

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

抑制自體吞噬對經檳榔子成分長期刺激後的食道癌細胞提升順
鉑療效之機轉研究—經刺激的上皮癌細胞可能比未經刺激的細
胞對抑制自體吞噬更為敏感

報告類別：成果報告

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 111-2635-B-041-001-

執行期間：111年08月01日至112年07月31日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學保健營養系(含碩士班)

計畫主持人：林美惠

共同主持人：劉永超

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：謝允中
大專生-兼任助理：張薺心

本研究具有政策應用參考價值：☒否 ☐是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)
本研究具影響公共利益之重大發現：☐否 ☐是

中 華 民 國 112 年 10 月 30 日

中文摘要：抑制自體吞噬 (autophagy inhibition, AI) 已在治療各種腫瘤上成為亮眼的新策略；然而由於自體吞噬在腫瘤的發展上扮演了雙重角色，目前究竟那些癌適合透過抑制自體吞噬加以治療，仍有待確認。我們過去的研究顯示，經檳榔子萃取液 (areca nut extract, ANE) 30-100 kDa 的部分 (ANE 30-100K) 長期刺激之後的腫瘤，可透過調升自體吞噬的活性進而提高對壓力環境的適應力，包含無血清與順鉑等。此外，CAS 亦可促進食道上皮癌 CE81T/VGH 細胞在培養基與裸鼠中的生長，並且這些生長優勢均可被自體吞噬抑制劑氯喹 (chloroquine, CQ) 與 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 所抑制；這兩種抑制劑也被證實對經 CAS 的細胞與順鉑 (cisplatin, DDP) 有協同的抑癌效果。這些發現可能意味著經 ANE 30-100K 刺激後的腫瘤細胞可能對自體吞噬上癮，並且比未經刺激的細胞對抑制自體吞噬更為敏感。我們最近的研究數據支持這項可能性：經過 CAS 的細胞在裸鼠體內的生長對 CQ 或 3-MA 的治療比未經 CAS 的 CE81T/VGH 細胞更為敏感。本計畫預計先比較在經 CAS 與未經 CAS 的 CE81T/VGH 細胞中，AI 與 DDP 的單獨與合併使用在體內與體內之療效，並探討其中 DDP 之抗藥機轉。由於 CQ 與 3-MA 具有與抑制自體吞噬無關的非特異性活性，故除 CQ 與 3-MA 外，我們會利用短髮夾 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的策略來抑制與自體吞噬相關的 atg5 基因之表現，藉以達成特異性的 AI 效果。正因具致癌性的檳榔子在我國仍非常受歡迎，並且跟食道與口腔上皮癌的發生率有密切的相關性，在計畫中我們亦擬採用口腔鱗狀細胞上皮癌 SCC15 細胞，以同樣的策略分析 AI 是否在 SCC15 亦有如同在 CE81T/VGH 中所觀察到的效益。最後，本計畫預期能提供特別是在治療經 CAS 的上皮癌細胞時的轉譯醫學參考。

中文關鍵詞：檳榔子、自體吞噬、食道上皮癌、口腔上皮癌、3-甲基腺嘌呤、氯喹、順鉑、Atg5、短髮夾核糖核酸

英文摘要：Autophagy inhibition (AI) has been highlighted as a new strategy for treating various types of cancers; however, due to the dual roles of autophagy in tumor development, which types of cancers are suitable for such treatment remain currently to be confirmed. Our previous studies revealed that tumor cells chronically stimulated with the 30-100 kDa fraction of areca-nut-extract (ANE 30-100K) exhibited stronger resistance against stressed environments including serum-free (SF) conditions and cisplatin (DDP) through elevation of higher autophagy activity. In addition, the growth of esophageal carcinoma CE81T/VGH cells in both culture medium and nude mice was significantly enhanced by chronic ANE 30-100K stimulation (CAS), which could be attenuated by autophagy inhibitors chloroquine (CQ) and 3-methyladenine (3-MA). Meanwhile, both inhibitors synergistically enhanced anti-tumor effects of DDP on CAS-treated cells both in vitro and in vivo. These findings raised a possibility that CAS-treated tumor cells could become autophagy addicted and more sensitive to

AI compared to naïve cells. Our recent data supported this possibility: the growth of CAS-treated CE81T/VGH cells in nude mice was more sensitive to either CQ or 3-MA monotherapy than control CE81T/VGH cells. This project firstly is to compare the in vitro and in vivo effects of both single and combined treatments of AI and DDP on CAS-treated and untreated CE81T/VGH cells, as well as investigation of the underlying mechanism of DDP resistance. In addition to CQ and 3-MA, we will knock down the expression of autophagy-related atg5 gene by using short hairpin RNA (shRNA) strategy to achieve specific AI purpose, because studies have shown that some non-specific activities of CQ and 3-MA are irrelevant to AI. As the carcinogenic areca nut (AN) is still popular in our country and closely correlated with incidences of esophageal and oral squamous cell carcinomas, we also plan to use the same strategies to address whether therapeutic advantages of AI observed in CE81T/VGH cells can be applied to oral squamous cell carcinoma SCC15 cells in this project. Finally, this project is expected to provide translational reference especially for carcinoma cells encountered with CAS.

英文關鍵詞：areca nut, autophagy, esophageal carcinoma, oral carcinoma, 3-methyladenine, chloroquine, cisplatin, atg5, shRNA

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

抑制自體吞噬對經檳榔子成分長期刺激後的食道癌細胞提升順鉑
療效之機轉研究—經刺激的上皮癌細胞可能比未經刺激的細胞對

抑制自體吞噬更為敏感

報告類別：☐進度報告

☒成果報告：☐完整報告/☐精簡報告

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：NSTC 111-2635-B-041-001-

執行期間：111 年 8 月 1 日至 112 年 7 月 31 日

執行機構及系所：嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫主持人：林美惠

共同主持人：劉永超

計畫參與人員：張薺心、謝允中

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

☐執行國際合作與移地研究心得報告

☐出席國際學術會議心得報告

☐出國參訪及考察心得報告

本研究具有政策應用參考價值：☒否 ☐是，建議提供機關_____

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：☒否 ☐是

中 華 民 國 112 年 10 月 30 日

目錄

中、英文摘要及關鍵詞	I
------------	---

報告內容

背景介紹	1
------	---

進度報告	5
------	---

附件一	6
-----	---

附件二	52
-----	----

中英文摘要及關鍵詞

中文摘要

抑制自體吞噬 (autophagy inhibition, AI) 已在治療各種腫瘤上成為亮眼的新策略；然而由於自體吞噬在腫瘤的發展上扮演了雙重角色，目前究竟那些癌適合透過抑制自體吞噬加以治療，仍有待確認。我們過去的研究顯示，經檳榔子萃取液 (areca nut extract, ANE) 30-100 kDa 的部分 (ANE 30-100K) 長期刺激之後的腫瘤，可透過調升自體吞噬的活性進而提高對壓力環境的適應力，包含無血清與順鉑等。此外，CAS 亦可促進食道上皮癌 CE81T/VGH 細胞在培養基與裸鼠中的生長，並且這些生長優勢均可被自體吞噬抑制劑氯喹 (chloroquine, CQ) 與 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 所抑制；這兩種抑制劑也被證實對經 CAS 的細胞與順鉑 (cisplatin, DDP) 有協同的抑癌效果。這些發現可能意味著經 ANE 30-100K 刺激後的腫瘤細胞可能對自體吞噬上癮，並且比未經刺激的細胞對抑制自體吞噬更為敏感。我們最近的研究數據支持這項可能性：經過 CAS 的細胞在裸鼠體內的生長對 CQ 或 3-MA 的治療比未經 CAS 的 CE81T/VGH 細胞更為敏感。本計畫預計先比較在經 CAS 與未經 CAS 的 CE81T/VGH 細胞中，AI 與 DDP 的單獨與合併使用在體內與體內之療效，並探討其中 DDP 之抗藥機轉。由於 CQ 與 3-MA 具有與抑制自體吞噬無關的非特異性活性，故除 CQ 與 3-MA 外，我們會利用短髮夾 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的策略來抑制與自體吞噬相關的 atg5 基因之表現，藉以達成特異性的 AI 效果。正因具致癌性的檳榔子在我國仍非常受歡迎，並且跟食道與口腔上皮癌的發生率有密切的相關性，在計畫中我們亦擬採用口腔鱗狀細胞上皮癌 SCC15 細胞，以同樣的策略分析 AI 是否在 SCC15 亦有如同在 CE81T/VGH 中所觀察到的效益。最後，本計畫預期能提供特別是在治療經 CAS 的上皮癌細胞時的轉譯醫學參考。

關鍵詞：檳榔子、自體吞噬、食道上皮癌、口腔上皮癌、3-甲基腺嘌呤、氯喹、順鉑、Atg5、短髮夾核糖核酸

Abstract

Autophagy inhibition (AI) has been highlighted as a new strategy for treating various types of cancers; however, due to the dual roles of autophagy in tumor development, which types of cancers are suitable for such treatment remain currently to be confirmed. Our previous studies revealed that tumor cells chronically stimulated with the 30-100 kDa fraction of areca-nut-extract (ANE 30-100K) exhibited stronger resistance against stressed environments including serum-free (SF) conditions and cisplatin (DDP) through elevation of higher autophagy activity. In addition, the growth of esophageal carcinoma CE81T/VGH cells in both culture medium and nude mice was significantly enhanced by chronic ANE 30-100K stimulation (CAS), which could be attenuated by autophagy inhibitors chloroquine (CQ) and 3-methyladenine (3-MA). Meanwhile, both inhibitors synergistically enhanced anti-tumor effects of DDP on CAS-treated cells both *in vitro* and *in vivo*. These findings raised a possibility that CAS-treated tumor cells could become autophagy addicted and more sensitive to AI compared to naïve cells. Our recent data supported this possibility: the growth of CAS-treated CE81T/VGH cells in nude mice was more sensitive to either CQ or 3-MA monotherapy than control CE81T/VGH cells. This project firstly is to compare the *in vitro* and *in vivo* effects of both single and combined treatments of AI and DDP on CAS-treated and untreated CE81T/VGH cells, as well as investigation of the underlying mechanism of DDP resistance. In addition to CQ and 3-MA, we will knock down the expression of autophagy-related atg5 gene by using short hairpin RNA (shRNA) strategy to achieve specific AI purpose, because studies have shown that some non-specific activities of CQ and 3-MA are irrelevant to AI. As the carcinogenic areca nut (AN) is still popular in our country and closely correlated with incidences of esophageal and oral squamous cell carcinomas, we also plan to use the same strategies to address whether therapeutic advantages of AI observed in CE81T/VGH cells can be applied to oral squamous cell carcinoma SCC15 cells in this project. Finally, this project is expected to provide translational reference especially for carcinoma cells encountered with CAS.

Keywords: areca nut, autophagy, esophageal carcinoma, oral carcinoma, 3-methyladenine, chloroquine, cisplatin, atg5, shRNA

Progress Report

Experimental results in the past one year:

We have been performing some analyses for this project by the college students of the Department of Biotechnology and confirmed that autophagy inhibition may have the advantage to treat CAS-treated cells. The detailed results including further purification of the active autophagy-inducing ingredient by isoelectric focusing (IEF) are shown in the appendix I and II.

We have also been doing our research by collaborating with the laboratory of Oral and Maxillofacial Surgery in Chi Mei Medical Center for two decades. However, after application of this project, we were told to cease the cooperation with the Laboratory of Oral and Maxillofacial Surgery in Chi Mei Medical Center by the director of Dental Department. Furthermore, I have been transferred from Department of Biotechnology to the Department of Health and Nutrition for two years. Last year I was arranged to change my position again to the Department of Life and Health Science. Thus, I decided to collaborate with Dr. Chung-Chi Lin at the College of Biological Science and Technology in National Yang Ming Chiao Tung University. Unfortunately, his graduate student Yun-Chong Hsieh (謝允中) failed to prepare the active ANE 30-100K and no further progress has been made.

Appendix I

嘉南藥理大學 生物科技系

Department of Biotechnology

Chia-Nan University of Pharmacy and Science

生技專題製作論文

(專題實作組)

誘導自體吞噬的檳榔子成分之純化與其對腫瘤生長之影響

Purification of the autophagy-inducing areca nut ingredient
and its impact on tumor growth

指導教授：劉永超 博士 (Dr. Young-Chau, Liu)

林美惠 博士 (Dr. Mei-Huei, Lin)

專 題 生：林子嵐 (Zi-Lan, Lin)

許証翔 (Zheng-Xiang, Xu)

班 級：藥粧四甲、生科四甲

摘要

我們過去發現檳榔子的汁液 (areca-nut-juice, ANJ) 可誘導細胞進行自體吞噬 (autophagy) , 且此活性位於分子量 30~100 kDa 之間, 命名為 ANJ 30-100K。目前初步分析後, 只知此成分可能為蛋白酶, 故本研究的第一部分為進一步純化其中的活性分子。此外, 我們也證實了不同的癌細胞, 在經過低濃度且不具細胞毒性的 ANJ 30-100K 刺激三週 (chronic ANJ 30-100K stimulation, CAS) 之後, 會透過增強本身的自體吞噬作用而對無血清的環境有較高耐受性; 此外, 動物實驗亦顯示, 經過 CAS 的食道癌 CE81T/VGH 細胞在裸鼠體內有較佳的生長, 且均能被自體吞噬抑制劑 3-甲基腺嘌呤 (3- methyladenine, 3-MA) 與氯喹 (chloroquine, CQ) 有效地抑制。本研究的第二部分旨在比較經 CAS 的 CE81T/VGH 細胞在裸鼠體內的生長, 是否比未經 CAS 的細胞對自體吞噬抑制劑更為敏感。目前初步純化的結果顯示, 我們可用等電位聚焦法 (isoelectric focusing, IEF) 進一步分離了 ANJ 30-100K 中誘導自體吞噬的活性。另外, 動物實驗結果則證實 3-MA 對未經 CAS 處理的 CE81T/VGH 在裸鼠體內的生長並無明顯的影響; 相對地, 經 CAS 處理的 CE81T/VGH 在裸鼠體內雖有較佳的生長情形, 但是卻對 3-MA 的治療有顯著的反應。最近我們亦採用 atg5 shRNA 來取代 3-MA , 結果只能部分抑制腫瘤的生長 (將於本文的結果與討論詳述)。事實上, 本實驗室也曾以 CQ 進行相同的動物實驗且有與

3-MA 類似的結果。綜合這些結果，我們認為經 CAS 後的癌細胞可能對自體吞噬的抑制更為敏感。

關鍵字：檳榔子、等電位聚焦法、自體吞噬、3-甲基腺嘌呤、裸鼠

目錄

摘要	I
目錄	III
圖目錄	VII
縮寫表	VIII
第一章 緒言	1
1-1 檳榔歷史及相關現況	1
1-2 咀嚼檳榔與口腔癌的相關性	2
1-3 檳榔嚼塊介紹.....	3
1-4 檳榔子成分對細胞之影響	4
1-5 細胞死亡的方法.....	5
1-6 細胞凋亡（ Apoptosis ）	6
1-7 自體吞噬（ Autophagy ）.....	7
1-8 RNA 干擾（ RNA interference, RNAi ） 介紹及作用機制	8
1-9 檳榔子萃取物 30-100k （ ANJ 30-100K ） 的發現	10
1-10 研究動機.....	11
第二章 材料與方法	13
2-1 儀器、器材與試劑.....	13
2-1-1 儀器.....	13

2-1-2	器材.....	14
2-1-3	試劑.....	15
2-2	實驗方法.....	19
2-2-1	細胞株的種類及來源	19
2-2-2	細胞培養方法	19
2-2-3	檳榔子萃取液（ANJ 30-100K）的製備.....	19
2-2-4	檳榔子萃取液（ANJ 30-100K）濃縮制備過程.....	20
2-2-5	細胞存活率分析（Cell viability assay）	20
2-2-5.1	種細胞（Seeded Cell）	20
2-2-5.2	細胞毒性測試	21
2-2-5.3	XTT 試驗	21
2-2-5.4	CAS 濃度最佳篩選.....	22
2-2-6	西方墨點法（Western Blot）	22
2-2-6.1	細胞內液提取（collection of cell lysate）	22
2-2-6.2	蛋白質濃度測定（protein assay）	23
2-2-6.3	鑄膠：配製 12% SDS PAGE	24
2-2-6.4	電泳及轉漬	24
2-2-7	IEF（1D）	26
2-2-7.1	前置處理	26

2-2-7.2	膠體製程樣品	27
2-2-7.3	膠條製程樣品並餵養細胞	28
2-2-8	動物實驗	28
2-2-8.1	飼養環境	28
2-2-8.2	異種移植	29
2-2-8.3	藥物治療	29
2-2-8.4	人道犧牲裸鼠	30
2-2-8.5	腫瘤蛋白抽取	30
第三章	結果與討論	31
3.1	ANJ 30-100K 對 CE81T/VGH 細胞毒性之測試	31
3.2	ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引起之細胞外觀變化	31
3.3	不同濃度的 ANJ 30-100K 刺激 CE81T/VGH 三週後，對無血清環境耐受性之影響	32
3.4	經過 CAS 的 CE81T/VGH 在裸鼠體內對 3-MA 有較高的敏感性	32
3.5	以 atg5 shRNA 治療經 CAS 的腫瘤以及其對腫瘤中 Atg5 的表現量與自體吞噬的影響	33
第四章	結論	34

參考文獻.....	35
附圖.....	44

圖目錄

圖 一、ANJ 30-100K 對 CE81T/VGH 細胞毒性之測試.....	44
圖 二、ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引起之細胞外觀變化	46
圖 三、不同濃度的 ANJ 30-100K 刺激 CE81T/VGH 三週後對無血清環境耐受性之影響.....	48
圖 四、經過 CAS 的 CE81T/VGH 在裸鼠體內對 3-MA 有較高的敏感性.....	49
圖 五、以 atg5 shRNA 治療經 CAS 的腫瘤以及其對腫瘤中 Atg5 的表現量與自體吞噬的影響.....	51

縮寫表

AN : Areca Nut

ANJ : Areca nut juice

APS : Ammonium persulfate

BQ : Betel quid

BSA : Bovine Serum Albumin

CAS : Chronic ANJ 30-100k Stimulation

CE81T / VGH : Esophageal Epithelial Cancer

DMEM : Dulbecco' s Modified Eagle Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

FBS : Fetal Bovine Serum

NC : Nitrocellulose

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PMS : N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SF : Serum-Free

TBST : Tris-Buffered Saline with Tween

TEMED : Tetramethylethylenediamine

PVDF : Polyvinylidene Fluor VIII

XTT : Sodium3'-[1- (phenylamino-carbonyl) -3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) Benzene Sulfonic Acid Hydrate

3-MA : 3-Methyladenine

第一章 緒言

1-1 檳榔歷史及相關現況

人類嚼食檳榔的習慣在世界各地已延續數千年之久，以台灣原住民來說，他們透過檳榔的交換與共同的嚼食經驗，來建立或強化族群與文化的認同，甚至將檳榔當作定情禮物以及治療疾病和防止瘟疫等⁽¹⁾。明朝時漢人移民台灣，發現原住民嚼食檳榔塊並入境隨俗。日據時代時，日本人禁止種植及嚼食檳榔塊，一直到台灣光復後檳榔才恢復種植⁽²⁾。

行政院農業委員會於 96 年 9 月訂定「檳榔產業專案輔導措施」為防範檳榔對國人健康造成危害，並維護國土保育，甚至於 103 年 9 月 3 日制定「檳榔管理方案」使近年來種植檳榔面積逐漸減少⁽³⁾，但根據 2018 年行政院農業委員會國內主要農產品種植面積最新統計為例，我國檳榔種植面積還是以 4 萬 2510 公頃位居第一⁽⁴⁾。

自民國 107 年資料顯示，國人以男性 40-49 歲嚼食檳榔率最高（10.7%），男性明顯多於女性，以教育程度來看則是以國中生比率最高（14.4%），職業別方面以技術性工人最多（21.6%），且咀嚼率最高的縣市分別為台東縣、花蓮縣、南投縣、嘉義縣和屏東縣，這些都是檳榔產量較高的縣市，由此可知，產量越高其嚼檳榔率越高，多集中在中南部及東部原住民鄉⁽⁵⁾。

1-2 咀嚼檳榔與口腔癌的相關性

檳榔嚼塊（Betel quid, BQ）和其主要成分檳榔子（Areca Nut, AN）被世界衛生組織國際癌症研究機構（International Agency for Research on Cancer, IARC）認為對人類具高度致癌性，且檳榔子在 2003 年認定為第一類致癌物。

在嚼食檳榔過程中不只對口腔黏膜上皮有增生、癌化的作用，對於黏膜上皮下的結締組織也有影響，其最主要的變化是口腔黏膜下纖維化，纖維化的組織，其膠原蛋白沈澱多，故較硬而無彈性，導致這些部位的細胞產生病變，也會讓使用者在食用後有保暖和提神的作用，這使得檳榔嚼塊成為全球四大的精神性物質之一，也造成全世界約有 6 億人口是檳榔嚼塊的使用者，台灣根據行政院衛生署國民健康局統計的資料顯示有約 8.5% 人口嚼食檳榔，表示大約近九成的人有嚼食檳榔的習慣^(6,7,8,9)。

在檳榔相關研究中，檳榔的使用與口腔癌的發生是呈正相關性的⁽¹⁰⁾。自民國 84 年起，口腔癌就已是國內十大癌症之一⁽¹¹⁾，其中九成以上的口腔癌為鱗狀上皮癌細胞⁽¹²⁾，民國 108 年死亡人數共 17 萬 5424 人，死於惡性腫瘤的佔了 28.6%，比上年增加 1.8%，在惡性腫瘤中死於口腔癌（含口咽和下咽）的人數佔了 14.5%，比上年增加了 4.5%，是國內十大癌症第五名⁽¹³⁾。

1-3 檳榔嚼塊介紹

檳榔嚼塊包括檳榔子及添加物，像是荖花、荖藤、紅灰及石灰等，隨者文化的差異，各國檳榔的組成也略微不同⁽¹⁴⁾。這些配料中有些已證實具有致癌性化學物質，其中，荖花（指雌性荖藤的花穗）內含致癌物黃樟素（Safrole）已被證實為一級癌症藥物，且在 1960 年時已被美國列為禁用之食品致癌物質⁽¹⁵⁾，民國 106 年我國將黃樟素禁用於化粧品中⁽¹⁶⁾。荖藤在長期嚼食情況下，可能產生強烈化學性刺激的亞硝基致癌物質。石灰、紅灰主要成分是氫氧化鈣，會在口腔內造成高鹼性環境，使釋放出活性氧或含氧自由基，破壞口腔黏膜細胞，導致表皮細胞不正常增生及變異，進而演變成口腔癌^(17,18)。檳榔組成中最不可或缺的主要成分檳榔子其中的檳榔鹼（Arecaidine）、檳榔素（Arecoline）和多酚類都被證實具有潛在致癌性，即使不添加紅灰、白灰、荖葉、荖花和荖藤咀嚼，其本身就會致癌⁽¹⁹⁾。

在嚼食檳榔過程中，檳榔與其他添加物會對消化道及口腔部位造成無法避免的直接刺激，像是活性氧的生成、檳榔子粗纖維造成的黏膜傷害、細胞毒性後之組織增生和檳榔中成分直接刺激細胞分裂等機轉，進一步導致過度角化、口腔黏膜纖維化（Oral Submucous fibrosis, OSF）、白斑和紅斑等生成，約 18% 口腔癌前病變將發展為鱗狀上皮癌細胞^(20,21)。

1-4 檳榔子成分對細胞之影響

檳榔子 (Areca nut, AN) 是由醣類、多酚類化合物 (Polyphenolic Compounds)、脂肪、粗纖維 (Crude Fiber)、單寧 (Tannin)、銅和各種生物鹼，包括細胞凋亡誘導劑檳榔鹼及會刺激副交感神經作用的檳榔素等組成^(22,23)。

檳榔生物鹼成分包括檳榔素 (Arecoline)、檳榔次鹼 (Arecaidine)、四氫菸酸 (Guvacine)、四氫菸酸甲脂 (Gucacoline)⁽²⁴⁾，硝化反應產生四種亞硝胺，分別為 3-(methylnitro-samino)-propionaldehyde (MNPA)、N-nitrosoguvacine (NGC)、3-(methylnitrosamino)-propionitrile (MNPN) 和 N-nitrosoguvacoline (NG)。MNPN 對培養人類上皮細胞具有高度的細胞毒性和遺傳毒性是檳榔咀嚼物中主要誘發腫瘤的原因⁽²⁵⁾。

檳榔鹼 (arecaidine) 和檳榔素 (arecoline) 會在口腔中硝化產生亞硝胺，在研究中證實了硝化衍生物會誘導實驗動物長出腫瘤⁽¹⁷⁾。除生物鹼外，檳榔具有金屬含量中較高的銅，檳榔鹼的存在增加了銅的氧化還原電位，從而導致 DNA 切割增強，從而產生細胞凋亡反應^(27,28,29)。多酚類則是抑制膠原蛋白使其堆積硬化，再加上與檳榔添加物石灰和紅灰作用的情況下使口腔在鹼性環境下釋放出對細胞具傷害性的活性氧 (Reactive Oxygen Species) 或超氧自由基 (Superoxide Radical)^(17,26)。近年研究更進一步發現，高濃度的檳榔素會促使細胞走向細胞凋亡 (Apoptosis)。

1-5 細胞死亡的方法

細胞死亡方式可以分為程序性死亡（programmed cell death, PCD）和非程序性死亡（non-programmed cell death, NPCD）兩種⁽³⁰⁾。

程序性死亡可分為第一類型程式性死亡（Type I cell death），又稱為細胞凋亡（apoptosis）；第二類型的程式性死亡（Type II cell death），又稱為自噬作用或自體吞噬（autophagy）⁽³¹⁾。細胞凋亡是在細胞正常生理條件下主動進行的反應，意旨細胞的死亡方式是有計畫性的，目的是為了要移除在發育過程中不必要的細胞，確保組織器官正常生長發育⁽³²⁾。因為溶酶體相對完整通常不太會引發發炎反應，發生時凋亡細胞會和其周圍的細胞脫離且皺縮，在組織裡都是極少數發生的且就算有發炎物質也很快地被周圍的細胞吞噬掉⁽³³⁾。其特徵是細胞膜皺縮、細胞染色體濃縮和 DNA 片段化等⁽³⁴⁾。

非程式性的細胞死亡又稱為細胞壞死（necrosis）⁽³⁰⁾。指細胞受到物理性或化學性的外來壓力刺激而導致的，像是細胞缺氧、面臨高溫低溫、pH 異常及極端變化等，是一種被動的死亡方式^(30,35)。細胞壞死後會發生自溶的現象，並在壞死局部引發急性炎症反應，使細胞和細胞裡的胞器像是內質網和粒線體腫脹後並脹破，導致細胞裂解，這樣的死亡細胞會因溶酶體破裂而引起發炎反應^(33,34)。

1-6 細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡主要是由硫胺酸蛋白酶 (caspase) 這種蛋白質進行調控。Caspase 可細分為 initiator caspase (啟動者硫胺酸蛋白酶) 包含了 Caspase 2、8、9 及 10，其功能主要是負責活化； Effector caspase (執行者硫胺酸蛋白酶) 包含了 Caspase 3、6、7，則是實際上去執行細胞凋亡工作的蛋白酶⁽³²⁾。

細胞凋亡可分為內途徑 (intrinsic pathway) 和外途徑 (extrinsic pathway)。內途徑是當細胞受到刺激，像是細胞激素缺乏、病毒感染、UV 照射或 DNA 受損等的壓力，導致細胞接收到訊號誘導細胞凋亡時，訊號會活化細胞膜上的接受器，進而活化了第八型和第十型硫胺酸蛋白酶 (caspase)，使粒線體膜的通透性增加，使粒線體內膜是電子傳遞鏈 (electron transport chain) 中重要分子的細胞色素 c (cytochrome c) 釋放出。當細胞色素 c 離開粒線體進入細胞質後，會和凋亡酶激活因素 (Apoptotic protease activating factor -1 ; Apaf-1) 結合，之後再和 Pro-caspase-9 形成 Apoptosome。此時 Pro-caspase- 9 會受到蛋白酶分解的切割獲得活性，成為活化型 caspase- 9 再活化下游的 Effector caspase，最後造成細胞凋亡。而外途徑的細胞凋亡是不經由粒線體途徑，而是經活化細胞膜上的接受器，進一步活化第八型和第十型硫胺酸蛋白酶後，直接活化下游分子 Effector caspase，最後造成細胞凋亡^(32,36)。

1-7 自體吞噬 (Autophagy)

自體吞噬是當細胞遭受到壓力，例如飢餓、UV 照射、缺氧、自由基、藥物刺激等時，可調控細胞內非重要成分的消化及再利用，也參與移除存活時間長的蛋白質、已退化或受損的胞器或某些成分等以提供空間給新成分的各種生理過程，是唯一能破壞整個胞器如粒線體、過氧化體及內質網的作用，但若養分還是不足以提供生存，細胞最終還是會死亡⁽³⁷⁾。

依照吞噬蛋白質的方式不同可分為巨自噬作用 (macroautophagy) 一般 autophagy 指的都是此種吞噬模式，主要是吞噬較大的蛋白質或胞器，例如粒線體、內質網等膜狀胞器，是最常誘導的一種自體吞噬^(38,39)；微自噬作用 (microautophag) 是指吞噬較小的蛋白質，需要靠某些特定的接合分子，來辨識這些物質，溶酶體的胞膜去形成細胞內的囊泡，包覆細胞質內待消化分解的蛋白質，其形式類似 macroautophagy⁽³⁹⁾；伴護蛋白調控的自噬作用 (chaperon-mediated autophagy)，具特定辨識訊號蛋白質，細胞藉由伴護蛋白複合體 (chaperone complex) 攜帶蛋白質到溶酶體的一種消化蛋白質模式^(37,40)。

當 Autophagy 形成的初期時，會從細胞膜或是內質網形成半月型的雙層膜並逐漸向兩邊延伸，ULK / Atg1 複合物激活 III 類磷酸肌醇 3-激酶 (class III phosphatidylinositol 3-kinase) 複合物，該複合物將一系列 Atg 蛋白聚集到分離膜 (自噬泡) 中，將欲降解的物質包覆住，即為自噬泡之形

成，同時游離在細胞質中的管連結蛋白第三型輕鍊-I（Microtubule-associated protein light chain 3-ILC3-I）會和磷脂醯乙醇胺（Phosphatidylethanolamine, PE）進行脂化作用形成管連結蛋白第三型輕鍊-II（Microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II），並堆積在自噬泡的膜表面，因此可以根據 LC3-II 的多寡作為 Autophagy 的指標之一。自噬泡會和溶酶體結合形成自噬溶酶體（Autophagolysosome），透過溶酶體內的酵素消化自噬泡所包裹的胞器或蛋白質^(41,42,43)。

1-8 RNA 干擾（RNA interference, RNAi）介紹及作用機制

RNA 干擾（RNAi）已被廣泛應用在體內和體外分析動植物細胞基因功能的實驗技術⁽⁴⁴⁾。它透過轉運到細胞的細胞質中雙股 RNA（double-strand RNA, dsRNA）激活使得目標基因的 mRNA 降解以選擇性抑制或沉默基因的轉譯及轉錄的表達⁽⁴⁵⁾。

RNAi 機制路徑主要透過 miRNA pathway（micro RNA）和 siRNA pathway（small interfering RNA）及 shRNA pathway（small hairpin RNA）誘導特定的 mRNA 降解⁽⁴⁶⁾。

內源性路徑也就是 miRNA pathway（micro RNA）是由細胞自行生成的。miRNA 是短的非編碼 RNA，可通過轉錄後抑制靶基因來調節基因表達⁽⁴⁷⁾。miRNA 形成前會以較大的前體型式在細胞核內由 RNA pol II 轉

錄出具有髮夾結構（hairpin structure or stem-loop structure）的產物，稱為起始微 RNA 轉錄物（primary microRNA transcript, pri-miRNA），長度約 300-1000 個鹼基，再經由屬於核糖核酸酶 III 的 Drosha 蛋白酶的剪切下修飾成保有莖-環結構的 miRNA 前驅物（precursor miRNA, pre-miRNA），長度大約為 70~90 個鹼基，然後由轉運蛋白 Exportin 5 輸出到細胞質中⁽⁴⁸⁾，隨後在核糖核酸酶 III 的 Dicer 酶作用下將莖-環結構剪切形成雙股 miRNA，接著正股（sense strand）會被降解，反股（anti-sense strand）則在 RNA 解旋酶的作用下形成成熟的 miRNA 並與 AGO2（Argonaute 2）和 RNA 誘導沉默複合物（RNA-inducing silencing complex, RISC）結合使其更穩定，主要透過與目標 mRNA 分子的 3' 端非編碼區域互補配對黏合，從而抑制轉譯⁽⁴⁹⁾，或著與目標 mRNA 結合，使其降解⁽⁵⁰⁾。

外源性路徑 siRNA pathway（small interfering RNA）及 shRNA pathway（small hairpin RNA），來自病毒、細菌感染，或是實驗室合成的雙股 RNA，可利用長鏈雙股 RNA（在哺乳動物細胞中會引起導致所有蛋白質合成停止的抗病毒干擾素應答（IR））或送入會表現 siRNA 的載體等方法來激活。首先由 Dicer 酶將長片段 dsRNA 切割成 21-23 個核苷酸大小的 siRNA，且此 5' 端帶有一個磷酸團基，而 3' 端會突出兩個核苷酸，接著 siRNA 會與 AGO2-RISC 複合物結合⁽⁵¹⁾，後來發生的一系列反

應與 miRNA pathway 相似，最後序列特異性地結合在目標 mRNA 上並造成直接性的切割。

另一個外源性途徑是 shRNA pathway，將 shRNA 經由細菌轉染（Transfection）或病毒載體轉導（Transduction）細胞的細胞核中合成，形成髮夾結構，透過 miRNA pathway 將 shRNA 加工成 siRNA⁽⁴⁶⁾，一旦與 AGO2-RISC 複合物結合，其降解過程是相同的。本實驗是利用 pLKO.1 Vector 於細胞中表現出 atg5 shRNA（委託中央研究院製作）。

1-9 檳榔子萃取物 30-100k（ANJ 30-100K）的發現

根據我們先前的研究發現，經過檳榔子萃取物（Areca Nut Juice, ANJ）誘導後的細胞死亡外觀變化呈現的是膨大變圓且細胞質被清空，且發現細胞內出現許多小空泡的形成，證實小空泡即為自噬泡（Autophagosome），利用吖啶橙染色（Acridine Orange Stain）發現酸性泡的產生，也利用西方墨點法（Western Blotting）證實經過 ANJ 處理後的細胞會導致自體吞噬（Autophagy）的指標性蛋白質為管連結蛋白第三型輕鍊 - II（Microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II）產生大量堆積。

進一步純化發現 ANJ 其 30-100 kDa 的部分會誘導細胞自體吞噬，稱之 ANJ 30-100 kDa，若再額外加入溶酶體抑制劑，阻斷自噬泡及溶酶體的結合，則使 LC3-II 更加大量表現，證實了 ANJ 30-100K，會促使自體吞

噬的流通（Autophagic Flux），也能誘導 ROS 使得不同細胞像是口腔癌、食道癌細胞、正常纖維母細胞、週邊血液淋巴球及白血病的 Jurkat T 增加自體吞噬的能力^(52,53,54,55)。

AN 誘導的 Autophagy 成分（autophagy-inducing AN ingredient, AIAI）通過格形蛋白（clathrin）介導的內吞作用誘導自體吞噬⁽⁵⁶⁾，即使 ANJ 含有檳榔鹼這種的凋亡誘導劑，但研究證明 ANJ 30-100K 本身不能激活 caspase-3⁽⁵⁷⁾。

慢性 ANJ 30-100K 刺激（chronic ANJ 30-100K stimulation, CAS）增加了自體吞噬相關基因的表達以及對環境壓力產生更大的抵抗力，且 CAS 可以顯著提高 LC3-II 和 Beclin 1 的蛋白水平⁽⁵⁸⁾。

1-10 研究動機

我們試圖進一步以等電位聚焦法，來純化 ANJ 30-100K 之中誘導自體吞噬的成分；作法是 ANJ 30-100K 經等電位聚焦後，將膠條分為十二等分，並分析其中的內含物是否能引起與 ANJ 的作用相似的外觀變化。

我們已知高濃度檳榔子（Areca Nut, AN）的汁液（AN Juice, ANJ）與其 30-100 kDa 的部分（ANJ 30-100K）可誘導細胞進行自體吞噬（autophagy）的死亡，但是低濃度（不具細胞毒性）的 ANJ 或 ANJ 30-100K 在處理不同的癌細胞三週之後（CAS），增加了癌細胞對抗環境

壓力產生了抵抗力，對未經 CAS 處理的 CE81T/VGH 在裸鼠體內的生長並無明顯的影響；相對地，經 CAS 處理的 CE81T/VGH 在裸鼠體內有較佳的生長情形，且均能被自體吞噬抑制劑 3-甲基腺嘌呤（3- methyladenine, 3-MA）與氯喹（chloroquine, CQ）有效地抑制，本研究擬進一步分析 CAS 的處理是否可使腫瘤細胞對 3-甲基腺嘌呤（3- methyladenine, 3-MA）的治療更為敏感？

先前利用 shRNA 技術，抑制了人類口腔鱗狀細胞上皮癌 OECM-1 和人類食道上皮癌細胞 CE81T/VGH 中 Atg5 蛋白的表現，發現可以有效降低由 ANJ 30-100K 所誘導的自體吞噬，我們進一步探討 Atg5 蛋白在裸鼠體內生長的影響，並利用西方墨點法來偵測 Atg5 及 LC3-II 的表達，評估是否有效的抑制由 ANJ 30-100K 所誘導的自體吞噬。

第二章 材料與方法

2-1 儀器、器材與試劑

2-1-1 儀器

秤量天平 (PB602-S; AG285)	Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland
恆溫水槽 (Water bath, BC-2D 18L)	WISDOM, Kachsiung, Taiwan
離心機 (Centrifuge, Eppendorf AG 22331)	CAMR, Hamburg, Germany
高速冷凍離心機 (Centrifuge, MIKRO 22R)	Hettich, Tuttelingen, Germany
震盪器 (Vortex, Genie-2)	Scientific Industries, New York, USA
逆滲透水 (RO H ₂ O)	MILLIPORE, Billreica, USA
二次過濾水 (Milli-Q H ₂ O)	MILLIPORE, Billreica, USA
冰箱 (Fridge, NR-M660MG)	National, Taipei, Taiwan
正立光學顯微鏡 (Optical microscopy)	LEICA, Wetzlar, Germany
抽氣櫃 (Hood)	HIPOINT, Kachsiung, Taiwan
pH Meter (CyberScan pH510)	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
液態氮桶	International Cytogenics, Inc. Birmingham, Britain
無菌操作台 (Laminar Flow)	Baker, Maine, USA
二氧化碳培養箱 (CO ₂ Incubator)	SANYO, Loughborough, Britain
細胞計數器	Marienfeld Superior, Germany

ELISA 讀取機 (ELISA reader, EL-800)	BIO-TEK, Winooski, USA
迷你垂直電泳槽 (Electrophoresis Tank, Mupid-II)	Bio-Rad, California, USA
轉漬系統 (Transfer system)	Bio-Rad, California, USA
水平震盪器 (Shaker)	TKS, Taipei, Taiwan
超音波震盪器	Enshine, Taipei, Taiwan
組織均質機 (Bullet Blender)	BIOCHIEFDOM INTERNATIONAL, TW
電磁加熱攪拌器	Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland
烘箱 (Oven)	SHEL LAB, USA
電源供應器 (Power Pro 300V 700mA 150W-110/230V)	Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK
乾式加熱器 (Dry bath, U-Tech Heating Block)	U-Tech, TaoYuan, Taiwan

2-1-2 器材

細胞刮刀	Orange Scientific, Braine-I'Alleud, Belgium
PVDF 膜	Rainbowbiotech, Taipei, Taiwan
壓片盒	Biofree, Colorado, USA
鑄膠系統	Bio-Rad, California, USA
APEX, Japan 底片	Fujifilm, Tokyo, Japan
拭鏡紙	Kimberly-Clark, USA
微量分注器	Rainin, USA

濃縮離心管 (Amicon Ultra, 100k/30k)	MERCK, Frankfurter, Germany
--------------------------------	-----------------------------

真空過濾杯 (Vacuum Filter Cups, 0.22μm)	Genedirex, Inc. Taipei, TW
------------------------------------	----------------------------

2-1-3 試劑

A. 細胞培養 (Cell culture)

DMEM	Gibco BRL, New York, USA
------	--------------------------

FBS	Gibco BRL, New York, USA
-----	--------------------------

Antibiotic	Gibco BRL, New York, USA
------------	--------------------------

Trypsin-EDTA	Gibco BRL, New York, USA
--------------	--------------------------

Trypan Blue Stain	Gibco BRL, New York, USA
-------------------	--------------------------

PBS	Protech Technology Enterprise CO, TW
-----	--------------------------------------

B. 細胞存活率 (Cell viability assay)

XTT (sodium 3'-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-bis

(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate	Sigma, Missouri, USA
---	----------------------

PMS	Sigma, Missouri, USA
-----	----------------------

DMEM	Gibco BRL, USA
------	----------------

C. 蛋白質定量 (Protein Assay)

BSA Sigma, Missouri, USA

Protein Assay Bio-Rad, California, USA

D. 西方墨點法 (Western Blot)

Lysis buffer Cell Signaling Technology, Inc. Boston, USA

Phosphatase inhibitor Sigma, Missouri, USA

Protease inhibitor Millipore, USA

PMSF Sigma, Missouri, USA

TRIS-base Bio-Rad, California, USA

TRIS-HCl J.T.Baker Phillipsburg, New Jersey, USA

Tween20 MERCK, Frankfurter, Germany

SDS Bio-Rad, California, USA

Acrylamide 30% Bio-Rad, California, USA

Sodium Chloride (NaCl) J.T.Baker Phillipsburg, New Jersey, USA

Sodium Hydroxide (NaOH) VWR International, USA

TEMED Bio-Rad, California, USA

APS Bio-Rad, California, USA

Ponceau S concentrate Sigma, Missouri, USA

ECL	Millipore, Missouri, USA
Glycine	J.T.Baker Phillipsburg, New Jersey, USA
Isopropanol	Sigma, Missouri, USA
Methanol	Sigma, Missouri, USA
Anti LC3-B	Sigma, Missouri, USA
Anti Mouse	Cell Signaling Technology, Inc. Boston. USA
Anti β -actin	Sigma, Missouri, USA
Anti Rabbit	Cell Signaling Technology, Inc. Boston. USA
顯影劑、定影劑	Carestream, USA
脫脂奶粉	安佳, Taiwan

E. IEF

等電點聚焦系統	GE Healthcare Life Sciences, USA
Urea	Sigma, Missouri, USA
CHAPS	Sigma, Missouri, USA
Thiourea	Sigma, Missouri, USA
Bromophenol Blue	Sigma, Missouri, USA
DTT	J.T.Baker Phillipsburg, New Jersey, USA
膠條	GE Healthcare Life Sciences, USA

F. 動物實驗

3-MA	Sigma, Missouri, USA
Attane	寶齡富錦生技, TaoYuan, Taiwan
Matrigel	Corning, Bedford, USA
PBS	盟基生物科技, Taiwan

2-2 實驗方法

2-2-1 細胞株的種類及來源

CE81T/VGH：人類食道上皮癌（esophageal carcinoma）細胞株，由陽明大學生命科學系翁芬華教授所提供。

2-2-2 細胞培養方法

將 CE81T/VGH 細胞培養於含有 10% 胎牛血清【FBS（Gibco BRL, USA）】的培養基【DMEM（BIOSOURCE, USA）】及 1% 抗生素【Antibiotic（Gibco BRL, USA）】，且每二至三天更換一次培養基。

胎牛血清【FBS（Gibco BRL, USA）】會先以 56℃，加熱 30 分鐘去除補體活性；二氧化碳培養箱條件為 37℃ 及含 5% 的二氧化碳。

2-2-3 檳榔子萃取液（ANJ 30-100K）的製備

將市面上販售的檳榔子經過清洗後，利用人工搗碎的方式來收集未加任何緩衝液的檳榔子汁液，經由含棉花的針筒初步過濾，其棉花放入針筒內的體積約針筒的 1/5，再將 1.5 ml 分裝於 eppendorf 中，經 4℃ 下離心 12,000 rpm、10 分鐘之後取上清液，再將 eppendorf 中的上清液收集並收集通過 0.22 μm 過濾杯【Vacuum Filter Cups, 0.22 μm （Genedirex, TW）】，即為檳榔子萃取物（ANJ）。

2-2-4 檳榔子萃取液 (ANJ 30-100K) 濃縮制備過程

將收集並通過過濾杯的檳榔子汁萃取液 (ANJ) 用孔徑為 100 kDa 的濃縮離心管 (MERCK, Germany), 在 4°C 下以 4000 rpm 濃縮離心至上清液剩下 1 ml, 時間約需 2 小時。取其下層液再用孔徑為 30 kDa 的濃縮離心管在 4°C 下以 4000 rpm 離心, 濃縮至剩下 0.5 ml, 再加入 10 ml (1X) PBS (Protech Technology Enterprise CO, TW) 離心至剩下 0.5 ml, 此動作重複 2 次。

收集分子量介於 30~100 kDa 的部分稱為 30-100K, 最後冷凍乾燥, 若要使用時以 10 mg 溶於 1 ml Milli-Q H₂O 或 DMEM 製備。

2-2-5 細胞存活率分析 (Cell viability assay)

2-2-5.1 種細胞 (Seeded Cell)

將附著性細胞 CE81T/VGH 以 10 公分培養盤培養約至八分滿, 以 10 ml (1X) PBS 清洗兩次後, 加入 1 ml (2X) Trypsin-EDTA (Gibco BRL, USA) 於 37°C 含 5% 二氧化碳培養箱中作用 10 分鐘, 輕拍培養盤使原本黏附底部的細胞懸浮, 立即加入約 1 ml DMEM 攪拌, 再移液至先前有 5 ml DMEM 的 15 ml 離心管靜置 10 分鐘, 使大粒細胞團塊沉澱, 再吸取離心管中的上層液 3-5 ml 至 50 ml 離心管中後, 搖晃均勻後, 從中吸取 100 μ l 至微量離心管並加入 100 μ l Trypan Blue 混合均勻, 接著加入細

胞計數器計算細胞液濃度，在 96 孔盤中每孔種入 5×10^3 個細胞，並加入 200 μ l 含有 10% FBS 及 1% 抗生素的 DMEM，最後放入培養箱中培養 48 小時。

2-2-5.2 細胞毒性測試

以種細胞的方式培養 48 小時後，將 96 孔盤中的細胞培養廢液吸除，以 PBS 清洗兩次並加入 DMEM，放入培養箱中培養 24 小時。

將 DMEM 抽除後用 PBS 清洗兩次，再以 DMEM 配置 0、1.25、2.5、5、10、20、40 μ g/ml 不同濃度的 ANJ 30-100K，接著置於培養箱中培養 24 小時，最後以 XTT 試驗檢測。

2-2-5.3 XTT 試驗

使用 XTT (Sigma, USA) 試劑來偵測細胞存活率，將加過藥物的 96 孔培養盤內的培養基移除，加入每孔含有 100 μ l DMEM 培養液、50 μ l XTT 溶液 (1 mg/ml) 與 1 μ l PMS (Sigma, USA) (0.383 mg/ml) 之混合液，於 37°C、5% CO₂ 下反應 1~2 小時後，以 ELISA 讀取機 (National, Taiwan) 在 450 nm 波長下測量其吸光值，測出之吸光值代入 (最大的吸光值-最小吸光值) $\times$ 0.5 + 最小吸光值，再依其得出的值代入 $y = -0.0129x + 0.5617$ (y = 吸光值； x = 濃度) 此公式，計算的結果得到其百分之五十的抑制濃度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀)。

存活的細胞其粒線體內的琥珀酸去氫酶（succinate dehydrogenase）會將 tetrazolium salt 代謝還原成橘紅色 formazan，而橘紅色的 formazan 其生成量則與存活的細胞數目成正比，經由 ELISA 讀取機量化即可判斷細胞的存活率。

2-2-5.4 CAS 濃度最佳篩選

將 CE81T/VGH 細胞分別以 6 孔盤培養盤培養，配置 0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 的含有 ANJ 30-100K 的培養基培養，以 CAS 方式培養刺激 3 週。經過 CAS 3 週後並以 6 孔盤以 seeded cell 方式到 96 孔盤，後 24 小時將 96 孔盤中的細胞培養廢液吸除，以 PBS 清洗兩次並加入 DMEM（並含有 0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 ANJ 30-100K），放入培養箱中培養 72 小時（刺激（Autophagy）。最後廢液吸除，以 PBS 清洗兩次，並以 XTT 試驗測試出最佳濃度。

2-2-6 西方墨點法（Western Blot）

2-2-6.1 細胞內液提取（collection of cell lysate）

將稀釋 10 倍的（10X）Lysis Buffer（Cell Signaling Technology, Inc.）與內含稀釋 100 倍的 PMSF（100 mM, Sigma）與 Phosphatase Inhibitor（100 mM, Sigma）以及 Protease Inhibitor（100 mM, Sigma），依比例混

合後加入 MQ 水配成總管液並置於冰上。

將事先使用直徑 10 公分的培養盤，以細胞密度 2.5×10^6 細胞培養 overnight，再將培養液換成 DMEM，在無血清環境下再度培養 overnight 後，加入藥品進行試驗 24 小時後，即可將細胞培養盤中的培養液去除，以 4°C 的 PBS (1X) 清洗 2~3 次後，加入 0.5 ml 4°C (1X) PBS，以細胞專用的刮勺刮下細胞，將細胞收集到 1.5 ml eppendorf 中，此動作重複 2 次，最後總體積為 1 ml。

接著以 3500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液留下底部的細胞，再加入配置的總管液混合均勻至冰上作用 10 分鐘，再以 12,000 rpm 於 4 °C 下離心 10 分鐘，取上清液（即為胞液），最後將取到的胞液進行蛋白質濃度的測試。

2-2-6.2 蛋白質濃度測定（protein assay）

以 0、1、5、10 mg/ml 濃度之 BSA 作標準曲線，並取上述製備的胞液 1 μ l 各別加入 Protein assay（Bio-Rad, USA）25 μ l，再補 Milli-Q H₂O 至 100 μ l，以分光光度計測得 OD₅₉₅ 之吸光值，並由 BSA（Sigma, USA）測得的標準線推算胞液內蛋白質濃度，求出蛋白質濃度。取定量蛋白質（75 μ g）加入（4X）sample buffer（25 μ g）使 sample buffer 被稀釋成（1X），再用乾式加熱器以 95°C 加熱 10 分鐘。

2-2-6.3 鑄膠：配製 12% SDS PAGE

以下表由左至右依照順序配製下層分離膠溶液，取 7.5 ml 注入鑄膠架的玻璃夾板之間，加入 500 μ l 異丙醇壓實膠體及隔絕空氣，靜置 30 分鐘等其凝固。

MQ 水	pH 8.8 Tris 1.5M	10% SDS	30% Acrylamide	10% APS	TEMED
2.56 ml	2.08 ml	80 μ l	3.2 ml	80 μ l	8 μ l

將異丙醇去除並以 MQ 水沖洗乾淨，再以圖畫紙將多餘水分吸乾，接著以下表配製成上層堆疊膠溶液，將溶液完全鑄滿玻璃夾板之間的剩餘空隙，最後插入齒梳靜置 30 分鐘，過程中要小心不要有氣泡。

MQ 水	pH 6.8 Tris 0.5M	10% SDS	30% Acrylamide	10% APS	TEMED
2.38 ml	1 ml	40 μ l	0.536 ml	40 μ l	4 μ l

2-2-6.4 電泳及轉漬

將製作好的 12% SDS PAGE 膠片架入垂直式電泳槽中，內部加入新的 1X Running Buffer，靜置 5 分鐘確認沒有外漏後，外部加入舊的 1X Running Buffer 至液面超過電泳槽底部金屬線，根據事先計算好的蛋白質濃度，每個樣品井注入 30 μ g 蛋白質樣品，若有空餘樣品井，則注入該次

實驗最大量體積之 Sample Buffer。

接著將電泳槽接上電源供應器，上層堆疊膠以 80V、30 分鐘，待樣品移動至焦集面再轉換成 130V、60 分鐘，將蛋白質依分子量大小作分離，用 1X Transfer Buffer 將整組轉印夾子浸溼，黑色面朝下、白色面朝上，並在黑色面上依序鋪上菜瓜布、三張圖畫紙，等待電泳結束後，再將電泳槽中的玻璃夾板取下，以塑膠鏟子鏟開玻璃片，切除膠體的上層堆疊膠部分，再將下層分離膠移至圖畫紙上，用 1X Transfer Buffer 將 PVDF 膜（需事先浸泡甲醇 5 分鐘）覆蓋在膠體上，再依序鋪上 3 張圖畫紙及菜瓜布，並用滾輪輕輕滾動菜瓜布，以除去膜和膠體之間的氣泡，將轉漬夾子闔上扣緊卡榫，再把整組準漬夾子及冰磚放入轉漬槽內，黑色面對黑色面，並補滿 1X Transfer Buffer，槽體外部則鋪滿冰塊；接著利用全濕式轉漬系統（Bio-Rad）以 350 mA、60 分鐘將分離後的蛋白質轉移到 PVDF 膜（PROTRAN, USA）上。

將轉漬完成的 PVDF 膜放入含有 5% 脫脂奶粉進行 blocking，在水平震盪器上於室溫下作用 60 分鐘。隨後再以 TBST（1X）緩衝液清洗 3 次，每次 10~15 分鐘，且水平震盪器（KS, Taiwan）以 100 rpm 進行清洗。

接著加入一級抗體（primary antibody），室溫下於旋轉盤上作用 1 小時（50 轉/小時），然後再以 TBST（1X）緩衝液清洗 3~4 次，每次 10~15 分鐘，去除未附著的一級抗體（primary antibody）。

接著加入二級抗體（secondary antibody），在室溫下於旋轉盤上作用 1 小時（50 轉/小時），以 TBST（1X）緩衝液清洗 3~4 次，每次 10~15 分鐘，去除未附著的二級抗體（secondary antibody）。

最後利用冷光顯影劑偵測試劑組（MILLIPORE）以 1：1 的比例加入 PVDF 膜上作用，讓二抗 FC 端發冷光，取至暗房壓片、顯影、定影，最後用以清水沖洗底片，底片以吹風機吹乾標上 Marker，最後掃描並定量。

2-2-7 IEF（1D）

2-2-7.1 前置處理

首先先配置 Rehydration buffer（如下表）

Urea	7 M	5.255 g
CHAPS	2 %	0.25 g
Thiourea	2 M	1.9 g
1% Bromophenol Blue	0.002 %	25 μ l
D.D water	補充至 12.5ml	

5 mg 的 ANJ 30-100K 粉末 加入 340 μ l 的 Rehydration buffer 再加入 0.01g DTT 充分混勻。接著將配好的 ANJ 30-100K 樣品平均的加到陶瓷質地的膠條槽，將凝膠上的塑膠保護膜去除，IPG 條放置在已經放入樣品的陶瓷質地的膠條槽中（凝膠面朝下，使膠面覆蓋住樣品溶液），使整

個膠條浸濕在混和液中，接著整個膠條槽均勻覆蓋上 1ml 礦物油，最後蓋上膠條槽的蓋子。放置等點聚焦系統-Ettan IPGphor3（General Electric Company，USA）步驟設置如下表：

膠條復水 8 小時

Step 1	200 V	Step-n-hold：200 Vhr
Step 2	500 V	Step-n-hold：500 Vhr
Step 3	1000 V	Step-n-hold：1000 Vhr
Step 4	3000 V	Step-n-hold：3000 Vhr
Step 5	8000 V	Step-n-hold：30 min
Step 6	8000 V	Step-n-hold：36000 Vhr

低溫狀態下約跑 40：35 hr。

2-2-7.2 膠體製程樣品

將跑完的膠條馬上分成 10 等分放入加有磁珠的 eppendorf 內，在無菌操作台內加入 SF-DMEM 250 μ l，以組織均質機敲打每次 5 分鐘，至膠體成泥狀，接著再補 250 μ l SF-DMEM 使 eppendorf 內的溶液體積為 500 μ l，接著以高速離心機以 12,000 rpm 於 4°C 下離心 10 分鐘，取上清液，重複 2 次收集 2 次上清液總共 1 ml，最後將置備好的膠體樣品以 0.22 μ l 小飛碟進行過濾樣品液，即可分別去進行細胞試驗。

2-2-7.3 膠條製程樣品並餵養細胞

將附著性細胞 CE81T/VGH 以 10 公分培養盤培養約至八分滿，以 10 ml (1X) PBS 清洗兩次後，加入 1 ml (2X) Trypsin-EDTA 於 37°C 含 5% 二氧化碳培養箱中作用 10 分鐘，輕拍培養盤使原本黏附底部的細胞懸浮，立即加入約 1 ml DMEM 攪拌，再移液至先前有 5 ml DMEM 的 15 ml 離心管靜置 10 分鐘，使大粒細胞團塊沉澱，再吸取離心管中的上層液 3-5 ml 至 50 ml 離心管中後，搖晃均勻後，從中吸取 100 μ l 至微量離心管並加入 100 μ l Trypan Blue 混合均勻，接著加入細胞計數器計算細胞液濃度，在 96 孔盤中每孔種入 5×10^3 個細胞，並加入 200 μ l 含有 10% FBS 及 1% 抗生素的 DMEM，放入培養箱中培養 48 小時後，將 96 孔盤中的細胞培養廢液吸除，以 PBS 清洗兩次並加入 DMEM，放入培養箱中培養 24 小時，隔天將 DMEM 抽除後用 PBS 清洗兩次，再分別將製備好的 12 段膠體樣品加入 96 孔盤中，接著置於培養箱中培養，每隔 24 小時用顯微鏡觀察並拍照。

2-2-8 動物實驗

2-2-8.1 飼養環境

將 30 隻 BALB/c 裸鼠 (4 週齡);母鼠; (樂斯科生物科技,台灣), 分別每三隻飼養在環境溫度為 22°C、相對溼度為 50% 的無菌及無病原體

飼養盒中並獲得無菌、無病原體的飲水和食物，照明及黑暗每 12 個小時循環一次，在進行異種移植前，先飼養 7 天讓裸鼠適應環境。

2-2-8.2 異種移植

CE81T/VGH 經過 ANJ 30-100K (0.1 µg/ml) (CAS) 處理三週後，將每 100 µl 中含有 2.5×10^6 顆的細胞懸浮液與 100 µl Matrigel 混合均勻，共注射 30 隻裸鼠。

2-2-8.3 藥物治療

異種移植後第 7 天用卡尺測量並記錄腫瘤大小和體重，將裸鼠隨機分組根據不同體重給予藥物治療，3-MA 施打劑量為 30 mg/kg/6 days，開始給藥後每 3 天測量一次腫瘤大小，體積公式為：體積 = (長 × 寬²) / 2；

其中對照組沒有經過 CAS 篩選過的 10 隻裸鼠和用 CAS 處理過的 10 隻裸鼠分別使用 PBS 或 3-MA；另外經過 CAS 處理過的 10 隻裸鼠分別使用 atg5 shRNA 及 scramble shRNA，藉由換算 M.O.I (multiplicity of infection) 意指細胞數目與感染的病毒數量之比例， $M.O.I = 2$ ，計算出的體積再注射到腫瘤上。藥物注射體積皆為 100 µl 並透過腹腔注射給藥治療，每 6 天施打一次，共給予 3 次藥物治療。

2-2-8.4 人道犧牲裸鼠

治療 18 天後，以人道的方式犧牲裸鼠，在氣麻桶中加入 1 ml Attane 揮發氣體對裸鼠進行麻醉，將裸鼠放入桶中上蓋，使其吸入過量麻醉死亡後，將手術刀先浸泡在 MQ 水潤洗，在浸入 75% 酒精消毒 3 分鐘並擦拭乾淨，接著將裸鼠右背皮下的腫瘤切除，測量長、寬並秤重紀錄，再將腫瘤移至冷凍小管，放入液態氮桶保存腫瘤組織用於後續研究。

2-2-8.5 腫瘤蛋白抽取

事先依比例將 Lysis Buffer (10X)、 Protease Inhibitor (100X)、 Phosphate Inhibitor (100X) 及 PMSF (100X)，依比例混合後加入 MQ 水配成總管液並置於冰上。取出腫瘤置於錫箔紙上，以手術刀將腫瘤塊切碎並放入微量離心管，根據腫瘤重量加入相對應之總管液，應加入之總管液體積為： $\text{腫瘤質量 (g)} \times 4000 \mu\text{l}$ 。

接著加入約 50 μl 體積之磁珠，使用均質機轉速設定為 9、時間為 5 分鐘，將腫瘤塊打碎均質化後，將微量離心管置於冰上冷卻 20 分鐘，以此步驟共重複 3 次，再以 4°C、12,000 rpm、10 分鐘離心，將含有蛋白質的上清液吸取至新的微量離心管內，放入 -80°C 冰箱中保存，用於後續研究。

第三章 結果與討論

3.1 ANJ 30-100K 對 CE81T/VGH 細胞毒性之測試

經 XTT 分析後，CE81T/VGH 細胞以不同濃度的 ANJ 30-100K 刺激 24 小時之後顯示，在 ANJ 30-100K 濃度介於 5-10 $\mu\text{g/ml}$ 時，其細胞毒性呈現劑量相依性，經公式（已列於材料方法）計算的結果得到其百分之五十的抑制濃度（50% inhibitory concentration, IC₅₀）為 11.64 $\mu\text{g/ml}$ （圖一）。

3.2 ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引起之細胞外觀變化

我們過去曾用 LC3-II 的增加、電子顯微鏡顯示自噬泡等方法證實 ANJ 30-100K 可在不同的細胞誘導自體吞噬。其中細胞在顯微鏡下的外觀變化，會有細胞的漲大、細胞核的皺縮與細胞質內含物幾乎完全被分解等特徵，如圖二 ANJ 30-100K 光學顯微鏡的照片所示。

我們進一步利用等電位聚焦法（isoelectric focusing, IEF）分離 ANJ 30-100K 後，將膠條分成十二個片段，並使用無血清的 DMEM 溶出每個片段膠體的內含物，經過 2 倍稀釋後，處理 CE81T/VGH 細胞 24 小時；結果如圖三顯示，第三、七、九、十和十一段膠體內含物溶出物具有明顯的細胞毒性，其中以第三段所誘導的外觀變化與 ANJ 30-100K 最為類似。

3.3 不同濃度的 ANJ 30-100K 刺激 CE81T/VGH 三週後，對無血清環境耐受性之影響

過去的經驗顯示，不同批的檳榔子所製備的 ANJ 30-100K 對細胞的影響有所差異，因此每一次製備新的 ANJ 30-100K 均須加以測試。本文所使用的 ANJ 30-100K，我們以 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 等濃度刺激細胞三週，稱為 chronic ANJ 30-100K stimulation (CAS)，之後測試細胞對無血清環境一到五天的培養之耐受性的變化情形。結果如圖三所示，CE81T/VGH 細胞以 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 的 ANJ 30-100K 進行 CAS 後，對無血清的環境有較高的耐受性。

3.4 經過 CAS 的 CE81T/VGH 在裸鼠體內對 3-MA 有較高的敏感性

過去的研究已知 CE81T/VGH 可在裸鼠體內形成腫瘤，並且經過 CAS 後腫瘤有更佳的生長情況，而這種生長優勢可被 CQ 與 3-MA 所抑制。我們繼續探討是否 CAS 會使腫瘤細胞對自體吞噬的抑制更為敏感。初步結果如圖四所示，在裸鼠實驗模式中，經由異種移植後，使用 3-MA (30 mg/kg/6 days) 共 18 天 (三次) 的藥物治療後，未經 CAS 的腫瘤生長並未被藥物明顯地影響，但經過 CAS 後的細胞，雖能比控制組有較好的生長優勢，但 3-MA 的治療則明顯地抑制腫瘤的生長。

3.5 以 atg5 shRNA 治療經 CAS 的腫瘤以及其對腫瘤中 Atg5 的表現量與自體吞噬的影響

由於過去已知 CE81T/VGH 可在裸鼠體內形成腫瘤，並且經過 CAS 後腫瘤有更好的生長情況並且能被 CQ 與 3-MA 抑制。事實上除了上述 3.4 的實驗，我們也曾證實以氯喹治療老鼠其療效與 3-MA 類似 (經 CAS 的腫瘤更為敏感)。這裡我們嘗試利用 atg5 shRNA 來抑制腫瘤細胞的自體吞噬，做法是將含有 atg5 shRNA 的慢病毒直接打入裸鼠腫瘤中，並在實驗結束取出老鼠體內的腫瘤塊，以西方墨點法偵測腫瘤均質液中 Atg5、LC3-II 及 β -actin 的表現情形。結果如圖五所示，經注射 atg5 shRNA 的腫瘤體積比注射 scramble shRNA 的對照組略為縮小，但沒有顯著的差異。出乎意外的是，Atg5 與 LC3-II 的在腫瘤塊中表現量有明顯的減少，顯示 atg5 shRNA 雖抑制了腫瘤的自體吞噬，但療效卻不彰。此結果似乎與 CQ 及 3-MA 的結果與我們的推論相左；但其原因有可能是 atg5 shRNA 雖有抑制 Atg5 表現量與自體吞噬的效果，但抑制效果卻不如 CQ 和 3-MA。改變 shRNA 的治療方式，例如在 CE81T/VGH 打入裸鼠前，即以含 atg5 shRNA 的慢病毒感染細胞且經 puromycin 篩選，此舉應可獲得 Atg5 表現量被抑制得較完全的細胞，之後再打入裸鼠即可能有更明顯的療效。這些臆測有需更進一步的實驗加以證實。

第四章 結論

1. 等位點聚焦法可有效分離 ANJ 30-100K 中的活性分子，其 pI 位於 2.8、3.5、3.75、4.25 以及大於 6.5 的位置。
2. 經適當濃度的 ANJ 30-100K 長期刺激後，可使 CE81T/VGH 細胞對無血清環境更有耐受性。
3. CAS 可能使腫瘤細胞對 3-MA 的治療更為敏感。
4. atg5 shRNA 的療效仍有待進一步的實驗確定。

參考文獻

1. 傅鳳琴。戀戀情深：臺灣阿美族檳榔傳說。史前館電子報第 397 期。
https://beta.nmp.gov.tw/enews/no397/page_02.html。出刊：2012 年 11 月 02 日。引用：2020 年 09 月 11 日。
2. 檳榔防制專區。檳榔歷史。台灣公共衛生促進協會。
<https://reurl.cc/6l0xj5>。出刊：2018 年 06 月 29 日。引用：2020 年 09 月 11 日。
3. 吳寶芬。檳榔管理方案簡介。行政院農業委員會。
<https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2502315>。出刊：2014 年 12 月。引用：2020 年 09 月 11 日。
4. 行政院農業委員會。農業統計要覽（107 年）。行政院農業委員會。
出刊：2019 年 09 月 10 日。引用：2020 年 09 月 11 日。
5. 癌症防治組。檳榔防制現況與分析及縣市別嚼檳率。衛生福利部國民健康署。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=595&pid=998>。出刊：2019 年 06 月 27 日。引用：2020 年 09 月 11 日。
6. Ko YC, Huang YL, Lee CH, et al. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J. Oral Pathol Med.* 1995;24:450-453.

7. Lin CY, Pan TS, Ting CC, Liang SS, et al. Cytochrome p450 metabolism of betel quid-derived compounds: implications for the development of prevention strategies for oral and pharyngeal cancers. *ScientificWorldJournal* .2013;618032.
8. 嘉義市衛生局。防制檳榔危害健康。嘉義市衛生局。
https://www.cichb.gov.tw/other/bus_detail-Vue.asp?bust_id=1048。
引用：2020 年 09 月 11 日。
9. Wang M, Xiao C, Ni P, et al. Correlation of Betel Quid with Oral Cancer from 1998 to 2017: A Study Based on Bibliometric Analysis. *Chin Med J*. 2018 ;131(16):1975-1982.
10. Gupta B, Johnson NW. Systematic review and meta-analysis of association of smokeless tobacco and of betel quid without tobacco with incidence of oral cancer in South Asia and the Pacific. *PLoS ONE*. 2014;9:e113385.
11. 衛生福利部統計處。死因統計。衛生福利部。
<https://dep.mohw.gov.tw/DOS/np-1776-113.html>。
出刊：2008 年 07 月 23 日。引用：2020 年 09 月 11 日。
12. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe A (2011) Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol*. 2000;57: 19–37

13. 衛生福利部統計處。108 年國人死因統計結果。衛生福利部。

<https://www.mohw.gov.tw/cp-16-54482-1.html>。

出刊：2020 年 06 月 16 日。引用：2020 年 09 月 11 日。

14. Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. Role of areca nut in betel quid associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol.* 2001;37:477-492.

15. Muir. C.S, Kirk. R. Betel, Tobacco, and Cancer of the Mouth. *Br J Cancer.* 1960 ; 14(4): 597–608.

16. 衛生福利部食品藥物管理署。預告訂定「黃樟素等 15 種成分為化粧品中禁止使用成分」草案。衛生福利部。

<https://www.fda.gov.tw/TC/siteListContent.aspx?sid=642&id=24112>。出刊：

2017 年 08 月 15 日。引用：2020 年 09 月 11 日。

17. Nair UJ, Obe G, Friesen M, Goldberg MT, et al. Role of lime in the generation of reactive oxygen species from betel-quid ingredients. *Environ Health Perspect.* 1992;98:203-205.

18. 林秉毅。紅唇族注意『檳榔的危害』。亞東紀念醫院。

<https://www.femh.org.tw/epaperadmin/viewarticle.aspx?ID=5011>。

出刊：2012 年 12 月。引用：2020 年 09 月 11 日。

19. Li WC1, Lee PL, Chou IC, et al. Molecular and cellular cues of

- diet-associated oral carcinogenesis--with an emphasis on areca-nut-induced oral cancer development. *J Oral Pathol Med*. 2015 Mar;44(3):167-77
20. 衛生福利部國民健康署。檳榔嚼塊之致癌性。檳榔防制暨口腔癌防治。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=613&pid=1114>。
出刊：2008 年 03 月 27 日。引用：2020 年 09 月 11 日。
21. 衛生福利部國民健康署。口腔癌防治。檳榔防制暨口腔癌防治。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=613&pid=1118>。
出刊：2018 年 03 月 09 日。引用：2020 年 09 月 11 日。
22. 國家環境毒物研究中心。植物性食品安全資料庫。食品安全資訊網。
http://nehrc.nhri.org.tw/foodsafety/plants_detail.php?id=65。2017 年 1 月
出刊。2020 年 09 月 11 日引用。
23. Chu NS. Cardiovascular responses to betel chewing. *J Formos Med Assoc*.1993;92(9):835-837
24. Anluwalia HS, Ponnampalam JT. The socio-economic aspects of betel-nut chewing. *J Trop Med Hyg*. 1968;71(2):48-50
25. Sundqvist K, Liu Y, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of areca nut-related compounds in cultured human buccal epithelial cells. *Cancer Res*. 1989 Oct 1;49(19):5294-8
26. Ray JG, Ranganathan K, Chattopadhyay A. Malignant transformation of

- oral submucous fibrosis: overview of histopathological aspects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122:200-209.
27. Mathew P, Austin RD, Varghese SS, et al. Estimation and comparison of copper content in raw areca nuts and commercial areca nut products: implications in increasing prevalence of oral submucous fibrosis (OSMF). *J Clin Diagn Res*. 2014; 8: 247–9.
 28. Trivedy C, Baldwin D, Warnakulasuriya S, et al. , et al. Copper content in Areca catechu (betel nut) products and oral submucous fibrosis. *Lancet*. 1997; 349: 1447.
 29. Khan I, Pant I, et al. Epithelial atrophy in oral submucous fibrosis is mediated by copper (II) and arecoline of areca nut. *J. Cell. Mol. Med. Vol 19, No 10, 2015 pp.* 2397-2412
 30. Gozuacik D, Kimichi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004;23:2891-2906.
 31. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 1973;7(3):253-266.
 32. 霍其嶸。細胞凋亡（Apoptosis）。國立台灣大學科學 Online。
<https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=78857>。2018 年 5 月 25 日出刊。2020 年 09 月 11 日引用。

33. 黃啟瑞、楊繼江。細胞死亡。台灣醫檢會報第 18 卷第 2 期。
[http://www.labmed.org.tw/bjournal04.asp?IsAno=7&IsBno=16&IsCno=52
&IsDno=138](http://www.labmed.org.tw/bjournal04.asp?IsAno=7&IsBno=16&IsCno=52&IsDno=138)。2003 年出刊。2020 年 09 月 11 日引用。
34. Vanden Berghe T, van Loo G, Saelens X, et al. Differential Signaling to Apoptotic and Necrotic Cell Death by Fas-associated Death Domain Protein FADD. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7925-7933.
35. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*. 1990;136:593-608.
36. Denecker G, Vercammen D, Steemans M, et al. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ*. 2001;(8):829-840.
37. 范姜文榮。【2016 諾貝爾生理醫學獎】發現自噬作用機制。
<https://scitechvista.nat.gov.tw/c/Nm6f.htm>。CASE 報科學。2016 年 10 月 7 日出刊。2020 年 09 月 11 日引用。
38. Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(2):453-458.
39. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered question. *J Cell Sci*. 2005;118(1):7-18.
40. Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J*

- Biochem Cell Biol. 2004;36(12):2435-2444.
41. Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):367-76.
 42. Klionsky DJ. Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature*. 2004;431(7004):31-2.
 43. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(3):211-6.
 44. Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2005 Aug;107(2):222-39.
 45. Bofill-De Ros X, Gu S. Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods*. 2016 Jul 1;103:157-66.
 46. Lu PY, Xie F, Woodle MC. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet*. 2005;54:117-42.
 47. Sjögren RJ, Egan B, Katayama M, Zierath JR, Krook A. Temporal analysis of reciprocal miRNA-mRNA expression patterns predicts regulatory networks during differentiation in human skeletal muscle cells. *Physiol Genomics*. 2015 Mar;47(3):45-57.
 48. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.

49. Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):411-4.
50. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*. 2003 Feb 15;17(4):438-42.
51. Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol*. 2004 Dec;33(3):545-57.
52. Liu SY, Lin MH, Hsu YR, et al. Arecoline and the 30-100 kDa fraction of areca nut extract differentially regulate mTOR and respectively induce apoptosis and autophagy: a pilot study. *J Biomed Sci*. 2008;15(6):823-31. doi: 10.1007/s11373-008-9273-8.
53. Lin MH, Hsieh WF, Chiang WF, et al. Autophagy induction by the 30-100kDa fraction of areca nut in both normal and malignant cells through reactive oxygen species. *Oral Oncol*. 2010;46(11):822-8
54. Lin MH, Liu SY, Liu YC. Autophagy induction by a natural ingredient of areca nut. *Autophagy*. 2008;4(7):967-8.
55. Yen CY, Chiang WF, Liu SY, et al. Long-term stimulation of areca nut components results in increased chemoresistance through elevated

- autophagic activity. *J Oral Pathol Med*. 2014 Feb;43(2):91-6.
56. Lin MH, Liu YC, Liu SY, et al. Clathrin-mediated endocytosis is required for ANE 30-100K-induced autophagy. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(1):25-31.
57. Yen CY, Chiang WF, Liu SY, et al. Impacts of autophagy-inducing ingredient of areca nut on tumor cells. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128011.
58. Chiu CT, Liu SY, Yen CY, et al. Chronic Stimulation of the Autophagy-inducing Ingredient of Areca Nut Promotes Tumor Growth In Vivo Though Up-regulation of Tumoral Autophagy. *Anticancer Res*. 2020;40(1):221-227.
59. 謝宛芳。檳榔子中誘導自體吞噬因子的特性。嘉南藥理大學。2008 年。
60. 劉邦衍。檳榔子成份對腫瘤細胞的影響。嘉南藥理大學。2017 年。
61. 楊蓓蓉。ANJ 30-100K 的分子構造與作用機轉的探討。嘉南藥理大學。2018 年。
62. 鄧日隆。誘導自體吞噬的檳榔子成分之純化與其對癌細胞在裸鼠體內生長的影响。嘉南藥理大學。2019 年。
63. 邱士軒。氯喹對長期檳榔子成分刺激後的食道癌細胞在裸鼠體內的療效。嘉南藥理大學。2020 年。

附圖

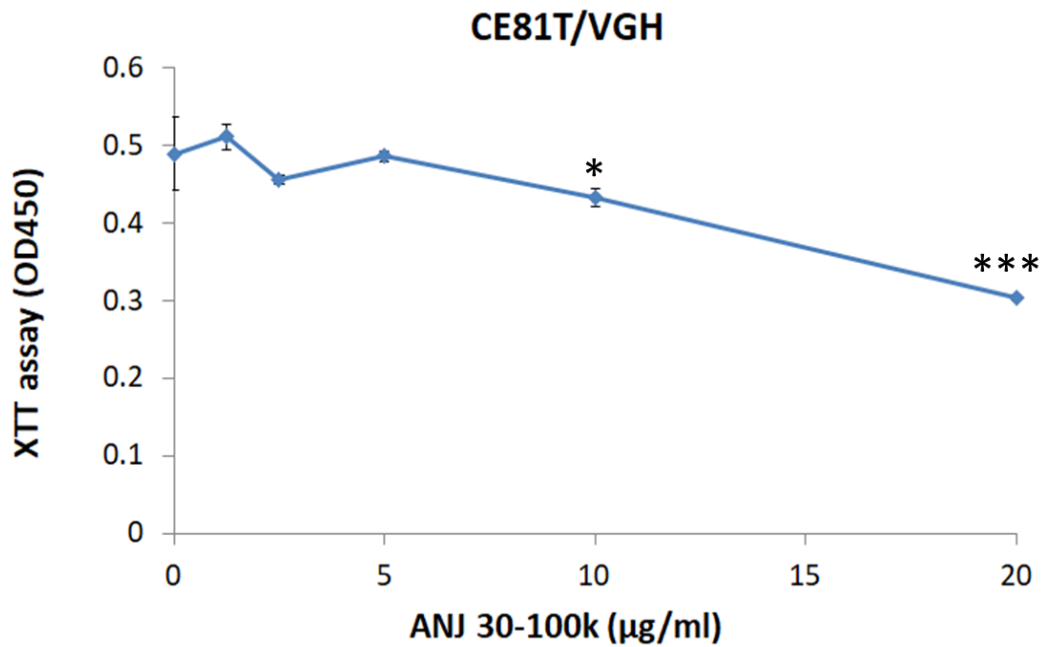
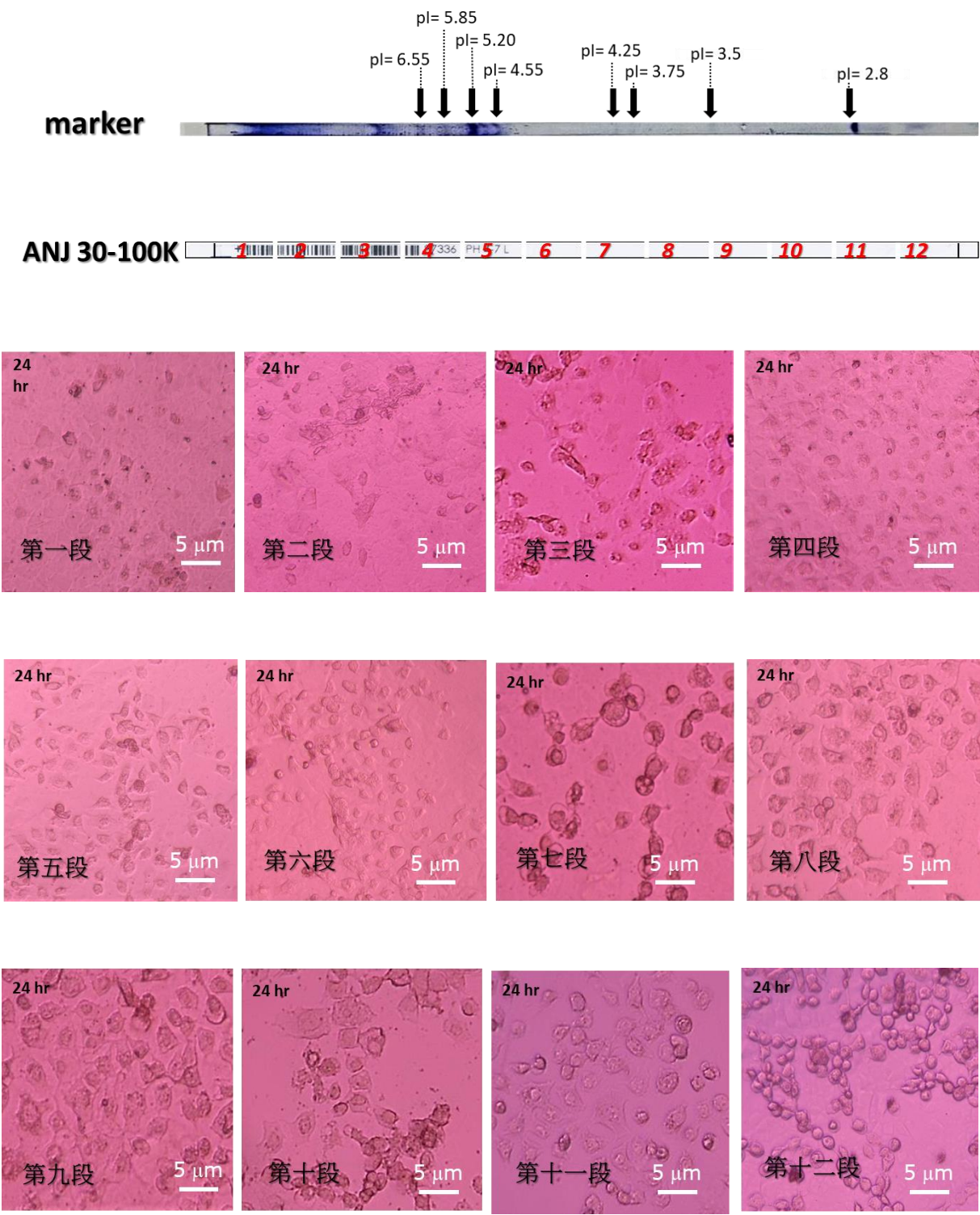


圖 一、ANJ 30-100K 對 CE81T/VGH 細胞毒性之測試

CE81T/VGH 細胞以無血清培養液培養 24 小時後，用 0、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 不同濃度的 ANJ 30-100K 刺激細胞，經 24 小時後進行 XTT 試驗分析其細胞活性。* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$ 。

CE81T/VGH 細胞株



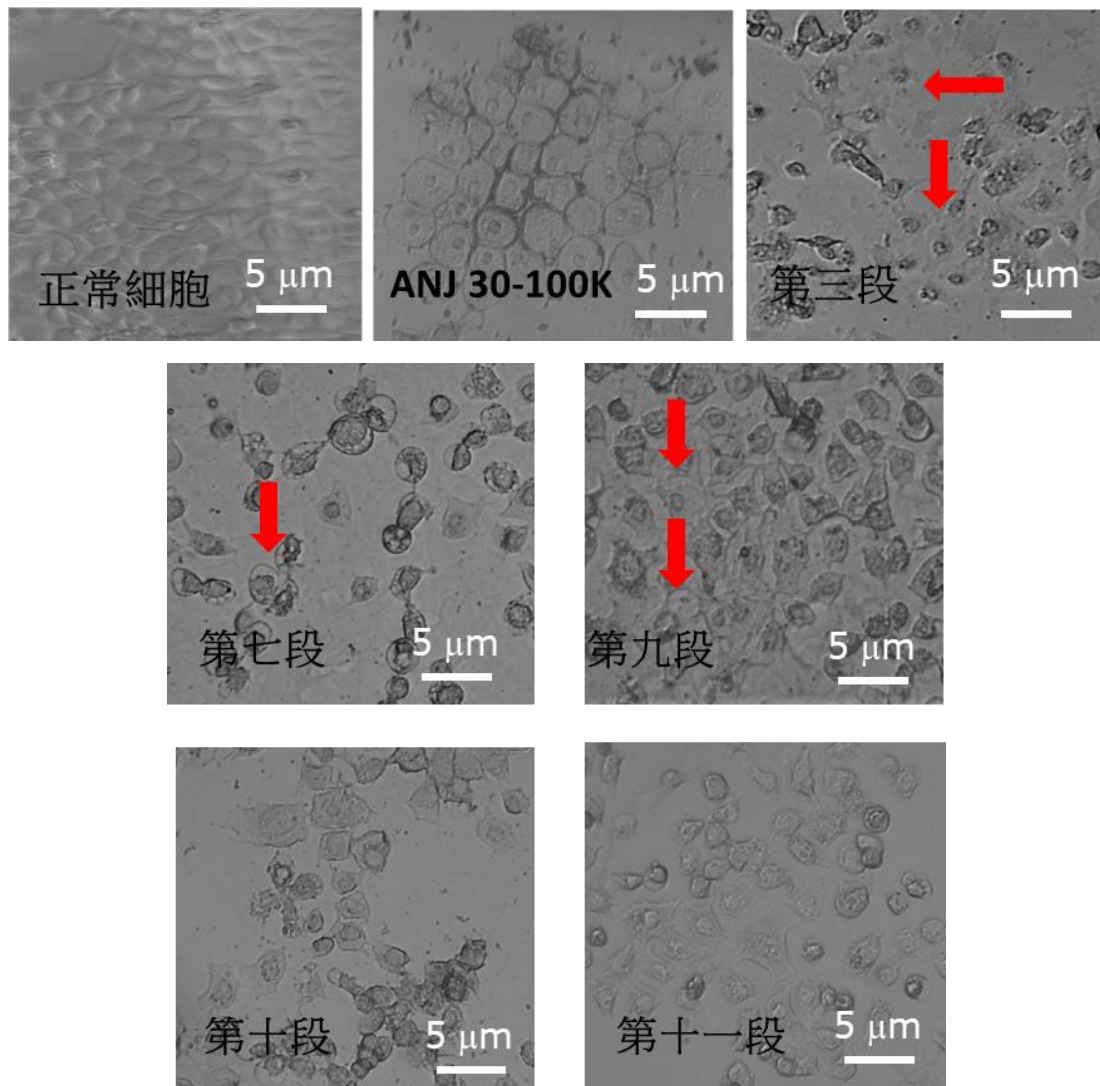


圖 二、ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引起之細胞外觀變化

將 0.5 mg 的 ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後的膠條依等分切成如圖示的十二段，以不含 FBS 的 500 μ L DMEM 將十二段中的膠條內容物溶出，並經一倍的稀釋後處理 CE81T/VGH 細胞 24 小時，再置於顯微鏡下觀察並拍照。

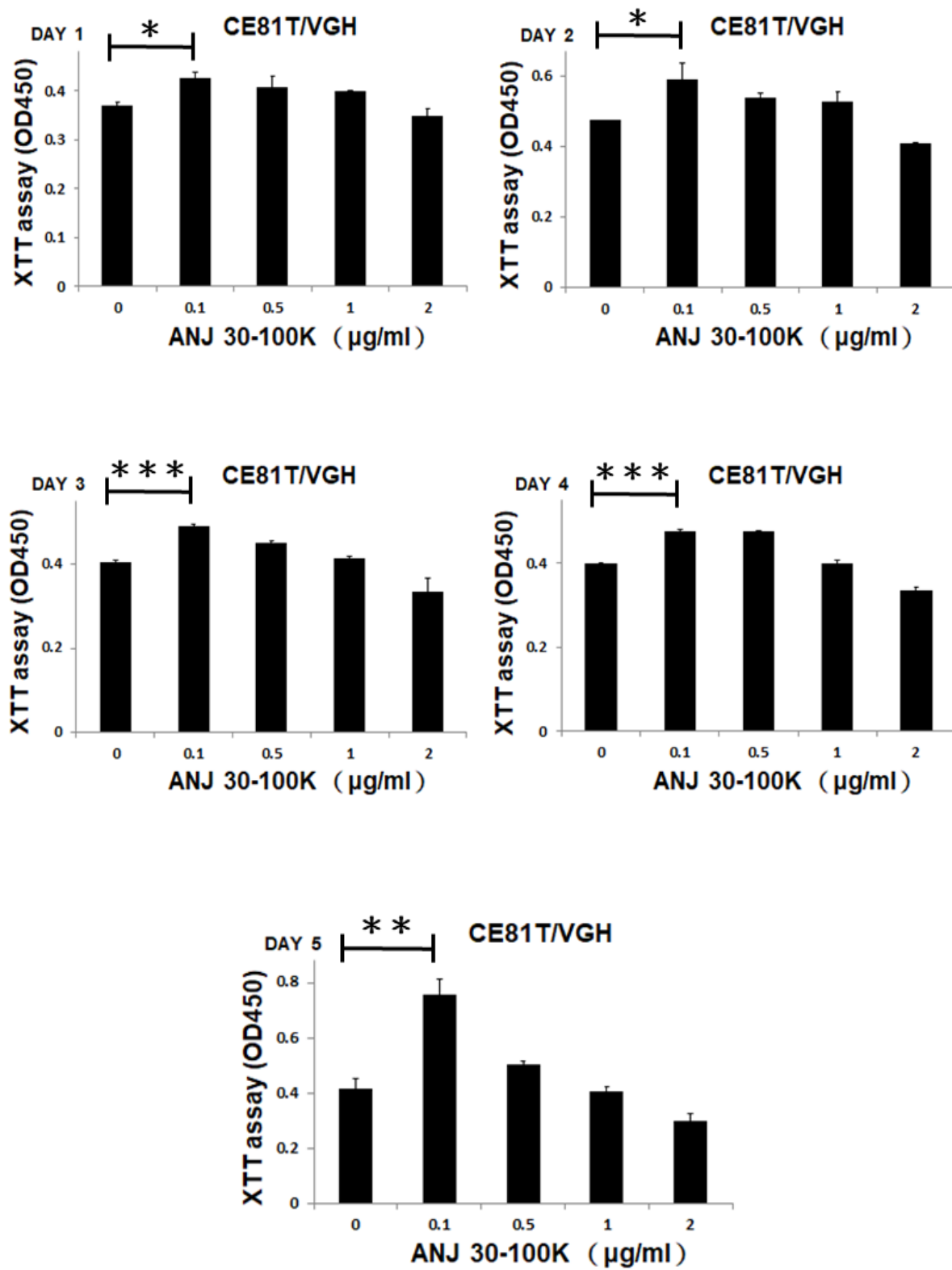


圖 三、不同濃度的 ANJ 30-100K 刺激 CE81T/VGH 三週後對無血清環境耐受性之影響

CE81T/VGH 經 ANJ 30-100K (CAS) (0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g/ml}$) 刺激三週後，分別以 5000 cell/well 種到 96 well 上，24 hr 之後使用無血清培養基培養一到五天後，以 XTT assay 進行分析。結果顯示，0.1 $\mu\text{g/ml}$ ANJ 30-100K 會使 CE81T/VGH 細胞對無血清的環境有較高耐受性。

* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。

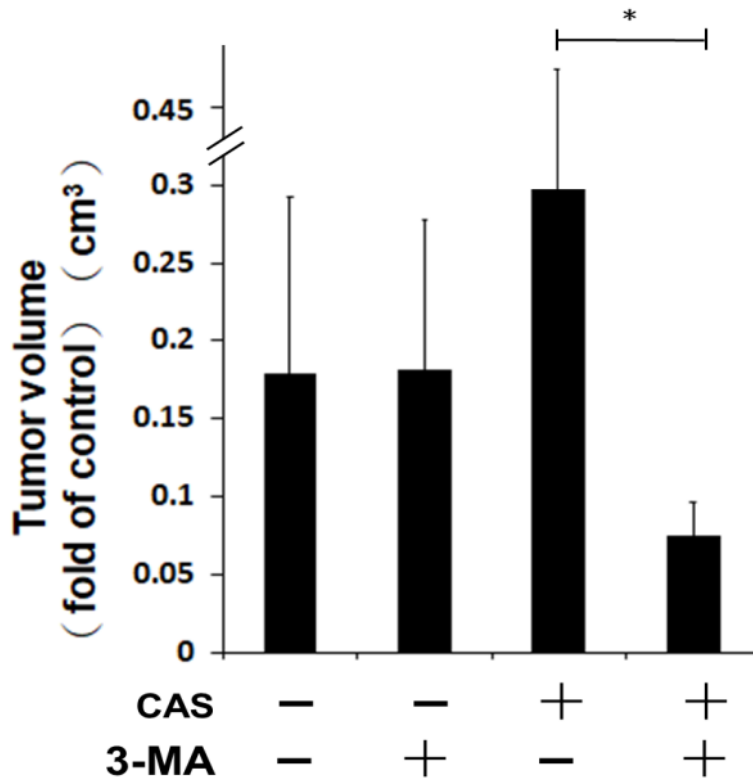
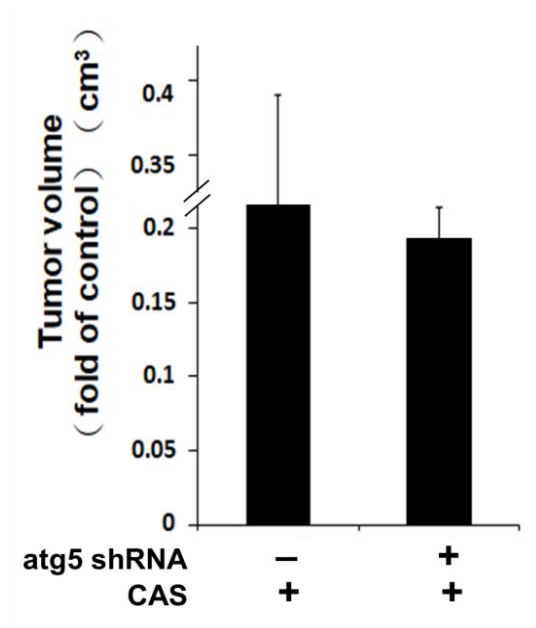


圖 四、經過 CAS 的 CE81T/VGH 在裸鼠體內對 3-MA 有較高的敏感性

在老鼠實驗模式中，將經過 ANJ 30-100K (CAS) (0.1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激三週後的 CE81T/VGH 細胞與未刺激的控制組細胞，藉由針筒注射的方式將 2.5×10^6 個細胞注入裸鼠 (n=5) 皮下進行異種移植，經過一週後再給予 3-MA (30 mg/kg/6 days) 治療，共三次 (共 18 天)，治療完隔週犧牲並從裸鼠皮上取出腫瘤。

*p < 0.05。

(A)



(B)

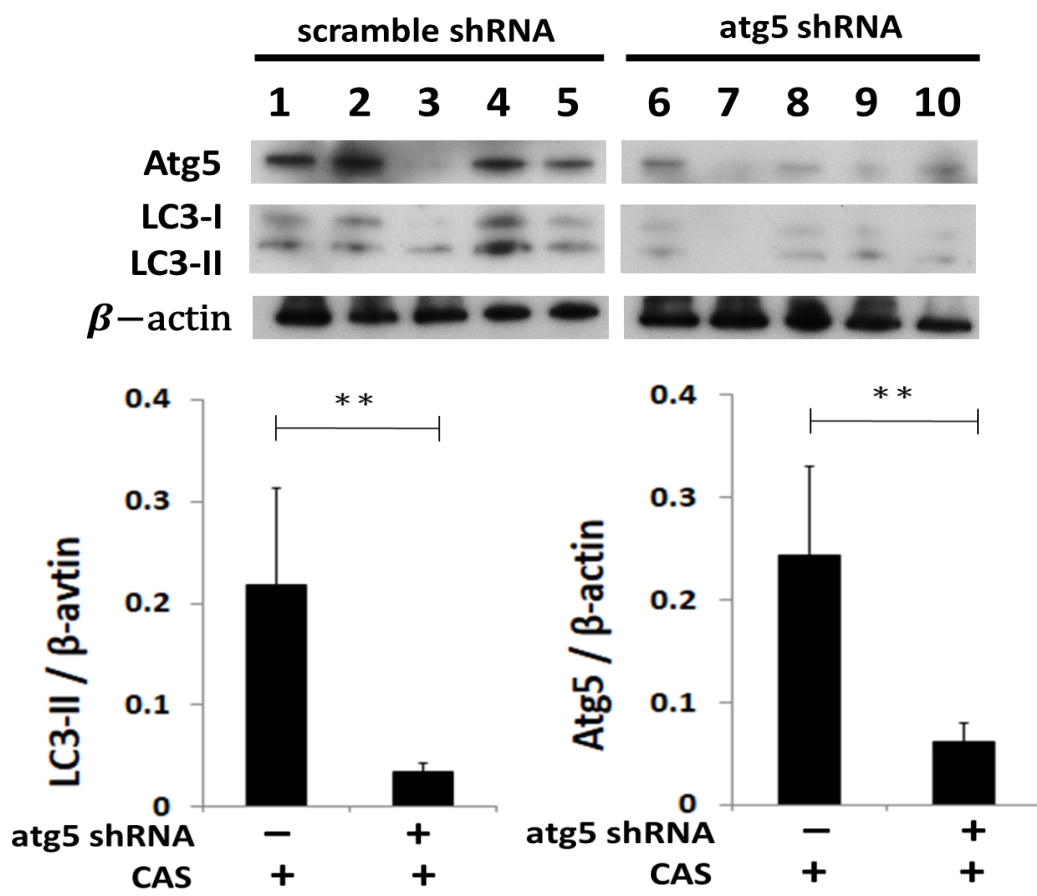


圖 五、以 atg5 shRNA 治療經 CAS 的腫瘤以及其對腫瘤中 Atg5 的表現量與自體吞噬的影響

(A) 在老鼠實驗模式中，將經過 ANJ 30-100K (CAS) ($0.1 \mu\text{g/ml}$) 刺激三週後的 CE81T/VGH 細胞，藉由針筒注射的方式將 2.5×10^6 個細胞注入裸鼠 ($n=5$) 皮下進行異種移植，經過一週後，將向中央研究院所購買的 atg5 shRNA 慢病毒以及 scramble shRNA，藉由換算 M.O.I (multiplicity of infection) 意指細胞數目與感染的病毒數量之比例， $\text{M.O.I} = 2$ ，計算出的體積再注射到腫瘤上，每六天治療一次，共三次 (共 18 天)。 $p > 0.05$ 。

(B) 將治療完三次的腫瘤塊從裸鼠皮上取出，接著，把腫瘤塊經均質機打碎萃取均質液後，再將含 $60 \mu\text{g}$ 的口腔腫瘤均質液，進行西方墨點法並偵測 LC3-II、 β -actin 及 Atg5 的表達量。 $**p < 0.01$ 。

Appendix II

嘉南藥理大學 生物科技系

Department of Biotechnology

Chia-Nan University of Pharmacy and science

生技專題製作論文

(專題實作組)

誘導自體吞噬的檳榔子成分之純化與其對癌細胞在裸鼠體內生長的影響

Purification of autophagy-inducing ingredient of areca nut and its impact on the growth of carcinoma cells in nude mice

指導教授：劉永超 博士 (Dr.Young-Chau,Liu)

林美惠 博士 (Dr.Mei-Huei,Lin)

專 題 生：鄧日隆 (Jih-Lung,Teng)

嘉南藥理大學 生物科技系

Department of Biotechnology

Chia-Nan University of Pharmacy and science

生技專題製作論文

(專題實作組)

誘導自體吞噬的檳榔子成分之純化與其對癌細胞在裸鼠體內生長的影響

Purification of autophagy-inducing ingredient of areca nut and its impact on the growth of carcinoma cells in nude mice

指導教授：劉永超 博士 (Dr.Young-Chau,Liu)

林美惠 博士 (Dr.Mei-Huei,Lin)

專 題 生：鄧日隆 (Jih-Lung,Teng)

中華民國 108 年 5 月

中文摘要

我們已知高濃度檳榔子(Areca Nut, AN)的汁液(AN Juice, ANJ)與其 30-100 kDa 的部分 (ANJ 30-100K) 可誘導細胞進行自體吞噬 (autophagy) 的死亡但是低濃度 (不具細胞毒性) 的 ANJ 或 ANJ 30-100K 在處理不同的癌細胞三週之後, 反而會讓它們透過自體吞噬活性的提升而對無血清的環境有較高的耐受性; 先前的研究結果亦顯示食道癌 CE81T/VGH 細胞經同樣的刺激後, 在裸鼠的體內亦可有較佳的生長情形, 且自體吞噬抑制劑氯喹 (chloroquine, CQ) 對上述的生長優勢具有部分的抑制效果, 且與順鉑 (cisplatin, DDP) 有協同的抑制作用。本研究旨在進一步純化 ANJ 30-100K 中的活性成分, 並分析經 ANJ 30-100K 刺激三週後, CE81T/VGH 細胞在裸鼠體內的生長優勢是否也會受到另一種自體吞噬抑制劑 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 的影響。純化部分的結果顯示, ANJ 30-100K 經等電點聚焦分離之後, 在膠條 pI 4.25, pI 3.75, pI 3.5 與 pI 2.8 的四個區段之溶出物均具有使細胞質內物質大量分解的活性。另外, 合併使用 3-MA 與 DDP 在裸鼠體內對 ANJ 30-100K 刺激三週的 CE81T/VGH 的生長有較佳的抑制作用。綜合這些結果, 自體吞噬抑制劑在治療長期 ANJ 30-100K 刺激後的 CE81T/VGH 細胞時, 對 DDP 具有輔助性的療效。

關鍵字：檳榔子、自體吞噬、氯喹、順鉑、3-甲基腺嘌呤、裸鼠

目錄

中文摘要.....	I
目錄.....	III
圖目錄.....	VI
縮寫表.....	VII
第一章 緒言	1
1.1 檳榔和口腔癌	1
1.2 檳榔嚼塊	1
1.3 檳榔子成分對細胞之影響	2
1.4 細胞死亡的方式	3
1.5 細胞凋亡	4
1.6 自體吞噬	4
1.7 發現檳榔子萃取物 30-100K (ANJ 30-100K)	5
1.8 等電位膠集電泳 (IEF)	6
1.9 研究動機	6
第二章 材料與方法	8
2.1 器材與試劑	8
2.1.1 器材	8
2.1.2 試劑	10

2.2 實驗方法	14
2.2.1 細胞株的種類及來源	14
2.2.2 細胞培養方法	14
2-2-3 檳榔子萃取液（ANJ 30-100K）的製備	14
2-2-4 細胞存活率分析（Cell viability assay）	15
2-2-5 西方墨點法（Western blot）	16
2-2-5.1 細胞內液的提取（collection of cell lysate）	16
2-2-5.2 蛋白質濃度測定（protein assay）	17
2-2-5.3 鑄膠:配製 12% SDS PAGE.....	18
2-2-5.4 電泳及轉漬.....	18
2-2-6 細胞凋亡檢測（Caspase-3 Assay Kit）	20
2-2-7 動物實驗及小鼠異種移植.....	21
2-2-7.1 飼養環境.....	21
2-2-7.2 異種移植.....	21
2-2-7.3 藥物治療.....	21
2-2-7.4 人道犧牲裸鼠.....	22
2-2-7.5 腫瘤蛋白抽取.....	22
2-2-8 IEF（1D）	23

2-2-9	膠體製程樣品.....	24
2-2-10	以膠體製程樣品餵養細胞.....	25
第三章	結果與討論	26
3.1	3-MA 與 DDP 對長期處理過 ANJ 30-100K 的 CE81-T/VGH 與自體吞噬之影響.....	26
3.2	3-MA 對 DDP 所誘導的細胞凋亡之影響.....	26
3.3	3-MA 與 DDP 對處理過 ANJ 30-100K 三週的 CE81T/VGH 在裸鼠體內生長之影響	27
3.4	ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引 起之細胞外觀變化	27
第四章	結論.....	29
	參考文獻.....	30
	附圖.....	34

圖目錄

圖一、3-MA 與 DDP 對長期處理過 ANJ 30-100K 的 CE81-T/VGH 與自體吞噬之影響	34
圖二、3-MA 對 DDP 所誘導的細胞凋亡之影響.....	35
圖三、3-MA 與 DDP 對處理過 ANJ 30-100K 三週的 CE81T/VGH 在 裸鼠體內生長之影響	36
圖四、ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引 起之細胞外觀變化	37

縮寫表

1. ANJ : areca nut juice
2. AN: Areca Nut Extract
3. BQ : Betel quid
4. CE81T / VGH : esophageal epithelial cancer
5. OECM-1 : human oral epidermoid carcinoma Meng-1
6. BSA: Bovine Serum Albumin
7. FBS : Fetal Bovine Serum
8. PBS : Phosphate-Buffered Saline
9. SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
10. DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
11. XTT : Sodium3'-[1- (phenylamino-carbonyl) -3,4-tetrazolium]-bis
(4- methoxy-6-nitro) Benzene Sulfonic Acid Hydrate
12. TBST : Tris-Buffered Saline with Tween
13. SF : Serum-Free
14. PMS : N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate
15. DDP: Cisplatin
16. DMSO: Dimethyl sulfoxide
17. NC: Nitrocellulose
18. PVDF: Polyvinylidene Fluoride

- 19. APS: Ammonium persulfate
- 20. 3-MA: 3-Methyladenine
- 21. DTT: Dithiothreitol
- 22. TEMED: Tetramethylethylenediamine

第一章 緒言

1.1 檳榔和口腔癌：

檳榔子現在已經被世界組織衛生國際癌症署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 認定是人類的致癌物⁽¹⁾。在嚼食檳榔的過程中，口腔及消化道都不可避免的受到刺激，使位於這些部位的細胞產生病變，其中九成以上的口腔癌為鱗狀上皮癌細胞⁽²⁾。檳榔和口腔癌成因密不可分，全球大約 2 至 6 億人口嚼食檳榔，而國內嚼食檳榔人口約為 200 萬人⁽³⁾，在僅 2300 萬的總人口中，佔有國人十大癌症死因中第 5 名的高位⁽⁴⁾。

1.2 檳榔嚼塊：

有關檳榔嚼塊 (Betel quid, BQ) 已是被證實有致癌性的致癌物，對於健康的危害，世界衛生組織國際癌症署研究 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 於 2003 年指出，即使不添加任何佐料，檳榔子 (Areca Nut, AN) 也具有高度致癌性，並將檳榔子認定為一級致癌物⁽⁵⁾。

檳榔的組成方式非常多樣化，在檳榔的組成中方式中會將檳榔子、荖花、荖藤、紅灰及石灰進行組合來做食用⁽⁶⁾。在多樣化的組合形式中，配料中的荖花、荖葉等皆已有證據證實含有致癌性化學物質。

其

中荖花含有黃樟素（**Safrole**），已被證實為一級癌症藥物；而石灰、紅灰主要成分為氫氧化鈣，則是會在口腔內造成高鹼性環境，破壞口腔黏膜細胞，導致口腔黏膜之表皮細胞受損，使表皮細胞不正常增生及變異，進而演變成口腔癌⁽⁷⁾。

而其中在檳榔子（**areca nut**，**AN**）中的檳榔素、檳榔鹼和多酚類已被證實具有潛在致癌性，即使不加紅灰、白灰、荖花、荖葉咀嚼檳榔子本身就會致癌⁽⁸⁾，由於嚼食檳榔過程中，檳榔及其它添加物對消化道及口腔部位造成無法避免的直接刺激，因此導致許多癌症前病變的產生，如：牙周炎、紅斑症、口腔黏膜白斑症、口腔黏膜下纖維化、疣狀增生、扁平苔癬症……等，這些原因都是導致口腔環境惡化並最終走向癌症的過程⁽⁹⁾。

1.3 檳榔子成分對細胞之影響：

檳榔子中含有生物鹼，包括檳榔鹼（**Arecaidine**）及會刺激副交感神經作用的檳榔素（**Areccoline**）⁽¹⁰⁾，而過去的研究指出，檳榔素會促使人類臉頰黏膜纖維母細胞死亡⁽¹¹⁾，檳榔子的另一種成分低聚原花青素（**Oligomeric Procyanidins**），隨著濃度及時間的增加，會誘導脾淋巴細胞凋亡⁽¹²⁾，近年研究更進一步顯示，高濃度的檳榔素會促使細胞走向細胞凋亡（**Apoptosis**）^(13,14)。

此外，檳榔子含有多酚類化合物，會抑制膠原蛋白酶活性，並刺

激口腔中的膠原蛋白增生，進而導致口腔黏膜纖維化，再加上由於檳榔嚼塊中所含的石灰佐料促使口腔環境鹼性化，多酚化合物會釋放對細胞具有傷害的活性氧族（ Reactive Oxygen Species ）及超氧自由基（ Superoxide Radical ）⁽¹⁵⁾，大量攝食檳榔鹼時，會抑制大腦活動，使食用者出現行動遲緩的現象。在動物的頰黏膜上塗抹檳榔子萃取物之實驗中可以發現會使腫瘤數目增加⁽¹⁶⁾。

1.4 細胞死亡的方式：

細胞死亡的方式主要有兩種方式可分為程序性死亡及非程序性死亡。非程序性細胞死亡是由於意外傷害或是受到創傷導致細胞死亡；程序性細胞死亡意即細胞由一連串的反應使細胞進行有計畫的死亡方式，包括細胞凋亡、自體吞噬⁽¹⁷⁾。

非程序性細胞死亡則為細胞受到外來壓力刺激，如：缺氧、高溫、低溫、輻射、pH 值變化、有毒物質……等由物理性或化學性造成的環境極端變化，使細胞受到不可逆永久性傷害，進而導致細胞直接死亡，稱為細胞壞死^(18,19)。

程序性細胞死亡可分為第一類型細胞死亡（ Type I Cell Death ），為細胞凋亡；第二類型細胞死亡（ Type II Cell Death ），則是指自體吞噬。

1.5 細胞凋亡：

細胞凋亡是當細胞的生命週期走向終點時，而主動產生生理性或病理性的內部程序死亡，細胞會因應環境的刺激，接受特定的訊號後所自行決定的死亡方式，在生物體中是種具有高度控制即調節的過程，是生物體成長過程中，維持正常生理及生命現象的調控方式。當細胞凋亡啟動時，內質網會逐漸和細胞膜融合，並在膜表面形成突起的小囊泡，細胞會呈現皺縮型態、細胞核中染色質退化分解，相關基因調控因子產生作用，細胞色素 c (Cytochrome c) 由粒線體釋放到細胞質，DNA 分解成片段，原本在細胞膜內的磷脂絲氨酸 (Phospholipid Phosphatidyl serine) 會翻轉到細胞膜表面，可做為吸引吞噬細胞的信號⁽²⁰⁾。

1.6 自體吞噬：

自體吞噬是指細胞在面臨養分不足、自由基傷害、UV 照射、缺氧、藥物刺激.....等，細胞內的部分胞器、大型損傷的蛋白質進行自體吞噬分解成胜肽鍊 (Peptides)，以達到養分回收再利用的目的，但若營養還是不足，細胞最終還是會死亡。自體吞噬主要可再細分為三種類型：巨自噬 (Macroautophagy)、微自噬 (Microautophagy)、伴護蛋白媒介自噬 (Cheperon-mediated Autophagy)，其中又以巨自噬為最常見^(21,22)。

當自體吞噬形成的初期時，會從細胞膜或是內質網形成半月型的

雙層膜並逐漸向兩邊延伸，將欲降解的物質包覆住，即為自噬泡之形成，同時游離在細胞質中的管連結蛋白第三型輕鍊-I(Microtubule-associated protein light chain 3-I, LC3-I) 會和磷脂醯乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine,PE) 進行脂化作用形成管連結蛋白第三型輕鍊-II(Microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II) ，並堆積在自噬泡的膜表面，因此可以根據 LC3-II 的多寡作為自體吞噬的指標之一。接著自噬小泡會和溶酶體結合形成自噬溶酶體 (Autophagolysosome) ，並透過溶酶體內的酵素將回收的胞器或蛋白質分解，此時溶酶體內的 pH 值呈酸性，可經由吖啶橙染色 (Acridine Orange Stain) 後於螢光顯微鏡下觀察，即可發現許多呈現橘色螢光的小點，也是另一種判定自體吞噬的指標^(23,24,25)。

1.7 檳榔子萃取物 30-100K (ANJ 30-100K) 的發現：

根據我們先前的研究發現，經過檳榔子萃取物 (Areca Nut Juice, ANJ) 誘導後的細胞死亡外觀變化不像是凋亡。在處理人類的口腔癌及食道癌細胞後，細胞死亡的型態有別於呈現皺縮，反而呈現的是膨大變圓且細胞質被清空。用電子顯微鏡觀察可以看到細胞內出現許多小空泡的形成，證實小空泡即為自噬泡 (Autophagosome) ，亦利用吖啶橙染色 (Acridine Orange Stain) 觀察到酸性泡產生，最後我們利用西方墨點法 (Western Blotting) 檢測蛋白質的表現，證實經過

ANJ 處理後的細胞會導自體吞噬 (Autophagy) 的指標性蛋白質為管連結蛋白第三型輕鍊-II(Microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II)產生大量堆積^(26,27)。

接著我們更進一步的純化 ANJ，發現位於 30-100 kDa 之間的成分會誘導細胞自體吞噬，稱之 ANJ 30-100 kDa，若在額外加入溶酶體抑制劑，阻斷自噬泡及溶酶體的結合，則使 LC3-II更加大量表現，證實了 ANJ 30-100K，會促使自體吞噬的流通 (Autophagic Flux)，除了口腔癌及食道癌細胞之外 ANJ 30-100K 也能誘導正常纖維母細胞、週邊血液淋巴球及白血病的 Jurkat T 走向自體吞噬^(28,29)。

1.8 等電位膠集電泳(IEF)：

分析物的分子會被集中在一個具有 pH 梯度的介質中，通過介質的電流將產生帶正電荷的氧化極和帶負電荷的還原極。帶電分子會向相反電荷的一極運動，直到周圍 pH 值與其等電點相同時帶電分子才停止在凝膠中運動。當樣本中的蛋白質泳動至相等於其 pI 的 pH 位置時，其淨電荷會變為零 ($\text{pH} = \text{pI}$)，因而焦集於該處不動⁽³⁰⁾。

1.9 研究動機：

我們已知高濃度檳榔子(Areca Nut, AN)的汁液(AN Juice, ANJ) 與其 30-100 kDa 的部分 (ANJ 30-100K) 可誘導細胞進行自體吞噬 (autophagy) 的死亡，但是低濃度 (不具細胞毒性) 的 ANJ 或 ANJ

30-100K 在處理不同的癌細胞三週之後，反而會讓它們透過自體吞噬活性的提升而對無血清的環境有較高的耐受性，因此我們試圖進一步以利用等電位聚焦法，來純化 ANJ 30-100K 之中誘導自體吞噬的成分；作法是經等電位聚焦後的 ANJ 30-100K，將膠條分為十二等分，並分析其中的內含物是否能引起與 ANJ 的作用相似的細胞外觀變化，以及觀察 LC3-II 的堆積是否提升來追蹤此活性。最後若順利找到該活性，預計將進一步分析其分子組成。因此我們藉由以更進一步的方式，來純化 ANJ 30-100K，如：透過 HPLC 分析的方式來釐清 ANJ 30-100K，為何種物質。

第二章 材料與方法

2-1 器材與試劑

2-1-1 器材

秤量天平 (PB602-S; AG285)

Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland

恆溫水槽 (Water bath, BC-2D 18L) WISDOM, Kachsiung, Taiwan

離心機 (Centrifuge, Eppendorf AG 22331)

CAMR, Hamburg, Germany

高速冷凍離心機 (Centrifuge, MIKRO 22R)

Hettich, Tuttelingen, Germany

震盪器 (Vortex, Genie-2) Scientific Industries, New York, USA

逆滲透水 (RO H₂O) MILLIPORE, Billreica, USA

二次過濾水 (Milli-Q H₂O) MILLIPORE, Billreica, USA

冰箱 (Fridge, NR-M660MG) National, Taipei, Taiwan

正立光學顯微鏡 (Optical microscopy) LEICA, Wetzlar, Germany

抽氣櫃 (Hood) HIPOINT, Kachsiung, Taiwan

pH Meter (CyberScan pH 510)

Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts,
USA

液態氮桶 International Cryogenics, Inc. Birmingham, Britain

無菌操作台 (Laminar Flow) Baker, Maine, USA

二氧化碳培養箱 (CO2 Incubator)	SANYO, Loughborough, Britain
細胞計數器	Marienfeld Superior, Germany
ELISA 讀取機 (ELISA reader, EL-800)	BIO-TEK, Winooski, USA
迷你垂直電泳槽 (Electrophoresis Tank, Mupid-II)	Bio-Rad, California, USA
乾式加熱器 (Dry bath, U-Tech Heating Block)	U-Tech, TaoYuan, Taiwan
轉漬系統 (Transfer system)	Bio-Rad, California, USA
水平震盪器 (Shaker)	TKS, Taipei, Taiwan
超音波震盪器	Enshine, Taipei, Taiwan
組織均質機 (Bullet Blender)	BIOCHIEFDOM INTERNATIONAL, TW
電磁加熱攪拌器	Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland
烘箱 (Oven)	SHEL LAB, USA
細胞刮刀	Orange Scientific, Braine-I'Alleud, Belgium
NC膜	Rainbowbiotech, Taipei, Taiwan
PVDF膜	Rainbowbiotech, Taipei, Taiwan
壓片盒	Biofree, Colorado, USA
鑄膠系統	Bio-Rad, California, USA
點聚焦系統-Ettan IPGphor3	(General Electric Company, USA)

卡尺	APEX, Japan
底片	Fujifilm, Tokyo, Japan
拭鏡紙	Kimberly-Clark, USA
微量分注器	Rainin, USA
飼料	LabDiet, Missouri, USA
飼養盒	樂斯科生物科技, 台灣
墊材	LabDiet, Missouri, USA

2-1-2 試劑

A. 細胞培養 (Cell culture)

DMEM	Gibco BRL, New York, USA
FBS	Gibco BRL, New York, USA
Antibiotic	Gibco BRL, New York, USA
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, New York, USA
Trypan Blue Stain	Gibco BRL, New York, USA
PBS	Protech Technology Enterprise CO, TW
DDP	Sigma, Missouri, USA
3-MA	Sigma, Missouri, USA
Matrigel	Sigma, Missouri, USA

B. 細胞存活率 (Cell viability assay)

XTT	Sigma, Missouri, USA
PMS	Sigma, Missouri, USA
DMEM	Gibco BRL, USA

C. 蛋白質定量 (Protein Assay)

BSA	Sigma, Missouri, USA
Protein Assay	Bio-Rad, California, USA

D. 細胞凋亡檢測 (Caspase-3 Assay Kit)

1M DTT	Biovision, Milpitas, USA
2X Reaction Buffer	Biovision, Milpitas, USA
4 mM DEVD-pNA	Biovision, Milpitas, USA

E. 西方墨點法 (Western Blot)

Lysis buffer	Cell Signaling Technology, Inc. Boston, USA
Phosphatase inhibitor	Sigma, Missouri, USA
Protease inhibitor	Millipore, USA
PMSF	Sigma, Missouri, USA
TRIS-base	Bio-Rad, California, USA
TRIS-HCl	J.T.Baker Phillipsburg, New Jersey, USA

Tween 20	MERCK, Frankfurter, Germany
SDS	Bio-Rad, California, USA
Acrylamide 30%	Bio-Rad, California, USA
Sodium Chloride (NaCl)	J.T.Baker Phillipsburg, New Jersey, USA
Sodium Hydroxide (NaOH)	VWR International, USA
TEMED	Bio-Rad, California, USA
APS	Bio-Rad, California, USA
Ponceau S concentrate	Sigma, Missouri, USA
ECL	Millipore, Missouri, USA
Glycine	J.T.Baker Phillipsburg, New Jersey, USA
Isopropanol	Sigma, Missouri, USA
Methanol	Sigma, Missouri, USA
Anti LC3-B	Sigma, Missouri, USA
Anti Mouse	Cell Signaling Technology, Inc. Boston. USA
Anti β -actin	Sigma, Missouri, USA
Anti Rabbit	Cell Signaling Technology, Inc. Boston. USA
顯影劑	Carestream, USA
定影劑	Carestream, USA
脫脂奶粉	安佳, Taiwan

F. 動物實驗

3-MA	Sigma, Missouri, USA
DDP	Sigma, Missouri, USA
Attane	寶齡富錦生技, Tao Yuan, Taiwan
Matrigel	Corning, Bedford, USA
PBS	盟基生物科技, Taiwan

G. 銀染 (Silver stain)

Silver stain Sensitizer	Thermo, USA
Silver stain Enhancer	Thermo, USA
Silver stain	Thermo, USA
Silver stain Developer	Thermo, USA

2-2 實驗方法

2-2-1 細胞株的種類及來源

CE81T/VGH：人類食道上皮癌（esophageal carcinoma）細胞株，由陽明大學生命科學系翁芬華教授所提供。

OECM-1：人類口腔鱗狀細胞上皮癌（human oral epidermoid carcinoma Meng-1）細胞株，由陽明大學口腔生物研究所的張國威教授與成功大學醫學院口腔生物研究所謝達斌教授所提供。

2-2-2 細胞培養方法

將 CE81T/VGH 與 OECM-1 細胞培養於含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的培養基 (DMEM) 與 1% 抗生素混合劑 (Antibiotic)，在 37°C 和 5% CO₂ 的二氧化碳培養箱中培養中以潮濕氣氛培養，每二至三天更換一次培養基。

2-2-3 檳榔子萃取液（ANJ 30-100K）的製備

將市面上販售的檳榔子，以逆滲透水（MILLIPORE）清洗，接著以人工搗碎的方式來收集未加任何緩衝液的檳榔子汁液，通過裝有棉花 5 ml 的針筒初步過濾，針筒內放置棉花，含量約為針筒體積的 1/5，再分裝於 1.5 ml eppendorf，經 4°C 下離心 12,000rpm、10 分鐘

之後取上清液，再將上清液通過 0.22 μ M filter (SARTORIUS, USA) 即為 ANJ。將收集到的檳榔子汁液 ANJ 用孔徑為 100 kDa 的濃縮離心管 (MILLIPORE, USA)，在 4°C 下以 4000 rpm 濃縮離心至上清液剩下 1 ml，時間約需 2 小時。取其下層液再用孔徑為 30 kDa 的濃縮離心管 (MILLIPORE) 在 4°C 下以 4000 rpm 離心，濃縮至剩下 0.5 ml，再加入 (1X) PBS 10 ml 離心至剩下 0.5 ml，此動作重複 2 次。

收集分子量介於 30~100 kDa 的部分稱為 30-100K，最後冷凍乾燥，若要使用時以 10 mg 溶於 1 ml Milli-Q H₂O 製備。

2-2-4 細胞存活率分析 (Cell viability assay)

● 種細胞

將 CE81T/VGH 及 OECM-1 細胞分別以 10 公分培養盤培養約至八分滿，以 10 ml PBS 清洗兩次後，加入 1 ml Trypsin-EDTA (2X) 於 37°C、5% 二氧化碳培養箱中作用 5~10 分鐘，輕拍培養盤使原本黏附底部的細胞懸浮，立即加入 7 ml DMEM 並移液至 15 ml 離心管靜置 5 分鐘，使大粒細胞團塊沉澱，再吸取離心管中的上層液 5 ml 至 50 ml 離心管中後，從中吸取 100 μ l 至微量離心管，加入 100 μ l Trypan Blue 混合均勻，接著使用細胞計數器計算細胞液濃度，在 96 孔盤中每孔種入 5×10^3 個細胞，並加入 200 μ l 含

有 10% FBS 及 1% 抗生素的 DMEM，最後放入培養箱中培養 24 小時。將 96 孔盤中的細胞培養廢液吸除，以 PBS 清洗兩次並加入無血清 DMEM，放入培養箱中培養 24 小時。將無血清 DMEM 抽除後用 PBS 清洗兩次，再以無血清 DMEM 配置 0、1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 不同濃度的 ANE 30-100K，接著置於培養箱中培養 24 小時。

●XTT 試驗

接著以 XTT (Sigma, USA) 試劑來偵測細胞存活率，將加過藥物的 96 孔培養盤內的培養基移除，每 well 含有加入 100 μl SF-DMEM 培養液、50 μl XTT 溶液 (1 mg/ml) 與 1 μl PMS (Sigma, USA) (0.383 mg/ml) 之混合液，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下反應 1~2 小時後，以 ELISA 讀取機 (National, Taiwan) 在 450 nm 波長下測量其吸光值。存活的細胞其粒線體內的琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 會將 tetrazolium salt 代謝還原成橘紅色 formazan，而橘紅色的 formazan 其生成量則與存活的細胞數目成正比，經由 ELISA 讀取機量化即可判斷細胞的存活率。

2-2-5 西方墨點法 (Western blot)

2-2-5.1 細胞內液提取 (collection of cell lysate)

將稀釋 10 倍的 (10X) Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Inc.) 與內含稀釋 100 倍的 PMSF (100 mM ,Sigma) 與 Phosphatase Inhibitor (100 mM ,Sigma)以及 Protease Inhibitor (100 mM ,Sigma)，依比例混合後加入 MQ 水配成總管液並置於冰上，接著將事先使用直徑 10 公分的培養盤，以細胞密度 2×10^6 培養 overnight 後將培養液換成無血清的 DMEM，在無血清環境下再度培養 overnight 後加入藥品進行試驗 24 小時，即可將細胞培養盤中的培養液去除，以 4°C 的 PBS (1X) 清洗 2~3 次後，加入 0.5 ml 4°C PBS (1X)，以細胞專用的刮勺刮下細胞，將細胞收集到 1.5 ml eppendorf 中，此動作重複 2 次，最後總體積為 1 ml。

接著以 3500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液留下底部的細胞，混合均勻至冰上作用 10 分鐘，再以 12,000 rpm 於 4 °C下離心 10 分鐘，取上清液（即為胞液），最後將取到的胞液進行蛋白質濃度的測試。

2-2-5.2 蛋白質濃度測定(protein assay)

以 0, 1, 5, 10 mg/ml 濃度之 BSA 作標準曲線，並取上述製備的胞液 2 μ l 各別加入 Protein assay (Bio-Rad, USA) 25 μ l，再補 H₂O 至 100 μ l，以分光光度計測得 OD₅₉₅ 之吸光值，並由 BSA 測得的標準線推算胞液內蛋白質濃度，求出蛋白質濃度。取定量蛋白質 (75

μg) 加入 (4X) sample buffer (25 μg) 使 sample buffer 被稀釋成 (1x), 再用乾式加熱器以 95°C 加熱 10 分鐘。

2-2-5.3 鑄膠:配製 12% SDS PAGE

以下表由左至右依照順序配製下層分離膠溶液，取 7.5 ml 注入鑄膠架的玻璃夾板之間，加入 500 μl 異丙醇壓實膠體及隔絕空氣，靜置 30 分鐘等其凝固。

MQ水	ph 8.8 Tris 1.5M	10% SDS	30% Acrylamide	10% APS	TEMED
2.56 ml	2.08 ml	80 μl	3.2 ml	80 μl	8 μl

將異丙醇去除並以 MQ 水沖洗乾淨，再以圖畫紙將多餘水分吸乾，接著以下表配製成上層堆疊膠溶液，將溶液完全鑄滿玻璃夾板之間的剩餘空隙，最後插入齒梳靜置 30 分鐘

MQ水	ph 6.8 Tris 0.5M	10% SDS	30% Acrylamide	10% APS	TEMED
2.38 ml	1 ml	40 μl	0.536 ml	40 μl	4 μl

2-2-5.4 電泳及轉漬

將製作好的 12% SDS PAGE 膠片架入垂直式電泳槽中，內部加入新的 1X Running Buffer，靜置5分鐘確認沒有外漏後，外部加入舊的 1X Running Buffer 至液面超過電泳槽底部金屬線，根據事先計算好的蛋白質濃度，每個樣品井注入 30 μg 蛋白質樣品，若有空

餘樣品井，則注入該次實驗最大量體積之 Sample Buffer。

接著將電泳槽接上電源供應器，上層堆疊膠以 80V、30 分鐘，待樣品移動至焦集面再轉換成 130V、60 分鐘，將蛋白質依分子量大小作分離，用 1X Transfer Buffer 將整組轉印夾子浸溼，黑色面朝下、白色面朝上，並在黑色面上依序鋪上菜瓜布、三張圖畫紙，等待電泳結束後，再將電泳槽中的玻璃夾板取下，以塑膠鏟子鏟開玻璃片，切除膠體的上層堆疊膠部分，再將下層分離膠移至圖畫紙上，用 1X Transfer Buffer 將 PVDF 膜(需事先浸泡甲醇 5分鐘) 或 NC 轉漬膜浸溼後覆蓋在膠體上，再依序鋪上3張圖畫紙及菜瓜布，並用滾輪輕輕滾動菜瓜布，以除去膜和膠體之間的氣泡，將轉漬夾子闔上扣緊卡榫，再把整組準漬夾子及冰磚放入轉漬槽內，並補滿1X Transfer Buffer，槽體外部則鋪滿冰塊；接著利用全濕式轉漬系統 (Bio-Rad) 以 350 mA、60 分鐘將分離後的蛋白質轉移到 PVDF 膜 (PROTRAN, USA) 上。

再將轉漬完成的 PVDF 膜放入含有 5% 脫脂奶粉或是 5% BSA 進行 blocking，在水平震盪器上於室溫下作用 60 分鐘或在 4°C 下置放 overnight (16 小時)。隨後再以 TBS (1X) 緩衝液清洗 3 次，每次 10~15 分鐘，且水平震盪器 (KS, Taiwna) 以 100 rpm 進行清洗。接著加入一級抗體 (primary antibody)，室溫下作用 60 分

鐘或在 4°C 下於旋轉盤上作用 24 小時 (50 轉/分鐘)，然後再以 TBS (1X) 緩衝液清洗 3~4 次，每次 10~15 分鐘，去除未附著的一級抗體。

接著加入二級抗體 (secondary antibody)，在室溫下作用 1 小時，以 TBS (1X) 緩衝液清洗 3~4 次，每次 10~15 分鐘，去除未附著的二級抗體。

最後利用冷光顯影劑偵測試劑組 (MILLIPORE) 以 1:1 的比例加入 PVDF 膜上作用，讓二抗 FC 端發冷光，取至暗房壓片、顯影、定影，最後用以清水沖洗底片，底片以吹風機吹乾後標上 Marker，最後掃描並定量。

2-2-6 細胞凋亡檢測 (Caspase-3 Assay Kit)

將 10 µl 1M DTT 及 1 ml 2X Reaction Buffer 混合均勻配成總管液，在 96 孔盤中，每個孔洞加入 50 µl 1X Lysis Buffer 內含有 200 ug 蛋白質，再加入 50µl 事先配好的總管液，接著加入 5µl 4Mm DEVD-pNA，將 96 孔盤放入培養箱 1~2個小時，以 ELISA Reader 偵測 OD 400，共作兩重複。

2-2-7 動物實驗

2-2-7.1 飼養環境

將 30 隻 BALB/c 裸鼠 (5 至 6 週齡);母鼠;樂斯科生物科技，台灣)，分別每三隻飼養在環境溫度為 22 °C、相對溼度為 50% 的無菌、無病原體飼養盒中，並隨意獲得無菌、無病原體的飲水和食物，照明及黑暗每 12 個小時循環一次，在進行異種移植前，先飼養 7 天讓裸鼠適應環境。

2-2-7.2 異種移植

CE81T/VGH 經過 1.75 µg/ml ANE 30-100K 下藥處理三週後，將每 100 µl 中含有 2.5×10^6 顆的細胞懸浮液和 100 µl Matrigel 混合均勻，注射至裸鼠右背皮下，因實驗過程中 2 隻裸鼠死亡，共注射 28 隻裸鼠。

2-2-7.3 藥物治療

異種移植後第 7 天用卡尺測量腫瘤大小和體重並記錄，接著將裸鼠隨機分組，根據不同體重給予藥物治療，3-MA施打劑量為 30 mg/kg ; DDP 則為 5 mg/kg，並在開始給藥後每3天測量一次腫瘤大小，體積公式為:體積 = (長 × 寬²) / 2。

其中對照組沒有經過檳榔子萃取液(ANJ 30-100K，1.75 µg/ml)篩選過的 5 隻裸鼠和經過檳榔子萃取液篩選過的 5 隻裸鼠使用 PBS 治療；其餘控制組每組 6 隻裸鼠，分別單獨使用 3-MA、DDP

及合併使用 3-MA + DDP。

藥物注射體積皆為 100 μ l 並透過腹腔注射給藥治療，每 6 天施打一次，共給予 3 次藥物治療。

2-2-7.4 人道犧牲裸鼠

治療 18 天後，以人道的方式犧牲裸鼠，在氣麻桶中加入 1 ml Attane 揮發氣體對裸鼠進行麻醉，將裸鼠放入桶中上蓋，使其吸入過量麻醉死亡後，將手術刀先浸泡在 MQ 水潤洗，在浸入 75% 酒精消毒 3 分鐘並擦拭乾淨，接著將裸鼠右背皮下的腫瘤切除，測量長、寬並秤重紀錄，再將腫瘤移至冷凍小管，放入液態氮桶保存腫瘤組織用於後續研究。

2-2-7.5 腫瘤蛋白抽取

事先依比例將 Lysis Buffer (10X)、 Protease Inhibitor (1X)、 Phosphate Inhibitor (1X) 及 PMSF (1X)，依比例混合後加入 MQ 水配成總管液並置於冰上。取出腫瘤置於錫箔紙上，以手術刀將腫瘤塊切碎並放入微量離心管，根據腫瘤重量加入相對應之總管液，應加入之總管液體積為： $\text{腫瘤質量 (g)} \times 4000 \mu\text{l}$ 。

接著加入約 50 μ l 體積之磁珠，使用均質機轉速設定為 9、時間為 5 分鐘，將腫瘤塊打碎均質化後，將微量離心管置於冰上冷卻 20 分鐘，以此步驟共重複 3 次，再以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm、10 分

鐘離心，將含有蛋白質的上清液吸取至新的微量離心管內，放入

-80 °C 冰箱中保存，用於後續研究。

2-2-8 IEF(1D)

先配置 Rehydration buffer （如下表）

CHAPS	2 %	0.25 g
Urea	7 M	5.255 g
1% Bromophenol Blue	0.002 %	25 µl
Thiourea	2 M	1.9 g
D.D water	補充至 12.5ml	

0.5 mg 的 ANJ 30-100K 粉末 加入 340 µl 的 Rehydration buffer 再加入 0.01g DTT 充分混勻。

接著將配好的 ANJ 30-100K 樣品平均的加到陶瓷質地的膠條槽，將凝膠上的塑膠保護膜去除，IPG 條放置在已經放入樣品的陶瓷質地的膠條槽中（凝膠面朝下，使膠面覆蓋住樣品溶液），使整個膠條浸濕在混和液中，接著整個膠條槽均勻覆蓋上 1ml 礦物油，最後蓋上膠條槽的蓋子。

放置等點聚焦系統-Ettan IPGphor3 (General Electric Company , USA)

步驟設置如下表：

膠條復水 8 小時		
Step 1	200 V	Step-n-hold : 200 Vhr
Step 2	500 V	Step-n-hold : 500 Vhr
Step 3	1000 V	Step-n-hold : 1000 Vhr
Step 4	3000 V	Step-n-hold : 3000 Vhr
Step 5	8000 V	Step-n-hold : 30 min
Step 6	8000 V	Step-n-hold : 36000 Vhr

低溫狀態下約跑 40 : 35 hr。

2-2-9 膠體製程樣品

將跑完的膠條馬上分成 12 等分 (每 1.5 公分為 1 等分) 放入加有磁珠的 eppendorf 內，在無菌操作台內加入 SF-DMEM 250 μ l，以組織均質機敲打每次 5 分鐘，至膠體成泥狀，接著再補 250 μ l SF-DMEM 使 eppendorf 內的溶液體積為 500 μ l，接著以高速離心機以 12,000 rpm 於 4 °C下離心 10 分鐘，取上清液，重複 2 次收集 2 次上清液總共 1 ml 的樣品，最後將置備好的膠體樣品以 0.22

μl 小飛碟進行過濾樣品液，即可分別去進行細胞試驗。

2-2-10 以膠體製程樣品餵養細胞

將 CE81T/VGH 細胞以 10 公分培養盤培養約至八分滿，以 10 ml PBS 清洗兩次後，加入 1 ml Trypsin-EDTA (2X)於 37°C、5% 二氧化碳培養箱中作用 5~10 分鐘，輕拍培養盤使原本黏附底部的細胞懸浮，立即加入 7 ml DMEM 並移液至 15 ml 離心管靜置 5 分鐘，使大粒細胞團塊沉澱，再吸取離心管中的上層液 5 ml 至 50 ml 離心管中後，從中吸取 100 μl 至微量離心管，加入 100 μl Trypan Blue 混合均勻，接著使用細胞計數器計算細胞液濃度，在 96 孔盤中每孔種入 5×10^3 個細胞，並加入 200 μl 含有 10% FBS 及 1% 抗生素的 DMEM，最後放入培養箱中培養 24 小時。將 96 孔盤中的細胞培養廢液吸除，以 PBS 清洗兩次並加入無血清 DMEM，放入培養箱中培養 24 小時。將無血清 DMEM 抽除後用 PBS 清洗兩次，再加入製備好的 12 等分膠體樣品，分別加入 96 孔盤中的孔洞中，放置培養箱中培養 12 個小時後，每個小時用顯微鏡觀察一次，並拍照紀錄。

第三章 結果與討論

3.1 3-MA與DDP 對長期處理過 ANJ 30-100K 的 CE81-T/VGH

與自體吞噬之影響

如圖一所示，CE81T/VGH 細胞經 Chronic ANJ 30-100k Stimulation (CAS)，慢性的 ANJ 30-100K 刺激 ($1.75 \mu\text{g/ml}$) 處理三週後，單獨使用 3-MA (1mM) 可顯著的抑制 LC3-II 的表現量，而單獨使用 DDP ($15\mu\text{M}$) 僅有部分的抑制效果，但若將兩種藥物同時使用則有顯著的抑制效果，表明 DDP 並不會影響 3-MA 抑制 LC3-II 之活性。

3.2 3-MA 對 DDP 所誘導的細胞凋亡之影響

如圖二所示，CE81T/VGH 細胞經 Chronic ANJ 30-100k Stimulation (CAS)，慢性的 ANJ 30-100K 刺激 ($1.75 \mu\text{g/ml}$) 處理三週後，單獨使用 DDP ($15\mu\text{M}$) 有顯著地誘細胞凋亡的效果，而同時使用 3-MA (1mM) 與單獨使用 DDP 時，相比之下則有更顯著的效果，表明使用 3-MA 抑制自體吞噬對於 DDP 所誘導的細胞凋亡有加成的作用。

3.3 3-MA 與 DDP 對處理過 ANJ 30-100K 三週的 CE81T/VGH 在裸鼠體內生長之影響

如圖三所示，在裸鼠實驗模式中，單獨使用 3-MA（30 mg/kg）或 DDP（5 mg/kg）均有部分抑制腫瘤生長的效果(未達統計上之意義)，但若將兩者藥物合併使用可有效的抑制腫瘤生長，有顯著的協同作用。

3.4 ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引起之細胞外觀變化

利用等電點聚焦分離 ANJ 30-100K 後，取出膠條將其分成十二個片段（每 1.5 cm 為一等分），使用不含胎牛血清的 DMEM 溶出個片段膠體的內含物，經過 1 倍稀釋後，處理 CE81T/VGH 細胞；結果如圖四顯示，CE81T/VGH 細胞株對膠體內含物第七片段的溶出物比起其他片段的溶出物，所引起的細胞外觀變化如細胞漲大、細胞質空化與細胞和皺縮等，最類似 ANJ 30-100K；除此之外，第八段、第十段與第十二段之膠體溶出物似乎亦具有細胞毒性（圖四）。

在過去我們細胞實驗已驗證，多種類型的癌細胞經過 ANJ 30-100K 長期處理後，可以提高細胞自體吞噬的活性，並對於 DDP 及無血清的刺激具有較高的耐受性，但若抑制細胞自體吞噬的路徑，並同時使用 DDP 促使細胞走向細胞凋亡，則對於抑制癌細胞的生長具有協同加成的效果。而在動物實驗模式中，更顯示出與未長期處理過

的 CE81T/VGH 細胞相比，經過 ANJ 30-100K 長期處理的細胞在裸鼠體內的生長情形較佳，且腫瘤大小具有顯著的差異，而單獨給予 3-MA 或 DDP，均有部分抑制腫瘤生長的效果，但未達統計上之意義

；若將兩種藥物合併使用時，不僅具有協同作用的效果，且腫瘤大小與單獨給予藥物治療相較，具有顯著上的差異，便與細胞模式結果一致⁽³¹⁾。

過去我們曾嘗試用許多方法純化 ANJ 30-100K，包括膠體層析法、離子交換樹脂層析法、高效液相層析法與薄層層析法等，均因 ANJ 30-100K 內含高黏性物質，而無法得到良好的分離效果。本研究嘗試只用二維電泳中的等電位聚焦法來分離 ANJ 30-100K，並成功的在四個膠體片段中，追蹤到可以誘導細胞進行自體吞噬的活性。希望能夠再藉由 HPLC 或其他純化方式，分析單一膠體片段中的有效成分為何。

第四章 結論

1. 自體吞噬抑制劑在治療長期 ANJ 30-100K 刺激後的 CE81T/VGH細胞時，對 DDP 具有輔助性的療效。
2. 在裸鼠實驗模式中，單獨使用3-MA、DDP，並無法顯著的抑制腫瘤生長的效果，但若是將兩種藥物合併使用，即可有顯著抑制腫瘤生長的效果。
3. ANJ 30-100K 經等電點聚焦分離之後，誘導自體吞噬的有效成分可能位於 pI 4.25 , pI 3.75 , pI 3.5 與 pI 2.8 。

參考文獻

1. Lin CY, Pan TS, Ting CC, Liang SS, et al. Cytochrome p450 metabolism of betel quid-derived compounds: implications for the development of prevention strategies for oral and pharyngeal cancers. *ScientificWorldJournal*. 2013:618032.
2. 衛生福利部國民健康署。104 年癌症登記年報。癌症登記報告<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=269&pid=808>
4。2017年12月27日。2018年12月27日。2018年05月20日。
3. 衛生福利部國民健康署。檳榔防制暨口腔癌防治。癌症防治。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/List.aspx?nodeid=204>。
2015年11月12日。2018年05月20日。
4. 吳寶芬。檳榔管理方案簡介。行政院農業委員會。
<https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2502315>。2014年12月。2014年12月。2018年05月20日。
5. 陳柏偉。口腔殺手---檳榔的淺論。口腔殺手---檳榔的淺論。
<https://www.shs.edu.tw/works/essay/2018102722572314.pdf>。2008年08月22日。2008年08月22日。2018年05月20日。
6. Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. Role of areca nut in betel quid associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol*. 2001;37:477-492.
7. Nair UJ, Obe G, Friesen M, Goldberg MT, et al. Role of lime in the generation of reactive oxygen species from betel-quid ingredients. *Environ Health Perspect*. 1992;98:203-205.

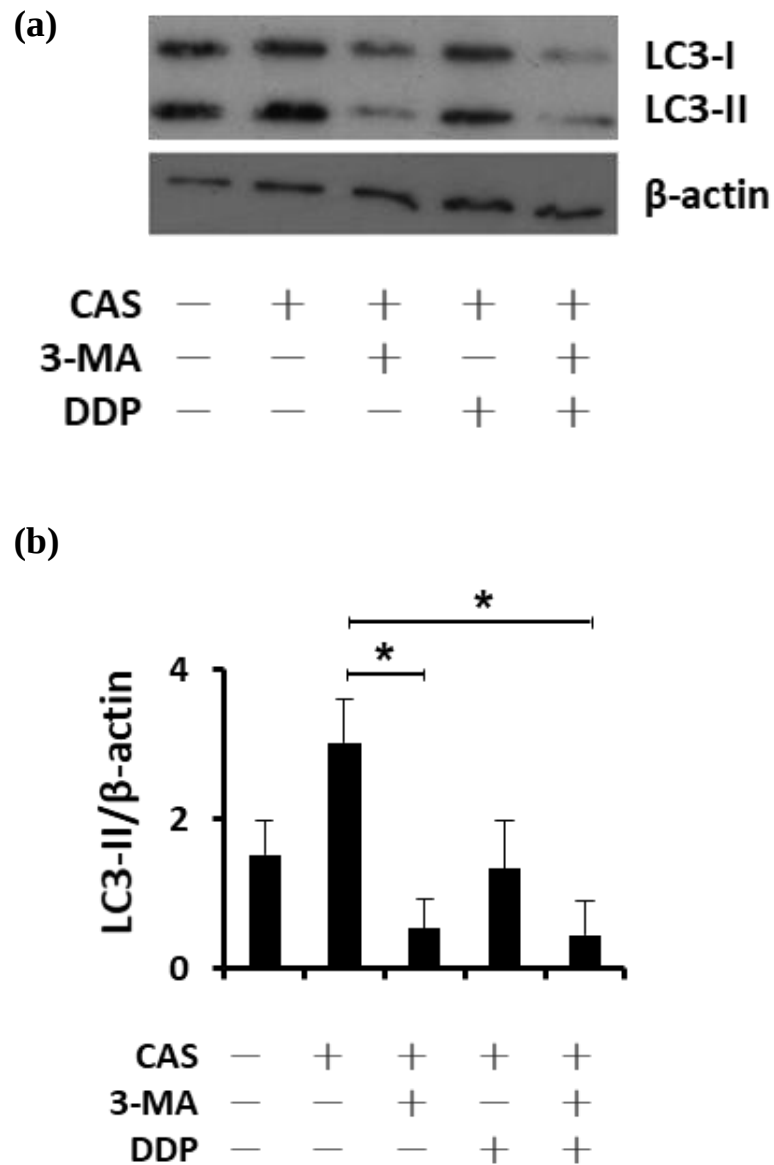
8. Li WC1, Lee PL, Chou IC, et al. Molecular and cellular cues of diet-associated oral carcinogenesis--with an emphasis on areca-nut-induced oral cancer development. J Oral Pathol Med. 2015 Mar;44(3):167-77.
9. 衛生福利部國民健康署。口腔癌防治。檳榔防制暨口腔癌防治。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=613&pid=1118>。
2018年03月29日。2018年03月29日。2018年05月20日
10. 國家環境毒物研究中心。植物性食品安全資料庫。食品安全資訊網。https://nehrc.nhri.org.tw/foodsafety/plants_detail.php?id=65。
2018年05月20日
11. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. Cell Struct Funct. 2002;27(6):421-9.
12. Chang MC, Chan CP, Wang WT, et al. Toxicity of areca nut ingredients: activation of CHK1/CHK2, induction of cell cycle arrest, and regulation of MMP-9 and TIMPs production in SAS epithelial cells. Head Neck. 2013 Sep;35(9):1295-302.
13. Meghji S, Scutt A, Harvey W, et al. An in-vitro comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. Arch Oral Biol. 1987;32(3):213-5.
14. Lee PH, Chang MC, Chang WH, et al. Prolonged exposure to arecoline arrested human KB epithelial cell growth: regulatory mechanisms of cell cycle and apoptosis. Toxicology. 2006;220(2-3):81-9.
15. 癌症防治組。檳榔子是國際認定第一類致癌物。衛生福利部國民健康署 <https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=1127&pid=1804>。2007年04月15日。2015年01月27日。2018年05

月 20 日。

16. Wang M, Xiao C, Ni P, et al. Correlation of Betel Quid with Oral Cancer from 1998 to 2017: A Study Based on Bibliometric Analysis. Chin Med J . 2018;131(16):1975-1982.
17. Vanden Berghe T, van Loo G, Saelens X, et al. Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD. J Biol Chem. 2004;279(9):7925-33.
18. Jeng JH, Wang YJ, Chang WH, et al. Reactive oxygen species are crucial for hydroxychavicol toxicity toward KB epithelial cells. Cell Mol Life Sci. 2004;61(1):83-96.
19. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene. 2004;23(16):2891-906.
20. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. Cell Struct Funct. 2002;27(6):421-9.
21. 范姜文榮。【2016諾貝爾生理醫學獎】發現自噬作用機制。
CASE報科學。 <https://scitechvista.nat.gov.tw/c/Nm6f.htm>。2013年
10月01日。2013年10月01日。2018年05月20日。
22. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. Cell Struct Funct. 2002;27(6):421-9.
23. Klionsky DJ. Cell biology: regulated self-cannibalism. Nature. 2004 ;431(7004):31-2.
24. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(3):211-6.

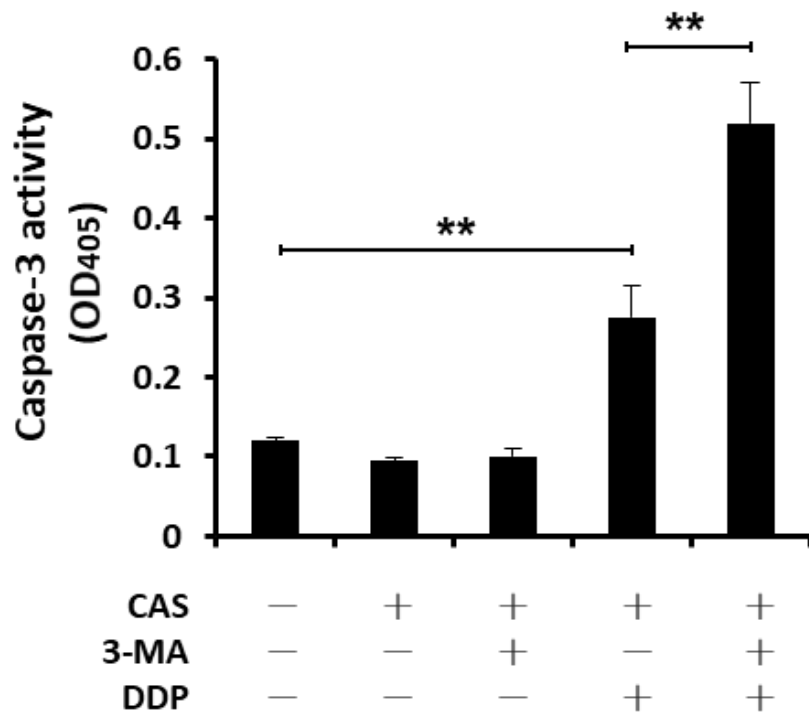
25. Liu SY, Lin MH, Hsu YR, et al. Arecoline and the 30-100 kDa fraction of areca nut extract differentially regulate mTOR and respectively induce apoptosis and autophagy: a pilot study. J Biomed Sci. 2008;15(6):823-31. doi: 10.1007/s11373-008-9273-8.
26. Liu SY, Lin MH, Hsu YR, et al. Arecoline and the 30-100 kDa fraction of areca nut extract differentially regulate mTOR and respectively induce apoptosis and autophagy: a pilot study. J Biomed Sci. 2008;15(6):823-31. doi: 10.1007/s11373-008-9273-8.
27. Lin MH, Hsieh WF, Chiang WF, et al. Autophagy induction by the 30-100kDa fraction of areca nut in both normal and malignant cells through reactive oxygen species. Oral Oncol. 2010;46(11):822-8.
28. Liu SY, Lin MH, Hsu YR, et al. Arecoline and the 30-100 kDa fraction of areca nut extract differentially regulate mTOR and respectively induce apoptosis and autophagy: a pilot study. J Biomed Sci. 2008;15(6):823-31. doi: 10.1007/s11373-008-9273-8.
29. Lin MH, Hsieh WF, Chiang WF, et al. Autophagy induction by the 30-100kDa fraction of areca nut in both normal and malignant cells through reactive oxygen species. Oral Oncol. 2010;46(11):822-8.
30. 楊蓓蓉。ANJ 30-100K 的分子構造與作用機轉的探討。嘉南藥理大學 2018 年。
31. 劉邦衍。檳榔子成份對腫瘤細胞的影響。嘉南藥理大學。2017 年。

附圖



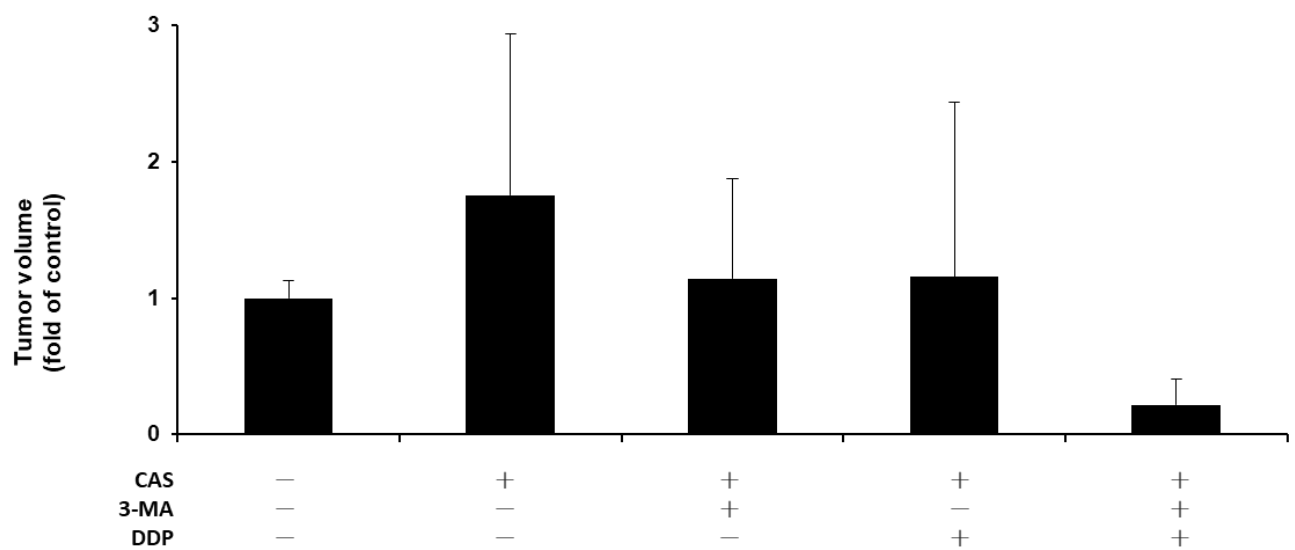
圖一、3-MA 與 DDP 對長期處理過 ANJ 30-100K 的 CE81-T/VGH 與自體吞噬之影響

CE81T/VGH 經 ANJ 30-100K (CAS)(1.75 μ g/ml)處理三週後，分別使用 3-MA (1 mM)、DDP(15 μ M)及兩者合併使用 24 小時後，以西方墨點法進行 LC3-II 表現量分析。



圖二、3-MA 對 DDP 所誘導的細胞凋亡之影響

CE81T/VGH 細胞經 ANJ 30-100K (CAS) (1.75 μ g/ml) 處理三週後，分別使用 3-MA (1 mM)、DDP (15 μ M) 及兩者合併使用 24 小時後，檢測 Caspase-3 之表現量。 $**p < 0.01$ 。

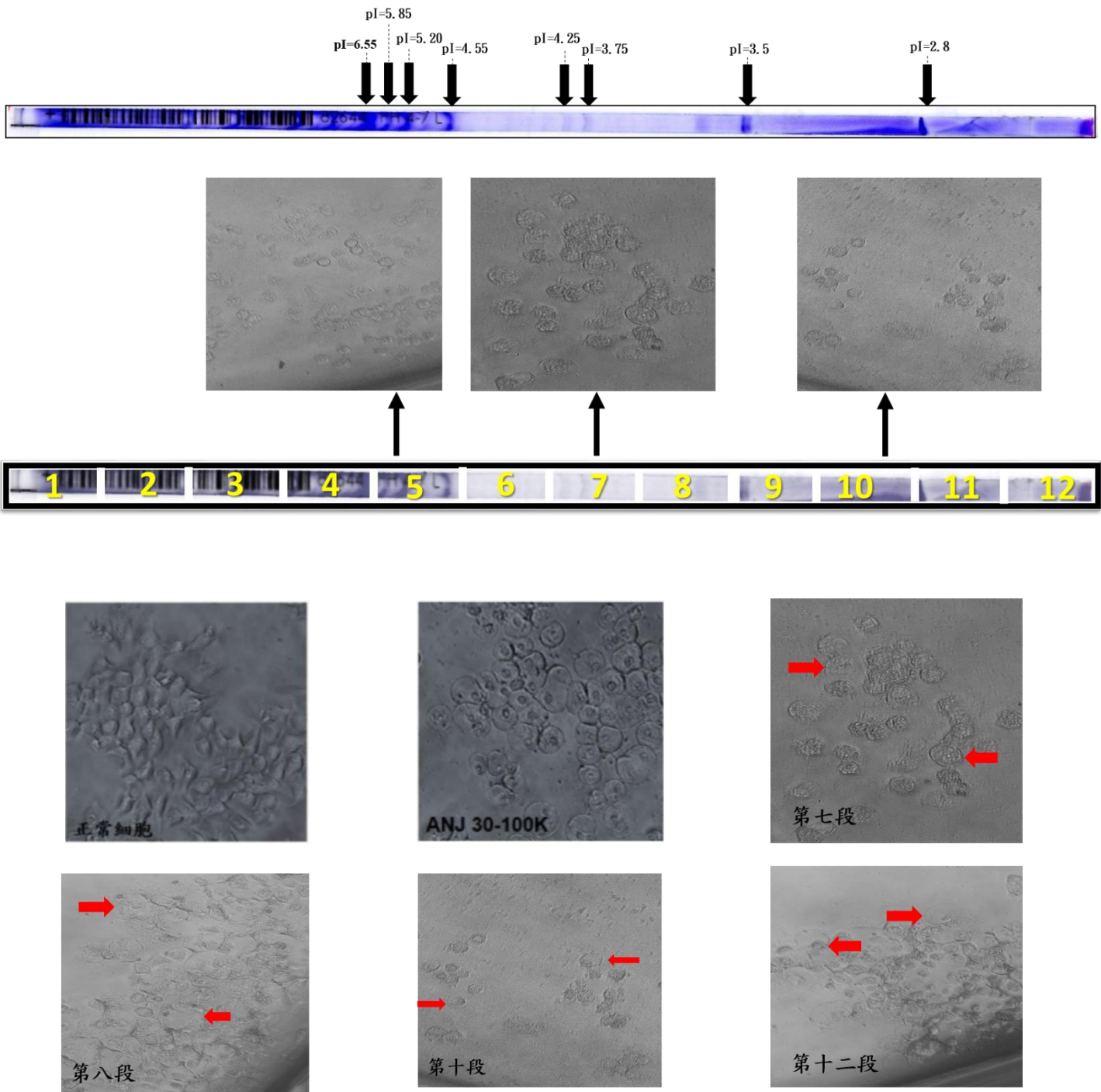


圖三、 3-MA 與 DDP 對處理過 ANJ 30-100K 三週的 CE81T/VGH 在裸鼠體內生長之影響

在老鼠實驗模式中，將經過 ANJ 30-100K (CAS) (1.75 $\mu\text{g/ml}$) 處理三週後的 CE81T/VGH 細胞對裸鼠進行異種移植，分別給予 PBS、3-MA、DDP 及 3-MA + DDP 合併使用進行藥物治療 18 天後，單獨使用 3-MA 或 DDP 均有部分抑制腫瘤生長的效果(未達統計上之意義)，但若將兩者藥物合併使用可有效的抑制腫瘤生長。

樣本數= 6，CAS =1.756 為 100%，3-MA =1.142 為 70%，DDP =1.156 為 80%，3-MA+DDP=0.216 為 20%，故 3-MA 70% x DDP 80% > 3MA+DDP 20%，具有協同作用。

CE81T/VGH



圖四、ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後，膠條的內含物所引起之細胞外觀變化

將 0.5 mg 的 ANJ 30-100K 經等電位聚焦法分離後的膠條切成如圖示的十二段，以不含胎牛血清的 DMEM（500 μ L）將每段膠條的內含物溶出，並經 1 倍的稀釋後處理 CE81T/VGH 細胞 24 小時，再置於光學顯微鏡下觀察與拍照。

111年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：林美惠			計畫編號：111-2635-B-041-001-		
計畫名稱：抑制自體吞噬對經檳榔子成分長期刺激後的食道癌細胞提升順鉑療效之機轉研究－經刺激的上皮癌細胞可能比未經刺激的細胞對抑制自體吞噬更為敏感					
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇	準備中
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇	
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
參與計畫人力	本國籍	大專生	1	人次	嘉南藥理大學生物科技系(大四)
		碩士生	1		陽明交通大學生命科學生命科學系暨基因體科學研究所
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					