

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090001

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 探討 Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對人類小細胞肺癌之功效

得獎獎項 三等獎

就讀學校 臺中市立臺中第一高級中等學校

指導教師 林季千、陳靜怡

作者姓名 蔡沂達

關鍵詞 人類小細胞肺癌、山柰酚、細胞凋亡

作者簡介



我是來自台中一中的蔡沂達，很高興在高中這三年能夠接觸科學研究，這樣難得且寶貴的經驗拓展了我的視野。

癌症是從小使我感到恐懼以及未知的疾病，很幸運能夠進入林季千老師實驗室學習並從事肺癌研究，我要謝謝所有幫助過我的人以及堅持到現在的自己，雖然研究成果並不完美，不過有了大家的幫助與陪伴我才能完成這份研究。希望自己保持這份熱忱，持續在科學的世界探索未知，延續對研究工作的熱情。

摘要

肺癌為全球最常被診斷的癌症之一，主要分為非小細胞肺癌與小細胞肺癌，其中小細胞肺癌是最具侵略性、致死性且預後最差的肺癌。目前針對小細胞肺癌仍未有有效的療法。

本研究探討花生外皮萃取出之山奈酚醣苷衍生物 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對小細胞肺癌的抗癌功效。我們發現細胞株 H1688 經藥物處理後細胞存活率明顯降低，以流式細胞儀細胞週期分析，隨藥物劑量增加時 sub G1 期細胞數明顯上升；以 Annexin V 觀察發現藥物劑量增加時細胞逐漸走向晚期凋亡，此外，隨劑量增加 c-PARP、caspase-3、-3 和 -9 的蛋白表達都有增進，同時也造成粒線體膜電位下降與 cytochrome c 釋放，另外我們透過西方墨點法分析發現隨著藥物劑量的增加，p53 蛋白的表現量下降且有磷酸化的現象，並且在經過咖啡因的處理後藥物對細胞株的毒殺作用更加明顯，由實驗結果可知 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 能夠良好的誘導 H1688 細胞凋亡，有潛力成為治療小細胞肺癌的藥物。

Abstract

Lung cancer is one of the most common malignant cancers worldwide. It is grouped into small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). SCLC has a very poor prognosis, as they are normally diagnosed at the late stage when the cancer is already spread to other parts of the body. Worst of all, the current anticancer treatment remains unsatisfactory. Kaempferol, a natural flavonoid compound, mainly presents in plants. Former studies show that kaempferol has anti-inflammatory, anti-oxidation, and anti-cancer effects. Our study aims to evaluate the effect of kaempferol glycoside derivative extracted from peanut skins on SCLC and its underlying mechanism. The SCLC cell line H1688 was treated with different concentrations of kaempferol glycoside derivative. Cell viability was examined using the MTT assay. Flow cytometry was used to evaluate cell cycle distribution, apoptosis, caspase activity, mitochondrial membrane potential, and cytochrome c release. The expression of proteins related to the cell cycle and apoptosis was analyzed by Western blot.

We found that kaempferol glycoside derivative inhibited cell growth, triggered sub G1 accumulation, and induced H1688 cell apoptosis in a dose-dependent manner. Expression levels of caspase-3, -8, and -9, as well as c-PARP, increased with the concentration of kaempferol glycoside derivative. Meanwhile, kaempferol glycoside derivative could trigger the mitochondrial-mediated apoptosis pathway, based on a decrease in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$); cytochrome c release; the decrease of Bcl-xL, survivin, and XIAP expression. Furthermore, we found that the expression of total p53 was decreased but the expression of phospho-p53 was upregulated. Treatment of kaempferol glycoside derivative in combination with caffeine showed a potential synergistic effect. Our findings indicated that kaempferol glycoside derivative can induce programmed cell death and might become a new anti-cancer drug.

一、前言

研究動機

(一)、文獻探討

1. 肺癌流行病學

根據世界衛生組織 2020 年的統計，肺癌是全球最常被診斷出的癌症之一，同時是男性身上被診斷出最多的癌症，肺癌亦為臺灣十大癌症死因之首，儘管近年來各種治療方法發展取得了重大進展，但肺癌的死亡率仍然居高不下，目前臨床上主要將肺癌分為小細胞肺癌 (Small cell lung cancer, SCLC) 及非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 兩大類，前者在早期容易擴大、轉移 (Van Meerbeeck, J. P., et al, 2011)；後者則擴散較晚 (Zappa, C., et al, 2016)，其中小細胞肺癌約占全球肺癌的 15%，每年影響全球超過 20 萬人 (Siegel, R., et al, 2014)，但其預後卻相當不理想。小細胞肺癌的分期大致上可以分為早期 (limited stage) 和晚期 (extensive stage)，不過大多數病人都是晚期才被診斷與接受治療。小細胞肺癌的發生大多為吸菸所致，同時也與環境因素有關 (Van Meerbeeck, J. P., et al, 2011)。小細胞肺癌有分化程度低、惡性程度高，生長迅速及早期擴散的特性 (W. N. William, et al, 2011)，小細胞肺癌患者在診斷時經常有明顯的遠端轉移，其存活率在過去三十幾年來的進展相當有限 (I. Oze, K. Hotta, et al, 2009)。在過去的數十年裡，因為肺癌患者中非小細胞肺癌的患者佔了多數，有相當大量針對非小細胞肺癌的研究，非小細胞肺癌的化學治療藥物也有很明顯地進步，但小細胞肺癌的治療一直沒有良好的對策，除了在治疗時容易產生擴散、轉移之外，一些副作用和抗藥性也是常見的問題，因此開發有效、安全且副作用低的抗腫瘤藥物刻不容緩。

2. 天然化合物

天然化合物 (nature compound) 是從各種不同植物或食物萃取出的化合物，許多研究指出天然物具有抗發炎、抗氧化、提升免疫力、預防心血管疾病等功效，使用天然物作為藥物也具有研發時間短、成本低、結構獨特、安全等優勢 (Atanasov, A. G., et al., 2021)，對患者的副作用也較低，天然物萃取物的多樣性更使得天然物成為癌症新藥開發的重要來源之一。

花生 (*Arachis hypogaea*) 是雙子葉植物剛豆科的植物，又稱落花生或土豆，為一年生草本，花為蝶花形，顏色多為黃色或橙色，先前的研究顯示花生中的化學成分如多酚類的化合物可以抗發炎、抗心血管疾病、抗癌、降低血糖和血脂 (Hussain, T., et al., 2016)。在花生膜多酚類，像是類黃酮 (flavonoid)，具有抗氧化和抗發炎的功能，也可以抵抗外來細菌的侵入 (Tamura, T., et al, 2013)，原花青素可以抑制 α -澱粉酶 (Hargrove, J.L., et al., 2011) 並且降低葡萄糖在人類大腸癌細胞株 Caco-2 細胞的運輸 (Deprez, S., et al., 2001)。

花生膜中含有許多植物化學成分 (phytochemical) 例如：綠原酸 (chlorogenic acid)、咖啡酸 (caffeic acid)、表兒茶素 (epicatechin)、對香豆酸 (p-coumaric acid)、阿魏酸 (ferulic acid)、白藜蘆 (resveratrol)、槲皮素(quercetin)、大豆苷 (daidzin)、木犀草素 (luteolin)、山奈酚 (kaempferol) 等 (AL-Azawi, A. H. , et al., 2017)。花生膜 (peanut skin) 是花生可食用的一部分，但經常被浪費或是當成家畜的飼料原料。花生膜萃取物山奈酚 (kaempferol) 是一種黃色化合物，屬於類黃酮的一種，大多數存在於水果當中，例如：番茄、蘋果、葡萄、草莓或是柑橘類，很多植物也含有山奈酚，像是茶葉、土肉桂、松樹、銀杏葉、豆類的植物等，山奈酚已被證實具有抗發炎、抗氧化的功效，也可以降低心血管疾病和神經發炎的風險，研究也指出山奈酚會抑制髓母細胞瘤 (medulloblastoma) 和乳癌 (breast cancer) 細胞的侵犯和轉移 (Kim, S.H. et al., 2013)，在肺癌治療上研究也顯示山奈酚可以預防肺腺癌 A549 細胞的生長 (Imran, M., et al., 2019)。

(二)、實驗動機

縱觀文獻，肺癌為全世界最常被診斷的癌症之一，開發有效的抗腫瘤藥物刻不容緩。使用天然物作為藥物具有研發時間短、成本低、結構獨特、安全等優勢，且對患者的副作用也較低。Kaempferol (山奈酚) 為一種廣泛存在於自然界中的天然類黃酮化合物，目前已被證實具有抗氧化、抗發炎、和抗癌的功效，本研究所使用的花生膜萃取物 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 為新型山奈酚糖苷之衍生物，目前已有研究表明其具有抗發炎、抗氧化之作用 (Chang, S. T., et al., 2012)，但其對於人類小細胞肺癌抗腫瘤的功效仍未有相關研究闡述，其作用機轉也尚未釐清，因此，希望透過本研究的實驗來了解 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 作為治療人類小細胞肺癌藥物的可能性。

研究目的

近年來非小細胞肺癌的治療有了許多進展，不過小細胞肺癌在臨床上依舊沒有有效的治療方法，Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 是一種新型的山奈酚糖苷衍生物，先前的研究已經證實其抗發炎和抗氧化功效，山奈酚在其他研究中也已被證實具有抗癌活性但其對小細胞肺癌的功效仍然未知，我們認為山奈酚可能同樣對人類小細胞肺癌具有良好的抗癌活性，因此我們的研究目的是探討 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對於人類小細胞肺癌的功效及機轉，希望了解 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 做為治療人類小細胞肺癌藥物的可能性。

二、研究方法或過程

(一) 研究設備及器材

1. 細胞培養

(1) 細胞株：

本研究採用的細胞株為肺癌細胞株 NCI-H1688 以及人類正常肺支氣管上皮細胞 BEAS-2B，細胞系來自來自 Bioresource 收集和研究中心 (BCRC，食品工業研究與開發研究所生資中心/國家衛生研究所細胞庫，新竹，台灣)。

(2) 培養基：

所有細胞株都被培養於含有 10% 胎牛血清蛋白 (Gibco) 1% Antibiotic-Antimycotic (100x) (Gibco)、1% Sodium Pyruvate、1% HEPES 的 RPMI-1640 培養基中，放置於 37°C 含 5% CO₂ 培養箱中培養。

(3) 其他：

Trypsin-EDTA (Gibco)、PBS (Phosphate-Buffered Saline)、二氧化碳培養箱、無菌細胞操作台、細胞培養盤 (6、24 well)、10 公分細胞培養皿、微量吸管、離心機、離心管、光學顯微鏡。

2. 細胞存活測試

- (1) ELISA reader (酵素免疫分析儀)

3. 蛋白表現量分析

- (1) Bio-Rad 西方墨點法系統
- (2) 冷光分析儀 (Las3000 Autochemi System, Fujifilm)
- (3) 乾浴槽
- (4) 各式抗體及試劑

4. 細胞生長觀察

- (1) 流式細胞儀 (Flow Cytometry, Accuri™ C5, BD Bioscience)
- (2) 細胞生長與存活分析 (MTT assay)
- (3) 細胞凋亡分析 (Annexin V / PI stain assay)
- (4) 細胞凋亡酶 caspase 分析 (Caspase activity assay)
- (5) 粒線體膜電位分析 (Mitochondrial membrane potential assay)
- (6) 細胞色素 c 釋放分析 (Cytochrome c release assay)
- (7) 抑制劑處理 (Inhibitor treatment)

5. 藥品

Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 由中國醫藥大學黃慧琪教授提供，自花生膜中萃取，避光保存於-20°C。

(二) 研究方法及進行步驟

1. 細胞培養

(1) 繼代培養

用 suction 去除培養皿內的培養液後以 1×PBS 洗滌細胞兩次以除去殘留的培養液，加入 1 ml 1× 的 trypsin-EDTA 均勻浸潤所有細胞，放回培養箱約 5 分鐘後取出，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮，加入 1 ml 含有血清蛋白的培養液終止 trypsin-EDTA 作用。將細胞沖下收集在 15 ml 離心管中離心後 (1200 rpm, 5 分鐘) 用 suction 抽掉上清液，加入適量的培養液回溶並混合均勻。取適量的細胞懸浮液平均分配到培養皿中，放回到 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱中。

(2) 細胞計數

用 suction 去除培養皿內的培養液後以 1× PBS 洗滌細胞兩次除去殘留的培養液，加入 1 ml 1× 的 trypsin-EDTA 均勻浸潤所有細胞，放回培養箱約 5 分鐘後取出，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮，加入 1 ml 含有血清蛋白的培養液終止 trypsin-EDTA 作用。將細胞沖下收集在 15 ml 離心管中離心後 (1200 rpm, 5 分鐘) 用 suction 抽掉上清液，加入適量的培養液回溶並混合均勻。取 10 μl 細胞懸浮液與 70 μl 甲基藍 (trypan blue, Sigma) 至微量離心管 (eppendorf) 均勻混合後，再取 10 μl 至細胞計數盤 (Counting chamber) 計數細胞，並加入所需的細胞量於培養皿，使其均勻散布後放回 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱中。細胞計數公式：
$$[(\text{上和下計算室九宮格的四個角落之細胞總和})/8(\text{計算格數})] \times \text{細胞稀釋倍數} \times 10^4。$$

2. 細胞生長與存活分析

我們利用 MTT assay (Sigma-Aldrich) 進行細胞生長與存活分析，MTT assay 會經由活細胞粒線體脫氫酶反應還原為紫色結晶物質 (formazan)，因此我們可以藉由結晶的多寡評估細胞存活之比例，進一步觀察加藥處理後細胞存活率之變化。我們將密度 1×10^5 cells/ml 之細胞種入內含 1 ml 含血清培養基之 24 孔細胞培養盤 (Corning)，隔夜使細胞貼附後加入不同濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理，在 37°C、5% CO₂ 下培養 24 小時後移除培養基溶液，用 1 \times PBS 清洗兩次。再加入以無血清培養液稀釋至 0.5 mg/ml 的 MTT 試劑 200 μ l，避光放置於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱中培養 2 至 3 小時，之後將 MTT 移除，加入 300 μ l / well 的 DMSO 溶解紫色結晶並混和均勻。每 well 各取 100 μ l 至 96 well 微量盤，利用 ELISA reader (Sunrise Tecan) 測量波長 570 nm 的吸光度讀值，測定細胞的存活率。計算細胞存活率： $(\text{OD sample 平均值} / \text{OD control 平均值}) \times 100\%$ 。

3. 細胞週期分析

本實驗以流式細胞儀 (Flow Cytometry, Accuri™ C5, BD Bioscience) 分析加藥處理後之肺癌細胞在不同細胞週期間其 DNA 含量的變化，進一步判斷不同濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對細胞週期的影響。隨著細胞進入不同週期 DNA 的含量也會有所變化，在 G₀/G₁ 時期 DNA 為雙套 (2n)，G₂/M 期為 4 套 (4n)，而 S 期介於 G₀/G₁ 及 G₂/M 期間 (2n-4n)，若細胞有凋亡現象產生，也就是 DNA 有片斷化之現象，將在 G₀/G₁ 波峰前形成 sub G₁ 之波峰 (<2n)。我們將密度 2×10^5 cells/ml 之細胞種入含 2 ml 含血清培養基之六孔細胞培養盤，隔夜待細胞貼附後加入不同濃度的藥物處理，培養 24 小時後將上清液收集至離心管內，以 1 \times PBS 清洗細胞培養盤兩次，加入適量 trypsin-EDTA，反應五分鐘，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮後加入含血清培養基中止其反應。接著將細胞懸浮液收集至離心管，以 1200 rpm 的轉速離心 5 分鐘，確認離心

管底部有明顯的細胞團塊後將上清液去除，以 1× PBS 清洗細胞團塊兩次，加入 70% 酒精，以 parafilm 封住開口後放置於 -20°C 冰箱固定至少 24 小時。進行流式細胞分析前，將以酒精固定的樣本以 1× PBS 清洗兩次，接著加入 400 μl 的 propidium iodide (PI) 染劑 (含 1 mg/ml PI、2 mg/ml RNase A (BD bioscience)、5% triton X-100 (BD bioscience)、1× PBS)，輕拍離心管使細胞及染劑混合均勻，於室溫下避光染色 30 分鐘過篩後上機。以儀器內建直方圖 (histogram) 分析數據。PI 以嵌入方式結合 DNA 或 RNA 後會產生紅色螢光 (經流式細胞儀中波長 488nm 之雷射光激發 PI 後發出 610 nm 之紅色螢光)，由於 PI 也會與 RNA 結合，故會加入 RNase A 來分解 RNA 避免干擾實驗結果，另外正常狀況下細胞膜完整因此 PI 無法進入核內，70% 酒精及 triton X-100 的作用為將細胞膜打洞，如此一來，PI 便可進入核內與 DNA 結合，流式細胞儀分析時偵測 FL2 之螢光訊號，藉由螢光強度分析細胞週期變化。

4. 細胞凋亡分析

本實驗使用 Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Pharmingen™，內含 1× Annexin V binding buffer、FITC annexin V、propidium iodide 染劑)，通過流式細胞儀以儀器內建點圖 (dot plot) 來進行分析經過 kaempferol 3-O-β-d-xylopyranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-7-O-α-l-rhamnopyranoside 處理後 H1688 細胞凋亡的情形。我們將密度 2×10^5 cells/ml 之細胞種入含 2 ml 之含血清培養基的六孔細胞培養盤，隔夜待細胞貼附後進行加藥處理，培養至所需時間之後，將上清液收集至離心管，以 1× PBS 清洗細胞培養盤兩次，加入適量 trypsin-EDTA，反應五分鐘，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮後加入含血清培養基中止其反應，接著將細胞懸浮液收集至離心管，以 1200 rpm 的轉速離心 5 分鐘，確認離心管底部有明顯的細胞團塊後將上清液去除，以 1× PBS 清洗細胞團塊兩次，加入預先配置好之染劑：2 μl Annexin V、2 μl PI 及 100 μl binding buffer (10 倍稀釋)，室溫下染色 15 分鐘後過篩上機，另外需分出單染 Annexin V、單染 PI 及未染色組，單染的目的除了用於判斷是否有確實染上染劑外，由於 FL1 綠色螢光及 FL2 紅色螢光會互相干擾，加了以上的單染組別可以幫助我們調整螢光補償。在正常

細胞中磷脂醯絲氨酸 (phosphatidylserine, PS) 只分布在細胞膜脂質雙層的內側，而在細胞凋亡早期，細胞膜中的 PS 由脂膜內側翻向外側。Annexin V 是一種分子量為 35~36 kD 的 Ca^{2+} 依賴性磷脂結合蛋白，與 PS 有高度親和力，故可通過細胞外側暴露的 PS 與早期凋亡細胞的胞膜結合。因此 Annexin V 是檢測細胞早期凋亡的靈敏指標之一。碘化丙啶 (propidium Iodide, PI) 是一種核酸染料，它不能透過完整的細胞膜，但對凋亡中晚期的細胞和死細胞，PI 能夠通過細胞膜而使細胞核染紅。因此將 Annexin V 與 PI 匹配進行雙染，就可以將處於不同凋亡時期的細胞區分開來，進一步偵測細胞之凋亡現象。

5. 細胞凋亡酶 caspase 分析

本實驗使用 caspase 細胞活性套組 (CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-Staining Kit, BioVision) 進行染色，細胞凋亡酶為一種蛋白酶，主要參與細胞凋亡、發炎、和壞死等過程，當細胞凋亡，接收到凋亡訊號後，將不活化的 pro-caspase 轉為活化的 caspase，本套組利用 caspase 的抑制劑 (caspase-3 inhibitor, DEVD-FMK; caspase-8 inhibitor, IETD-FMK; caspase-9 inhibitor, LEHD-FMK)，結合 FITC 螢光，以無毒、具細胞穿透性且易與活化之 caspase 結合的特性來偵測正在凋亡之活細胞的 caspase 活化情形。我們將密度 2×10^5 cells/ml 之細胞種入含 2 ml 之含血清培養基的六孔細胞培養盤，隔夜待細胞貼附後加入不同濃度的 kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside 處理，置於 37°C 含 5% CO_2 的培養箱中培養 24 小時將上清液收集到 15 ml 離心管，以 1x PBS 沖洗兩次，並將 PBS 收集到離心管，加入 1 ml trypsin-EDTA，反應 5 分鐘，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮後加入含血清培養基中止其反應，將細胞懸浮液收集到 15 ml 離心管中，以 1200 rpm 的轉速離心 5 分鐘，確認離心管底部有明顯的細胞團塊後將上清液去除，之後以 1x PBS 清洗細胞團塊兩次，將離心管底部的細胞團塊打散，每管取 50 μ l 當作當 no stain control 組，使用 caspase 細胞活性套組進行染色 (每支檢體加入 300 μ l 含血清 RPMI 培養基和 1 μ l 的 caspase 抑制劑，no stain 只加 300 μ l 含血清 RPMI 培養基) 置於 37°C 含 5% CO_2 的培養箱中作用 45 分鐘。離心後倒掉上清液，利用套組中的 wash buffer 清洗兩

次，加入 300 μ l wash buffer 至每個濃度的 flow tube 中過篩上機。並以流式細胞儀內建點圖 (dot plot) 進行分析，偵測其螢光表現量來分析正在凋亡之活細胞和其 caspase 活化情形。

6. 粒線體膜電位分析

本實驗以流式細胞儀內建 dot plot 進行分析，分析加藥後細胞之粒線體膜電位變化。粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi$ M) 在正常細胞中的粒線體是一個重要的指標，JC-1 是帶正電且親脂性的陽離子染劑，它可以選擇性的進入粒線體並且藉由其顏色的改變來觀察粒線體膜電位的變化，在正常細胞中 (有較高的粒線體膜電位)，帶正電的 JC-1 染劑會進入帶負電的粒線體中並會形成 J-aggregates 複合物，此時呈現紅色螢光 (590 nm)，當細胞凋亡時，粒線體膜電位會降低 (低於 100 mV)，使得 JC-1 染劑變為單體，呈現綠色螢光 (529 nm)。以 FL1 (綠色螢光) 及 FL2 (紅色螢光) 進行分析，若加藥處理後有綠色螢光產生，即可判定有細胞凋亡現象。首先我們將密度 2×10^5 cells/ml 之細胞種入含 2 ml 之含血清培養基的六孔細胞培養盤，隔夜待細胞貼覆後進行加藥處理，培養至所需時間之後，將上清液收集至離心管，以 1x PBS 清洗細胞培養盤兩次，加入適量 trypsin-EDTA，反應五分鐘，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮後加入含血清培養基中止其反應，接著將細胞懸浮液收集至離心管，以 1200 rpm 的轉速離心 5 分鐘，確認離心管底部有明顯的細胞團塊後將上清液去除，以 1x PBS 清洗細胞團塊兩次，加入以無血清之培養基配至最終濃度為 10 μ g/ml 之 JC-1 染劑 (Invitrogen)，置入 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中作用 10 分鐘，隨後以 1x PBS 清洗細胞團塊兩次，加入 1x PBS 400 μ l，過篩後上機。

7. 細胞色素 c 釋放分析

當細胞凋亡時，粒線體的膜電位會產生改變並使得粒線體的通透性改變，細胞色素 c (cytochrome c) 便得以從粒線體釋放至細胞質中並且與 Apaf-1 蛋白的 WD40 區域產生蛋白交互作用結合成 apoptosome 進而使 caspase 活化並進一步引發內在路徑的細胞凋

亡。本實驗使用 digitonin 在細胞膜上形成約 40~50Å 的小孔洞造成膜的通透性增加，藉此清洗掉由粒線體釋放至細胞質中的 cytochrome c 等細胞質成分，透過 cytochrome c 標記 digitonin-permeabilized cells，並以流式細胞儀分析細胞凋亡之細胞粒線體中的 cytochrome c。我們將密度 2×10^5 cells/ml 之細胞種入含 2ml 之含血清培養基的六孔細胞培養盤，隔夜待細胞貼附後加入不同濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理，置於 37°C 含 5% CO₂ 培養 24 小時，將上清液收集到 flow tube 中，以 1 \times PBS 沖洗細胞培養盤兩次。接著加入 1 ml trypsin-EDTA 反應 5 分鐘，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮後加入含血清培養基中止其反應，將細胞懸浮液收集到 flow tube 中以 1200 rpm 的轉速離心 5 分鐘，確認離心管底部有明顯的細胞團塊後將上清液去除，以 1 \times PBS 清洗細胞團塊兩次，將離心管底部的細胞團塊打散，加入 100 μ l digitonin buffer (含 1 mg/ml digitonin (sigma), 100 mM KCl)，於冰上反應五分鐘，以 PBS 沖洗，離心後去除上清液，加入 200 μ l IC Fixation buffer (ebioscience)，在室溫下反應 20 分鐘，接著以 1 \times Perm/wash buffer (BD) 清洗細胞團塊，離心後去除上清液，加入染劑(1 μ l Cytochrome C-FITC、50 μ l Perm/wash buffer)，置於 4°C 避光染色 1 小時後以 Perm/wash buffer 清洗細胞團塊，最後回溶 400 μ l 1% paraformaldehyde 固定細胞，過篩後以流式細胞儀分析。

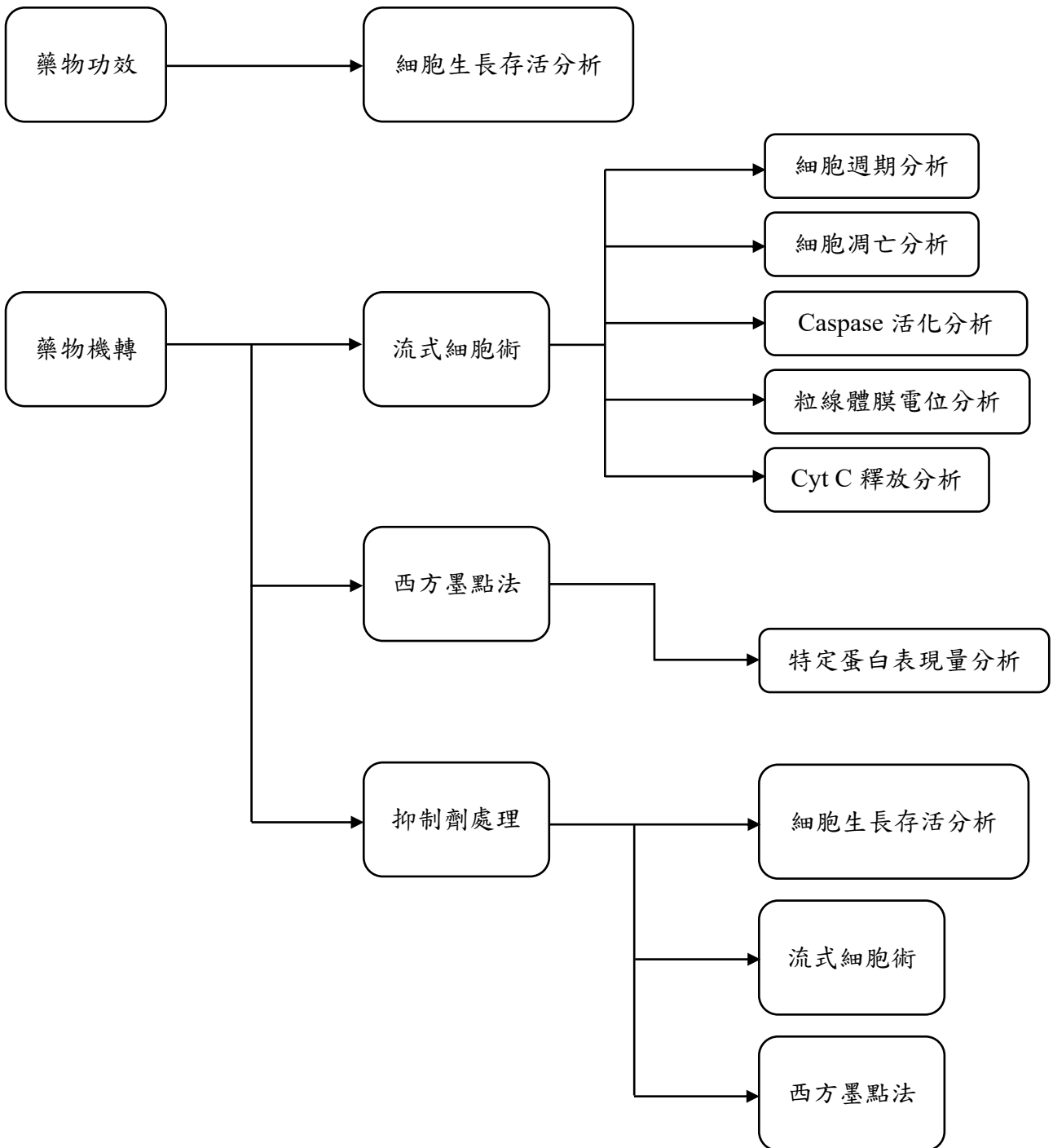
8. 西方墨點法

將密度 2×10^5 細胞種入含 2 ml 培養基之 6 孔細胞培養盤中，隔夜待細胞貼覆後加入不同濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理，於 37°C 含 5% CO₂ 培養 24 小時，將上清液收集到 15 ml 離心管，1ml PBS 沖洗兩次，並將 PBS 收集到離心管。接著加入 1 ml trypsin-EDTA，反應 5 分鐘，確認原先貼附於盤底的細胞收縮成圓形並且懸浮後加入含血清培養基中止其反應，並將細胞懸浮液收集到 15 ml 離心管中以 1200 rpm 離心 5 分鐘，離心後去除上清液，加入 1ml PBS 沖洗兩次將離心管底部的細胞團塊打散放置微量離心管，加入 RIPA lysis buffer 混合液(含 phosphatase inhibitors、protease inhibitors)充分混合均勻後，放置冰上反應 30 分鐘，離心 12000 rpm，10 分鐘，將上清液吸到新的微量離心管。利用 BCA 蛋白定量試劑 (Bicinchoninic Acid Kit, Thermo Scientific Pierce) 進行蛋白濃度定量，並且使用 BSA (bovine serum albumin) 當作標準品，製作出標準曲線計算檢體蛋白濃度。依照所測之蛋白分子量的不同，配置不同濃度的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 分離蛋白，利用濕式轉漬系統電壓 100 伏特 50 至 60 分鐘使凝膠上的蛋白質轉印 (transfer) 到 polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上，之後將轉印完的 PVDF 膜放置乾淨的盒子倒入 blocking buffer，使其蓋過 PVDF 膜置於室溫搖晃 1 小時，移除 blocking buffer 後倒入 TBST 清洗 5 次，每次 5 分鐘，倒入一級抗體，放置 4°C 冰箱搖晃至隔天。移除一抗，倒入 TBST 清洗 5 次，每次 5 分鐘，倒入二級抗體放置 4°C 冰箱搖晃隔夜，移除二抗，倒入 TBST 清洗 5 次，每次 5 分鐘，利用以 ECL (Enhanced chemiluminescence, PerkinElmer Inc) 分析套組呈色，利用酵素冷光分析儀分析蛋白質。

9. 抑制劑處理

將細胞以抑制劑預先處理培養一小時，接著加入特定濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 24 小時，隨後收取細胞進行細胞存活率分析或以流式細胞儀分析細胞週期以及細胞凋亡情形。

實驗架構圖：



三、研究結果與討論

(一) 新型山奈酚糖苷衍伸物對 H1688 之細胞形態 (cell morphology) 及生長存活之影響。

首先我們希望了解 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對人類小細胞肺癌生長存活之功效，我們發現與加入 DMSO 之對照組相比，隨著 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 之濃度增加，H1688 細胞逐漸變為圓形且皺縮脫落，並且有細胞死亡漂浮之情形 (圖一)。我們以 MTT assay 分析細胞存活率發現 H1688 之生長受到抑制，進一步計算 H1688 在經過藥物處理 24 小時後之半抑制濃度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 為 8.53 μ g/ml 換算成體積莫耳濃度大約為 12 μ M (圖二)，透過實驗結果我們發現 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 能夠有效之抑制細胞生長，且有劑量依賴性之表現，並且與先前山奈酚衍伸物對人類非小細胞肺癌功效之研究相比 (Tsui, K. C., et al, 2014)，新型山奈酚衍伸物 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 在人類小細胞肺癌細胞株 H1688 上顯示了更好之抗癌活性。

(二) 新型山奈酚糖苷衍伸物誘導 H1688 細胞週期停滯。

先前結果已初步證實 H1688 細胞株之存活會受到 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 之抑制，細胞週期 (cell cycle) 發生變化可能會造成細胞死亡，先前有關山奈酚對人類非小細胞肺癌之研究也指出山奈酚能夠使細胞週期停滯在 G2/M 期 (Huang, W. W., et al, 2013)，因此我們想進一步觀察 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 造成 H1688 細胞受到之生長抑制是否同樣是因為細胞週期停滯所導致，我們藉由流式細胞儀來分析在不同濃度之 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside (3.13、6.25、12.5 μ g/ml) 處理 24 小時後細胞週期之變化。結果顯示隨著藥物濃度增加，Sub G1 之細胞數明顯增加 (圖三)，該實驗結果證實藉由 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-

rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理 H1688 細胞 24 小時，會誘導細胞週期停滯在 sub G1，這樣的結果和先前顯示山奈酚會誘導子宮內膜癌細胞停滯在 sub G1 並造成凋亡的研究結果相符 (Chuwa, A. H., et al., 2018)。

(三) 新型山奈酚糖苷衍伸物誘導 H1688 細胞凋亡。

在上述的細胞週期分析發現，Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 的濃度增加會誘導細胞停滯在 sub G1，當細胞週期停滯時便有可能造成細胞凋亡 (Plesca, D., et al., 2008)，因此我們藉由 Annexin V / PI 染色來觀察是否有細胞凋亡的情況發生。

根據我們的實驗結果發現，加入 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理 6 小時後，Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 濃度越高，細胞凋亡的百分比也越高 (圖四)，將其量化可發現有劑量效應 (圖五)。

(四) 新型山奈酚糖苷衍伸物透過細胞凋亡路徑抑制 H1688 的活性。

細胞凋亡可以通過兩個基本途徑發生：內在路徑 (intrinsic pathways) 和外在水路徑 (extrinsic pathways)，其中 caspase 活化對於細胞凋亡酶依賴性細胞凋亡 (caspase-dependent apoptosis) 扮演著重要的角色，caspase-9 (內源性)、caspase-8 (外源性) 及 caspase-3 (包含內源及外源性) 的活化更是凋亡途徑主要的指標之一，因此我們使用 caspase 細胞活性染色套組觀察細胞凋亡酶活化的情形。

透過流式細胞儀來觀察 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 誘導 H1688 細胞凋亡的路徑，我們發現在經過藥物處理後，caspase-3 和 caspase-9 的表現隨著劑量上升而增進，caspase-8 的表達則是在高劑量有較明顯的增加 (圖六)，由此上述的結果我們除了可以知道 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 會誘導 H1688 細胞凋亡，且能進一步推測 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 能

夠誘導細胞透過內在途徑的活化走向凋亡。

因此我們透過西方墨點法來進一步觀察分析和內源性凋亡相關蛋白之表現情形(圖七)，我們發現經過 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後，凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 和 XIAP 的表達隨 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 濃度的增加而減少；而 cleaved caspase-3 的表現量伴隨著劑量的增加而上升。並且，活化的 caspase-3 會進一步剪切 poly ADP-ribose polymerase (PARP)，成為 cleaved PARP (c-PARP)，使其無法發揮正常功能進而造成 DNA 斷裂，從西方墨點法結果也可看到 c-PARP 表現量隨著劑量增加而上升；Survivin 是一種抗細胞凋亡的蛋白，具有促進癌細胞存活與增生的功能，在實驗結果中我們也可以看到 Survivin 的表現量隨著 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 濃度增加而減少，這些現象與內源性細胞凋亡都是相符合的。

(五) 新型山奈酚糖苷衍伸物使 H1688 細胞粒線體膜電位損失以及促進 cytochrome c 釋放。

內源性細胞凋亡又被稱作粒線體介導途徑凋亡，因為內源性的細胞凋亡取決於許多從粒線體釋放的因子，其發生主要又與粒線體膜電位的下降有關 (McIlwain, D. R., et al., 2013)。上述的實驗結果顯示，與內源性途徑有關的 caspase-3 和 caspase-9 都有顯著的增加，於是我們將細胞經 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 加藥處理後，利用 JC-1 染劑進行膜電位分析。從結果發現隨著劑量的增加，JC-1 染劑因為細胞凋亡導致粒線體膜上的負電性降低而變成單體的數量增加，使得綠色螢光訊號也跟著增加 (圖九)。結果證實 H1688 細胞在經過 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 加藥處理後，有隨著劑量增加而促使粒線體膜電位下降的情形 (圖十)。

透過以上實驗結果我們可以更肯定由 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 所誘導的細胞凋亡是透過內源性途徑，而促進凋亡的刺激會造成粒線體膜的通透性改變，進而釋放細胞色素 c (cytochrome c) 至細胞質中並活

化下游的 caspase 最後使細胞走向凋亡 (Garrido, C., et al., 2006)。於是我們同樣將細胞經 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後使用流式細胞儀檢測 cytochrome c 釋放至細胞質的情形，結果顯示在高劑量組別 (12.5 μ g/ml) 有大量增加的 cytochrome c 釋放 (圖十一、圖十二)。

(六) 新型山奈酚糖苷衍伸物對 H1688 細胞週期相關蛋白之影響。

接著，我們想了解 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 造成細胞週期停滯的原因，使分子機轉更明朗。以西方墨點法進行分析，觀察細胞週期調控的相關蛋白表現量。從結果可以看到 H1688 細胞在經過不同濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後，細胞中的 p53 蛋白表現量隨著濃度的提高而減少，而 Phospho-p53 (Ser¹⁵) 蛋白的表現量則隨著濃度提高而增加，同時 p21 與 p27 蛋白也隨著 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 濃度的提高而減少 (圖十三)，我們推測 p53 蛋白的磷酸化可能就是造成後續細胞凋亡的原因。

(七) 以抑制劑 NAC 5 mM 與 4-PBA 1 mM 預先處理一小時後分析新型山奈酚衍伸物對抑制細胞生長之影響。

接下來我們想了解造成 p53 蛋白磷酸化的原因，根據文獻，活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 的生成 (Liu, B., et al., 2008)，以及內質網壓力 (Lin, W. C., et al., 2012) 都有可能影響 p53 的活化情形。我們檢測了 H1688 細胞在經過 ROS 抑制劑 NAC (N-acetyl-L-cysteine) 以及內質網壓力抑制劑 4-PBA (4-phenylbutyric acid) 處理後 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對 H1688 細胞存活率的影響 (圖十四)。透過實驗結果我們發現無論是加入 NAC 或是加入 4-PBA 的組別，其細胞存活率的變化與對照組間並無顯著差異，因此我們初步排除活性氧化物生成以及內質網壓力的途徑。

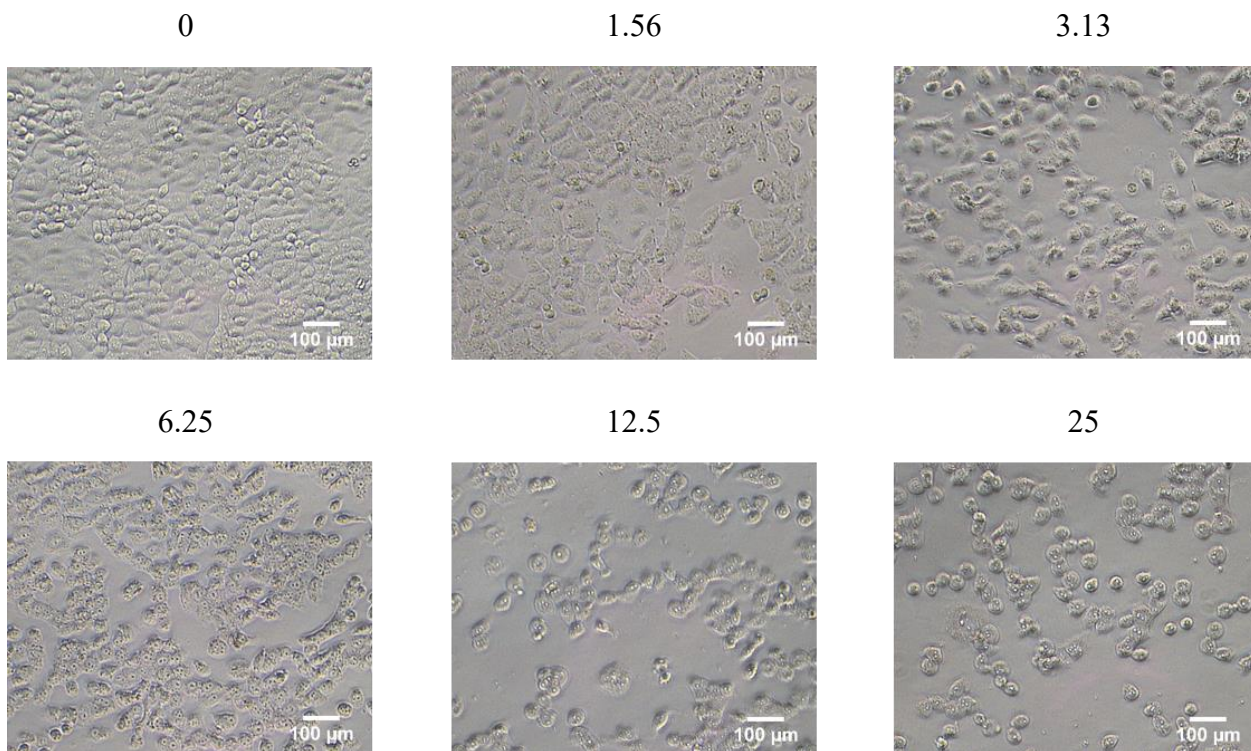
(八) 以 Caffeine 預先處理後分析新型山奈酚糖苷衍伸物對抑制細胞生長之影響。

DNA 損傷 (DNA damage) 也可能影響 p53 蛋白的活化 (Lakin, N. D., et al., 1999), Caffeine 已知可以透過抑制 ATM/ATR 路徑來抑制 DNA damage (Cortez, D., et al., 2003), 我們檢測了 H1688 細胞在經過 5 μ M 的 Caffeine 預先處理一小時後處理後 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對 H1688 細胞存活率的影響 (圖十五), 透果實驗結果發現, 相較於只加入 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 的組別, 在合併 Caffeine 與 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 後能夠更有效的降低 H1688 的細胞存活率, 先前已有研究證實 Cisplatin 等現行的化療藥物也具有相似的特性 (Wang, G., et al., 2015)。

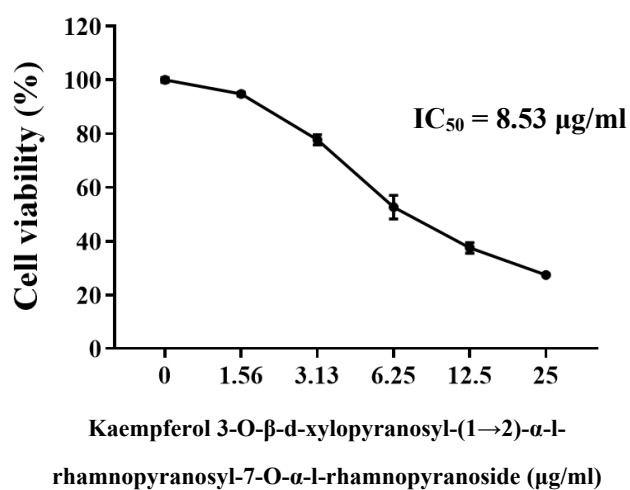
(九) 新型山奈酚糖苷衍伸物對人類正常細胞之生長影響。

接著我們希望了解 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對人類正常細胞的影響, 我們透過 MTT Assay 分析了 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對人類正常肺上皮細胞 BEAS-2B 的生長存活影響 (圖十六), 並發現 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 和對人類小細胞肺癌細胞的毒殺效果相比此新型山奈酚衍伸物對人類正常費上皮細胞的毒殺效果較小。

Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside ($\mu\text{g/ml}$)

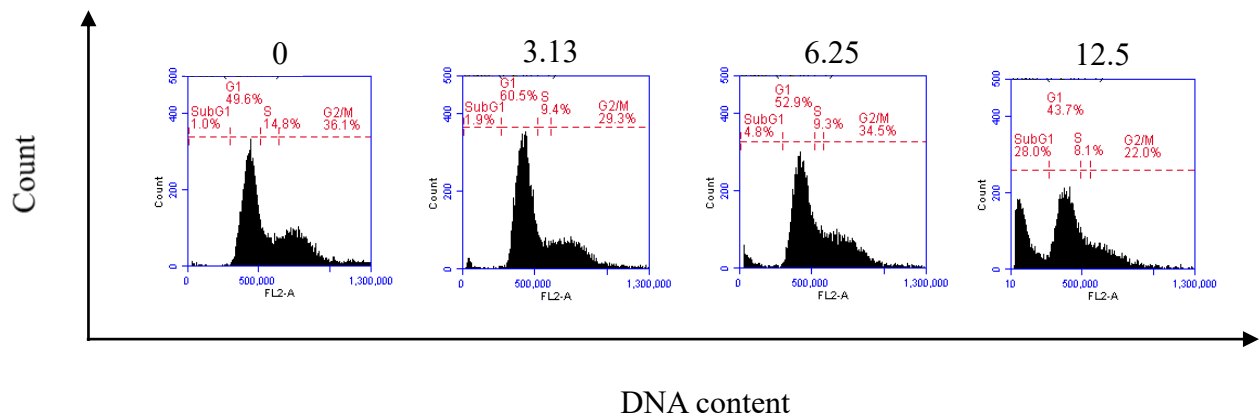


圖一、H1688 細胞在經過不同濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理 24 小時後顯微鏡下細胞型態的變化，放大倍率 100 倍。



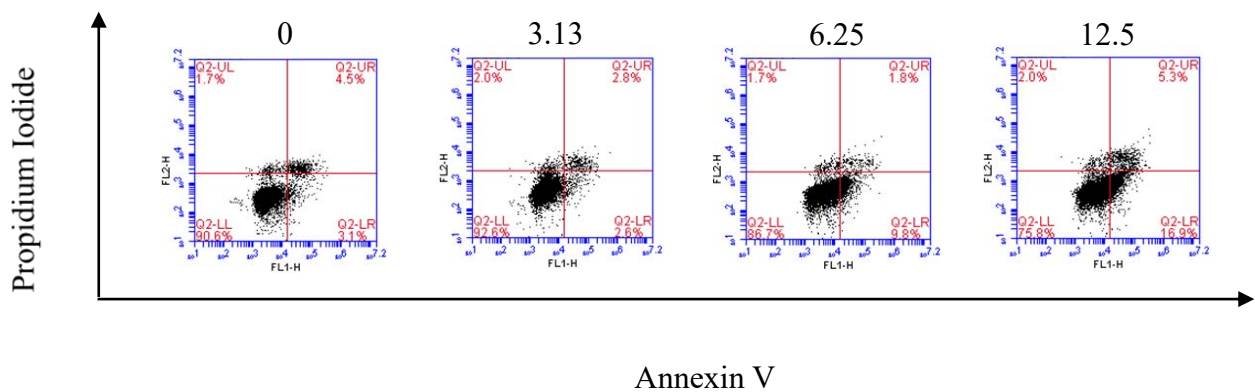
圖二、H1688 細胞在經過藥物處理後，細胞存活率的下降情形。

Kaempferol 3-O-β-d-xylopyranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-7-O-α-l-rhamnopyranoside (μg/ml)

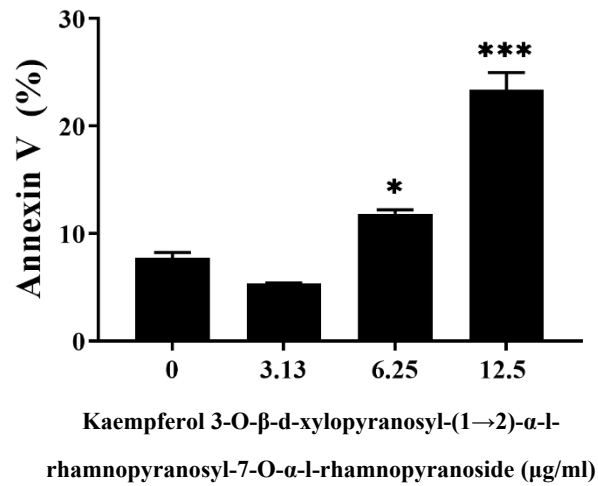


圖三、H1688 細胞在經過 kaempferol 3-O-β-d-xylopyranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-7-O-α-l-rhamnopyranoside 處理後停留在 sub G1 的細胞數隨著濃度上升而增加

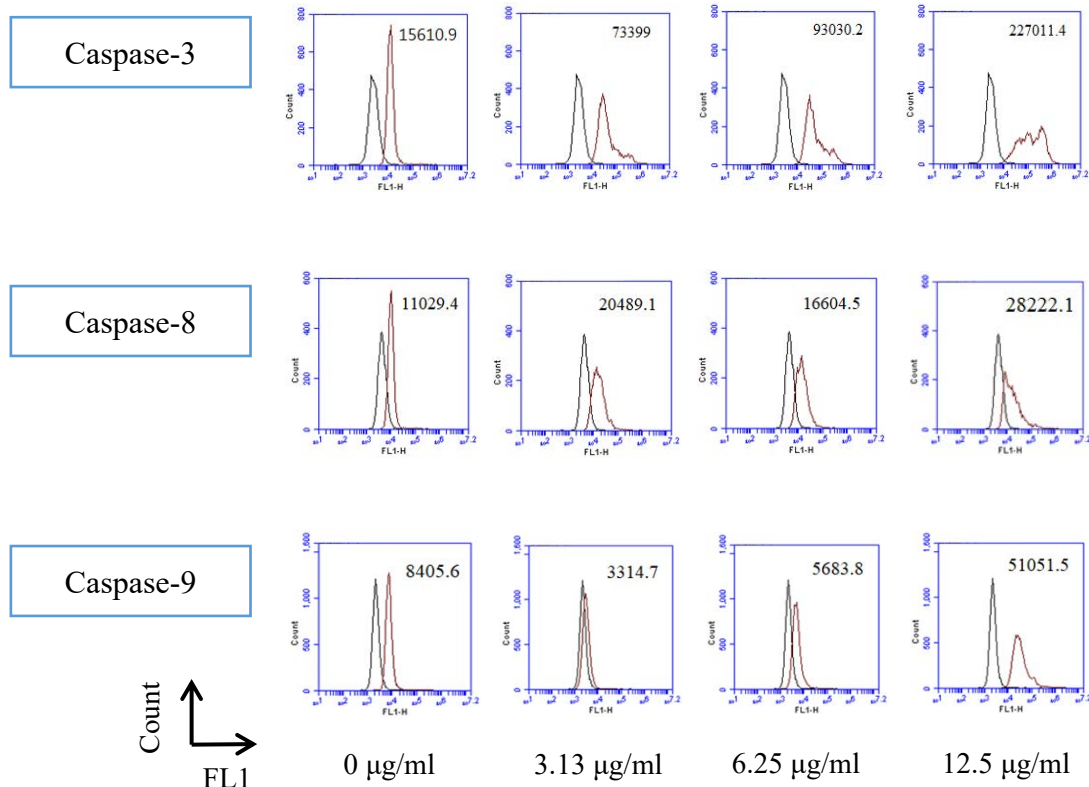
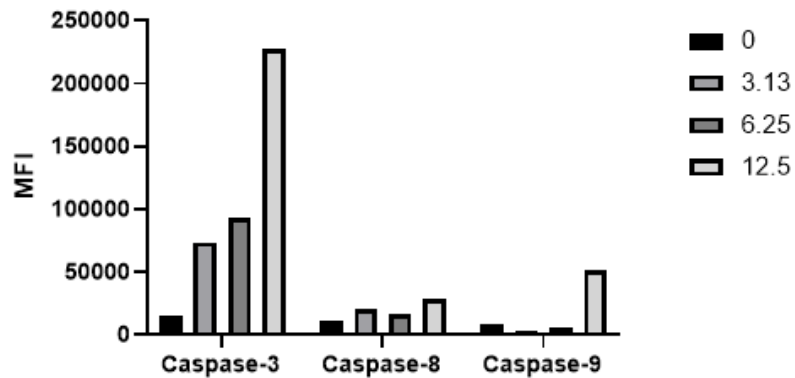
Kaempferol 3-O-β-d-xylopyranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-7-O-α-l-rhamnopyranoside (μg/ml)



圖四、H1688 細胞在經過不同濃度 kaempferol 3-O-β-d-xylopyranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-7-O-α-l-rhamnopyranoside 處理後的細胞凋亡情形。FL1:Annexin V-FITC; FL2: PI。

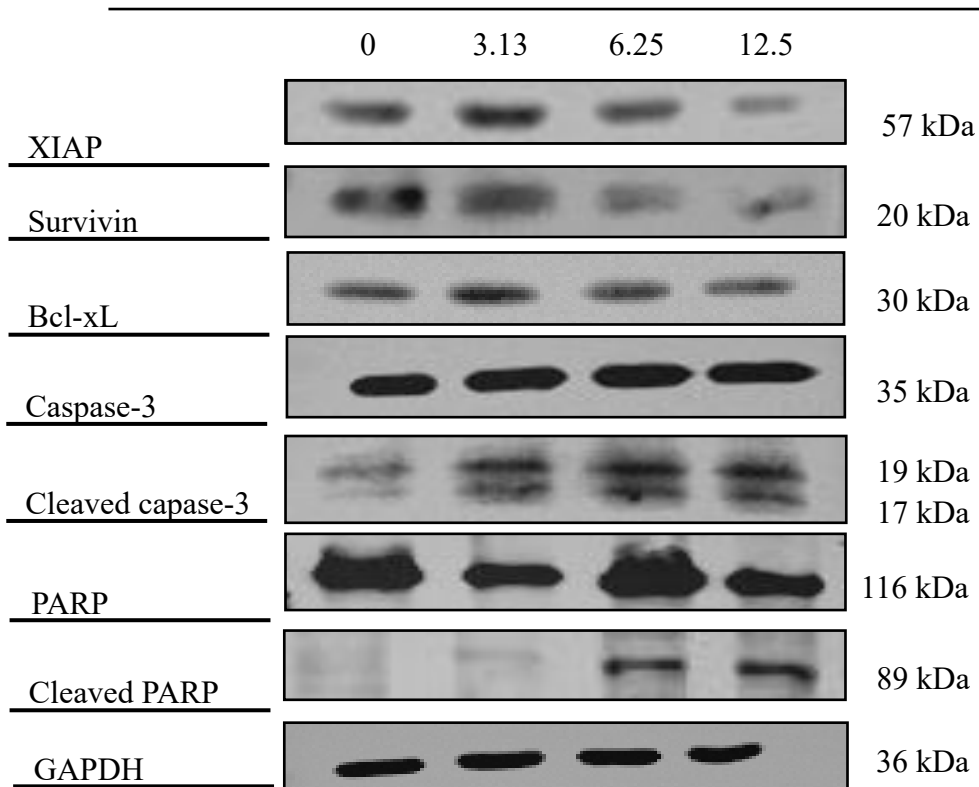


圖五、量化 H1688 細胞在經過 kaempferol 3-O-β-d-xylopyranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-7-O-α-l-rhamnopyranoside 處理後的細胞凋亡情形。(以 One-way ANOVA 分析，並以 Dunnett's test 比較各實驗組與對照組之間的差異。*P<0.05; *** P<0.0001)。

AKaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside (μ g/ml)**B**

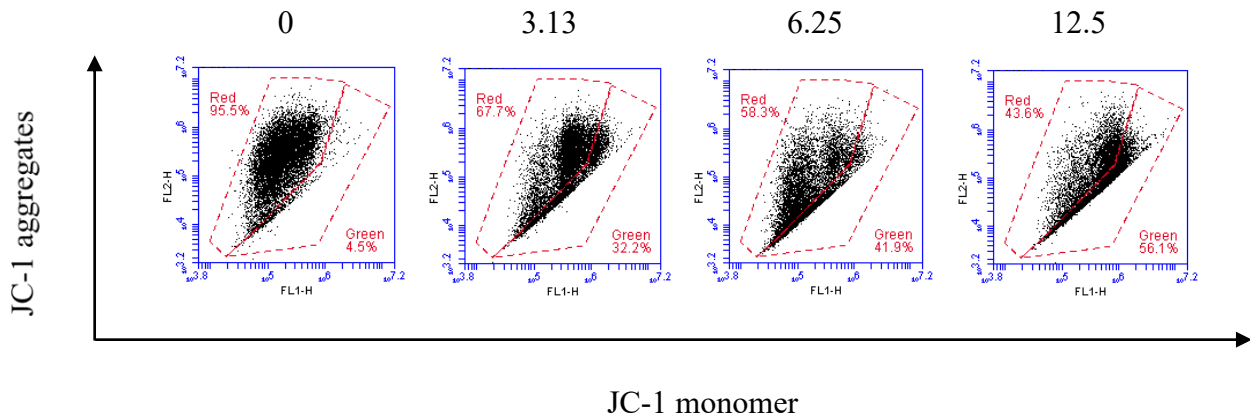
圖六、H1688 細胞在經過不同濃度的 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後 caspase -3、-8、-9 的表現情形。

Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside (μ g/ml)

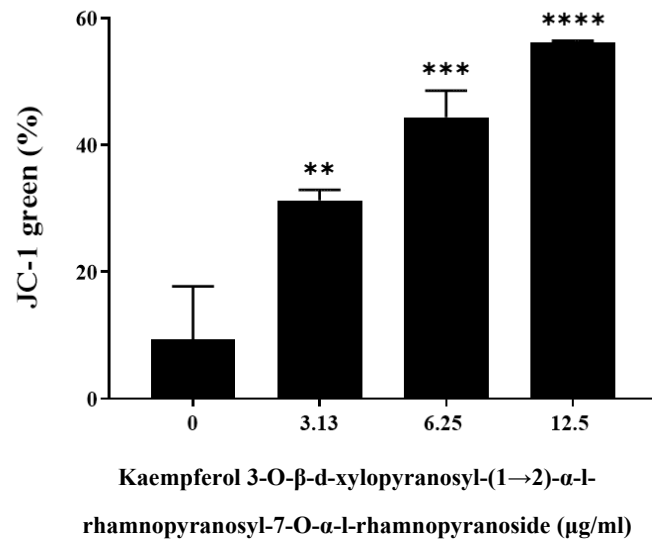


圖七、H1688 細胞在經過不同濃度 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後，內源性細胞凋亡相關蛋白表現情形。

Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside ($\mu\text{g/ml}$)

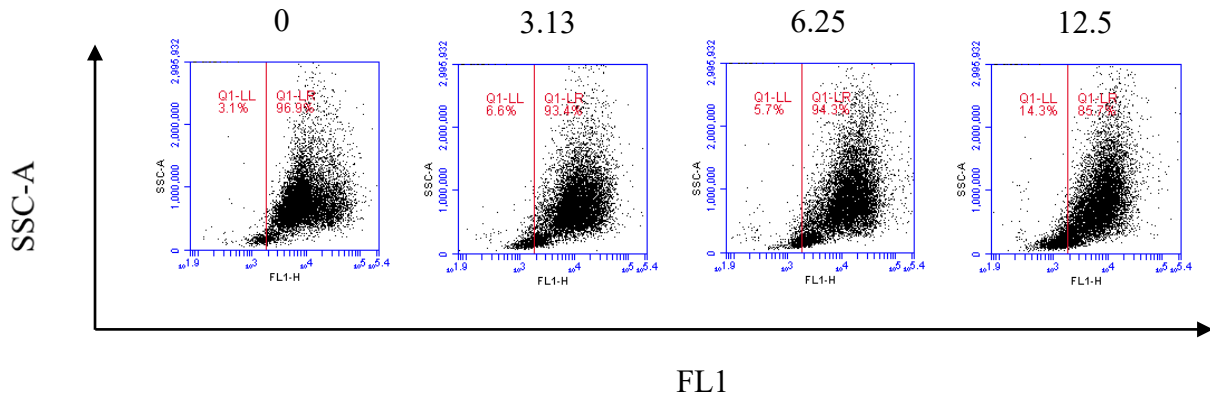


圖九、H1688 細胞在經過不同濃度 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後，以 JC-1 染劑觀察粒線體膜電位改變，綠色螢光訊號增加。

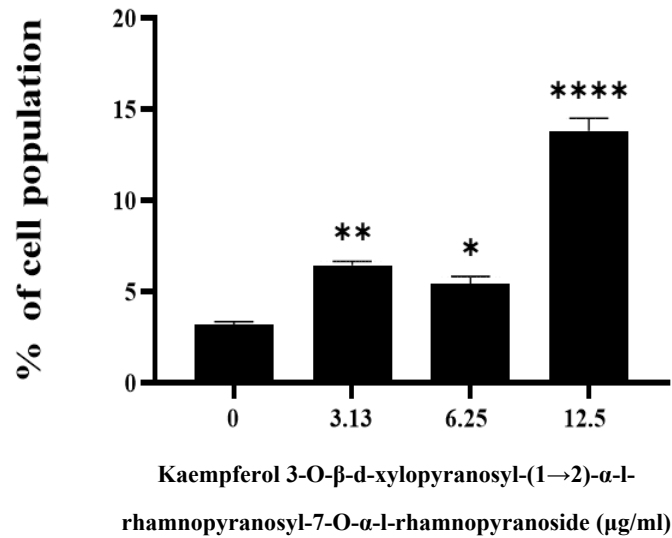


圖十、H1688 細胞在經過不同濃度 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後，JC-1 染劑變成單體的數目隨濃度增加。
(以 One-way ANOVA 分析，並以 Dunnett's test 比較各實驗組與對照組之間的差異。
P<0.001; * P<0.0001; **** P<0.00001)

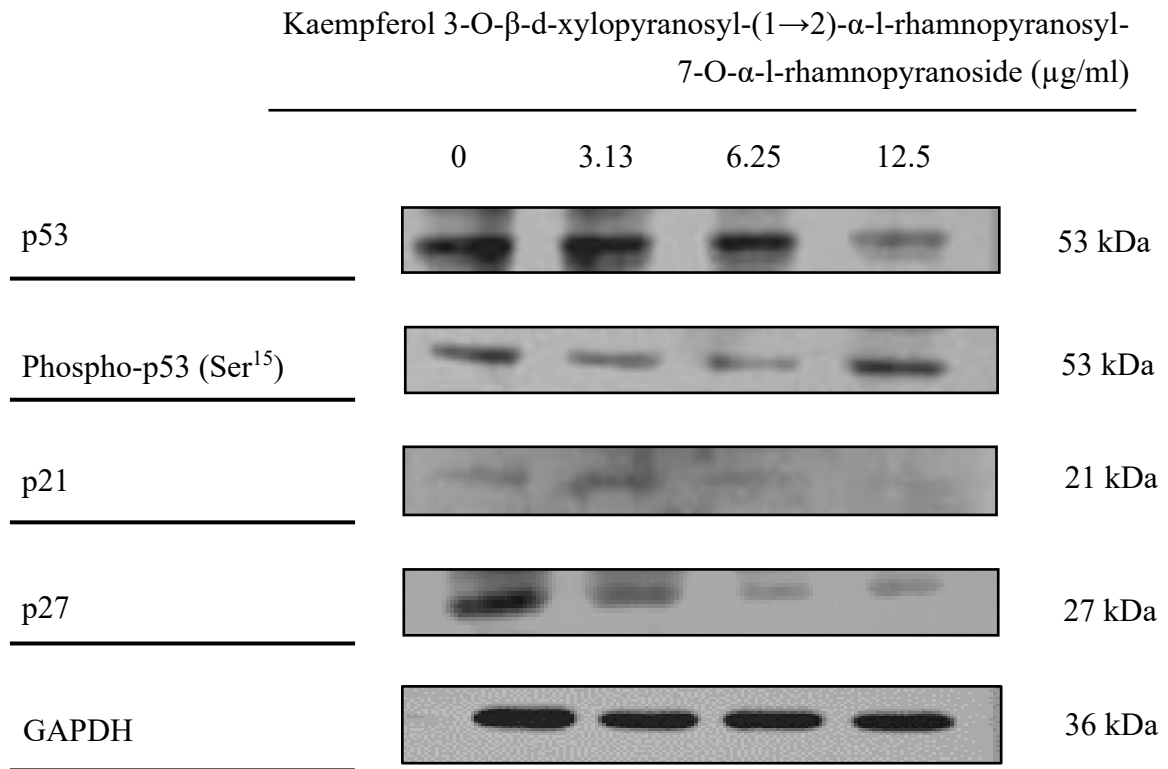
Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside (μ g/ml)



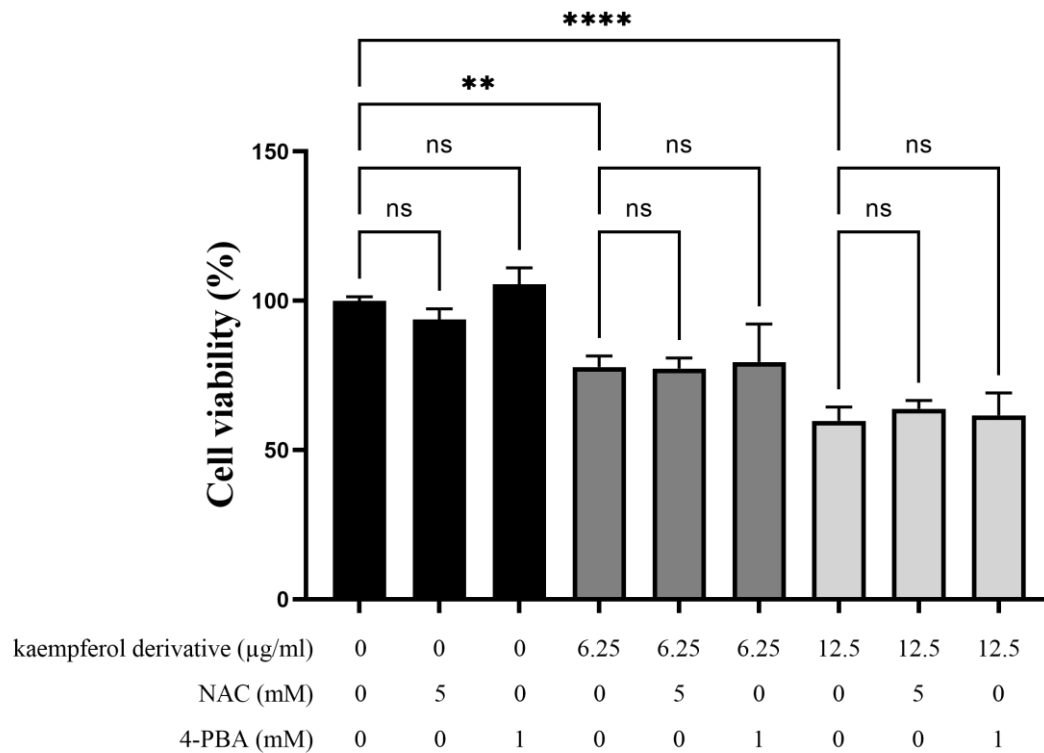
圖十一、H1688 細胞在經過不同濃度 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranosid 處理後，cytochrome c 釋放至細胞質的情形。



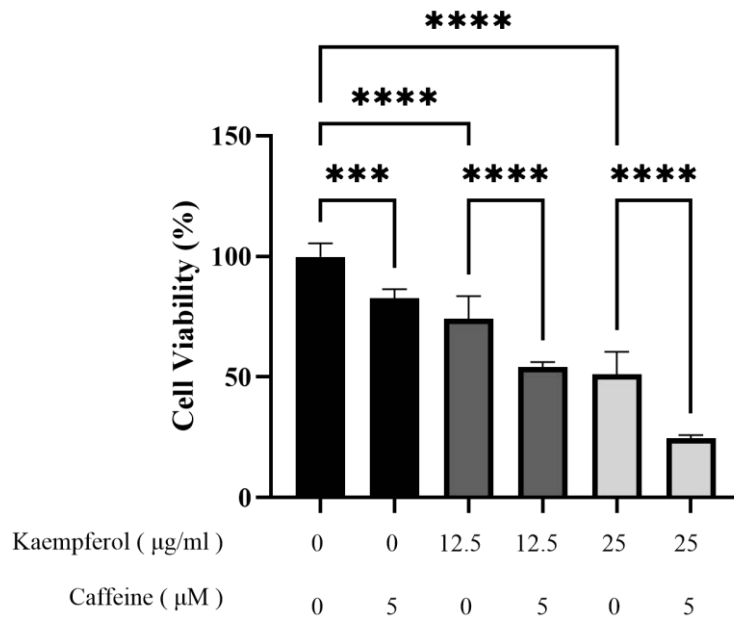
圖十二、量化 H1688 細胞在經過不同濃度 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後，cytochrome c 釋放至細胞質的情形。(以 One-way ANOVA 分析，並以 Dunnett's test 比較各實驗組與對照組之間的差異。*P<0.05; **P<0.001; **** P<0.00001)



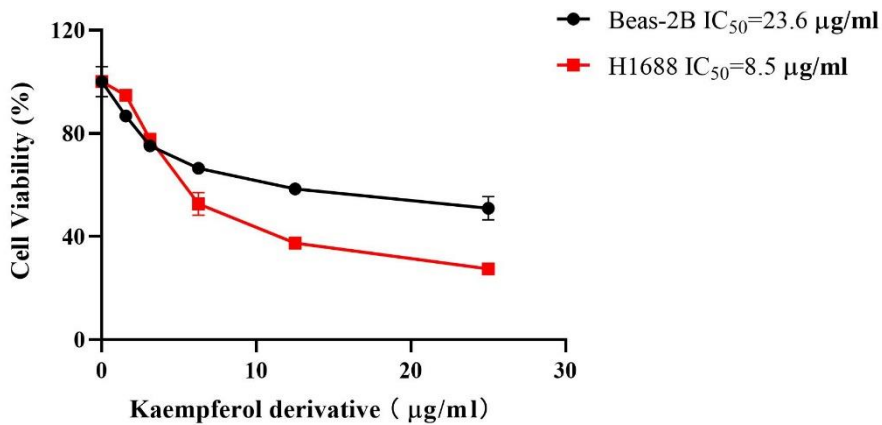
圖十三、H1688 細胞在經過不同濃度 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 處理後細胞週期調控相關蛋白與 p53 蛋白磷酸化的情形。



圖十四、H1688 細胞在經過 5 mM NAC 和 1 mM 4-PBA 預先處理一小時後加入不同濃度 kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside (μ g/ml) 其細胞存活率的變化。(以 One-way ANOVA 分析，並以 Tukey test 比較各實驗組與對照組之間的差異。ns $P > 0.5$; ** $P < 0.001$; **** $P < 0.00001$)



圖十五、H1688 細胞在經過 5 µM Caffeine 預先處理一小時以後再加入不同濃度的 kaempferol 3-O-β-d-xylopyranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-7-O-α-l-rhamnopyranoside 後細胞存活率的變化。(以 One-way ANOVA 分析，並以 Tukey test 比較各實驗組與對照組之間的差異。***P<0.0001; **** P<0.00001)

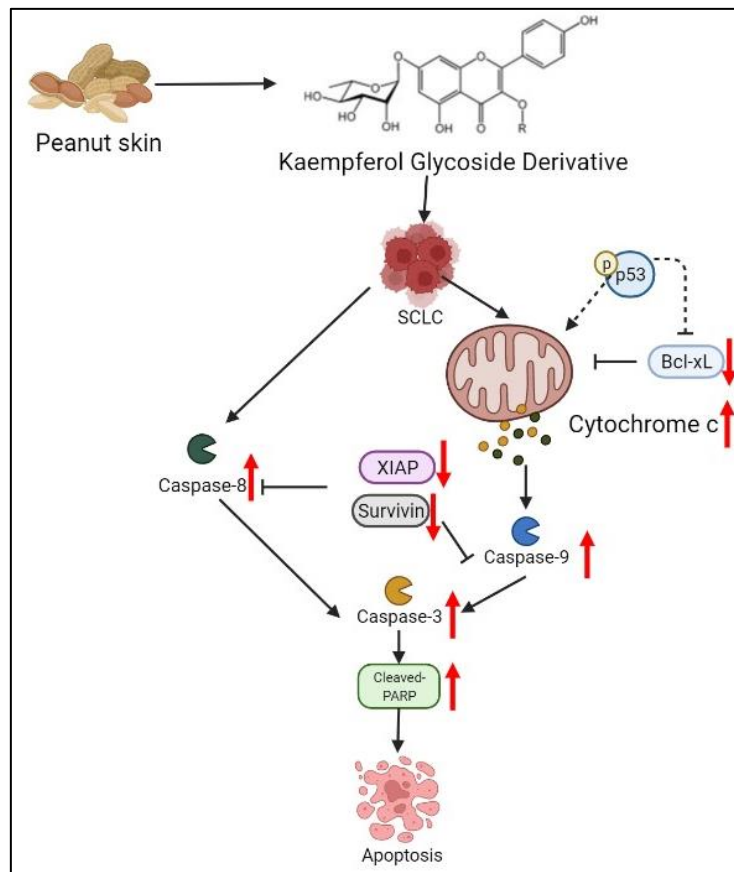


圖十六、Kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 → 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對正常上皮細胞的生長存活影響。

四、結論與應用

本研究首度證實從花生膜萃取的新型山奈酚衍伸物 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 對小細胞肺癌 H1688 有生長抑制的作用，且透過 Annexin V 染色得知此藥物能使細胞週期停滯在 sub G1 進一步誘導細胞凋亡，透過西方墨點法得知凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 和 XIAP 以及 c-PARP、caspase-3 和-9 的蛋白表達隨著 kaempferol 3-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-rhamnopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside 的濃度升高而增進，抗凋亡蛋白 Survivin 表達量則相反，同時我們也發現山奈酚衍伸物會造成粒線體膜電位下降以及 cytochrome c 釋放。進而確認其凋亡機制是細胞凋亡酶依賴性細胞凋亡 (caspase-dependent pathway) 且能透過內源性途徑誘導細胞凋亡，我們透過加入 ROS 抑制劑 NAC 以及 ER Stress 抑制劑 4-PBA 的結果初步排除此兩種途徑。此外此藥物與許多現行的化療藥物相同，在合併 Caffeine 後能夠顯著的增加藥物功效。本研究結果顯示了山奈酚衍伸物的良好抗癌活性以及其與現行化療藥物的相似性質，期望未來以本研究結果進行延伸，完整的了解其作用機轉並進一步分析體內抗癌功效，為小細胞肺癌的治療增添可能。

機制圖



五、參考文獻

1. World Health Organization. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all.
2. AL-Azawi, A. H., Salih, W. Y., & Hassan, Z. H. (2017). Phytochemical and Antioxidant Activity of (*Arachis hypogaea* L.) Skin Extract Scultiv Atedin Iraq. *Research J Pharm and Tech*, 10(11), 1994-2000.
3. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1-17.
4. Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer letters*, 247(1), 26-39.
5. Chang, C. C., Hsu, H. F., Huang, K. H., Wu, J. M., Kuo, S. M., Ling, X. H., & Houng, J. Y. (2014). Anti-proliferative effects of *Siegesbeckia orientalis* ethanol extract on human endometrial RL-95 cancer cells. *Molecules*, 19(12), 19980-19994.
6. Chuwa, A. H., Sone, K., Oda, K., Tanikawa, M., Kukita, A., Kojima, M., Oki, S., Fukuda, T., Takeuchi, M., Miyasaka, A., Kashiyama, T., Ikeda, Y., Nagasaka, K., Mori-Uchino, M., Matsumoto, Y., Wada-Hiraike, O., Kuramoto, H., Kawana, K., Osuga, Y., & Fujii, T. (2018). Kaempferol, a natural dietary flavonoid, suppresses 17 β -estradiol-induced survivin expression and causes apoptotic cell death in endometrial cancer. *Oncology letters*, 16(5), 6195–6201.
7. Cortez, D. (2003). Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM-and Rad3-related (ATR) protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37139-37145.
8. Deprez, S., Mila, I., Huneau, J. F., Tome, D., & Scalbert, A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxidants and redox signaling*, 3(6), 957-967.
9. Domvri, K., Zarogoulidis, K., Zogas, N., Zarogoulidis, P., Petanidis, S., Porpodis, K., Kioseoglou, E., & Hohenforst-Schmidt, W. (2017). Potential synergistic effect of phosphodiesterase inhibitors with chemotherapy in lung cancer. *Journal of Cancer*, 8(18), 3648–3656.
10. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1423-1433.
11. Hargrove, J. L., Greenspan, P., Hartle, D. K., & Dowd, C. (2011). Inhibition of aromatase and α -amylase by flavonoids and proanthocyanidins from *Sorghum bicolor* bran extracts. *Journal of medicinal food*, 14(7-8), 799-807.11
12. He, Z., Ma, W. Y., Hashimoto, T., Bode, A. M., Yang, C. S., & Dong, Z. (2003). Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer research*, 63(15), 4396-4401.
13. Huang, W. W., Tsai, S. C., Peng, S. F., Lin, M. W., Chiang, J. H., Chiu, Y. J., Fushiya, S., Tseng, M. T., & Yang, J. S. (2013). Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human

hepatic cancer cells. *International journal of oncology*, 42(6), 2069–2077.

14. Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

15. Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A., Shahbaz, M., Tsouh Fokou, P. V., Umair Arshad, M., Khan, H., Guerreiro, S. G., Martins, N., & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(12), 2277.

16. Kim, S. H., & Choi, K. C. (2013). Anti-cancer effect and underlying mechanism (s) of kaempferol, a phytoestrogen, on the regulation of apoptosis in diverse cancer cell models. *Toxicological research*, 29(4), 229-234.

17. Lakin, N. D., & Jackson, S. P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 18(53), 7644-7655.

18. Lin, H. Y., & Chang, S. T. (2012). Kaempferol glycosides from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum* and their nitric oxide production inhibitory activities. *Carbohydrate research*, 364, 49-53.

19. Lin, W. C., Chuang, Y. C., Chang, Y. S., Lai, M. D., Teng, Y. N., Su, I. J., Wang, C. C., Lee, K. H., & Hung, J. H. (2012). Endoplasmic reticulum stress stimulates p53 expression through NF- κ B activation. *PloS one*, 7(7), e39120.

20. Liu, B., Chen, Y., & Clair, D. K. S. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(8), 1529-1535.

21. Malhotra, U., Zaidi, A. H., Kosovec, J. E., Kasi, P. M., Komatsu, Y., Rotoloni, C. L., Davison, J. M., R, C., Irvin, Hoppo, T., Nason, K. S., Kelly, L. A., Gibson, M. K., & Jobe, B. A. (2013). Prognostic value and targeted inhibition of survivin expression in esophageal adenocarcinoma and cancer-adjacent squamous epithelium. *PloS one*, 8(11), e78343.

22. McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008656.

23. Orbán, C., Vászárhelyi, Z., Bajnok, A., Sava, F., & Toldi, G. (2018). Effects of caffeine and phosphodiesterase inhibitors on activation of neonatal T lymphocytes. *Immunobiology*, 223(11), 627-633.

24. Oze, I., Hotta, K., Kiura, K., Ochi, N., Takigawa, N., Fujiwara, Y., Tabata, M., & Tanimoto, M. (2009). Twenty-seven years of phase III trials for patients with extensive disease small-cell lung cancer: disappointing results. *PloS one*, 4(11), e7835.

25. Perier, C., & Vila, M. (2012). Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(2), a009332.

26. Plesca, D., Mazumder, S., & Almasan, A. (2008). DNA damage response and apoptosis. *Methods in enzymology*, 446, 107–122.

27. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(1), 9-29.

28. Tamura, T., Inoue, N., Ozawa, M., Shimizu-Ibuka, A., Arai, S., Abe, N., Koshino, H., & Mura, K.

- (2013). Peanut-skin polyphenols, procyanidin A1 and epicatechin-(4 β \rightarrow 6)-epicatechin-(2 β \rightarrow O \rightarrow 7, 4 β \rightarrow 8)-catechin, exert cholesterol micelle-degrading activity in vitro. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(6), 1306–1309.
29. Tsui, K. C., Chiang, T. H., Wang, J. S., Lin, L. J., Chao, W. C., Chen, B. H., & Lu, J. F. (2014). Flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* exhibit differential induction of cell cycle arrest in H460 and A549 cancer cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 17663–17681.
30. Van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A., & De Ruyscher, D. K. (2011). Small-cell lung cancer. *The Lancet*, 378(9804), 1741-1755.
31. Wang, G., Bhoopalan, V., Wang, D., Wang, L., & Xu, X. (2015). The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *Experimental hematology & oncology*, 4(1), 1-9.
32. Wang, S., Tang, J., Sun, T., Zheng, X., Li, J., Sun, H., Zhou, X., Zhou, C., Zhang, H., Cheng, Z., Ma, H., & Sun, H. (2017). Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages. *Scientific reports*, 7(1), 1339.
33. William, W. N., & Glisson, B. S. (2011). Novel strategies for the treatment of small-cell lung carcinoma. *Nature reviews Clinical oncology*, 8(10), 611-619.
34. Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288-293.
35. 細胞計數公式來源：
<http://scholar.fju.edu.tw/%E8%AA%B2%E7%A8%8B%E5%A4%A7%E7%B6%B1/upload/012098/content/981/D-5413-04191-.pdf>

【評語】 090001

1. 標準的疾病模式的藥物篩選主題。針對研究主題的背景討論清楚且切入主題。不過針對藥物篩選相關主題最為重要的正常細胞的藥物處理實驗的實驗結果解讀與實驗結果 (圖 16) 有差距，若無法在後續對此部分作出更多討論是較為可惜的部分。
2. 此外，該藥物的名稱過長，建議使用縮寫取代，使內容較好閱讀
3. Phospho-p53 的數據需要再重複
4. 5 uM Caffeine 有毒殺的效果需要再確認
5. 毒殺的機制需要再深入探討
6. 已經有相關的論文發表如下，應參考。

Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells

Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK