

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

牙髓病學組

碩士論文

School of Dentistry

Graduate Institute of Clinical Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis



丁酸對 MG-63 類骨瘤細胞之細胞週期、細胞型態  
以及活性氧產生的影響

Effect of Butyrate on cell cycle, cell morphology and Reactive Oxygen  
Species production of MG-63 osteoblasts

廖敏為

Min-Wei Liao

指導教授：鄭景暉博士

Advisor: Jjiang-Huei Jeng, Ph.D.

中華民國 103 年 6 月

June, 2014

## 謝致



轉眼間在台大牙髓病科接受訓練與學習已經三年，覺得自己很充實也很愉快，三年來接受許多人的幫忙與鼓勵，十分感謝也感到自己非常幸運。首先感謝三年來不辭辛勞、無所保留的指導教授 鄭景暉主任，不論在牙科臨床學習以及實驗研究方面，老師豐富的學識都給予我很多的幫助與提攜，讓我在三年來成長不少。也感謝牙髓病科的老師們：林思洸醫師、李苑玲醫師、蔡宜玲醫師在臨床上的指導，還有牙髓病科的夥伴：凱哥、惠萍、佑珊三年來的幫忙，點滴在心頭。也感謝親愛的學長姊：韋綾學姊、彥臻學姊、郁安學姊還有亦師亦友的琇品學長，給予我許多的建議與幫忙。也要感謝我最優秀的同學們：宛瑜、煒慶以及為盛，恭喜大家終於要畢業啦！當然還有 R347 堅強的實驗團隊：育雯、穎成、奕君、順華、欣樺、倚慧、孟儒、盈盈、芷綾，有你們的幫忙，才能讓我這甚麼都不懂的新手學會做實驗的方法，謝謝你們！

最後感謝我最親愛的爸爸媽媽、遠在德國的妹妹、疼愛我的女友函融以及建中 310 的高中好友們，有你們的支持我才能撐過這三年，謝謝你們包容我的無知與任性。謹以此致感謝我想感謝的大家，謝謝你們！

## 中文摘要



**實驗目的:** 丁酸(丁酸)是一種常見的厭氧性葛蘭氏陰性菌(anaerobic Gram-negative bacteria)的代謝產物，常見於口腔致病菌，亦常見於牙髓以及牙周致病菌中。本篇研究的目的是探討丁酸對 MG-63 類骨瘤細胞的毒性、訊息傳遞與細胞週期的進行的過程中所扮演的角色。藉此了解此牙髓與牙周致病菌常見的毒素產物對於牙齒周圍骨組織的影響，有助於釐清牙根尖齒槽骨與牙周環境發炎和修復的生理病理過程。

**實驗方法:** 本研究以丁酸在不同的刺激濃度以及刺激時間作用於 MG-63 類骨瘤細胞，觀察其細胞反應以及細胞週期相關因子的變化。

### 實驗結果:

1. 丁酸 對於 MG-63 細胞的毒性方面，在本實驗設定之濃度(0- 16 mM)與刺激時間內對於 MG-63 類骨瘤細胞的細胞型態與生長來說並沒有明顯的抑制現象，在光學顯微鏡下以及電子顯微鏡下 MG-63 細胞的外型並沒有顯著的變化。
2. 在細胞存活率分析的結果顯示在高濃度(尤其是 16mM)的丁酸的刺激下，細胞的生長分化顯著受到抑制。
3. 加入丁酸對於 MG-63 細胞的訊息傳遞與細胞週期方面，它能夠影響細胞週期在 G<sub>2</sub> 期進入 mitosis 的過程，相關的調控因子如 Cdc2、Cdc25C 以及 Cyclin-B1 的蛋白質反應; Cdc25C 以及 Cyclin-B1 的 mRNA 表現都會受到丁酸的影響而下降，隨著丁酸濃度上升，G<sub>2</sub> 期進入 mitosis 的停滯現象會變明顯。
4. MG-63 細胞在較高濃度丁酸的刺激下，活性氧以及 p21 的產量會顯著的提升，亦可能會造成細胞週期的停滯。

**結論:** 厭氧性葛蘭氏陰性菌的重要產物丁酸會造成 MG-63 細胞的細胞週期停滯，尤其在進入分裂期前，隨濃度上升影響更鉅，顯示在牙周發炎以及牙根尖發炎中

細菌所產生的丁酸可能會影響周圍骨細胞，進而延滯周圍骨頭的修復。亦即，丁酸的毒性與活性氧過度產生以及細胞週期相關之蛋白質與 RNA 表現有關。

**關鍵字：** 丁酸、MG-63 類骨瘤細胞、細胞週期、細胞生長、活性氧、根尖病變、根管致病菌

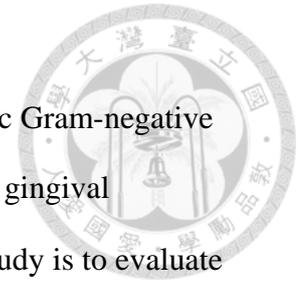
## Abstract

**Aim:** Butyric acid, one of major byproducts produced by anaerobic Gram-negative periodontal and root canal micro-organism and is easily detected in gingival crevicular fluid from human periodontal pockets. The aim of this study is to evaluate the role of butyric acid in the cytotoxicity, signaling pathway and cell cycle of the MG-63 osteoblast cell-line. By understanding the role of butyric acid in MG-63 osteoblast cell-line, we can surmise the effect of this toxicant in human alveolar bone and the possible reaction while osteoblasts encounter butyric acid and the possible progression of bone healing.

**Material and Methods:** MG-63 osteoblast cells were treated with butyric acid in different concentration and different stimulation time. The MG-63 cell morphology and cell cycle-related factors were evaluated: Cell morphology was observed under optical microscope and scanning electron microscope. MTT assay was used to appraise the cell viability. Changes in mRNA expression was determined by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein level was evaluated by western blotting.

**Results:** MG-63 cell under the treatment of butyric acid (range: 1mM-16mM) showed no significant change in cell morphology. The cell viability was significantly suppressed in high concentration group(16 mM) of butyric acid. Expression in protein level of Cdc2, Cdc25C and Cyclin-B1 were decreased as the concentration of butyric acid increased. The expression of the mRNA level of Cdc25C and Cyclin-B1 were decreased as the concentration of butyric acid increased. The ROS and the p21 expression of MG-63 cell were elevated in the groups of high concentration of butyric acid.

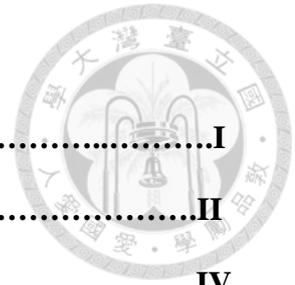
**Conclusions:** Many factors could affect the progress of cell cycle, one of the important by-products of Gram-negative bacteria- butyric acid may take part in cell



cycle, high concentration of butyric acid might hinder the process of the cell cycle, especially in G<sub>2</sub>-mitosis phase. butyric acid might also elevate the production of ROS, which may affect the cell cycle of MG-63.

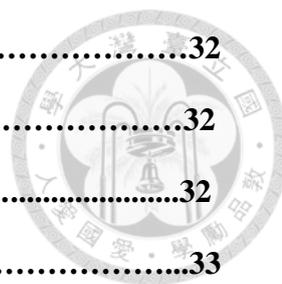
**Key words:** butyric acid 、 MG-63 osteoblasts 、 cell cycle 、 cell growth 、 periapical lesion 、 root canal microorganism

# 目錄 Table of Contents



謝致.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
目錄.....	VI
圖次目錄.....	XI
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 丁酸 (Butyric acid).....	3
2-2 人類成骨肉瘤細胞 (MG-63) .....	5
2-3 細胞週期 (cell cycle) .....	5
2-4 丁酸與細胞週期.....	8
2-5 活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS).....	10
第三章 研究假說和實驗目的.....	15
第四章 材料和方法.....	16
4-1 藥劑(Reagent).....	17
4-2 培養 MG-63 細胞.....	17
4-3 藥物對 MG-63 細胞型態影響(cell morphology) .....	17
4-4 藥物的細胞毒性分析-細胞存活率分析(MTT assay) .....	18
4-5 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR).....	18
4-6 西方點墨法(Western Blot).....	22
4-7 利用流式細胞儀(Flow Cytometer)分析細胞週期變化.....	26
4-8 利用 DCF 染色來判定細胞內的活性氧產生.....	27
4-9 電子顯微鏡觀察細胞型態.....	28
4-10 統計分析.....	30

第五章	結果.....	32
5-1	細胞型態觀察(Cell morphology).....	32
5-2	細胞存活率分析 (MTT assay) .....	32
5-3	流式細胞儀分析(Flowcytometry analysis) .....	33
5-4	反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) .....	33
5-5	西方墨點法 (Western blotting) 測定蛋白質表現.....	33
5-6	流式細胞儀 DCF 染色來判定細胞內的活性氧含量.....	33
第六章	討論.....	35
6-1	Cdc2 磷酸化與否在細胞週期中所扮演的角色.....	35
6-2	Cdc25 Family 在細胞週期所扮演的角色.....	36
6-3	CyclinB 在細胞週期所扮演的角色.....	37
6-4	細胞型態以及細胞存活率.....	37
6-5	活性氧含量以及 p21 的表現.....	38
第七章	結論.....	40
第八章	參考資料.....	42



## 圖次

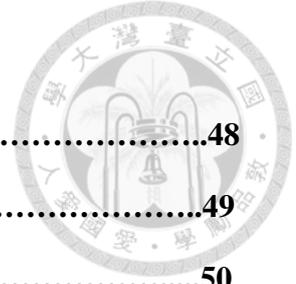


圖 2-1 細胞週期概圖.....	48
圖 2-2 細胞週期之 G <sub>2</sub> /M 期概圖.....	49
圖 2-3 細胞週期中之正向與負向調控因子.....	50
圖 2-4 活性氧的作用時間、濃度以及對細胞週期的影響.....	51

### 加入藥物後 MG-63 細胞型態光學顯微鏡觀察

圖 5-1-1 MG-63 細胞型態(丁酸刺激 2 小時).....	52
圖 5-1-2 MG-63 細胞型態(丁酸刺激 6 小時).....	52
圖 5-1-3 MG-63 細胞型態(丁酸刺激 24 小時).....	53
圖 5-1-4 MG-63 細胞型態(丁酸刺激 48 小時).....	53

### 加入藥物後 MG-63 細胞型態以電子顯微鏡觀察

圖 5-1-5 MG-63 細胞型態(丁酸刺激 24 小時)放大 1000 倍.....	54
圖 5-1-6 MG-63 細胞型態(丁酸刺激 24 小時)放大 5000 倍.....	54

### 細胞存活率分析

圖 5-2 MTT assay.....	55
----------------------	----

### 加入藥物後 MG-63 細胞進行流式細胞儀分析- PI 染色

圖 5-3-1 MG-63 加入丁酸刺激 2 小時後 M1 值變化(圖示).....	56
圖 5-3-2 MG-63 加入丁酸刺激 2 小時後 M1 值變化(統計).....	57
圖 5-3-3 MG-63 加入丁酸刺激 6 小時後 M1 值變化(圖示).....	58
圖 5-3-4 MG-63 加入丁酸刺激 6 小時後 M1 值變化(統計).....	59
圖 5-3-5 MG-63 加入丁酸刺激 24 小時後 M1 值變化(圖示).....	60

圖 5-3-6	MG-63 加入丁酸刺激 24 小時後 M1 值變化(統計).....	61
圖 5-3-7	MG-63 加入丁酸刺激 48 小時 M1 值變化(圖示).....	62
圖 5-3-8	MG-63 加入丁酸刺激 48 小時後 M1 值變化(統計).....	63
圖 5-3-9	MG-63 加入丁酸 2 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(圖示).....	64
圖 5-3-10	MG-63 加入丁酸 2 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(統計).....	65
圖 5-3-11	MG-63 加入丁酸 6 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(圖示).....	66
圖 5-3-12	MG-63 加入丁酸 6 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(統計).....	67
圖 5-3-13	MG-63 加入丁酸 24 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(圖示).....	68
圖 5-3-14	MG-63 加入丁酸 24 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(統計).....	69
圖 5-3-15	MG-63 加入丁酸 48 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(圖示).....	70
圖 5-3-16	MG-63 加入丁酸 48 小時後 G <sub>2</sub> 期停滯現象(統計).....	71

加入藥物後 MG-63 細胞之細胞週期相關的 RNA 表現變化

圖 5-4-1	在不同濃度的丁酸作用下, Cdc25C 的表現變化.....	72
圖 5-4-2	在不同濃度的丁酸作用下, Cyclin B 的表現變化.....	73

加入藥物後 MG-63 細胞之細胞週期相關的 RNA 表現變化

圖 5-5	細胞週期相關蛋白質表現.....	74
-------	------------------	----

加入藥物後 MG-63 細胞進行流式細胞儀分析- DCF 染色

圖 5-6-1	活性氧分析 (圖示).....	75
圖 5-6-2	活性氧分析 (統計).....	76

## 第一章 前言

本篇論文研究與臨床牙科治療的應用:當牙齒因為外來的刺激如齲齒、外傷等而侵犯到牙髓腔時，來自唾液的細菌(原本不應存在於牙髓腔內的細菌)將入侵牙髓腔甚至到牙根尖以及其周圍的骨頭，而細菌本身以及所代謝的產物會對牙根尖周圍的骨頭產生影響。

丁酸是一種常見的短鏈脂肪酸，是厭氧性葛蘭氏陰性菌如牙齦卍淋單胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、具核酸桿菌(*Fusobacterium nucleatum*)等細菌的代謝產物之一，常見於腸道內生細菌(endogenous intestinal flora)發酵作用中。(Hamer et al., 2008)，也被認為是腸道上皮細胞(enterocytes)的能量來源，丁酸能夠影響腸道細胞的增生(proliferation)、分化(differentiation)並且能夠抑制組蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylases, HDACs)抑制劑以及引發細胞凋亡(apoptosis) (Conway et al. 1995; Boisteau et al.1996)。有趣的是，在*in vivo*的實驗中，丁酸能夠刺激腸道上皮細胞的細胞分化增生，但在*in vitro*的實驗中它卻是抑制上皮細胞分化的(Canny et al., 2008)。

在口腔環境中，不論是在牙周發炎抑或是在牙髓發炎都可能有丁酸的產生。許多在牙周發炎方面的研究指出：丁酸在較嚴重的牙周病患的口腔中的含量較高，而且丁酸對於人類牙齦纖維芽細胞、內皮細胞、牙齦上皮細胞的生長分化都有抑制的作用，另外它可能會造成細胞凋亡或是細胞週期的停滯，甚至可能使得細胞沒有辦法進行接下來的分化，雖然我們知道在牙根尖病變中也會有丁酸的產生，但是丁酸在牙根尖發炎中所扮演的角色並沒有完整相關的研究，因此我們想要了解在不同濃度的丁酸(參考口腔環境中的濃度範圍)對於模擬造骨細胞(osteoblasts)的MG-63類骨瘤細胞的影響，包含細胞生長、型態、分化、細胞週期的推展以及活性氧含量的多寡，在進一步了解丁酸對於牙根尖周圍骨細胞以及牙周骨細胞可能的影響後，或許可以當作未來研究牙周骨頭以及牙根尖周圍骨頭髮炎與癒合機制的參考，幫助我們在臨床上的治療來幫助牙周骨頭以及牙根尖發炎

骨頭的再生與修復。並積極開發新的選擇性抑制劑來用於臨床，希望未來在牙周治療以及牙髓根尖病變的治療上能提供一個可能的治療途徑。



## 第二章 文獻回顧



### 2-1 丁酸 (butyric acid)

丁酸 (BUT; 丁酸; 酪酸; 化學式:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOH}$ )，主要見於乳製品，在動物中主要為厭氧發酵產物(anaerobic fermentation)，是一種短鏈脂肪酸 (short chain fatty acid; SCFA; 定義:  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_x\text{-COOH}$ ,  $x < 3$ ;  $C < 5$ )，丁酸主要是由一些口腔致病菌如：牙齦卟啉單胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、牙髓卟啉單胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、洛氏普雷沃菌(*Prevotella loescheii*)、中間普雷沃菌(*Prevotella intermedia*)、具核酸桿菌(*Fusobacterium nucleatum*)等細菌所分泌的代謝副產物(metabolic by-products)(Pöllänen et al., 1997; Kurita-Ochiai et al., 1998)。

在全身系統性的影響方面，丁酸在抗發炎反應的影響中被廣泛研究，被認為能夠增加腸道的保護，它是腸道細胞的能量來源，能夠影響腸道細胞的生長分化(Breuer et al., 1997); 它還能夠減少腸道上皮的通透性(intestinal epithelial permeability)。綜合來說，丁酸被認為是一種適合用來進行腸道治療的藥物(Immerseel et al., 2010)，甚至被認為可能可以減低腸道癌症的機率。

在局部口腔環境方面，研究指出，在牙周囊袋的微生物中有高達89.5%為絕對厭氧菌(obligate anaerobe)，而有74.9%為葛蘭氏陰性菌(Slots, 1977)，這些正是會釋放出丁酸的微生物。在牙髓疾病方面，許多相關的致病菌亦為葛蘭氏陰性菌，常見的牙髓感染中的葛蘭氏陰性菌有牙齦卟啉單胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、牙髓卟啉單胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、洛氏普雷沃菌(*Prevotella loescheii*)、中間普雷沃菌(*Prevotella intermedia*)、具核酸桿菌(*Fusobacterium nucleatum*)、齒垢密螺旋體(*Treponema denticola*)、福賽斯坦納菌(*Tannerella forsythia*)、直腸彎曲菌(*Campylobacter rectus*)等等。而這些牙髓疾病相關的細菌釋放到周圍環境的短鏈脂肪酸包含(Niederman et al., 1997):

1. 揮發性酸(volatile acids): 丙酸(propionic acid)、丁酸(丁酸)、異丁酸(isobutyric)、戊酸(valeric acid)、異戊酸(isovaleric acid)、乙酸(acetic acid) 以及甲酸(formic acids)。

2. 非揮發性酸(non-volatile acids): 乳酸(lactic acid)以及丁二酸(succinic acid)

這些短鏈脂肪酸為厭氧性葛蘭氏陰性菌的代謝產物，它們能夠造成嗜中性白血球(neutrophil)的趨化(chemotaxis)、脫顆粒作用(degranulation)以及吞噬作用(phagocytosis)，它們還能夠刺激介白素-1 (interleukin-1)的產生，進而導致根尖周圍骨頭吸收以及造成根尖周圍炎(periradicular disease)，而身為牙髓疾病相關細菌的代謝廢物的短鏈脂肪酸，它們也是造成牙髓相關的缺氧感染的難聞氣味的原因之一(Siqueira Jr. et al.,2007)。而短鏈脂肪酸之一的丁酸在牙髓疾病中也扮演了重要角色。

關於丁酸在口腔環境中的濃度，在口腔牙齦溝液(gingival crevicular fluid)的比較中，在嚴重牙周病的平均濃度為 $2.6 \pm 0.4$  mM，輕微者或是健康者為 $0.2 \pm 0.04$  mM，差距可達十倍以上(Niederman et al., 1997); 在其他學者的研究中，在牙周病中依不同的致病位置以及嚴重度其探測丁酸濃度介於0.5 mM到16 mM (Pöllänen et al., 1997)。

丁酸除了特別在人類牙周病扮演致病角色外(Tonetti et al., 1987)，其他研究也指出它能夠抑制人類牙齦纖維芽細胞(human gingival fibroblasts)、內皮細胞(endothelial cell)、牙齦上皮細胞(gingival epithelial cell)的生長分化(Jeng et al., 1999; Pöllänen et al.,1997)。此外，丁酸還可以誘導人類T細胞以及B細胞的細胞凋亡(Kurita-Ochiai et al., 2001); 抑制T-cell的增殖 (proliferation)以及會誘導單核細胞(monocytes)產生發炎前驅物質(pro-inflammatory cytokines) (Niederman et al., 1997)。

## 2-2 人類成骨肉瘤細胞 (MG-63)



MG-63 細胞是一種人類骨肉瘤細胞(Human osteosarcoma cell)的細胞株(cell line)，來源是惡性骨腫瘤，因為它具有一些造骨細胞(osteoblast)的特性，因此常被拿來從事骨細胞相關的研究(當作 osteoblastic models)(Pautke et al., 2004)，但是因為 MG-63 細胞與造骨細胞在染色體上的差異導致兩者在分子表現或是細胞特性上仍有一些不同。

MG-63 細胞以及造骨細胞的比較上，MG-63 細胞在大小上小了許多(約為造骨細胞的六分之一)，此外，MG-63 細胞的複製時間(doubling-time)較長(為骨細胞的 2-3 倍)，飽和濃度較高(為骨細胞的 15 到 20 倍)。在細胞型態上，MG-63 細胞的細胞外基質(extracellular matrix, ECM)組成並不完整，它的形狀呈現卵圓狀或梭狀(ovoid/ spindle)，而且它不具有明顯細胞分支(branching cell process)(Pautke et al., 2004)。

## 2-3 細胞週期(cell cycle)

細胞週期(Cell cycle)與細胞生長關係密切，它能夠決定細胞接下來要進行增生(proliferation)或是進行細胞凋亡(apoptosis)。

在真核細胞(eukaryotic cells)中，細胞週期分為四個階段(圖2-1)，包含：

- (1) 絲裂期 (細胞分裂期; Mitosis phase; M phase)
- (2) 第一間期 (DNA合成前期; Gap<sub>1</sub> phase; G<sub>1</sub> phase)
- (3) 合成期 (DNA合成期; Synthesis phase; S phase)
- (4) 第二間期(DNA合成後期; Gap<sub>2</sub> phase; G<sub>2</sub> phase)

其中G<sub>1</sub>期、S期以及G<sub>2</sub>期被合稱為間期(interphase)，間期佔了細胞分裂循環

中大部分的時間，主要進行的是進行細胞分裂前的準備。因此，可以說細胞週期的分期主要由兩部分構成:間期以及絲裂期。



### **2-3-1 Interphase (包含G<sub>1</sub>期、S期以及G<sub>2</sub>期)**

在間期時，細胞中的細胞質(cytoplasm)會增倍並合成DNA，進行分裂的細胞大約有90% - 95%的時間在進行間期的工作。

#### **2-3-1-1 G<sub>1</sub>期(第一間期; DNA 合成前期; Gap<sub>1</sub> phase)**

本時期在 DNA 合成之前進行，為了接下來細胞的分裂，此時期必須先進行細胞質以及胞器數目的增加，細胞會變成原本的兩倍大小，若細胞接下來不進行分裂則將保持在此不增殖階段，又叫做 G<sub>0</sub> 期。也就是說，不進行增殖狀態的 G<sub>1</sub> 期細胞稱為 G<sub>0</sub> 期細胞。與此時期相關的正向(幫助細胞週期推進)調控因子有: Cyclin D、Cyclin E、轉錄因子蛋白 DP1、E2F 等等; 而相關的負向調控因子則有: p16、p15、p18、p19、p27、p21、p57、視網膜母細胞瘤蛋白 (retinoblastoma) 等等。

#### **2-3-1-2 S 期(合成期; DNA 合成期; Synthesis phase)**

本時期主要進行的是細胞中的 DNA 合成，在此時期，染色體的量會變成兩倍。與此時期相關的正向調控因子為 Cyclin A; 而相關的負向調控因子則有: p27、p21、p57 等等。

### 2-3-1-3 G<sub>2</sub>期(第二間期(DNA 合成後期; Gap<sub>2</sub> phase)

本時期也可以說是在細胞分裂前的最後準備，細胞著手進行的是蛋白質的合成以及細胞體積持續增大。

### 2-3-1-4 M期(絲裂期; 細胞分裂期; Mitosis phase)

本時期包含了細胞質分裂(cytokinesis)以及細胞核內染色體(chromosome)的分離，在分裂期結束時會產生兩個大小相同的子細胞(daughter cells)，每個細胞內具有的相同的基因組合(identical genetic material)，M期又可以細分為四個時期：

- (1) Prophase (前期): 此時期染色質(chromatin)濃縮成染色體(chromosome)，而且染色體已完成複製。
- (2) Metaphase (中期): 此時期核膜(nuclear membrane)破壞，染色體形成著絲點(kinetochores)。
- (3) Anaphase (分裂後期): 此時期著絲點分裂成兩個，兩條姐妹染色單體(Sister chromatids)彼此分開(為兩形狀、大小相同的染色體)。
- (4) Telophase (分裂末期): 姊妹染色體被微管拉到細胞兩端，細胞逐漸形成完整的核膜重新形成，染色體解旋成為染色質，核仁重新出現。

### 2-3-1-5 G<sub>2</sub>/M phase (圖2-2)

影響G<sub>2</sub>期是否會進入mitosis是受到週期素A (Cyclin A)、週期素B (Cyclin B)以及週期素活化酶-1 (Cyclin-dependent kinase 1, CDK1)所影響。Cyclin A以及CDK1的結合會在G<sub>2</sub>期達到高峰，但是會很快地降解掉。接著是否會進入mitosis

是由Cyclin B以及CDK1的結合來決定(Boonstra et al., 2004)。在人類細胞中，CDK1主要由Cdc2所編碼(encode)，在G<sub>2</sub>/M期交界時，Cdc2以及Cyclin-B1的結合可以決定細胞是否進入mitosis (Hartwell & Kastan et al., 1994; Yuan et al., 2004)。

Cdc2的活性受到Wee1、Cyclin-B1以及Cdc25C所影響，當Cyclin-B1的量上升時會使得Cdc2活性上升，而Cdc2在磷酸化時並不具有活性，Wee1在tyrosine-15的位置能使得Cdc2保持磷酸化(phosphorylation)(Gould et al., 1989)，而Cdc25C則可以使Cdc2進行去磷酸化(dephosphorylation)後並與Cyclin B結合成為活化態(Graves et al., 2000; Yuan et al., 2004)，因此Cdc25C、Cdc2以及Cyclin-B1的蛋白質的表現量可以觀察是否有G<sub>2</sub>/M期停滯的現象。

G<sub>2</sub>/M期停滯對於細胞面對DNA損傷是非常重要的，它可以避免破壞的DNA在進入S期之後大量累積，如果將此停滯相關的基因Wee1或是將其磷酸化位置tyrosine-15移除，則此保護機制(G<sub>2</sub>/M checkpoint)就會被破壞，DNA便不經修復就進入S期，而若是缺乏Cdc25C則只是會造成G<sub>2</sub>/M期停滯，不論是Wee1或是Cdc25C都在G<sub>2</sub>/M期的進行扮演重要角色。

在人類細胞中，Chk1可以幫助Cdc25C磷酸化(磷酸化位置在絲胺酸-216，Serine-216)，接著可“創造”出一個供14-3-3蛋白質結合的位置(Peng et al. 1997)。14-3-3 蛋白質屬於多基因家族(conserved multi-gene family)的一員，它可以跟磷酸化的蛋白質基序(phosphorylated motifs)結合，在細胞分化中扮演重要角色。14-3-3蛋白質跟Cdc25C的結合在mitosis時是不會發生的，但如果14-3-3 蛋白質的結合位置被破壞時，細胞進入mitosis的速度會加快，而這種細胞在面對DNA損傷或是外在壓力時細胞週期是無法停滯在G<sub>2</sub>期的。

## 2-4 丁酸與細胞週期

真核生物細胞的細胞週期受到週期素(Cyclin)以及週期素活化酶(Cyclin-

dependent kinases; CDKs)的調控(Jeffrey et al., 1995; Morgan et al., 1995)。CDK是一種具有絲胺酸/羥丁胺酸(serine/threonine)的蛋白質激化酶(protein kinases)，必須要跟週期素結合以達到活化態；而週期素活化酶抑制劑(CDK inhibitors; CDKIs)則是在控制細胞週期中扮演著抑制的角色(藉由在特定的時期調控CDK的活性)(Elledge

& Harper et al., 1994; Peter & Herskowitz et al., 1994; Brugarolas et al., 1995; Sherr & Roberts et al., 1995)。

綜合以上，細胞週期受到三大類調控蛋白質所影響，其影響的是G<sub>1</sub>/S及G<sub>2</sub>/M期的進程(Sherr et al., 1996):

(1) 週期素(Cyclins):可分為兩大類:

(a) G<sub>1</sub>/S Cyclins – 顧名思義是控制細胞週期中的G<sub>1</sub>期到S期的進行(transition),

其中又分為:

(i) Cyclin A/ CDK2 –與S期有關。

(ii) Cyclin D/ CDK4, Cyclin D/ CDK6以及Cyclin E/ CDK2 – 與G<sub>1</sub>/S期的進行有關。

(b) G<sub>2</sub>/M Cyclins – 影響G<sub>2</sub>/M期的進行transition(mitosis): Cyclin B/ CDK1

(2) 週期素活化酶(Cyclin-dependent kinases; CDKs)

(3) 週期素活化酶抑制劑(CDK inhibitors; CDKIs)，依結構與相似性分成兩大類:

(a) CIP/KIP family: 包含p21<sup>CIP1/WAF1</sup>、p27<sup>KIP1</sup> 以及p57<sup>KIP2</sup> 等等。可以抑制CDK2 (Brugarolas et al., 1995; Sherr et al., 1995)。

(b) INK4 family: 包含p15<sup>INK4B</sup>、p16<sup>INK4A</sup>、p18<sup>INK4C</sup> 以及p19<sup>INK4D</sup> (Sherr et al., 1995)

它們可以直接抑制CDK4以及間接抑制CDK6，抑制CDK6的方式為將Cyclin D containing complexes上的CIP/KIP蛋白質取代掉，而此CIP/KIP的蛋白質可以跟CDK2結合以抑制CDK2的活性(Tyner and Gartel, 2003)。

丁酸能夠影響參與調控細胞週期以及細胞凋亡的基因，包含了p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (Archer et al., 1998)、p16<sup>INK4</sup>、p27<sup>KIP1</sup>、視網膜母細胞瘤蛋白(retinoblastoma protein)、Cyclin-D1、Bcl-2以及Bax (Mandal & Kumar et al., 1996; Kurita-Ochiai et al., 2006)。有研究指出，丁酸在低濃度(使用濃度為1.25 mM/ 2.5 mM/ 5 mM)時對於Jurkat human T lymphocytes (一種永生化的人類T細胞cell line)，依其濃度會產生其對細胞週期的不同的影響(Kurita-Ochiai et al., 2005)。

低濃度的丁酸會隨著濃度提高大幅提升S期以及G<sub>2</sub>/M期的細胞累積，而在高濃度的丁酸也是大幅提升G<sub>2</sub>/M期以及sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的細胞累計，但是卻減少G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>以及S phases的細胞累計，所以推論G<sub>2</sub>/M期的累計上升不但跟G<sub>2</sub>/M期arrest有關，也跟G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>以及S phases所產生的細胞死亡有關(Kurita-Ochiai et al., 2005)。

細胞凋亡相關的蛋白質，像是 Cyclin A、Cyclin E、Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2)、CDK4 以及 CDK6 等蛋白質在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期以及 S 期的減少;以及 Cyclin B、Cdc25c、p27<sup>KIP1</sup> 等蛋白質在 G<sub>2</sub>/M 期的減少，但丁酸可以使得 p21<sup>CIP1/WAF1</sup> 在 G<sub>2</sub>/M 期的蛋白質表現增加(Kurita-Ochiai et al., 2005)。

總的來說，高濃度的丁酸會增加G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期以及S期的細胞死亡並且增加G<sub>2</sub>/M期的arrest，亦即，高濃度的丁酸對於細胞生長的抑制以及細胞凋亡的產生具有重要的影響。也有研究指出，多數細胞在丁酸的作用下，細胞週期的G<sub>1</sub>期會被影響而停滯(Guilbaud et al. 1990; Takahashi & Parsons 1990; Saito et al. 1991)。

## **2-5 活性氧Reactive Oxygen Species (ROS)**

活性氧是細胞的代謝產物，當細胞面對外在微生物入侵時或是外在逆境時(來源像是汙染、吸菸、輻射、含較多酚化合物的食物等等)，可能會造成細胞中的活性氧的大量產生。活性氧的來源不只是單單來自外在的刺激，細胞內的作用也有可能產生活性氧，像是來自吞噬細胞(phagocytic cells)、過氧化酶體

(peroxisomes)的  $\beta$ -oxidation、粒線體呼吸鏈(Mitochondrial respiratory chain)、前列腺素的合成(Prostaglandin synthesis)等等(Boonstra et al., 2004)。

大量活性氧在細胞結構中的蛋白質、脂質、碳水化合物或是 DNA 方面所造成的氧化傷害可能會使得細胞受到損傷甚至死亡。活性氧的含量在許多疾病中可能會不斷上升，像是動脈粥樣硬化(atherosclerosis)、灌流損傷(ischemic reperfusion injury)、神經退化疾病(neurodegenerative diseases)、類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)、乾癬性關節炎(psoriatic arthritis)等等(Boonstra et al.,2004)。除了病理變化上扮演的角色，近來的研究指出活性氧還可以在細胞訊號傳遞以及細胞週期中扮演重要的角色。如同前面提到，細胞週期受到幾個調控點來決定是否進行，而調節這些調控點的蛋白質也會受到細胞中氧化物的狀況所影響(Burhans et al., 2009)。

### 2-5-1 活性氧與細胞週期

活性氧會造成許多不同的細胞反應，低濃度的活性氧被認為可以幫助細胞週期的進行，而低濃度的活性氧通常是來自細胞內正常產生的，而不是來外在的刺激(Martindale and Holbrook, 2002; Davies, 2000)，而高濃度的活性氧則是會抑制細胞週期中的  $G_1$  期、S 期以及  $G_2$  期的進行(Rancourt et al., 1999; Rancourt et al., 2001)。然而，除了活性氧的多寡，活性氧產生的位置以及本身的種類也可能造成不同的影響。

在細胞週期的不同時期，活性氧扮演的角色並不相同，在  $G_1$  期，活性氧會影響 CDKs 活性以及視網膜母細胞瘤蛋白(RB)的磷酸化，因此，活性氧能夠影響細胞由  $G_1$  期進入 S 期。 $G_1$  期的停滯被認為是細胞的保護機制，抵抗氧化傷害避免細胞死亡(Rancourt et al., 2002)。

當面對過度的氧化壓力(oxidative stress)時，核轉錄因子 Nrf2 以及轉錄因子

Foxo3a 能夠幫助產生一些抗氧化物像是 p27 (週期素活化酶抑制劑的一種)來停止細胞週期，以使細胞能夠存活。在 S 期時活性氧能夠藉由 p-RB (磷酸化視網膜母細胞瘤蛋白)的去磷酸化(PP2A-dependent dephosphorylation)來導致 S 期的停滯 (Burhans et al., 2009)。

此外，活性氧所造成的 DNA 損傷會活化一些細胞週期的 checkpoints 相關因子像是 p53 以及 p16 (INK4a)，進而使得粒線體官能不良(dysfunction)，而粒線體失能又會產生更多的活性氧，形成一個迴饋，造成更多 DNA 的損傷(Burhans et al., 2009)。

在許多關於癌化細胞中的研究指出，活性氧跟 G<sub>1</sub> 期中 CDK/CKI 的交互關係能夠導致癌化細胞老化以及導致 DNA 的損傷，被認為是腫瘤形成(tumorigenesis)的阻礙保護。因此，活性氧調節被認為是腫瘤治療的可能方向之一。

### 2-5-2 p21、活性氧與細胞週期之間的關係

研究指出有許多因子能夠影響細胞週期，在其中有一個常見且相當重要的因子: p21<sup>CIP1/WAF1</sup>。如同前述所說，p21 屬於週期素活化酶抑制劑(CDK I)，它能夠調節細胞週期。p21 具有一個具高度保留性的氨基酸序列(conserved region of sequence at the amino acid terminus)，是抑制 Cyclin/CDK 複合體的重要因子。另外，在一些研究中，p21 除了當作 CDK 的抑制劑，也可以穩定 Cyclin D/ CDK4 複合體，並使之活化(LaBaer et al., 1997)。

p21 的產生見於 DNA 的損傷或是產生於細胞分裂中的有絲分裂(Tyner et al., 2003)。p21 具有一個能夠和增殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen; PCNA)結合的羧端(carboxy terminal)，加上 p21 與 Cyclin-CDK 複合體的關係，p21 被認為能夠阻礙 DNA 的合成，雖然機制還不完全被了解(Tyner et al., 2003)。

p21 的表現能夠在轉錄時被調控，此調控跟 p53 息息相關，包含了 p53-dependent 以及 p53-independent 機制。p21 的表現上升在許多種類的細胞中能夠

導致細胞的老化(senescence)，而這個現象能夠被抗氧化劑所抑制(Macip et al., 2002)。如前所述，p21 對於細胞週期的影響跟 p53 息息相關。跟 p53 相關所產生的 p21 多半跟 DNA 的損傷有關，在 DNA 損傷後會引發 ATM(一種 PI3 kinase related kinase)的活化，活化的 ATM 會造成 p53 的活化，接著會再誘發 p21 的活化(Cinti et al., 2003)。

在利用 HCT116 大腸癌細胞(HCT116 colon carcinoma cells)的研究指出:在 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 的環境下，p53 的表現、p53 的磷酸化、p21 的 mRNA 以及 p21 蛋白質表現皆為上升的趨勢，而細胞週期則是產生遲滯；相對地在 p53-缺失或是 p21 缺失的細胞則沒有細胞週期停滯的現象；具有 p21 的細胞在細胞自 DNA 損傷修復後，能夠再度進行細胞分化，但在 p21 缺失的細胞則無法再度進行細胞分化(Helt et al., 2001)。以上結果顯示，p53 在 p21 對於細胞週期的影響當中扮演重要的角色(Helt et al., 2001)。在正常的時候，因為 p53 的含量並不高，但是在來自細胞內外的壓力刺激下，可以使得 p53 穩定的存在以及活化，像是 DNA 的損傷就可以使得 p53 活性增加，進而可以使得細胞週期暫時停滯進而幫助 DNA 的修復(Cinti et al., 2003)。

當細胞持續地接受低濃度的活性氧刺激，會藉由 MAPK pathway 來造成細胞週期的 G<sub>1</sub> 期的停滯；而當細胞接受過量的活性氧刺激時則是會造成 DNA 損傷，在此過量活性氧環境下，在細胞週期各個時期的細胞分化都會受到影響而停滯，直到 DNA 的損傷能被修復。其中 G<sub>2</sub>/M 期的遲滯跟過量活性氧所造成的 p53 表現上升、p21 表現上升、Chk1 的表現上升以及 Cdc25C 的表現下降有關，而其中 Cdc25C 又跟 Cdc2 的去磷酸化有關(Thorn et al., 2001; Chung et al., 2002; Zhang et al., 2001, 2003; Bijur et al., 1999)。

綜合各方面，活性氧有許多途徑可以影響細胞週期，而這些影響又跟活性氧的量、作用時間、作用細胞有關。當活性氧作用時間較久，不論是高濃度或是低濃度，在非分化中的細胞中，可能會造成細胞開始分化；而當低濃度活性氧在分

化中細胞做短時間或長時間作用時，亦可能幫助其分化；當活性氧的濃度較高時，則可能造成 DNA 的損傷、p53 活性上升(接著是 p21 的表現上升)、細胞分化的被阻礙、細胞週期各期停滯以進行 DNA 的修復，如果 DNA 順利修復則 p21 的量就可以恢復正常、細胞分化就能接著順利進行、暫時停止的細胞週期就能恢復進行；但若活性氧的量持續上升，接著就可能造成細胞凋亡(apoptosis)或是壞死(necrosis)。(圖 2-4)

### 第三章 研究假說和實驗目的



本篇研究的假說是假設丁酸不會影響 MG-63 細胞的細胞型態以及其細胞週期的進行，也不會造成活性氧的大量產生。本篇研究的目的是確認 丁酸 對於 MG-63 細胞的毒性、訊息傳遞與細胞週期的進行的過程中所扮演的角色。藉此了解牙周以及牙髓致病菌常見的毒素產物對於牙齒周圍骨頭的影響，有助於釐清牙周骨頭破壞以及牙根尖齒槽骨發炎和修復的生理病理過程。

## 第四章 材料和方法

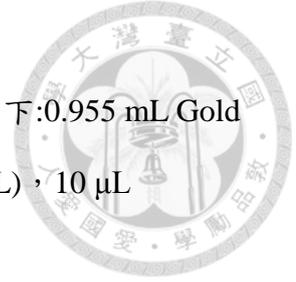


### 4-1 藥劑 Reagent

- (1) MG-63 購自 ATCC (American Type Culture Collection, USA)。
- (2) 丁酸購自 Sigma (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA)。
- (3) 培養液為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)，fetal bovine serum (FBS)，Penicillin/streptomycin 購自 Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)。
- (4) The SuperScript™ III First-Strand DNA synthesis system for RT-PCR 購自 Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)。
- (5) RNA isolation kit and NucleoSpin RNAII 購自 Macherey-Nagel (Macherey-Nagel Inc., Easton, PA, USA)。
- (6) 細胞溶解液(lysis buffer)的成份如下：10 mM Tris (pH=7.0)，140 mM NaCl，3 mM MgCl<sub>2</sub>，0.5% NP-40，2 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride)，1% aprotinin，5 mM DTT (dithiothreitol)。
- (7) RNaseA for flowcytometry 購自 Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA)。
- (8) Propidium iodide (PI，ICN) for flowcytometry 購自 Sigma (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA)。
- (9) Blocking buffer for western blotting 的成份如下：25 g 脫脂奶粉，0.1g NaN<sub>3</sub>，加入 1X TBST 至 500 mL，保存於 4°C 的環境中。
- (10) 細胞溶解液(Golden lysis buffer) for western blotting 的成份如下: 137 mM NaCl，20 mM Tris (pH= 7.9)，10 mM NaF，5 mM EDTA，1 mM EGTA，10%(v/v) Glycerol，1%(v/v) Triton X-100，1 mM Sodium orthovanadate，1 mM Sodium pyrophosphate，100 mM β-Glycerophosphate，加入 ddH<sub>2</sub>O 至 500 mL，保存於

4°C 的環境中。

- (11) Protein Extraction Buffer (1mL) for western blotting 的成份如下: 0.955 mL Gold lysis buffer, 20  $\mu$ L PMSF(50 mM), 10  $\mu$ L Aprotinin (1 mg/mL), 10  $\mu$ L Leupeptin(1 mg/mL), 5  $\mu$ L DTT (1 M)。



## **4-2 培養 MG-63 細胞**

- (1) 將MG-63細胞培養在10 cm dish中 (Corning Industries, Corning, NY)。
- (2) 於相位差顯微鏡 (IX-71, Olympus INC., USA)於100倍下觀察長到7-8分滿可分盤去除上清液，利用PBS wash(5 mL/dish)，接著吸除PBS，加入1倍的trypsin/EDTA (1 mL/dish)。
- (3) 放入於37°C，5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)，潮濕環境的培養箱中置放5分鐘。
- (4) 取出培養皿後，輕拍以拍下仍附著的細胞後，加入4 mL的medium(含10% DMEM)，以1:4的比例，混和均勻後分盤(4盤)。

## **4-3 藥物對 MG-63 細胞型態影響(cell morphology)**

- (1) 在 6-well culture plate 的每格中鋪上  $5 \times 10^5$  個 MG-63 細胞於含 10%FBS 的 DMEM 培養液。
- (2) 於 37°C，5%二氧化碳，潮濕環境的培養箱中培養 24 小時。
- (3) 更換新的 DMEM 培養液。
- (4) 分別加入不同濃度的丁酸 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM)。
- (5) 於加藥 2 小時/ 6 小時/ 24 小時/ 48 小時後使用相位差顯微鏡於 100 倍下觀察 MG-63 細胞外形變化並照相。



#### 4-4.藥物的細胞毒性分析- 細胞存活率分析 (MTT assay)

##### (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)

- (1) 在 6-well plate 的每格中鋪上  $5 \times 10^4$  個 MG-63 細胞於 10%FBS 的 DMEM 培養液。
- (2) 24 小時後換新培養液。
- (3) 加入不同濃度的丁酸 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 10 mM)。
- (4) 於培養箱(37°C, 5%二氧化碳潮濕環境)中培養 5 天。
- (5) 每 1mL 的培養液中加入 20 $\mu$ L MTT, 放入培養箱中作用 2 小時。
- (6) 吸除含 MTT 之培養液, 加入 600  $\mu$ L 二甲基亞砷(DMSO; Dimethyl sulfoxide;  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ), 使其混合溶解甲臍(formazan;  $\text{CN}_4\text{H}_5$ )。
- (7) 各取上述培養皿中液體 100  $\mu$ L 到 96-well plate 中。
- (8) 使用 ELISA reader (Multiskan Spectrum, USA) , 於 540 nm 波長下測量其 OD 值。

#### 4-5 反轉錄聚合酶連鎖反應

##### (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) (RT-PCR)

此方法用來評估細胞週期相關的調控基因的表現。使用 primer 如下:

Primer	Sense sequence	Anti-sense sequence	Base pair
$\beta$ -actin	5'-AGAGGCATCCTCACCCCT-3'	5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'	218 bp
(ref: Wang et al.,2000)			

Cdc25c	5' CCTGGTGAGCCTTCGAAGACC 3'	5'- GCAGATGAAGTACACATTGCATC -3'	456bp
(ref: Martignoni et al., 2003)			
Cyclin-B1	5'- AAGAGCTTTAAACTTTGGTCTGGG -3'	5'- CTTTGTAAGTCCTTGATTACCATG -3'	317bp
(ref: Krause et al., 2000)			

#### **4-5-1 分離抽取 MG-63 細胞的 RNA :**

- (1) 將培養接近長滿的 MG-63 細胞培養液抽吸掉，換成新鮮的培養液之後加入不同濃度丁酸 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM)，處理時間為 24 小時。
- (2) 吸除培養液後，以磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate-buffered saline; PBS)清洗後，加入 350  $\mu$ L RAI (lysis buffer, guanidine thiocyanate)和 3.5  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoethano 到培養盤中，用無菌刮勺將細胞刮下，將黏稠液吸至 NucleoSpin Filter unit (Macherey-Nagel INC., Germany)，放到紫色收集管(filtration column)中，以 14000 r.p.m. (Z 233 MK-2, HermLe INC., Germany)離心 1 分鐘，收取濾液。目的是將蛋白質，細胞壁等阻擋在膜上，收集濾液 cell lysate。
- (3) 在濾液中加入 350  $\mu$ L 70%酒精，並用 pipette 混合使得濾液均質化。
- (4) 組合 NucleoSpin RNA column 和 2mL 的離心管，將濾液吸入容器(column)上層中，以 10000 r.p.m.離心 30 秒，去除液體。
- (5) 組合 NucleoSpin column 放入一個新的無菌收集管中(Silica column)，加入 350  $\mu$ L 的 MDB (Membrane Desalting Buffer, guanidine thiocyanate<10%)，以 14000 r.p.m.離心 1 分鐘，去除液體。

- 
- (6) 準備 DNase reaction mixture：以 10  $\mu\text{L}$  DNase 加入 90  $\mu\text{L}$  DNase reaction buffer 混合。
  - (7) 將 95  $\mu\text{L}$  DNase reaction mixture 放入結合 NucleoSpin RNA column 之離心管中，靜置使其反應 15 分鐘。
  - (8) 加入 200  $\mu\text{L}$  RA2 (DNase stop solution 和 wash buffer，guanidine thiocyanate) 到 NucleoSpin column，以 10000 r.p.m. 離心 30 秒，去除液體。
  - (9) 加入 600  $\mu\text{L}$  RA3 (wash buffer) 到 NucleoSpin column，以 10000 r.p.m. 離心 30 秒後去除上清液。
  - (10) 倒掉濾液，再加入 250  $\mu\text{L}$  RA3(wash buffer) 到 NucleoSpin column 以 14000 r.p.m. 離心 2 分鐘，再將 column 放到 1.5 mL nuclease-free 的離心管中。
  - (11) 最後將 60  $\mu\text{L}$  RNase -free water 均勻加入 column 中，以 14000 r.p.m. 離心一分鐘，留取濾液，內含取得之 RNA，儲存在  $-20^{\circ}\text{C}$  環境備用。

#### **4-5-2 RNA 定量:**

- (1) 將裝有 DEPC-treated  $\text{H}_2\text{O}$  50 mL Tube 自  $-4^{\circ}\text{C}$  環境中取出。
- (2) 將欲定量之 RNA 自  $-4^{\circ}\text{C}$  環境中取出，置於冰浴中，待溫度降至室溫後離心。
- (3) 取 1000  $\mu\text{L}$  DEPC-treated  $\text{H}_2\text{O}$  和 10  $\mu\text{L}$  欲定量之 RNA 置入 1.5 mL eppendorf 中混合。
- (4) 將 RNA+DEPC-treated  $\text{H}_2\text{O}$  的溶液以分光光度計(Spectrophotometer, Hitachi, U-2001)，測出 RNA 在 280 nm 和 260 nm 的吸光值。
- (5) 將 280 nm 和 260 nm 的數值輸入電腦，跑出經定量後的 RNA 和 DEPC-treated  $\text{H}_2\text{O}$  數值( $\lambda$ )。
- (6) 所抽到的 RNA 濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )為： $\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{稀釋倍數}(\mu\text{g})$  (即 1 mL 的 DEPC-treated  $\text{H}_2\text{O}$ /加入 10  $\mu\text{L}$  RNA；若 260 nm 的 OD 值為 1，則表示 1 mL RNA 溶

液含有 40  $\mu\text{g}$  的 RNA。(將抽到的 RNA 測量其 260nm/280nm；若比值大於 1.8 表示所抽到的 RNA 純度夠)



#### **4-5-3 反轉錄(Reverse Transcription, RT) :**

使用的是 Invitrogen SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System (adapted from Life Technologies Corporation)。

- (1) 在 0.2 mL eppendorf 中配製 RNA/primer mixture，配法如下：5  $\mu\text{g}$  RNA 1-8 $\mu\text{L}$  (<8 $\mu\text{L}$ )，1  $\mu\text{L}$  dNTP 10mM，Oligo (dT)(0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )，加入 DEPC-treated water 至總體積 10  $\mu\text{L}$ 。
- (2) 放在 65 $^{\circ}\text{C}$  中處理 5 分鐘，然後置於冰上至少 1 分鐘。
- (3) 加入 10X RT buffer 2  $\mu\text{L}$ ，25mM  $\text{MgCl}_2$  4  $\mu\text{L}$ ，0.1M DTT 2  $\mu\text{L}$ ，RNase inhibitor 1  $\mu\text{L}$   
在 25  $^{\circ}\text{C}$  下處理 2 分鐘。
- (4) 接著加入 1  $\mu\text{L}$  Superscript III RT (Invitrogen, USA) 放在 25  $^{\circ}\text{C}$  中處理 2 分鐘、42 $^{\circ}\text{C}$  中處理 50 分鐘，然後在 70  $^{\circ}\text{C}$  處理 15 分鐘後中止反應，並置於冰上。
- (5) 加入 1  $\mu\text{L}$  E.coli RNase H (2U/ $\mu\text{L}$ ，Invitrogen)，放在 37 $^{\circ}\text{C}$  中處理 20 分鐘即得 cDNA。

#### **4-5-4 聚合酶連鎖反應 Polymerase Chain Reaction (PCR) :**

- (1) 於總體積 50  $\mu\text{L}$  的混合反應液中分別含有 2  $\mu\text{L}$  的 first-stand cDNA，5  $\mu\text{L}$  的 10 倍 PCR buffer，2 單位 Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA)，1  $\mu\text{L}$  各種欲測定之 primer，200  $\mu\text{mol}$  的 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)。混合均勻

後置入溫度循環器(Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler, using the GenePrint STR System LPL (8p22) of Promega Corporation, Madison, WI, USA.)。

(2) 聚合酶連鎖反應的溫度先以 94°C，2 分鐘來分開雙股(denaturation)，而後為 20-35 個溫度循環反應，其中每個循環依序為：

- i. 94 °C，30 秒分開雙股螺旋
- ii. 55 °C，1 分鐘的連結 (annealing)
- iii. 72 °C，30 秒的延伸(extension)

經不同溫度循環反應後，整個反應溶液最後保持在 72 °C 的延伸溫度下 10 分鐘。

(3) 反應完的產物在跑電泳前會保持在 4°C 下，然後取出 14  $\mu$ L 的聚合酶連鎖反應產物於 1.8% 濃度的 agarose 中進行電泳，以 100 伏特的電壓跑電泳，電泳完畢後以 0.5  $\mu$ g/mL 的溴乙烯 (ethidium bromide) 染色，置於紫外光(UV light) 下觀察，並以 Alpha Image (Alpha Innotech Corporation#210125)照相記錄。

## **4-6. 西方點墨法(Western Blot)**

### **4-6-1 細胞的蛋白萃取**

(1) 將 MG-63 細胞培養在 10 cm dish 接近 confluence stage。

(2) 經 24 小時後分別再加入不同濃度之丁酸 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM)，經過 24 小時後，去除 DMEM 培養液，再以 PBS 清洗兩次(於冰浴環境中完成，以減少對蛋白質的傷害)。

(3) 加入約 150  $\mu$ L lysis buffer，並用塑膠刮勺將細胞刮下後欲 pipette 吸至 1.5mL eppendorf tube 中，使用震盪器 (Vortex Genie2, Scientific Industries Inc., USA)

震盪之，然後置於冰浴 20 分鐘，每 10 分鐘震盪一次。

- (4) 以 12000 r.p.m.(Z 233 MK-2, HermLe INC., Germany) 離心 30 分鐘，並以 BSA 蛋白質濃度測定試劑組(Amresco Inc. , USA)來測量上層 cell lysate 中蛋白質濃度。
- (5) 以每管含 45  $\mu$ g 蛋白質的濃度分裝至 eppendorf tube 中，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  環境中。



#### **4-6-2 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE): 分析蛋白質**

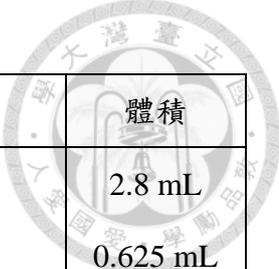
(1) 製膠的配方：

★10%分離膠 (resolving gel)

成分	體積
去離子水(ddH <sub>2</sub> O)	3.05 mL
1.5 M pH6.8 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽緩衝液 Tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tris-HCl	0.85 mL
40% 丙烯醯胺 (Acrylamide)	1.25 mL
10% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS	50 $\mu$ L
10% 過硫酸銨 (Ammonium persulfate; APS)	50 $\mu$ L
四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine; TEMED)	10 $\mu$ L

★12%分離膠 (resolving gel)

(適用於較小分子量蛋白質，需要較小分子量之 marker)



成分	體積
去離子水(ddH <sub>2</sub> O)	2.8 mL
1.5M pH6.8 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽緩衝液 Tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tris-HCl	0.625 mL
40% 丙烯醯胺 (Acrylamide)	1.5 mL
10% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS	50 μL
10% 過硫酸銨 (Ammonium persulfate; APS)	50 μL
四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine; TEMED)	10 μL

★成層膠(Stacking gel)

成分	體積
去離子水(ddH <sub>2</sub> O)	1.574 mL
3M pH6.8 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽緩衝液 Tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tris-HCl	0.25 mL
40% 丙烯醯胺 (Acrylamide)	0.25 mL
10% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS	25 μL
10% 過硫酸銨 (Ammonium persulfate; APS)	25 μL
四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine; TEMED)	10 μL

(2) 製膠方法:

將電泳片裝置在電泳槽(BioRad)上(電泳片上層為 stacking gel，下層為 resolving gel)，在電泳膠片製作完成後，並填滿電泳緩衝液。將分裝於 0.5 mL eppendorf tube 的蛋白質樣本加入 3  $\mu$ L 的 SDS/protein loading dye，使用乾浴器 (Fire Fox Dry Bath 6100, 汎泰)於 100°C 環境加熱 5 分鐘後，再以冰浴冷卻。將所處理之蛋白質樣本置入各個 well 中，以 80-120 mA 的電流量進行電泳分離，經過適當時間後停止電泳。

#### 4-6-3 蛋白質樣本的轉印

(1) 試劑與材料

- i. 電泳轉印槽(electrotransfer tank; SCIE-PLAS , UK)
- ii. 電源供應器(PowerPac Basic; Biorad, USA)
- iii. 轉漬紙(3M paper)
- iv. 電泳轉印緩衝液(electrotransfer buffer)
- v. 轉漬膜(Hybond-PVDF transfer membrane; Perkin Elmer, Canada)

(2) 方法：

剪一張 Hybond-PVDF transfer membrane，先以甲醇(methanol)浸濕活化 1 分鐘以去除其極性，再用水將 membrane 洗浸，連同兩張 3M paper 放入 transfer buffer(內含 20 mM Tris-HCl, 150mM Glycine, 20% Methanol, pH=8.3)中浸濕。操作時，堆疊的順序由下而上依次為 3M paper、Hybond-PVDF transfer membrane、SDS-PAGE gel、3M paper，並使用玻璃棒去除在其中的氣泡，再放入轉漬槽中，以 400 mA 的電流量轉漬 90 分鐘。



#### **4-6-4 免疫墨點法 ( immune-blot )**

- (1) 轉印完成後，PVDF transfer membrane 以 5% milk blocking buffer(含 5% 牛奶的 TBST)作用 30 分鐘。
- (2) 將前述之牛奶液置換為與細胞週期相關之初級抗體(primary antibody)；於室溫下作用兩小時(兼震盪之)。
- (3) 以 TBST (Tris-base 0.607g、 NaCl 2.92g、TWEEN 20 0.5mL 加二次水至 500 mL， pH 7.5)緩衝液清洗三次，每次五分鐘。
- (4) 加入與初級抗體對應之 1:5000 的二級抗體(HRP-labeled anti-goat、anti-mouse、anti-rabbit secondary antibody)，室溫下作用一小時(兼震盪之)。
- (5) 以 TBST 緩衝液清洗三次，每次五分鐘。最後加入 Luminol 感應試劑(enhanced chemiluminescence reagents；Santa cruz Biotechnology, USA)作用 40 秒。
- (6) 在呈色機(LAS-4000, Fujifilm, Japan)上以適當時間顯影。

#### **4-7 利用流式細胞儀(Flow Cytometer)分析細胞週期變化**

##### **4-7-1 細胞收取與固定**

MG-63 細胞 ( $5 \times 10^5$ ) 在 6-well culture plate 中以含 10% FBS 之 DMEM 培養液中培養 24 小時，待細胞貼附於盤底後，置換新的 DMEM 培養液。接著依實驗設計的不同，加入的作用藥物濃度與作用時間點如下：以不同濃度的丁酸 (NC, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM) 作用於 MG-63 細胞 2/6/24/48 小時。待作用時間終了，將培養液收取，並加入 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution(Sigma Biotechnology Inc., USA)，待靜置作用 5 分鐘後，收下細胞至 15mL 離心管中，

以 1200rpm 離心 5 分鐘(KUBOTA)，去除上層液後，以 PBS wash 兩次，再以 1200 r.p.m.離心 5 分鐘，震盪搖散細胞後再加入 2 mL 70%冰乙醇(ethanol)，接著置放在-20°C 環境中 24 小時來固定細胞。



#### **4-7-2 上機前準備**

取出固定好的 MG-63 細胞，去除上清液後以 PBS 清洗兩次後至放置康氏管 (5 mL Polystyrene Round-Buttom Tube; BD Falcon, USA)中，加入 250  $\mu$ L 的 staining buffer (碘化丙啶 Propidium Iodide, 0.04 mg/mL)，以及 2  $\mu$ L 的 RNaseA (1%)，並在暗室反應 15 分鐘。

#### **4-7-3 上機**

於流式細胞儀(FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, USA)上以CELLQuest 軟體(Becton Dickinson)做細胞週期分析，分析時以FL2 channel讀取PI的螢光 (argon laser at 488 nm wavelength excitation and a 610-nm filter)，收取的細胞數為  $1 \times 10^5$  個細胞，並以Modfit LT version2.0軟體(Verity Software House, Inc., USA) 計算細胞週期的比率。

### **4-8. 利用 DCF 染色來判定細胞內的活性氧族群**

主要是利用可以自由通過細胞膜的染劑 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma Biotechnology Inc., USA)，通過細胞膜後經過去酯化 (deesterified)後變成 Dihydrodichlorofluorescein (DCFH)，而 DCFH 與氧自由基 reactive oxygen species (ROS)作用後能夠成為具有螢光的 DCF，所以 DCF 染色被認為可以用來偵測細胞內氧自由基的改變(Karlsson et al., 2010)。步驟如下：



- (1) 以不同濃度的丁酸 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM)作用下的 MG-63 細胞培養於 37 °C, 5 % 二氧化碳(CO<sub>2</sub>), 潮濕環境的培養箱 23 小時 30 分鐘。
- (2) 待丁酸作用時間終了前 30 分鐘(23 小時 30 分鐘時自培養箱取出), 加入 10 μM 的 DCF-DA, 反應 30 分鐘, 結束後收集上清液。
- (3) 使用 PBS 清洗, 再加入 1 mL 的 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution, 待細胞完全脫落後加入 2 mL 的 DMEM 培養液, 吸取至 15 mL 離心管以 1200 r.p.m. 離心 5 分鐘, 清除上清液, 再以 PBS 清洗。
- (4) 再次吸至 15 mL 離心管以 1200 r.p.m.離心 5 分鐘後吸去上清液, 最後加入 500 μL PBS 使細胞懸浮。
- (5) 立即在流式細胞儀上以 CELLQuest 軟體作 DCF 螢光染色分析。

## **4-9 電子顯微鏡(Scanning electron microscope, SEM) 觀察細胞型態**

### **4-9-1 緩衝液 (buffer) 配製**

所使用緩衝液種類為 0.2 M cacodylate buffer, 使用 4.28 g 的二甲次酸鈉 (Sodium Cacodylate, Na(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O)溶於 100 mL 水中, 並添加 1 N 的 HCl 使 pH 值為 7.2。

### **4-9-2 固定液 (fixative) 配製**

所使用的固定液種類為戊二醛(glutaraldehyde), 成分為: 2.5% glutaraldehyde/ 0.1 M buffer + 單寧酸(tannic acid), 配製方式為: 0.5 g 的 tannic acid 溶於 20 mL

distilled water 中，再加入 5 mL 的 25 % 的 glutaraldehyde 以及 25 mL 的 0.2 M 的 cacodylate buffer。



### 4-9-3 細胞收取與固定

同流式細胞儀使用之細胞以及收取方式。

### 4-9-4 電子顯微鏡樣本配製以及樣本觀察

流程如下：

- (1) 將收取好的細胞放入 2.5% glutaraldehyde/ 0.1 M buffer + Tannic acid (於 0°C – 4°C 環境) 中 30 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m. 離心 5-10 分鐘，去除上清液。
- (2) 加入 0.1 M buffer/ 5 % 蔗糖(sucrose)(0°C- 4°C)，作用 15 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m. 離心 5-10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (3) 重複步驟 2.

.....以上為前固定.....

- (4) 加入 1% 的四氧化鐵(Osmium Tetraoxide)/0.1 M buffer (4°C-室溫)，作用 30 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m. 離心 5-10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (5) 加入 0.1 M buffer/ 5 % sucrose (室溫)，作用 15 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m. 離心 5 -10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (6) 加入 0.1 M buffer/ 5 % sucrose (室溫)，作用 15 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m.

離心 5-10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。



.....以上為後固定.....

- (7) 加入 50 % 乙醇(ethanol)，作用 10 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m.離心 5 -10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (8) 加入 70 % ethanol，作用 10 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m.離心 5-10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (9) 加入 80 % ethanol，作用 10 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m.離心 5-10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (10) 加入 90 % ethanol，作用 10 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m.離心 5-10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (11) 加入 95 % ethanol，作用 10 分鐘。以 3000 r.p.m.- 5000 r.p.m.離心 5 -10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。
- (12) 加入 100 % ethanol，作用 10 分鐘。以 3000 r.p.m. – 5000 r.p.m.離心 5 – 10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。(此步驟重複兩次)。
- (13) 加入 100 % 丙酮(acetone)，作用 10 分鐘。以 3000 r.p.m.-5000 r.p.m.離心 5-10 分鐘，去除上清液。以 PBS 沖洗，離心後去除上清液。(此步驟重複兩次)。
- (14) 進行臨界點乾燥(critical point drying ; CPD)。
- (15) 黃金鍍膜 (Au coating)。
- (16) 以電子顯微鏡觀察。

#### **4-10 統計分析**

需統計分析的實驗項目至少重複四次，實驗數據以 One-way ANOVA and post

hoc Tukey test，SPSS 8.0 統計軟體做分析。P 值小於 0.05 視為組別間的存在有顯著差異。



## 第五章 結果



### 5-1 細胞型態觀察 Cell appearance

關於細胞形態方面，將  $5 \times 10^5$  的 MG-63 細胞分別加入不同濃度的丁酸 (1-16 mM) 培養不同的加藥時間(2/ 6/ 24/ 48 小時)後，在相位差顯微鏡 100 倍的觀察下 MG-63 細胞外形都沒有明顯的變化。(圖 5-1-1、圖 5-1-2、圖 5-1-3、圖 5-1-4)，仍然維持卵圓狀到梭狀的外型。另外在電子顯微鏡在不同倍率的觀察下(1000 倍以及 5000 倍)，MG-63 細胞外形亦沒有明顯的變化。(圖 5-1-5、圖 5-1-6)。

### 5-2 細胞存活率分析 (MTT assay)

關於細胞存活率分析方面，使用  $5 \times 10^4$  的 MG-63 細胞(6 well)經過 MTT assay 的分析後可以發現在高濃度的丁酸的刺激下(尤其是 16 mM)，細胞存活率顯著下降(圖 5-2)。

### 5-3 流式細胞儀分析(Flowcytometry Analysis) – PI 染色

利用流式細胞儀分析-PI 染色可以得到關於  $G_2$  期停滯現象變化的資訊，同樣使用的設定是  $5 \times 10^5$  的 MG-63 細胞分別加入不同濃度的丁酸 (1-16 mM) 培養不同的加藥時間(2/ 6/ 24/ 48 小時)後，以 PI 染色處理後進行流式細胞儀分析。

在 sub  $G_0/G_1$  population 的數值方面(M1 值)，各組沒有明顯變化(圖 5-3-1、圖 5-3-2、圖 5-3-3、圖 5-3-4、圖 5-3-5、圖 5-3-6、圖 5-3-7、圖 5-3-8)。

在 G<sub>2</sub> 期停滯方面，在 2 小時組顯示濃度 2mM、4mM、8mM 以及 16mM 的 G<sub>2</sub> 期細胞停滯現象跟 0 mM 組都有顯著差異(圖 5-3-9、圖 5-3-10)，在 6/24/48 小時等組方面則是濃度 4mM、8mM 以及 16mM 的 G<sub>2</sub> 期細胞停滯現象跟 0 mM 組都有顯著差異(圖 5-3-11、圖 5-3-12、圖 5-3-13、圖 5-3-14、圖 5-3-15、圖 5-3-16)。顯示較高濃度的丁酸對於 G<sub>2</sub> 期細胞停滯的程度會產生影響。

#### **5-4 反轉錄聚合酶鏈鎖反應 ( Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)**

再利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應的實驗方面，跟 G<sub>2</sub> 期到 mitosis 期的轉換中相關的因子: Cdc25C (圖 5-4-1)以及 Cyclin B (圖 5-4-2)都可以看到在設定濃度內，隨著丁酸的濃度上升而使得 RNA 的表現下降。

#### **5-5 西方墨點法 (Western blotting) 測定蛋白質表現**

在蛋白質表現方面，p21、pcdc25C 以及 pcdc2 的表現在 8mM 以及 16mM 的丁酸的刺激下表現量上升，而在 cdc25C、cdc2 以及 cyclin B1 的表現則是隨著丁酸濃度上升而有表現下降的趨勢。(圖 5-5)

#### **5-6 流式細胞儀-DCF 染色來判定細胞內的活性氧含量變化**

利用流式細胞儀分析-DCF 染色可以得到關於活性氧含量變化的資訊，利用 5x10<sup>5</sup> 的 MG-63 細胞分別加入不同濃度的丁酸 (1-16 mM)培養 24 小時後，以 DCF 染色處理後進行流式細胞儀分析。經過統計的結果可以得知在丁酸的濃度較高(8

mM 以及 16 mM)兩組的活性氧含量顯著地較 0 mM 組上升。(圖 5-6-1、圖 5-6-2)。



## 第六章 討論



MG-63 類骨瘤細胞具有許多造骨細胞的特性，同時容易培養，常被用來模擬造骨細胞(osteoblasts)對於藥物毒物的反應。丁酸在許多實驗中顯示可以影響細胞週期，高濃度的丁酸會使得的細胞週期尤其  $G_2/M$  期的停滯，不過丁酸對於在造骨細胞所造成影響還未有太多研究，因此我們就由文獻回顧了解相關的研究來設計實驗，以釐清丁酸對於 MG-63 類骨瘤細胞的細胞週期的影響。

### 6-1 Cdc2 磷酸化與否在細胞週期中所扮演的角色

在細胞週期由  $G_2$  期進入 mitosis 期前，Cdc2 扮演了調控的角色，Cdc2 上的磷酸化(phosphorylation)位置酪氨酸-15 (tyrosine-15; Tyr-15; 在部分高等生物中還包含了 tyrosine-14) 的磷酸化與否控制了細胞是否進入 mitosis 期，Cdc2 的磷酸化造成其與 Cyclin B 結合成為一複合體(Cdc2/ Cyclin B complex)，這個機制在細胞保護上扮演重要角色，可以避免 DNA 損壞的或是複製錯誤的細胞進入 mitosis 期。Cdc2 的 tyrosine-15 的磷酸化可藉由 tyrosine kinases Wee1 以及 Mik1 的來幫助進行; 至於 Cdc2 的 tyrosine-14 的磷酸化則可以藉由 Myt1 的催化來幫助進行。總而言之，如果 Cdc2 的去磷酸化(dephosphorylation)被阻礙，細胞進入 mitosis 期時就會被阻礙，細胞週期會延滯在  $G_2$  期，唯有 Cdc2 的去磷酸化順利進行，細胞週期才會繼續進行(Nicholas et al., 1998)。

在一利用粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)細胞研究 Cdc2 的 tyrosine-15 的磷酸化在細胞週期在進入複製前的 checkpoint 扮演的角色的實驗中，利用西方墨點法可得知: 在羥基脲(hydrourea; HU)所引發的細胞週期停滯中，Cdc2 會維持其 tyrosine - 15 呈現磷酸化的形式(Rhind et al., 1998)。在一利用實驗用增殖表皮癌細胞(HeLa cells)研究其細胞週期停滯(利用羥基脲引發)的實驗中，利用西

方墨點法，亦得到tyrosine-15的磷酸化在細胞週期的 G<sub>2</sub>/M期的停滯中扮演了重要角色的結論。在利用裂殖酵母(fission yeast)的實驗中得到:損傷的DNA會使得tyrosine-15 避免進行去磷酸化，並使得接下來Cdc2無法活化(Enoch and Nurse 1991, Rhind et al. 1997, Rhind and Russell 1998)。

在本實驗中，Cdc2 的蛋白質的表現隨著丁酸的濃度上升而略有下降，而在磷酸化Cdc2(pCdc2)的表現中，隨著丁酸的濃度上升，在較高濃度的組別(8 mM 以及16 mM)中的表現明顯上升，由以上結果可推論，在丁酸的濃度上升的情況下，Cdc2的表現下降，磷酸化的Cdc2的表現上升，此結果可能會造成細胞週期停滯在G<sub>2</sub>期。

## 6-2 Cdc25 Family在細胞週期所扮演的角色

真核生物細胞(eukaryotic cell)的細胞週期受到主要受到週期素(Cyclins)以及週期素活化酶(Cyclin-dependent kinases; CDKs)的調控(Jeffrey et al., 1995)。Cdc25 磷酸酶(phosphatase)家族可以利用其本身的磷酸化(造成週期素活化酶的去磷酸化)來造成週期素活化酶的活化。

高等生物的真核細胞中，Cdc25家族可以分為:

- (1) Cdc25A: 主要負責G<sub>1</sub>期到S期的轉換。
- (2) Cdc25B: 幫助細胞週期由G<sub>2</sub>期進入mitosis期，活化的時機在Cdc25C前 (Gabrielli et al. 1996, Lammer et al. 1998)。
- (3) Cdc25C: 幫助細胞週期由G<sub>2</sub>期進入mitosis期(Lammer et al., 1998)。

在許多癌細胞中，Cdc25A以及Cdc25B會大量產生;但在Cdc25C則沒有這樣的現象(Gasparotto et al. 1997)。如同前面所述，磷酸化的Cdc2與Cyclin-B1可結合成為一複合體，導致細胞週期停滯在G<sub>2</sub>期，而Cdc25C對於Cdc2的調控扮演重要的角色，在*in vitro*以及*in vivo*的實驗中都顯示:當DNA損傷發生時，Chk1以及Cds1

這兩種protein kinases會使得 Cdc25磷酸化(Cdc25C的磷酸酶活性亦被抑制，導致Cdc2的去磷酸化以及Cdc2/ Cyclin-B1複合體的活性被抑制)來幫助細胞停滯在G<sub>2</sub>期(Funari et al. 1997)。

在本實驗中，Cdc25C的蛋白質表現隨著丁酸的濃度上升而有下降，磷酸化的Cdc25C的表現則是隨丁酸濃度的上升而上升，而Cdc25C的RNA表現是隨著丁酸的濃度上升而有下降。可知如果MG-63細胞若處於丁酸濃度較高的環境中，Cdc25C磷酸化表現會上升，而如同前述所說，磷酸化的Cdc25C若和14-3-3蛋白質結合可能會造成G<sub>2</sub>期的遲滯。

### **6-3 Cyclin-B1 在細胞週期所扮演的角色**

在細胞週期中，Cyclin-B1/ Cdc2複合體跟mitosis早期的活動有關像是粒線體的濃縮(chromosome condensation)以及細胞核核膜的破壞(nuclear envelope breakdown)等等。Cyclin-B1在細胞中是大量存在但是缺乏活性的，它跟Cdc2形成的複合體在經過Cdc25C磷酸酶的幫助下才會去磷酸化並變成活化態(Berry et al., 1996)。

在本實驗中，Cyclin-B1的蛋白質表現隨著丁酸的濃度上升而有下降，而Cyclin-B1的RNA表現是隨著丁酸的濃度上升而有下降。可知如果MG-63細胞若處於丁酸濃度較高的環境中，Cyclin-B1表現會被抑制，同時可能會造成G<sub>2</sub>期的遲滯。

### **6-4 細胞型態以及細胞存活率**

在不同濃度的丁酸 (1-16 mM)的刺激下，造成的MG-63細胞型態的改變，無論在經過 2、6、24、48小時的丁酸刺激後，光學顯微鏡下所觀察到的細胞型態

並沒有顯著的改變，MG-63 細胞仍然維持著其卵圓形到梭形的外觀，另外在電子顯微鏡下觀察經過24小時的丁酸刺激後的MG-63細胞，細胞型態亦沒有顯著的改變，因此推論：丁酸在此濃度範圍內對於MG-63細胞的毒性並不明顯。

MTT assay是用來測定細胞存活率或增殖作用的方法，原理是利用活細胞內粒線體中的琥珀酸去氫酶 (SDH)之作用將黃色的MTT之tetrazolium轉為藍色產物甲臍(formazan)，加入DMSO將其溶解後可利用測定其OD值得知細胞還原MTT的能力(formazan 形成量)，即代表了粒線體的活性，亦即活細胞數目(死細胞不能將MTT還原)。

本實驗中在使用 $5 \times 10^4$ 的MG-63細胞於不同濃度的丁酸 (1-16 mM)作用5天後來進行MTT assay，在4mM、8 mM以及16 mM兩組顯著的表現細胞存活率下降，推測在此環境設定下，較高濃度的丁酸對於MG-63細胞的細胞存活率會產生影響，導致細胞分化的能力下降。(選擇此細胞數量以及藥物作用時間是考慮到MG-63細胞為癌細胞，增殖作用快速，若採較大數量的細胞可能致使藥物的作用被大量增殖的細胞所隱藏)。

## 6-5 活性氧含量以及p21的表現

低濃度的活性氧可以刺激細胞生長及分化，但在此狀況下活性氧多只來自內生性產生的活性氧而非來自外在刺激產生的(Martindale and Holbrook et al., 2002)。過多的活性氧則會造成DNA的損傷(Blagosklonny et al., 2008)，也可能造成細胞週期的停滯(Gartel et al., 2005)。在利用人類纖維母細胞的實驗中，過氧化氫( $H_2O_2$ )會造成細胞週期停滯在 $G_1$ 期(Chen et al., 1998; 2000)。而在利用單軸應變對 3T3 纖維母細胞 (NIH 3T3 fibroblast) 的實驗中，過氧化氫則會造成  $G_1$  期、 $G_2$  期以及 S 期的停滯(Barnouin et al., 2002)。然而在中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell ; CHO)中，過氧化氫則會造成進入mitosis的細胞減少(Martinez



et al., 2002)。在人類胰臟癌細胞(human pancreatic carcinoma cell)，一氧化氮(NO)會造成p21的表現上升進而使得G<sub>1</sub>期停滯，甚至可能會造成細胞死亡(Gansauge et al., 1998)。而在人類肝癌細胞(human hepatocellular carcinoma cells)(Esumi et al., 1997)以及血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells)(Ishida et al., 1997)中，一氧化氮同樣會造成p21的表現上升進而使得G<sub>1</sub>期停滯。

本實驗利用不同濃度的丁酸 (1-16 mM)作用於MG-63細胞24小時DCF染色，所得到的活性氧分析結果得知在較高的藥物濃度(8 mM以及16 mM)作用下，活性氧的產生有顯著的提升，加上在p21的蛋白質表現上同樣的8 mM以及 16 mM的表現明顯上升，我們推測在8 mM以及16 mM的丁酸的刺激下，會有過多活性氧以及p21的產生，也代表著細胞週期的進行可能因此受到影響。

## 第七章 結論



1. 丁酸會造成 MG-63 類骨瘤細胞的細胞週期的停滯，尤其是在進入 mitosis 期前，隨 butyric acid 濃度的上升會更明顯。
2. 在影響 MG-63 類骨瘤細胞由 G<sub>2</sub> 期進入 mitosis 期方面，相關的調控因子包含 Cdc2、Cdc25C 以及 Cyclin-B1 方面，隨著丁酸濃度上升，抑制了這些因子的表現，同時也代表著丁酸濃度上升抑制了 G<sub>2</sub> 期進入 mitosis 期。
3. 在利用流式細胞儀統計各細胞週期的細胞含量方面，不同的藥物刺激時間下，隨著藥物濃度的上升，細胞在 G<sub>2</sub> 期的含量有上升的趨勢，直接地代表了細胞停留在 G<sub>2</sub> 期的現象變得明顯。
4. 在活性氧分析方面，在高濃度的丁酸的刺激下，活性氧的含量顯著的增加，而過量的活性氧也與細胞週期的停滯有關。
5. 在細胞形態方面，經由顯微鏡觀察，在設定的藥物刺激濃度以及時間之內，細胞的型態並沒有顯著的改變，推論可能是使用的藥物濃度毒性並不會造成細胞的變化或是因為所使用之細胞具有癌細胞的特性，生長能力較佳。

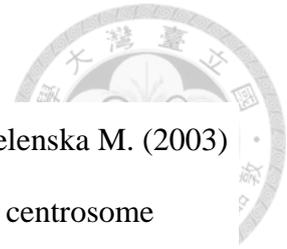
總結，不論是在直接評估細胞週期的含量或是相對應的蛋白質以及 mRNA 的表現，丁酸的濃度上升都會造成 G<sub>2</sub> 期進入 mitosis 的停滯，而在與細胞週期有重要關係的活性氧分析方面也顯示丁酸的濃度上升會造成細胞週期的停滯可以推論產生過多的丁酸會造成骨細胞的細胞週期被影響進而影響牙根尖周圍骨頭的癒合。在臨床意義上，了解了丁酸對於骨細胞的細胞週期可能的影響可以幫助我們了解在細菌含量高的牙周或是牙髓病變中，骨細胞的增生與活性可能因為丁酸而停滯，導致在細菌造成骨細胞的破壞時，骨細胞的生長無法彌補被破壞的部分。

本實驗結果主要為細胞進入 mitosis 期前的影響，但在其他時期的控制點還

有許多可以探討的因子。此外，了解丁酸對於造骨細胞可能的影響之後，如果未來能夠從抑制丁酸的作用著手，或許可以應用在臨床上治療牙周骨頭破壞或是牙根尖病變的手段之一。



## References



- Al Romaih K., Bayani J., Vorobyova J., Karaskova J., Park P.C., Zielenska M. (2003) Chromosomal instability in osteosarcoma and its association with centrosome abnormalities. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 144: 91-99
- Archer S.Y., Meng S., Shei A., and Hodin R.A. (1998). p21<sup>WAF1</sup> is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:6761–6796
- Bartek J. and Lukas J. (2001). Pathways governing G<sub>1</sub>/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters* 490: 117-122
- Boisteau O. (1996). Induction of apoptosis in vivo and in vitro on colonic tumor cells of the rat after sodium butyrate treatment. *Bull Cancer* 83: 197-204
- Boonstra J. and Post J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells, *Gene* 337: 1–13
- Breuer R.I., Soergel K.H., Lashne B.A., Christ M.L., Hanauer S.B., Vanagunas A., Harig J.M., Keshavarzian A., and Robinson M. (1997). Short-chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled trial. *Gut* 40, 485–491
- Brugarolas J., Chandrasekaran C., Gordon J.I., Beach D., Jacks T., and Hannon G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377: 552–557
- Burhans W.C. and Heintz N.H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate, *Free radical biology & medicine*. 47:1282-1293
- Canny G.O. and McCormick B.A. (2008). Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infection and Immunity* 76: 3360–3373

- 
- Chabanas A., Khoury E., Goeltzl P., Froussard P., Gjerset R., Dod B., Eisen H., and Lawrence J.J. (1985). Effects of butyric on Cell Cycle Regulation and Induction of Histone H1” in mouse cells and tissue culture: Inducibility of H1<sup>o</sup> in the late S-G<sub>2</sub> phase of the cell cycle. *Journal Molecular Biology* 183: 141-151
- Chang M.C., Tsai Y.L., Chen Y.W., Chan C.P., Huang C.F., Lan W.C., Lin C.C., Lan W.H., and Jeng J.H. (2013). Butyrate induces reactive oxygen species production and affects cell cycle progression in human gingival fibroblasts. *Journal Periodontal Research* 48: 66–73
- Chen H., Huang Q., Dong J., Zhai D.Z., Wang A.D., and Lan Q. (2008). Overexpression of CDC2/Cyclin-B1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer* 8:29-39
- Chow P.H., Siu W.Y., Ho T.B., Ma H.T., Ho C.C., and Poon Y.C. (2003). Differential contribution of inhibitory phosphorylation of Cdc2 and CDK2 for unperturbed cell cycle 0 mM and DNA integrity checkpoints, *Journal of Biological Chemistry* 278 42: 40815–40828
- Conway R.M. (1995). Induction of apoptosis by sodium butyrate in the human Y79 retinoblastoma cell line. *Oncology research and treatment* 7: 289-297
- Coradini D., Pellizzaro C., Marimpietri D., Abolafio G., and Daidone M.G. (2000). Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *Cell proliferation* 33: 139-146
- Declercq H., Van den Vreken N., De Maeyer E., Verbeeck R., Schacht E., De Ridder L. (2004). Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/ biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials* 25: 757-768

- 
- Elledge S.J. and Harper J.W. (1994). Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Current opinion in cell biology* 6: 847–852.
- Guilbaud N.F. (1990). Effect of differentiation-inducing agents on maturation of human MCF7 breast cancer cell. *Journal of Cellular Physiology* 145: 162-172
- Hamer H.M., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F.J., and Brummer R.J. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27: 104–119
- Helt C.E., Rancourt R.C., Staversky R.J., and O'Reilly M.A. (2001). p53-Dependent Induction of p21<sup>Cip1/WAF1/Sdi1</sup> Protects against Oxygen-Induced Toxicity. *Toxicological Sciences* 63: 214–222
- Ho Y.C. and Chang Y.C. (2007). Effects of a bacterial lipid byproduct on human pulp fibroblasts *in vitro*. *Journal of Endodontics* 33: 437-441
- Hoffmann I. (2000). The role of Cdc25 phosphatases in cell cycle checkpoints. *Protoplasma* 211:8-11
- Immerseel F.V., Ducatelle R., De Vos M., Boon N., Wiele T.V., Verbeke K., Rutgeerts P., Sas B., Louis P., and Flint H.J. (2010). butyric-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *Journal of Medical Microbiology* 59: 141-143
- Jeng J.H., Chan C.P., Ho Y.S. (1999). Effects of butyrate and propionate on the adhesion, growth, cell cycle kinetics and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Journal Periodontology* 70: 1435-1442
- Jeng J.H., Kuo M.Y.P., Lee P.H. (2006). Toxic and metabolic effects of sodium butyrate on SAS tongue cancer cells: role of cell cycle deregulation and redox changes. *Toxicology* 223: 235-247
- Karlsson M., Kurz T., Brunk U.T., Nilsson I S., Frennesson C.I. (2010). What does the commonly used DCF-test for oxidative stress really show? *Biochemical Journal*

- 428: 183-190,
- Kim T.I., Han J.E., Jung H.M., Oh J.H, Woo K.M. (2013). Analysis of histone deacetylase inhibitor-induced responses in human periodontal ligament fibroblasts. *Biotechnology Letters* 35:129–133
- Kurita-Ochiai T., Hashizume T., Yonezawa K., Kuniyasu (2006). Characterization of the effects of butyric on cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47: 67–74
- Lew D.J. and Kornbluth S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle 0 mM. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 795-804
- Mandal M. and Kumar R. (1996). Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Growth & Differentiation* 7: 311–318.
- Morozumi A. (2011). High concentration of sodium butyrate suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation in ROS17/2.8 cells. *Journal of Oral Science* 53: 509-516
- Niederman R., Zhang J., and Kashket S. (1997). Short chain carboxylic-acid-stimulated , PMN mediated gingival inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 8: 269-290
- O'Connor P.M. (1997). Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Journal of Cancer Survivorship* 29: 151-182
- Pautke C., Schieker M., Tischer T., Kolk A., Neth P., Mutschler W., and Milz S. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research* 4: 3743-3748

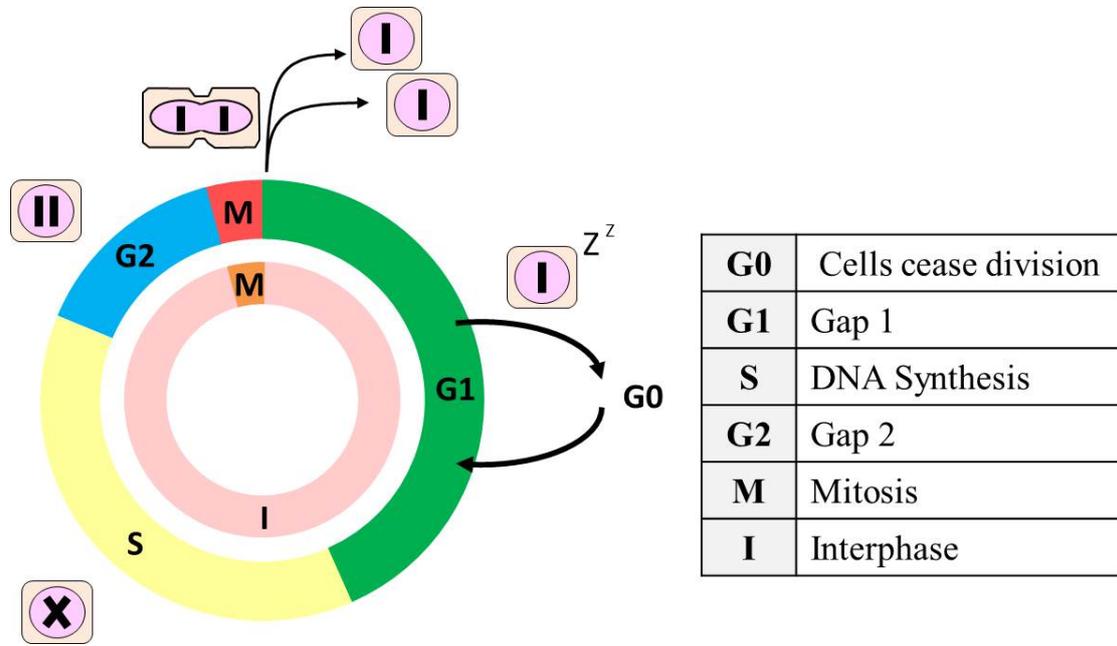
- Peter M. and Herskowitz I (1994). Joining the complex: cyclindependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79: 181–184
- Pizarro J.G., Folch J., Torre A.V., Verdaguer E., Junyent F., Jordan J., Pallas M., and Camins A. (2009). Oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle regulation in B65 dopaminergic cell line. *Free Radical Research* 4310: 985-994
- Pöllänen M.T., Overman D.O., Salonen J.I. (1997). Bacterial metabolites sodium butyrate and propionate inhibit epithelial cell growth in vitro. *Journal Periodontal Research*. 32:326-34
- Qiqiang L., Huanxin M., Xuejun G. (2012). Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy. *Journal Periodontal Research*. 47: 740-749
- Rhind N. and Russell P. (1998). Tyrosine phosphorylation of Cdc2 Is required for the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology* 18: 3782–3787
- Russell P. and Nurse P. (1986). Cdc25 functions as an inducer in the mitotic 0 mM of fission yeast. *Cell* 45: 145–153
- Siqueira Jr J.F. and RÔÇAS I.N. (2007) Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Brazilian Dental Journal* 18: 267-280
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., and Paules R.S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 1387–1404
- Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A., Swidsinski S., Loening-Baucke V., Ortner M., Weber J., Hoffmann U., Schreiber S., Dietel M., and Lochs H. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44–54
- Takahashi H., Parsons P.G. (1990). *In vitro* phenotype alteration of human melanoma cells induced by differentiating agents: heterogeneous effects on cellular growth

- and morphology, enzymatic activity and antigenic expression. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 3: 223-232
- Saito S. (1991). Flow cytometric and biochemical analysis of dose-dependent effects of sodium butyrate on human endometrial adenocarcinoma cells. *Cytometry* 12: 757-764
- Sherr C.J. and Roberts J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G<sub>1</sub> cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* 9: 1149–1163
- Singh B., Halestrap A.P., Paraskeva C. (1997). Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* 18: 1265–1270
- Slots J (1977). The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *European Journal of Oral Sciences*. 85: 114–121
- Tonetti M., Eftimiadi C., Damiani G., Buffa P., and Botta G.A. (1987). Short chain fatty acids present in periodontal pockets may play a role in human periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research* 22: 190–191
- Tsuda H., Ochiai K., Suzuki N., Otsuka K. (2010). Butyrate, a bacterial metabolite, and autophagic cell death in gingival epithelial cells. *Journal of Periodontal Research* 45: 626-634
- Uematsu H., Sato N., Hossain M.Z., Ikeda T., and Hoshino E. (2003). Degradation of arginine and other amino acids by butyrate-producing asaccharolytic anaerobic Gram positive rods in periodontal pockets. *Archives of Oral Biology* 48: 423-429

# 圖表

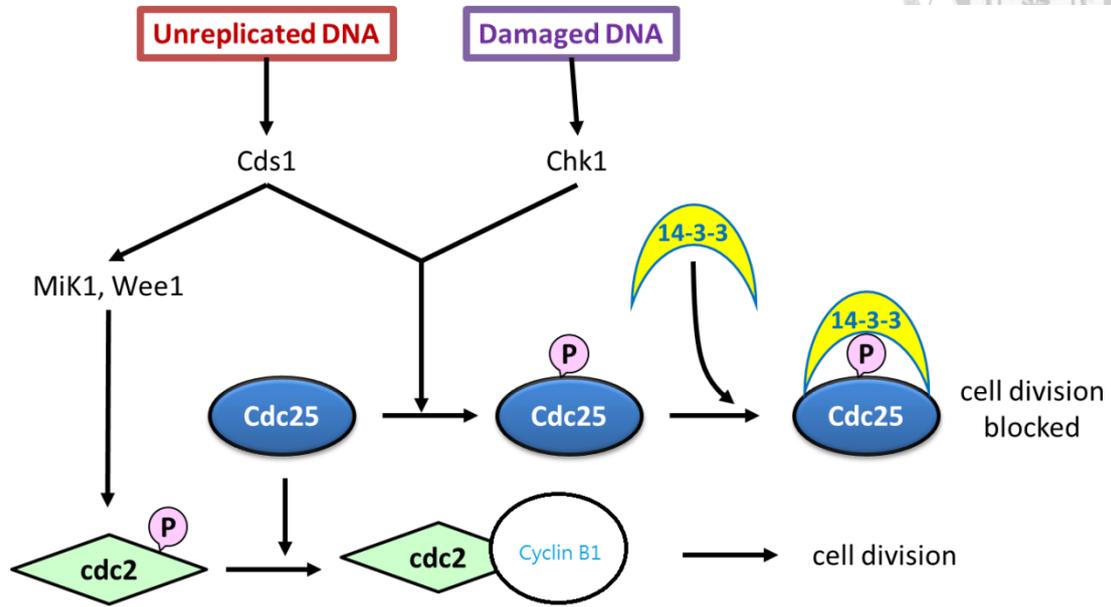


圖 2-1 細胞週期概圖



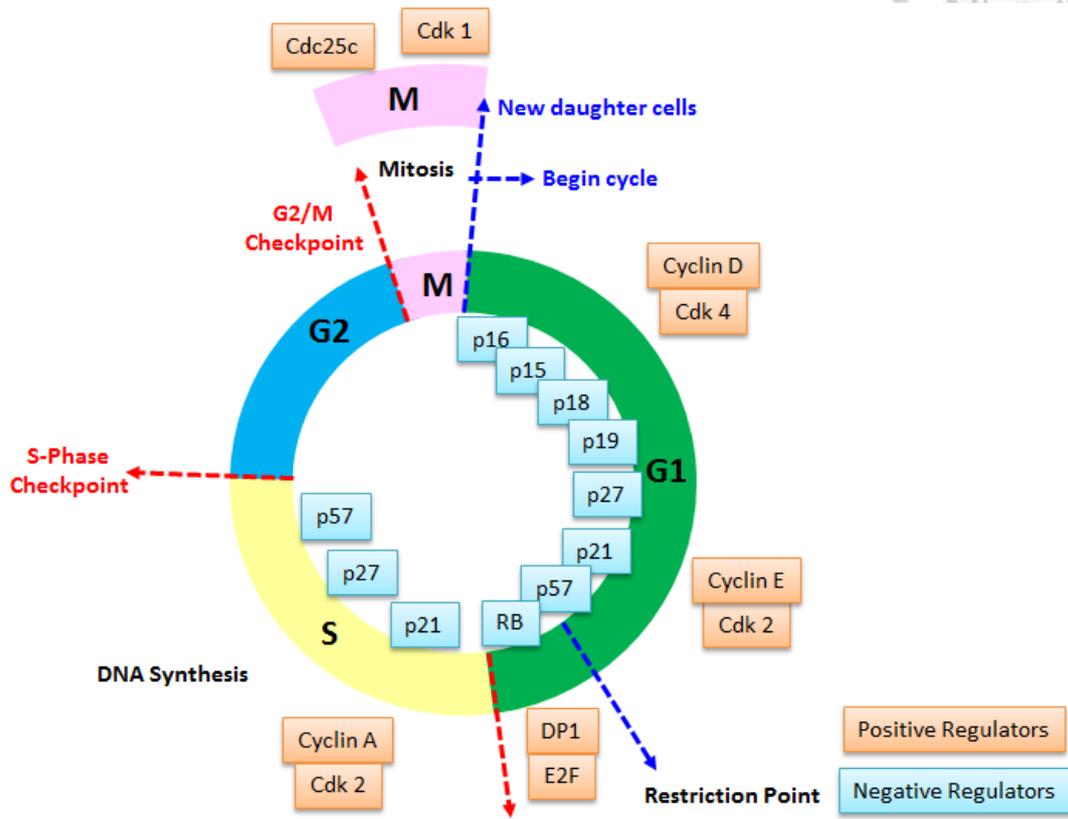
(Modified from: Cooper GM (2000). "Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle". The cell: a molecular approach, 2nd ed.)

圖 2-2 細胞週期之 G<sub>2</sub>/M 期概圖



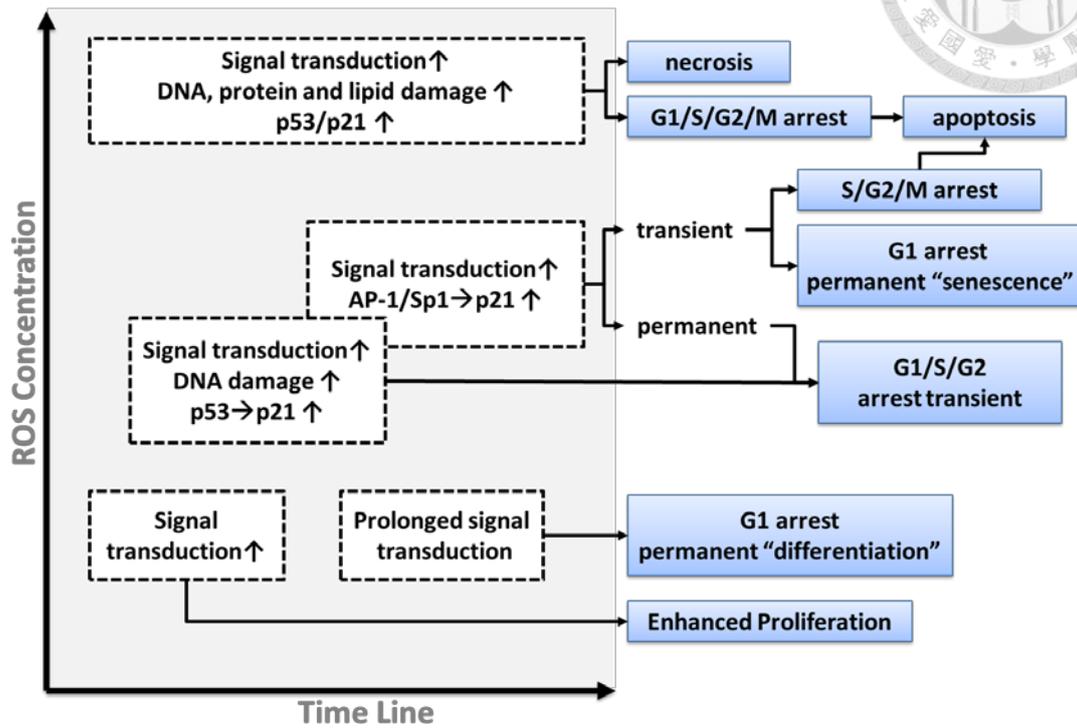
(Modified from : Perry and Kornbluth *Cell Division* 2007 2:12 )

圖 2-3 細胞週期中之正向與負向調控因子



(Modified from: [http://journals.prous.com/journals/dof/20032809/html/df280881/images/Kong\\_f1.gif](http://journals.prous.com/journals/dof/20032809/html/df280881/images/Kong_f1.gif))

圖 2-4 活性氧的作用時間、濃度以及對細胞週期的影響



(modified from: Boonstra, 2004)

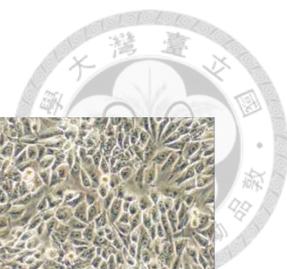
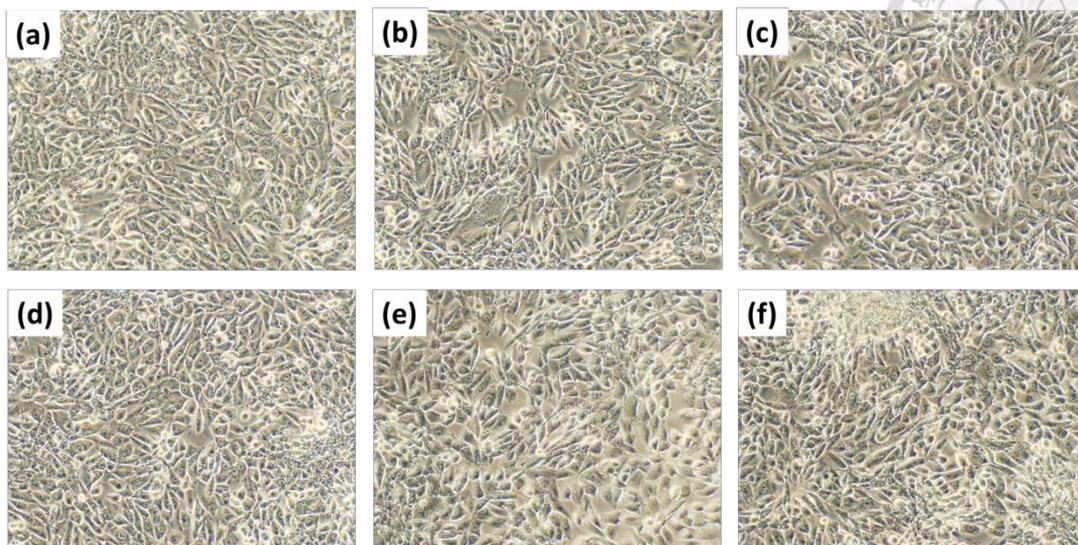
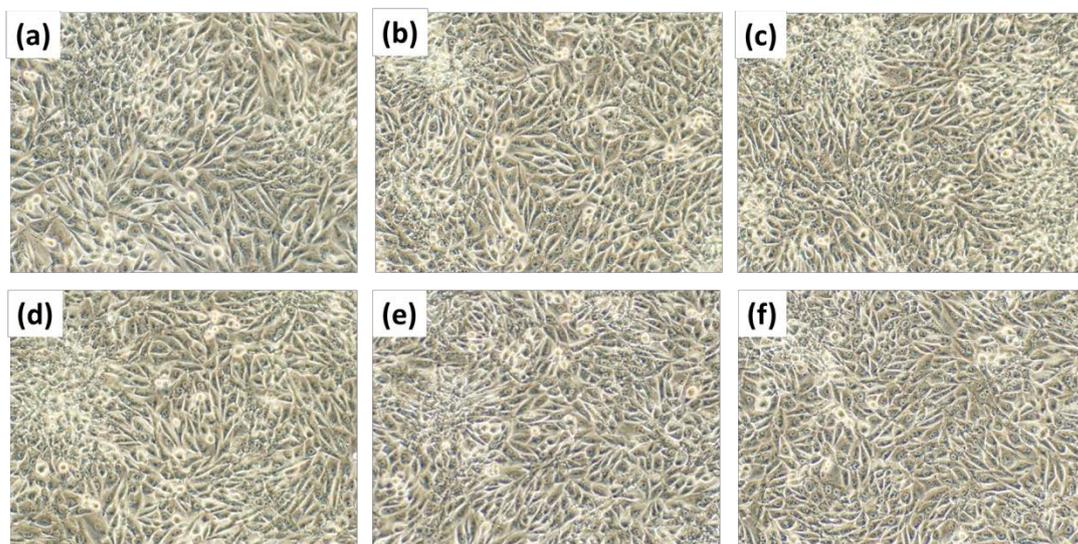


圖 5-1-1



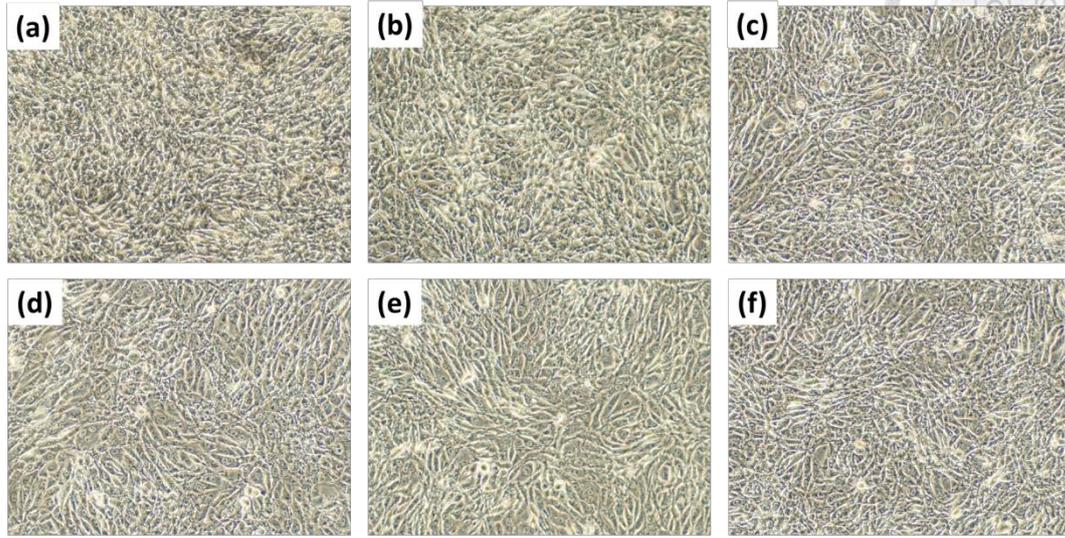
分別加入(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM Butyric acid，與MG-63細胞共同培養2小時後，經放大100倍的細胞顯微影像。

圖 5-1-2



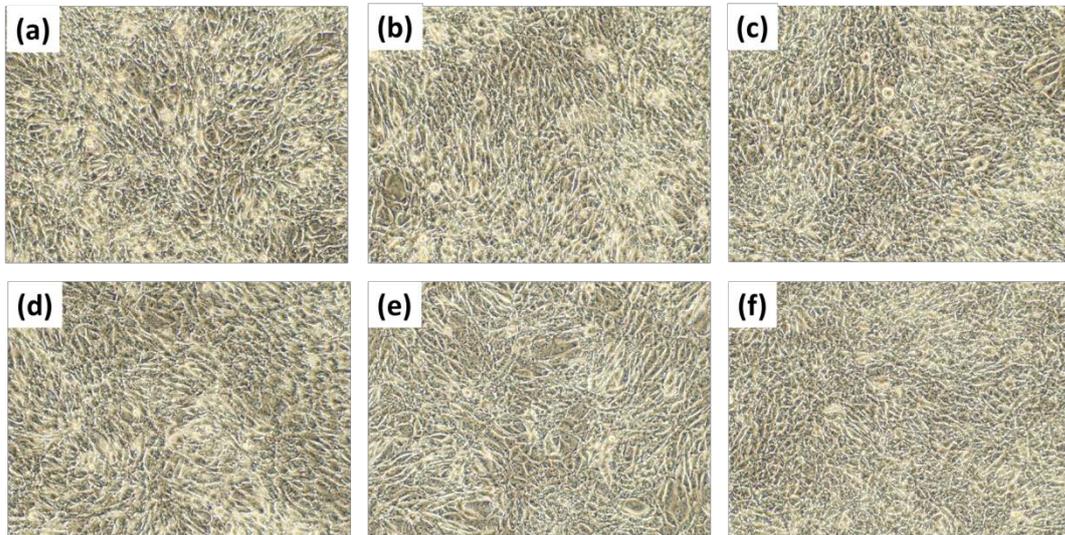
分別加入(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM Butyric acid，與MG-63細胞共同培養6小時後，經放大100倍的細胞顯微影像。

圖 5-1-3



分別加入(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM Butyric acid，與MG-63細胞共同培養24小時後，經放大100倍的細胞顯微影像。

圖 5-1-4



分別加入(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM Butyric acid，與MG-63細胞共同培養48小時後，經放大100倍的細胞顯微影像。

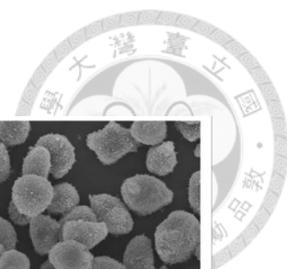
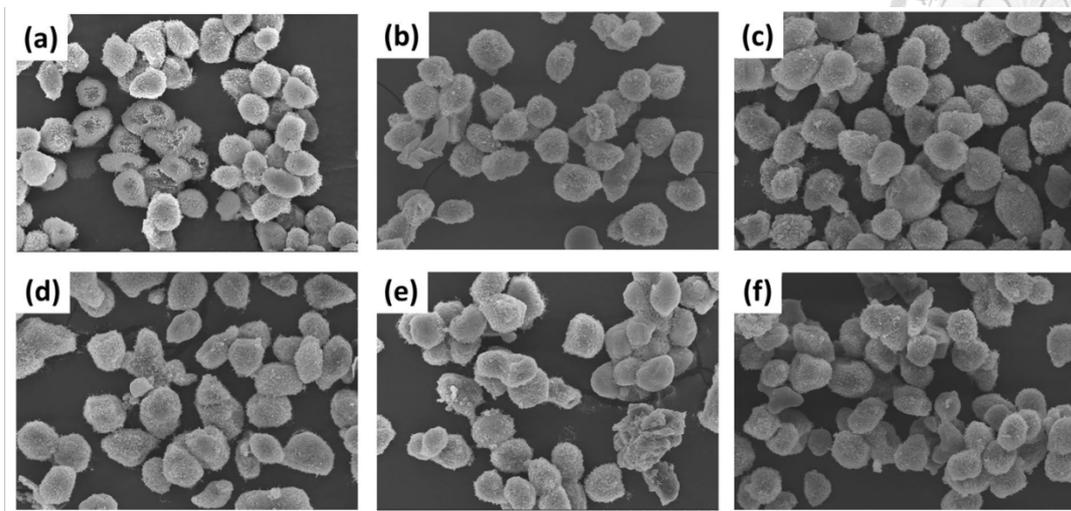
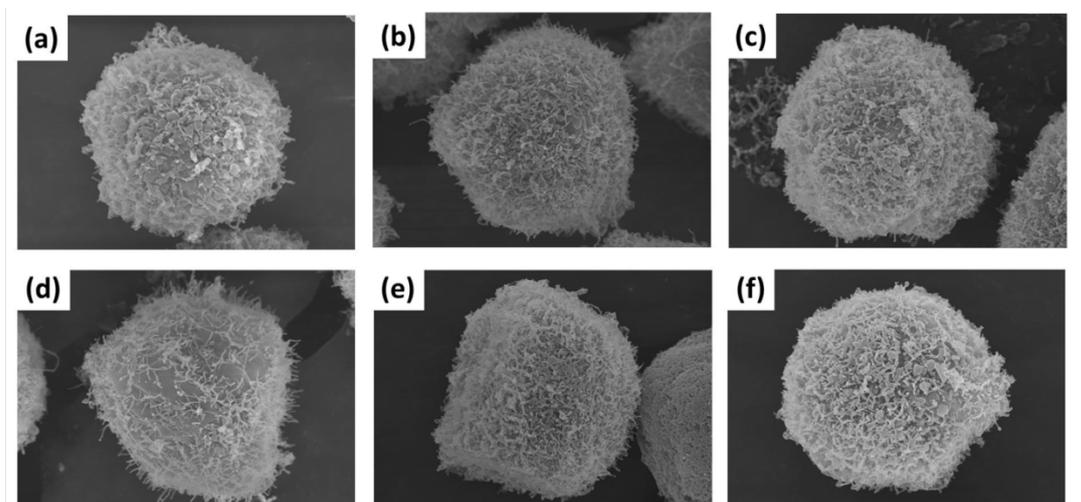


圖 5-1-5



分別加入(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM Butyric acid，與MG-63細胞共同培養24小時後，經放大1000倍的細胞顯微影像

圖 5-1-6



分別加入(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM Butyric acid，與MG-63細胞共同培養24小時後，經放大5000倍在電子顯微鏡下的影像

圖 5-2 MG-63 細胞( $5 \times 10^4$ )加入刺激五天後細胞存活率的改變 (6

well/ 2mL medium)



**MG-63 cell, 50000 cells- Butyric acid dose- MTT assay= 5 days**

\*  $p < 0.05$ , compare with control

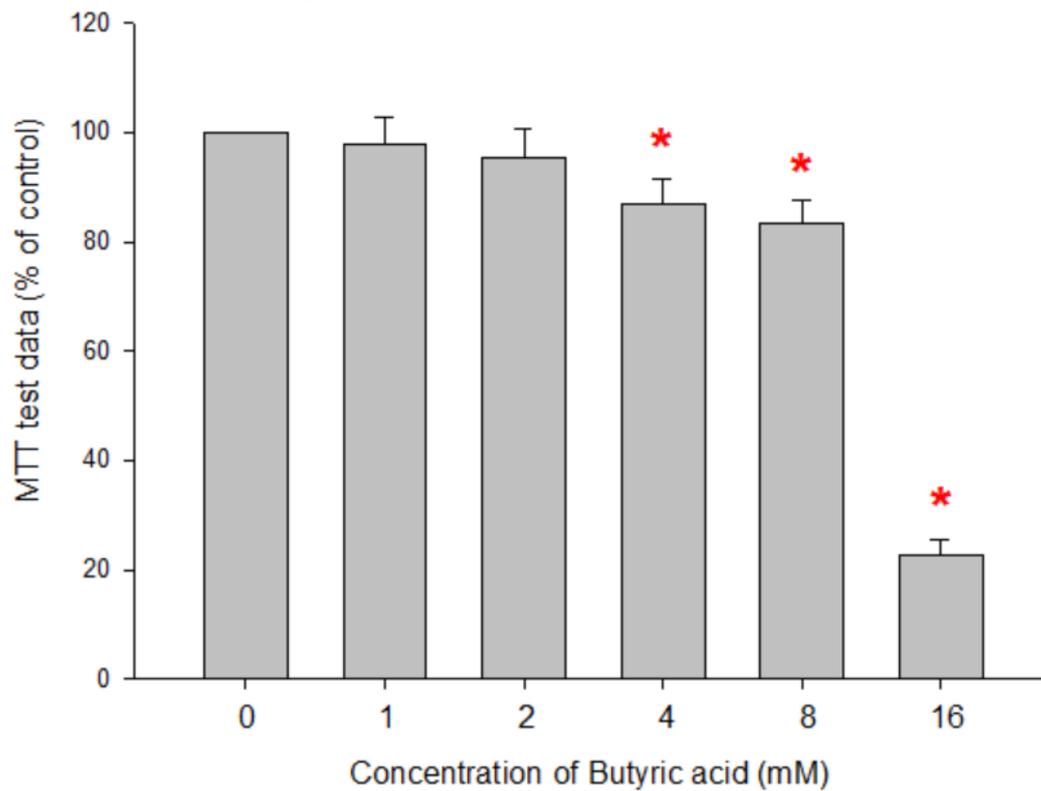
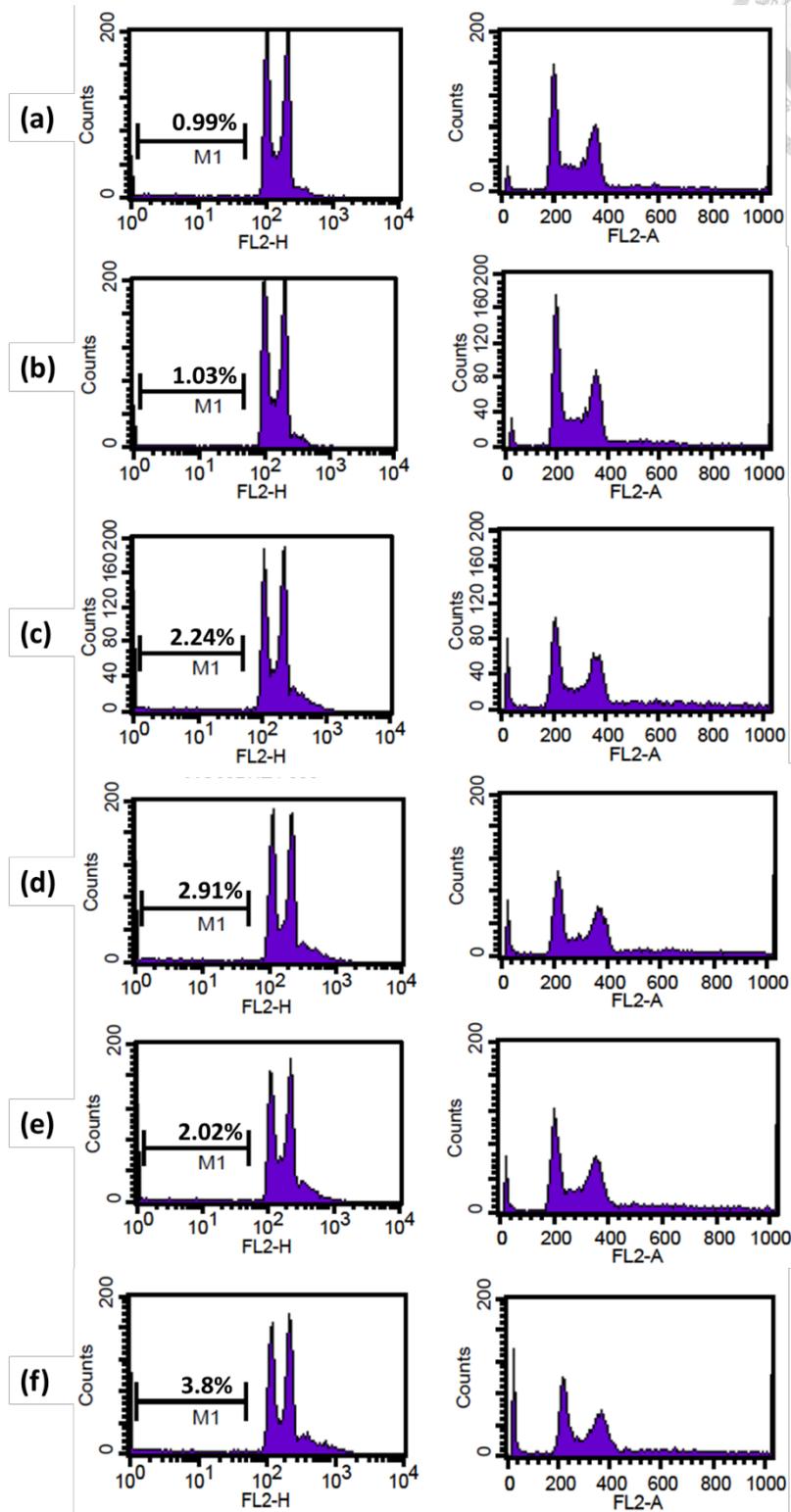


圖 5-3-1



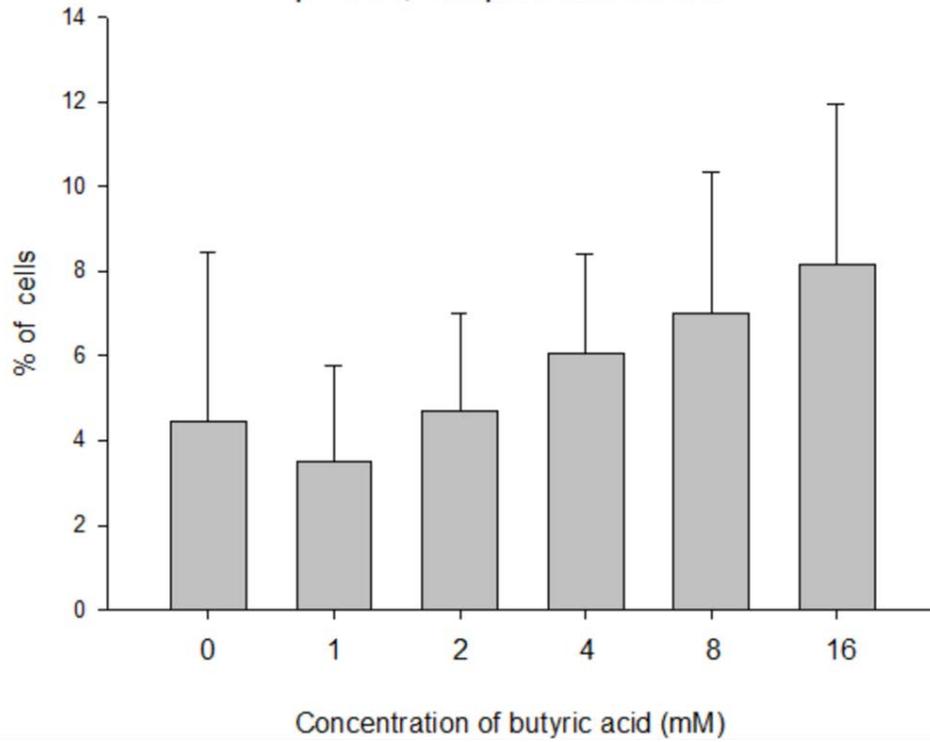
以流式細胞儀分析，以PI染色 (a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養2小時後，細胞的sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> population的變化。



圖 5-3-2

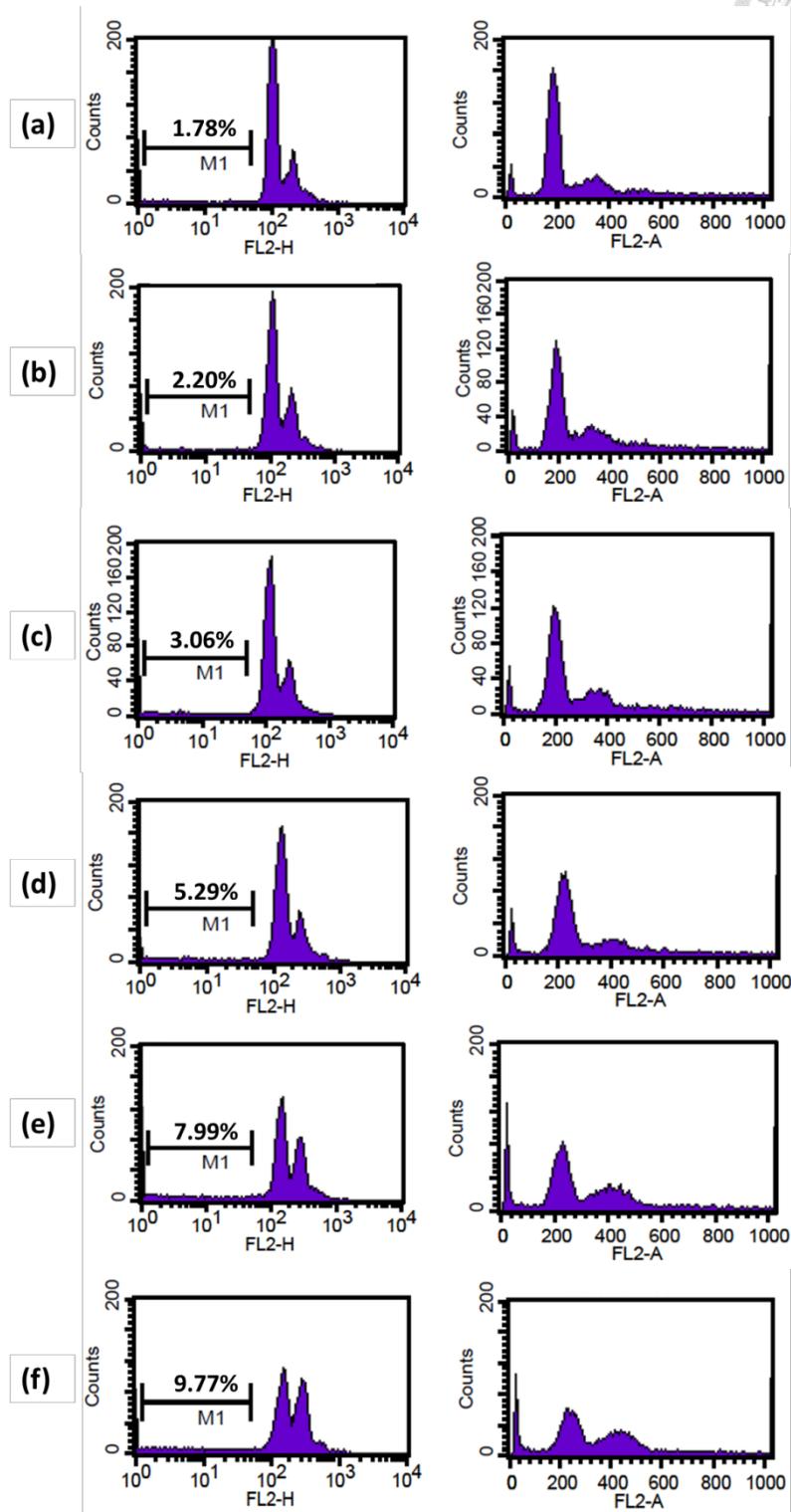
MG-63 cell, 500000 cells- Butyric acid dose- PI test (M1 value)= 2h

\* p < 0.05, compare with control



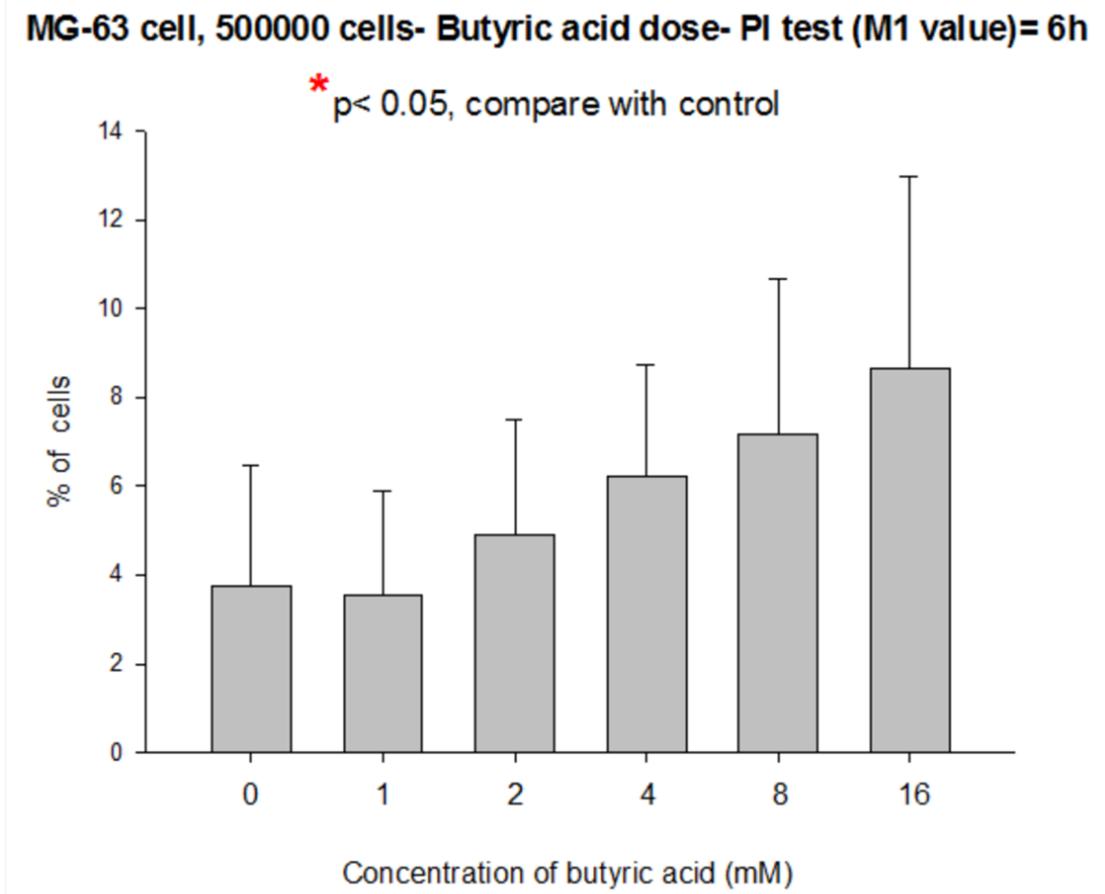
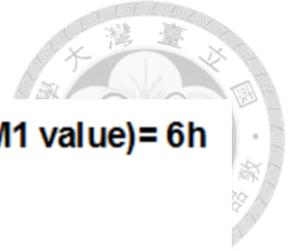
以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養2小時後，sub  $G_0/G_1$  population的比例(M1值)的統計，\*代表與control組有顯著差異。(n=6)。

圖 5-3-3



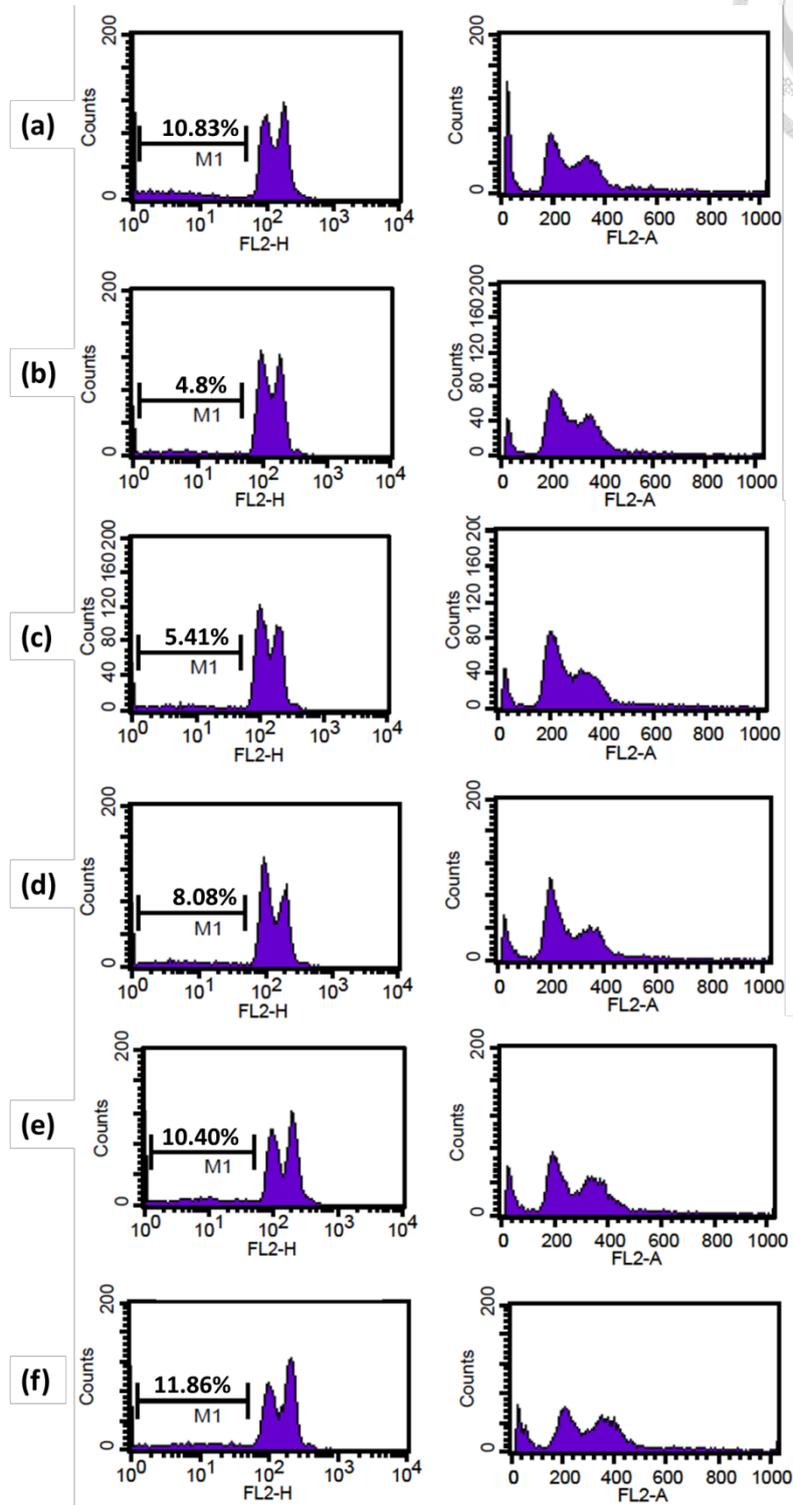
以流式細胞儀分析，以PI染色 (a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養6小時後，細胞的sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> population的變化。

圖 5-3-4



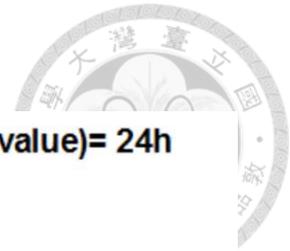
以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養6小時後，sub  $G_0/G_1$  population的比例(M1值)的統計，\*代表與control組有顯著差異。(n=6)。

圖 5-3-5

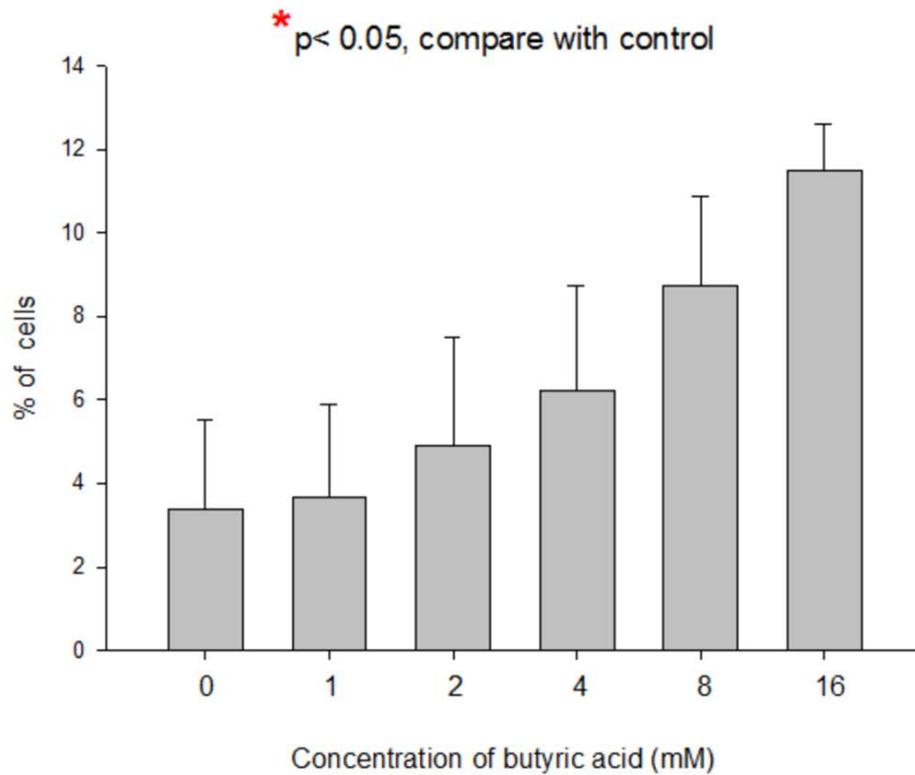


以流式細胞儀分析，以PI染色 (a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養24小時後，細胞的sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> population的變化。

圖 5-3-6

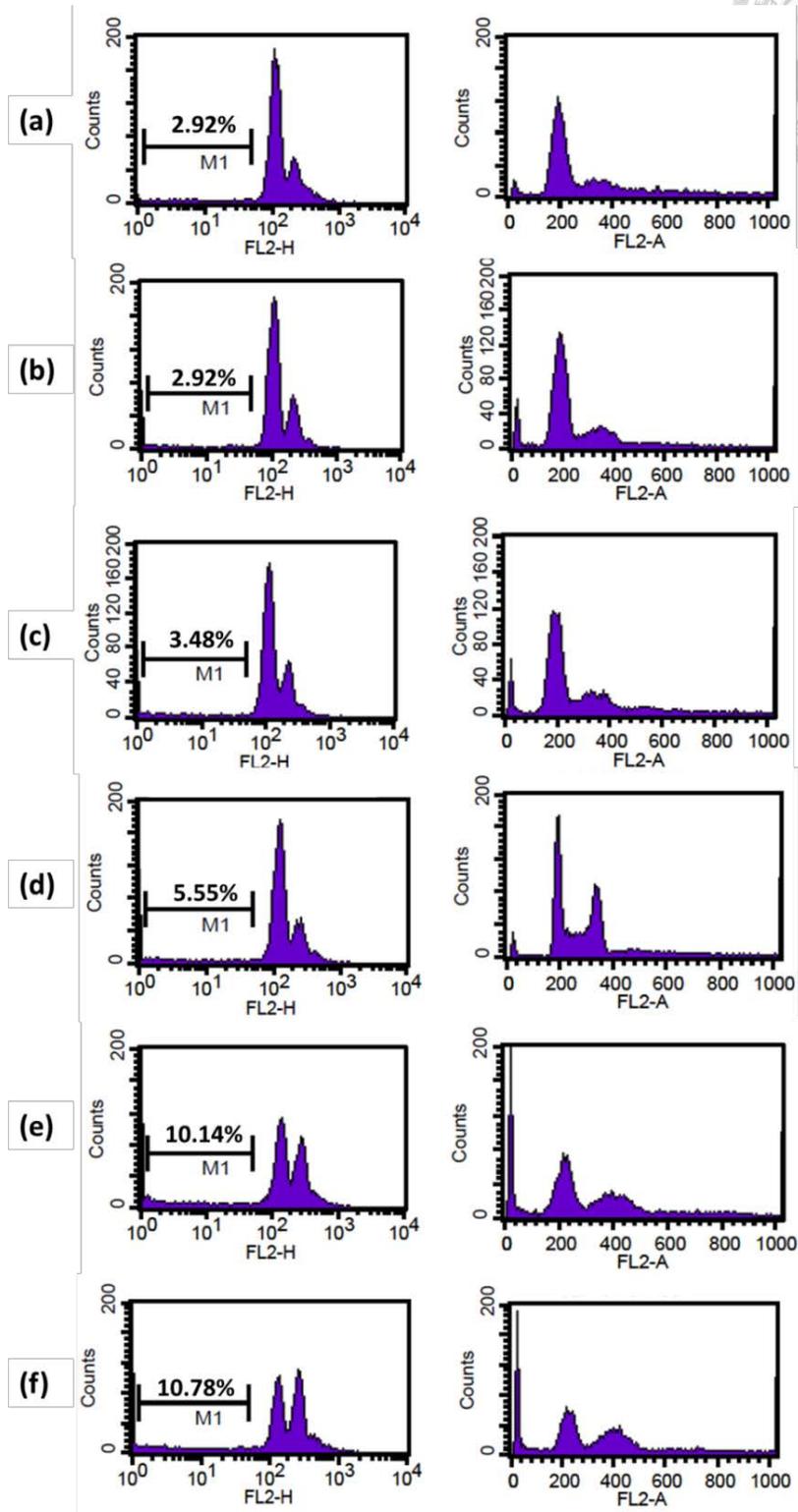


MG-63 cell, 500000 cells- Butyric acid dose- PI test (M1 value)= 24h



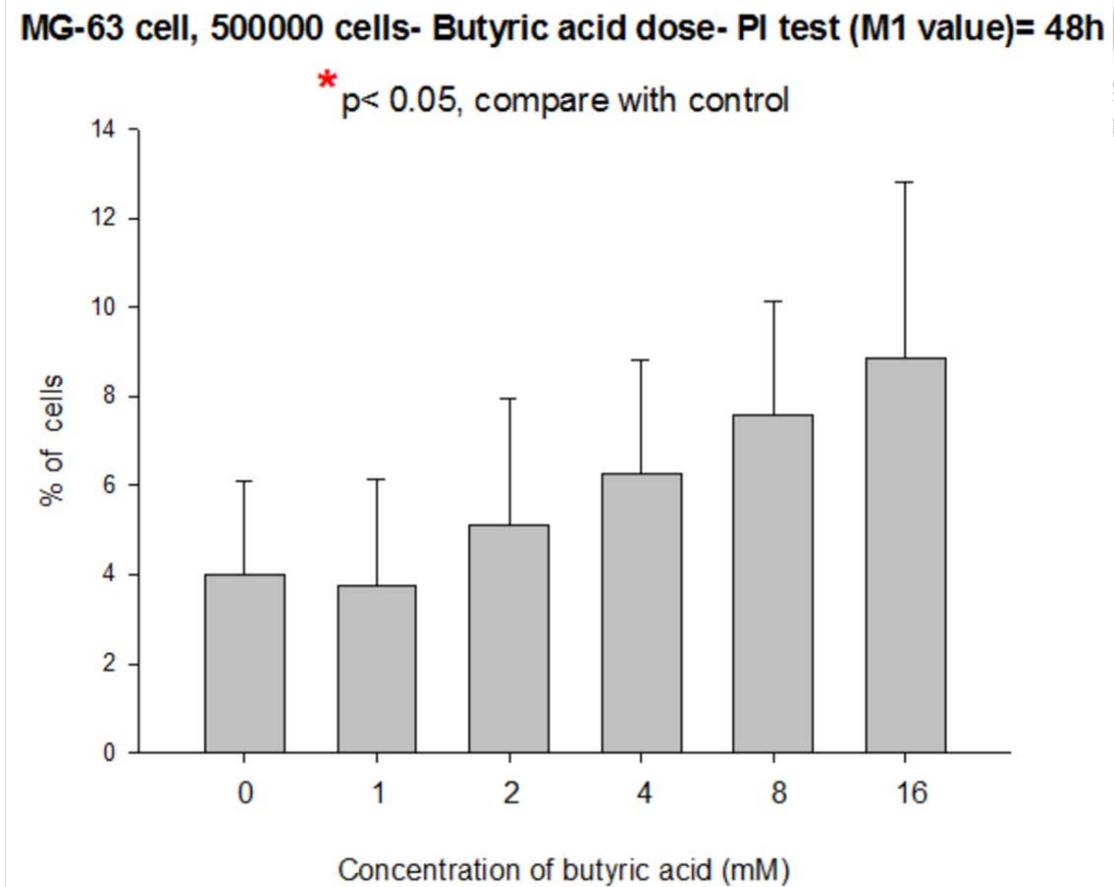
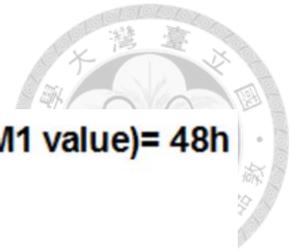
以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養24小時後，sub  $G_0/G_1$  population的比例(M1值)的統計，\*代表與control組有顯著差異。(n=6)。

圖 5-3-7



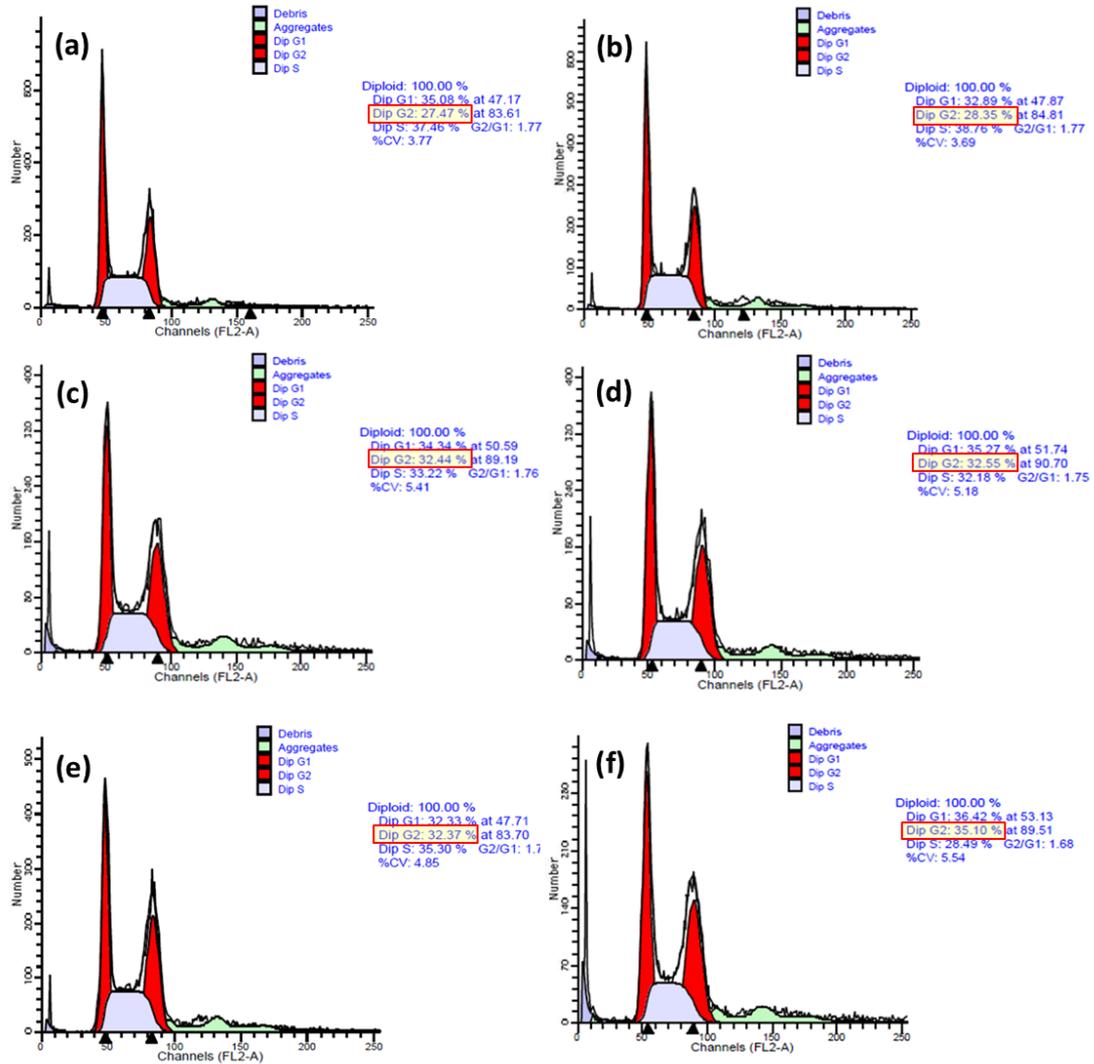
以流式細胞儀，PI染色分析以(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM Butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養48小時後，細胞死亡量的變化。

圖 5-3-8



以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養48小時後，sub  $G_0/G_1$  population的比例(M1值)的統計，\*代表與control組有顯著差異。(n=6)。

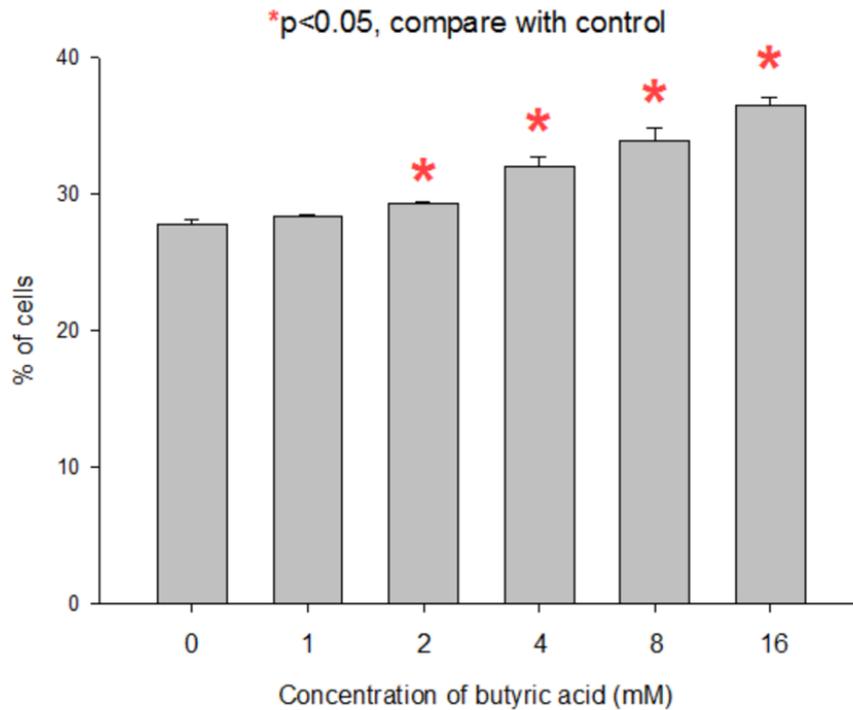
圖 5-3-9



以流式細胞儀分析，PI染色以(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養2小時後，細胞停滯在G<sub>2</sub>期的比例的變化。

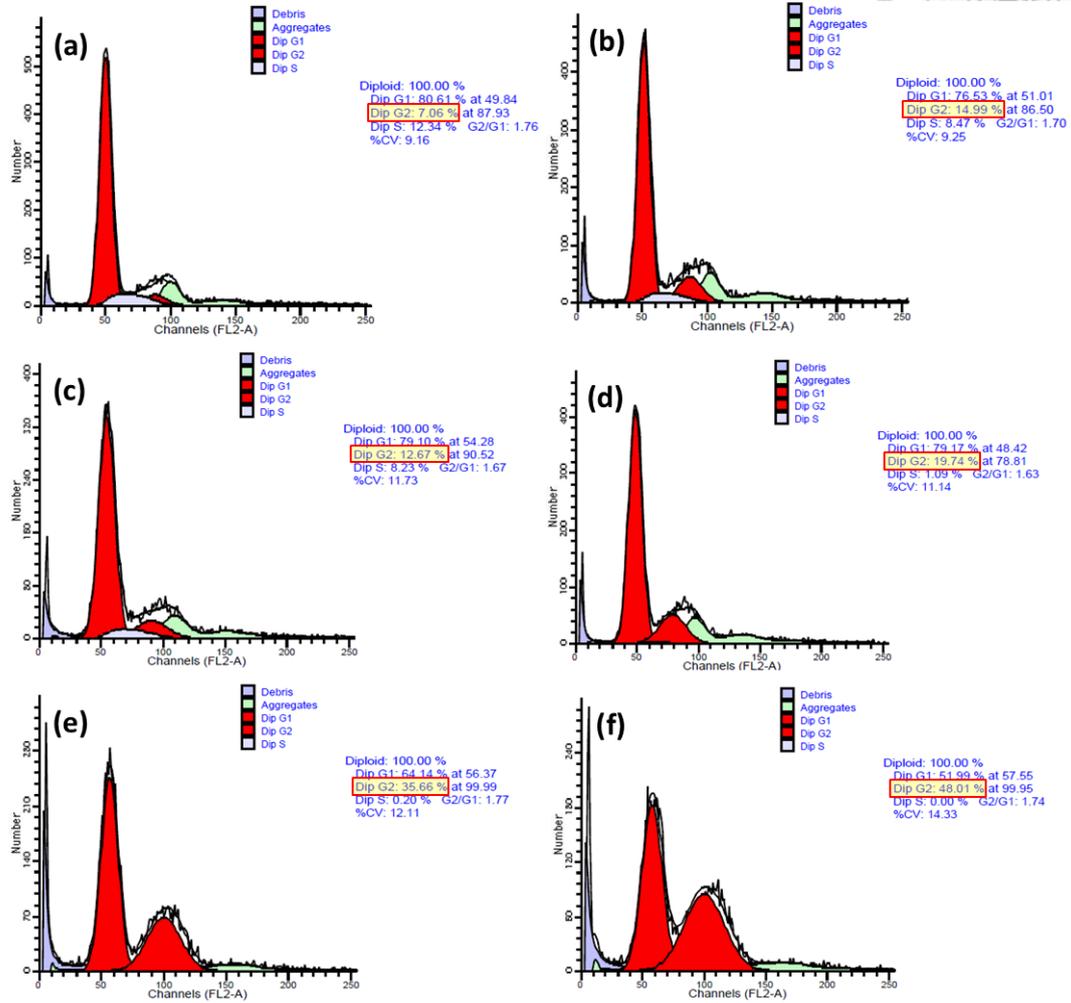
圖 5-3-10

MG-63 cell, 500000 cells-Butyric acid dose- PI test (G<sub>2</sub> arrest)=2h



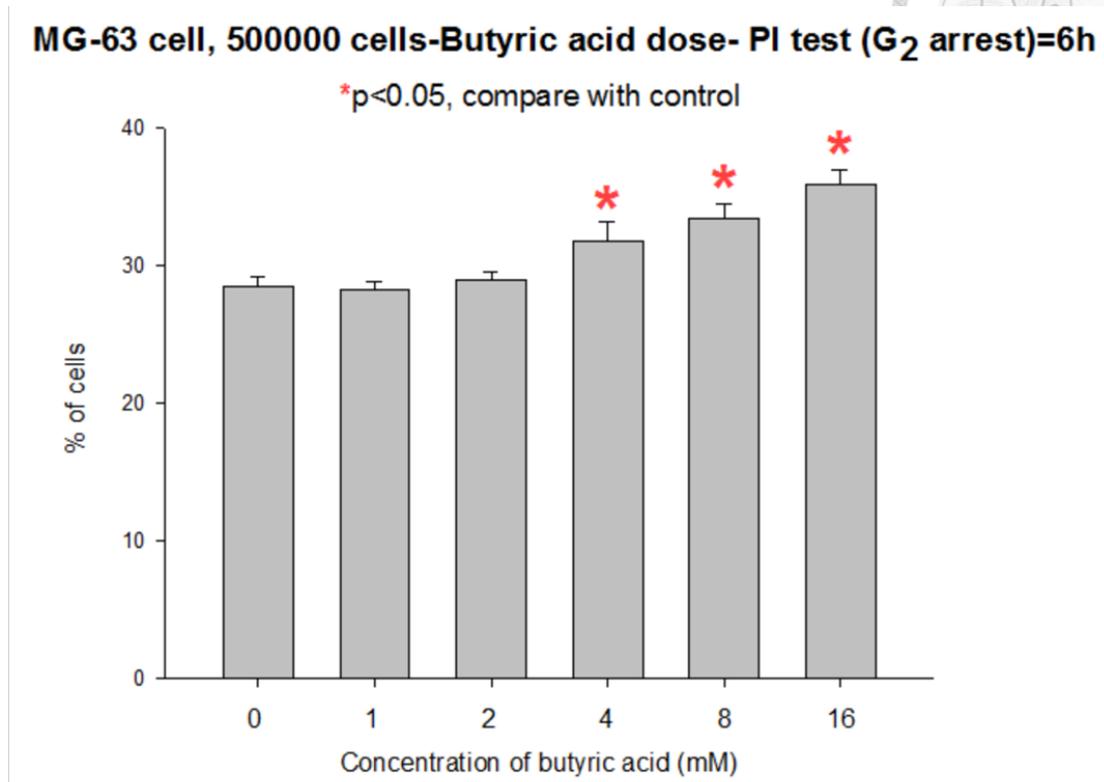
以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的 butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養2小時後，細胞停滯在G<sub>2</sub>期現象的統計，\*代表與control組比較有顯著差異。(n=6)

圖 5-3-11



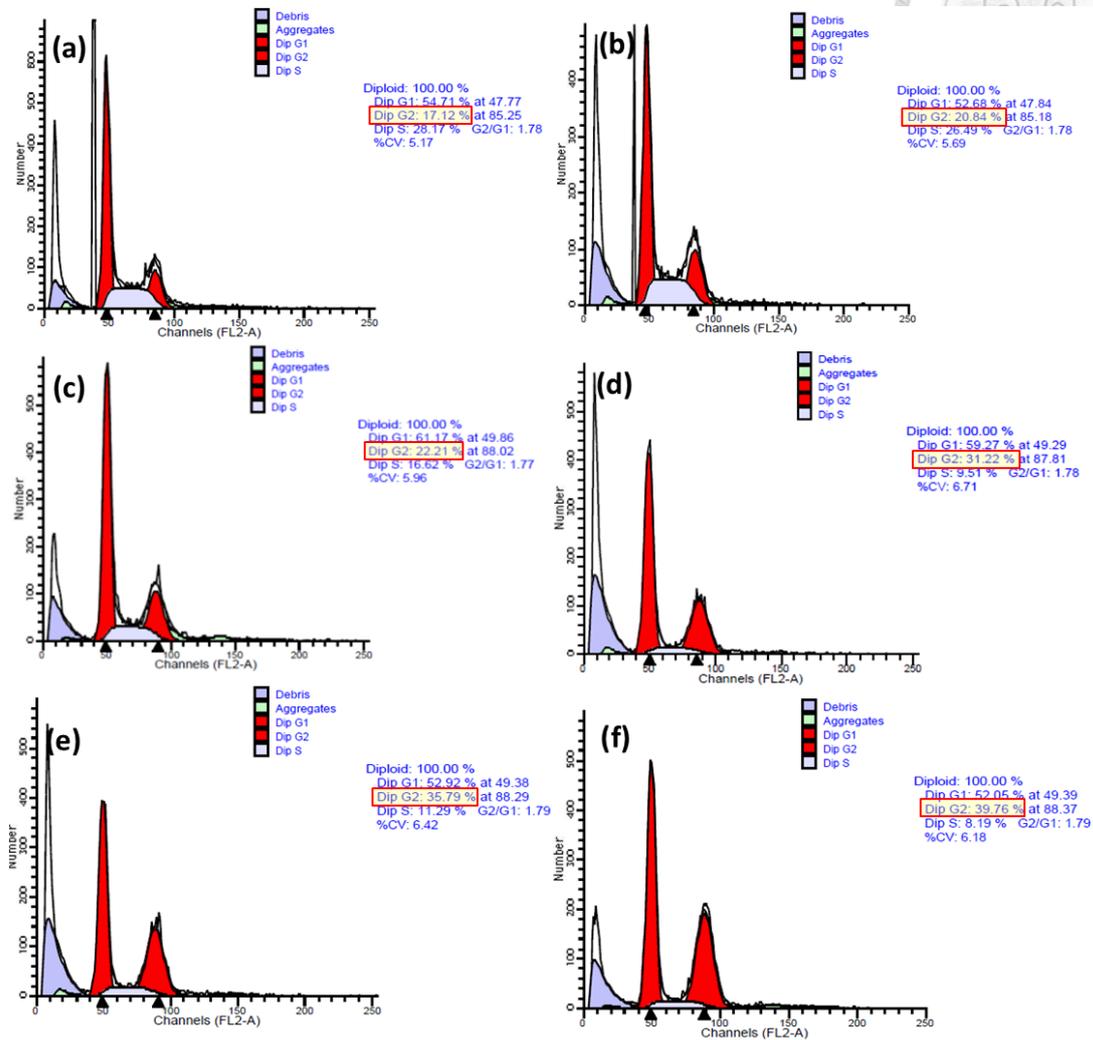
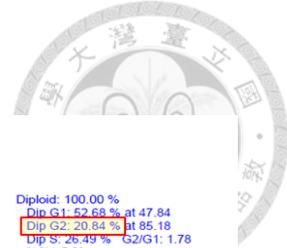
以流式細胞儀分析，PI染色以(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養6小時後，細胞停滯在G<sub>2</sub>期的比例的變化。

圖 5-3-12



以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的 butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養6小時後，細胞停滯在 $G_2$ 期現象的統計，\*代表與control組比較有顯著差異。(n=6)

圖 5-3-13

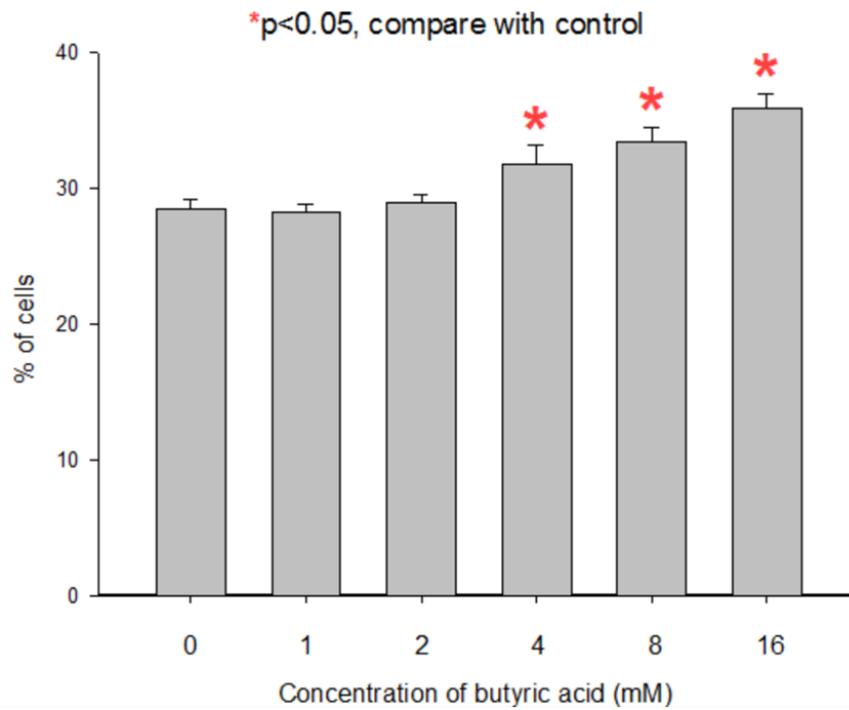


以流式細胞儀分析，PI染色以(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養24小時後，細胞停滯在G<sub>2</sub>期的比例的變化。

圖 5-3-14

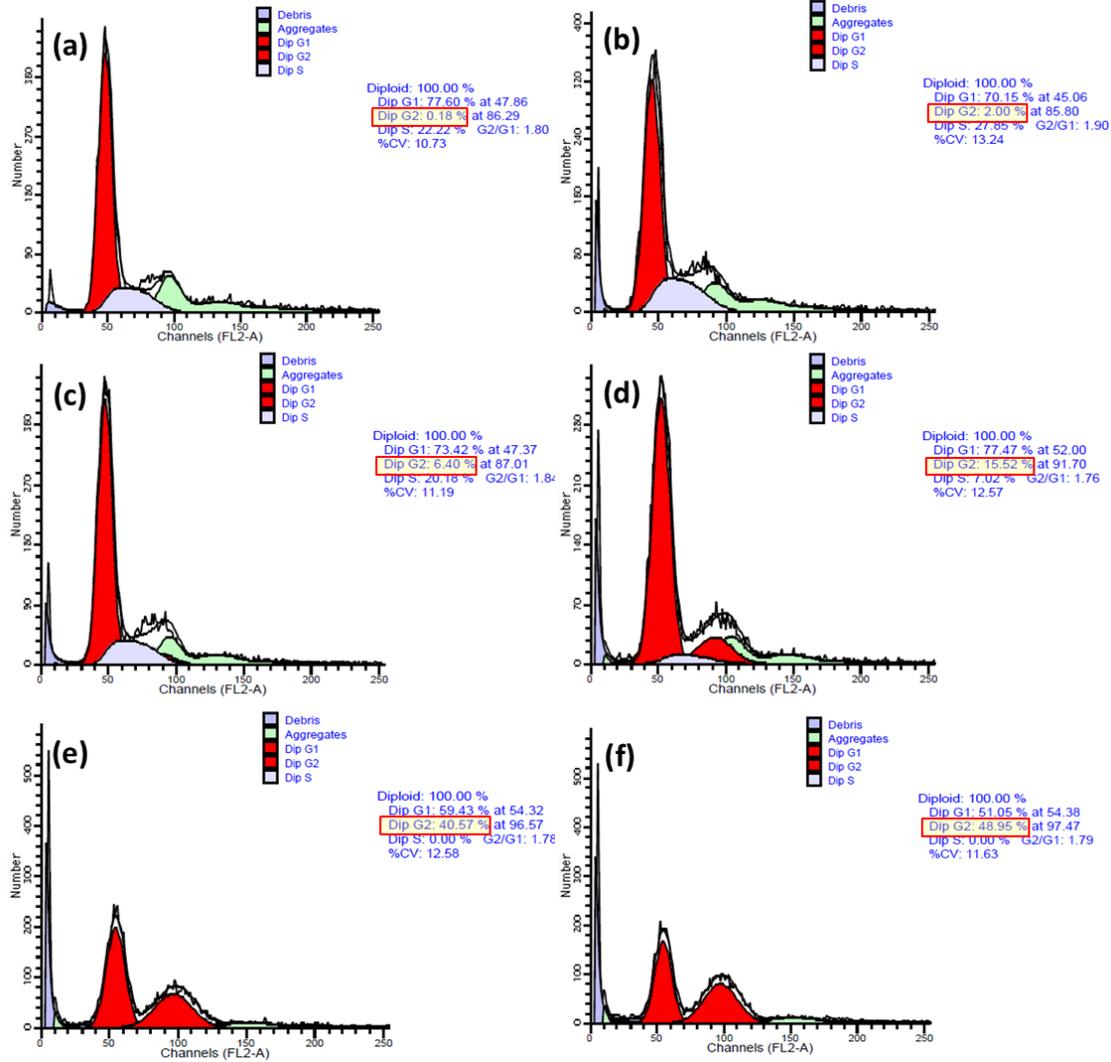
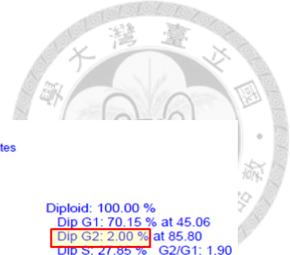


MG-63 cell, 500000 cells-Butyric acid dose- PI test (G<sub>2</sub> arrest)=24h



以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的 butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養24小時後，細胞停滯在G<sub>2</sub>期現象的統計，\*代表與control組比較有顯著差異。(n=6)

圖 5-3-15

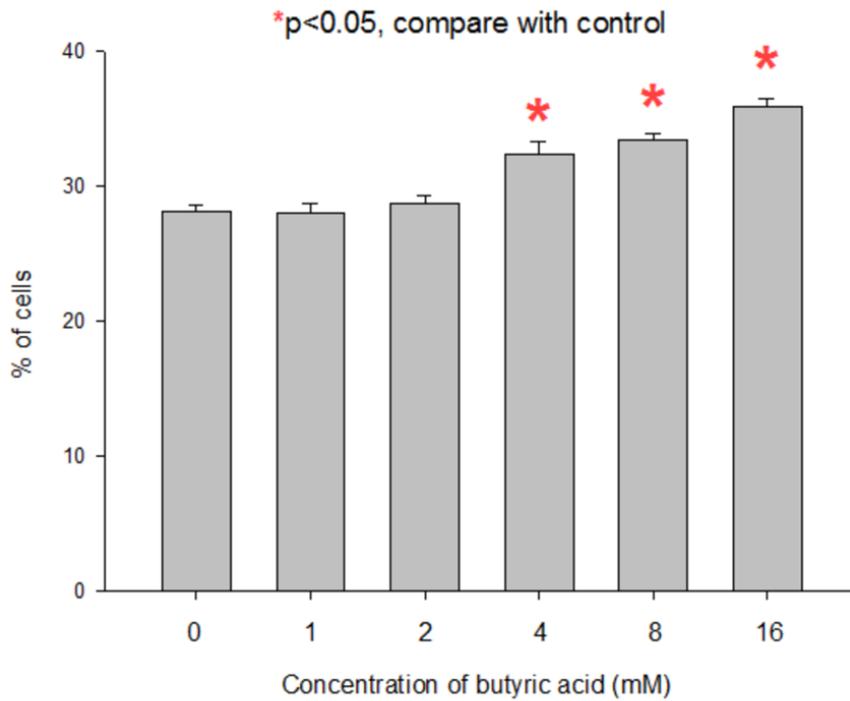


以流式細胞儀分析，PI染色以(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 4 mM、(e) 8 mM、(f) 16 mM的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培48小時後，細胞停滯在G<sub>2</sub>期的比例的變化。

圖 5-3-16

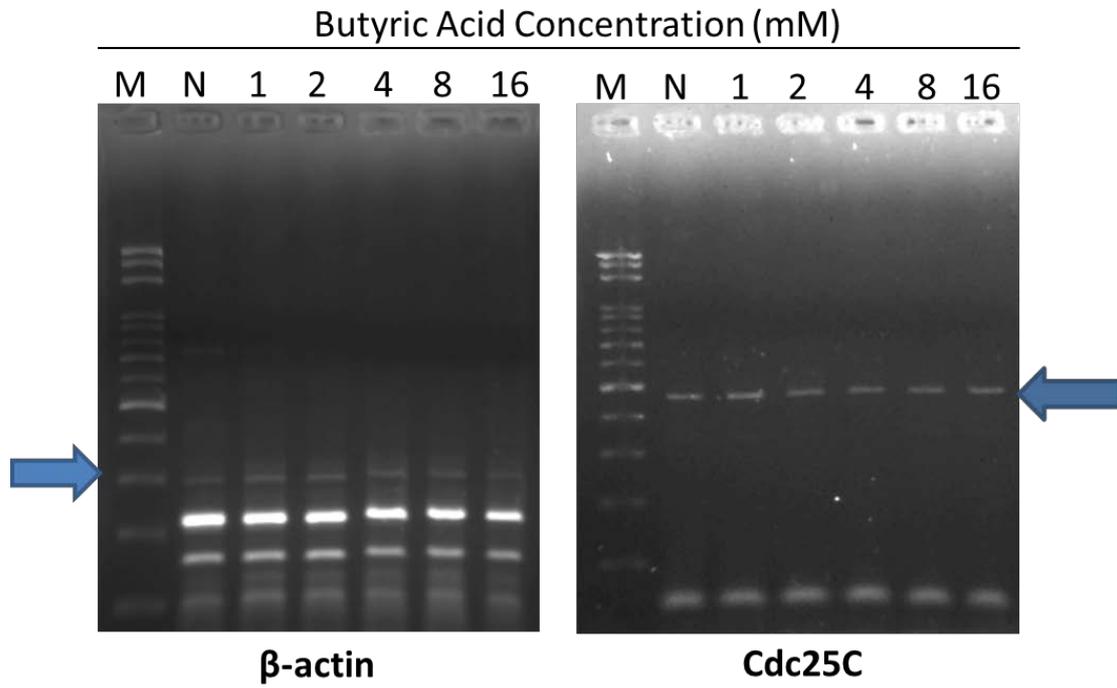


MG-63 cell, 500000 cells-Butyric acid dose- PI test (G<sub>2</sub> arrest)=48h



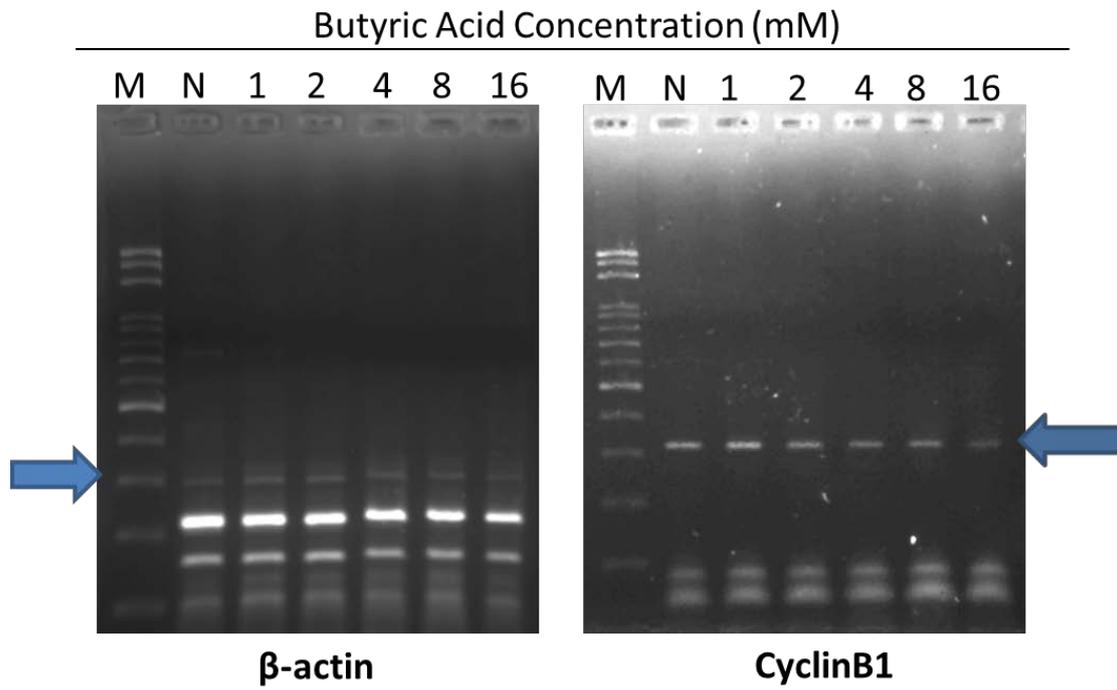
以流式細胞儀，PI染色分析以不同濃度的 butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養48小時後，細胞停滯在G<sub>2</sub>期現象的統計，\*代表與control組比較有顯著差異。(n=6)

圖 5-4-1



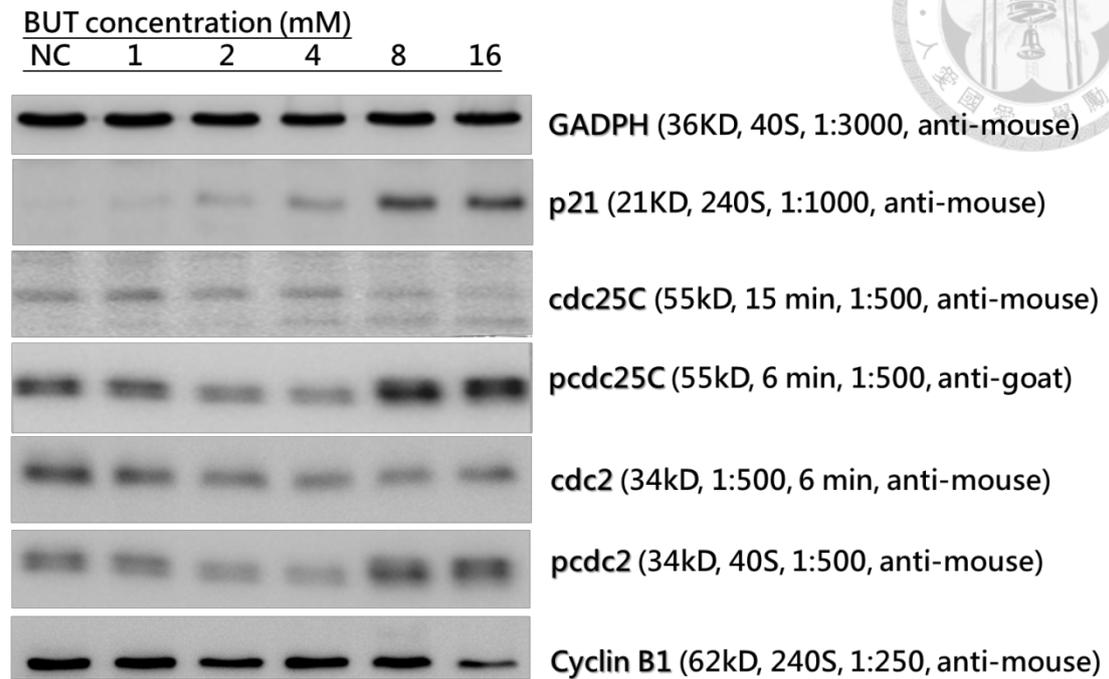
以反轉錄聚合酶連鎖反應觀察經不同濃度的butyric acid刺激24小時後的MG-63細胞，其Cdc25C表現量的變化

圖 5-4-2



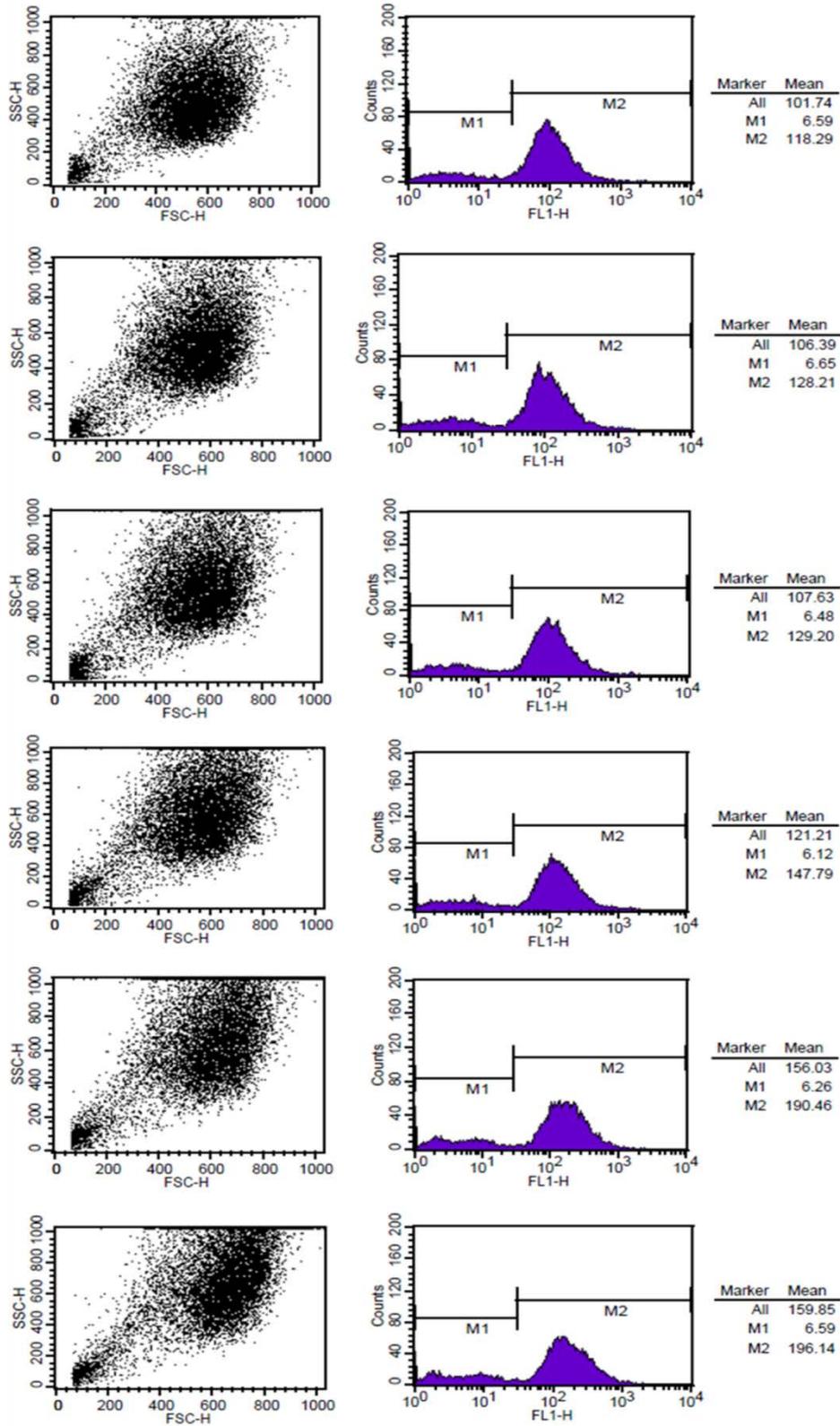
以反轉錄聚合酶連鎖反應觀察經不同濃度的butyric acid刺激24小時後的MG-63細胞，其Cyclin B1表現量的變化。

圖 5-5



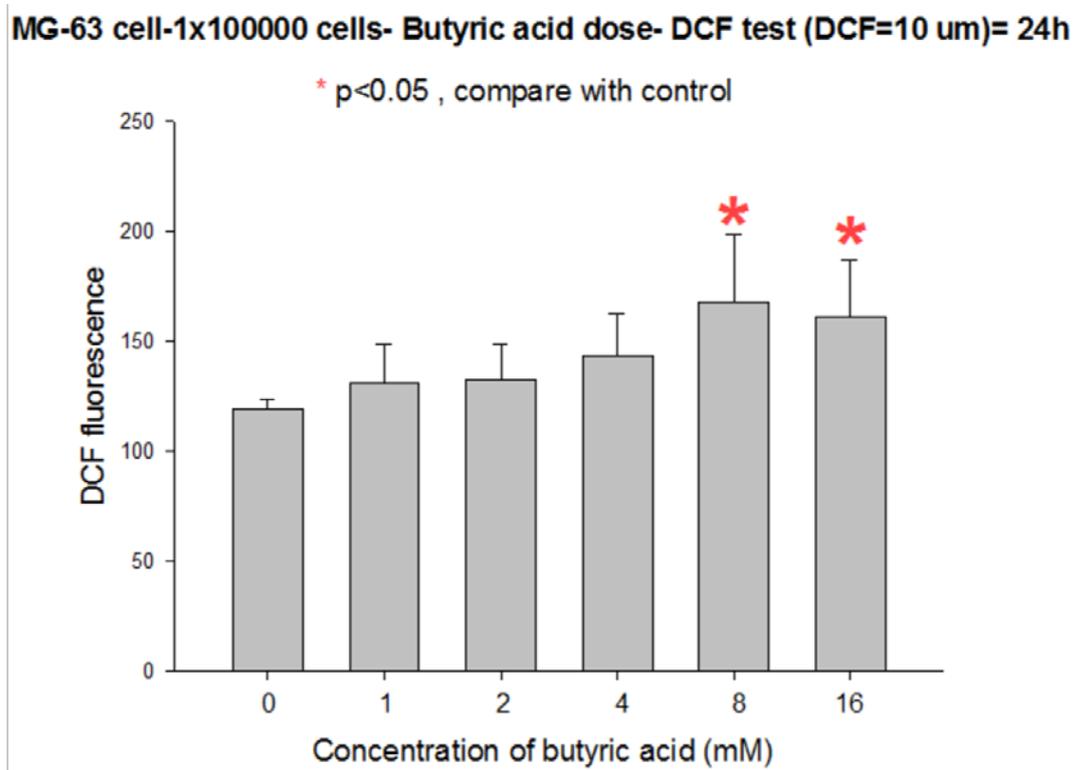
圖為以不同濃度的butyric acid與MG-63類骨瘤細胞共同培養24小時後，與細胞週期相關之蛋白質的表現量的變化。

圖 5-6-1



以流式細胞儀，DCF染色分析以不同濃度的butyric acid與MG-63類骨瘤(1x10<sup>5</sup>)細胞共同培養24小時後，細胞活性氧的產生量(M2值)的分析。

圖 5-6-2



以流式細胞儀，DCF染色分析以不同濃度的butyric acid與MG-63類骨瘤( $1 \times 10^5$ )細胞共同培養24小時後，細胞活性氧的產生量的統計分析，\*代表與0 mM 組有顯著差異。(n=8)。