

國立台灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

分析植物對苯二酚衍生物 HQ17(3)

對急性淋巴性白血病細胞株的抑制作用

Inhibitory Effects of The Botanical Alkyl Hydroquinone

Derivative HQ17(3) on Acute Lymphoblastic

Leukemia Cell Lines

陳佳瑋

Chia-Wei Chen

指導教授：胡忠怡 博士

Advisor : Chung-Yi Hu, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July, 2016



國立台灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

分析植物對苯二酚衍生物 HQ17(3)

對急性淋巴性白血病細胞株的抑制作用

Inhibitory Effects of The Botanical Alkyl Hydroquinone
Derivative HQ17(3) on Acute Lymphoblastic
Leukemia Cell Lines

本論文係陳佳瑋君 (R03424028) 在國立台灣大學醫學檢驗暨生物
技術學研究所完成之碩士學位論文，於民國 105 年 7 月 18 日承下列考
試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

胡忠怡

(簽名) (指導教授)

林文音

歐大涼

郭遠輝

林文音

系主任、所長

致謝



在這兩年的碩士生涯中，首先我要感謝我的指導教授胡忠怡老師這兩年的用心指導，以及在專題討論和 meeting 給予的寶貴意見，帶領我完成碩士論文；還要感謝林亮音老師、歐大諒老師、郭遠燁老師、吳瑞菁老師、顧雅真老師對於 committee、meeting 和實驗上給予的指導與建議，讓我從中學到很多，也幫助我從實驗的困頓中解救出來。感謝林淑萍老師提供 HQ17(3)這個藥物讓我的碩士論文能順利完成；感謝林亭妤學姊、唐偉倩學姊在純化 HQ17(3)上給予的協助。感謝 R304 的夥伴們這兩年來的照顧，謝謝佩蓉學姐、馨瑩學姐、耀仁學姐、蔓潔、文博這兩年對我的關心和幫助，以及願意傾聽我所發生的點點滴滴，一起分享實驗成功的喜悅與失敗的苦悶；謝謝和我一起奮鬥兩年的好夥伴蔓潔，這兩年雖然辛苦但有個戰友在一旁一起奮鬥讓這兩年不用孤軍奮戰。感謝我的好朋友育翎跟我一起發瘋早起晨練打球，以及願意當我的忠實聽眾，從妳身上我也學到了很多。感謝我的好朋友桓瑋與振機陪我打電動和耍嘴皮子紓壓。感謝大學時期系羽的夥伴相約的羽球團，在每週的練球當中讓我盡情揮灑汗水紓解學業上的壓力。感謝我的愛駒陪我征戰台北市各大單車路線，讓我從中了解只要堅持下去終點就在眼前。兩年前因當兵脫離學業一年的我，下了很大的決心才回來完成碩士學業，很感謝家人的支持以及陪伴，每當我想放棄時你們的鼓勵總能給我力量繼續走下去。這兩年碩士生涯雖然辛苦，但有了大家的幫忙與陪伴這兩年就值得了，再次的感謝你們。

中文摘要



好發於兒童的急性淋巴性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)為不成熟的 B 淋巴球和 T 淋巴球異常增生的一種血液癌症，造成 ALL 的原因有 proto-oncogene 不正常表現、染色體轉位(chromosome translocation)或多倍體(hyperdiploidy)等導致造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)或血液前驅細胞(hematopoietic progenitor cells, HPC)之異常增生、抗凋亡以及自我更新的能力。高危險群(high risk)的 t(9;22) *BCR-ABL*⁺ precursor B-ALL 在兒童 ALL 發生率約有 3%，但在成人 ALL 卻超過 25%，雖然在治療上採取最高劑量化療搭配 tyrosine kinase inhibitors (如：Imatinib, IM)，但其預後仍差；而對第一線抗血癌藥物(如：glucocorticoid, Dexamethasone)的抗性是在 T-ALL 治療上常碰到的問題。因此，有必要針對這些高危險群(high risk)的 ALL 發展出新的治療策略。小分子 10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone (HQ17(3))萃取自台灣漆樹(*Rhus succedanea*)的漆液，先前研究指出對於多種癌細胞具有選擇性毒性，但對周邊血液白血球則無明顯毒性，已知 HQ17(3)能抑制 DNA 拓撲異構酶(DNA topoisomerase II)活性，在 Huh7 肝癌細胞中可造成氧化壓力引起細胞凋亡。

用低濃度(μM)的 HQ17(3)處理 SUP-B15 (IM-refractory *BCR-ABL*⁺ B-ALL)或 Jurkat (Dexamethasone-resistant T-ALL)細胞 24 小時即有顯著毒殺效果，HQ17(3)也會導致粒線體膜電位喪失並在 Jurkat 及 SUP-B15 細胞分別造成 caspase-dependent，caspase-independent 的細胞死亡。用低於 IC₅₀ 濃度的 HQ17(3)能增加 SUP-B15 細胞對 IM 的敏感度，也能增加 Dexamethasone 對 Jurkat 細胞的抑制效果。

在 SUP-B15 細胞中，HQ17(3)引起細胞死亡之前有顯著的酸性胞器生成，顯示溶小體膜通透(lysosomal membrane permeabilization, LMP)或細胞自噬(autophagy)可能與細胞死亡相關。使用多種 lysosome 中 cathepsins 的抑制劑皆不



能挽救 HQ17(3)導致的死亡，說明與 LMP 相關的 cathepsins 溢出並非 HQ17(3)導致細胞死亡的原因。HQ17(3)能造成外源性的 EGFP-LC3 融合蛋白的聚集，代表 HQ17(3)能促使細胞產生 autophagy。使用 autophagy 的抑制劑(Bafilomycin A1)以及利用 shRNA 抑制 Beclin1 (autophagy 發生的必要蛋白)的表現皆能降低 HQ17(3)造成的死亡，autophagy 誘導劑(Rapamycin)也可以減少 HQ17(3)引起之細胞死亡。因此，HQ17(3)造成的死亡與 autophagy 相關。我們發現 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞迅速引起 mTOR 和 NF- κ B 的活化，顯示細胞遭受壓力。HQ17(3)造成內質網壓力進而導致 eIF2 α 磷酸化和 ER chaperone-Grp78 表現量的增加。推測 HQ17(3)引起內質網壓力進而導致細胞發生 autophagy 和死亡。

本研究結果顯示 HQ17(3)對高復發風險 ALL 細胞具有毒殺效果，且第一線用藥與 HQ17(3)合併使用能增強對 ALL 細胞株的抑制作用，除了在 Jurkat 細胞引起典型的細胞凋亡，我們也發現 HQ17(3)能對 SUP-B15 細胞造成內質網壓力和 autophagy，而內質網壓力是否與 HQ17(3)導致的 autophagy 和細胞死亡有關還需進一步探討。

關鍵字：急性淋巴性白血病、細胞自噬、HQ17(3)、內質網壓力

Abstract



Acute lymphoblastic leukemia (ALL), the most common cancer in childhood, is a neoplasm with uncontrolled proliferation of immature B- or T-lymphoid cells in hematopoietic system. Aberrant expression of proto-oncogene, chromosome translocation or hyperdiploidy make hematopoietic stem cell (HSC) or progenitor cells obtain ability of uncontrolled proliferation, anti-apoptosis and self-renewal and result in ALL development. High risk (HR) precursor B-ALL with t(9;22) BCR-ABL composed of 3% of childhood ALL and more than 25% of the adult ALL. It's characterized by dismal clinical outcome, even treated with the highest dose chemotherapy combined with tyrosine kinase inhibitors (e.g. Imatinib, IM). Resistant to first-line drugs (e.g. glucocorticoid, Dexamethasone) is a common problem encountered in T-ALL treatment. Developing new therapeutic strategies for high risk ALL is necessary. The small natural molecule 10'(Z),13'(E),15'(E)- heptadecatrienyl hydroquinone (HQ17(3)) is extracted from the sap of the lacquer tree *Rhus succedanea*. HQ17(3) exerted selective cytotoxicity in various types of cancer cells, but did not reduce the viability of normal peripheral blood leukocytes. Introduction of HQ17(3) resulted in DNA topoisomerase II inhibition and oxidative stress production in Huh7 cell lines.

We found HQ17(3) had significant cytotoxic effect within 24 hours at micromolar concentration on HR SUP-B15 (IM-refractory *BCR-ABL*⁺ B-ALL) and Jurkat (Dexamethasone-resistant T-ALL) cell lines. HQ17(3) lead to loss of mitochondria membrane potential and caspase-dependent cell death in Jurkat cells. HQ17(3) induced caspase-independent cell death in SUP-B15 cells. Combination of sub-IC₅₀ concentration of HQ17(3) sensitize SUP-B15 cells to Imatinib, and enhance the

inhibitory effect of Dexamethasone on Jurkat cells.

In SUP-B15 cells, HQ17(3) induced formation of acidic vesicles prior to cell death. The cause of HQ17(3)-induced cell death could not be attributed to cathepsins from lysosomal membrane permeabilization (LMP) because cathepsin inhibitors did not attenuate the cell death. HQ17(3) induced autophagy characterized by aggregation of ectopically expressed EGFP-LC3. Inhibition of autophagy by Bafilomycin A1 or knockdown the essential autophagy-related protein Beclin1 by shRNA could partially attenuate HQ17(3)-induced cell death. Autophagy induced by rapamycin also reduced the cytotoxic effect of HQ17(3). HQ17(3)-induced autophagy may be implicated cell death. Further, HQ17(3) treatment gave rise to early mTOR and NF- κ B activation, indicating induction of cell stress. HQ17(3) also induce ER stress as revealed by enhancement of eIF2 α phosphorylation and up-regulation of ER chaperone Grp78. We speculate HQ17(3) may lead to ER stress and then result in autophagy and cell death.

In summary, HQ17(3) is highly cytotoxic to high risk ALL cell lines (SUP-B15 and Jurkat), and combination of HQ17(3) with the first-line anti-leukemia drugs enhance the inhibitory effect on ALL cells. HQ17(3) also induced ER stress and autophagy in SUP-B15. Whether ER stress is essential for HQ17(3)-induced autophagy and cell death in *BCR-ABL*⁺ B-ALL cells await further investigation.

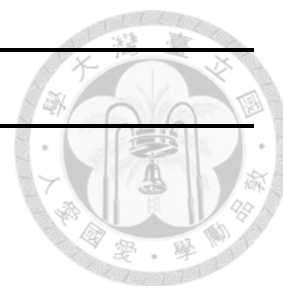
Keywords : ALL, autophagy, HQ17(3), ER stress

縮寫表

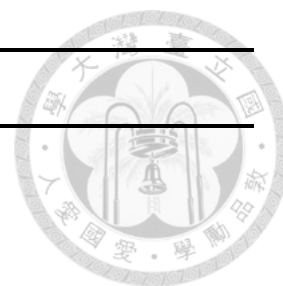


縮寫	全名
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ACP	Acid phosphatase
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
AIF	Apoptosis-inducing factor
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
Allo-HSCT	Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
APAF-1	Apoptotic protease-activating factor-1
AO	Acridine orange
APS	Ammonium persulfate
ASK1	Apoptotic-Signaling Kinase-1
ATCC	American Type Culture Collection
ATF6	Activating transcription factor 6
Atg13	Autophagy protein 13
Bip	Binding immunoglobulin protein
BQ	1,4-Benzoquinone
BSA	Bovine serum albumin
CAD	Caspase-activated DNase
CaMKK- β	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β
CB	Cathepsin B
CD	Cathepsin D
CHOP	C/EBP homologous protein
CL	Cathepsin L

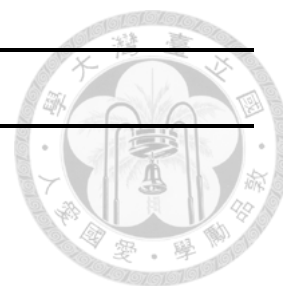
縮寫	全名
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAPK	Death associated protein kinase
DED	Death effector domain
Dex	Dexamethasone
DiOC ₆ (3)	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DISC	Death-inducing signaling complex
DTT	Dithiothreitol
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation
Ero1 α	Endoplasmic reticulum oxidoreductase-1
FADD	Fas-associated death domain protein
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
Grp78	78 kDa glucose-regulated protein
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HQ	Hydroquinone
HQ17(3)	10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone
HSPA5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5
HtrA2	High-temperature-requirement protein A2
ICAD	Inhibitors of caspase-activated DNase
IKK	I κ B kinase
IM	Imatinib mesylate



縮寫	全名
IMM	Mitochondrial inner membrane
IMS	Mitochondrial inter-membrane space
IP3R	Inositol triphosphate receptor
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
LMP	Lysosomal membrane permeabilization
MLS	Mitochondrial localization signal
MMP	Matrix metalloproteinases
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MPO	Myeloperoxidase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MPT	Mitochondrial permeability transition
MTP	Mitochondrial transmembrane potential
NAC	N-acetylcysteine
Nec-1	Necrostatin 1
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NIK	NF- κ B inducing kinase
NLS	Nuclear localization signals
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
NRF2	Nuclear factor (erythroid- derived 2)-like 2
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PAR	Poly (ADP-ribose) polymers
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PE	Phosphatidylethanolamine
PERK	Protein kinase RNA -like ER kinase



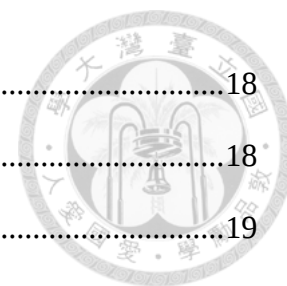
縮寫	全名
PI	Propidium iodide
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PNPP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PP1	Phosphatase 1
PS	Phosphatidylserine
RAPA	Rapamycin
RHD	Rel homology domain
RIP1	Receptor-interacting protein1
ROS	Reactive oxygen species
TAD	Transactivation domains
TNF α	Tumor necrosis factor- α
TNFR	Tumor necrosis factor- α receptor
Topo II	DNA Topoisomerase II
TRADD	TNF receptor-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAILR	TNF-related apoptosis inducing ligand receptor
UPR	Unfolded protein response
UVRAG	UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene
V-ATPase	Vacuolar H ⁺ -ATPase
XBP1	X box-binding protein 1
XIAP	X-linked inhibitors of apoptosis protein
z-VAD	z-VAD(OMe)-FMK



目錄



致謝.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
縮寫表.....	VI
第一章 緒論.....	1
一、 急性淋巴性白血病.....	1
1、 急性淋巴性白血病的症狀.....	1
2、 急性淋巴性白血病的診斷.....	2
3、 急性淋巴性白血病的治療(risk-directed combined chemotherapies).....	3
4、 急性淋巴性白血病的不良預後因子.....	4
二、 對苯二酚衍生物 HQ17(3)簡介.....	5
1、 對苯二酚誘發 caspase-dependent 及 caspase-independent 細胞死亡模式.....	5
2、 對苯二酚衍生物 HQ17(3) 相關文獻探討.....	6
三、 計畫性細胞死亡(Programmed cell death).....	7
1、 細胞凋亡(Apoptosis, type I cell death).....	7
2、 細胞壞死(Necroptosis, type III cell death).....	11
3、 Lysosomal membrane permeabilization (LMP).....	11
4、 細胞自噬(Autophagy, Type II cell death).....	12
四、 Nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling pathway.....	14
五、 Unfolded protein response (UPR)-內質網壓力(ER stress).....	15
六、 Preliminary data.....	17
第二章 研究目的與實驗設計.....	18



一、 研究目的	18
1、 研究動機	18
2、 研究目的	19
二、 實驗設計	19
第三章 材料與方法	21
一、 實驗材料	21
1、 細胞株	21
2、 試藥/劑、抗體、儀器、耗材清單	21
3、 各式溶液及其配方	27
(1) 細胞培養、繼代	27
(2) 流式細胞儀相關實驗	28
(3) 萃取細胞蛋白質	28
(4) 鈉十二烷基硫酸鹽聚丙烯胺凝膠電泳與膠體轉漬	29
(5) 西方墨點法	30
(6) 細胞存活/活性分析-Acid phosphatase assay (ACP assay)	32
(7) 免疫螢光染色	32
二、 實驗方法	32
1、 解凍細胞、細胞培養及細胞計數	32
2、 細胞存活分析	33
(1) Acid phosphatase (ACP) assay	33
(2) 細胞膜磷脂質 phosphatidylserine (PS)外翻與細胞膜完整性分析 (Annexin V/PI).....	33
(3) 細胞粒線體膜電位的測定(DiOC ₆ (3)染色)	34
3、 Autophagy 的偵測.....	34
4、 Knockdown of Beclin1	35

5、免疫螢光染色	36
6、RNA 萃取與定量反轉錄聚合酶連鎖反應(qRT-PCR).....	36
(1) RNA 萃取	36
(2) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)	37
7、西方墨點法	37
(1) 蛋白質的萃取	37
(2) 蛋白質定量與電泳樣品準備	38
(3) 鈉十二烷基硫酸鹽聚丙烯胺凝膠電泳與膠體轉漬	38
(4) 阻斷非特異性結合與免疫染色	39
8、核質分離	39
9、X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA splicing 偵測	40
第四章 結果	41
一、HQ17(3)對 ALL 細胞株的毒殺能力	41
1、HQ17(3)對 ALL 細胞株具有毒性	41
2、HQ17(3)使 T-ALL 細胞株 Jurkat 細胞出現細胞凋亡特徵	41
(1) HQ17(3)促使 Jurkat 細胞膜 PS 外翻、細胞膜受損	41
(2) HQ17(3)促使 Jurkat 細胞的粒線體膜電位喪失	42
(3) HQ17(3)對 Jurkat 細胞引起 caspase-dependent cell death.....	42
二、HQ17(3)與第一線淋巴性白血病藥物合併使用可增加對 ALL 細胞的抑 制效果	43
1、ALL 細胞株對化療藥物有抗性.....	43
(1) SUP-B15 細胞對 Imatinib 有抗性.....	43
(2) Jurkat 細胞對 Dexamethasone 有抗性	43
2、第一線淋巴性白血病藥物與 HQ17(3)合併使用可增加對 ALL 細胞的	

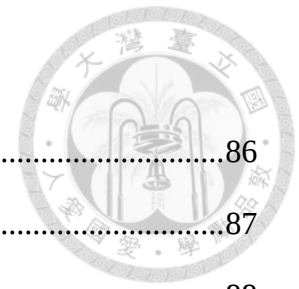
抑制效果.....	44
(1) IM 與 HQ17(3)合併處理能增強對 SUP-B15 細胞的抑制效果....	44
(2) Dex 與 HQ17(3)合併處理能增強對 Jurkat 細胞的抑制效果.....	44
三、 HQ17(3)誘使 SUP-15 細胞死亡的 effector.....	44
1、 Lysosome 中的 proteases 不是 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞中引起死亡的 effector	45
2、 HQ17(3)引起 Autophagy	45
3、 Autophagy 參與 HQ17(3)引起的細胞死亡	46
四、 HQ17(3)造成細胞壓力	47
五、 HQ17(3)造成內質網壓力(ER stress).....	48
六、 HQ17(3)造成 DNA 斷裂可能由 Apoptosis-inducing factor (AIF)造成	48
第五章 討論	50
圖與表	68
附錄.....	85

圖目錄

圖一、HQ17(3)抑制 ALL 細胞株的生長	69
圖二、HQ17(3)促使 Jurkat 細胞膜 phosphatidylserine (PS)外翻、細胞膜受損	70
圖三、HQ17(3)處理 8 小時，Jurkat 細胞開始出現顯著死亡	71
圖四、HQ17(3)處理 16 小時，Jurkat 細胞失去粒線體膜電位	72
圖五、HQ17(3)對 Jurkat 細胞引起 caspase-dependent cell death.....	73
圖六、ALL 細胞株對化療藥物有抗性	74
圖七、第一線淋巴性白血病藥物與 HQ17(3)合併使用可增加對 ALL 細胞的抑制效 果	75
圖八、Cathepsins 不是 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞中引起死亡的 effector	76
圖九、HQ17(3)對 SUP-B15 細胞引起 Autophagy.....	77
圖十、Bafilomycin A1 (Baf A1)部分減少 HQ17(3)導致的死亡	78
圖十一、Rapamycin (RAPA)部分減少 HQ17(3)導致的死亡	79
圖十二、Knockdown Beclin1 部分減少 HQ17(3)導致的死亡	80
圖十三、HQ17(3)引起細胞壓力	81
圖十四、HQ17(3)造成內質網壓力(ER stress)	82
圖十五、HQ17(3)造成 DNA 斷裂可能由 Apoptosis-inducing factor (AIF)造成	83
圖十六、HQ17(3)造成 ALL 細胞株死亡的可能機轉示意圖	84

附錄目錄

附錄一：苯(benzene)的代謝	86
附錄二：The intrinsic and extrinsic apoptotic pathways	87
附錄三：AIF 的活化.....	88
附錄四：Necroptosis	89
附錄五：細胞自噬(Autophagy).....	90
附錄六：NF-κB signaling pathway.....	91
附錄七：Unfolded protein response (UPR) pathway.....	92
附錄八：pLKO.1-puro 慢病毒載體	93
附錄九：pLKO.1-emptyT 慢病毒載體	94
附錄十：pCMVΔR8.91 慢病毒載體	95
附錄十一：pMD.G 慢病毒載體.....	96
附錄十二：細胞內 Ca^{2+} 恆定調控機制	97



第一章 緒論



一、急性淋巴性白血病

白血病(leukemia)俗稱血癌，為一種不成熟白血球異常增生的血液癌症，是由於造血幹細胞或造血前驅細胞發生病變導致異常增生的血液惡性疾病。根據癌化細胞品系的不同分成骨髓性(myeloid leukemia)及淋巴性白血病(lymphoid leukemia)；根據病程發展快慢及細胞有無分化又可區分為急性(acute)及慢性(chronic)白血病。在急性白血病的造血系統與周邊血液中會有較多不成熟的血液前驅細胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs)，而慢性的周邊血液則有分化較成熟的血液細胞。急性淋巴性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是淋巴系前驅細胞癌化而導致骨髓及周邊血液中的淋巴芽細胞(lymphoblasts)異常增生的一種癌症，根據癌細胞的品系又分為 B-ALL 和 T-ALL¹⁻³。

急性淋巴性白血病在兒童癌症發生率居首位，約占兒童癌症的 30%左右⁴，最常見於 2-5 歲孩童，在老人為另一波發生率高峰^{5,6}。根據 *CA Cancer J Clin* 在 2012 年的報導統計，美國每年約有 6000 個 ALL 新病例，男女比例約為 1.3:1⁷，有六成是兒童及青少年；而在衛生福利部國民健康署報導統計，台灣在 2013 年有 259 個 ALL 病例，男女比例約為 1.38:1⁸。五年無事件存活率(five-year event-free survival rate)在兒童約 90%，成人約 40%。^{9,10}

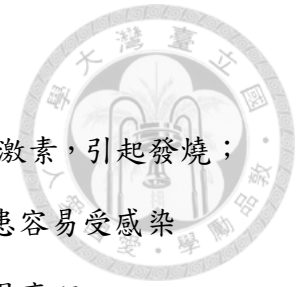
以下引述中華民國兒童癌症基金會⁵和長庚紀念醫院衛教手冊⁶資料做介紹：

1、急性淋巴性白血病的症狀^{5,6}

初期症狀可能只是食慾減退、容易疲倦，常常發燒或出血瘀斑現象，隨疾病進展患者會逐漸出現下列各種症狀：

(1) 骨髓失去功能

A. 紅血球減少：貧血、容易疲倦、臉色蒼白，因貧血可能導致膚色泛黃，少



數病患有阻塞性黃疸

B. 白血球數目增加：癌細胞迅速生長、破壞，分泌特殊細胞激素，引起發燒；

另外，因血癌細胞為不成熟的白血球不具免疫功能，病患容易受感染

C. 血小板減少：容易出血，如流鼻血、牙齦出血、皮膚出現瘀斑

(2) 血癌細胞浸潤組織

A. 骨髓內血癌細胞增生造成骨頭或關節疼痛

B. 前、後頸部、腋窩或鼠蹊部淋巴結腫大，但大多不會感覺疼痛或壓痛

C. 血癌細胞侵犯到各器官而引起器官腫大(如：肝臟、脾臟、淋巴腺、胸腺、扁桃腺、睪丸(男童較常見)等)，口腔和氣管因周圍淋巴組織腫脹而影響呼吸

D. 少數病人因血癌細胞侵入中樞神經造成腦壓增高引發頭痛、嘔吐等症狀

2、急性淋巴性白血病的診斷^{5,6}

急性淋巴性白血病的診斷必須靠抽取血液和骨髓做抹片檢查，由抹片上確定白血球的形態特徵。主要檢查包括：

(1) 患者的病史收集與身體檢查評估

(2) 血液檢查：檢查各種血球的數目及白血球形態分類是否異常

(3) 骨髓檢查：吸取少量骨髓組織出來做檢查，除在顯微鏡下做型態學分類外，搭配細胞化學染色和細胞免疫型態分析診斷B-或T-ALL。大部分急性淋巴性白血病細胞都帶有染色體轉位或染色體數目異常，因此基因檢查鑑定各種染色體轉位及基因變異對急性淋巴性白血病分類、治療計畫擬定(例如是否該做造血幹細胞移植)及預後評估非常重要。

(4) 脊髓液檢查：即腰椎穿刺，檢查不正常的白血球是否侵犯到中樞神經。其目的除了採集檢體檢查中樞神經系統是否受白血病的侵犯，也可將化療藥物注射入

中樞神經系統內預防或治療中樞神經系統白血病。



3、急性淋巴性白血病的治療(risk-directed combined chemotherapies)

根據發病時的年齡、血球數、是否有特殊染色體轉位等條件，將急性淋巴性白血病依復發風險分成三群：標準危險群(standard risk)、高危險群(high risk)、最高危險群(very high risk)，根據危險程度給予輕重不同等級的複合性化學治療。

急性淋巴性白血病的治療分為下列五個階段：^{1,3,5,6,10}

(1) 引導緩解期(Remission-induction therapy)

為期4-6週的引導緩解期，此時期主要目的是藉由藥物殺死99%以上的白血病細胞，使骨髓恢復正常造血功能，讓血球數目回歸正常，此時白血病細胞應小於5%，此階段化療藥物常使用glucocorticoid (prednisone或dexamethasone), vincristine, asparaginase等藥物。如白血病細胞帶有特殊基因變異(如：*BCR-ABL*)可合併使用標靶藥物治療(如：*imatinib*, *dasatinib*)。

(2) 鞏固療法(Consolidation therapy)

引導緩解期結束，此階段更換藥物組合，把殘留的癌細胞消滅，使剩下白血病細胞數目達到小於萬分之一的理想程度，降低疾病再度復發風險；常使用高劑量(i.e., 1–8 g/m²) methotrexate, 6-mercaptopurine, vincristine, glucocorticoids, asparaginase等化療藥物，視不同治療方案而定。

(3) 再次引導緩解(Re-induction therapy)

再次給予類似引導緩解期的藥物(如：*vincristine*, *asparaginase*)，在治療初期就儘量消滅白血病細胞至最少量，以提高治療效果。

(4) 中樞神經系統的預防

在引導緩解及鞏固治療的同時，同時進行中樞神經系統的預防，由於一般的化療藥物無法進入中樞神經系統，所以需將抗癌藥物注入到脊髓鞘內(腰椎注射)，使抗癌藥物能循著脊髓液循環保護腦膜，或消滅藏在中樞神經系統內的癌細胞。

(5) 維持療法(Continuation therapy)

整個療程至少兩年，一般療法為每天給予6-mercaptopurine和每週給予methotrexate，在高危險群(high risk)或最高危險群(very high risk)的病人可能會搭配Dexamethasone和Vincristine。

由於疾病本身及化療藥物的影響，病人常會出現貧血、出血或細菌、黴菌或病毒感染等症狀，臨床上會針對這些症狀進行支持性療法，如：輸注紅血球治療貧血、輸注血小板治療出血、抗生素、止痛藥等。

依照疾病危險程度和治療後的反應可能會搭配異體造血幹細胞的移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)和放射線治療；最高危險群(very high risk)的病人(*BCR-ABL*⁺ ALL或初期化療反應不佳)在得到緩解時，若有組織抗原相合的兄弟姐妹，最好能做異體造血幹細胞的移植，降低復發率。

4、急性淋巴性白血病的不良預後因子^{1,10}

- (1) 發病年齡：成人、嬰兒(<1 歲)、小孩(≥ 10 歲)
- (2) 發病時白血球數目 $\geq 50 \times 10^9/L$
- (3) 種族(西班牙裔或黑人)：例如在西班牙裔背景的兒童急性淋巴性白血病上較常發現 somatic *CRLF2* rearrangement¹¹
- (4) 性別：男性
- (5) T-ALL
- (6) Cytogenetic 變化：帶有 *MLL* gene rearrangement 或費城染色體(*BCR-ABL*)



雖然兒童 ALL 和成人 ALL 中的基因異常的種類發生率不太一樣，但造成 ALL 的原因大致為 proto-oncogene 的不正常表現、染色體轉位(chromosomal translocation)、多倍體(hyperdiploidy)¹²，這些基因異常導致造血幹細胞(hematopoietic stem cell)或前驅細胞(progenitors)活性改變，包括自我更新(self-renewal)、停止分化、增生能力上升、anti-apoptotic 的能力，進而導致細胞癌化。其中跟染色體轉位(chromosomal translocation)的例子就是 *MLL* gene rearrangement 或費城染色體(t(9;22), *BCR-ABL*)，與 *MLL* gene rearrangement 相關的急性白血病皆有極不良預後，而在兒童的 ALL 中費城染色體(t(9;22), *BCR-ABL*)發生率約 3%，但在成人的發生率卻有 25%，50 歲以上的病人的發生率甚至超過 50%，且這兩種 cytogenetic 變化與不良預後相關性高。¹

二、對苯二酚衍生物 HQ17(3)簡介

1、對苯二酚誘發 caspase-dependent 及 caspase-independent 細胞死亡模式

對苯二酚(hydroquinone, HQ)是苯(benzene)的代謝物，當苯進到人體後會透過肝臟中的細胞色素p450 2E1(cytochrome p450 2E1)代謝成benzene oxide，接著透過nonenzymatic rearrangement轉變成酚(phenol)，酚接著被cytochrome p450 2E1代謝成HQ並隨著血流進到骨髓，骨髓中的myeloperoxidase (MPO)會將HQ轉變成1,4-benzoquinone (BQ)。在細胞實驗中，利用BQ處理哺乳類細胞會造成細胞凋亡、DNA斷裂、染色體異常。另外，BQ也可以透過NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)還原成HQ，而在這還原的過程中會造成reactive oxygen species (ROS)的產生。¹³⁻¹⁵(附錄一)

利用HQ處理富含myeloperoxidase (MPO)的HL-60細胞和缺少MPO的Jukat細胞皆造成phosphatidyl serine (PS)外翻、粒線體失去膜電位(mitochondrial transmembrane potential, MTP, loss)、cytochrome c的釋放、caspases-3/8/9的活化，



最後導致細胞死亡；預先處理pan-caspase inhibitor (z-VAD)能抑制在這兩株細胞中 caspase-3/8/9的活化，而細胞死亡、PS外翻、粒線體失去膜電位在Jurkat細胞可被抑制，但在HL-60則否，顯示HQ會導致兩種不同細胞死亡方式：caspase-dependent 和 caspase-independent；另一方面，如預先處理抗氧化劑N-acetylcysteine (NAC)則可減少MTP loss的發生，顯示因HQ代謝而產生的ROS對細胞有一定的傷害¹⁶。另外，在試管內實驗中發現HQ會抑制Topo II的活性，造成DNA斷裂；利用HQ處理人類CEM Leukemia Cells造成Topo II與DNA結合的量增加，說明HQ造成DNA斷裂是因為抑制Topo II活性導致。除此之外，HQ也具有和硫醇基(sulfhydryl)結合的能力，如果與含硫醇基的試劑(DTT、glutathione)結合後，再與Topo II和DNA作用，發現HQ會喪失抑制Topo II活性的能力。¹³

2、對苯二酚衍生物 HQ17(3) 相關文獻探討

10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone，簡稱為 HQ17(3)，是由台灣漆樹(*Rhus succedanea*)的漆液中萃取出來的小分子化合物，其結構為對苯二酚的第二個碳上接有一段 17 個碳的不飽和碳氫鏈，在第 10、13、15 個碳上有雙鍵¹⁷。先前研究指出，對多種癌細胞株都有顯著的毒殺效果，像是人類子宮頸癌細胞(HeLa)、人類肝癌細胞(Huh7, Hep3B, HepG2)、人類大腸癌細胞(HCT116, LoVo)、大鼠神經膠質瘤細胞(rat C6 glioma cells)和人類血液腫瘤細胞(HL-60)等，其 72 小時的 IC₅₀ 介於 0.9~60 μM，而高濃度的 HQ17(3) (50μM)對周邊血單核性細胞(PBMCs)則無毒殺能力，且利用腹腔注射方式持續給予 1mg/kg 的 HQ17(3)對 F334 大鼠沒有明顯致死毒性。文獻指出，HL-60 和 HL-60/MX2(缺乏 Topo II 的 HL-60 細胞)對 HQ17(3)的感受性有很大差異，其 EC₅₀ 分別為 0.9 和 9.6μM，顯示 HQ17(3)會選擇性毒殺具有 Topo II 的細胞¹⁸。在試管實驗中，HQ17(3)會與 recombinant Topo IIα的半胱胺酸(Cys-427, Cys-733, Cys-977)形成共價鍵，且在 Huh7 細胞當中發現 HQ17(3)會與 Topo IIα的半胱胺酸-427 (Cys-427)形成共價鍵，Cys-427 為 Topo



II α 的 ATPase domain，與 HQ17(3)形成共價鍵會影響其酵素活性，進而導致 Topo II α -DNA 複合體增加和 DNA 斷裂進而引起細胞死亡。在 Huh7 和 HL-60 細胞中發現 HQ17(3)會造成 DNA 受損指標 γ -H2A.X 磷酸化的上升，並啟動 DNA 受損相關基因的表現(如 *DDIT3*, *GADD45A*, *GADD45G*)。另外，HQ17(3)也能導致 reactive oxygen species (ROS)增加進而導致細胞死亡，先前研究指出在 HL-60, RS4;11, SUP-B15 細胞處理 HQ17(3)後可造成細胞的死亡，如果預先處理或同時處理抗氧化劑(如 NAC, GSH, Vitamin C)能部分減少 HQ17(3)導致的死亡、DNA 的斷裂、細胞膜破損及粒線體膜電位的喪失。在 Huh7 細胞中，如果預先處理抗氧化劑 NAC 雖能部分減少 HQ17(3)導致的 DNA 的斷裂、細胞膜破損及粒線體膜電位的喪失，但無法顯著減少細胞的死亡，顯示 Topo II 被抑制是 HQ17(3)造成 Huh7 細胞死亡的主要原因。¹⁷⁻²¹

三、計畫性細胞死亡(Programmed cell death)

“Programmed cell death”一詞的出現要追溯到 1960 年代中期，當時只是對細胞死亡外觀型態上做描述，直到 1973 年，Schweichel 和 Merker 將細胞死亡的形式做分類，包括 Type I、II、III cell death，分別代表 apoptosis, autophagic cell death 和 necrosis²²。以下就幾種主要的細胞死亡方式做介紹：

1、細胞凋亡(Apoptosis, type I cell death)

細胞凋亡發生時，從細胞形態上可以觀察到細胞萎縮變小成圓型、染色質濃縮(condensation of chromatin)、細胞核碎裂(karyorrhexis)、細胞膜泡狀突出(plasma membrane blebbing)並形成凋亡小體(apoptotic bodies)；而從生化方面可以看到胱氨酸蛋白酶(caspase)類的 proteases 的活化、DNA 斷裂成約 200bp 倍數大小的片段、細胞膜上的 phosphatidylserine (PS)從內膜外翻到外膜等特徵。

細胞凋亡分為 caspase-dependent 和 caspase-independent cell death，caspase 是一種 cysteine aspartate-specific protease，一般情況下以不活化的狀態(zymogens)廣



泛存於細胞中，caspase 可分為扮演細胞凋亡起始角色的 initiators caspase (caspase-2/8/9/10)和最後執行細胞凋亡的 effectors caspase (caspase-3/6/7)，caspase 可藉由自己活化(autoactivate)或是透過其他 caspase 的切割而活化，藉由 caspase 活化其他 caspase 的方式來放大細胞凋亡的訊號進而導致細胞死亡。effectors caspase 會切割 inhibitors of caspase-activated DNase (ICAD)導致 caspase-activated DNase (CAD)從 ICAD 釋出，CAD 具有 endonuclease 的活性，進到細胞核後會將 nucleosomes 間的 DNA 切斷形成約 200bp 倍數大小的片段，在瓊脂(agarose)電泳中呈現”ladder”的特徵。²³

Effectors caspase也會進入細胞核切割Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)，使得DNA無法修復造成細胞死亡。PARP是一個核蛋白，在DNA damage時活化，藉由在DNA受損處添加poly (ADP-ribose) polymers (PAR)來徵召DNA修復相關的蛋白到受損處，但此過程會消耗大量ATP、 NAD^+ ，因此若DNA受損太嚴重，PARP 將被proteases (包括caspases、calpains、cathepsins、granzymes以及matrix metalloproteinases (MMPs))切割，避免過度損耗能量，導致細胞壞死，不同的 proteases會切出不同型態的PARP，在細胞凋亡時PARP主要藉由caspase-3/7切成89、24kD的型態，可作為細胞凋亡的marker。²⁴

Caspase-dependent cell death 可再分成外源性(extrinsic pathway)和內源性(intrinsic pathway)兩條路徑：^{22,23,25,26}(附錄二)

(1) 外源性路徑：

透過細胞膜上的death receptors (包括Fas/CD95, Tumor necrosis factor- α receptor (TNFR), TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (TRAILR1-2))與其 ligands結合(包括Fas/CD95 ligand (FasL/CD95L), $\text{TNF}\alpha$, TRAIL)後徵召 adapter protein-Fas- associated death domain protein (FADD)，此時FADD和procaspase-8透過彼此的death effector domain (DED)結合形成death-inducing signaling complex

(DISC)進而活化caspase-8或-10，活化的caspase-8或-10再活化effectors caspase，最後導致細胞凋亡。caspase-8也可透過切割BH3-interacting domain death agonist (Bid)為tBid，導致粒線體膜受到傷害，透過mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)誘導內源性路徑的細胞凋亡。

(2) 內源性路徑：

當細胞遭受內在壓力下(例如DNA damage, radiation, toxins, hypoxia, viral infections, oxidative stress, cytosolic Ca^{2+} overload, endoplasmic reticulum (ER) stress)會造成粒線體發生mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)，導致粒線體intermembrane space中的物質釋出到細胞質，其中cytochrome c會跟apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1)和procaspase-9結合形成apoptosome進而活化caspase-9，活化的caspase-9再活化effectors caspase，最後導致細胞凋亡。

另外有些特殊細胞(如cytotoxic T lymphocytes (CTL))所含的特殊酵素granzyme B也可以誘導caspases-3/10的活化，且也可以透過切割Bid誘導內源性路徑的細胞凋亡。²³

當發生MOMP後，從intermembrane space中釋出的介質會導致caspase-independent cell death：^{22,23,25,26}

(1) Smac/DIABLO和high-temperature-requirement protein A2 (HtrA2)/Omi藉由干擾X-linked inhibitors of apoptosis proteins (XIAPs，細胞內生性的caspase-3/7/9抑制分子)與caspase-3/7/9的interaction，進而活化caspase-3/7使細胞凋亡的發生；而HtrA2/Omi也是serine protease，可以直接透過其protease的活性導致caspase-independent cell death²⁷。

(2) Endonuclease G是一個核基因編碼的粒線體蛋白(Nuclear-encoded

mitochondrial protein)，參與粒線體DNA的複製與修復，當發生MOMP時，endonuclease G會自粒線體釋出進到細胞核中降解DNA，造成oligonucleosomal DNA fragments^{28,29}。

(3) 由apoptosis-inducing factor (AIF)引起的caspase-independent cell death：^{22,23,30}

AIF 是一個 C-terminal 朝向 mitochondrial intermembrane space (IMS) 且 N-terminal 鑲嵌在 mitochondrial inner membrane (IMM) 上的 flavoprotein，具有 NADH oxidase activity，調節粒線體電子傳遞鏈 complex I 的結構和功能(oxidative phosphorylation)。當接受特定刺激後導致 MOMP 發生，AIF 會被 proteases 切割成 57 kDa AIF fragment 並從 IMS 跑到細胞質，因 AIF 上具有 nuclear localization signals (NLS)，所以會再從細胞質跑到細胞核，進而造成 large-scale DNA fragmentation (~50-300 kb) 和染色質的濃縮，進而導致細胞死亡。

Calpains 和 cathepsins 負責粒線體 IMS 中 AIF 的切割(切位在 Gly102/Leu103)³¹，calpains 是 calcium-dependent、non-lysosomal cysteine proteases，細胞內有兩種 isoforms - calpain-I (μ -calpain) 和 calpain-II (m-calpain)，而 calpain-I 具有 mitochondrial localization signal (MLS)，與 AIF 共同存在於粒線體的 IMS 且為負責 AIF processing 的酵素³²。Ca²⁺ 是細胞內調節生理功能的 messenger，例如神經傳導物質的釋出和肌肉的收縮，但當細胞內 Ca²⁺ 濃度過度增加時會影響細胞的生理狀態，例如使用 staurosporine 或 PKC412 處理 NSCLC cell lines，導致細胞內 Ca²⁺ 濃度提升進而活化 calpain，然後導致 AIF 從粒線體釋出³³，而 Ca²⁺ 濃度提升不僅僅只是活化 calpain，也會促進粒線體 ROS 的產生且導致 AIF 被 oxidative modification，且有研究指出，跟 non-modified AIF 相比，calpain-I 能更有效的切割 oxidative modification 的 AIF³⁴(附錄三)。另外，cathepsins 是 lysosomal peptidases，cathepsin-mediated AIF release 需要透過 lysosomal membrane permeabilization (LMP)(見後面介紹)導致 cathepsins 從 lysosome 流出且進到粒線體切割 AIF，在試管實驗中，cathepsin B, L, S 能切割 AIF³¹，目前在細胞實驗中對於 cathepsin-mediated

AIF release的證據還很少。



2、細胞壞死(Necroptosis, type III cell death)^{22,26}

apoptosis和necrosis在細胞的外觀上有很大的不同，apoptosis是造成細胞皺縮，並出現apoptotic body，necrosis則造成細胞脹大破裂而死。文獻指出U937細胞同時處理TNF α 與z-VAD會引起necrosis，而Necrostatin 1 (Nec-1)可專一性的抑制receptor- interacting protein1 (RIP1)的活性，進而抑制necroptotic death的發生，這種需要RIP1活性的細胞死亡方式被命名為necroptosis³⁵。

目前已知由RIP1主導的necroptosis有以下兩種形式：

- (1) 藉由death ligand與其death receptor結合後(如Fas, TNF α , TRAILR1)，會與TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (TRADD), FADD, RIP1, RIP3 和caspase-8形成complex，若caspase-8處於活化狀態，caspase-8會分解RIP1和RIP3導致細胞走向caspase-dependent cell death，若caspase-8活性經由藥物抑制或是透過基因層面的抑制，RIP1和RIP3就可表現其活性讓細胞走向necrosis³⁶，例如TNF α 或是抑制caspase的藥物(如z-VAD)可導致L929 mouse fibrosarcoma cells發生necrosis³⁷。
- (2) 非透過death receptor，而是透過某些刺激造成genotoxic stress(如化療藥物：etoposide)，亦可促使細胞內形成類似上述的complex(不含death receptor)，稱之為riposome，這之間除了caspase-8之外，還有IAP或是FLICE-like inhibitory protein (FLIP)的參與，細胞走向apoptosis或是necrosis就要看細胞的種類及所處環境的狀況³⁸，但上述兩者都依賴RIP1的活性。(附錄四)

3、Lysosomal membrane permeabilization (LMP)

Lysosome是一個由cytoplasmic membrane-enclosed的胞器，含有許多水解酵素

(hydrolytic enzymes)並負責細胞內部分大分子的turnover；lysosome內的水解酵素
有蛋白質水解酵素(proteases，如cathepsin proteases)、脂肪酵素(lipases)、核酸酶
(nucleases)、醣苷水解酵素(glycosidases)、磷脂水解酵素(phospholipases)、磷酸酶
(phosphatases)以及硫酸酯酶(sulfatases)等酵素，通常這些酵素需要在低的pH值環
境下($\text{pH} \leq 5$)才能發揮最大的活性。³⁹

LMP指的是lysosome的膜受到傷害造成膜的破裂，進而導致lysosome內的物
質流出的現象。很多刺激都可導致LMP，其中最重要也研究最透徹的是ROS，又
因lysosome是細胞內以autophagy進行含鐵蛋白(包括mitochondrial cytochromes以
及ferritin)回收及循環的胞器，所以含有大量的鐵離子，而hydrogen peroxide (H_2O_2)
可自由地穿過lysosome的膜，如果碰到lysosome內游離的亞鐵離子(Fe^{2+})便會透過
Fenton reaction催化轉變為更具活性的hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$)，使得lysosome的膜
上脂質被氧化而不穩定導致LMP發生，而前述lysosome內的這些物質便會流出並
任意破壞細胞內容物而導致細胞死亡。Lysosome內的酵素中與細胞死亡最相關的
是cathepsin B (CB)和cathepsin D (CD)，少部分報導與cathepsin L (CL)有關，這些
酵素在中性pH值時仍然具有活性，其中CB可直接進到細胞核破壞核酸導致細胞
死亡，而CB和CD可透過切割Bid引發MOMP導致細胞死亡，至於是產生apoptosis
或necrosis則視刺激以及細胞種類而定。先前研究指出抗氧化劑(NAC、Vitamin C、
Vitamin E)或鐵的螯合劑(desferrioxamine mesylate, DFO)等可抑制LMP並且抑制後
續的情形發生，最後抑制細胞死亡。^{39,40}

4、細胞自噬(Autophagy, Type II cell death)

Autophagy 又稱 macroautophagy，是一種當細胞遭受到壓力時(如：飢餓
(starvation)、低氧(hypoxia)、DNA damage、內質網壓力)時的保護機制，幫助細胞
度過難關³⁸。細胞內部本身就有一些 basal level 的 autophagy，並透過 lysosome
的參與將細胞內受損的胞器或不要的蛋白清除掉並回收再利用，與細胞存活

(survival)、分化(differentiation)、發育(development)以及恆定(homeostasis)有關⁴¹。

當細胞處於適合生長的环境下(如：有許多營養物質或是growth factor)，mammalian target of rapamycin (mTOR)被活化並磷酸化autophagy protein 13 (Atg13)，使得Atg13無法和含有Atg1以及Atg17的complex結合，而減弱Atg1酵素活性，但是當細胞在缺乏養份的環境壓力下，mTOR活性被抑制，Atg13就可以與Atg1結合使Atg1表現活性導致囊泡核化(vesicle nucleation)，vesicle nucleation還需透過class III PI3K (Vps34)的活化和Beclin1、UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene (UVRAG)、myristylated kinase (Vps15)等蛋白的參與使形成isolation membrane (又稱為phagophore)，接著透過兩個ubiquitin-like conjugation systems來幫助囊泡延展(vesicle elongation)：(1)透過E1-like enzyme Atg7以及E2-like enzyme Atg10幫助Atg5和Atg12結合；(2) protease Atg4將LC3-I (soluble form LC3)切割形成LC3-II (autophagic vesicle-associated form LC3)，然後透過Atg7以及E2-like enzyme Atg3的幫助讓phosphatidylethanolamine (PE)與LC3-II結合，之後Atg5/Atg12 complex與LC3-II/PE complex再結合將要分解的胞器或物質包起來形成autophagosome (LC3-II會鑲嵌在autophagosome膜上)，最後autophagosome與lysosome融合形成自噬溶酶體(autolysosome)，接著lysosome內的酸性酵素將autolysosome中的物質和inner membrane降解，進而完成autophagy^{41,42}。(附錄五)

過度的autophagy反而會導致細胞死亡，像是autophagy可清除受損的粒線體，若過度清除粒線體反而會造成細胞死亡。在許多腫瘤細胞中都有較高活性的autophagy，如果抑制autophagy，依照tissue type、tumor grade和所搭配使用的治療等不同，可能會導致癌細胞死亡或反而讓癌細胞存活³⁸，而細胞受壓力時，autophagy常伴隨細胞死亡發生，但autophagy在其中扮演促進死亡或避免死亡的保護機制則視情況而異。依照2012年Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)對autophagic cell death的定義如下：細胞的死亡能被autophagy抑制劑(如：3-Methyladenine、Chloroquine)或基因層面方法(gene knockout/mutation或RNAi方

式抑制調控autophagy基因的表現，例如Atg5、Beclin1)抑制，這種死亡的方式稱為autophagic cell death；由於有些Atg蛋白具有autophagy-independent的功能(如：Atg5、Atg6、Beclin1)，可藉由proteases (caspase或calpain)的切割使其而轉變成使細胞死亡的蛋白(pro-death protein)，所以建議是knockdown至少兩種調控autophagy的蛋白來確認是否屬於autophagic cell death²²。研究指出autophagic cell death會透過兩種方式導致細胞死亡(1)直接因為autophagy而死：過度autophagy清除細胞內過多的胞器或蛋白等，導致細胞無法維持正常功能而死亡；另外，細胞也會因為內部被autophagy產生的vesicles(如：autophagosome)佔滿，結構受損死亡；(2)先發生autophagy後，然後引起apoptosis或necrosis而死亡，細胞會透過哪一種方式死亡無法預測⁴²。

四、 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway^{43,44}

NF- κ B為細胞內一群的transcription factors，跟發炎與免疫反應、細胞增生、分化和存活有關。又分為兩個subfamilies (“NF- κ B” proteins和”Rel” proteins)，都具有高度保守的DNA-binding/dimerization domain - Rel homology domain (RHD)，其中”NF- κ B” proteins (包括NF- κ B1 (p105)和NF- κ B2 (p100))具有較長的C-terminal domains，包含multiple copies of ankyrin repeats，”NF- κ B” proteins要活化需透過轉譯後修飾切成較小的蛋白(p105→p50；p100→p52)，且須與Rel subfamily (c-Rel, RelB, RelA (p65))形成二具體(dimers)，且Rel subfamily具有C-terminal transactivation domains (TAD)進而活化下游基因的轉錄。

常見的NF- κ B的活化分為有兩條路徑，canonical和non-canonical pathway；共同的上游分子為I κ B kinase (IKK) complex，由IKK α , IKK β 和NEMO (IKK γ)組成，在canonical pathway中，當接收到活化訊號時IKK β 會被磷酸化，然後IKK β 再磷酸化NF- κ B的inhibitor-I κ B，繼而引起I κ B被polyubiquitination接著被proteasome分解，這時p65/p50會轉移到細胞核，進而活化下游基因的轉錄；而在non-canonical

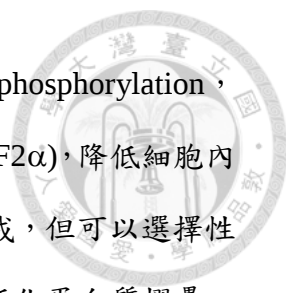
pathway中，接收到活化訊號時NF- κ B inducing kinase (NIK)會去磷酸化IKK α ，然後IKK α 再磷酸化p100，造成p100被切成p52並與RelB形成二具體(dimer)一起轉移到細胞核，進而活化下游基因的轉錄(附錄六)。有研究報導指出NF- κ B的活化是暫時性且具週期性，像是在mouse fibroblasts持續給予tumor necrosis factor (TNF)，核內NF- κ B與DNA結合的活性不會一直存在，約每30-60分鐘為一週期，是由於IkB的分解與再合成而影響NF- κ B的活化與不活化。⁴⁵

五、 Unfolded protein response (UPR)-內質網壓力(ER stress)

細胞的存活仰賴於蛋白質正確的生成、控制、摺疊，而內質網(endoplasmic reticulum, ER)為細胞內確保蛋白質正確的生成和摺疊的胞器，為了維持細胞內蛋白質的恆定和對抗在內質網累積的壓力(ER stress)，細胞有一套自我保護的機制來恢復內質網的正常功能，此機制為 unfolded protein response (UPR)。

內質網一個很重要的功能就是確保蛋白質正確的生成，當過度的蛋白質生成或累積過多未摺疊或錯誤折疊的蛋白在內質網內會導致“內質網壓力(ER stress)”，另外內質網 Ca^{2+} 的流出、glucose starvation (減少蛋白的糖基化)或 hypoxia (減少雙硫鍵的形成)也會導致內質網壓力，此時細胞會透過 UPR 回復內質網的恆定(homeostasis)，如果內質網壓力一直持續且無法排除則會讓細胞走向死亡^{46,47}。

UPR 下游至少有三條分支路徑，受三種穿膜蛋白(UPR sensor)所調控-inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)、protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK)和 activating transcription factor 6 (ATF6)，在一般狀況下，這三種蛋白會與 ER 內的 chaperone - Heat shock 70 kDa protein 5/78 kDa glucose-regulated protein/ Binding immunoglobulin protein (HSPA5/Grp78/Bip)結合，使其維持在不活化狀態；當發生內質網壓力時，Grp78 會與 UPR sensor 分開並與未折疊蛋白或錯誤折疊的蛋白結合，進而導致 UPR sensor 的活化。以下針對三條 UPR pathway 做介紹^{46,48,49}：(附錄七)



當發生內質網壓力時，PERK 會 oligomerization 並 auto-transphosphorylation，進而磷酸化 α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α)，降低細胞內整體 mRNA 的轉譯作用(translation)，減少內質網內蛋白質的生成，但可以選擇性表現 activating transcription factor 4 (ATF4)，ATF4 會進到細胞核活化蛋白質摺疊、抗氧化反應、細胞自噬(autophagy)、胺基酸代謝或細胞死亡(如：C/EBP homologous protein (CHOP))相關基因；ATF4 也可以透過活化調控 growth arrest 和誘導 DNA damage 的蛋白-GADD34 的表現來調控 PERK，GADD34 藉由抑制 phosphatase 1 (PP1)讓 PP1 無法將 p-eIF2 α 去磷酸化，進而降低細胞內整體蛋白生成。PERK 也會磷酸化 nuclear factor (erythroid- derived 2)-like 2 (NRF2)來調控抗氧化反應。

IRE-1 α 具有 endoribonuclease (RNase)和 kinase domain，當生 ER stress 時，IRE-1 α 會 oligomerization 並 autophosphorylation，透過其 RNase 的活性對 X box-binding protein 1 (XBP1) mRNA 進行 unconventional splicing，移除 intron 1 的 26 個 nucleotide，導致 frameshift 產生，進而轉譯出具有轉錄活性功能的 XBP1s⁵⁰，XBP1s 可活化 ER chaperones, ER-associated degradation (ERAD)和 phospholipid 的合成。IRE-1 α 也可透過其 kinase domain 活化 apoptotic-signaling kinase-1 (ASK1)，進而活化下游的 c-jun N-terminal kinase (JNK)和 p38 讓細胞走向細胞凋亡 (apoptosis)。

當發生內質網壓力時，ATF6 會從內質網轉移至高基氏體(Golgi apparatus)的膜上，並被 site 1 (membrane-bound transcription factor peptidase site 1, MBTPS1)和 site 2 (MBTPS2)兩個 proteases 經由 intramembrane proteolysis 切割成具有活性的轉錄因子(transcription factor)，進而活化 ER chaperones (如：Grp78)和 ERAD components 的表現。

由上述可知 UPR 除了可以解除內質網壓力讓細胞存活外，也可能會導致細胞的死亡，例如(1) IRE-1 α 活化 ASK1/JNK；(2) PERK/eIF2 α 活化 pro-apoptotic

transcriptional factor CHOP;另外也有研究指出 CHOP 能活化 endoplasmic reticulum oxidoreductase-1 (Ero1 α)的表現，Ero1 α 能過度氧化內質網造成細胞死亡，Ero1 α 也被報導能活化內質網上的鈣離子通道 inositol triphosphate receptor (IP3R)，造成過量的 Ca²⁺從內質網進到細胞質和粒線體，並造成 mitochondrial permeability transition (MPT)最後導致細胞死亡^{51,52}。

內質網壓力能導致兩種蛋白質降解的路徑：(1) 透過 ER-associated degradation (ERAD)將內質網內的未摺疊蛋白送至細胞質，並將其蛋白 ubiquitinate 後送至 proteasom 降解；(2) 透過 autophagy 清除未摺疊或錯誤摺疊的蛋白⁵³。目前有很多內質網壓力引起 autophagy 的機制被報導⁴⁹，例如：(1) Ca²⁺ mobilizing agents (如：ionomycin, ATP, thapsigargin)能抑制 mTOR 進而誘導大量 autophagosomes 累積(Beclin1-和 Atg7-dependent)⁴⁷；(2) 從內質網釋出的 Ca²⁺活化 calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKK- β)，CaMKK- β 再活化 AMPK 導致 mTOR 被抑制，進而造成 autophagy 發生⁵⁴；(3) IRE-1/TRAF2 活化 JNK 進而造成 autophagy⁵⁵，也有研究指出 JNK 能磷酸化 Bcl-2 使其與 Beclin1 分離讓 Beclin1 活化 autophagy⁵⁶；(4) 從內質網釋出的 Ca²⁺活化 protein kinase C (PKC)進而造成 mTOR-independent autophagy⁵⁷；(5) PERK/eIF2 α 能誘導 Atg12 的表現⁵⁸；(6) XBP1 能活化 Beclin1 的表現進而促使 autophagy⁵⁹。

六、 Preliminary data^{20,21}

在本實驗室先前研究中發現 HQ17(3)處理 SUP-B15 (BCR-ABL⁺)和 RS4;11 (MLL gene rearrangement)兩株急性淋巴性白血病細胞株皆造成 caspase-independent cell death，且會導致 ROS 的產生，如果利用抗氧化劑(GSH 或 Vitamin C)可以部分降低 ROS 的增加、粒線體膜電位喪失並挽救細胞死亡，並且在 SUP-B15 細胞中發現 HQ17(3)造成酸性胞器的消長且能與細胞死亡有關。

第二章 研究目的與實驗設計



一、研究目的

1、研究動機

常見於兒童的急性淋巴白血病患者目前化療藥物的療法雖然能達到約 90% 的五年無事件存活率(five-year event-free survival rate)^{9,10}，但 *BCR-ABL*⁺ ALL 其預後較差，即使最高劑量的化療配合 ABL 標靶治療(imatinib)病患的長期存活率仍差，T-ALL 更有高比例對第一線用藥 glucocorticoid 具有抗性。老年病人罹患 ALL 有高比例為 *BCR-ABL*⁺ ALL，除了不耐高劑量化療造成的副作用，更難以承受異體造血幹細胞的移植相關的嚴苛考驗¹，因此有必要發展出更有效的治療方式或藥物。先前研究指出 HQ17(3)對於癌細胞有選擇性毒性，且跟實體腫瘤的效果相比，HQ17(3)對 ALL 的抑制效果較佳²¹，另外對 PBMCs 則無毒性¹⁸。目前已知 HQ17(3)的兩種毒殺機制是抑制 DNA Topo II 的活性或造成 ROS 的產生，進而導致細胞死亡¹⁷⁻¹⁹。

在本實驗室先前研究發現 HQ17(3)處理 SUP-B15 (*BCR-ABL*⁺)和 RS4;11 (*MLL* gene rearrangement)細胞都是造成 caspase-independent cell death^{20,21}，為了瞭解 HQ17(3)是否在 ALL 都是造成這樣的死亡方式，本論文將探討 HQ17(3)對另一個與不良預後相關之 T-ALL 細胞(Jurkat)的毒殺抑制效果和死亡方式。

由於一些 ALL 其預後較差(例如：*BCR-ABL*⁺或 T-ALL)，這些 ALL 對第一線淋巴性白血病藥物感受性較低，本論文將進一步利用細胞實驗評估 HQ17(3)是否有潛力能作為臨床上第一線淋巴性白血病藥物的增敏劑，降低其使用劑量達到更好的效果，降低副作用，提高存活率。

在本實驗室先前研究發現 HQ17(3)處理 SUP-B15 細胞時除了會造成細胞死亡外，也會引起酸性胞器的增多，且酸性胞器的增加會隨時間而減少，消退的時間與細胞發生顯著死亡的時間接近，推測酸性胞器之消長與細胞死亡有關²⁰。因此

本論文進一步探討 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞中引起的酸性胞器的特性、誘發原因及與細胞死亡之間的關係。



2、研究目的

- (1) 以 Jurkat 細胞作為急性淋巴性白血病之研究模型，檢測 HQ17(3)對 Jurkat 細胞的抑制毒殺效果和死亡方式
- (2) 探討 HQ17(3)是否有潛力作為治療 ALL 中輔佐現行第一線淋巴性白血病藥物的增敏劑
- (3) 探討 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞中引起的酸性胞器的特性、誘發原因及與細胞死亡之間的關係

二、實驗設計

- 1、以細胞活性試驗(ACP assay)定出 HQ17(3)對 Jurkat 細胞在 24 小時的 IC_{50} ，接著再以 Annexin V/PI 和 DiOC₆(3)染色觀察 HQ17(3)處理 24 小時過後細胞的死亡和粒線體膜電位的變化；以 pan-caspase inhibitor (z-VAD)處理後，利用 Annexin V/PI 染色和西方墨點法觀察細胞死亡和 caspase 活化的情形，以得知 HQ17(3)在 Jurkat 細胞造成的死亡模式是屬於 caspase-dependent 或 caspase-independent。
- 2、以不良預後相關性高的兩株 ALL 細胞株 SUP-B15 ($BCR-ABL^+$, IM^r)和 Jurkat (T-ALL, Dex^r)為模型，以 ACP assay 定出 HQ17(3)對這兩株細胞在 72 小時的 IC_{50} ，接著將不同濃度的 Imatinib (IM)或 Dexamethasone (Dex)與 IC_{50} 上下不同濃度的 HQ17(3)搭配後分別處理 SUP-B15 或 Jurkat 細胞，並利用 ACP assay 檢測細胞活性的變化，以評估 HQ17(3)是否有潛力作為第一線淋巴性白血病藥物的增敏劑。
- 3、根據先前研究酸性胞器的消退可能跟 lysosomal membrane permeabilization

(LMP)有關進而導致細胞死亡。以 lysosome 中不同種類的 proteases 的抑制劑處理細胞，利用 ACP assay 觀察 HQ17(3)對 SUP-B15 細胞的毒殺作用是否有受影響。Lysosome 內 proteases 的抑制劑如下：

Pepstatin A：cathepsin D (Asp protease) inhibitor

CA-074-Me：cathepsin B/L (Cys protease) inhibitor

AEBSF：Ser protease inhibitor

4、HQ17(3)所造成的酸性胞器也有可能是經由 autophagy 所產生的 autolysosome，首先利用 pEGFP-LC3 質體使細胞表現具有螢光的 EGFP-LC3 融合蛋白，觀察 HQ17(3)是否會對 SUP-B15 細胞造成 autophagy，如果會造成 autophagy 代表此酸性胞器可能為 autolysosome，接著利用 autophagy 誘導劑-Rapamycin (RAPA)和 autophagy 的抑制劑-Bafilomycin A1 (Baf A1)來探討 autophagy 在 HQ17(3)造成的死亡中扮演什麼角色，此結果如果顯示與 HQ17(3)造成的死亡與 autophagy 有關則會進一步利用 shRNA 的方式抑制 Beclin1 的表現來進一步確認結果。

第三章 材料與方法



一、實驗材料

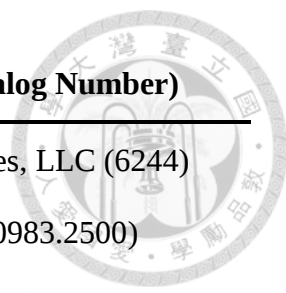
1、細胞株

本研究使用的急性淋巴性白血病細胞株 SUP-B15 和 Jurkat 購買自 American Type Culture Collection (ATCC)

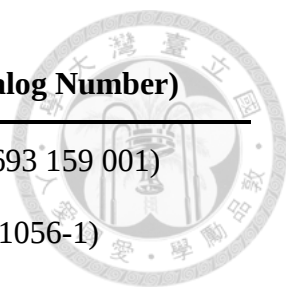
ATCC 編號：CRL-1929TM (SUP-B15)、TIB-152TM (Jurkat)

2、試藥/劑、抗體、儀器、耗材清單

試藥品名	廠牌 (Catalog Number)
1-Butanol	Merck (1.01990.1000)
3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC ₆ (3))	Molecular probe (D273)
40% Acrylamide/bis-acrylamide (29:1)	AMRESCO (0311)
4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF)	Sigma (A8456)
β-Mercaptoethanol	Sigma (M6250)
Agarose I TM	AMRESCO (0710)
Ammonium persulfate (APS)	AMRESCO (0486)
Annexin V-FITC	BioVision (1001-200)
Albumin	Sigma (A-4503)
Bafilomycin A1	Sigma (B-1793)
HyClone TM Bovine serum albumin (BSA)	GE Healthcare (SH30574.02)
CA-074Me	Enzo (BML-PI126-0001)
CaCl ₂ • 2H ₂ O	Wako (031-00435)
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	ImmunoChemistry



試藥品名	廠牌 (Catalog Number)
	Technologies, LLC (6244)
Ethanol	Merck (1.00983.2500)
Fetal bovine serum	Biological Industries (04-001-1A)
FLUORO-GEL	Electron Microscopy Sciences/17985-10
Glucose (Dextrose)	Wako (041-00595)
L-glutamine solution	Biological Industries (03-020-1B)
Glycine	Sigma (G-8898)
HCl	Wako
HEPES	Sigma (H-0891)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Biological Industries (11-058-1G)
Imatinib mesylate	Enzo (ALX-270-492-M025)
Isoton	Beckman Coulter (8546719)
Methanol	Merck (1.06009.2500)
NaCl	Sigma (S-7653)
Non-fat milk powder (安佳脫脂奶粉)	安佳
OPTI-MEM	Gibco (31985)
Pepstatin A	Enzo (ALX-260-M005)
PBS (10X ready pack)	Gibco (70011-044)
Phosphatase Inhibitor cocktail (10X)	NovelGene Biotech
<i>p</i> -nitrophenyl phosphate (PNPP)	Sigma (S-0942)



試藥品名	廠牌 (Catalog Number)
Protease Inhibitor cocktail (10X)	Roche (04 693 159 001)
Propidium iodide (PI)	BioVision (1056-1)
Rapamycin	LC Laboratories (R-5000)
RPMI 1640	Biological Industries (11-100-1K)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	AMRESCO (0227)
Sodium acetate trihydrate	Wako (198-01055)
Sodium bicarbonate	Sigma (S-4019)
Sodium pyruvate	Biological Industries (03-042-1B)
TEMED	Sigma (T-9281)
Tris-base	AMRESCO (0827)
Triton-X100	Sigma (T-9284)
Tunicamycin	Sigma (T7765)
Tween-20	Sigma (P-1379)
z-VAD(OMe)-FMK	Abcam (ab120487)

抗體品名	廠牌/目錄編號
Mouse anti-human $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	Cell signaling/4814
Rabbit anti-human phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	Cell signaling/2855
Rabbit anti-human AIF antibody	GeneTex/GTX102399
Rabbit anti-human α -tubulin antibody	Cell signaling/10376
Rabbit anti-human Beclin1 antibody	GeneTex/ GTX113039
Rabbit anti-human EIF2 alpha (phospho Ser52)	GeneTex/ GTX130006



抗體品名	廠牌/目錄編號
antibody	
Rabbit anti-human GAPDH antibody	GeneTex/ GTX100118
Rabbit anti-human cleaved caspase-3 (Asp175)	Cell signaling/9664
Rabbit anti-human Grp78 antibody	GeneTex/ GTX113340
Rabbit anti-human Histone H3 antibody	GeneTex/ GTX122148
Rabbit anti-human mTOR	Cell signaling/2983
Rabbit anti-human phospho-mTOR (Ser2448)	Cell signaling/5536
Rabbit anti-human NF-κB p65	Cell signaling/8242
Rabbit anti-human phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Cell signaling/9234
Rabbit anti-human PARP antibody	Cell signaling/9542
Rabbit anti-human XBP1 antibody	Abcam/ ab198999
Goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	Invitrogen/A-11008
Goat anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell signaling/7074
Horse anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell signaling/ 7076

試劑組品名	廠牌/目錄編號
Bio-Rad Protein Assay Dye reagent concentrate	Bio-Rad/500-0006
Dream Taq™ DNA Polymerase	Thermo/EP0702
Ingenio® Electroporation Solution	Mirus/ MIR 50116
Maxima SYBR green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Thermo/K0222
NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction	Thermo/78833

試劑組品名	廠牌/目錄編號
Reagents	
Trizol [®] LS reagent	Ambion/10296010
PEG-it [™] Virus Precipitation Solution (5X)	System Biosciences (SBI)/ LV810A-1
Prestained Protein ladder	ARROWTEC
SuperScript [™] III First Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen/1808-051
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo/34075
TransIT [®] -LT1 Transfection Reagent	Mirus
Western Lighting Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence	PerkinElmer/NEL105001EA

shRNA lentivirus 製備

pLKO.1-emptyT (TRCN0000208001)與 pLKO.1-shBECN1 (TRCN0000033550)

購自中研院 RNAi 核心設施(RNAi core)。lentivirus 製備依據 RNAi core 提供之操作手冊進行。

儀器名稱	廠牌型號
Bio-Rad Gene Pulser XCell [™]	Bio-Rad/165-2661
Shandon Cytospin III cytocentrifuge	GMI
即時螢光定量聚合酶連鎖反應器	ABI7500 Fast
倒立螢光顯微鏡	Olympus IX83
倒立螢光顯微鏡	Olympus IX71

儀器名稱	廠牌型號
LAS-4000 影像照相系統	FUJIFILM life science LAS-4000
落地型低溫離心機	KUBOTA 8800
桌上型離心機	KUBOTA 2100
微量離心管低溫離心機	HERMLE Z233MK-2
自動酵素免疫分析儀 (VERSAMax microplate reader)	VERSAMax
分光光度計 Nanodrop	Thermo
流式細胞儀	BD FACSCalibur
二氧化碳培養箱	ESCO CO2 incubator
迴旋水浴槽	STOVALL life science
蛋白質轉漬裝置	Amersham Biosciences Hoefer Dual Gel Caster
迷你垂直式電泳槽 (Mini-PROTEAN Tetra Cell)	Bio-Rad/ 165-8001
Mupid-21 Mini Gel Electrophoretic Unit	TSC Biosciences LTD/Mupid-21

計算/分析軟體 (版本)	開發廠商
Microsoft Office Excel (2007)	Microsoft
Image J (1.84V)	National Institutes of Health, USA
Prism4	GraphPad Software, Inc
CompuSyn (1.0)	ComboSyn, Inc.



3、各式溶液及其配方

(1) 細胞培養、繼代

細胞培養基：IMDM/20%FBS

材料	用量	濃度
IMDM	400ml	
FBS	100ml	20%
100mM Sodium pyruvate	5ml	1mM
200mM L-glutamine solution	5ml	2mM

※通過 0.22 μ m filter，4 $^{\circ}$ C 保存

細胞培養基：RPMI/10%FBS

材料	用量	濃度
RPMI-1640	450ml	
HEPES	1.192g	10mM
FBS	50ml	10%
Glucose	2.25g	25mM
100mM Sodium pyruvate	5ml	1mM
200mM L-glutamine solution	5ml	2mM

※通過 0.22 μ m filter，4 $^{\circ}$ C 保存



(2) 流式細胞儀相關實驗

5X Annexin V-binding buffer, pH7.4 (100ml)

材料	用量	濃度
HEPES	1.192g	50mM
NaCl	4.09g	700mM
CaCl ₂ • 2H ₂ O	3.675g	25mM

※室溫保存，以 ddH₂O 稀釋成 1X 使用，並通過 0.22μm filter

(3) 萃取細胞蛋白質

細胞溶解液 (cell lysis buffer)

材料	濃度
Tris-HCl (pH8.0)	50mM
NaCl	150mM
Triton X-100	1 %
10X protease inhibitor cocktail	1X
10X phosphatase inhibitor cocktail	1X

※4°C 保存

※使用前才加入 1/10 體積 10X protease inhibitor cocktail、10X phosphatase inhibitor cocktail 和 1/100 體積 Triton X-100

(4) 鈉十二烷基硫酸鹽聚丙烯胺凝膠電泳與膠體轉漬

Separating gel for Tris-glycine SDS-PAGE (2 片膠，8cm x 10cm x 1.5mm/片)

材料	Gel conc. (%)				
	5%	8%	10%	12%	15%
40% Acrylamide (29:1) (ml)	2.5	4	5	6	7.5
1.5M Tris-Cl, pH8.8 (ml)	5	5	5	5	5
H ₂ O (ml)	12.1	10.6	9.6	8.6	7.1
10% SDS (μl)	200	200	200	200	200
10% APS (μl)	200	200	200	200	200
TEMED (μl)	16	12	8	8	8
Total(ml)	20	20	20	20	20

適用分離蛋白大小(kDa)	建議膠體濃度(%)
~80-350	5
~40-250	8
~30-200	10
~20-150	12
~5-70	15



5X Tris-glycine electrophoresis buffer, pH8.3

材料	濃度(5X)
Tris-base	125 mM
Glycine	1.25 M
10% SDS	0.5 %

※室溫保存，以 ddH₂O 稀釋成 1X 使用

6X SDS loading dye

材料	用量	濃度
1M Tris-HCl, pH6.8	3 ml	300 mM
SDS	1.2g	12%
Bromophenol blue	1.5mg	0.015%
Glycerol	5ml	50 %
β-Mercaptoethanol	2ml	20%
Total	10ml	

※-20℃ 保存

(5) 西方墨點法

1X Transfer buffer (pH8.5)

材料	濃度
Tris-base	48mM
Glycine	39mM
10% SDS	0.04%
Methanol	20%(v/v)

※4℃ 保存



10X TBS (pH7.6)

材料	濃度(10X)
Tris	200mM
NaCl	1.36M

※室溫保存

1X TBS/T (washing buffer)

材料	終濃度
10X TBS	1X
Tween20	0.1%

※室溫保存

Blocking buffer (5% non-fat milk in TBS/T)

材料	濃度
1X TBS/T	1X
non-fat milk	5%

※4°C 保存



(6) 細胞存活/活性分析-Acid phosphatase assay (ACP assay)

ACP substrate buffer (pH5.5)

材料	濃度
Sodium acetate	0.1M
Triton X-100	0.1%

※室溫保存

1N NaOH

取 4g 的 NaOH 溶於 100ml 的 ddH₂O，即為 1N 的 NaOH

(7) 免疫螢光染色

Blocking buffer

材料	濃度
BSA	1%
Triton X-100	0.3%

※泡在 PBS 中，4℃ 保存

二、實驗方法

1、解凍細胞、細胞培養及細胞計數

實驗中所使用的急性淋巴性白血病細胞株(SUP-B15、Jurkat)為懸浮性細胞，分別以含 20% FBS 的 IMDM (SUP-B15)和含 10% FBS 的 RPMI1640 (Jurkat)培養於 37℃、5% CO₂ 的恆溫培養箱培養。解凍細胞時，將以液態氮凍存的細胞 37℃ 水浴，90 秒內完全解凍，並立即將細胞液轉移到 15ml 離心管，逐滴加入 6ml 已回溫至 37℃ 的培養基且搖晃使之均勻，之後再加入 4ml 培養基，以~70 x g (800rpm/KUBOTA2100)，室溫下離心 3 分鐘，然後去除上清液，將細胞重新懸浮

於 5ml 培養基中，放入 25T flask 中培養，等到活細胞比率提高至 90%，再將培養基體積增加，培養於 75T flask 中。之後，每隔兩天進行繼代培養。每次進行繼代培養時，取出 15 μ l 細胞液與等體積的 0.4% trypan blue (in 1X PBS) 混合，再取 15 μ l 混合液注入細胞計數器，計數細胞數。繼代時，取需要的細胞數，且利用培養基將細胞密度調整至適合的密度(SUP-B15 : 5 $\times 10^5$ /ml ; Jurkat : 3 $\times 10^5$ /ml)，剩餘細胞可取來進行實驗或丟棄。(最適培養細胞密度範圍 SUP-B15 : 5~20 $\times 10^5$ /ml ; Jurkat : 1~10 $\times 10^5$ /ml)

2、細胞存活分析

(1) Acid phosphatase (ACP) assay⁶⁰

ACP 活性廣泛存於細胞中，ACP assay 原理為測定細胞內酸性磷酸酶(ACP)活性，其活性與細胞數目成正比，藉由給予 ACP 受質(*p*-nitrophenyl phosphate, PNPP)，ACP 將其轉變成 *p*-nitrophenol，其在鹼性環境下呈黃色，且在 405nm 有最大吸光。將細胞接種於 96 孔盤中(SUP-B15 : 5 $\times 10^4$ /well ; Jurkat : 1 $\times 10^4$ /well)，在培養基中加入不同濃度的實驗藥物 HQ17(3)、Imatinib (IM)、Dexamethasone (Dex)，放置於 37°C、5% CO₂ 的恆溫培養箱培養，在指定時間收取細胞進行 ACP assay，以 400 x g (1500 rpm/ KUBOTA8800)，室溫下離心 5 分鐘，此時利用 ACP buffer 配置 1mg/ml PNPP，離心後的上清液以 suction 的方式去除，然後在每個 well 中加入 100 μ l 的 PNPP，放置 37°C 下作用 1.5 小時，之後加入 10 μ l 的 1N NaOH 中止反應，最後以自動酵素免疫分析儀(VERSAMax)測量 O.D.₄₀₅，進而算出細胞的相對存活百分比。

(2) 細胞膜磷脂質 phosphatidylserine (PS) 外翻與細胞膜完整性分析(Annexin V/PI)

於 24 孔盤中接種細胞(2 $\times 10^5$ /ml，共 1ml)，再分別處理 HQ17(3)、z-VAD、Bafilomycin A1、Rapamycin 等藥物，放置於 37°C、5% CO₂ 的恆溫培養箱培養。

達指定時間後，將細胞懸浮液吸到康氏管中，以 $400 \times g$ (1500 rpm/KUBOTA8800)，室溫下離心 5 分鐘，去除上清液，輕輕拍散細胞團塊，再加入 1ml 1X PBS 清洗細胞。細胞重新懸浮於 500 μ l 1X Annexin V-binding buffer 後，加入 1 μ l 150 μ g/ml Annexin V-FITC 和 1 μ l 250 μ g/ml PI，避光，室溫反應 5 分鐘，再補上 500 μ l 1X Annexin V-binding buffer，即可用流式細胞儀進行分析。

(3) 細胞粒線體膜電位的測定(DiOC₆(3)染色)

於 24 孔盤中接種細胞(2×10^5 /ml，共 1ml)，並以 HQ17(3)處理，放置於 37°C、5% CO₂ 的恆溫培養箱培養。指定時間後，將細胞懸浮液吸到康氏管中，以 $400 \times g$ (1500 rpm/ KUBOTA8800)，室溫下離心 5 分鐘，去除上清液，輕輕拍散細胞團塊，再加入 1ml 1X PBS 清洗細胞。將細胞重新懸浮於 1ml PBS/100nM DiOC₆(3)，於 37°C 避光染色半小時，即可用流式細胞儀進行分析。

3、Autophagy 的偵測

細胞發生 autophagy 時，細胞內的 LC3 會從 type I (cytosolic)轉變成 type II (membrane bound)，並鑲嵌在 autophagosome 膜上，利用 LC3-I 和 LC3-II 在細胞內的位置不同的特性，我們利用電穿孔方式將 pEGFP-LC3 質體送到細胞內，EGFP-LC3 融合蛋白帶有綠螢光，藉由觀察螢光是否由散布整個細胞的形式 (cytosolic)轉變成聚集成點狀分布(puncta, membrane-bound)的形式來推測細胞有無發生 autophagy。

將 2.5×10^6 個 SUP-B15 細胞用 PBS 清洗過後，讓細胞懸浮於 0.25ml 的 Ingenio[®] Electroporation Solution (10×10^6 cells/ml)，並與 5 μ g 的 pEGFP-LC3 (20 μ g/ml)質體 DNA 混合後轉移至 cuvette 中，以 Bio-Rad Gene Pulser XCell™ 進行電穿孔 (Square-wave form : 300V, 950mF, 15ms)，之後將細胞盡速移至裝有 IMDM/20% FBS 的培養盤，培養一個晚上後更換 IMDM/20% FBS 並分成兩組，其中一組以

2 μ M 的 HQ17(3)處理 6 小時，一組以 DMSO (Veh)處理。將細胞以 cytopsin 的方式(3×10^5 cells /200 μ l, 450rpm, 5mins)打在載玻片上，以 methanol 固定兩分鐘後，接著用 1 μ g/ml 的 DAPI 染色 15 分鐘，之後以 PBS 清洗 5 次(每次 3ml)，最後滴上約 15 μ l 的 PBS 在細胞上，蓋上蓋玻片，並用指甲油將四邊封起來，待指甲油乾後就可用螢光顯微鏡觀察。每組實驗至少拍 5 個視野(10x100 倍)，計數時以帶有綠螢光的細胞當作分母，以綠螢光細胞內綠螢光 puncta 超過 15 個當作有過度 autophagy 的細胞。

4、 Knockdown of Beclin1

有關 shRNA 實驗所使用的試劑，皆由中研院 RNAi 核心實驗室提供，我們利用 shBECN1 (TRCN0000033550)抑制人類內生性的 Beclin1。shBECN1 建構於 pLKO.1-puro 載體(附錄八)。pLKO.1-emptyT 載體(附錄九)中帶有一段隨機序列，做為控制組使用。為產製可供轉導實驗的 lentivirus，我們同時將三種不同的載體，以 TransIT-LT1 Transfection Reagent 轉染至 293FT 細胞，分別為：表現 shRNA 的 pLKO.1 載體、包裹 lentivirus 的載體 pCMV Δ R8.91 (gag, pol, rev gene)及 pMD.G (envelope)(附錄十、十一)。取 2.25 μ g 的 pCMV Δ R8.91、0.25 μ g 的 pMD.G、2.5 μ g 的 pLKO.1 載體，加入 OPTI-MEM 使總體積達 250 μ l，另外取 15 μ l 的 TransIT-LT1 以 OPTI-MEM 稀釋使總體積達 250 μ l，之後把 DNA 混合液逐滴加入稀釋好的 TransIT-LT1 中，室溫作用 30 分鐘後，將混合液逐滴加入繼代培養 18 小時內的 293FT 細胞培養基當中，培養 18 小時後將培養基換成含 1% BSA 的 DMEM 培養基，於培養後 24 和 48 小時即可收集含有 lentivirus 的細胞上清液，並以離心方式去掉細胞碎片，接著進行病毒濃縮，加入 1/4 倍病毒液體積的 PEG-it™ Virus Precipitation Solution (5X)，混勻後置於 4°C 至少 12 小時，之後以 10000 x g，4°C 下離心 1 小時，接著去除上清液，加入 1/10 倍原上清液體積冰的 DMEM 培養基(含 1% BSA)回溶病毒液，分裝後存於 -80°C。

為了產製 Beclin1 受抑制的 SUP-B15 細胞，培養於 24 孔培養盤的 SUP-B15 細胞(約 2×10^5 cells)先與含 polybrene ($8 \mu\text{g/ml}$)的病毒液混合後($\sim 3 \text{ m.o.i.}$)，以 $1100 \times g$ ($2400 \text{ rpm/ KUBOTA8800}$)， 37°C 下離心 30 分鐘，之後培養於 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的恆溫培養箱培養，培養 24 小時後更換培養基再養 24 小時，接著以含有 $2 \mu\text{g/ml}$ puromycin 的培養基篩選 48 小時，以去除未轉導成功的細胞，經篩選過後會以定量反轉錄聚合酶連鎖反應(qRT-PCR)和西方墨點法確認 Beclin1 的表現是否下降。

5、 免疫螢光染色

於 24 孔盤中接種 SUP-B15 細胞($5 \times 10^5/\text{ml}$ ，共 2ml)，利用 HQ17(3)處理，放置於 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的恆溫培養箱培養。指定時間後，利用 cytopsin 的方式(3×10^5 cells/ $200 \mu\text{l}$, 450 rpm , 5 mins)將細胞打在蓋玻片上，利用 $4\% \text{ paraformaldehyde}$ 固定 15 分鐘，接著用 blocking buffer ($1\% \text{ BSA}$, $0.3\% \text{ Triton X-100 / PBS}$)覆蓋整個蓋玻片，室溫下作用一小時；將一級抗體以 blocking buffer 稀釋成適合的濃度後並覆蓋整個蓋玻片， 4°C 下作用一個晚上(in wet chamber)，之後將玻片浸於 2ml 的 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘；將二級抗體以 blocking buffer 稀釋 500 倍後覆蓋整個蓋玻片，室溫下作用一小時，之後利用 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘；用 ddH_2O 將 DAPI 稀釋成 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 並加到蓋玻片上，室溫下作用 5 分鐘，之後利用 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，最後在載玻片上滴一滴 FLUORO-GEL 封片液並將蓋玻片覆蓋上去，須避免氣泡，再利用指甲油將四邊封起來，待指甲油乾後就可用螢光顯微鏡觀察，每組實驗至少拍 5 個視野(10×100 倍)。

6、 RNA 萃取與定量反轉錄聚合酶連鎖反應(qRT-PCR)

(1) RNA 萃取

取 5×10^6 個 SUP-B15 細胞並將培養基去除，加入 1ml 的 Trizol[®] LS reagent 打散細胞，冰於 -80°C 至少一個晚上，隔天將樣本取出回溫至室溫，加入 0.2ml 的氯



仿(chloroform)，上下翻轉混合均勻，於室溫靜置反應 2-3 分鐘，接著在 4°C 中以 12000 x g 離心 15 分鐘，離心完畢後可看見液體分層，由上到下分別為 aqueous phase (無色)、interphase 和 phenol-chloroform phase (紅色)，其中 RNA 位於 aqueous phase。將 aqueous phase 吸出並移至另一個新的微量離心管，再加入 0.5ml 的異丙醇(isopropanol)混合均勻，於室溫下反應 10 分鐘，之後在 4°C 中以 12000 x g 離心 10 分鐘，離心完畢後，小心地去除上清液，注意不要碰到管底的白色沉澱物，再加入 1ml 的 75%酒精清洗，之後在 4°C 中以 7500 x g 離心 5 分鐘。將去除酒精的離心管倒放，於室溫下風乾約 10 分鐘，之後加入 20μl 的 DEPC 水回溶 RNA。回溶後的 RNA 以膠體電泳分析品質，並以分光光度計定量。

(2) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

利用 SuperScript™ III First Strand Synthesis System 將 RNA 反轉錄成 cDNA，之後用 SYBR green/ROX qPCR Master Mix (2X)針對 Beclin1 進行 qPCR，並以內生性 GAPDH 表現量作為標準化(normalization)的依據，以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因相對表現量。

人類 Beclin1 primer sequence 如下：

Forward：5'-CACATCTGGCACAGTGGACAG-3'

Reverse：5'-CTCCTTAGATTTGTCTGTCAGAG-3'

人類 GAPDH primer sequence 如下：

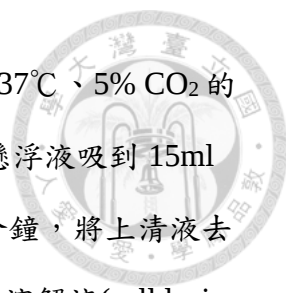
Forward：5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3'

Reverse：5'-GGCCATCCACAGTCTTCT-3'

7、西方墨點法

(1) 蛋白質的萃取

於 6 cm 的培養皿接種 3×10^6 個 SUP-B15 細胞(5×10^5 cells/ml, 6ml)或 1.5×10^6



個 Jurkat 細胞(3×10^5 cells/ml, 5ml)，利用 HQ17(3)處理，放置於 37°C 、5% CO_2 的恆溫培養箱培養。到達指定時間後，取出細胞，以滴管將細胞懸浮液吸到 15ml 離心管中，以 $400 \times g$ (1500 rpm/KUBOTA8800)， 4°C 下離心 5 分鐘，將上清液去除，輕輕拍散團塊，加入 PBS (4°C)清洗細胞兩次。以 80ul 細胞溶解液(cell lysis buffer)打破細胞(cell lysis buffer 體積可視 pellet 量做調整)並轉移到 1.5ml 微量離心管，置於冰上 15 分鐘，之後將細胞於冰浴中進行 3 次 sonication，一次 10 秒，每次間隔需等 10 秒，之後以 $22000 \times g$ (15000 rpm/ HERMLE Z233MK-2)， 4°C 下離心 5 分鐘，將上清液移至新的 1.5ml 微量離心管，接著進行蛋白質定量。

(2) 蛋白質定量與電泳樣品準備

以 Bio-Rad Protein Assay 作為蛋白質定量法，利用 albumin 製作標準曲線；將 stock ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)做序列稀釋成六個濃度(0, 1/2X, 1/3X, 1/4X, 1/8X, 1/16X)，並將待測樣品以滅菌水稀釋 10 倍或 20 倍，各取 $10\mu\text{l}$ 加入 96 孔盤中(三重複)。將 Bio-Rad Protein Assay reagent 以滅菌水稀釋五倍，於每一孔加入 $200\mu\text{l}$ ，室溫下作用至少 5 分鐘(不可超過一小時)，以自動酵素免疫分析儀(VERSAMax)偵測波長 595nm 吸光值。依據 albumin 濃度與吸光值作出標準曲線，依此標準曲線定量出待測蛋白濃度。定量後，將蛋白樣品以滅菌水稀釋成 $15\mu\text{l}$ 內含有 $30\mu\text{g}$ 或 $40\mu\text{g}$ (phosphorylated protein)的蛋白，並加入 $3\mu\text{l}$ 6X SDS loading dye， 98°C 加熱 10 分鐘，即完成電泳樣品的準備。

(3) 鈉十二烷基硫酸鹽聚丙烯胺凝膠電泳與膠體轉漬

依據想要分離的蛋白分子量大小配製適當濃度的 separating gel，stacking gel 都用 5%。將上述的電泳樣品以及蛋白質標記(marker)($5\mu\text{l}/\text{well}$)注入齒孔(well)。在 4°C 下進行電泳，先以 70 伏特(V)電壓進行聚焦(stackings)，待追蹤染劑(tracking dye)聚集於上下膠介面時，再以 130 伏特(V)電壓進行分離(separating)蛋白，藉由蛋白

標記決定電泳停止時間，之後進行膠體轉漬(transfer)。進行膠體轉漬時，先將 PVDF 膜(poly-vinylidene fluoride membrane)以甲醇(methanol)活化，再依序組裝轉漬裝置(由負極至正極)：海綿、濾紙三張、膠體、PVDF 膜、濾紙三張、海綿。將轉漬裝置移至裝有 transfer buffer 的轉漬槽後，在 4°C 冰箱中以 400 毫安培(mA)進行轉漬一小時。

(4) 阻斷非特異性結合與免疫染色

將完成轉漬的 PVDF 膜依需要進行裁切，做好記號，放入塑膠盒中，加入 washing buffer (1X TBS/T)清洗 3 次，每次 5 分鐘(蓋過膜即可)，接著加入 5% non-fat milk (blocking buffer, in TBS/T)在室溫反應 1 小時(blocking)，再以 TBS/T 清洗 3 次。加入以 blocking buffer 稀釋的一級抗體，於 4°C 冰箱反應過夜(或室溫一小時)，再以 TBS/T 清洗 3 次，加入以 blocking buffer 稀釋的二級抗體，室溫反應一小時，再以 TBS/T 清洗 3 次，最後以 ECL 呈色套組呈色，使用富士 LAS-4000 影像系統拍照。

8、核質分離

於 10 cm 的培養皿終接種 6×10^6 個 SUP-B15 細胞(5×10^5 cells/ml, 12ml)，再利用 2 μ M HQ17(3)處理，放置於 37°C、5% CO₂ 的恆溫培養箱培養。到達指定時間後，取出細胞，以滴管將細胞懸浮液吸到 15ml 離心管中，以 400 x g (1500 rpm/KUBOTA8800)，4°C 下離心 5 分鐘，將上清液去除，輕輕拍散團塊，加入 PBS (4°C)清洗細胞 2 次，之後加入 300 μ l CERI (含 1X protease inhibitor)並轉移到 1.5ml 微量離心管，震盪 15 秒後置於冰上 10 分鐘，再加入 16.5 μ l CERII，震盪 5 秒後置於冰上 1 分鐘，再震盪 5 秒後以 22000 x g (15000 rpm/ HERMLE Z233MK-2)，4°C 下離心 5 分鐘，將上清液轉移至新的 1.5ml 微量離心管，此為細胞質部分的蛋白，將剩餘團塊以 PBS 清洗兩次後，加入 80 μ l NER (含 1X protease inhibitor)，震

盪 15 秒後置於冰上 15 分鐘，之後將細胞於冰浴中進行 3 次 sonication 各 10s，最後將蛋白轉移至新的 1.5ml 微量離心管，此為細胞核部分的蛋白，接著進行蛋白質定量。



9、X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA splicing 偵測

依照 IRE-1 α 會移除 XBP1 mRNA intron 1 的 26 個 nucleotide 之特點⁵⁰，我們將 SUP-B15 細胞以 2 μ M 的 HQ17(3)處理 5 小時後，以 Trizol[®] LS reagent 抽取 RNA，並以 SuperScript[™] III First Strand Synthesis System 將 RNA 反轉錄成 cDNA，之後用 PCR 偵測 XBP1 是否有被 splicing，人類 XBP1 primer sequence⁶¹如下：

Forward : 5'-CCTGGTTGCTGAAGAGGAGG-3'

Reverse : 5'-CCATGGGGAGATG TTCTGGAG-3'

PCR 產物以 3% agarose gel 進行膠體電泳分析，PCR 產物預測大小如下：

XBP1-unspliced : 145 bp ; XBP1-spliced : 119 bp 。

第四章 結果



一、HQ17(3)對 ALL 細胞株的毒殺能力

1、HQ17(3)對 ALL 細胞株具有毒性

本實驗室先前研究顯示低濃度 HQ17(3)對 ALL 細胞株具有毒性²¹，在此，我們選用 SUP-B15 和 Jurkat 兩株 ALL 細胞株，並使用 Acid phosphatase (ACP) assay 確認此結果，將細胞接種於 96 孔盤中(SUP-B15 : 5×10^4 /well ; Jurkat : 1×10^4 /well)，處理不同濃度(0、0.5、1、1.5、2、3、5 μ M)的 HQ17(3)，分別於 24、48、72 小時候進行 ACP assay 分析細胞活性，以各時間點的 Vehicle (Veh)組別當作 100%活性，計算各濃度及時間處理下的細胞活性，實驗結果如圖一，以 Compusyn 軟體計算三天的細胞抑制 50% 的濃度(50% inhibitory concentration, IC_{50})，在 SUP-B15 細胞中，三天的 IC_{50} 分別為 24h : $3.83 \pm 0.44 \mu$ M、48h : $2.26 \pm 0.20 \mu$ M、72h : $1.83 \pm 0.13 \mu$ M；在 Jurkat 細胞中，三天的 IC_{50} 分別為 24h : $0.95 \pm 0.39 \mu$ M、48h : $0.31 \pm 0.02 \mu$ M、72h : $0.19 \pm 0.01 \mu$ M。結果顯示在低濃度 HQ17(3)處理一天就可以看見細胞增殖受抑制的情形。

2、HQ17(3)使 T-ALL 細胞株 Jurkat 細胞出現細胞凋亡特徵

本實驗室先前研究顯示 HQ17(3)會使 RS4;11 及 SUP-B15 細胞出現死亡特徵，包括 phosphatidylserine (PS)外翻及粒線體膜電位的喪失^{20,21}，但 HQ17(3)在 Jurkat 細胞中是否引發細胞死亡還不清楚。

(1) HQ17(3)促使 Jurkat 細胞膜 PS 外翻、細胞膜受損

我們於 24 孔盤中接種 2×10^5 個 Jurkat 細胞，處理不同濃度(0、0.25、0.5、0.7、1、2 μ M)的 HQ17(3)，於 24 小時後進行 Annexin V/PI 染色分析，結果如圖二，隨濃度增加 Annexin V⁺的細胞比例也跟著增加，呈現 dose-dependent 的現象，不同濃度 HQ17(3)處理後 apoptotic cells (Annexin V⁺)比例如下：Veh ($6.46 \pm 1.13\%$)、

0.25 μ M ($7.21\pm0.75\%$)、0.5 μ M ($13.07\pm0.97\%$)、0.7 μ M ($24.37\pm2.59\%$)、1 μ M ($48.97\pm5.14\%$)、2 μ M ($76.04\pm0.94\%$)。之後我們選定 1 μ M HQ17(3)處理 24 小時進行後續實驗。

圖三結果顯示，1 μ M 的 HQ17(3)處理 8 小時後，細胞死亡開始出現顯著差異，隨時間增加，可看見 Annexin V⁺PI⁻的細胞比例先增加，之後 Annexin V⁺PI⁺的細胞比例才增加，這是典型 apoptosis 的現象，各時間點 apoptotic cells 比例如下：0h ($5.09\pm1.58\%$)、8h ($14.51\pm4.90\%$)、16h ($37.05\pm10.02\%$)、24h ($49.35\pm5.73\%$)。但在實驗室先前研究顯示 HQ17(3)處理 SUP-B15 細胞後，不管在哪個時間點，皆為 Annexin V⁺PI⁺的細胞，不屬於典型 apoptosis 的現象²⁰。綜合以上結果顯示 HQ17(3)使 ALL 細胞株的細胞膜 PS 外翻、細胞膜受損並造成細胞死亡，且在不同細胞株中造成不一樣的死亡型式。

(2) HQ17(3)促使 Jurkat 細胞的粒線體膜電位喪失

由上述 Annexin V/PI 實驗推測 HQ17(3)引發 apoptosis，而 apoptosis 的發生可能是透過粒線體失去膜電位，釋放出粒線體中的 cytochrome c 等物質直接或間接導致細胞死亡，因此我們使用與粒線體膜具高親和力的染劑 DiOC₆(3)標記粒線體膜電位變化，以 1 μ M 的 HQ17(3)處理 16 小時後粒線體膜電位喪失的細胞比例開始有統計差異，並且隨時間增加，各時間點粒線體膜電位喪失的細胞比例如下：0h ($5.2\pm2.45\%$)、8h ($10.5\pm5.66\%$)、16h ($31.1\pm9.15\%$)、24h ($49.6\pm8.23\%$) (圖四)，其結果與 Annexin V/PI 染色結果的時間與 apoptotic cells 比例相呼應。

(3) HQ17(3)對 Jurkat 細胞引起 caspase-dependent cell death

本實驗室先前研究顯示 HQ17(3)處理 SUP-B15 細胞後，不管在哪個時間點，皆為 Annexin V⁺PI⁺的細胞，與典型 apoptosis 的形式不同，且 Western blot 結果顯示 caspase-3 只有低度活化，另外，利用 pan-caspase inhibitor (z-VAD)處理後，雖

然微量活化的 caspase-3 被抑制，但卻無法挽救 HQ17(3)導致的死亡²⁰，由此可知 HQ17(3)對 SUP-B15 細胞引起的死亡是屬於 caspase-independent，而 HQ17(3)導致的死亡應該是由其他 effector 來執行。

由上述 Annexin V/PI 實驗可知 HQ17(3)處理 Jurkat 細胞後，隨時間增加，Annexin V⁺PI⁻的細胞比例先增加，之後 Annexin V⁺PI⁺的細胞比例才增加，屬於典型 apoptosis 的形式。我們使用 HQ17(3)與 z-VAD 共同處理後，利用 Annexin V/PI 染色分析，結果顯示單獨處理 HQ17(3)和與 z-VAD 共同處理後 apoptotic cells 比例從 48.05±4.57%下降到 17.60±3.74% (圖五)。另外，利用 Western blot 分析 caspase-3 的活化情形，結果顯示 HQ17(3)和 z-VAD 共同處理後能抑制 caspase-3 的活化(圖五)。綜合以上結果可知 HQ17(3)對 Jurkat 細胞引起的死亡大部份歸於 caspase-dependent cell death。

二、HQ17(3)與第一線淋巴性白血病藥物合併使用可增加對 ALL 細胞的抑制效果

1、ALL 細胞株對化療藥物有抗性

(1) SUP-B15 細胞對 Imatinib 有抗性

Imatinib mesylate (IM)是第一代 ABL tyrosine kinase inhibitor (TKI)，屬於 type II kinase inhibitor，先前研究已經知道 SUP-B15 細胞對 IM 具有抗性²⁰，我們利用 ACP assay 確認此結果，結果顯示 SUP-B15 細胞在 24 小時和 48 小時的 IC₅₀ 皆大於 10μM，到 72 小時 IC₅₀ 為 0.1μM，但從圖中可以看到隨 IM 濃度增加細胞存活不受影響(圖六)，且利用 Trypan blue 染色結果顯示在 IM 不會殺死 SUP-B15 細胞只抑制其生長，說明 SUP-B15 細胞對 Imatinib 具有抗性。

(2) Jurkat 細胞對 Dexamethasone 有抗性

Dexamethasone (Dex)是治療 ALL 常見的第一線藥物，根據先前研究已經知道

Jurkat 細胞對 Dex 具有抗性，我們利用 ACP assay 確認此結果，結果顯示當用 300 μ M 的 Dex 處理 72 小時都還無法抑制 50%的細胞(圖六)，說明 Jurkat 細胞對 Dex 有抗性。



2、第一線淋巴性白血病藥物與 HQ17(3)合併使用可增加對 ALL 細胞的抑制效果

為了確認 HQ17(3)是否可以作為增敏劑增加對原來具抗性藥的效用，我們使用不同濃度的第一線淋巴性白血病治療藥物(IM 或 Dex)與 HQ17(3)相互搭配，處理 72 小時後，利用 ACP assay 分析細胞活性。

(1) IM 與 HQ17(3)合併處理能增強對 SUP-B15 細胞的抑制效果

以不同濃度的 IM 與 HQ17(3)共同處理 72 小時後，利用 ACP assay 分析細胞活性，結果顯示 IM 與 HQ17(3)合併使用後比單獨處理的抑制效果更好(圖七)，在顯微鏡下觀察合併處理低於 IC₅₀ 之 IM 與 HQ17(3)就可以造成大多數細胞死亡的型態，HQ17(3)更可恢復 SUP-B15 細胞對 TKI-Imatinib 之感受性。

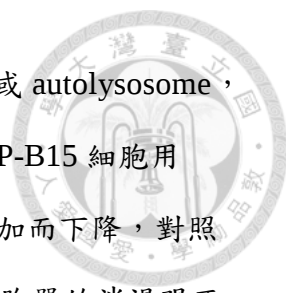
(2) Dex 與 HQ17(3)合併處理能增強對 Jurkat 細胞的抑制效果

以不同濃度的 Dex 與 HQ17(3)共同處理 72 小時後，利用 ACP assay 分析細胞活性，結果顯示 Dex 與 HQ17(3)合併使用後比單獨處理的抑制效果更好(圖七)，說明兩種藥物合併使用後，使用較低濃度的 Dex 就可以達到更好的抑制效果。

根據上述的結果顯示，IM 或 Dex 與 HQ17(3)合併使用後能增強對 ALL 細胞株的抑制效果，說明 HQ17(3)未來可能有潛力作為治療 ALL 的增敏劑，降低 IM 和 Dex 使用的濃度。

三、HQ17(3)誘使 SUP-15 細胞死亡的 effector

Acridine orange (AO)為一種具細胞通透性且帶有弱鹼性的染劑，能與 DNA



結合發綠螢光，也可以進入細胞內的酸性胞器，例如 lysosome 或 autolysosome，這些胞器內的酸性環境能使 AO 發紅螢光。而先前研究指出 SUP-B15 細胞用 HQ17(3)處理 4-6 小時後酸性胞器有明顯增加，之後隨著時間增加而下降，對照 AnnexinV/PI 實驗顯示細胞 8 小時開始出現顯著死亡，說明酸性胞器的消退跟死亡可能有關係²⁰，依照之前的研究，應該是 lysosome 破裂導致紅螢光消退，因此，HQ17(3)造成的酸性胞器累積又消退可能是因為此原因-lysosomal membrane permeabilization (LMP)；另外，這些酸性胞器也有可能是因為 autophagy 產生的 autolysosome，而細胞的死亡也常常伴隨著 autophagy 的發生²²。接下來我們將針對 LMP 和 autophagy 與 HQ17(3)造成的細胞死亡之間的關係做探討。

1、Lysosome 中的 proteases 不是 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞中引起死亡的 effector

Lysosome 中有很多的酵素，發生 LMP 時這些酵素會從 lysosome 釋出並對細胞造成傷害，其中跟細胞死亡最有關的酵素是 cathepsin 這類的 proteases，除了會造成 DNA fragmentation 或造成 caspase-independent cell death 外，也會造成 MOMP，進而活化 caspase-dependent 或 caspase-independent cell death³⁹。我們預先處理不同種類的 cathepsin 抑制劑再處理 2 μ M 的 HQ17(3)處理 48 小時，之後利用 ACP assay 分析細胞活性，結果顯示預先處理 Pepstatin A (cathepsin D (aspartic protease) 抑制劑)和 CA-074-Me (cathepsin B/L (cysteine protease)抑制劑)再處理 HQ17(3)後並不會逆轉 HQ17(3)造成的細胞死亡，反而細胞活性比單獨處理 HQ17(3)還低，而 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF, serine protease 抑制劑)則無差異(圖八)，合併處理所有的 proteases 抑制劑也不能逆轉 HQ17(3)造成的細胞死亡。因此推斷 lysosome 內的 proteases 並非 HQ17(3)引起 SUP-B15 細胞死亡的主要分子。

2、HQ17(3)引起 Autophagy

雖然 LMP 不是 HQ17(3)導致死亡的原因，但我們先前看到的酸性胞器有可能是 autophagy 產生的 autolysosome。為了瞭解 HQ17(3)是否促進 autophagosome 形成，我們利用電穿孔方式將 pEGFP-LC3 質體送到細胞內，EGFP-LC3 融合蛋白自發綠螢光，當 autophagy 發生時 LC3-I (cytosolic)則會轉變為 LC3-II (membrane bound)形式鑲嵌於 autophagosome 膜上，可藉由觀察螢光是否由散布整個細胞的形式轉變成聚集成點狀分布(puncta)的形式來推測細胞有無發生 autophagy。從圖中可以看到細胞在正常狀況下就有 basal level 的 autophagy，而用 HQ17(3)處理過後，細胞內點狀螢光變多，經定量後，點狀螢光變多的細胞比例增加 2.3 倍左右(圖九)，說明 HQ17(3)處理 SUP-B15 細胞增進 autophagy 發生，而 autophagy 在 HQ17(3)造成的死亡中扮演什麼角色還需進一步探討。

3、Autophagy 參與 HQ17(3)引起的細胞死亡

為了瞭解 autophagy 在 HQ17(3)造成的死亡中扮演什麼角色，我們使用 autophagy 的抑制劑-Bafilomycin A1 (Baf A1)及 autophagy 的誘導劑-Rapamycin (RAPA)，其中 Baf A1 為 vacuolar H^+ -ATPase (V-ATPase)的抑制劑，抑制 lysosome 內腔的酸化，進而影響 autophagosome 和 lysosome 的融合⁶²，而 lysosome 內的酵素活性也因此被抑制；RAPA 能藉由抑制 mTOR 活性，進而促進 autophagy⁶³。藉由抑制和促進 autophagy 來探討 autophagy 在 HQ17(3)造成的死亡中扮演什麼角色。

圖十結果顯示，HQ17(3)和 Baf A1 共同處理後，利用 propidium iodide (PI)染色分析，結果顯示單獨處理 HQ17(3)或與 Baf A1 共同處理後死細胞比例從 $73.54 \pm 4.40\%$ 下降到 $44.38 \pm 8.99\%$ ，說明抑制 autolysosome 中的分解程序能部分抑制 HQ17(3)導致的死亡；接著我們使用 RAPA 與 HQ17(3)共同處理，首先利用 RAPA 處理 SUP-B15 細胞 24 小時後，利用 acridine orange (AO)染色確認細胞內酸性胞器是否有增加 (autolysosome)，結果顯示 RAPA 處理後細胞內紅色螢光有明顯變多

(圖十一)，間接說明 RAPA 誘導 autophagy 的發生。接著利用 PI 染色分析，圖十一結果顯示單獨處理 HQ17(3)或與 RAPA 共同處理後活細胞比例從 $55.81 \pm 17.57\%$ 下降到 $25.33 \pm 7.10\%$ ，說明誘導細胞發生 autophagy 也能部分抑制 HQ17(3)導致的死亡。我們使用 autophagy 的抑制劑和誘導劑都能減少 HQ17(3)導致的死亡。

上述實驗我們使用藥物來抑制 autophagy，並發現抑制 autophagy 能部分抑制 HQ17(3)導致的死亡，為了進一步確認此結果，我們從基因層面下手，利用 shRNA 的方式 knockdown Beclin1 的表現，以 qRT-PCR 確認 shREC N1 將 Beclin1 表現量降低為對照組細胞的 0.28 倍，以西方墨點法確認 shREC N1 的確降低細胞內 Beclin1 的蛋白表現(圖十二)，接著用 HQ17(3)處理 SUP-B15-shBEC N1 與對照組 SUP-B15-empty 細胞，利用 PI 染色分析，結果顯示在 HQ17(3)處理後的死細胞比例在 SUP-B15-shBEC N1 ($26.79 \pm 7.24\%$)比在 SUP-B15-empty ($71.18 \pm 10.47\%$)還來的少，且達統計意義(圖十二)，綜合藥物和 shRNA 的結果說明 HQ17(3)引起的死亡跟 autophagy 相關。

四、HQ17(3)造成細胞壓力

為了瞭解 HQ17(3)是如何造成 autophagy，我們分析調控 autophagy 的 pathway，autophagy 一般是受 mTOR 這條 pathway 調控(見附錄五)，且 mTOR 活性被抑制有利於 autophagy 的發生，我們利用西方墨點法分析 mTOR 及其下游 substrate 活化(磷酸化)的情形，結果顯示在 HQ17(3)處理後至酸性胞器大量出現期間，mTOR 和其下游分子 Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1)反而被活化(圖十三)，這跟我們預測結果相反，但先前文獻中指出當細胞處於壓力的狀態下，細胞會透過 mTOR 來活化一些蛋白讓細胞可以渡過壓力的環境，使細胞存活下來^{64,65}。我們推測 HQ17(3)導致細胞壓力進而導致細胞死亡，所以進一步分析細胞遭受壓力的指標- NF- κ B pathway，結果顯示 HQ17(3)處理 5 小時後，細胞內的 p65 總量增加，且 NF- κ B 的抑制物 I κ B α 的總量下降，說明 NF- κ B 可能

有活化。NF- κ B pathway 活化時，p65 會進到細胞核活化下游的基因表現，接著我們將細胞核和細胞質的蛋白分離，並利用西方墨點法分析，結果顯示 HQ17(3)處理後，細胞核內的 p65 量增加，代表 HQ17(3)導致 NF- κ B pathway 活化(圖十三)。從 mTOR 與 NF- κ B 的活化說明 HQ17(3)造成細胞壓力。

五、HQ17(3)造成內質網壓力(ER stress)

為了釐清 HQ17(3)造成什麼壓力進而導致 autophagy，先前研究指出內質網壓力能造成細胞死亡或 autophagy^{47,49}，我們利用西方墨點法分析內質網壓力的幾個指標(Grp78, p-eIF2 α , XBP1)，結果顯示當 HQ17(3)處理五個小時後，Grp78 和 p-eIF2 α 的表現量上升，但 XBP1 只有看見 mRNA 未被 splicing 的蛋白產物(XBP1u, 29kDa)；XBP1 要活化其 mRNA 需被 IRE-1 α 切除 intron 1 的 26 個 nucleotide，導致 frameshift 產生，進而轉譯出具有轉錄活性功能的 XBP1s (54kDa)⁵⁰，進一步利用 RT-PCR 分析 XBP1 mRNA 是否有被 splicing，結果顯示加藥前後 XBP1 都沒有被 splicing 的現象，說明 HQ17(3)的確不會導致 XBP1 的活化(圖十四)。雖然已經知道 HQ17(3)造成內質網壓力，但是否因 ER stress 才導致 autophagy 和細胞死亡還需做進一步探討。

六、HQ17(3)造成 DNA 斷裂可能由 Apoptosis-inducing factor (AIF)造成

本實驗室之前研究發現 HQ17(3)會導致 SUP-B15 細胞 subG1 的細胞比例增加且造成 caspase-independent cell death，說明不是因 caspase-activated DNase (CAD)造成 DNA 的斷裂；另外，之前研究有發現 HQ17(3)會導致 MOMP²⁰，為了瞭解 DNA 的斷裂是否可能是因為從粒線體釋出的 AIF 所造成，進而引起 caspase-independent cell death。我們利用免疫螢光染色分析 HQ17(3)是否造成 AIF 進入細胞核，從免疫螢光染色的結果看見 AIF 訊號散布在 Veh 組的細胞內，利用 HQ17(3)處理 24 小時，AIF 的訊號似乎有聚集的現象，但因 SUP-B15 細胞屬於 blast cells，

細胞核較大，仍需優化免疫螢光染色步驟並搭配共軛焦顯微鏡攝影以確定 AIF 是否有進到細胞核(圖十五)。



第五章 討論



本研究發現 HQ17(3)能在低濃度和短時間內有效殺死 ALL 細胞株(SUP-B15 和 Jurkat)，且在兩株細胞株所造成的死亡方式不同(SUP-B15 : caspase-independent²⁰; Jurkat : caspase-dependent)(圖五)；在先前研究指出 HQ17(3)對 RS4;11 (*MLL* gene rearrangement)細胞造成 caspase-independent cell death²¹，而在肝癌細胞株 Huh7 是造成 caspase-dependent cell death¹⁹；另外先前研究也有指出，HQ17(3)對周邊血單核性細胞(PBMCs)則無毒殺能力，且利用腹腔注射方式持續給予 HQ17(3)對 F334 大鼠也沒有明顯致死毒性¹⁸。綜合以上結果說明 HQ17(3)能選擇性殺死癌細胞，HQ17(3)可能因細胞株基因背景的不同導致不一樣的死亡方式。

HQ17(3)引起 SUP-B15 細胞死亡前發現有酸性胞器增加後消退，酸性胞器的消退可能與 lysosomal membrane permeabilization (LMP)有關，lysosome 中有很多的酵素，發生 LMP 時這些酵素會從 lysosome 釋出並對細胞造成傷害，其中跟細胞死亡最有關的酵素是 cathepsins 這類的 proteases，除了會造成 DNA fragmentation 或造成 caspase-independent cell death 外，也會造成 MOMP，進而活化 caspase-dependent 或 caspase-independent cell death³⁹。我們預先處理 lysosome 中不同種類的 cathepsin inhibitors 後再以 HQ17(3)處理 48 小時候進行細胞活性分析 (ACP assay)，結果顯示預先處理 Pepstatin A 或 CA-074-Me 再處理 HQ17(3)後，細胞活性反而比單獨處理 HQ17(3)的組別還低(圖九)；有研究指出 cysteine/aspartic cathepsins 會調節細胞內的一些功能，除了會造成細胞死亡外，也可以調節細胞內訊息的傳遞、antigen processing、細胞的複製，顯示對某些細胞來講是一個很重要的酵素⁶⁶⁻⁷¹，可能因為此原因所以我們才會看到 HQ17(3)加上 cathepsin 抑制劑造成更多的細胞死亡。由此部分實驗結果說明 lysosome 內的 cathepsins 不是 HQ17(3)導致死亡的原因(圖八)，但 LMP 發生時並不會只有 proteases 的釋出，可能還有

ROS 和 H^+ 釋出到細胞質，也都會導致細胞死亡，例如 H^+ 釋出會造成細胞質的酸化，過酸的環境影響正常的細胞生理，lysosome 釋出的其它酵素在細胞質內也保有活性，細胞被大肆破壞而影響細胞存活；而 lysosome 是細胞內以 autophagy 進行含鐵蛋白(包括 mitochondrial cytochromes 以及 ferritin)回收及循環的胞器，所以含有大量的鐵離子，如果 H_2O_2 碰到 lysosome 內游離的亞鐵離子(Fe^{2+})便會透過 Fenton reaction 催化轉變為更具活性的 $OH\cdot$ ，除了造成更嚴重的 LMP 外，這些 ROS 也會去攻擊細胞內的其它物質，進而導致細胞死亡^{39,40}。

酸性胞器的增加也有可能是 autophagy 產生的 autolysosome，於是我們將 pEGFP-LC3 質體 DNA 用電穿孔方式將其送入細胞內，發現 HQ17(3)處理 5 小時後，發生 autophagy 的細胞有明顯增加(圖九)，接著我們分別使用 autophagy 的抑制劑-Bafilomycin A1 (Baf A1)、autophagy 的誘導劑-Rapamycin (RAPA)及利用 shRNA 抑制 Beclin1 的表現來探討 HQ17(3)導致的死亡與 autophagy 之間的關係，我們發現利用 Baf A1 和 shRNA 抑制 Beclin1 的表現皆能減低 HQ17(3)導致的死亡(圖十、十二)，代表 HQ17(3)導致的死亡與 autophagy 伴隨發生，但我們發現利用 RAPA 也能減低 HQ17(3)導致的死亡(圖十一)，此部分我們還未有明確的解答，但可以確定 HQ17(3)引起的死亡與 autophagy 相關。根據 2012 年 Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)對 autophagic cell death 的定義為細胞死亡能被 autophagy 抑制劑或透過 RNAi 方式抑制，但有些 Atg 蛋白具有 autophagy-independent 的功能(如：Atg5、Atg6、Beclin1)，可藉由 proteases 的切割使其而轉變成使細胞死亡的蛋白(pro-death protein)，所以建議是 knockdown 至少兩種調控 autophagy 的蛋白來確認是否屬於 autophagic cell death²²；在本研究中只 knockdown Beclin1 一種調控 autophagy 蛋白，未來需要再 knockdown 另外一種調控 autophagy 蛋白(如：Atg5)來探討是否也能挽救 HQ17(3)導致的死亡，進而確認 HQ17(3)是否造成 autophagic cell death。雖然利用 Baf A1、RAPA 及 shBECN1 皆能減少 HQ17(3)造成的細胞死亡，但我們並沒有證據指出在這些處理下 autophagy 是否真的有被

抑制或活化，在 RAPA 的實驗中我們利用 acridine orange (AO) 染色間接證明能誘導 autophagy 發生，但畢竟不是直接的證據，未來還需進一步證明是否經由這些處理能減少或增加 HQ17(3) 引起的 autophagy，例如利用 EGFP-LC3 等方法證明。

Autophagy 一般受 mTOR pathway 調控，mTOR 被抑制有利於 autophagy 發生，但有研究指出 autophagy 也會受其他因子調控(mTOR-independent autophagy)，例如鈣離子(Ca^{2+})，文獻指出利用藥物處理使細胞質內的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上升，進而活化 calcium/ calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKK- β)，CaMKK- β 會再活化 AMPK 進而導致 mTOR 被抑制，最後造成 autophagy 發生⁵⁴；另外也有研究指出 calcium/ calmodulin-dependent death associated protein kinase (DAPK) 會磷酸化 Beclin1 (T119)，因此造成 Beclin1 與 Bcl-X_L 和 BCL-2 的分離，進而促進 autophagy 的發生⁷²。另一方面，也有文獻指出細胞內 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高會使細胞內 mTORC1 維持在活化態，或是造成 calcium/calmodulin 與 Vps34 (PI3K class III) 結合並造成 Vps34 活化，進而導致 phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) 的生成，最後活化 mTORC1 進而抑制 autophagy^{73,74}。我們分析 HQ17(3) 處理後 mTOR 及其下游分子活化的情形，發現很快就有 mTOR 還有下游的 4E-BP1 被活化(圖十三)，說明 HQ17(3) 引起的 autophagy 是屬於 mTOR-independent，加上 HQ17(3) 導致 mTOR 的活化可能跟細胞遭受壓力有關^{64,65}，我們針對內質網壓力做檢測，發現 Grp78 和 p-eIF2 α 的表現量上升，代表 HQ17(3) 造成內質網壓力(圖十四)，研究指出內質網壓力可能造成內質網內的 Ca^{2+} 釋出到細胞質，進而導致 autophagy^{47,54}，推測 HQ17(3) 所引起的 autophagy 可能受內質網壓力釋出的 Ca^{2+} 或是由細胞外進到細胞質的 Ca^{2+} 所引起。有研究指出經由 PERK/eIF2 α 活化的 CHOP 能活化 endoplasmic reticulum oxidoreductase-1 (Ero1 α) 的表現，Ero1 α 能活化內質網上的鈣離子通道 inositol triphosphate receptor (IP3R)，造成過量的 Ca^{2+} 從內質網進到細胞質和粒線體，並造成 mitochondrial permeability transition (MPT) 最後導致細胞死亡⁵²。未來可以使用 Fluo-4 AM 偵測細胞內 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的變化，或是偵測 CHOP 活化和 Ero1 α 的表

現先確認 HQ17(3)造成的內質網壓力是否透過 CHOP/Ero1 α 路徑導致 Ca²⁺釋出，接著再使用 unfolded protein response (UPR) inhibitor 或抑制細胞內[Ca²⁺]上升的藥物(如：IP3R inhibitor (xestospongine C)、Ca²⁺ chelator (BAPTA))來進一步探討 Ca²⁺-ER stress-autophagy 與細胞死亡之間的關聯。

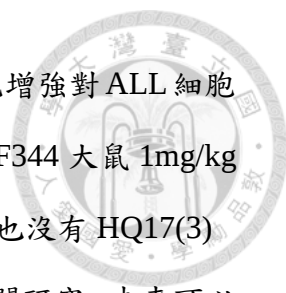
Ca²⁺為細胞內的一種訊息傳遞分子，所以細胞需控制好靜止狀態下細胞質的[Ca²⁺]，一般狀態下細胞質的[Ca²⁺]維持在~100nM，過多的 Ca²⁺會透過細胞膜上的 pumps 和 exchangers 將 Ca²⁺送至細胞外，也可以透過將 Ca²⁺儲存於內質網或粒線體與細胞質隔離([Ca²⁺]_{ER}：100–800 μ M；[Ca²⁺]_{mito}：~100nM)⁵¹，[Ca²⁺]_{mito}上升活化 Krebs cycle 中 calcium-sensitive dehydrogenases 和 pyruvate dehydrogenase，增加 oxidative phosphorylation 的作用(ATP 生成)^{75,76}，一般生理狀況下，[Ca²⁺]_{mito}透過 uniporter 和 Na⁺/Ca²⁺ exchanger 來調控 Ca²⁺在粒線體基質與細胞質之間的循環，但當[Ca²⁺]濃度超出粒線體能負荷的上限時，會導致粒線體失去功能且導致 ROS 產生，造成 mitochondrial permeability transition (MPT)，釋出 cytochrome c 進而活化細胞凋亡路徑，釋放出來的 cytochrome c 也會與內質網上的 IP3R 結合，抑制 IP3R 自我抑制(關閉)的能力，導致 Ca²⁺不斷從內質網釋出，進而造成更嚴重的細胞死亡⁷⁷(附錄十二)。先前研究顯示 HQ17(3)處理 SUP-B15 細胞會造成 MOMP，而使用 ROS scavengers 只能部份減少粒線體膜電位喪失的現象²⁰，推測細胞內[Ca²⁺]過高在 HQ17(3)造成粒線體膜電位喪失的現象之中也扮演一定的角色，進而造成細胞死亡。

pre-B cells 中 Ig heavy chain 變異區基因的重組和 Ig heavy chain 先表達需 Grp78 的幫助的原故，所以 Grp78 又稱為“Ig heavy chain-binding protein” (BiP)⁷⁸。在 BCR-ABL⁺白血病細胞株中被發現有高表現的 XBP1 和 Grp78，而在 high-risk Ph⁺和 MLL rearranged B-ALL subsets 中也有發現 XBP1、Grp78、IRE-1 α 被 upregulation，如果將 BCR-ABL 送入 32Dcl3 mouse myeloid cells 中可以發現細胞內 XBP1 和 Grp78 表現量上升，如果再讓此細胞表達 dominant-negative mutant ATF6 或 IRE1

則會讓此細胞失去對 etoposide 和 Imatinib 的抗性而造成死亡，且在 primary BCR-ABL⁺白血病患者細胞中 UPR 相關的基因有較高的表現，說明 UPR 為 BCR-ABL 的下游標的且使 BCR-ABL⁺白血病患者細胞具 anti-apoptosis 的能力^{48,79}。在我們的研究中發現在一般狀況下 SUP-B15 (BCR-ABL⁺)細胞內的 Grp78 表現量高的現象與先前研究相符(圖十四)，顯示在 SUP-B15 細胞有較高的內質網壓力。我們利用 HQ17(3)處理 SUP-B15 細胞加強內質網壓力(Grp78 和 p-eIF2 α 表現量上升)且會導致細胞死亡，可能在 SUP-B15 細胞本身就有較高的內質網壓力，而 HQ17(3)又造成更嚴重的內質網壓力，因此造成細胞發生 autophagy 或細胞死亡，至於 HQ17(3)造成的內質網壓力與 HQ17(3)造成的 autophagy 及死亡是否有關聯為未來我們進一步要探討的方向。

剛轉譯出來的 AIF 為 67kDa 的蛋白，接著被切割成 62kDa 並鑲嵌在 mitochondrial inner membrane (IMM)上，當接受特定刺激後導致 MOMP 發生，AIF 會被 proteases 切割成 57 kDa AIF fragment 並從 IMS 進到細胞核，進而造成 large-scale DNA fragmentation (~50-300 kb)和染色質的濃縮，進而導致細胞死亡³⁰，研究指出 calpains 負責 AIF 的切割(Gly102/Leu103)³¹，而 calpains 是 calcium-dependent、non-lysosomal cysteine proteases，加上我們推測 HQ17(3)會影響造成細胞內[Ca²⁺]上升，可能因此活化 calpain 造成 AIF 從粒線體進到細胞核，進而造成 DNA 斷裂和染色質的濃縮，最後導致細胞死亡。另外，因 AIF 會導致約 50-300 kb 的 DNA 片段，與一般細胞凋亡造成~200bp 倍數大小的 DNA 片段不同，未來可以藉由分析 DNA 片段的大小來判斷 HQ17(3)造成的 DNA 片段是否是因 AIF 造成，進一步證實 AIF 執行細胞 caspase-independent cell death 的假設。

常見於兒童的急性淋巴白血病患者目前化療藥物的療法雖然能達到約 90%的五年無事件存活率(five-year event-free survival rate)^{9,10}，但 BCR-ABL⁺ ALL 和 T-ALL 其預後較差，最大的原因為抗藥性的產生，因此有必要發展出更有效的治療方式或藥物。從我們的研究中除了可看見低濃度 HQ17(3)單獨處理就有不錯效果外(圖一)，



也可看見 HQ17(3) 與治療急性淋巴白血病第一線藥物合併使用能增強對 ALL 細胞株的抑制效果(圖七); 雖然先前研究利用腹腔注射方式持續給予 F344 大鼠 1mg/kg 的 HQ17(3)¹⁸, 但並無偵測血漿中 HQ17(3) 的濃度為何, 且目前也沒有 HQ17(3) 對 primary ALL 細胞和 ALL 細胞在動物模型中的抑制效果的相關研究, 未來可以朝此方向探討以評估 HQ17(3) 或與第一線藥物搭配的未來發展性。

根據到目前的研究發現 HQ17(3) 進到 ALL 細胞後導致 mitochondrial transmembrane potential (MTP) loss, 且在 Jurkat 和 SUP-B15 細胞分別導致 caspase-dependent 和 caspase-independent cell death; HQ17(3) 對 SUP-B15 細胞造成 mTOR-independent autophagy, 利用 autophagy 抑制劑和用 shRNA knockdown Beclin1 皆能挽救 HQ17(3) 造成的細胞死亡, 另外在 SUP-B15 細胞中會導致內質網壓力, 此壓力可能為細胞產生 autophagy 和死亡的原因, 其中可能透過 Ca^{2+} 為媒介進而導致細胞發生 autophagy、MTP loss 或細胞死亡。(圖十六)

參考文獻



- 1 Pui, C. H. & Evans, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* **354**, 166-178, doi:10.1056/NEJMra052603 (2006).
- 2 Pui, C. H., Relling, M. V. & Downing, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* **350**, 1535-1548, doi:10.1056/NEJMra023001 (2004).
- 3 Pui, C. H., Robison, L. L. & Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)* **371**, 1030-1043, doi:10.1016/s0140-6736(08)60457-2 (2008).
- 4 Lo Nigro, L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology* **35**, 245-252, doi:10.1097/MPH.0b013e31828f8746 (2013).
- 5 中華民國兒童癌症基金會. 兒童白血病. (2007).
- 6 長庚紀念醫院. 認識成人急性白血病 (Acute Leukemia) (長庚紀念醫院衛教手冊).
- 7 Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **62**, 10-29, doi:10.3322/caac.20138 (2012).
- 8 衛生福利部國民健康署. 中華民國 102 年癌症登記報告. (2016).
- 9 Faderl, S., O'Brien, S., Pui, C. H., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D. & Kantarjian, H. M. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* **116**, 1165-1176, doi:10.1002/cncr.24862 (2010).
- 10 Inaba, H., Greaves, M. & Mullighan, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)* **381**, 1943-1955,

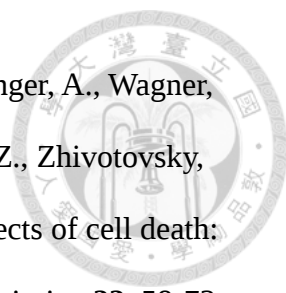


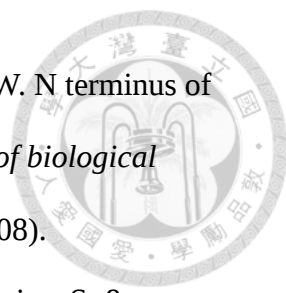
- doi:10.1016/s0140-6736(12)62187-4 (2013).
- 11 Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Chen, I. M., Wharton, W., Mikhail, F. M., Carroll, A. J., Kang, H., Liu, W., Dobbin, K. K., Smith, M. A., Carroll, W. L., Devidas, M., Bowman, W. P., Camitta, B. M., Reaman, G. H., Hunger, S. P., Downing, J. R. & Willman, C. L. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 5312-5321, doi:10.1182/blood-2009-09-245944 (2010).
 - 12 Pui, C. H. & Jeha, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 149-165, doi:10.1038/nrd2240 (2007).
 - 13 Lindsey, R. H., Jr., Bender, R. P. & Osheroff, N. Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. *Chemical research in toxicology* **18**, 761-770, doi:10.1021/tx049659z (2005).
 - 14 Regev, L., Wu, M., Zlotolow, R. & Brautbar, N. Hydroquinone, a benzene metabolite, and leukemia: a case report and review of the literature. *Toxicology and industrial health* **28**, 64-73, doi:10.1177/0748233711404037 (2012).
 - 15 Siew, E. L., Chan, K. M., Williams, G. T., Ross, D. & Inayat-Hussain, S. H. Protection of hydroquinone-induced apoptosis by downregulation of Fau is mediated by NQO1. *Free radical biology & medicine* **53**, 1616-1624, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.046 (2012).
 - 16 Inayat-Hussain, S. H. & Ross, D. Intrinsic pathway of hydroquinone induced apoptosis occurs via both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Chemical research in toxicology* **18**, 420-427,



- doi:10.1021/tx049762o (2005).
- 17 Wu, P. L., Lin, S. B., Huang, C. P. & Chiou, R. Y. Antioxidative and cytotoxic compounds extracted from the sap of *Rhus succedanea*. *Journal of natural products* **65**, 1719-1721 (2002).
- 18 Huang, C. P., Fang, W. H., Lin, L. I., Chiou, R. Y., Kan, L. S., Chi, N. H., Chen, Y. R., Lin, T. Y. & Lin, S. B. Anticancer activity of botanical alkyl hydroquinones attributed to topoisomerase II poisoning. *Toxicology and applied pharmacology* **227**, 331-338, doi:10.1016/j.taap.2007.11.014 (2008).
- 19 Lin, T. Y., Huang, C. P., Au, L. C., Chang, Y. W., Hu, C. Y. & Lin, S. B. A cysteine-reactive alkyl hydroquinone modifies topoisomerase II α , enhances DNA breakage, and induces apoptosis in cancer cells. *Chemical research in toxicology* **25**, 2340-2351, doi:10.1021/tx3002302 (2012).
- 20 張耀仁. Master Thesis : Inhibitory effects of the botanical alkyl hydroquinone derivative HQ17(3) on acute lymphoblastic leukemia SUP-B15 cells harboring Philadelphia chromosome. (2013).
- 21 高意雯. Master Thesis : The effects of the botanical alkyl hydroquinone derivative HQ17(3) on acute lymphoblastic leukemia cell lines, RS(4;11) harboring t(4;11) chromosome translocation. (2011).
- 22 Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature

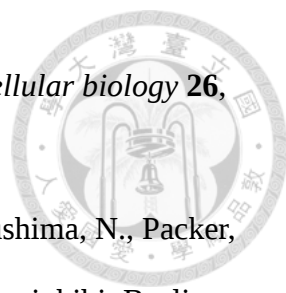
- 
- Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* **19**, 107-120, doi:10.1038/cdd.2011.96 (2012).
- 23 Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337 (2007).
- 24 Chaitanya, G. V., Steven, A. J. & Babu, P. P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell communication and signaling : CCS* **8**, 31, doi:10.1186/1478-811x-8-31 (2010).
- 25 Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., Di Daniele, N., Dixit, V. M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Fimia, G. M., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M. L., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P. J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Munoz-Pinedo, C., Nunez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J. M., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Ravichandran, K. S., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H. U., Stockwell, B. R., Szabadkai, G., Tait, S. W., Tang, H. L., Tavernarakis,

- 
- N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E. F., Walczak, H., White, E., Wood, W. G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation* **22**, 58-73, doi:10.1038/cdd.2014.137 (2015).
- 26 Lynne Cassimeris, G. P., Vishwanath R. Lingappa Lewin's CELLS 2nd Edition.
- 27 Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *The Journal of biological chemistry* **277**, 432-438, doi:10.1074/jbc.M109721200 (2002).
- 28 Broker, L. E., Kruyt, F. A. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 3155-3162, doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-2223 (2005).
- 29 Kroemer, G. & Martin, S. J. Caspase-independent cell death. *Nature medicine* **11**, 725-730, doi:10.1038/nm1263 (2005).
- 30 Norberg, E., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and biophysical research communications* **396**, 95-100, doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.163 (2010).
- 31 Yuste, V. J., Moubarak, R. S., Delettre, C., Bras, M., Sancho, P., Robert, N., d'Alayer, J. & Susin, S. A. Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell death and differentiation* **12**, 1445-1448, doi:10.1038/sj.cdd.4401687 (2005).

- 
- 32 Badugu, R., Garcia, M., Bondada, V., Joshi, A. & Geddes, J. W. N terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. *The Journal of biological chemistry* **283**, 3409-3417, doi:10.1074/jbc.M706851200 (2008).
- 33 Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlen, P., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell death and differentiation* **15**, 1857-1864, doi:10.1038/cdd.2008.123 (2008).
- 34 Norberg, E., Gogvadze, V., Vakifahmetoglu, H., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing. *Free radical biology & medicine* **48**, 791-797, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.020 (2010).
- 35 Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A. & Yuan, J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology* **1**, 112-119, doi:10.1038/nchembio711 (2005).
- 36 Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 700-714, doi:10.1038/nrm2970 (2010).
- 37 Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R. J. & Yuan, J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* **135**, 1311-1323, doi:10.1016/j.cell.2008.10.044 (2008).
- 38 Kreuzaler, P. & Watson, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? *Nature reviews. Cancer* **12**, 411-424, doi:10.1038/nrc3264 (2012).
- 39 Boya, P. & Kroemer, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death.

- 
- Oncogene* **27**, 6434-6451, doi:10.1038/onc.2008.310 (2008).
- 40 Kroemer, G. & Jaattela, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews. Cancer* **5**, 886-897, doi:10.1038/nrc1738 (2005).
- 41 Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42, doi:10.1016/j.cell.2007.12.018 (2008).
- 42 Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 741-752, doi:10.1038/nrm2239 (2007).
- 43 Gerondakis, S., Fulford, T. S., Messina, N. L. & Grumont, R. J. NF-kappaB control of T cell development. *Nature immunology* **15**, 15-25, doi:10.1038/ni.2785 (2014).
- 44 Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684, doi:10.1038/sj.onc.1209954 (2006).
- 45 Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706-6716, doi:10.1038/sj.onc.1209933 (2006).
- 46 Flamment, M., Hajdуч, E., Ferre, P. & Fougelle, F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**, 381-390, doi:10.1016/j.tem.2012.06.003 (2012).
- 47 Hoyer-Hansen, M. & Jaattela, M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell death and differentiation* **14**, 1576-1582, doi:10.1038/sj.cdd.4402200 (2007).
- 48 Kharabi Masouleh, B., Chevet, E., Panse, J., Jost, E., O'Dwyer, M., Bruemmendorf, T. H. & Samali, A. Drugging the unfolded protein response in acute leukemias. *Journal of hematology & oncology* **8**, 87,

- doi:10.1186/s13045-015-0184-7 (2015).
- 49 Sano, R. & Reed, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 3460-3470, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028 (2013).
- 50 Uemura, A., Oku, M., Mori, K. & Yoshida, H. Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *Journal of cell science* **122**, 2877-2886, doi:10.1242/jcs.040584 (2009).
- 51 Kawamata, H. & Manfredi, G. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of ageing and development* **131**, 517-526, doi:10.1016/j.mad.2010.05.003 (2010).
- 52 Li, G., Mongillo, M., Chin, K. T., Harding, H., Ron, D., Marks, A. R. & Tabas, I. Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of cell biology* **186**, 783-792, doi:10.1083/jcb.200904060 (2009).
- 53 Bernales, S., McDonald, K. L. & Walter, P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS biology* **4**, e423, doi:10.1371/journal.pbio.0040423 (2006).
- 54 Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I. S. & Jaattela, M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Molecular cell* **25**, 193-205, doi:10.1016/j.molcel.2006.12.009 (2007).
- 55 Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F. & Imaizumi, K. Autophagy is activated for cell

- 
- survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* **26**, 9220-9231, doi:10.1128/mcb.01453-06 (2006).
- 56 Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. & Levine, B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939, doi:10.1016/j.cell.2005.07.002 (2005).
- 57 Sakaki, K. & Kaufman, R. J. Regulation of ER stress-induced macroautophagy by protein kinase C. *Autophagy* **4**, 841-843 (2008).
- 58 Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E. & Momoi, T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell death and differentiation* **14**, 230-239, doi:10.1038/sj.cdd.4401984 (2007).
- 59 Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., Karamariti, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Zhang, Z., Wang, W., Jiang, Z., Gao, C., Ma, B., Chen, Y. G., Cockerill, G., Hu, Y., Xu, Q. & Zeng, L. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry* **288**, 859-872, doi:10.1074/jbc.M112.412783 (2013).
- 60 Yang, T. T., Sinai, P. & Kain, S. R. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Analytical biochemistry* **241**, 103-108, doi:10.1006/abio.1996.0383 (1996).
- 61 Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y. T., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Fabre, C., Minami, J., Ohguchi, H., Kiziltepe, T., Ikeda, H., Kawano, Y., French, M., Blumenthal, M., Tam, V., Kertesz, N. L., Malyankar, U. M., Hokenson, M.,



- Pham, T., Zeng, Q., Patterson, J. B., Richardson, P. G., Munshi, N. C. & Anderson, K. C. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* **119**, 5772-5781, doi:10.1182/blood-2011-07-366633 (2012).
- 62 Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R. & Tashiro, Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* **23**, 33-42 (1998).
- 63 Xia, T., Wang, J., Wang, Y., Wang, Y., Cai, J., Wang, M., Chen, Q., Song, J., Yu, Z., Huang, W. & Fang, J. Inhibition of autophagy potentiates anticancer property of 20(S)-ginsenoside Rh2 by promoting mitochondria-dependent apoptosis in human acute lymphoblastic leukaemia cells. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.8285 (2016).
- 64 Chou, S. D., Prince, T., Gong, J. & Calderwood, S. K. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. *PloS one* **7**, e39679, doi:10.1371/journal.pone.0039679 (2012).
- 65 Fournier, M. J., Coudert, L., Mellaoui, S., Adjibade, P., Gareau, C., Cote, M. F., Sonenberg, N., Gaudreault, R. C. & Mazroui, R. Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation. *Molecular and cellular biology* **33**, 2285-2301, doi:10.1128/mcb.01517-12 (2013).
- 66 Concha, C., Monardes, A., Even, Y., Morin, V., Puchi, M., Imschenetzky, M. & Genevriere, A. M. Inhibition of cysteine protease activity disturbs DNA replication and prevents mitosis in the early mitotic cell cycles of sea urchin embryos. *Journal of cellular physiology* **204**, 693-703, doi:10.1002/jcp.20338

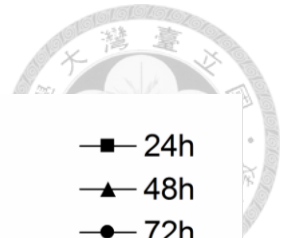
- (2005).
- 67 Goulet, B., Baruch, A., Moon, N. S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogyo, M. & Nepveu, A. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Molecular cell* **14**, 207-219 (2004).
- 68 Goulet, B., Sansregret, L., Leduy, L., Bogyo, M., Weber, E., Chauhan, S. S. & Nepveu, A. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation. *Molecular cancer research : MCR* **5**, 899-907, doi:10.1158/1541-7786.mcr-07-0160 (2007).
- 69 Pislari, A., Perisic Nanut, M. & Kos, J. Lysosomal cysteine peptidases - Molecules signaling tumor cell death and survival. *Seminars in cancer biology* **35**, 168-179, doi:10.1016/j.semcancer.2015.08.001 (2015).
- 70 Zavasnik-Bergant, T. & Turk, B. Cysteine proteases: destruction ability versus immunomodulation capacity in immune cells. *Biological chemistry* **388**, 1141-1149, doi:10.1515/bc.2007.144 (2007).
- 71 Benes, P., Vetvicka, V. & Fusek, M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Critical reviews in oncology/hematology* **68**, 12-28, doi:10.1016/j.critrevonc.2008.02.008 (2008).
- 72 Zalckvar, E., Berissi, H., Eisenstein, M. & Kimchi, A. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* **5**, 720-722 (2009).
- 73 Khan, M. T. & Joseph, S. K. Role of inositol trisphosphate receptors in autophagy in DT40 cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 16912-16920, doi:10.1074/jbc.M110.114207 (2010).
- 74 Gulati, P., Gaspers, L. D., Dann, S. G., Joaquin, M., Nobukuni, T., Natt, F.,



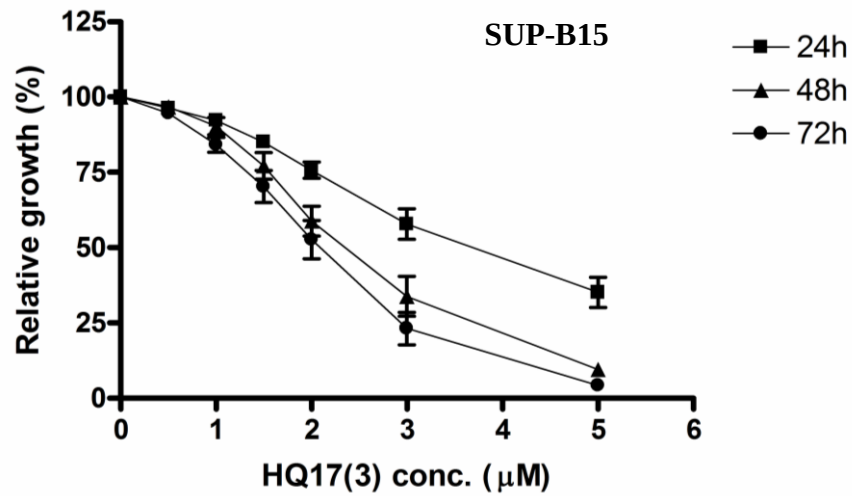
- Kozma, S. C., Thomas, A. P. & Thomas, G. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca^{2+} /CaM signaling to hVps34. *Cell metabolism* **7**, 456-465, doi:10.1016/j.cmet.2008.03.002 (2008).
- 75 Hansford, R. G. Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **23**, 823-854 (1991).
- 76 Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A. & Rizzuto, R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13807-13812 (1999).
- 77 Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T. & Snyder, S. H. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature cell biology* **5**, 1051-1061, doi:10.1038/ncb1063 (2003).
- 78 Kharabi Masouleh, B., Geng, H., Hurtz, C., Chan, L. N., Logan, A. C., Chang, M. S., Huang, C., Swaminathan, S., Sun, H., Paietta, E., Melnick, A. M., Koeffler, P. & Muschen, M. Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E2219-2228, doi:10.1073/pnas.1400958111 (2014).
- 79 Tanimura, A., Yujiri, T., Tanaka, Y., Hatanaka, M., Mitani, N., Nakamura, Y., Mori, K. & Tanizawa, Y. The anti-apoptotic role of the unfolded protein response in Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Leukemia research* **33**, 924-928, doi:10.1016/j.leukres.2009.01.027 (2009).



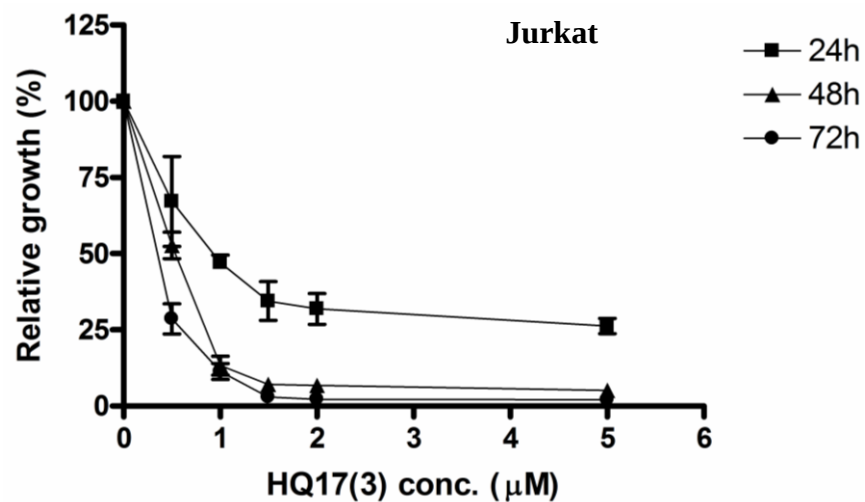
圖與表



(A)



(B)

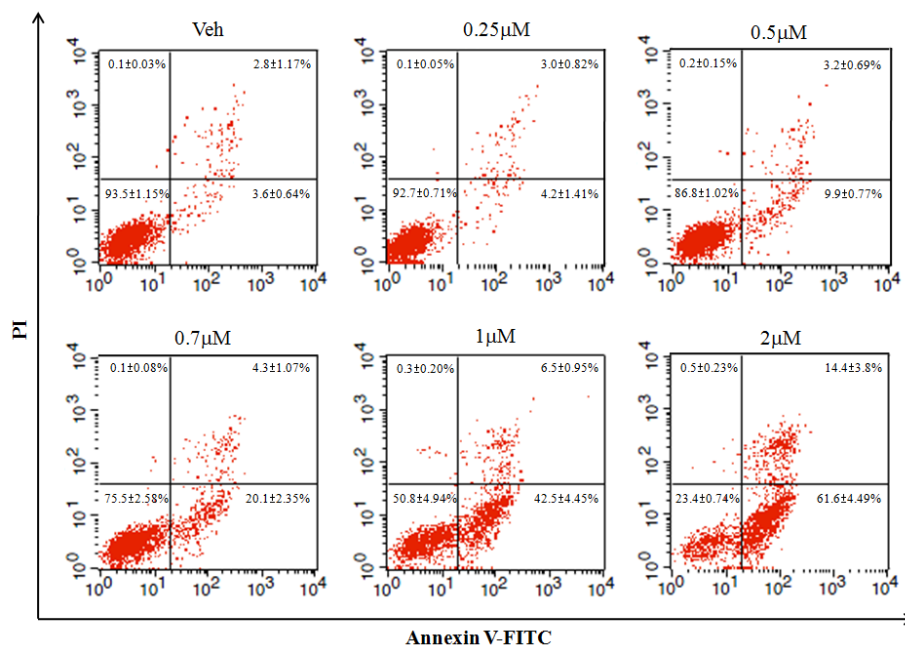


圖一、HQ17(3)抑制 ALL 細胞株的生長

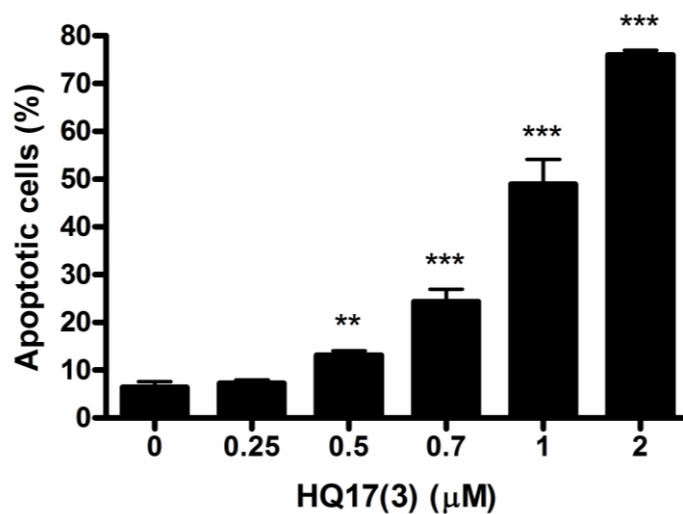
將細胞接種於 96 孔盤中(SUP-B15 : 5×10^4 /well ; Jurkat : 1×10^4 /well)，處理不同濃度(0、0.5、1、1.5、2、3、5 μ M)的 HQ17(3)，分別於 24、48、72 小時候進行 ACP assay 分析細胞活性，以各時間點的 Veh 組別當作 100%活性，計算各濃度及時間處理下的相對細胞活性，以 relative growth (%)表示之。圖中每一點為三次獨立實驗平均，標準誤標示於圖上。(A)和(B)分別代表 SUP-B15 和 Jurkat 細胞。以 Compusyn 軟體計算三天的 IC_{50} 如下：

	IC_{50} (μ M) (mean $\pm$ SEM)		
	24h	48h	72h
SUP-B15	3.83 $\pm$ 0.44	2.26 $\pm$ 0.20	1.83 $\pm$ 0.13
Jurkat	0.95 $\pm$ 0.39	0.31 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.01

(A)



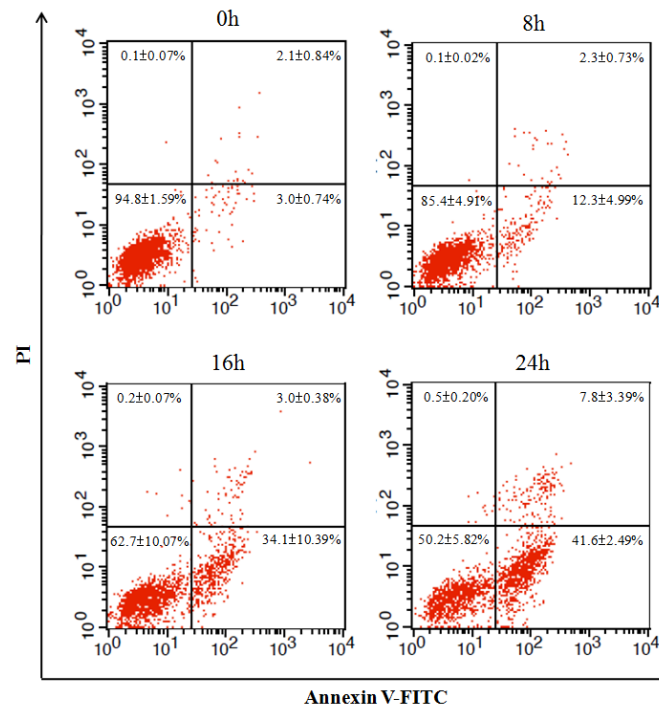
(B)



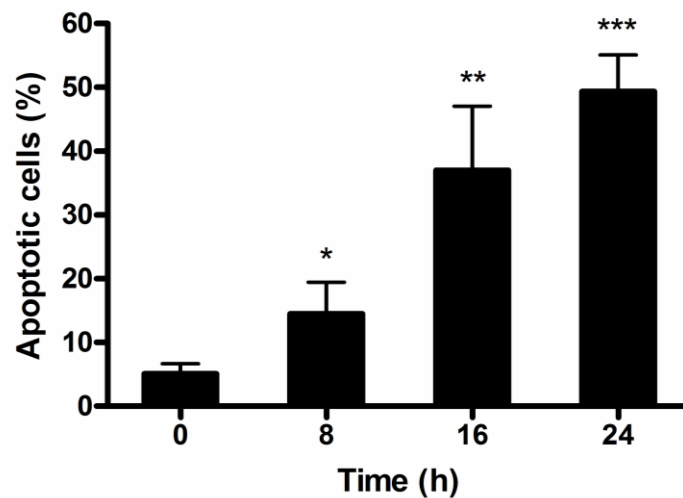
圖二、HQ17(3)促使 Jurkat 細胞膜 phosphatidylserine (PS)外翻、細胞膜受損
 於 24 孔盤中接種 2×10^5 個 Jurkat 細胞，處理不同濃度(0、0.25、0.5、0.7、1、2 μM)
 的 HQ17(3)，於 24 小時後進行 Annexin V/PI 染色分析。(A)流式細胞儀結果分析
 圖。(B)三次實驗平均量化圖，apoptotic cell (%)定義為 Annexin V⁺的細胞比例，
 標準差畫於其上，利用 t-test 統計分析，各組別與 Veh 組相比。不同濃度 HQ17(3)
 處理後 apoptotic cells 比例如下：0 μM ($6.46 \pm 1.13\%$)、0.25 μM ($7.21 \pm 0.75\%$)、0.5 μM
 ($13.07 \pm 0.97\%$)、0.7 μM ($24.37 \pm 2.59\%$)、1 μM ($48.97 \pm 5.14\%$)、2 μM ($76.04 \pm 0.94\%$)。
 *表與 Veh 組別相比，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



(A)

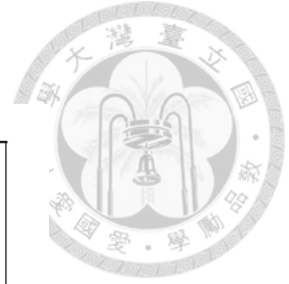


(B)

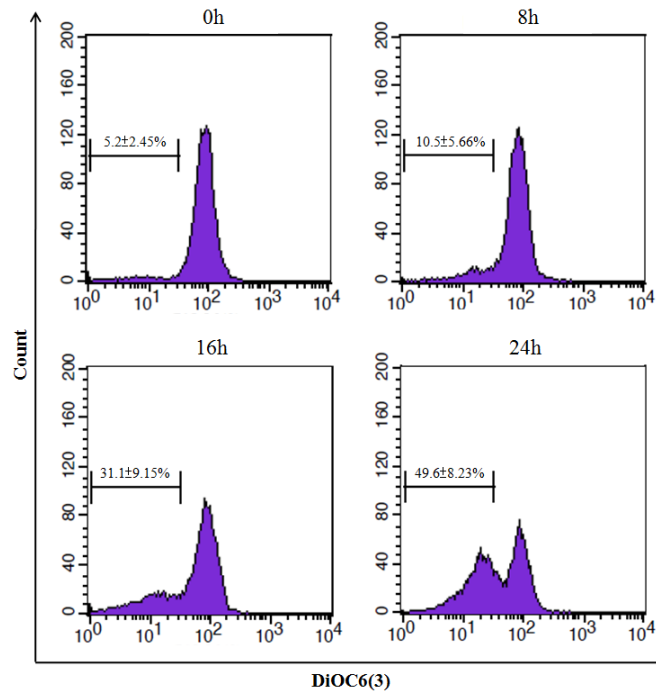


圖三、HQ17(3)處理 8 小時，Jurkat 細胞開始出現顯著死亡

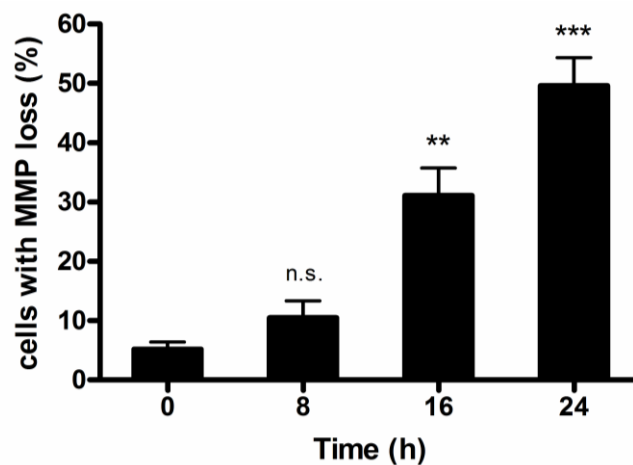
於 24 孔盤中接種 2×10^5 個 Jurkat，以 $1 \mu\text{M}$ HQ17(3)處理後，於不同時間點進行 Annexin V/PI 染色分析。(A)流式細胞儀結果分析圖。(B)四次實驗平均量化圖，apoptotic cell (%)定義為 Annexin V⁺的細胞比例，標準差畫於其上，各時間點與 0 小時相比，利用 t-test 統計分析，顯示 8 小時開始出現有統計意義的死亡。HQ17(3)處理後各時間點 apoptotic cells 比例如下：0h ($5.09 \pm 1.58\%$)、8h ($14.51 \pm 4.90\%$)、16h ($37.05 \pm 10.02\%$)、24h ($49.35 \pm 5.73\%$)。*表與 Veh 組別相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



(A)

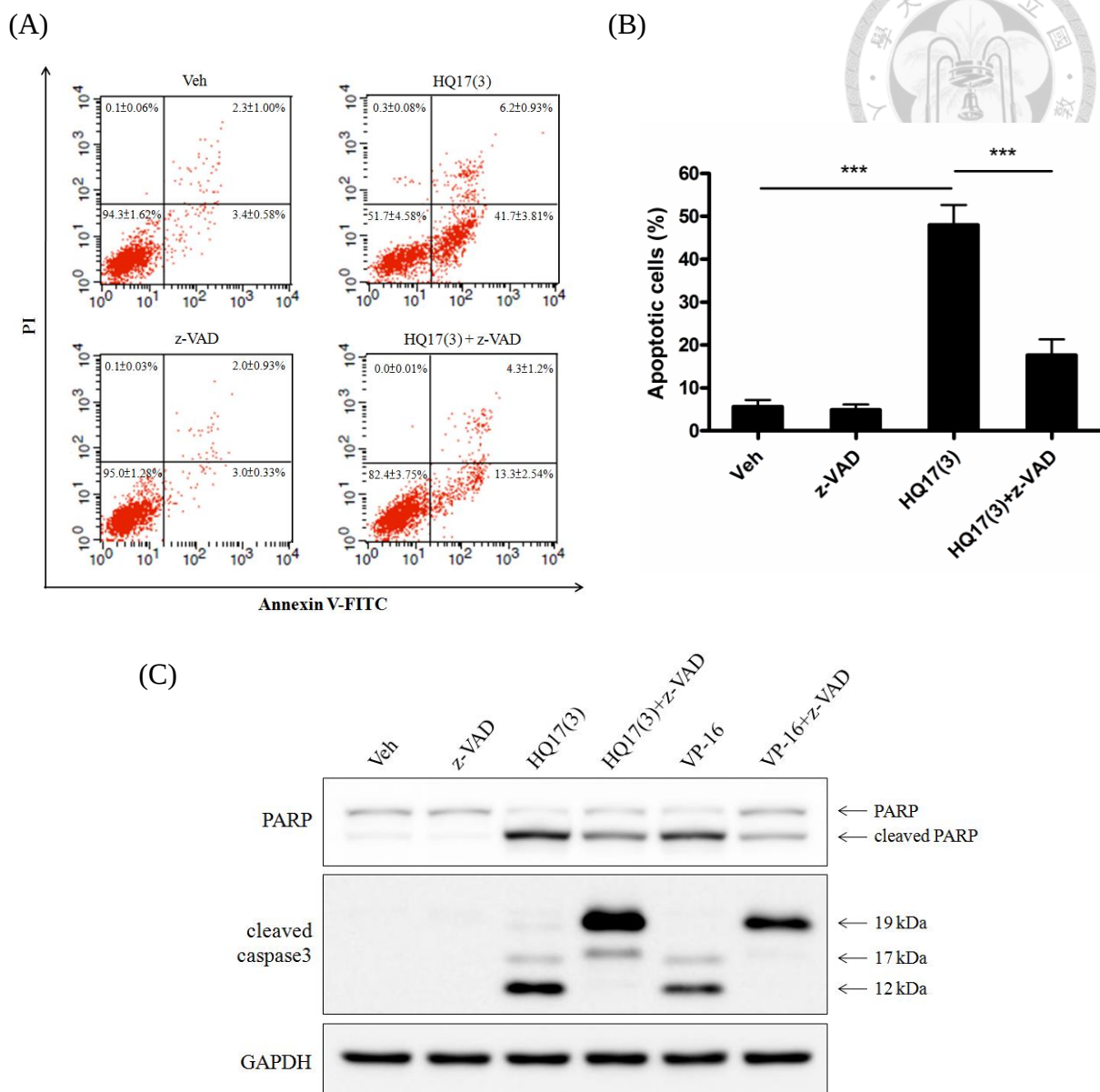


(B)



圖四、HQ17(3)處理 16 小時，Jurkat 細胞失去粒線體膜電位

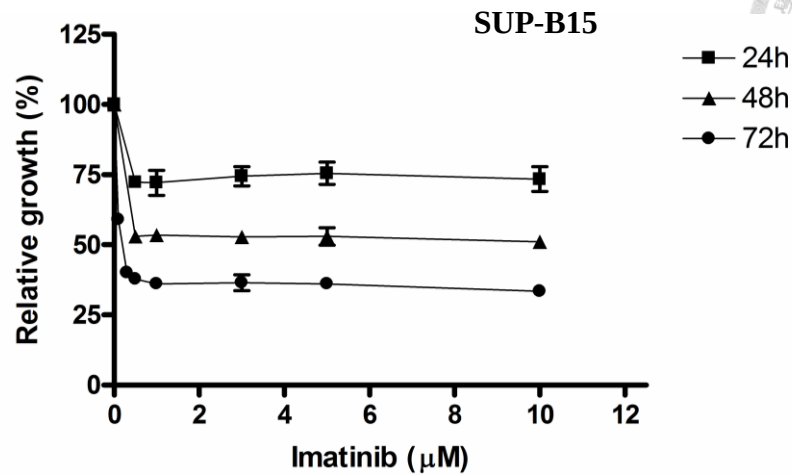
於 24 孔盤中接種 2×10^5 個 Jurkat 細胞，以 $1 \mu\text{M}$ HQ17(3)處理後，於不同時間點進行 DiOC₆(3)染色後以流式細胞儀分析。(A)流式細胞儀結果分析圖。(B)四次實驗平均量化圖，標準差畫於其上，各時間點 MMP loss (%)與 0 小時相比，利用 t-test 統計分析，顯示 16 小時開始出現有統計意義的變化。HQ17(3)處理後各時間點 MMP loss 的細胞比例如下：0h ($5.2 \pm 2.45\%$)、8h ($10.5 \pm 5.66\%$)、16h ($31.1 \pm 9.15\%$)、24h ($49.6 \pm 8.23\%$)。*表與 Veh 組別相比，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



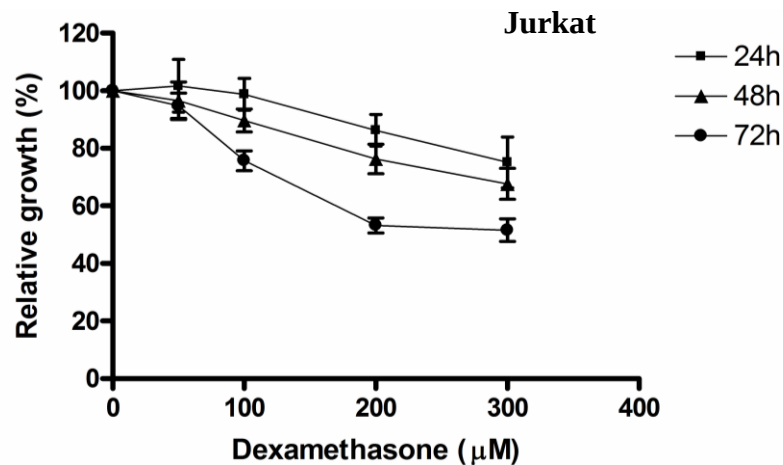
圖五、HQ17(3)對 Jurkat 細胞引起 caspase-dependent cell death

以 1 μ M 的 HQ17(3) 或 10 μ M 的 z-VAD 單獨處理或共同處理 24 小時後進行 Annexin V/PI 染色或 Western blot。(A)、(B) 圖中顯示 HQ17(3) 和 z-VAD 同時處理可挽救 HQ17(3) 導致的細胞死亡。(B) 三次實驗平均量化圖，apoptotic cell (%) 定義為 Annexin V⁺ 的細胞比例，標準差畫於其上，利用 t-test 統計分析，HQ17(3) 與 Veh 相比和 HQ17(3) 與 HQ17(3)+z-VAD 相比達統計意義。***p<0.001。(C) pro-form 的 caspase-3：經兩次切割後出現 17 和 12kDa cleaved form 代表 caspase-3 的活化。HQ17(3) 和 z-VAD 同時處理後，caspase-3 出現分子量停留在 19kDa，顯示 caspase-3 活性被抑制，無法完全活化因此不能執行功能。以 10 μ M 的 VP16 (Etoposide) 處理 24 小時當作實驗的陽性對照組。GAPDH 當作 loading control。

(A)



(B)

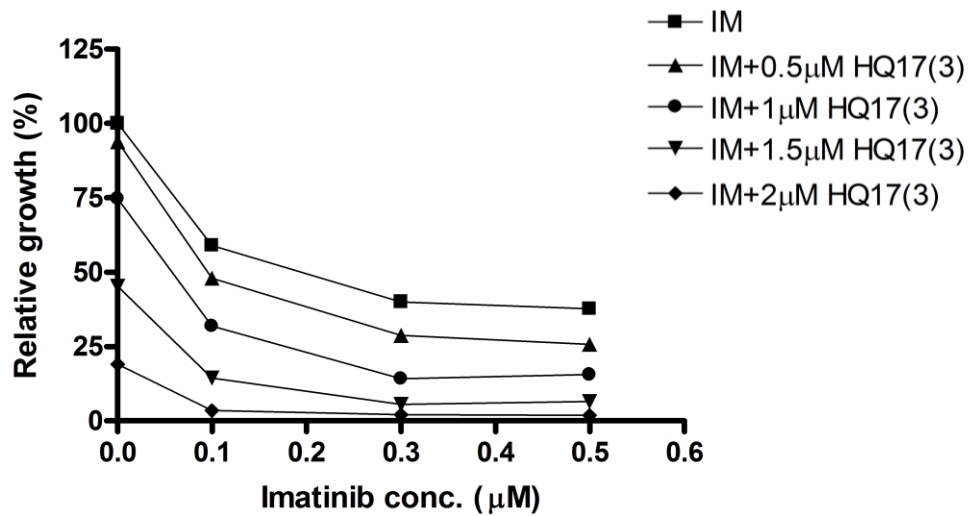


圖六、ALL 細胞株對化療藥物有抗性

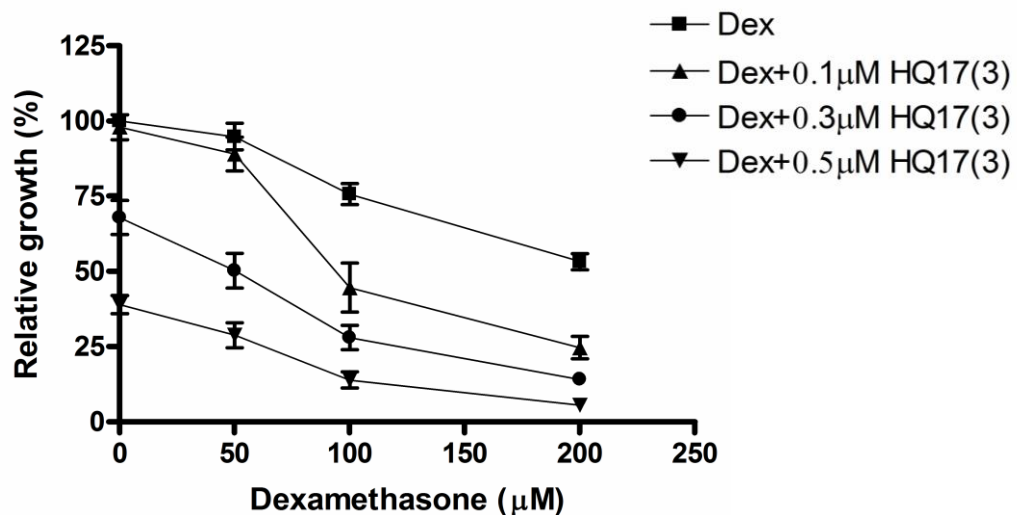
將細胞接種於 96 孔盤中(SUP-B15 : 5×10^4 /well ; Jurkat : 1×10^4 /well)，處理不同濃度 IM (0、0.1、0.3、0.5、1、3、5、10 μ M)或 Dex (0、10、50、100、200、300 μ M)，分別於 24、48、72 小時進行 ACP assay 分析細胞活性，以各時間點的 Veh 組別當作 100%活性，計算各濃度及時間 IM 與 Dex 處理下的相對細胞活性，以 relative growth (%)表示之。在 IM 處理 72 小時的實驗種有加做 0.1 和 0.3M 的濃度。圖中每一點為三次獨立實驗平均，標準誤標示於圖上。(A)和(B)分別代表 SUP-B15 和 Jurkat。以 Compusyn 軟體計算三天的 IC_{50} 如下：

	Drugs	IC_{50} (μ M) (mean $\pm$ SEM)		
		24h	48h	72h
SUP-B15	IM	>10	>10	0.11 $\pm$ 0.06
Jurkat	Dex	>300	>300	>300

(A) SUP-B15



(B) Jurkat

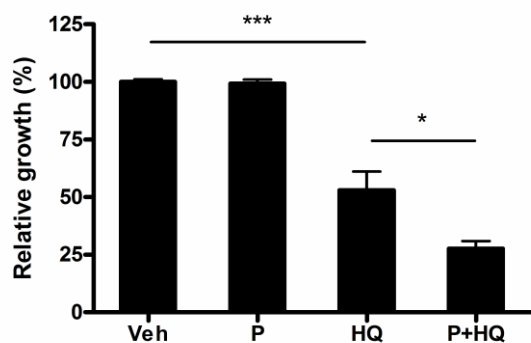


圖七、第一線淋巴性白血病藥物與 HQ17(3)合併使用可增加對 ALL 細胞的抑制效果

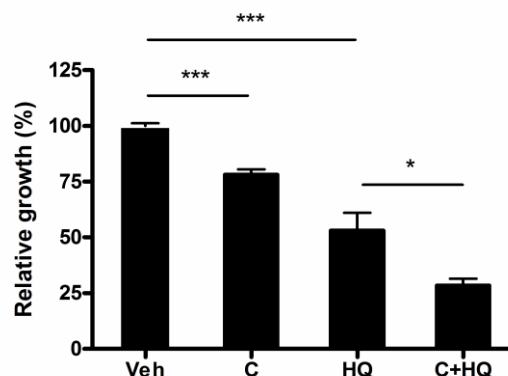
將細胞接種於 96 孔盤中(SUP-B15 : 5×10^4 /well ; Jurkat : 1×10^4 /well)，SUP-B15 細胞以不同濃度的 IM (0、0.1、0.3、0.5μM)與 HQ17(3) (0、0.5、1、1.5、2μM)相互搭配，Jurkat 細胞以不同濃度的 Dex (0、50、100、200μM)與 HQ17(3) (0、0.5、1、1.5、2μM)相互搭配，處理 72 小時後，利用 ACP assay 分析細胞活性，以 Veh 組別當作 100%活性，計算不同藥物濃度搭配處理下的細胞相對活性，以 relative growth (%)表示之。圖中每一點為三次獨立實驗平均，標準誤標示於圖上。(A)和(B)分別代表 SUP-B15 和 Jurkat。

IM : Imatinib。Dex : Dexamethasone。

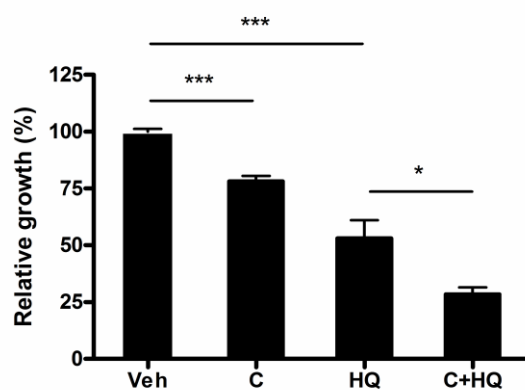
(A)



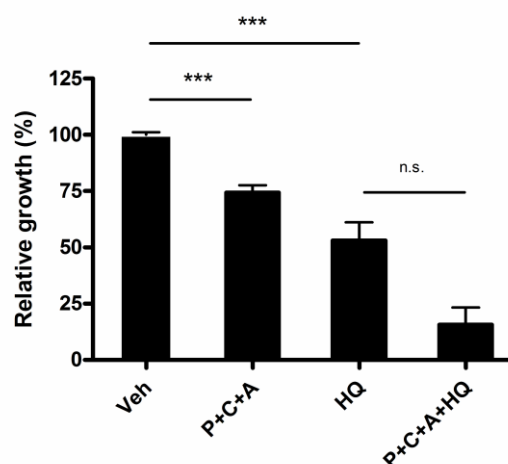
(B)



(C)



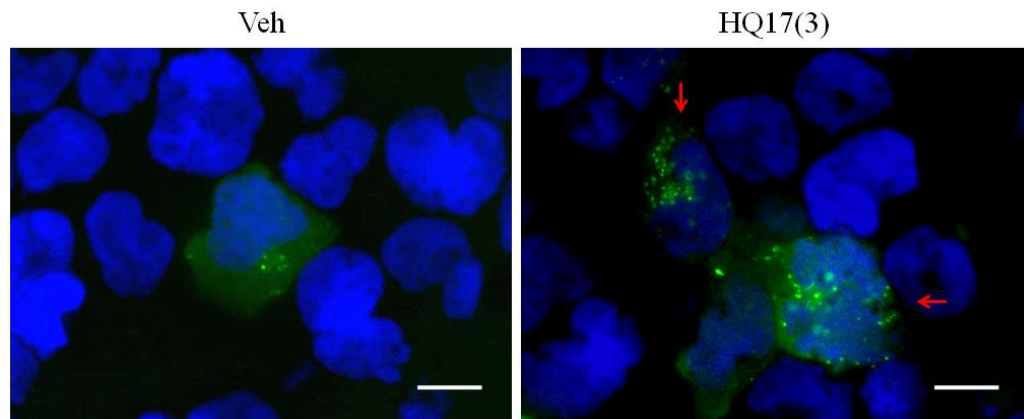
(D)



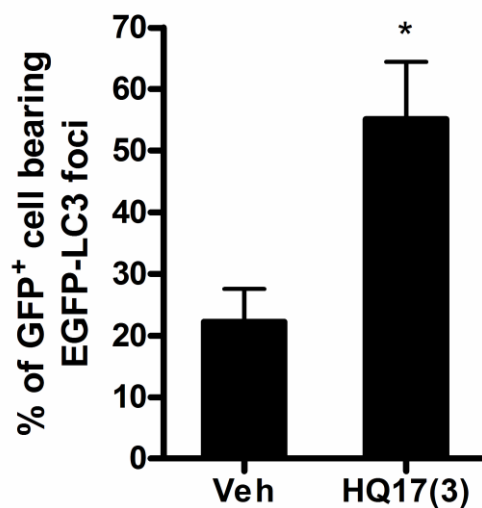
圖八、Cathepsins 不是 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞中引起死亡的 effector

將 SUP-B15 細胞接種於 96 孔盤中(5×10^4 /well)，預先處理不同種類的 cathepsin 抑制劑(50 μ M 的 Pepstatin A 處理 16h; 10 μ M 的 CA-074-Me 處理 1h; 20 μ M 的 AEBSF 處理 1h)，再用 2 μ M 的 HQ17(3)處理 48 小時，之後利用 ACP assay 分析細胞活性，以 Veh 組別當作 100%活性，計算各組相對的細胞活性，以 relative growth (%)表示之。圖中顯示三次獨立實驗，標準誤標示於圖上，利用 t-test 統計分析，P+HQ 和 C+HQ 與 HQ17(3)相比細胞活性有顯著下降。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。P：Pepstatin A。C：CA-074-Me。A：AEBSF。HQ：HQ17(3)。

(A)



(B)

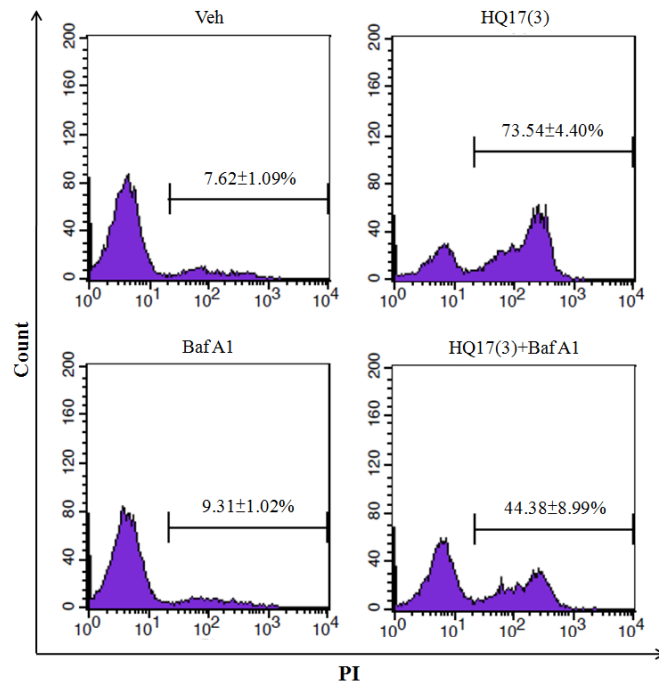


圖九、HQ17(3)對 SUP-B15 細胞引起 Autophagy

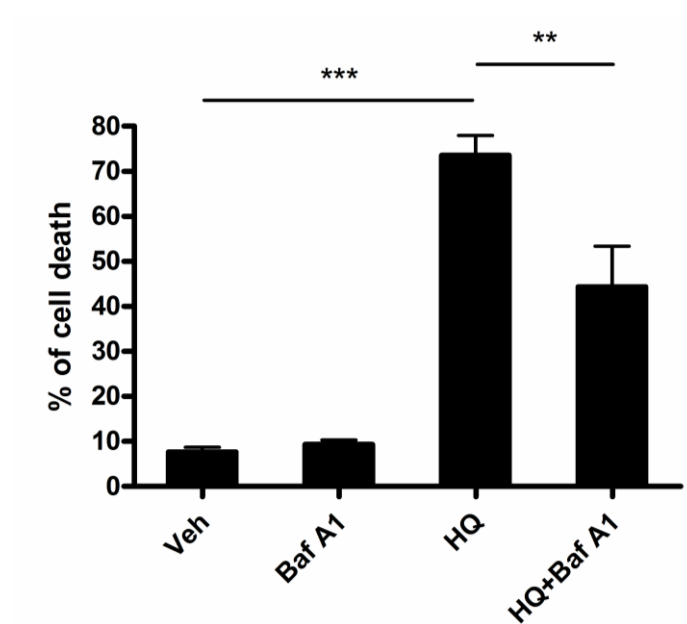
利用電穿孔方式將 pEGFP-LC3 質體送到細胞內，EGFP-LC3 帶有綠螢光。將電穿孔過後的細胞培養一個晚上後分成兩組，一組以 2 μ M 的 HQ17(3)處理 6 小時，一組以 DMSO (Veh)處理。將細胞以 cytospin 的方式打在載玻片上，以 methanol 固定，且用 DAPI 染細胞核，並利用螢光顯微鏡觀察。(A)螢光顯微鏡圖，Bar=10 μ m。(B)各實驗中綠螢光細胞內 puncta 超過 15 個的細胞比例平均量化圖。計數時以帶有綠螢光的細胞當作分母，以綠螢光細胞內綠螢光 puncta 超過 15 個當作有過度 autophagy 的細胞，每組至少拍 5 個(10x100 倍)視野。圖中顯示各實驗中綠螢光細胞內 puncta 超過 15 個的細胞比例平均，標準差畫於其上，利用 t-test 統計分析，HQ17(3)與 Veh 相比達統計意義。*表與 Veh 組別相比，*p<0.05。



(A)



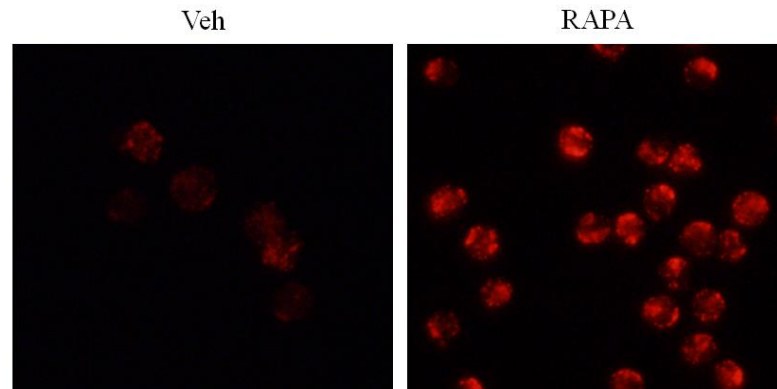
(B)



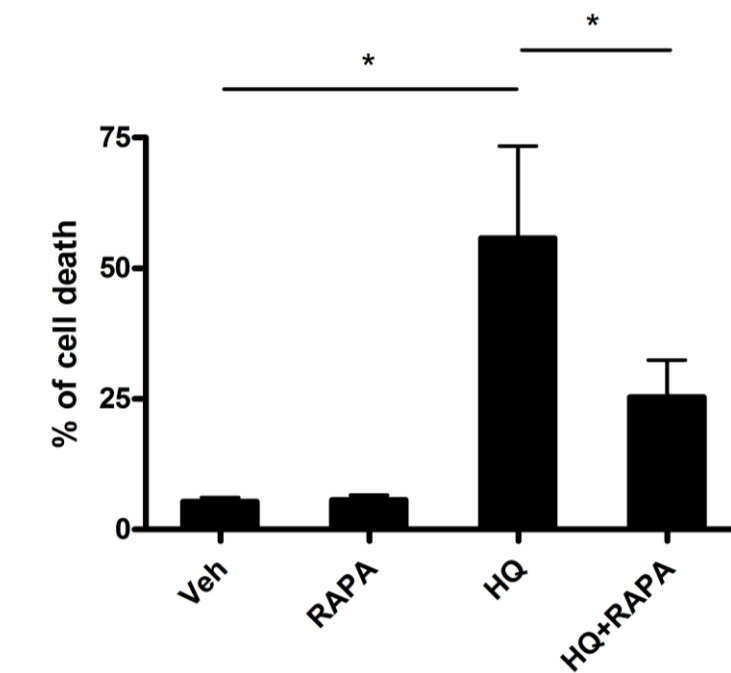
圖十、Bafilomycin A1 (Baf A1)部分減少 HQ17(3)導致的死亡

使用 3.5 μ M 的 HQ17(3)和 3nM 的 Baf A1 單獨處理或共同處理處理 24 小時後進行 propidium iodide (PI)染色。(A)流式細胞儀結果分析圖。(B)三次實驗平均量化圖，以 PI⁺的細胞定義為死細胞。圖中顯示三次獨立實驗，標準差標示於圖上，利用 t-test 統計分析，HQ17(3)+Baf A1 與 HQ17(3)單獨處理相比死細胞比例有顯著下降。
 p<0.01, *p<0.001。 Baf A1：Bafilomycin A1。HQ：HQ17(3)。

(A)



(B)

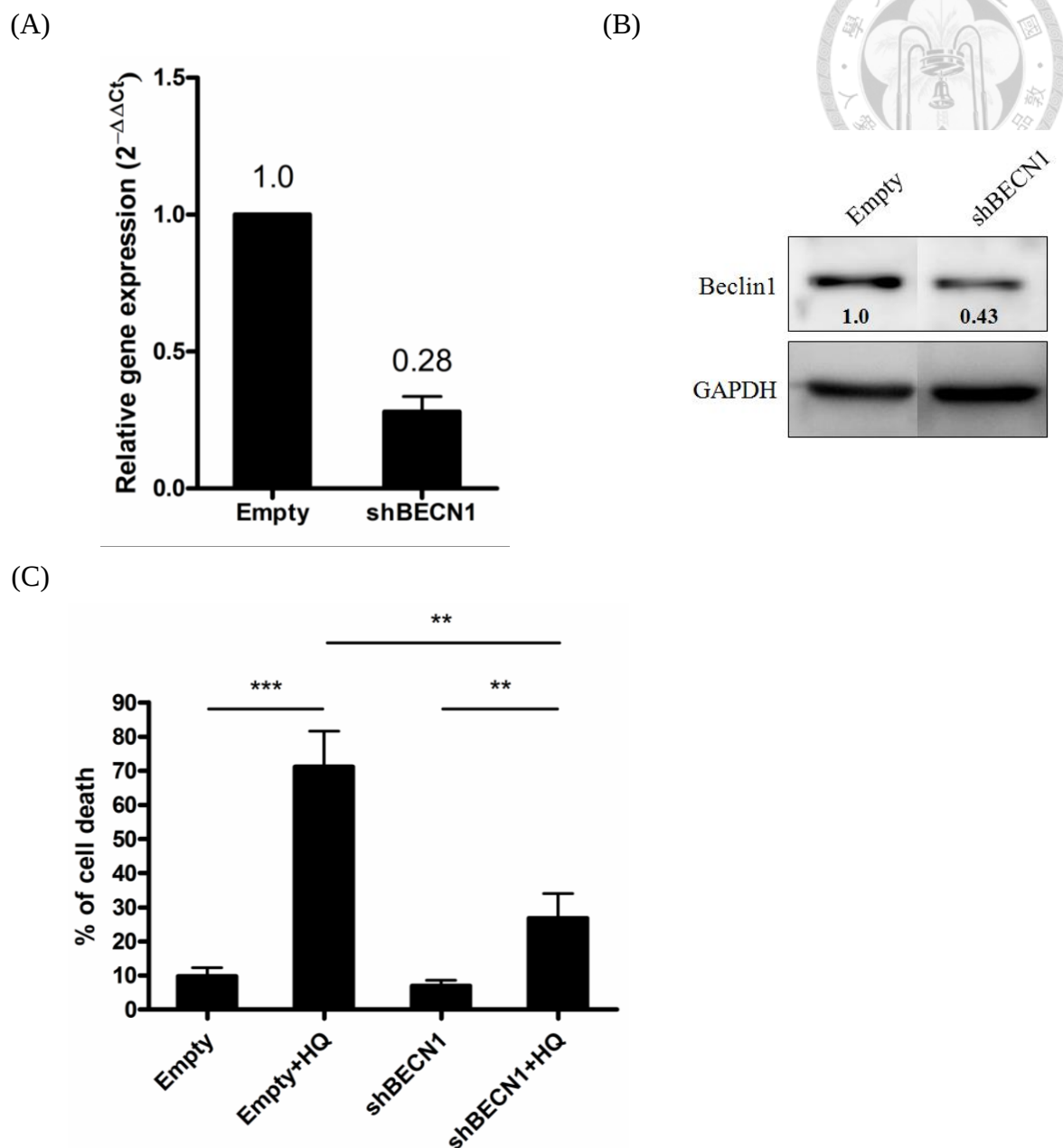


圖十一、Rapamycin (RAPA)部分減少 HQ17(3)導致的死亡

(A) 30nM RAPA 處理 SUP-B15 細胞 24 小時後，利用 acridine orange (AO) 染色的結果。使用 3.5 μ M 的 HQ17(3) 和 30nM 的 RAPA 單獨處理或共同處理 24 小時後進行 propidium iodide (PI) 染色。(B) 流式細胞儀分析結果之四次實驗平均量化圖，PI⁺的細胞定義為死細胞。圖中顯示四次獨立實驗，標準差標示於圖上，利用 t-test 統計分析，HQ17(3)+RAPA 與 HQ17(3) 單獨處理相比死細胞比例有顯著下降。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

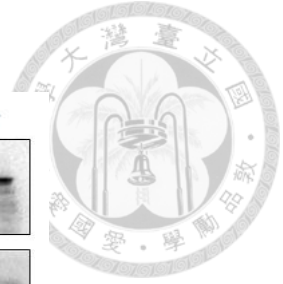
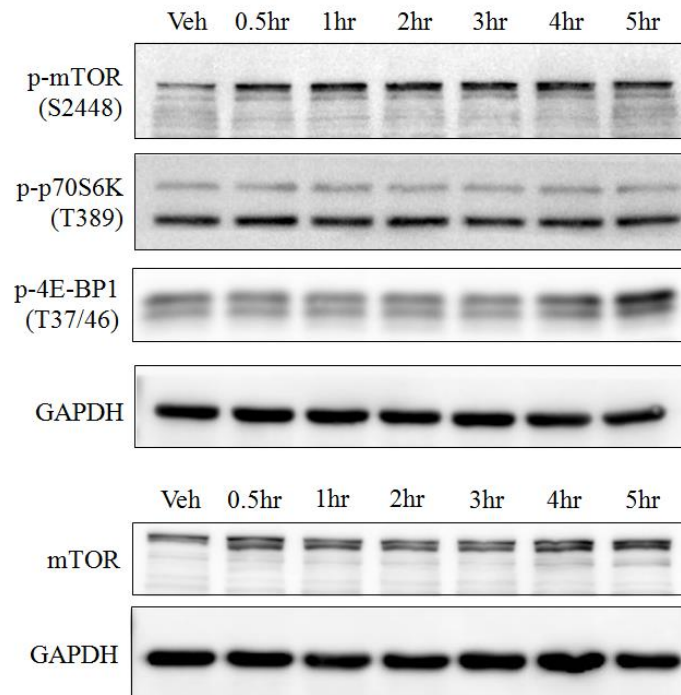
RAPA：Rapamycin。HQ：HQ17(3)。



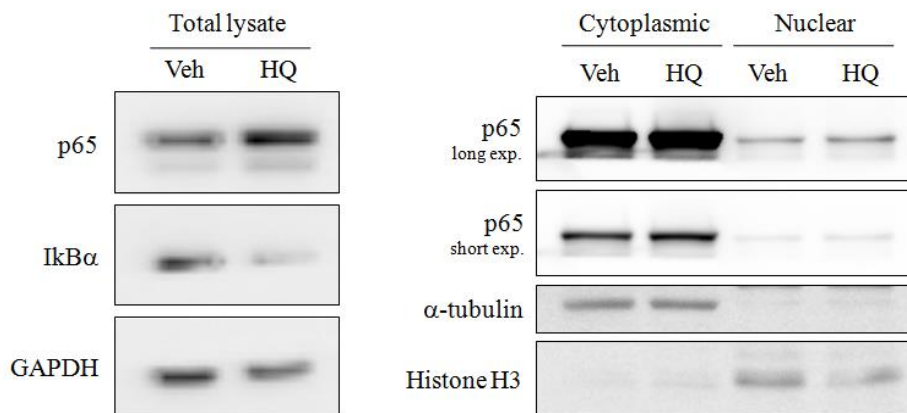
圖十二、Knockdown Beclin1 部分減少 HQ17(3)導致的死亡

利用 shRNA 方式 knockdown Beclin1，並用 3.5 μ M 的 HQ17(3)處理 24 小時後進行 Annexin V/PI 染色。(A)分別以 qRT-PCR 和西方墨點法分析 shBECN1 的 knockdown 效果，以 Empty 當作實驗控制組，以 GAPDH 當作 internal control，Beclin1 的表現以 GAPDH 表現量作標準化依據，以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因相對表現量。(C)流式細胞儀分析結果之三次實驗平均量化圖，PI⁺的細胞定義為死細胞。圖中顯示三次獨立實驗，標準差標示於圖上，利用 t-test 統計分析，shBECN1+HQ17(3)與 Empty+HQ17(3)相比，死細胞比例有顯著下降。**p<0.01, ***p<0.001。HQ：HQ17(3)。

(A)



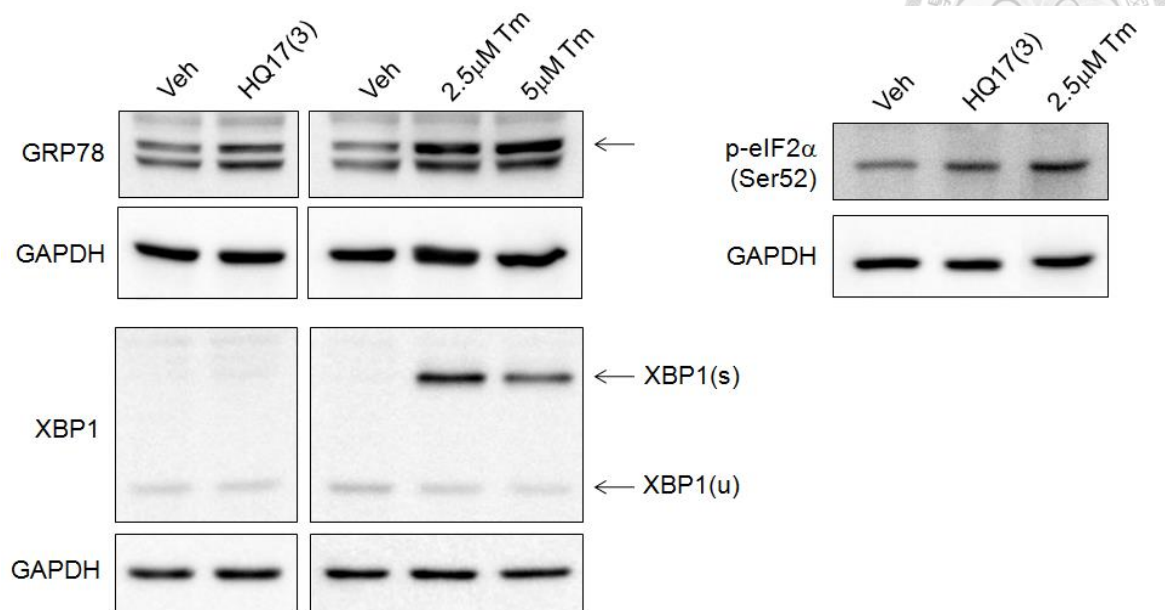
(B)



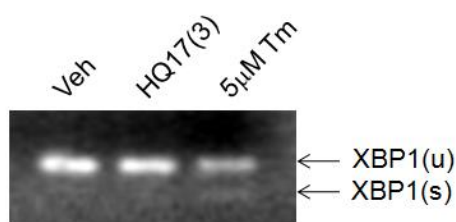
圖十三、HQ17(3)引起細胞壓力

將 SUP-B15 細胞用 2 μ M 的 HQ17(3)處理，到達指定時間後萃取細胞總蛋白或是利用 NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents 將細胞核和細胞質的蛋白分離，然後進行西方墨點法分析。(A) mTOR pathway 和其下游分子活化分析結果。(B) HQ17(3)處理 5 小時後抽取細胞蛋白，左圖為細胞總蛋白分析結果，右圖為細胞核和細胞質蛋白分離後的分析結果。以 GAPDH 當作分析總蛋白量的 loading control；分別以 α -tubulin 和 Histone H3 當作細胞質和細胞核的 loading control。HQ：HQ17(3)。

(A)



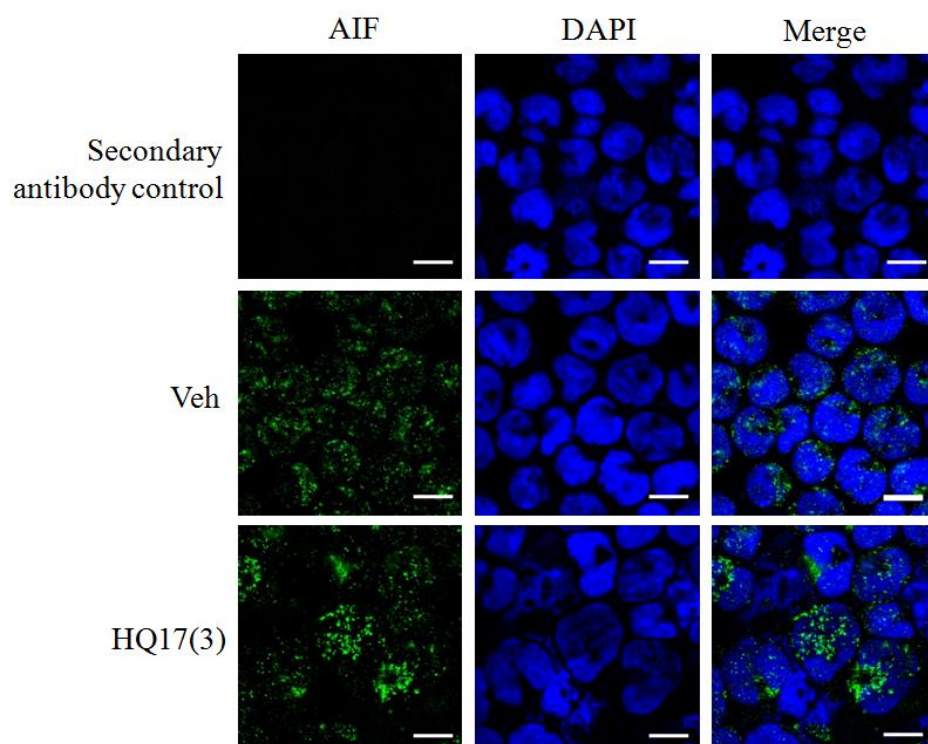
(B)



圖十四、HQ17(3)造成內質網壓力(ER stress)

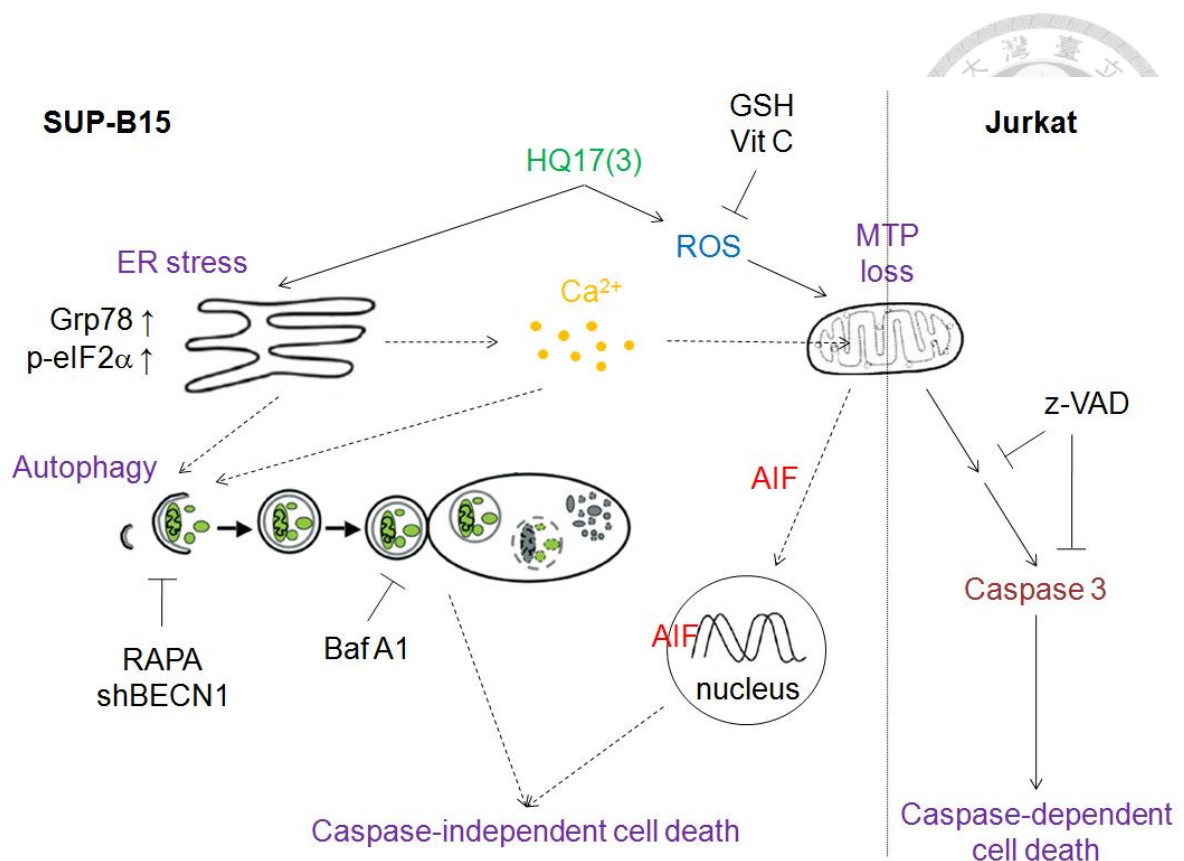
將 SUP-B15 細胞用 2μM 的 HQ17(3)處理 5 小時後，萃取細胞蛋白進行西方墨點法分析。以 Tunicamycin (Tm)處理 24 小時當作陽性對照組。(A)利用西方墨點法分析 ER stress 指標的結果，以 GAPDH 當作 loading control。(B)利用 RT-PCR 分析 XBP1 mRNA 是否被 splicing 結果。

XBP1(u)：unsplicing XBP1；XBP1(s)：splicing XBP1。



圖十五、HQ17(3)造成 DNA 斷裂可能由 Apoptosis-inducing factor (AIF)造成
 將 SUP-B15 細胞用 3.5 μ M 的 HQ17(3)處理 24 小時進行免疫螢光染色的分析結果。

Bar = 10 μ m。



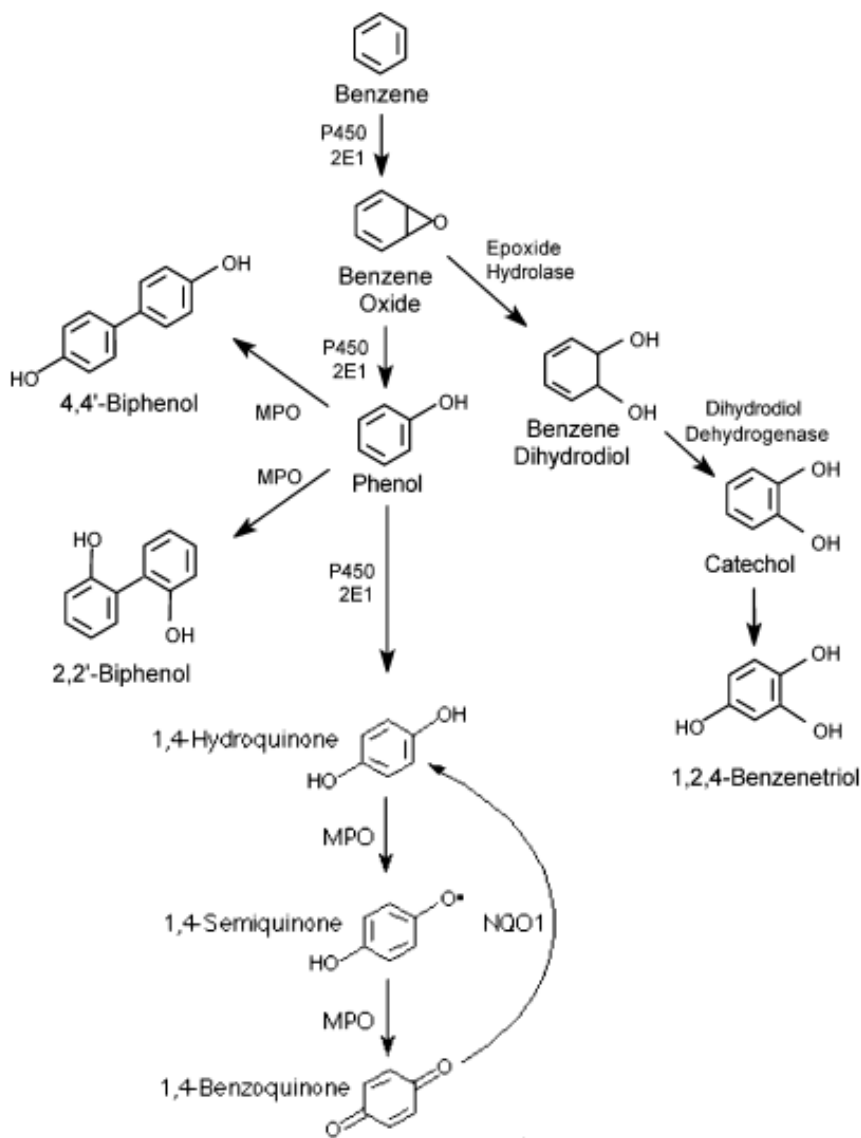
圖十六、HQ17(3)造成 ALL 細胞株死亡的可能機轉示意圖

HQ17(3)進到 SUP-B15 細胞後導致內質網壓力，可能造成 Ca^{2+} 從內質網釋出進入細胞質或粒線體，並造成 autophagy 和 mitochondrial transmembrane potential (MTP) loss，最後造成 caspase-independent cell death，而細胞死亡能被 autophagy 抑制劑 (Bafilomycin A1) 和 shBECN1 抑制，autophagy 誘導劑 (Rapamycin) 也能降低 HQ17(3) 造成的細胞死亡；HQ17(3)也會造成 ROS 的產生，而利用抗氧化劑 (GSH、Vit C) 能部分抑制 HQ17(3) 導致的死亡²⁰。HQ17(3)進到 Jurkat 細胞後導致 MTP loss，進而活化 caspase3，最後造成 caspase-dependent cell death，此過程能被 pan-caspase inhibitor (z-VAD) 抑制。



附錄

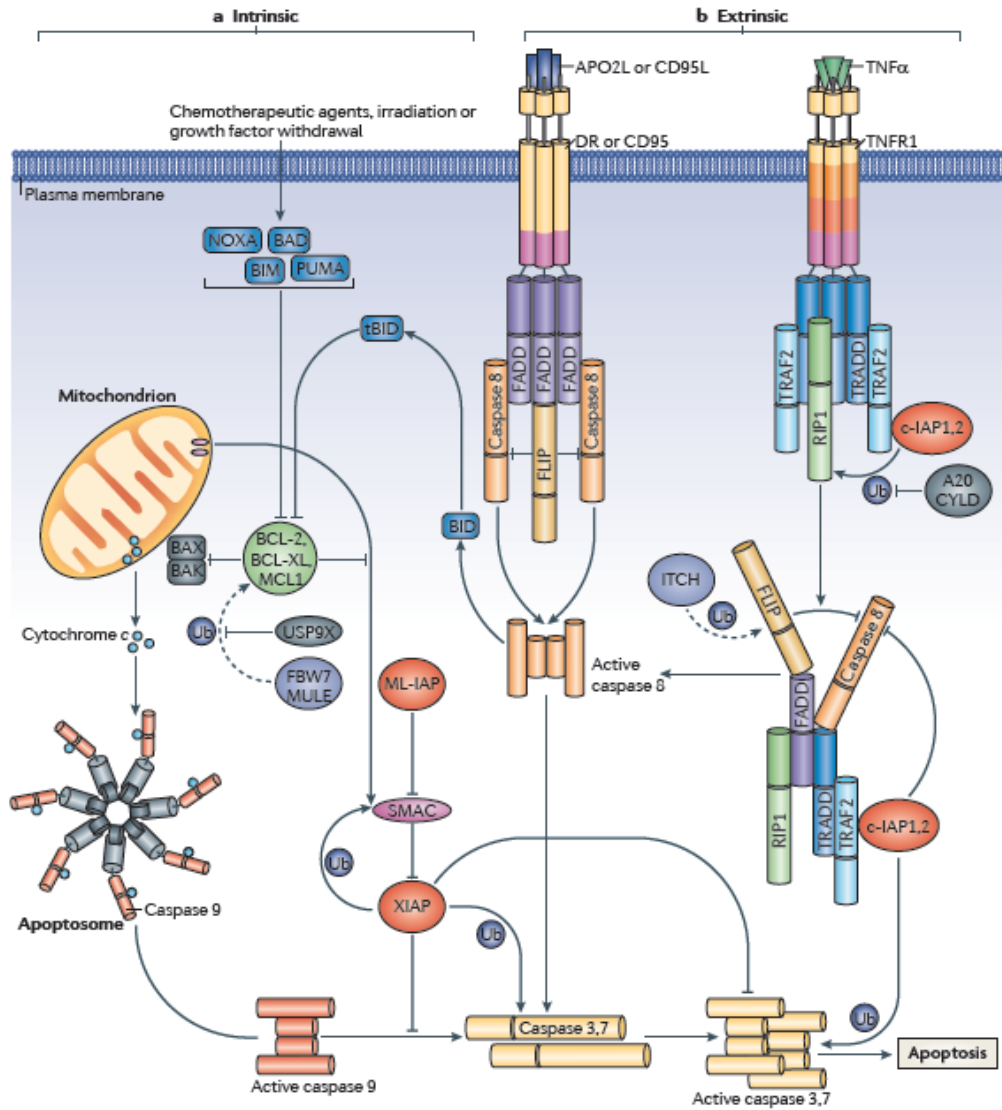
附錄一：苯(benzene)的代謝



參考資料來源：

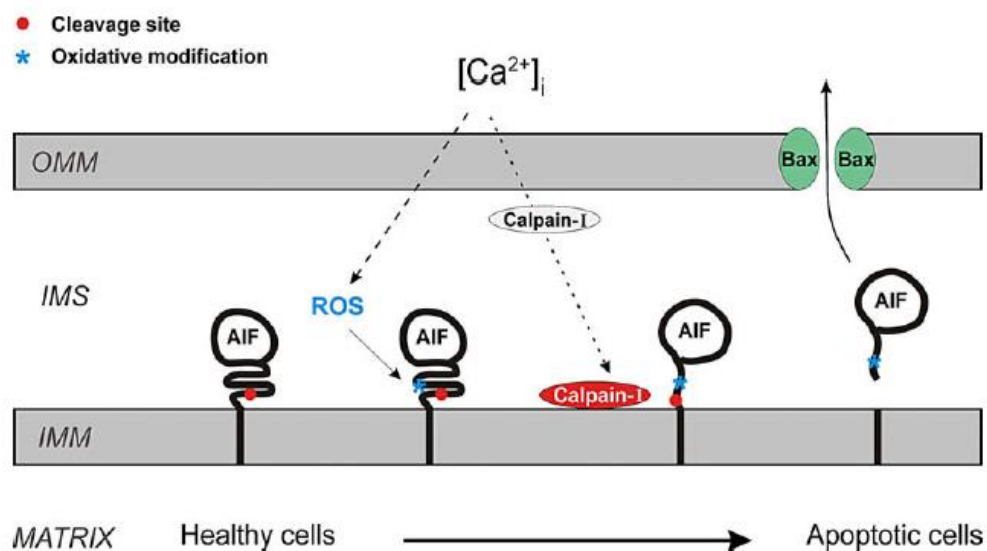
Lindsey RH Jr, Bender RP, Osheroff N. Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. *Chem Res Toxicol*. 2005;18(4):761-70

附錄二：The intrinsic and extrinsic apoptotic pathways



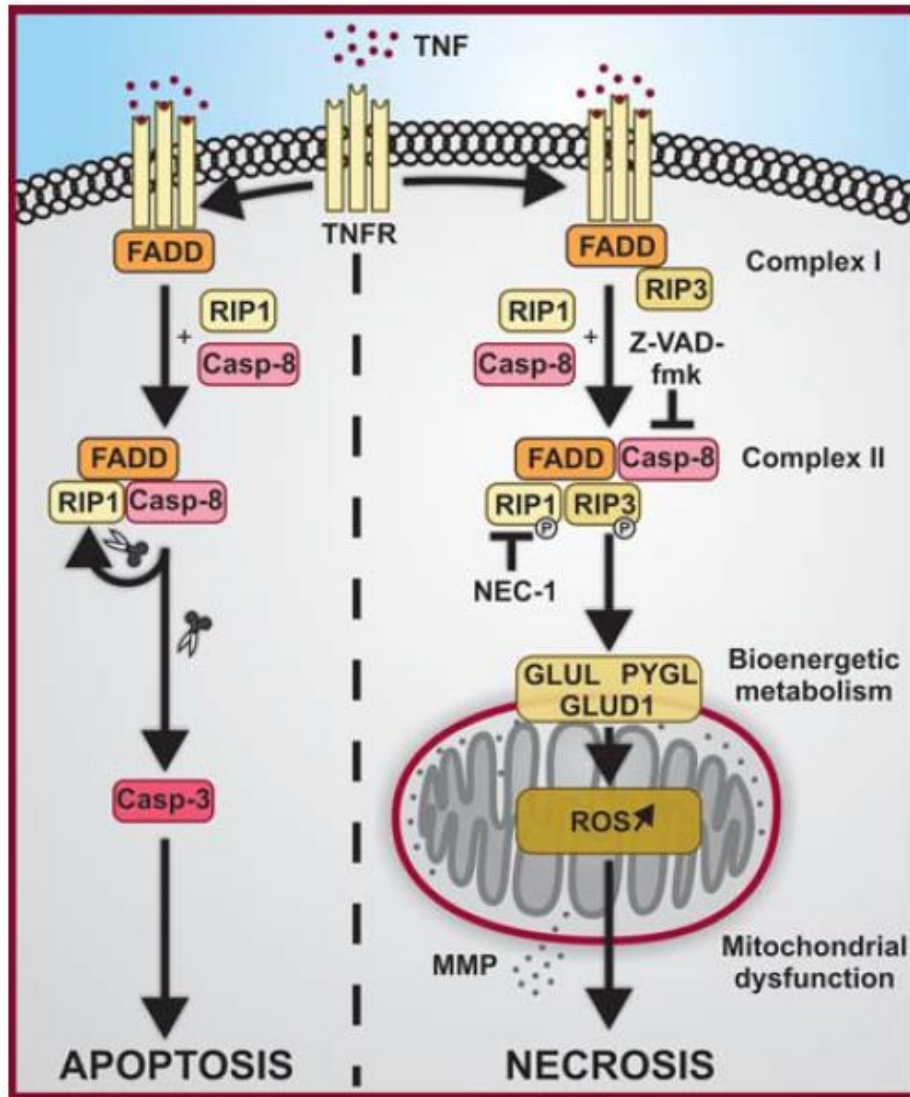
參考資料來源：

Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(7):439-52



Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death : processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(1):95-100

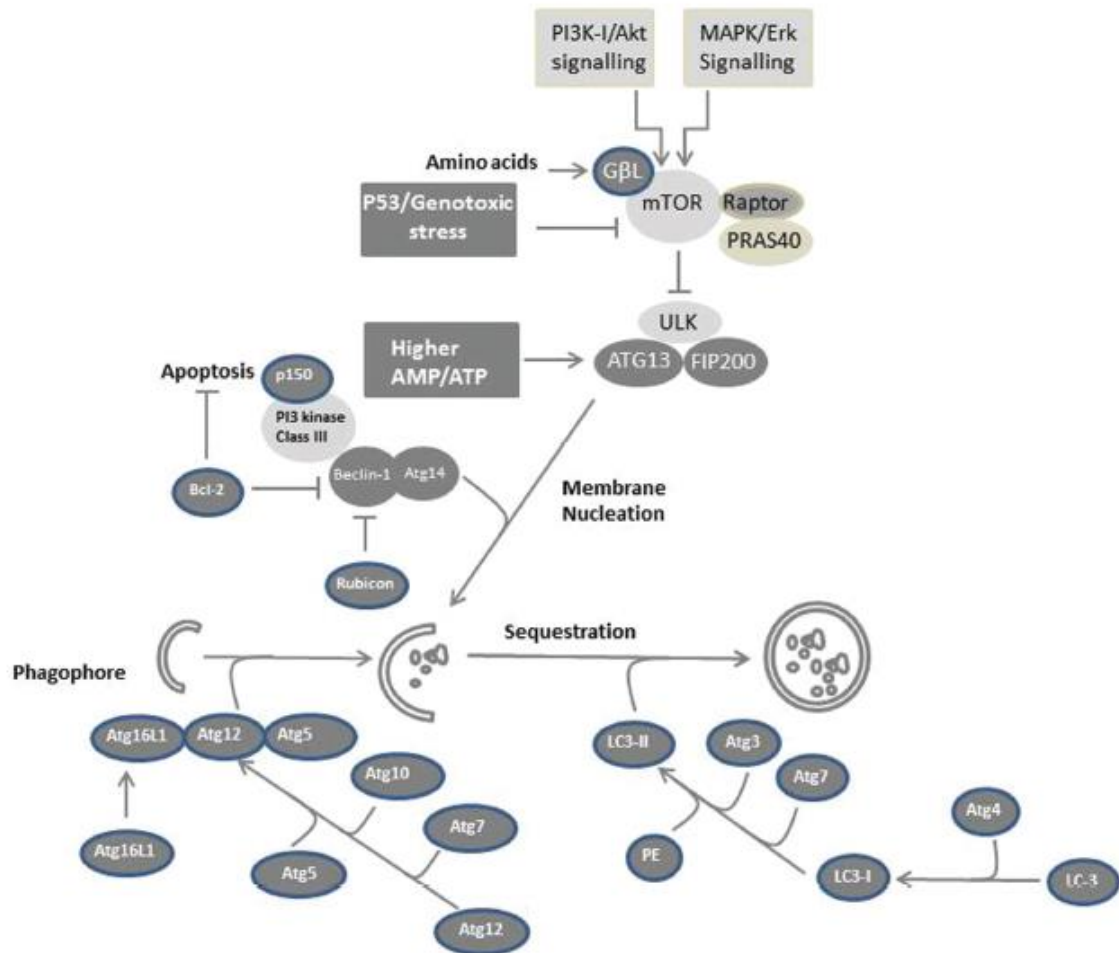
附錄四：Necroptosis



參考資料來源：

Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol.* 2009;1(1):8-10

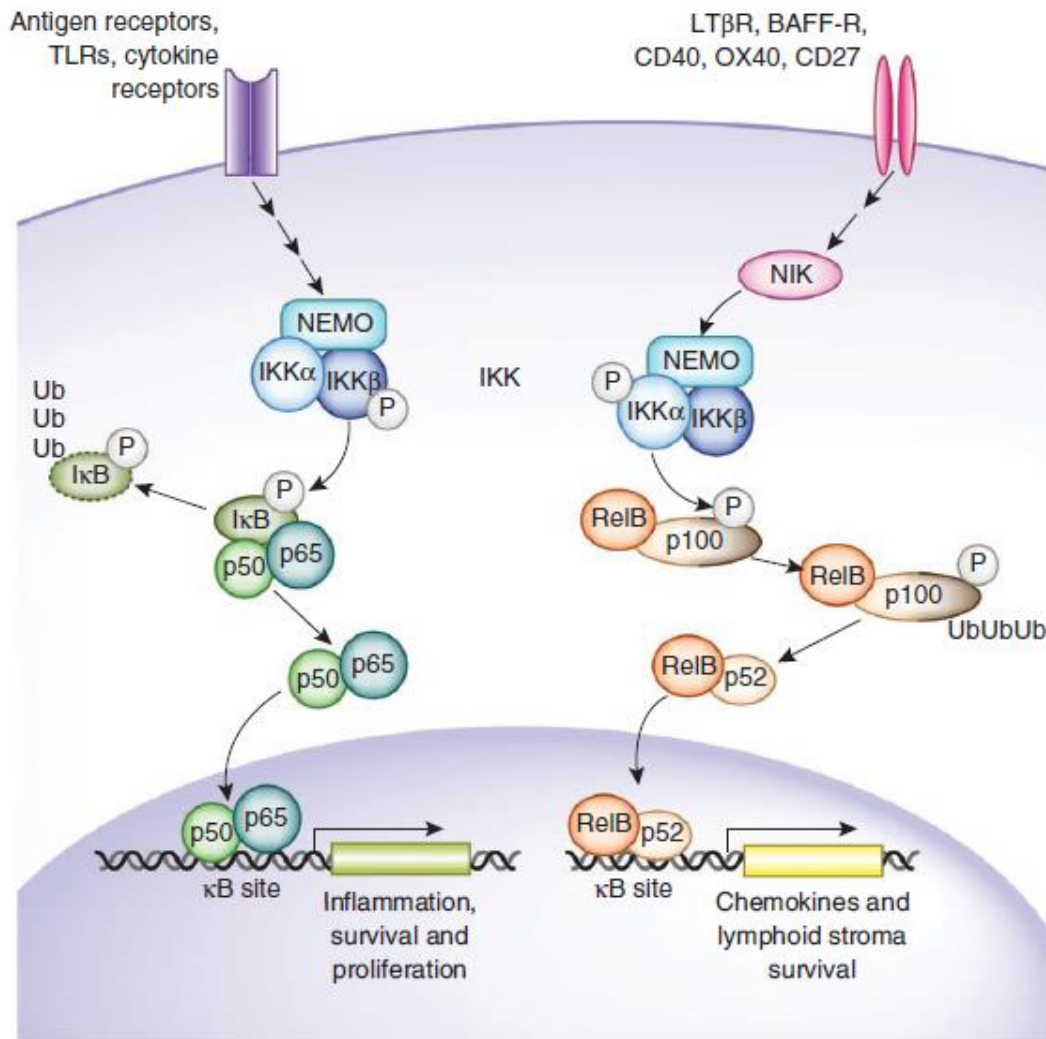
附錄五：細胞自噬(Autophagy)



參考資料來源：

El-Khattouti A, Selimovic D, Haikel Y, Hassan M. Crosstalk between apoptosis and autophagy: molecular mechanisms and therapeutic strategies in cancer. *J Cell Death*. 2013;6:37-55

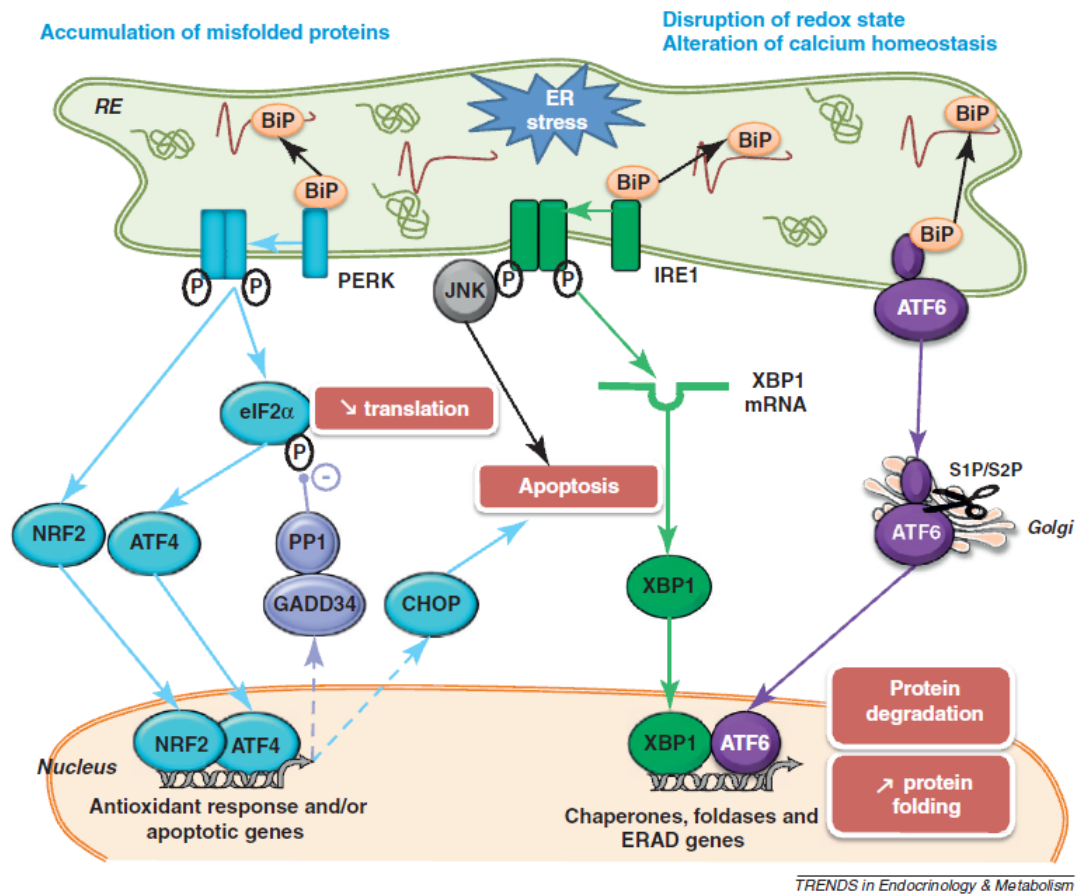
附錄六：NF- κ B signaling pathway



參考資料來源：

Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF- κ B control of T cell development. *Nat Immunol.* 2014;15(1):15-25

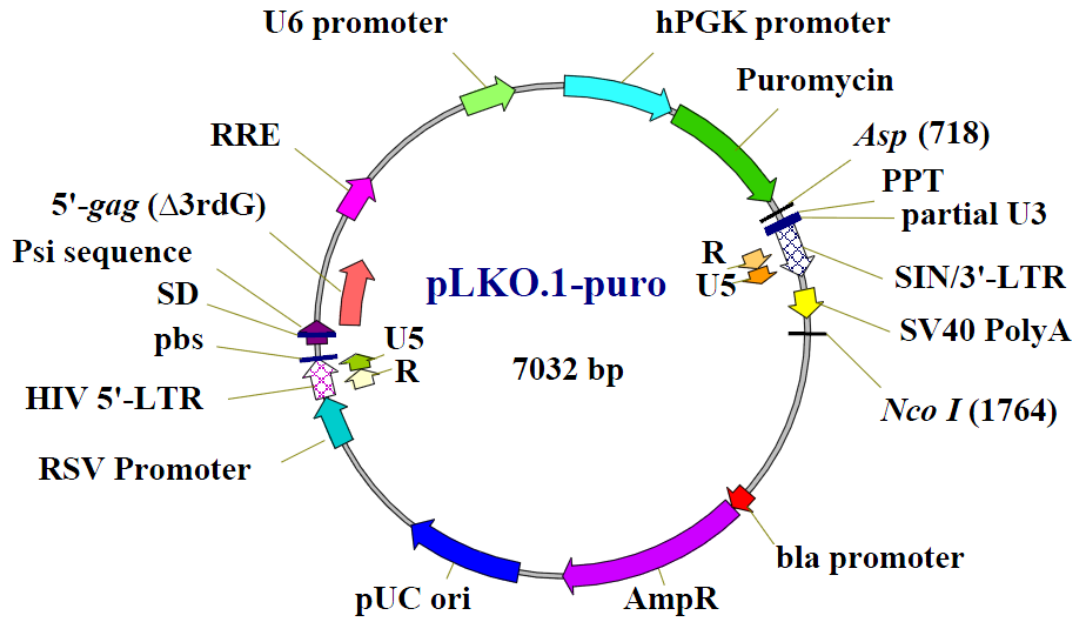
附錄七：Unfolded protein response (UPR) pathway



參考資料來源：

Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foulle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(8):381-90

附錄八：pLKO.1-puro 慢病毒載體



Description:

pLKO.1-Puro is a cloning vector of shRNA, originally derived from HIV-1. It contains all the necessary *cis*-elements for packaging, reverse transcription, and integration for subsequent production of the lentiviral particles.

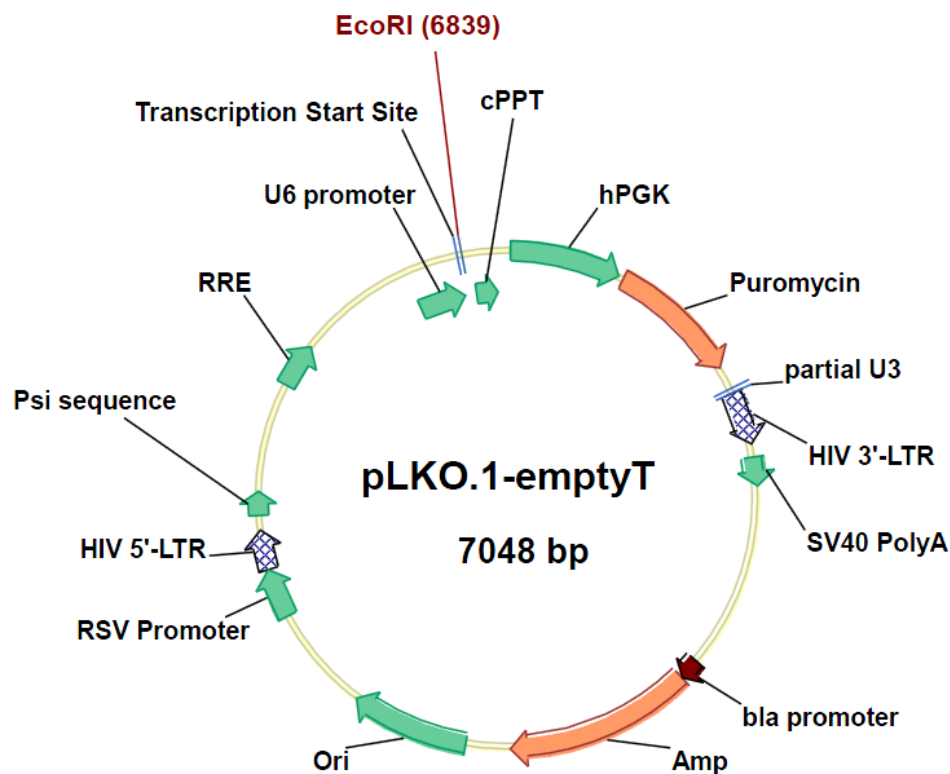
Cloning site:

*Age*I and *Eco*RI (only these two sites available)

參考資料來源：

中央研究院分子生物研究所 RNAi 核心設施

附錄九：pLKO.1-emptyT 慢病毒載體



Description:

pLKO.1-emptyT was derived from pLKO_TRC001 by inserting with the following sequences: acactcgagcactttt into AgeI and EcoRI sites.

Location of Features (for other features, please refer to pLKO.1-puro):

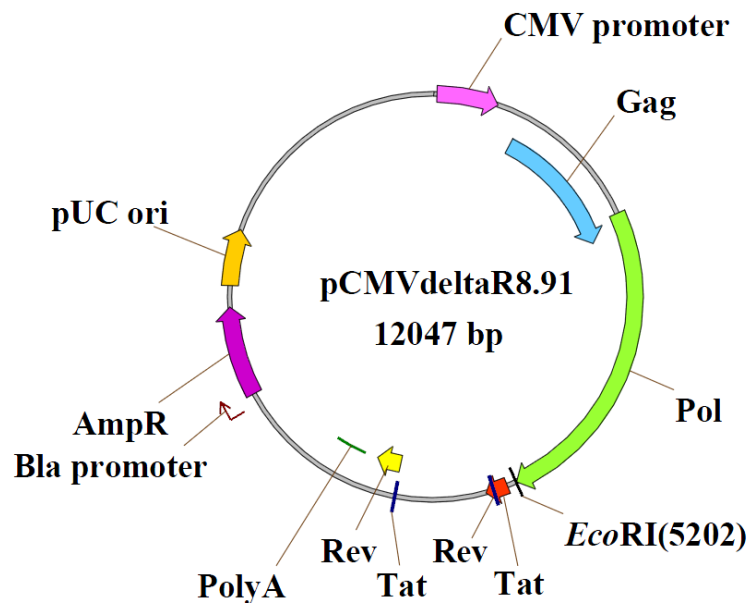
- Human U6 promoter (U6p) : nt6571-6818; Transcription start site:nt6819
- empty-T sequence : nt6821-6837
- cPPT(central polypurinetract) : 6879-6996
- Human PGK promoter : nt1-507
- Puromycin : nt529-1128

Note: DNA sequences within lentiviralgenome including both 5'LTR and 3'LTR was confirmed by sequencing.

參考資料來源：

中央研究院分子生物研究所 RNAi 核心設施

附錄十：pCMV△R8.91 慢病毒載體



Description:

Lentiviruses such as the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can infect both dividing cells and non-proliferating cells. pCMV△R8.91 was derived from pCMV△R8.9 by further deletion of *nef* gene resulting in 4 accessory proteins of HIV-1 been deleted on this plasmid, i.e. Vif, Vpr, Vpu, and Nef. Multiply attenuated lentiviral vector keeps the ability to transduce growth-arrested cells and monocyte-derived macrophages in culture, and could also deliver genes into adult neurons *in vivo* efficiently. In short, pCMV△R8.91 is a HIV-1 Gag and Polymerase (RT) expression plasmid. In addition, two of HIV-1 accessory proteins, Tat and Rev, can also be expressed on this plasmid. Importantly, no any *ciselements* for viral replication of HIV-1 can be found on this plasmid.

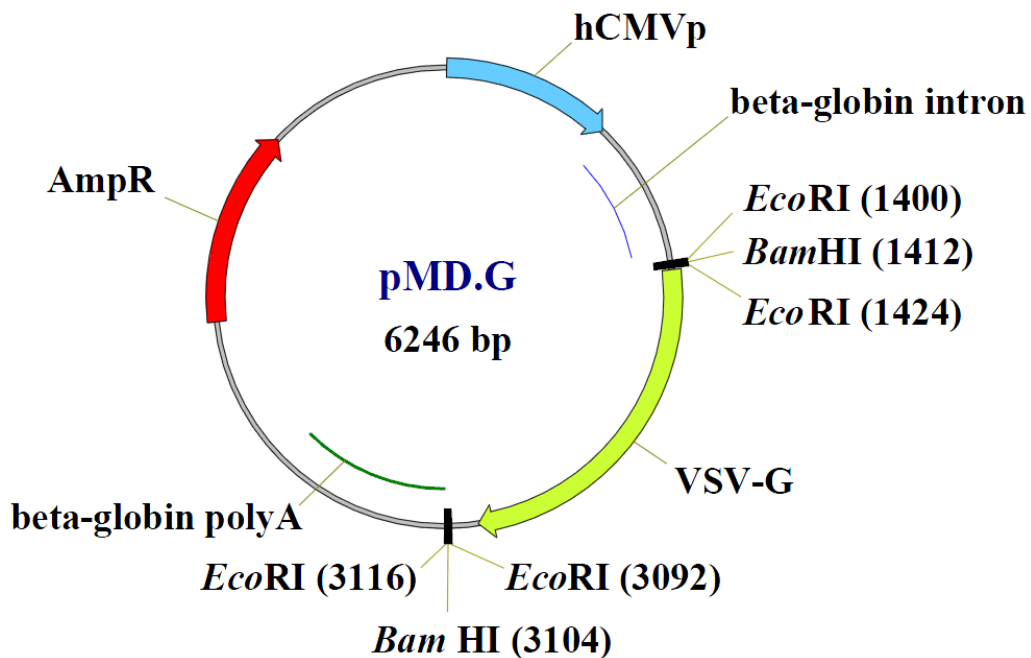
Location of features:

- CMV promoter: 27-614
- Gag : 888-2387
- Pol : 2184-5194
- Ta t: 5288-5502,6378-6468
- Rev : 5427-5502,6378-6652
- Ploy A : 6795-7157
- Bla promoter (Bla p) : 7985-8083
- Ampicillin resistance gene (AmpR) : 8083-8940
- pUC origin of replication (pUC ori) : 9144-9684

參考資料來源：

中央研究院分子生物研究所 RNAi 核心設施

附錄十一：pMD.G 慢病毒載體



Description:

pMD.G is a VSV-G envelope glycoprotein expression plasmid. It can be used for production of VSV-G-pseudotyped lentiviral particles.

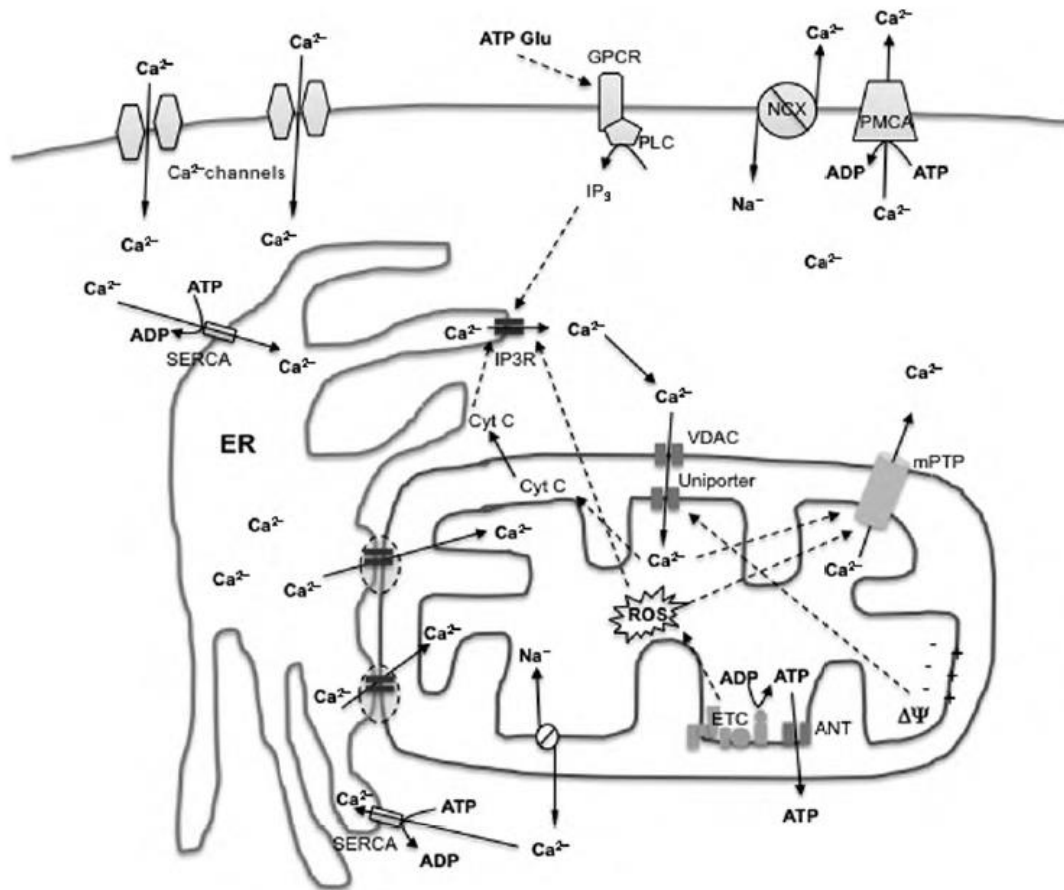
Location of features:

- hCMV promoter : 1-750
- beta-globin intron : 801-1348
- VSV-G : 1436-2971
- beta-globin polyA : 3115-3895
- Ampicillin resistance gene (AmpR) : 4576-5436

參考資料來源：

中央研究院分子生物研究所 RNAi 核心設施

附錄十二：細胞內 Ca^{2+} 恆定調控機制



參考資料來源：

Kawamata H, Manfredi G. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(7-8):517-26