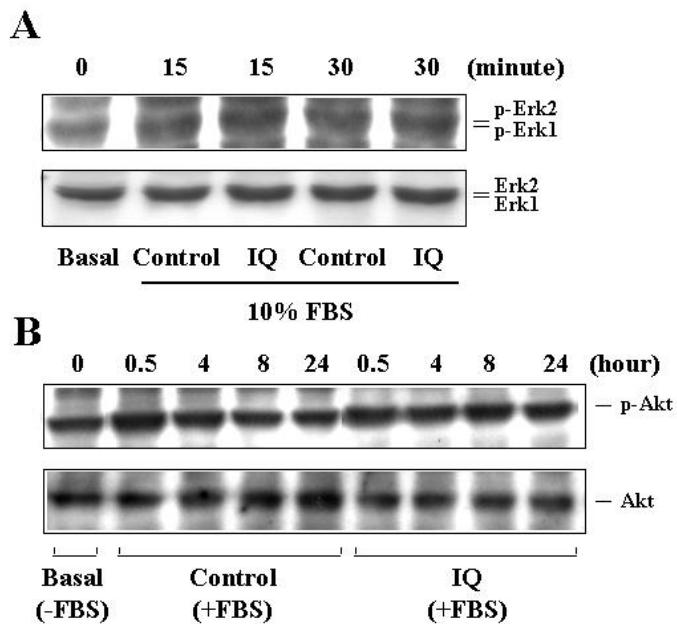


Fig.19 Effect of YCS-IQ on the expression of phospho-Erk and phospho-Akt. Cells were incubated in the vehicle or YCS-IQ (10 μ M) for the indicated time course. Then, the cells were harvested and lysed for the detection of protein expressions by Western blot analysis.

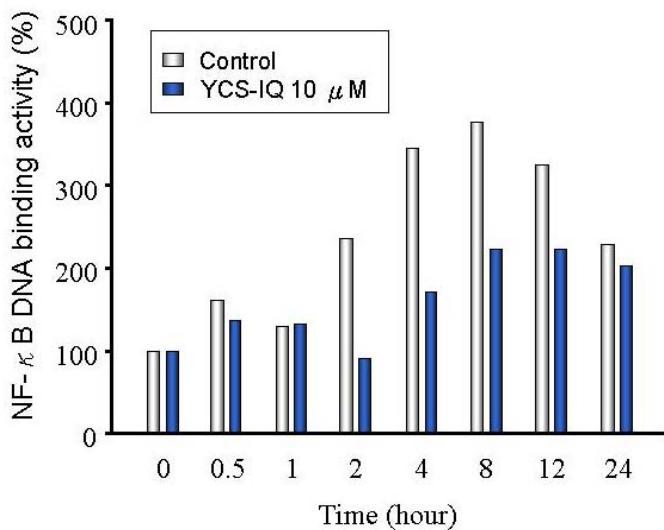


Fig.20 Effect of YCS-IQ on NF-κB DNA binding activity. Cells were incubated in the vehicle or YCS-IQ (10 μ M) for the indicated time course. Then, the nucleus were extracted from cells for the binding assays. Analysis of p65 binding to its consensus oligonucleotide was performed using an ELISA-based Trans-AM™ 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 kB oligonucleotide according to the manufacturer's instructions.

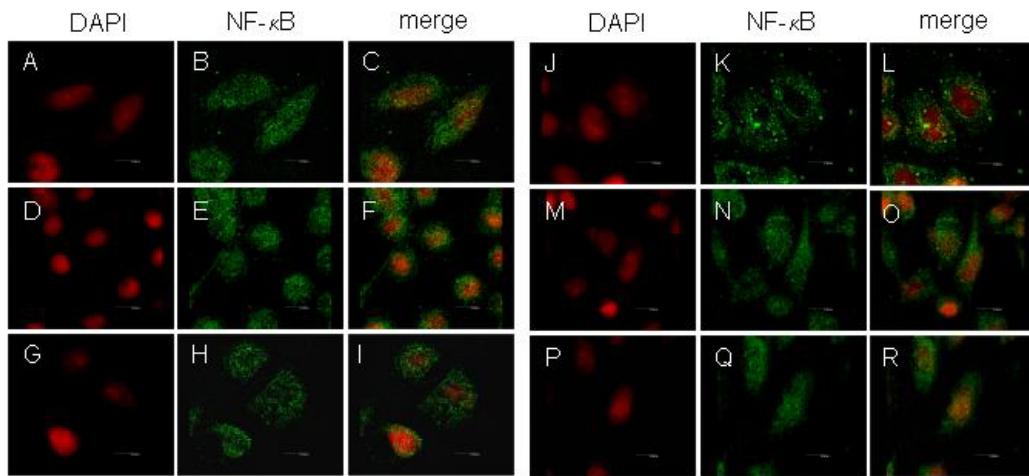


Fig.21 Effect of YCS-IQ on NF- κ B nuclear translocation. Cells were incubated in the vehicle (control, A, B and C) or 10 μ M YCS-IQ for the indicated time course (1hr, D, E and F; 2hr, G, H and I; 4hr, J, K and L; 18hr, M, N and O; 24hr, P, Q and R). Then, the cells were washed, fixed and immuno-stained with NF- κ B. The nuclei were counterstained with DAPI.

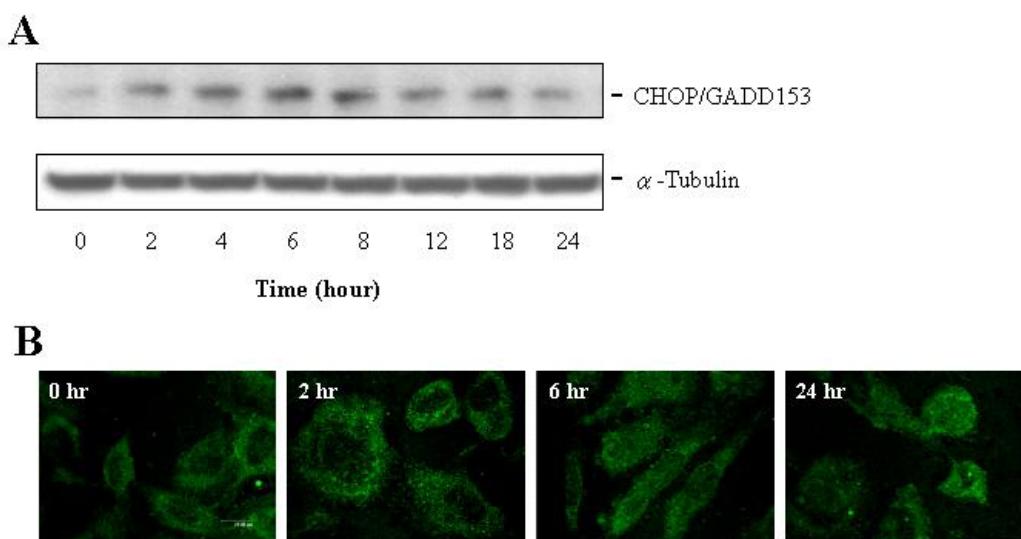


Fig.22 Effect of YCS-IQ on CHOP/GADD153 expression and nuclear translocation. Cells were incubated in the vehicle (zero time) or 10 μ M YCS-IQ for the indicated time course. Then, the cells were harvested for the detection of protein expression by Western blot analysis or fixed for the detection of nuclear translocation by immuno-histochemical staining.

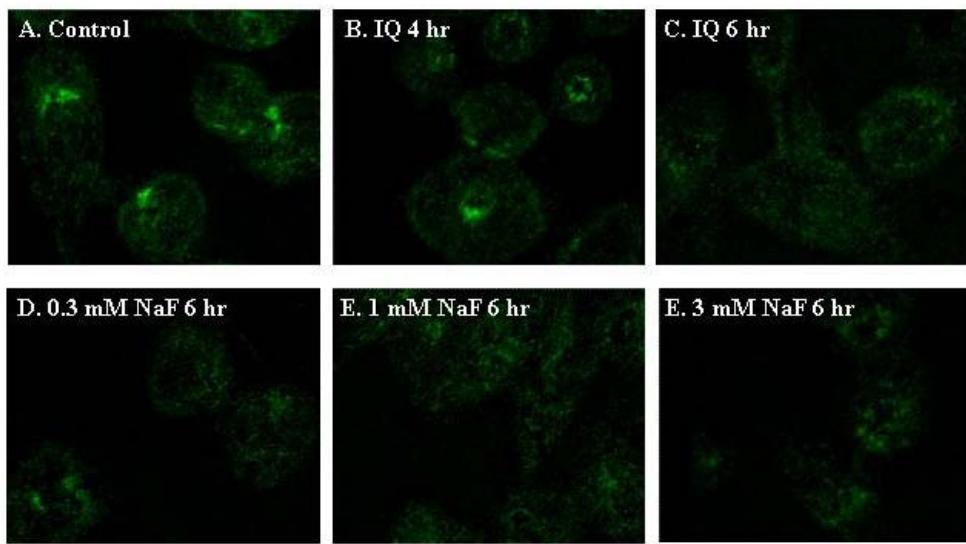


Fig.23 Effect of YCS-IQ and NaF on Golgi vesiculation. Cells were incubated in the vehicle (A, control), 10 μ M YCS-IQ (B, 4hr; C, 6hr) or NaF (D, 0.3mM for 6hr; E, 1mM for 6hr; F, 3mM for 6hr) for the indicated concentration and time course. Then, the cells were fixed for the detection of Golgi vasiculation by immuno-histochemical staining of cis-Golgi marker GM130.

