嘉南藥理科技大學 藥物科技研究所

碩士論文

Tyloxapol 與各種細胞之交互作用

Intracellular responses in various cells treated with tyloxapol

指導教授:郭 榮 華 博士

研究生:曾若雯

中華民國九十七年七月二十五日

嘉南藥理科技大學藥物科技研究所

Department of Pharmaceutical Science Chia-Nan University of Pharmacy and Science

碩士論文

Thesis for the Degree of Master

Tyloxapol 與各種細胞之交互作用

Intracellular responses in various cells treated with tyloxapol

指導教授:郭榮華博士(Dr. Jung-Hua Kuo)

研究生:曾若雯(Jo-Wen Tseng)

中華民國九十七年七月二十五日

25, July 2008

本校	物科技研究所 碩士班	<u>曾若雯</u>	君
Intracellul	ar responses in various cell	s treated with t	<u>yloxapol</u>
合於碩士	資格水準,業經本委員會	評審認可。	
			高剧体
考試委員	: 詹明修博士	研究所 剧教授	/= "N" }
	黄秀琴博士		夏まべ
	嘉南藥理科技大學 藥物科技	研究所 副教授	郭紫
振道。	嘉南蔡理科技大学 藥物科技码	F究所 教授	
金土仁(D 14	
示主任 ()	カスノ・	-	
	中華民國 九十七	年七月	n let and national

本授	灌書所授權之論文全文電子檔案,為本人於嘉南藥理科技大學,撰寫之碩士 論文。(以下調擇一勾澤)
	同意立即開放
	同意一年後開放,原因是:
躢	同意二年後開放,原因是:
	同意三年後開放,原因是:
性質;	之線上檢索、閱覽、下載或列印。
性質;	之線上檢索、閱覽、下載或列印。
研究	生簽名: 了了了了。
論文	名稱:Tyloxapol 與各種細胞之交互作用
指導	教授: <u> </u>
系所	: ـــــــــــــــــــــــــــــــ
	: <u>G9522003</u>
學號	

備註:

- 1. 本授權書請填寫並以黑色筆親筆簽名後,裝訂於各紙本論文封面後之次頁。
- 2. 讀者基於非個人營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文,應依著 作權法有關規定辦理。

誌謝

兩年的研究所生活,一轉眼已結束了,即將離開校園生活,成為社會新鮮 人,心中充滿惶恐。經歷兩年的磨鍊,不但提升了自己的邏輯思考能力, 也讓實驗設計與技巧更加熟練,同時也讓自己在待人處事上更加圓融。感 謝<u>郭榮華</u>教授的悉心指導,從當專題生到研究生經過一系列的訓練,讓我 對生物技術有更深一層的認識,並感謝<u>詹明修</u>老師與<u>黃秀琴</u>老師對本論文 的指導,讓我能即時修正錯誤,使本論文更加完善。

同時也感謝所辦的<u>馨茹</u>,辛苦地幫我們辦理瑣事,謝謝妳總是收留到處飄 盪的我,陪我一起聊心事一起耍笨,常在我心情低落時安慰我鼓勵我。還 有,感謝<u>文君</u>不厭其煩的教我使用sigma軟體,讓我能順利的完成論文中統 計圖形。接下來,要感謝<u>祐塘</u>在我生病時開車送我去醫院,以及<u>麗雅</u>總是 提醒迷糊的我該注意的事情。感謝學弟阿丸、佳緯、建雄的協助,讓我能 在實驗上更得心應手,接下來就靠你們一起加油囉。感謝生技中心提供儀 器讓我能順利完成實驗。

最後,我要感謝一路支持陪伴我的家人,謝謝你們提供我一切生活所需, 讓我能無後顧之憂地順利完成學業,還有,感謝常陪伴我晚上做實驗及熬 夜趕論文的肥仔,謝謝你的陪伴與支持。

I

中文摘要

Tyloxapol被報導可以用來預防巨噬細胞受內毒素引發刺激活化作用,但對 於Tyloxapol與巨噬細胞所產生的細胞內反應卻沒有完整的研究,因此在我 們的研究中將探討巨噬細胞與tyloxapol作用後,所引發的各種細胞內反應, 以及tyloxapol對受內毒素刺激活化之巨噬細胞的抗氧化作用。我們利用流式 細胞儀來測定細胞內之變化,包括:ROS的含量、粒線體膜電位的變化、 細胞大小與複雜度、及分析細胞週期,同時也偵測tyloxapol對由內毒素引發 活化之巨噬細胞所產生的抗氧化作用。結果顯示細胞內H2O2含量,隨著 tyloxapol劑量增加而下降,而細胞內 O_2^- 含量隨著tyloxapol劑量增加而漸漸 上升,另外tyloxapol也會使粒線體膜電位呈現不穩定狀態,在tyloxapol為高 劑量且培養時間為4小時,tyloxapol更會引發細胞產生凋亡作用。當tyloxapol 爲低劑量且培養時間小於2小時,tyloxapol才能對細胞產生抗氧化作用。在 tyloxapol為低劑量時,巨噬細胞內 O_2^- 及 H_2O_2 之變化量可回復至與沒有加入 tyloxapol之巨噬細胞相當狀態。我們同時也研究加入tyloxapol之Hela子宮頸 癌細胞之細胞內各種變化情形,以便了解tyloxapol產生之效應是否僅針對特 定細胞。我們的研究可促使更了解tyloxapol界面活性劑對各種細胞之分子作 用機轉。

Abstract

Tyloxapol is reported to prevent macrophages from reacting to endotoxin. However, the intracellular responses that tyloxapol induces in macrophages are still not fully explored. Hence, the objective of this study was to evaluate the intracellular events in macrophages treated with tyloxapol and assess the antioxidant properties of tyloxapol in endotoxin-activated macrophages. Using flow cytometry, we examined intracellular responses in macrophages: reactive oxygen species (ROS) content, mitochondria membrane potential, and cell cycle profiles.We also assessed the antioxidant properties of tyloxapol in endotoxin-activated macrophages. Kinetic hydrogen peroxide production tended to decline with increasing doses. Tyloxapol produced a progressive increase followed by a decline in superoxide anion production in macrophages with increasing doses. Tyloxapol also caused unstable fluctuations in mitochondrial membrane potential. Apoptosis had developed at higher doses after 4 h of incubation time. After 2 h of tyloxapol-pretreatment, tyloxapol acted as an antioxidant only at lower doses. Most tyloxapol-pretreated cells at lower doses fully recovered from the changes in superoxide anion and hydrogen peroxide production. We also investigate the intracellular events in Hela cell to evaluate cell-dependent properties induced by tyloxapol.Our findings contribute to a better understanding of the molecular action of tyloxapol in various cells such as macrophages and cancer cells.

目錄

誌謝	I
中文摘要	II
英文摘要	Ш
目錄	IV
圖目錄	VI
附圖目錄	VIII
縮寫表	IX
1. 緒論	1
1.1 Tyloxapol	1
1.1.2 Tyloxapol 的應用	1
1.1.3 Tyloxapol 對細胞間的毒性作用	3
1.2 細胞凋亡(apoptosis)	4
1.2.1 細胞週期(cell cycle)	4
1.3 活化性氧分子	5
1.4 抗氧化劑N-acetyl-L-cysteine	6
1.5 NADPH氧化酶抑制劑 Diphenyleneiodonium	6
1.6 研究動機	7
第二章 材料與方法	8

2.1 〕	實驗藥品與材料
2.2 〕	實驗儀器9
2.3 〕	實驗製備與方法10
2.3.1	配製 Tyloxapol10
2.3.2	PI 的製備10
2.3.3	細胞保存液配製10
2.3.4	細胞培養11
2.4 着	田胞毒性測試13
2.5 着	田胞型態觀察14
2.6 }	充式細胞儀14
2.6.1	細胞內粒線體 ROS 含量測定15
2.6.2	粒線體膜電位的測定17
2.6.3	細胞大小與細胞內胞器複雜度測定18
2.6.4	細胞週期分析18
2.6.5	檢測 Tyloxapol 對受 LPS 刺激後的 U937 細胞產生的抗氧化作
用	
2.6.6	檢測Tyloxapol對U937細胞內H2O2的影響是否爲可逆性21
2.6.7	檢測Tyloxapol對U937細胞內 O_2 的影響是否為可逆性22
2.6.8	檢測NAC或DPI是否可以引起Hela細胞的抗氧化作用23

第三章 結果	
3.1 細胞毒性測試	25
3.2 細胞內粒線體 ROS 含量測定	26
3.3 粒線體膜電位的測定	28
3.4 細胞大小與細胞內胞器複雜度測定	29
3.5 細胞週期分析	30
3.6 Tyloxapol對受LPS刺激後的U937細胞產生的抗氧化作用	31
3.7 Tyloxapol對U937細胞內 H_2O_2 與 O_2 的影響是否為可逆性	
3.8 NAC或DPI是否可以引起Hela細胞的抗氧化作用	
第四章 討論	
第五章 結論	36
參考文獻	

圖目錄

圖一、U-937 細胞與 tyloxapol 作用後之細胞存活率	44
圖二、Hela細胞與tyloxapol作用後之細胞存活率	45
圖三、U-937細胞與tyloxapol作用後之細胞內H2O2變化	46
圖四、U-937 細胞與tyloxapol作用後之細胞內O₂⁻變化	47
圖五、Hela細胞與tyloxapol作用後之細胞內H2O2變化	48
圖六、Hela細胞與tyloxapol作用後之細胞內O₂¯變化	49
圖七、U-937細胞與 tyloxapol 作用後之粒線體膜電位變化	50
圖八、Hela細胞與tyloxapol作用後之粒線體膜電位變化	51
圖九、U-937 細胞與 tyloxapol 作用後之細胞大小與複雜度變化	53
圖十、Hela細胞與tyloxapol作用後之細胞大小與複雜度變化	55
圖十一、U937細胞與tyloxapol作用後細胞週期分析	57
圖十二、Hela細胞與tyloxapol作用後細胞週期分析	62
圖十三、Hela細胞與tyloxapol作用後細胞產生凋亡作用	63
圖十四、Tyloxapol對受LPS刺激後之U937細胞產生抗氧化作用	64
圖十五、Tyloxapol對受LPS刺激後之U937細胞產生抗氧化作用	65
圖十六、Tyloxapol與U-937細胞作用產生ROS變化的可逆性	66
圖十七、Tyloxapol與U-937細胞作用產生ROS變化的可逆性	67
圖十八、NAC對對Hela細胞的抗氧化作用	68

圖十九、DPI對Hela細胞的抗氧化作用	
----------------------	--

附圖目錄

附圖一、Tyloxapol 結構式	70
附圖二、活性氧分子(ROS)在細胞內的轉變與對細胞的傷害	70
附圖三、Cell-counting kit-8 測細胞存活率之化學反應與結構式	71
附圖四、細胞毒性測試之實驗步驟	71
附圖五、DCFH-DA 螢光染劑之作用原理	72
附圖六、檢測H2O2的變化之實驗步驟	72
附圖七、HE 螢光染劑之作用原理	73
附圖八、檢測 O_2 的變化之實驗步驟	73
附圖九、R123 螢光染劑之結構式	74
附圖十、粒線體膜電位的測定之實驗步驟	74
附圖十一、細胞大小與細胞內胞器複雜度測定	75
附圖十二、細胞週期之流式細胞儀分析圖	75
附圖十三、細胞週期分析之實驗步驟	76
附圖十四、Tyloxapol 對受 LPS 刺激後的 U937 細胞產生抗氧化作用。	と實驗
步驟	77

縮寫表

- 1. DCFH-DA : Dichlorofluorescin diacetate
- 2. DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- 3. DCF : 2'-7'-dichlorofluorescein
- 4. FBS : Fetal bovine serum
- 5. HE : Hydroethidine
- 6. H_2O_2 : Hydrogen peroxide
- 7. O_2^- : Superoxide anion
- 8. PI : Propidium iodide
- 9. PBS : Phosphate buffered saline
- 10. R-123 : Rhodamine
- 11. RPMI : Roswell Park Memorial Institute
- 12. ROS : Reavtive oxygen species
- 13. NAC : N-acetyl-L-cysteine
- 14. DPI : Diphenyleneiodonium

第一章 緒論

1.1 Tyloxapol [1,2]

Tyloxapol (又稱為 Triton WR-1339),它是在 1948 年由 Rohm & Hass 公司獲得專利,這種高分子界面活性劑的平均分子量約為 5000Da。 Tyloxapol 是一種由 Triton X-100 所聚合而成的寡合物(oligomers)(附 圖一),屬於 gemini surfactants 一種。Tyloxapol 是一種非離子性的界 面活性劑。雖然 Tyloxapol 是由 Triton X-100 所聚合而成,但 Tyloxapol 的物理化學性質卻完全不同於 Triton X-100,例如: Tyloxapol 對於降 低表面張力的能力,遠大於 Triton X-100,而且 Tyloxapol 的臨界微胞 濃度 (Critical Micelle Concentration, CMC) 也遠比 Triton X-100 低, 再加上 Tyloxapol 的微黏度 (micro-viscosity) 高於 Triton X-100,因而 使得 Tyloxapol 所形成的 micelles 安定性較高。無論環境中鹽類是否 存在,Tyloxapol 皆比 Triton X-100 擁有較高的曇點 (cloud point, cp), 因此 Tyloxapol 的熱安定性會比 Triton X-100 高。

1.1.2 Tyloxapol 的應用

在日常生活中,Tyloxapol 可以被用來當作清潔劑,例如:清洗隱形眼鏡的去蛋白劑。治療肺部疾病時,可以當化痰藥 (mucolytic agent) [3,4],及人工肺部界面活性劑 (Exosurf) 的合成配方[5]。另外,因為

Tyloxapol 可以與血液中的脂蛋白 (如 HDL) 結合,所以當應用於靜脈 注射的劑型時, Tyloxapol 會取代 apoA-I 跟 HDL 的表面結合位置,進 而影響 HDL 之功能,例如:分解三酸甘油脂細胞表面的接受器;影 響膽固醇之輸送,並且阻礙內皮脂蛋白酶的作用,而導致異常的高脂 血症 (hyperlipemia),因此 Tyloxapol 可被用來當作 hyperlipidemic atherogenesis 的動物模式[6]。在動物模式中, Tyloxapol 可以有效地抑 制靜脈中由內毒素 (endotoxin) 所引發的肺部與全身性發炎免疫反 應,且在動物中並沒有嚴重的毒性副作用產生,這是因為 Tyloxapol 被實驗證實用於抑制巨噬細胞與細胞膜脂多醣 (LPS) 辨識接受器的 結合, 使得 LPS 無法進入細胞內, 並且抑制 CD2、CD4、 CD22 、 HLA-DR 等接受器相關之抗原與抗體的免疫反應,並且巨噬細胞的吞 噬作用 (phagocytosis) 不會受到影響[7,8]。在藥物劑型的設計上, Tyloxapol 亦被應用於自我乳化型的藥物傳輸系統 (self-emulsifying drug delivery system),例如:在 Paclitaxel 抗癌藥的配方中,加入 Tyloxapol 以期望能提高藥物的溶解度,並使其穩定性增加,同時也可 避免因 P-glycoprotein efflux pump (Pgp) 數量增加,而產生抗藥性作用 [9]。當面對懸浮性細胞 (Jurkat T 細胞) 時, Tyloxapol 也可以被用來 提高非病毒性載體 (non-viral vector; 陽離子性樹枝體 (cationic dendrimer)) 的轉染效率[10]。在 1970 年時, Tyloxapol 更被發現於動

2

物模式中,具有抗癌的效果,進一步研究後發現 Tyloxapol 可以防止 Lewis lung carcinoma, Ehrlich carcinoma, Sarcoma 180, Ascites tumors 之腫瘤細胞的擴散與轉移,而且在細胞的分子作用上,發現 Tyloxapol 在 T24 膀胱癌細胞 (bladder carcinoma cell lines)中,能有效地抑制細 胞的增生作用,Tyloxapol 會對一些重要的細胞生命週期的調控因子 (cyclin-dependent kinases (CDKs)),例如:cdk2,做向下調控 (down-regulation)的作用,因而使得細胞生長週期 (cell-cycle)停留 在 G1 時期,同時 Tyloxapol 也會增加細胞內 CDK 的抑制因子 P21、 P27 的基因表現,因此可以說 Tyloxapol 對調控癌細胞的生命週期有顯 著的影響[11]。

1.1.3 Tyloxapol 對細胞間的毒性作用

我們最近發現 Tyloxapol 新的細胞毒性作用機轉,我們用老鼠的巨噬 細胞 (macrophages) 及纖維母細胞 (NIH/3T3) 當作模式,發現 Tyloxapol 對這兩種細胞皆會造成細胞凋亡的現象,而其造成細胞凋亡 的作用機轉可能與細胞的 caspase- dependent 路徑有關。我們顛覆了以 往學者認為, Tyloxapol 對細胞產生的毒性,全是因為細胞壞死的觀 念,也提供 Tyloxapol 與細胞,在細胞內分子間作用方式更深一層的 啓發 [12]。

1.2 細胞凋亡(apoptosis)

細胞凋亡路徑與細胞內相關分子的作用機轉,在這幾年來被廣泛的研 究討論,細胞產生凋亡的過程是受程式化的調控而將細胞拆解,當細 胞老化或受到外來的刺激傷害,而產生基因突變時,細胞會進行自殺 性行為以避免造成遺傳突變[13,14]。當細胞產生凋亡作用時,細胞內 部的分子會發生許多改變,例如:DNA 片段化(DNA fragmentation)、 染色質濃縮(chromatin condensation)與粒線體崩解(disintegration of mitochondria),且細胞膜也會因凋亡作用產生變化,磷脂醯絲氨 酸(phosphatidylserine, PS) 會被暴露在細胞膜外[15,16],使巨噬細 胞加以辨認,進而將此細胞或細胞的凋亡體(apoptotic body)吞噬。 當細胞產生細胞凋亡時,並不會像細胞壞死(Necrosis) 般使細胞 膜破裂,將細胞內的胞器與細胞質釋放出來,因而開始產生發炎免疫 作用[17,18]。

1.2.1 細胞週期 (cell cycle) [19-21]

在真核生物中,細胞成長然後複製分裂成兩個子細胞的過程就是所謂的細胞週期(cell cycle),細胞的生長過程中主要可以分爲四個時期,在這過程中細胞內染色體的數目會隨著週期改變而不同,此四個週期分別為:

G1 phase (Gap 1): 細胞生長的時期,並且複製所需胞器及一些細胞

質的組成,提供下一階段複製染色體時使用。

S phase: DNA 複製的時期,也就是染色質複製。

G2 phase (Gap 2):細胞繼續生長。

M phase (mitosis): 有絲分裂期,細胞進行分裂的時期。

另外還有個 G0 phase,為細胞離開細胞週期並且停止分裂的時期。

1.3 活化性氧分子(reactive oxygen specise; ROS)(附圖二)

巨噬細胞是一種位於組織內的白血球,其源自於單核球細胞,而單核 球細胞又來自於骨髓。巨噬細胞與單核細胞皆為吞噬細胞,兩者在脊 椎動物體內會參與非特異性防禦作用(即是先天性免疫反應)和特異 性防禦作用(即是細胞免疫作用)。它們的主要功用是對細胞殘片及病 原體進行吞噬消化作用,及刺激活化淋巴球或其他免疫細胞,使其對 病原體作出反應。當巨噬細胞受到外來刺激時,會使細胞內部的ROS 含量產生變化[22],而細胞內部常見的ROS主要可以分為二種: superoxide anion (O₂)和 hydrogen peroxide (H₂O₂) [23]。ROS在引起 細胞凋亡時扮演很重要的角色,因為ROS會調控細胞的訊息傳遞與轉 錄系統。另外,ROS也會利用細胞內的抗氧化酶來調節細胞的氧化還 原狀態[24]。細胞內的粒線體(mitochondria)是細胞產生能量的主要 來源,也是細胞產生ROS的來源,同時它也是ROS主要的攻擊目標。 當細胞產生細胞凋亡時,會使粒線體的膜電位產生不穩定變化,細胞 內部ROS含量增加,細胞膜的通透性改變,及細胞開始釋放凋亡蛋白 (apoptotic protein)[25]。

1.4 抗氧化劑 N-acetyl-L-cysteine (NAC) [26-32]

N-acetyl-L-cysteine (NAC)是一種具有雙硫鍵的抗氧化劑,它不但可以清除氧的自由基,並可補充細胞內粒線體與胞液glutathione的儲存[22],NAC亦被證實具有清除活化的氧化物與氮化物(reactive oxygen species and reactive nitrogen species)的能力,此外,在體外試驗時,NAC可以藉由壓抑巨噬細胞與嗜中性白血球,減低內皮細胞的 通透性及淋巴球的附著力,及抑制發炎物質釋放例如:interleukin-8 而產生抗發炎作用。

1.5 NADPH 氧化酶 (Nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate-oxidase)抑制劑 Diphenyleneiodonium (DPI)[33-38] NADPH氧化酶是一種存在於細胞膜上具有多種調節功能的酶, NADPH氧化酶被證實爲引發嗜中性白血球與其它具吞噬作用白血球 免疫反應中主要的複合型酶,因爲引發這些免疫反應必須藉由ROS的 產生,而在吞噬細胞中NADPH氧化酶正是ROS產生時最主要的調控 因素,其作用機制如下:

NADPH + $2O_2 \longrightarrow \text{NADP}^+ + 2O_2^- + 2H^+$ $2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ $O_2^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 + OH^-$

當NADPH氧化酶成活化狀態時,DPI可與NADPH氧化酶產生非競爭 性的共價性鍵結,抑制NADPH氧化酶的作用,進而抑制ROS的產生。

1.6 研究動機

在之前的文獻中已有 Tyloxapol 毒性與其抗氧化作用的相關報導,但 Tyloxapol 與細胞作用時,所產生的細胞內分子變化,例如:細胞內 ROS 含量變化與粒線體膜電位的變化,卻無相關報導,因而引發我們 探討 Tyloxapol 與巨噬細胞 U937 作用時所產生的細胞內變化,另外我 們也選用人類子宮頸癌細胞 Hela 與 Tyloxapol 作用,比較兩種細胞間 對 Tyloxapol 所產生的變化趨勢。

第二章、材料與方法

2.1 實驗藥品與材料

- 1. Tyloxapol (Sigma , USA)
- 2. Cell counting kit-8 (Dojindo Laboratories , Japan)
- 3. Dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA; Sigma, USA)
- 4. Hydroethidine bromide (HE; Sigma, USA)
- 5. Rhodamine-123 (R123; Sigma, USA)
- 6. Propidium iodide (PI; Aldrich Chemicals)
- 7. Phosphoryl buffer solution $(10 \times PBS , biosera , USA)$
- 8. RPMI-Medium 1640 (GIBCO , USA)
- 9. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO, USA)
- 10.Antibiotics (100U/mL Penicillin/ 100µg/mL Streptomycin) (GIBCO, USA)
- 11.Fetal bovine serum (FBS; GIBCO, USA)
- 12.U937 (human U937 myeloid leukemia cell line)
- 13.Hela (cervical cancer)
- 14. Typsin/EDTA (ethylenediaminetetraacetates; GIBCO, USA)
- 15.Lipopolysaccharides (LPS; Sigma, USA)
- 16.N-acetyl-L-cysteine (NAC; Sigma, USA)

17.Diphenyleneiodonium (DPI; Sigma, USA)

2.2 實驗儀器

- 1. 無菌操作臺(Laminar Flow; VCM-420, Taiwan)
- 2. 細胞恆溫培養箱(CO₂ Incubator ; SANYO, MCO-17AIC, Japan)
- 3. 倒立式顯微鏡(OLYMPUS, CK40, Japan)
- 4. 桌上型離心機 (KUBOTA, 2010, Taiwan)
- 5. 渦旋震盪器(Scientific Industries, Inc., Vortex-Genie 2, USA)
- 6. 免疫分析分光光度計 ELLISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) reader (TECAN, A5082, Austria)
- 7. BD 流式細胞儀(FACScan, Becton Dickinson, USA)

2.3 實驗製備與方法

2.3.1 配製 Tyloxapol 溶液

秤取 1g Tyloxapol,置之於 15mL 離心管中,加入 10mL 1×PBS,充分 地 vortex 使 Tyloxapol 完全溶解,製備成 100μg/μL 的溶液,靜置直到 泡沫消失後,在無菌操作台上以 0.22μm 的 filter 過濾,常溫下保存備 用。

2.3.2 Propidium iodide (PI) 的製備

1. PI standard solution :

秤取 PI 粉末 20mg,將其溶於 1000μL 1×PBS 中形成濃度為 20mg/mL standard solution

2. PI 染劑(含有 40µg/mL PI 及 100mg/mL RNase A):

從 PI standard solution 中取 100μL 到 50mL 的離心管中,再秤取 5mg

的 RNase A 到同一離心管,加1×PBS 到 50mL,保存於4℃下, 備用。

2.3.3 細胞保存液配製

將純酒精(99.9%)與 1×PBS 以體積比為 7:3 的方式混合,並以 0.22μm 的 filter 渦濾,保存於 4℃下備用。

2.3.4 細胞培養

A、人類骨髓性白血病細胞 (human U937 myeloid leukemia cell line, ATCC: CRL-1593.2)

本實驗所使用的細胞株來自於中山醫學大學微生物暨免疫學科 詹明修老師提供。將人類骨髓性白血病細胞U937,培養於含有 10%去補體胎牛血清(fetal bovine serum,FBS),及1%100U/mL Penicillin/100µg/mL Streptomycin的RPMI培養液中,使用 10cm 培養皿(cell culture dish),並將細胞置於37℃且含有5% CO₂的 細胞恆溫培養箱中。

細胞繼代培養(subculture)

- 當細胞株在 10cm 培養皿中,長滿至 80%~90%時,直接將 懸浮狀的細胞與培養液吸至 15mL 的離心管。
- 2. 用 1500rpm 離心 5 分鐘後,去除上清液。
- 3. 加入 1mL 的培養液將 pellet 打散。
- 吸取離心管內約 3×10⁶的細胞至 10cm 培養皿中,並在每一
 10cm 培養皿中放入 10mL 的培養液。
- 最後將此培養皿放置於 37℃ 且含有 5% CO₂的細胞恆溫培 養箱中。

B. 人類子宮頸癌細胞株(Hela)

本實驗所使用的細胞株來自於中山醫學大學微生物暨免疫學科詹 明修老師提供。將人類子宮頸癌細胞株Hela,培養於含有 10%去補 體胎牛血清 (fetal bovine serum,FBS),及 1% 100U/mL Penicillin/ 100µg/mL Streptomycin的DMEM培養液中,使用 10cm 培養皿(cell culture dish),並將細胞置於 37℃且含有 5% CO₂的細胞恆溫培養箱 中。

細胞繼代培養(subculture)

- 當細胞在培養皿中長滿至 80%-90%時,移除培養液,用 3-5 mL
 phosphate-buffered saline (PBS) 清洗。
- 加入 2 mL 0.1% Trypsin/EDTA,將培養皿放入 37℃且含有 5%
 CO₂的恆溫培養箱中 5 分鐘,直到細胞自盤底飄起。
- 3.反覆沖吸以打散細胞,然後將細胞吸取至離心管,加入 6 mL free medium 中和 Trypsin 活性。
- 4. 以 1500 rpm 離心 5 分鐘後,倒掉上清液留下 pellet,然後加入 1
 mL 培養液將 pellet 打散。
 - 5. 先於每一10cm 培養皿中各加入10 mL培養液 ,再取3×10⁶的 細胞放入培養皿中,重新培養於37℃且含有5% CO₂的恆溫培養

箱中。

2.4 細胞毒性測試(cytotoxicity assay)[39]

Cell Counting Kit-8 試劑可簡便且精準的用於檢測細胞增殖及毒性。其應用原理為: Cell Counting Kit-8 試劑中含有 WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-di-sulfophe nyl)-2H-tetrazolium,monosodium salt],其結構與反應機轉如(附圖 三)。WST-8 在電子攜帶者(1-MEthoxy PMS)的作用下,被細胞粒線體 中的去氫化酶還原成具高水溶性黃褐色的 Formazan dye,而 Formazan dye 產生的量與細胞存活量成正比,因此可應用於偵測細胞增殖量及 毒性。

實驗步驟:(附圖四)

- 將細胞以 1×10⁴/well分到 96 well中(100 μl/well), overnight待細胞
 穩定後。
- 分別加入 Tyloxapol,濃度各為 25,50,250,500,1000µg/mL (1ml/well)。
- 充分vortex後,將加入Tyloxapol後的細胞,放置於37℃且含有5%
 CO₂的恆溫培養箱中,培養時間分別為1,2,4,8小時,且每一濃 度皆為3重覆。
- 4. 培養完畢後,取出先以顯微鏡觀察其細胞形態後,在每一個well中

加入 10 µl Cell Counting Kit-8 試劑,再放回 37℃且含有 5% CO₂的 恆溫培養箱中,培養至其變色(約為 2~3 小時)。

5. 最後以 ELISA Reader 測其在 450~595nm 波長下之吸光値(OD 450 和 630)。

2.5 細胞型態觀察

以倒立式顯微鏡(OLYMPUS, CK40, Japan)觀察細胞型態的變化, 比較細胞在未添加或添加濃度各為 25,50,250,500µg/mL Tyloxapol, 且經過 1,2,4,8小時不同時間點後,細胞型態的變化。

2.6 流式細胞儀 (Flow cytometer) [40-43]

流式細胞儀(flow cytometer)是由液流系統、光學系統、分選系統以 及電子系統所構成,是現代生物醫學研究中不可或缺的利器,流式細 胞儀不但可以用來測定細胞各種標記,更可以用來分析細胞的生長週 期、細胞中DNA含量、細胞凋亡作用(apoptosis)及細胞內多種分子 之變化,此外,流式細胞儀也可用於篩選特定細胞,以提供進一步研 究所需。

流式細胞儀主要是為了快速偵測一顆接著一顆流動於液體水柱(fluid stream)中的顆粒或細胞,因此流式細胞儀所偵測到的訊號,是以每一個細胞或顆粒進入流式細胞儀分吸管後,被雷射光照射激發後,產

14

生光學訊號,再將光學訊號轉換成電子訊號後,由偵測器收集電子訊 號後進入電腦分析,即可得到所測之細胞或顆粒的特性。當細胞或顆 粒被雷射光照射激發後,會產生前散射光(forward scatter, FSC)及 側散射光(side scatter 或 right-angle scatter 或SSC),兩者呈90度角, 而當顆粒本身帶有螢光物質(fluorochrome),或被帶有螢光物質的 抗體或被其它螢光物質染上時,則會產生各種不同波長的螢光,由光 的波長及強度變化,即可測出細胞的大小(與FSC 成正比),細胞複 雜度(與SSC 成正比)及細胞內特定物質的含量。

2.6.1 細胞內粒線體 ROS 含量測定(Intracellular Reactive oxygen species contents)

A. 檢測H₂O₂的變化[44]

在待測樣品中加入具有細胞膜穿透性的dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA),當DCFH-DA進入細胞後,會與細胞內的H₂O₂產生裂 解與氫化反應(cleaved and oxidized),而形成帶有綠色螢光的DCF產 物,其波長在488~530nm下偵測。(附圖五)

實驗步驟:(附圖六)

 將細胞以 1×10⁶/well分到 24well中(1ml/well), overnight待細胞 穩定後。

- 2. 分別加入 Tyloxapol 的濃度為 25,50,250,500µg/mL(1ml/well)。
- 充分 vortex 後,將加入 Tyloxapol 後的細胞,放置於 37℃且含有 5% CO₂的恆溫培養箱中,培養時間分別為1,2,4小時,且每一 濃度皆為3重覆。
- 培養完畢後,取出先以顯微鏡觀察其細胞形態後,分別將每一濃度的細胞各取出 10µl,以 trypan blue 染色,在顯微鏡下計算細胞存活率。
- 5. 將細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500 rpm 離心 5 分鐘。
- 6. 倒掉上清液,加入 1mL 1×PBS,充分地 vortex,使細胞分布均匀。
- 7. 避光加入 1μL DCFH-DA (10μM),充分 vortex,待 15 分鐘後,以流式細胞儀測定細胞內H₂O₂的變化。

B. 檢測O2的變化[44]

在待測樣品中加入具有細胞膜穿透性的hydroethidine bromide(HE), 當hydroethidine bromide(HE)進入細胞後,會與細胞內的O₂產生氧 化反應,形成ethidium bromide(EB),其波長在488~585nm下偵測。 (附圖七)

實驗步驟:(附圖八)

1. 將與 Tyloxapol (濃度各為 25,50,250,500µg/mL)作用後之待

測細胞(時間為1,2,4小時),從24 well 移至 trypan blue,以1500 rpm 離心5分鐘。

- 2. 倒掉上清液,加入 1mL 1×PBS,充分地 vortex,使細胞分布均匀。
- 3. 避光加入 1μL HE (5μM),充分地 vortex,待 15 分鐘後,以流式
 細胞儀測定細胞內O₂ 的變化。
- 2.6.2 粒線體膜電位的測定(Mitochondria membrane potential $(\Delta \Psi_m)$)

當R123可以穿透細胞膜,進入細胞後會與細胞內粒線體結合並抑制粒線體的呼吸作用[45],藉由R123結合後所產生的螢光強度可以偵測粒線體膜電位的變化。R123的結構如(附圖九)。

實驗步驟:(附圖十)

- 將與 Tyloxapol (濃度各為 25,50,250,500µg/mL)作用後之待 測細胞(時間為 1,2,4小時),細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500 rpm 離心 5 分鐘。
- 2. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS,充分地vortex,使細胞分布均匀。
- 3. 避光加入 1 μL R123 (10μM),充分地 vortex,待 15 分鐘後,以流 式細胞儀測定細胞內之粒線體膜電位變化。

2.6.3 細胞大小與細胞內胞器複雜度測定(cell size and complexity analysis)(附圖十一)[46]

當細胞進入流式細胞儀之分析管,被雷射光照射激發後,會產生前散 射光(forward scatter, FSC)於平行方向,及側散射光(side scatter, SSC)於垂直方向,藉由 FSC 値之測定可以得到細胞之大小與表面積, 另外也可透過 SSC 値之測定分析比較細胞之複雜度與其細胞型態之 變化。

2.6.4 細胞週期分析 (cell cycle analysis)

當 Propidium iodide (PI)進入細胞後,能與細胞核內的 DNA 與 RNA 結合,藉由細胞在各生長時期 DNA 含量不同的因素,我們可以得知 細胞所處的生長階段,又因為 PI 也會和細胞核內的 RNA 結合,因此 我們在製備 PI solution 時會加入 RNase,分解細胞核中的 RNA,以避 冤干擾 PI 對 DNA 的測定。正常人體細胞的細胞週期,在 G0/G1 時期 具有 2 套染色體 (2N),G2/M 時期具有 4 套染色體 (4N),而 S 時期 介於 G0/G1 與 G2/M 之間,因此其染色體含量也為兩者之間。當細胞 產生細胞凋亡時,細胞內的酵素被活化,因而使 DNA 片段化,而使 染色體含量少於 2N,所以在 G0/G1 前有 Sub-G1 的波峰出現,藉由流 式細胞儀分析圖 (附圖十二),不但可以判斷整個細胞生長階段,也 可以用來當作是否產生細胞凋亡的指標。

細胞經由 70%酒精保存液, overnight, 增加細胞膜通透性,加入 PI, 利用波長 488nm 的雷射光激發後,可產生橘紅色螢光,收集分析螢光 強度後,即可知道細胞內 DNA 的含量,細胞生長週期,及是否產生 細胞凋亡現象

實驗步驟:(附圖十三)

- 將與 Tyloxapol (濃度各為 25,50,250,500µg/mL)作用後之待 測細胞(時間為 1,2,4小時),細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500 rpm 離心 5 分鐘。
- 2. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS,充分地vortex,使細胞分布均匀
 後,再以1500 rpm 離心5分鐘。
- 到掉上清液,加入已製備的保存液(4℃),充分 vortex 使細胞分布
 均匀後,置之於 4℃, overnight。
- 4. 以 1500 rpm 離心 5 分鐘, 倒掉上清液, vortex 使細胞分布均匀。
- 5. 避光加入 1mL PI,充分地 vortex,待 30 分鐘後以流式細胞儀測定 細胞週期的變化。

- 2.6.5 檢測 Tyloxapol 對受 LPS 刺激後的 U937 細胞產生的抗氧化作用 實驗步驟:(附圖十四)
 - 將細胞以 1×10⁶/well分到 24well中(1ml/well), overnight待細胞 穩定。
 - 分別加入 Tyloxapol,濃度各為 25,50,250,500 µ g/mL
 (1ml/well),將加入 Tyloxapol 後的細胞,放置於 37℃且含有 5%
 CO₂的恆溫培養箱中,培養時間分別為 1,2 小時,且每一濃度皆 為 3 重覆。
 - 之後在每一 well 中加入 1 μL LPS,將細胞放置於 37℃ 且含有 5%
 CO₂ 的恆溫培養箱中,培養時間為 21 小時。
 - 培養完畢後,取出先以顯微鏡觀察其細胞形態後,分別將每一 濃度的細胞各取出 10 μL,以 trypan blue 染色,在顯微鏡下計算 細胞存活率。
 - 8. 將細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500 rpm 離心 5 分鐘。
 - 7. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS,充分地vortex,使細胞分布均 匀。
 - 8. 避光加入 1 μL HE (5μM),充分地 vortex,待 15 分鐘後,以流 式細胞儀測定細胞內 O₂ 的變化。

2.6.6 檢測Tyloxapol對U937細胞內H2O2的影響是否為可逆性

實驗步驟:

- 將細胞以 1×10⁶/well分到 24well中(1ml/well), overnight待細 胞穩定後。
- 2. 分別加入 Tyloxapol 的濃度為 25,50,250,500 µg/mL(1ml/well)。
- 將加入Tyloxapol後的細胞,放置於 37℃ 且含有 5% CO₂的恆 溫培養箱中,培養時間分別為 1,2 小時,且每一濃度皆為 3 重 覆。
- 培養完畢後,將細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500 rpm 離心 5 分鐘。
- 5. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS, vortex 使細胞被充分清洗過, 重覆清洗2次。
- 再以 1500 rpm 離心 5 分鐘, 倒掉上清液, 加入 1 mL 細胞培養液, vortex 使細胞分布均匀後, 重新放入新的 24well 中, 置於恆溫培 養箱中培養 4 小時。
- 培養完畢後,取出先以顯微鏡觀察其細胞形態後,分別將每一濃度的細胞各取出 10 μL,以 trypan blue 染色,在顯微鏡下計算細胞存活率。
- 8. 將細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500 rpm 離心 5 分鐘。

 9. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS,充分地vortex,使細胞分布均匀。
 10. 避光加入1µLDCF(10µM),充分vortex,待15分鐘後,以流 式細胞儀測定細胞內H₂O₂的變化。

2.6.7 檢測Tyloxapol對U937細胞內O2的影響是否為可逆性

實驗步驟:

- 將細胞以 1×10⁶/well分到 24well中(1ml/well), overnight待細 胞穩定後。
- 2. 分別加入 Tyloxapol 的濃度為 25,50,250,500 µg/mL(1ml/well)。
- 將加入Tyloxapol後的細胞,放置於 37℃ 且含有 5% CO₂的恆 溫培養箱中,培養時間分別為 1,2 小時,且每一濃度皆為 3 重 覆。
- 培養完畢後,將細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500
 rpm 離心 5 分鐘。
- 5. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS, vortex 使細胞被充分清洗過, 重覆清洗2次。
- 再以 1500 rpm 離心 5 分鐘,倒掉上清液,加入 1 mL 細胞培養 液,vortex 使細胞分布均匀後,重新放入新的 24well 中,置於 恆溫培養箱中培養 4 小時。
- 培養完畢後,取出先以顯微鏡觀察其細胞形態後,分別將每一 濃度的細胞各取出 10 μL,以 trypan blue 染色,在顯微鏡下 計算細胞存活率。
- 8. 將細胞從 24 well 移至 1.5 mL microtube,以 1500 rpm 離心 5 分 鐘。
- 9. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS,充分地vortex,使細胞分布均匀。
- 10. 避光加入 1 μL HE (5μM),充分地 vortex,待 15 分鐘後,以流 式細胞儀測定細胞內O₂的變化。

2.6.8 檢測 NAC 或 DPI 是否可以引起 Hela 細胞的抗氧化作用 實驗步驟:

- 將細胞以 1×10⁶/well分到 24well中(1ml/well), overnight待細 胞穩定後。
- 加入 10mM NAC 或 10µM DPI (1ml/well) 培養 15 分鐘後,再 加入 Tyloxapol 濃度為 500 µg/mL 培養 1 小時後。
- 加入 100 µL 0.1% Trypsin/EDTA,將 24well 放入 37℃且含有 5%
 CO₂的恆溫養箱中 5 分鐘,直到細胞自盤底飄起,再加入 500 µL free medium 中和 Trypsin 活性。

- 500rpm 離心 5 分鐘。
 - 5. 倒掉上清液,加入1mL1×PBS,充分地vortex,使細胞分布均匀。
 - 6. 避光加入 1 μL HE (5μM),充分地 vortex,待 15 分鐘後,以
 流式細胞儀測定細胞內 O₂ 的變化。

第三章 結果

3.1 細胞毒性測試 (cytotoxicity assay)

A. U937 細胞毒性測試

U937 細胞分別以 25,50,250,500,1000 µg/mL 五種劑量, 與細胞作用 1,2,4,8 小時後,利用去氫化酶活性的評估可以 得知細胞的存活率。圖一中顯示,隨著 Tyloxapol 劑量的增加及 暴露在 Tyloxapol 時間的增加,我們發現細胞存活率越來越低。 當 Tyloxapol 劑量分別為 25,50,250,500 µg/mL 培養 4 小時 後,細胞存活率仍大於 80%,而 Tyloxapol 劑量 1000 µg/mL 培 養 8 小時後,存活率則小於 50%。一個理想的生物醫學材料, 必須是對細胞無毒性的,因此,我們選用 25,50,250,500 µg/mL 四種對細胞傷害較小的劑量,做後續研究。

B. Hela 細胞毒性測試

Hela 細胞分別以 25,50,250,500μg/mL 四種劑量,與細胞作 用 1,2,4,8,24 小時後,利用去氫化酶活性的評估可以得知 細胞的存活率。圖二中顯示,隨著 Tyloxapol 劑量的增加及暴露 在 Tyloxapol 時間的增加,我們發現細胞存活率越來越低。當 Tyloxapol 劑量分別為 25,50,250,500 μg/mL 培養 4 小時後, 細胞存活率仍大於 80%,而培養 8 小時與 12 小時後的存活率低,因此,我們選用培養 4 小時; 25,50,250,500 μg/mL 四種對細胞傷害較小的劑量,做後續研究。

3.2 細胞內粒線體 ROS 含量測定(Intracellular Reactive oxygen

species contents)

細胞內H₂O₂的量會隨著Tyloxapol劑量的增加及暴露在Tyloxapol時間的增加而提高,細胞內的H₂O₂會與穿透細胞膜進入細胞內的DCFH-DA反應,產生DCF發出綠色螢光,當細胞內H₂O₂量增加時,DCF所產生的螢光強度也會提高。

A. U937 細胞內H2O2的變化

由圖三顯示,在Tyloxapol 劑量為 250 µg/mL,與 U937 細胞作 用 1 小時後,所測得之 DCF 螢光強度,突然下降至接近於沒 有加入 Tyloxapol 的 U937 細胞 (control) 時,U937 細胞所產 生的 DCF 螢光強度,而 Tyloxapol 劑量為 500 µg/mL,同樣與 U937 細胞作用 1 小時後,其產生的 DFC 螢光強度又突然上 升。另外 Tyloxapol 與 U937 細胞作用 2 小時後,當 Tyloxapol 劑量為 25 µg/mL 時的 DFC 螢光強度和沒有加入 Tyloxapol 的 U937 細胞 (control) 產生的螢光強度差不多,而 Tyloxapol 劑 量為 50 及 250 μg/mL 時 DCF 螢光強度皆為增加的趨勢,但在 Tyloxapol 劑量為 500 μg/mL 又呈下降。最後當 Tyloxapol 與 U937 細胞作用 4 小時後,無論 Tyloxapol 劑量為何,其 DCF 的相對螢光強度皆為下降趨勢。

B. U937 細胞內O2 的變化

由圖四顯示,細胞內O2⁻的量會隨著Tyloxapol劑量的增加及暴露 在Tyloxapol時間的增加而提高,細胞內的O2⁻會與穿透細胞膜進 入細胞內的HE反應,生成EB發出螢光,當細胞內O2⁻含量增加 時,HE所產生的螢光強度也會提高。隨著Tyloxapol劑量與培養 時間的增加,U937 細胞所產生的HE螢光強度呈現相對增加的 趨勢。

C. Hela細胞內H₂O₂的變化

由圖五顯示, Tyloxapol 劑量為 25μg/mL 與細胞作用 1 小時後, DCF 螢光強度比沒有加入 Tyloxapol 的 Hela 細胞 (control) 的 DCF 螢光強度明顯上升,但之後隨劑量增加而呈下降趨勢。當 細胞與 Tyloxapol 作用 2 小時或 4 小時後,無論 Tyloxapol 為任 何劑量,其 DCF 螢光強度與沒有加入 Tyloxapol 的 Hela 細胞 (control) 的 DCF 螢光強度比較,發現皆呈下降的趨勢。

D. Hela細胞內 O_2 的變化

由圖六顯示,無論 Tyloxapol 劑量為何,細胞所產生的 HE 螢光 強度呈現相對增加的趨勢,尤其是 Tyloxapol 劑量為 250µg/mL 與細胞作用 4 小時後,所產生的 HE 螢光強度非常明顯地增加。

3.3 粒線體膜電位的測定(Mitochondria membrane potential $(\Delta \Psi_m)$)

經由ROS刺激引起ROS釋放的系統,所造成不穩定的粒線體膜電位 與氧化還原反應,會對細胞生存產生負面影響。細胞產生凋亡作用 的初期,其粒線體膜電位會呈現下降趨勢,因爲粒線體會釋放 cytochrome *c*。

A. U937 細胞粒線體膜電位的測定

由圖七顯示,和沒有與Tyloxapol作用的U937細胞比較,會發現 隨著Tyloxapol劑量與培養時間增加,U937細胞的粒線體膜電位 呈現不穩定狀態。Tyloxapol與U937細胞分別作用1小時和2小時 後,其粒線體膜電位與沒有和Tyloxapol作用的U937細胞比較, 發現在初期粒線體膜電位呈下降趨勢,而後隨著Tyloxapol劑量 增加而增加,但在Tyloxapol劑量為25 μg/mL,培養時間為4小時 時,其粒線體膜電位變化為增加的現象,隨著Tyloxapol劑量的 增加,會使粒線體膜電位變化劑下降的趨勢發展。

B. Hela細胞粒線體膜電位的測定

由圖八顯示,和沒有加入Tyloxapol的Hela細胞 (control) 比較, 會發現隨著Tyloxapol劑量與培養時間增加,Hela細胞的粒線體 膜電位呈現不穩定狀態。當細胞與Tyloxapol作用1小時後,無論 Tyloxapol劑量為何,其產生的R123螢光強度皆比沒有加入 Tyloxapol的Hela細胞 (control) 的R123 螢光強度低。Tyloxapol 劑量為25μg/mL與細胞作用2小時後,產生的R123螢光強度與沒 有加入Tyloxapol的Hela細胞 (control) 的R123螢光強度比變化 不大,但在Tyloxapol劑量為50µg/mL及250µg/mL時,R123螢光 強度呈上升趨勢,隨後在Tyloxapol劑量為500µg/mL時又呈減少 狀態。當Tyloxapol與細胞作用4小時後, Tyloxapol劑量為 25μg/mL時的R123螢光強度明顯下降,而Tyloxapol劑量為 50µg/mL及250µg/mL時,R123螢光強度呈上升趨勢,隨後在 Tyloxapol劑量為500µg/mL時又呈減少狀態。

3.4 細胞大小與細胞內胞器複雜度測定(cell size and complexity

analysis)

藉由測量FSC與SSC值,評估Tyloxapol對於細胞的大小與複雜度所造成的影響。由圖九與圖十顯示,Tyloxapol與U937細胞作用1,2,4

小時後,加入HE螢光染劑,發現當Tyloxapol劑量與培養時間增加時,其對細胞大小與複雜度並無明顯影響,且Tyloxapol對Hela細胞亦無明顯的變化。

3.5 細胞週期分析 (cell cycle analysis)

在細胞的生長週期中,會因細胞所處的生長階段不同,而有不同的 DNA套數,藉由這個特性,我們可以測定細胞與Tyloxapol作用在不 同濃度與培養後,細胞週期的改變,也可從此判斷出是否有細胞凋 亡作用產生。

A. U937 細胞週期分析

由圖十一顯示,當細胞與Tyloxapol作用1小時及2小時後, Tyloxapol無論在任何劑量下,皆沒有細胞凋亡的作用產生(細 胞的subG1値與控制組相當)。而當細胞與Tyloxapol作用4小時 後,Tyloxapol劑量為250 µg/mL與500 µg/mL時,可以明顯的看 到subG1値比沒有加入Tyloxapol的U937細胞(control)的subG1 値高,這就表示細胞內部有凋亡作用的產生。

B. Hela細胞週期分析

由圖十二及圖十三顯示,細胞與Tyloxapol作用1小時及2小時後,Tyloxapol無論在任何劑量下,皆沒有細胞凋亡的作用產生, 細胞的subG1値與控制組相當。當Tyloxapol劑量為500µg/mL與 細胞作用4小時後,發現細胞的subG1値開始上升,表示細胞開 始產生凋亡作用。而當Tyloxapol劑量為250µg/mL及500µg/mL與 細胞作用8小時後,細胞的subG1値明顯地上升,細胞產生凋亡 作用。

3.6 Tyloxapol對受LPS刺激後的U937細胞產生的抗氧化作用

在之前的文獻中提到無論是體內 (*in vivo*) 或體外(*in vitro*), Tyloxapol皆能對Hydroxyl radical與Hypochlorous acid產生抗氧化作 用。當U937細胞與LPS作用21小時後,U937細胞會因受到刺激活化, 而使細胞內部的O₂ 含量增加。由圖十四顯示,Tyloxapol與受LPS刺 激活化後的U937細胞作用1小時後,發現Tyloxapol可以將受LPS刺激 活化後的U937細胞所產生的螢光強度,恢復到沒有受刺激活化時的 狀態,但由圖十五顯示Tyloxapol與受LPS刺激活化後的U937細胞作 用2小時後,卻只有低劑量(25 μg/mL與50 μg/mL)的Tyloxapol可以 將受LPS刺激活化後的U937細胞所產生的螢光強度,恢復到沒有受 刺激活化時的狀態。

3.7 Tyloxapol對U937細胞內H2O2與O2的影響是否為可逆性

當Tyloxapol與細胞作用1小時後,將Tyloxapol從細胞培養液中移除再 繼續培養21小時,由圖十六發現細胞內H₂O₂與O₂的含量並沒有很明 顯的變化,而由圖十七顯示,在與Tyloxapol作用2小時後的細胞中發 現H₂O₂含量些微下降,但其下降的量在統計上無顯著差異性,相對 於O₂而言,U937細胞在與低劑量 (25 μg/mL與50 μg/mL)的 Tyloxapol作用2小時後,細胞內部的O₂含量也沒有明顯變化,但在 高劑量(250 μg/mL與500 μg/mL)的Tyloxapol下,細胞內的O₂含量 會明顯的增加。

3.8 NAC或DPI是否可以引起Hela細胞的抗氧化作用

由圖十八與圖十九顯示,預先加入10mM NAC或10µM DPI與Hela細胞作用15分鐘後,皆會使後續再加入Tyloxapol培養1小時之Hela細胞內的O₂含量增加,由此可知NAC與DPI兩者皆無法使Hela細胞產生抗氧化作用,所以Tyloxapol對Hela細胞之作用機轉與NAC之雙硫鍵及DPI抑制細胞膜上NADPH無關。

第四章 討論

本研究主要為探討Tyloxapol與U937及Hela細胞作用後細胞內的變化,及 Tyloxapol對受LPS活化後的巨噬細胞所產生的抗氧化作用,在研究結果中, 首先發現Tyloxapol對U937細胞內ROS的影響為:隨著Tyloxapol劑量的增 加,細胞內H₂O₂含量的變化呈現減少趨勢,相反地,U937細胞內O₂含量的 變化是呈增加的趨勢。U937細胞內ROS的產生主要是藉由細胞膜上的 NADPH氧化酶系統(NADPH oxidase system),於細胞內生成O₂後,再經 由superoxide dismutase (SOD)-catalyzed dismutation轉變成H₂O₂[22]。而當 界面活性劑與細胞接觸時,首先是與細胞膜產生作用,因此實驗結果亦印 證Tyloxapol藉由與細胞膜交互作用,而在細胞內產生O₂。我們亦發現細胞 內H₂O₂與O₂含量的變化是呈現相反趨勢,這亦反映了當細胞面對ROS變化 時細胞的微妙平衡關係。

Tyloxapol所造成的粒線體膜電位不穩定是受細胞內O₂⁻增生的影響,而非細胞內的H₂O₂。一般而言,在細胞產生凋亡作用前,粒線體膜電位的改變主要是因為過氧化物的生成[25]。研究結果中,顯示U937細胞只有在高Tyloxapol劑量(250µg/mL與500µg/mL)與長時間(4h)的培養時,才會對粒線體產生改變,而有細胞凋亡作用產生。在先前的文獻中報導,一些界面活性劑會造成粒線體膜電位的下降與增加細胞內O₂⁻含量,但這些都與我們的研究結果不相同。而Tyloxapol對細胞產生的影響,除了ROS的變化與

33

粒線體膜電位改變外,Tyloxapol也會造成細胞大小與複雜度的改變,在實驗結果中發現當Tyloxapol劑量增加時,其對細胞大小與複雜度影響也隨之增加,高劑量的Tyloxapol對細胞大小與複雜度所造成的改變比低劑量的Tyloxapol大。

最後,我們發現Tyloxapol對U937細胞可以產生氧化與抗氧化兩種作用。在 Tyloxapol對U937細胞可逆性試驗中,當Tyloxapol與細胞作用1h後,再重新 培養,其細胞內的H₂O₂與O₂含量皆會恢復到與沒有加入Tyloxapol作用的細 胞狀態相當,這表示Tyloxapol對U937細胞的作用是可逆性的,但當與 Tyloxapol作用時間大於1h時,其細胞內的H₂O₂與O₂含量就無法回復,即表 示Tyloxapol對U937細胞的作用無可逆性。因此,我們把Tyloxapol造成U937 細胞內ROS改變與Tyloxapol阻止LPS活化巨噬細胞的能力相關性做比較之 後,我們發現的Tyloxapol抗氧化作用與之前文獻中不同[47,48],即在短培 養時間與低劑量下,Tyloxapol對受LPS刺激後之U937細胞,才具有抗氧化 作用,而當Tyloxapol為高劑量及培養時間較長時,Tyloxapol不但沒有抗氧 化作用產生,巨噬細胞反而會受到Tyloxapol之毒性作用影響。

另外,由於界面活性劑與細胞接觸時,首先是與細胞膜產生作用[22],因而 我們也選用具有不同細胞結構的人類子宮頸癌細胞Hela進行試驗,因兩細胞 株細胞膜結構的不同,所以得到的實驗結果也就不盡相同。Tyloxapol對Hela 細胞所造成的ROS變化與粒線體膜電位變化趨勢,雖然與U937細胞相近,

34

但以相同條件(相同的Tyloxapol劑量與培養時間)做試驗時,兩種細胞與 Tyloxapol作用所產生之ROS與粒線體膜電位變化量卻不相同,而在細胞週 期的偵測實驗結果中,發現當U937細胞與Tyloxapol劑量為250 μg/mL及 500 μg/mL作用4h後,U937細胞的subG1値比控制組的subG1値高,這就表 示細胞內部有凋亡作用的產生,然而Tyloxapol對Hela細胞產生凋亡作用的 條件是;當Tyloxapol劑量為500μg/mL並與細胞作用4h,及Tyloxapol劑量為 250μg/mL及500μg/mL與細胞作用8h後。綜合實驗結果我們發現Tyloxapol具 有cell-dependent的特性,也證實了Tyloxapol對癌細胞之毒性效應,源自於 O₂含量增加及粒線體膜電位之不穩定,然而這些Tyloxapol對Hela產生的細 胞內分子作用,尚未於文獻中發表。

第五章 結論

當Tyloxapol與U937及Hela細胞作用於適當的劑量與培養時間後,可引發細胞內的各種反應,例如:改變細胞內ROS的含量、粒線體膜電位的變化、細胞週期改變,及細胞大小與複雜度變化等,而當U937細胞與Tyloxapol作用1h及2h後,Tyloxapol可以對受LPS刺激的U937巨噬細胞產生抗氧化作用,然而高劑量的Tyloxapol卻使U937細胞產生過量之ROS(O₂),且當Tyloxapol對U937細胞作用1h後,細胞內ROS的變化為可逆性。另外, Tyloxapol對於Hela人類子宮頸癌細胞之毒性效應,源自於O₂含量增加及粒線體膜電位不穩定,且其O₂含量增加與NAC及DPI兩種抗氧化劑之作用機轉無關。

參考文獻

- H. Schott. Comparing the Surface Chemical Properties and the Effect of Salts on the Cloud Point of a Conventional Nonionic Surfactant, Octoxynol 9 (Triton X-100), and of Its Oligomer, Tyloxapol (Triton WR-1339). *J. Colloid Interface Sci.* 205:496-502 (1998)
- O. Regev, and R. Zana. Aggregation behavior of tyloxapol, a nonionic surfactant oligomer, in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* 210:8-17 (1999)
- J. E. F. Reynolds (Ed.). *Martindale, The Extra Pharmacopoeia*, 31st ed., Royal Pharmaceutical Soc., London, 1996, PP. 1347
- A. R. Gennaro (Eds.). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th ed., Mack, Easton, PA, 1995
- K. L. Dechant and D. Faulds. Colfosceril palmitate. A review of the therapeutic efficacy and clinical tolerability of a synthetic surfactant preparation (Exosurf Neonatal) in neonatal respiratory distress syndrome. *Drugs* 42:877-894 (1991)
- 6. K. Yamamoto, B. Shen, C. Zarins, and A. M. Scanu. In vitro and in vivo interactions of Triton 1339 with plasma lipoproteins of normolipidemic rhesus monkeys. Preferential effects on high density lipoproteins.

Arteriosclerosis **4**:418-434 (1984)

- N. C. Staub, K. E. Longworth, V. Serikov, E. H. Jerome, and T. Elsasser. Detergent inhibits 70-90% of responses to intravenous endotoxin in awake sheep. J. Appl. Physiol. 90:1788-1797 (2001)
- 8. V. B. Serikov, T. V. Glazanova, E. H. Jerome, N. W. Fleming, H. Higashimori, and N. C. Staub, Sr. Tyloxapol attenuates the pathologic effects of endotoxin in rabbits and mortality following cecal ligation and puncture in rats by blockade of endotoxin receptor-ligand interactions. *Inflammation* 27:175-190 (2003)
- 9. N. Gursoy, J. S. Garrigue, A. Razafindratsita, G. Lambert, and S. Benita. Excipient effects on in vitro cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system. *J. Pharm. Sci.* **92**:2411-2418 (2003)
- 10. J. F. Kukowska-Latallo, C. Chen, J. Eichman, A. U. Bielinska, and J. R.
 Baker. Enhancement of dendrimer-mediated transfection using synthetic lung surfactant exosurf neonatal in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*14:253-261 (1999)
- 11.R. D. Findlay, H. W. Taeusch, R. David-Cu, and F. J. Walther. Lysis of red blood cells and alveolar epithelial toxicity by therapeutic pulmonary surfactants. *Pediatr. Res.* **37**:26-30 (1995).

- 12.Kuo JH, Jan MS, Chiu HW. Cytotoxic properties of tyloxapol. *Pharm Res.*2006 Jul;23(7):1509-16. Epub 2006 Jun 21
- 13.Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol.*1999 Jan;11(1):68-75
- Smith ML, Fornace AJ Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutat Res.* 1996 Jun;340(2-3):109-24
- 15. Mytle A. Davis. Apoptosis methods in pharmacology and toxicology. 2002;1-6

16. Michael D. Jacobson and Nicola McCarthy. Apoptosis. 2004;3-5

- 17. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6
- 18.Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 1992 Apr 1;148(7):2207-16
- 19.Baserga R, Wiebel F. The cell cycle of mammalian cells. *Int Rev Exp Pathol*. 1969;7:1-30
- 20.Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Aug;7(8):2168-81

- 21.Hanna DE, Rethinaswamy A, Glover CV. Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem.* 1995 Oct 27;270(43):25905-14
- 22.Iles KE, Forman HJ. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res.* 2002;26(1-3):95-105
- 23.Nagata M. Inflammatory cells and oxygen radicals. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Aug;4(4):503-4
- 24.Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem.* 2001;82(4):674-82
- 25.Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000 Nov;5(5):415-8
- 26.Slattery JT, Wilson JM, Kalhorn TF, Nelson SD. Dose-dependent pharmacokinetics of acetaminophen: evidence of glutathione depletion in humans._*Clin Pharmacol Ther.* 1987 Apr;41(4):413-8
- 27.Miners JO, Drew R, Birkett DJ. Mechanism of action of paracetamol protective agents in mice in vivo. *Biochem Pharmacol.* 1984 Oct 1;33(19):2995-3000
- 28.Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C.

Gutteridge. Free Radic Biol Med. 1992;12(1):93-5

- 29.Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol.* 1997;38:205-27
- 30.Kharazmi A, Nielsen H, Schiøtz PO. N-acetylcysteine inhibits human neutrophil and monocyte chemotaxis and oxidative metabolism. *Int J Immunopharmacol.* 1988;10(1):39-46
- 31.Schmidt H, Schmidt W, Müller T, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E. N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Crit Care Med.* 1997 May;25(5):858-63
- 32.Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock?_*Chest.* 1998 Jun;113(6):1616-24
- 33. Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest.* 1982 Jul;47(1):5-18
- 34.Grisham, M. B.; McCord, J. M. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Taylor, A. E.; Matalan, S; Ward, P. A., eds. *Physiology of oxygen radicals*. Bethseda, MD: American Physiological Society; 1986:1–18.

- 35.Curnutte JT. Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Immunodefic Rev.* 1992;3(2):149-72
- 36.DeCoursey TE, Cherny VV. Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils. *Biophys J.* 1993 Oct;65(4):1590-8
- 37.O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J.* 1993 Feb 15;290 (Pt 1):41-9
- 38.Demaurex N, Grinstein S, Jaconi M, Schlegel W, Lew DP, Krause KH. Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH. *J Physiol.* 1993 Jul;466:329-44
- 39. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull.* 1996 Nov;19(11):1518-20.
- 40. Givan, A. L. (2001). Flow Cytometry: First Principles 2nd Ed. Wiley-Liss
- 41. Shapiro, H.M. (1995). Practical Flow Cytometry, 3rd Ed. Wiley-Liss.
- 42. Darzynkiewicz et al. (1994). Flow Cytometry, 2nd Ed. Academic Press.
- 43.Ormerod, M. G. (2000). *Flow Cytometry*, 3rd Ed. Oxford University Press.44.Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in

phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin. *J Leukoc Biol*. 1990 May;47(5):440-8

- 45.Scaduto RC Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J.* 1999 Jan;76(1 Pt 1):469-77
- 46.Freeman BA, Crapo JD Biology of disease: free radicals and tissue injury.*Lab Invest.* 1982 Nov;47(5):412-26
- 47.Ghio AJ, Marshall BC, Diaz JL, Hasegawa T, Samuelson W, Povia D,
 Kennedy TP, Piantodosi CA. Tyloxapol inhibits NF-kappa B and cytokine
 release, scavenges HOCI, and reduces viscosity of cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Sep;154(3 Pt 1):783-8
- 48.Ghio AJ, Fracica PJ, Young SL, Piantadosi CA. Synthetic surfactant scavenges oxidants and protects against hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol.* 1994 Sep;77(3):1217-23



圖一、U-937 細胞與 tyloxapol 作用後之細胞存活率

The cytotoxicity of tyloxapol on U-937 macrophages by measuring generated dehydrogenases. Negative control cells were grown without adding tyloxapol. Results are reported as cell viability percentages (average optical density (OD)/average negative control OD) \pm standard deviation (SD) (n = 6)



圖二、Hela 細胞與 tyloxapol 作用後之細胞存活率

The cytotoxicity of tyloxapol on Hela cells by measuring generated dehydrogenases. Negative control cells were grown without adding tyloxapol. Results are reported as cell viability percentages (average optical density (OD)/average negative control OD) \pm standard deviation (SD) (n = 6)





圖三、U-937細胞與tyloxapol作用後之細胞內H2O2變化

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (H_2O_2) in tyloxapol-treated U-937 macrophages. (A) A representative histogram showing the change in 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescence intensity in untreated cells (dotted line) and cells treated with 25 µg/mL of tyloxapol for 2 h. (B) DCF fluorescence intensities in cells treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. Untreated cells were controls for each corresponding incubation period. Data are expressed as means ± standard deviation (SD) of three experiments done twice.







圖四、U-937細胞與tyloxapol作用後之細胞內O₂¯變化

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (O_2^-) in tyloxapol-treated U-937 macrophages.(C) A representative histogram showing the change in ethidium fluorescence intensity in untreated cells (dotted line) and cells treated with 50 µg/mL of tyloxapol for 4 h. (D) EB fluorescence intensities in cells treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. Untreated cells were controls for each corresponding incubation period. Data are expressed as means \pm standard deviation (SD) of three experiments done twice.



圖五、Hela細胞與tyloxapol作用後之細胞內H₂O2變化

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (H_2O_2) in tyloxapol-treated Hela cells. (A) A representative histogram showing the change in 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescence intensity in untreated cells (dotted line) and cells treated with 25 µg/mL of tyloxapol for 2 h. (B) DCF fluorescence intensities in cells treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. Untreated cells were controls for each corresponding incubation period. Data are expressed as means ± standard deviation (SD) of three experiments done twice.



圖六、Hela細胞與tyloxapol作用後之細胞內O₂一變化

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (O_2^-) in tyloxapol-treated Hela cells.(C) A representative histogram showing the change in ethidium fluorescence intensity in untreated cells (dotted line) and cells treated with 50 µg/mL of tyloxapol for 4 h. (D) EB fluorescence intensities in cells treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. Untreated cells were controls for each corresponding incubation period. Data are expressed as means \pm standard deviation (SD) of three experiments done twice.



圖七、U-937 細胞與 tyloxapol 作用後之粒線體膜電位變化

Flow cytometric analysis of mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi$ m) on tyloxapol-treated U-937 macrophages. (A) A representative histogram showing the change in R-123 fluorescence intensity in untreated cells (dotted line) and in cells treated with 25 µg/mL of tyloxapol for 2 h. (B) R-123 fluorescence intensities in cells treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. Data are expressed as means ± standard deviation (SD) of three experiments done twice.



圖八、Hela 細胞與 tyloxapol 作用後之粒線體膜電位變化

Flow cytometric analysis of mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi$ m) on tyloxapol-treated Hela cells. (A) A representative histogram showing the change in R-123 fluorescence intensity in untreated cells (dotted line) and in cells treated with 25 µg/mL of tyloxapol for 2 h. (B) R-123 fluorescence intensities in cells treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. Data are expressed as means ± standard deviation (SD) of three experiments done twice.



圖九、U-937 細胞與 tyloxapol 作用後之細胞大小與複雜度變化

Flow cytometric analysis of forward scatter (FSC) and 90° side scatter (SSC) on U-937 macrophages treated with tyloxapol at different dosages for different incubation times.



圖十、Hela 細胞與 tyloxapol 作用後之細胞大小與複雜度變化

Flow cytometric analysis of forward scatter (FSC) and 90° side scatter (SSC) on Hela cells treated with tyloxapol at different dosages for different incubation times.





圖十一、U937 細胞與 tyloxapol 作用後細胞週期分析

Cell cycle analysis of U-937 macrophages treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. The percentage of each phase that cells were in was expressed as a percentage of diploid. The experiments were repeated three times with similar results .








圖十二、Hela 細胞與 tyloxapol 作用後細胞週期分析

Cell cycle analysis of Hela cell treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. The percentage of each phase that cells were in was expressed as a percentage of diploid. The experiments were repeated three times with similar results .



圖十三、Hela 細胞與 tyloxapol 作用後細胞產生凋亡作用

Cell cycle analysis of Hela cells treated with tyloxapol at different dosages and for different incubation times. The percentage of each phase that cells were in was expressed as a percentage of diploid. The experiments were repeated three times with similar results.



圖十四、Tyloxapol 對受 LPS 刺激後之 U937 細胞產生抗氧化作用

Flow cytometric analysis of the antioxidant properties of tyloxapol in macrophages activated by LPS for 1 h tyloxapol-pretreatment times. Data was plotted as curves of ethidium bromide (EB) fluorescence intensity of (a) control untreated macrophages; (b) cells stimulated by 1 μ g/mL LPS for 21 h, and cells pre-treated with (c) 25 μ g/mL, (d) 50 μ g/mL, (e) 250 μ g/mL, and (f) 500 μ g/mL of tyloxapol for 1 h and then stimulated with 1 μ g/mL of LPS for 21 h.



圖十五、Tyloxapol 對受 LPS 刺激後之 U937 細胞產生抗氧化作用

Flow cytometric analysis of the antioxidant properties of tyloxapol in macrophages activated by LPS for 2 h tyloxapol-pretreatment times. Data was plotted as curves of ethidium bromide (EB) fluorescence intensity of (a) control untreated macrophages; (b) cells stimulated by 1 μ g/mL LPS for 21 h, and cells pre-treated with (c) 25 μ g/mL, (d) 50 μ g/mL, (e) 250 μ g/mL, and (f) 500 μ g/mL of tyloxapol for 2 h and then stimulated with 1 μ g/mL of LPS for 21 h.



圖十六、Tyloxapol與U-937細胞作用產生 ROS 變化的可逆性

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (H_2O_2 and O_2^-) in U-937 macrophages treated with tyloxapol for 1 h followed by removing tyloxapol from the culture medium and further incubated for 21 h. Data are plotted as curves of (A)2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) and (B)ethidium bromide (EB) fluorescence intensities of (a) control untreated macrophages, and cells treated with (b) 25 µg/mL, (c) 50 µg/mL, (d) 250 µg/mL, and (e) 500 µg/mL of tyloxapol for 1 h followed by removing tyloxapol from the culture medium and incubated for an additional 21 h.



圖十七、Tyloxapol與U-937細胞作用產生 ROS 變化的可逆性

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (H_2O_2 and O_2^-) in U-937 macrophages treated with tyloxapol for 2 h followed by removing tyloxapol from the culture medium and further incubated for 21 h. Data are plotted as curves of (A)2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) and (B)ethidium bromide (EB) fluorescence intensities of (a) control untreated macrophages, and cells treated with (b) 25 µg/mL, (c) 50 µg/mL, (d) 250 µg/mL, and (e) 500 µg/mL of tyloxapol for 2 h followed by removing tyloxapol from the culture medium and incubated for an additional 21 h.



圖十八、NAC 對 Hela 細胞的抗氧化作用

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (O₂⁻) in tyloxapol and NAC-treated Hela cells. A representative histogram showing the change in ethidium fluorescence intensity in untreated cells (A) ,cells pretreated with 10mM NAC for 15min. followed by adding 500 µg/mL tyloxapol for 1h (B), and cells treated with 500 µg/mL tyloxapol for 1h (C).



圖十九、DPI 對 Hela 細胞的抗氧化作用

Flow cytometric analysis of intracellular ROS content (O_2^-) in tyloxapol and DPI-treated Hela cells. A representative histogram showing the change in ethidium fluorescence intensity in untreated cells (A) ,cells pretreated with 10µM DPI for 15min. followed by adding 500 µg/mL tyloxapol for 1h (B), and cells treated with 500 µg/mL tyloxapol for 1h (C).



附圖一、Tyloxapol 結構式



附圖二、活性氧分子(ROS) 在細胞內的轉變與對細胞的傷害



附圖三、Cell-counting kit-8 測細胞存活率之化學反應與結構式



附圖四、細胞毒性測試之實驗步驟



附圖五、DCFH-DA 螢光染劑之作用原理



附圖六、檢測H2O2的變化之實驗步驟



附圖七、HE 螢光染劑之作用原理



附圖八、檢測O2的變化之實驗步驟



附圖九、R123 螢光染劑之結構式



附圖十、粒線體膜電位的測定之實驗步驟











附圖十三、細胞週期分析之實驗步驟



附圖十四、Tyloxapol 對受 LPS 刺激後的 U937 細胞產生抗氧化作用之實驗