

國立臺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)對費城染色體陽性之

急性淋巴性白血病細胞株SUP-B15的毒殺機制

Cytotoxic Effects Imposed by the Botanical Alkyl

Hydroquinone Derivative HQ17(3) on

Philadelphia Chromosome Positive ALL SUP-B15 Cells

周映辰

Yin-Chen Chou

指導教授：胡忠怡 博士

Advisor: Chung-Yi Hu, Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July, 2018

## 致謝



碩班生涯兩年時光，感謝我的論文指導老師胡忠怡老師，收我為 R304 的一員進行碩班論文研究，感謝老師在實驗研究上的傾囊相授，以及在專討與口試報告時的修改與幫助，讓我在這兩年成長並獲得了許多。感謝我的口試委員，林亮音老師、郭靜穎老師、郭遠燁老師、歐大諒老師，在標靶課報告、進度報告與口試時的指教與意見分享，以及在論文上的校閱與修改，謝謝老師們的幫助讓我能順利完成我的碩士論文。謝謝蘇剛毅老師實驗室的廖耿林學長，感謝學長在粒線體相關研究與實驗上給予許多建議，並慷慨提供材料讓我能順利進行實驗，並對於我的實驗結果給予不同方面的意見，謝謝學長讓我在這塊領域上有更深入的認識。感謝共同在 R304 奮鬥的夥伴們，佩蓉學姊、佳瑋學長、蔓潔學姊、文博學長、克巍、亦欣、怡臻，感謝大家在實驗上的幫忙與建議，在我剛進來時教導並帶領我做實驗，在煩惱時一同討論 data，下午一起擠個悠閒時光吃下午茶，謝謝大家讓我在 R304 順利的度過每一天。謝謝醫技系的同學們，在專討上的問題討論與指教，在休閒時一同聊天八卦，在為了實驗煩惱時互相提供資訊與材料，謝謝你們讓我的碩班生活變得多彩。感謝我的男友，不管是快樂、傷心抑或是煩惱時都在我身邊陪我鬧逗我笑，謝謝你成為我的小綠洲，讓我永遠有個可以依靠的肩膀。謝謝我的好閨蜜好姐妹修禎與緯丞，我們三人一起在不同領域各自努力，在遇到煩惱時互相做對方的垃圾桶，半夜一同談心，一起描繪未來的藍圖，謝謝你們讓我知道人生的路上一定有你們的歡笑陪伴。謝謝我的爸媽，謝謝你們支持我的理想，永遠為我點上一盞燈等我回家，並在我煩惱時給予我建議與鼓勵，謝謝你們讓我知道家是永遠的避風港，以及謝謝我的小天使，陪伴我度過每個低落的時刻。最後感謝我自己，雖然一路上有些許挫折，但終於熬過兩年碩班研究生涯，並預祝自己能更有更美好的未來。


## 中文摘要



人類第9與第22號染色體轉位產生的費城染色體(Philadelphia chromosome, Ph)會導致具致癌性的BCR-ABL融合蛋白產生; BCR-ABL為持續活化的酪氨酸激酶, 會啟動與細胞增生、存活及自我更新相關的訊息傳遞路徑, 導致細胞轉型癌化。帶有費城染色體的急性淋巴性白血病(Ph<sup>+</sup> ALL)具高惡性度且不易治癒, 即使以高強度化療搭配 tyrosine kinase inhibitor (TKI)抑制 BCR-ABL 活性, 仍有高比例的患者會對藥物產生抗性而導致疾病復發, 因此針對這類高風險(high-risk)患者發展有效的替代輔助治療方針, 仍是目前 ALL 研究上的重要課題之一。

10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienyl hydroquinone (HQ17(3)) 是自台灣漆樹的漆液中所萃取出天然小分子化合物, 目前已知 HQ17(3)在多種腫瘤細胞中會透過抑制 DNA 拓撲異構酶 II (DNA topoisomerase II)的活性引起 DNA 斷裂, 並對細胞造成氧化壓力導致依賴半胱胺酸蛋白酶介導的細胞凋亡, 對人類周邊血單核球細胞則不具明顯毒性。我們之前研究發現, 以低濃度(1-3  $\mu$ M)的 HQ17(3)處理帶有費城染色體的急性淋巴性白血病細胞株 SUP-B15, 在 24 小時之下即有顯著毒殺效果, 因此希望藉由研究 HQ17(3)在 SUP-B15 細胞的毒殺模式了解這類細胞可能帶有的特殊弱點, 以發展輔助 Ph<sup>+</sup> ALL 的治療策略。

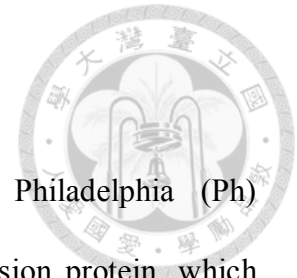
我們先前的研究已知 HQ17(3)處理下 SUP-B15 細胞發生不依賴半胱胺酸蛋白酶介導的細胞死亡, 其中包含了活性氧分子堆積及粒線體膜電位喪失及 DNA 斷裂, 另外也發現 HQ17(3)會誘導細胞發生內質網壓力及細胞自嗜現象。在此研究中, 我們發現 HQ17(3)可能透過內質網壓力引發粒線體內鈣離子濃度上升, 導致粒線體內膜蛋白 apoptosis-inducing factor (AIF)切割並轉移至細胞核而造成不依賴半胱胺酸水解酶介導的細胞死亡。然而以 PD150606 抑制 AIF 的切割/核轉移僅小部分減緩 HQ17(3)引起的細胞死亡, 若以鈣離子螯合劑抑制粒線體內鈣離子濃度上升能更有



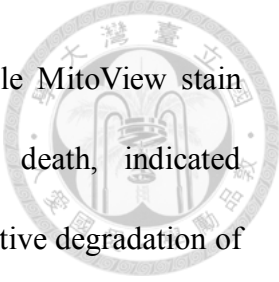
效挽救細胞免於死亡，說明 SUP-B15 細胞在 HQ17(3)處理下粒線體鈣離子的堆積可能誘發其他引起細胞死亡的機制。我們發現 HQ17(3)除了引起粒線體內活性氧分子堆積、膜電位喪失等粒線體損傷，也會造成粒線體融合相關蛋白 Opa1 的切割與 Mfn1/2 降解。利用粒線體螢光染色發現 HQ17(3)引起的細胞死亡會伴隨粒線體出現片段化以及大量減少的現象，顯示 HQ17(3)可能會促使粒線體進行分裂並啟動粒線體自嗜清除機制(mitophagy)，以免疫螢光染色看到自嗜體標誌 LC3-II 與粒線體 complex IV 訊號重疊的現象，可確定 HQ17(3)增進粒線體自嗜的發生。HQ17(3)造成的粒線體損傷與清除現象可透過與鈣離子螯合劑共處理降低粒線體鈣離子堆積而得到緩解，顯示 HQ17(3)所造成粒線體鈣離子增加導致粒線體損傷與自嗜。總合以上，我們認為 HQ17(3)在帶有費城染色體的 preB-急性淋巴性白血病 SUP-B15 細胞會透過尚未明瞭的機制引發內質網壓力，導致粒線體內鈣離子的累積，除了引起 AIF 分子切割與核轉位，也會致使粒線體活性氧分子上升，導致粒線體損傷及引發粒線體自嗜，最終導致粒線體大量減少細胞死亡。透過實驗數據與過去文獻探討，也暗示 Ph<sup>+</sup> ALL 易受內質網壓力及粒線體壓力影響而導致細胞死亡發生，並期望後續研究上得以提供未來在高風險 ALL 患者治療替代方針的一個新方向。

關鍵字：帶有費城染色體的急性淋巴性白血病, SUP-B15, HQ17(3), 粒線體損傷, 細胞死亡

## Abstract



Reciprocal t(9;22) *BCR-ABL* translocation gives rise to Philadelphia (Ph) chromosome and results in production of chimeric BCR-ABL fusion protein, which activates multiple signaling pathways that promote cell proliferation, survival and self-renewal. Ph<sup>+</sup>-acute lymphoblastic leukemia presents very poor clinical outcomes irrespective of the highest dose chemotherapy combined with tyrosine kinase inhibitors. Therefore, it's important to explore new agents act as alternative/supplemental strategies in treatment of this high-risk disease. The 10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienyl hydroquinone (HQ17(3)) is a small natural molecule extracted from the sup of *Rhus succedanea*. HQ17(3) was found to be a DNA topoisomerase II $\alpha$  poison that cause DNA damage, induced oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in various types of cancer cells, but didn't affect normal peripheral blood leukocytes. We found HQ17(3) has significant cytotoxic effect on the Ph<sup>+</sup> B-ALL SUP-B15 cells within 24 hours at micromolar concentration. HQ17(3) induced ROS production, loss of mitochondrial membrane potential, and DNA fragmentation in SUP-B15 cells, accompanied by signs of autophagy and ER stress, followed by caspase-independent cell death. Here, we found HQ17(3) induced mitochondrial Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup><sub>m</sub>]) elevation, leading to apoptosis-inducing factor (AIF) cleavage and nuclear translocation. However, inhibition of AIF cleavage by calpain-I inhibitor PD150606 only slightly attenuated the HQ17(3)-induced cell death. Furthermore, Ca<sup>2+</sup> chelator Bapta-AM could prevent [Ca<sup>2+</sup><sub>m</sub>] overload and rescue cell death more effectively, indicating [Ca<sup>2+</sup><sub>m</sub>] participate in other mechanisms implicated in cell death. HQ17(3) treatment resulted in increased mitochondrial superoxide, and loss of mitochondrial membrane potential. Degradation



of mitochondrial fusion protein Mfn1/2 and Opa1 was noted, while MitoView stain showed significant loss of mitochondrial mass preceded cell death, indicated mitochondria might undergo fission followed by mitophagy, the selective degradation of mitochondria by autophagy. Mitophagy was revealed by COX IV and LC3B co-localization in immune-fluorescence stain. Furthermore, Ca<sup>2+</sup>-chelator attenuated HQ17(3)-induced mitochondrial ROS elevation, Opa1 cleavage and mitophagy occurrence, indicated HQ17(3)-induced mitochondrial damage features are consequences of [Ca<sup>2+</sup><sub>m</sub>] overload and related to cell death. In conclusion, HQ17(3) induces ER stress by yet-defined mechanism in Ph<sup>+</sup> preB-ALL SUP-B15 cells, leads to [Ca<sup>2+</sup><sub>m</sub>] overload, elevated superoxide and mitochondrial damage, followed by mitophagy, and cell death ensue. Our finding also suggests that Ph<sup>+</sup> ALL cells is vulnerable to ER stress or mitochondrial stress, may provide a new approach to study alternative strategies for high-risk ALL treatment in future.

Key words:

Ph<sup>+</sup> acute lymphoblastic leukemia, SUP-B15, HQ17(3), mitochondria damage, cell death

## 縮寫表



縮寫	全名
[Ca <sup>2+</sup> <sub>m</sub> ]	Mitochondrial Calcium ion
AIF	apoptosis-inducing factor
ALL	acute lymphoblastic leukemia
ATCC	American Type Culture Collection
CCCP	Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
CQ	Chloroquine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic translation initiation factor 2
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation
Grp78	78 kDa glucose-regulated protein
GSH	Glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
HQ	Hydroquinone
HQ17(3)	10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone
IM	Imatinib mesylate
IMM	Mitochondrial inner membrane
IMS	Mitochondrial inter-membrane space
MAMs	mitochondrial associated membrane

Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
MMP	Mitochondrial membrane potential
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
NAC	N-acetylcysteine
Opa1	optic atrophy 1
Ph <sup>+</sup> ALL	Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia
PI	Propidium iodide
PINK1	PTEN-induced putative kinase protein 1
PS	Phosphatidylserine
PT	Permeability transition
ROS	Reactive oxygen species
Topo II	DNA topoisomerase II
UPR	Unfolded protein response





# 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 .....	3
4. 急性淋巴性白血病的不良預後因子 .....	5
5. 費城染色體陽性急性淋巴性白血病 (Ph <sup>+</sup> ALL) .....	5
6. 費城染色體 .....	6
7. 費城染色體陽性急性淋巴性白血病治療 .....	6
8. TKI 在 Ph <sup>+</sup> ALL 治療上所面臨的問題 .....	7
二、對苯二酚衍生物 HQ17(3)簡介.....	8
1. 對苯二酚代謝與誘發細胞死亡型態 .....	8
2. 對苯二酚衍生物相關文獻探討 .....	9
三、活性氧分子 reaction oxygen species (ROS).....	10
1. 活性氧分子 ROS 介紹 .....	10
2. ROS 與細胞死亡 .....	12



四、計畫性細胞死亡 (Programmed cell death, PCD).....	13
1. 細胞凋亡 (apoptosis, type I) .....	13
2. 細胞自嗜 (autophagy, type II).....	16
3. 細胞壞死 (necroptosis, type III) .....	18
五、Unfolded protein response (UPR)-內質網壓力(ER stress) .....	19
六、粒線體恆定 .....	21
1. 粒線體動態平衡 .....	21
2. 粒線體自嗜.....	24
七、Preliminary data.....	27
第二章 研究目的與實驗設計 .....	29
一、研究目的 .....	29
1. 研究動機 .....	29
2. 研究目的 .....	30
二、實驗設計 .....	30
第三章 材料與方法 .....	31
一、實驗材料 .....	31
1. 細胞株 .....	31
2. 試藥/劑、抗體、儀器清單 .....	31
3. 各式溶液及其配方 .....	36
(1) 細胞培養液.....	36
(2) 流式細胞儀相關實驗.....	36
(3) 萃取細胞蛋白質.....	36
(4) 鈉十二烷基硫酸鹽聚丙烯酰胺凝膠電泳與膠體轉漬.....	37



(5) 西方墨點法.....	39
(6) 免疫螢光染色.....	40
三、實驗方法.....	41
1. 細胞解凍、培養與計數.....	41
2. 細胞膜磷脂質 phosphatidylserine (PS)外翻與細胞膜完整性分析.....	41
3. 粒線體 ROS 偵測.....	42
4. 細胞內鈣離子偵測.....	42
5. 粒線體膜電位偵測.....	43
(1) 以螢光顯微鏡觀察.....	43
(2) 以流式細胞儀分析.....	43
6. 粒線體形態與總量分析.....	43
(1) 以螢光顯微鏡觀察.....	43
(2) 以流式細胞儀分析.....	44
7. 免疫螢光染色.....	44
8. 西方墨點法.....	45
(1) 蛋白質萃取.....	45
(2) 蛋白質定量與電泳樣品準備.....	45
(3) 納十二烷基硫酸鹽聚丙烯胺凝膠電泳與膠體轉漬.....	46
(4) 阻斷非特異性結合與免疫染色.....	46
第四章 結果.....	47
一、HQ17(3)誘粒線體 Ca <sup>2+</sup> 增加與 AIF translocation 與細胞死亡有關.....	47
1. HQ17(3)造成 mitochondrial Ca <sup>2+</sup> 增加.....	47
2. HQ17(3)造成 AIF nuclear translocation 並與 mitochondrial Ca <sup>2+</sup> 增加有關....	48

3. AIF 的切割不是導致細胞死亡的主因 .....	48
4. 粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 增加調控其他死亡路徑的發生 .....	49
二、HQ17(3) 誘導的粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 增加導致粒線體損傷與自嗜 .....	49
1. HQ17(3) 導致粒線體損傷情形發生 .....	50
(1) 粒線體 ROS 上升 .....	50
(2) 粒線體膜電位喪失 .....	50
(3) 粒線體融合蛋白減少 .....	51
2. HQ17(3) 導致粒線體片段化與總量減少 .....	52
3. HQ17(3) 造成粒線體自嗜(mitophagy)發生 .....	53
4. 粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 的累積參與 HQ17(3) 所造成的粒線體損傷 .....	53
(1) 粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 參與粒線體 ROS 的堆積 .....	54
(2) 粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 與 ROS 參與 HQ17(3) 誘導的融合蛋白 Opal 的切割 .....	54
(3) 粒線體自嗜為 HQ17(3) 誘導的粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 增加所導致 .....	55
第五章 討論 .....	56
參考文獻 .....	62
圖與表 .....	71
附錄 .....	86

## 圖目錄



圖一、HQ17(3)處理 5 小時即造成 SUP-B15 細胞粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ overload，且可透過 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合劑 Bapta-AM 抑制 .....	72
圖二、HQ17(3)造成 SUP-B15 細胞 Apoptosis-inducing factor (AIF) 進入到細胞核	73
圖三、Calpain inhibitor PD150606 部分抑制 HQ17(3)誘導的 SUP-B15 細胞死亡 ..	74
圖四、Bapta-AM 明顯減緩 HQ17(3)誘導的 SUP-B15 細胞死亡 .....	75
圖五、HQ17(3)八小時處理造成 SUP-B15 細胞粒線體 ROS 堆積.....	76
圖六、HQ17(3)處理八小時造成 SUP-B15 細胞粒線體膜電位喪失 .....	77
圖七、HQ17(3)導致 SUP-B15 粒線體損傷與融合蛋白降低 .....	78
圖八、HQ17(3)導致細胞粒線體形態改變與粒線體總量減少 .....	79
圖九、HQ17(3)造成 SUP-B15 細胞粒線體自嗜 .....	80
圖十、Bapta-AM 抑制 HQ17(3)導致的粒線體 ROS 堆積 .....	81
圖十一、ROS 清除劑 GSH 或 Bapta-AM 均可緩解 HQ17(3)導致的 Opa1 蛋白切割情形 .....	82
圖十二、Bapta-AM 緩解 HQ17(3)所造成的粒線體總量減少 .....	83
圖十三、Bapta-AM 可抑制 HQ17(3)造成 SUP-B15 細胞粒線體自嗜 .....	84
圖十四、HQ17(3)造成 $\text{Ph}^+$ B-ALL SUP-B15 細胞株死亡的可能機轉示意圖 .....	85

## 附錄目錄



附錄一、ALL 基因變異分佈圖.....	87
附錄二、BCR-ABL 融合蛋白生成示意圖.....	88
附錄三、苯(benzene)的代謝.....	89
附錄四、caspase dependent/independent cell death.....	90
附錄五、AIF processing 過程.....	91
附錄六、non-selective autophagy 進程.....	92
附錄七、由 RIP1 所誘導的 apoptosis 或 necroptosis.....	93
附錄八、UPR pathway 路徑.....	94
附錄九、粒線體動態平衡.....	95
附錄十、粒線體自嗜(Mitophagy)分子機制.....	96
附錄十一、ER stress 誘導粒線體壓力.....	97
附錄十二、HQ17(3)誘導 SUP-B15 細胞 ER stress 發生.....	98
附錄十三、Ca <sup>2+</sup> 螯合劑 Bapta-AM 對 SUP-B15 細胞的毒性測試.....	99
附錄十四、Calpain-I 抑制劑 PD150606 對 SUP-B15 細胞的毒性測試.....	100

# 第一章 緒論



## 一、急性淋巴性白血病

白血病(leukemia)，俗稱血癌，是由於造血幹細胞或造血前驅細胞惡化導致異常增生所造成的血液腫瘤。白血病根據不同的病變細胞品系可分為骨髓性(myeloid leukemia)及淋巴性白血病(lymphoid leukemia)，而根據疾病進程快慢又可區分為急性(acute)及慢性(chronic)白血病，急性白血病患者的造血系統及周邊血液中會有較多不成熟的造血前驅細胞(hematopoietic progenitor cells, HPC)，慢性白血病則是周邊血液中有分化較成熟的血液細胞。急性淋巴性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是淋巴前驅細胞惡化導致骨髓及周邊血液中的淋巴芽細胞(lymphoblasts)不正常增生所造成的癌症，根據淋巴細胞的品系可細分為 B-ALL 及 T-ALL，其中 B-ALL 佔所有 ALL 病例中的 80%<sup>1-3</sup>。

急性淋巴性白血病好發於 2 到 5 歲兒童，位居兒童癌症發生率首位，約佔兒童癌症的 30%<sup>4</sup>，在老人也佔另一波發生率高峰<sup>5,6</sup>，五年無事件存活率(five-year event-free survival rate)在兒童約為 90%，成人為 40%<sup>7,8</sup>。根據台灣衛生福利部國民健康署於 2017 年發表的 2015 年癌症登記年報統計，台灣在 2015 年有 223 個 ALL 新病例，男女比約為 1.47:1，治療情形以化學治療者最多，占總病例 89.69%<sup>9</sup>。

以下引述中華民國兒童癌症基金會<sup>5</sup>及長庚紀念醫院衛教手冊資料<sup>6</sup>作介紹：

### 1. 急性淋巴性白血病的症狀<sup>5,6</sup>

初期常見臨床症狀與感冒類似，包括發燒、疲倦、臉色蒼白等等，隨疾病持續發展惡化，患者會逐漸出現下列各種症狀：

#### (1) 骨髓失去正常功能

- a. 紅血球減少：貧血、容易疲勞、臉色蒼白，少數病患會因貧血而造成阻塞性黃疸導致皮膚泛黃。



- b. 白血球指數異常：由於白血球異常增生，分泌特殊細胞激素導致發燒，以及正常白血球減少，導致免疫功能降低易受感染。
- c. 血小板數降低：容易出血，例如流鼻血、口腔流血，及皮膚出現細小出血點或大瘀斑，偶有黑色大便或血尿；少數患者會因血小板低下而發生顱內出血。

## (2) 正常組織受惡化淋巴芽球浸潤

- a. 因骨髓內血癌細胞增生之故，導致骨頭及關節疼痛。
- b. 頸部、腋窩或鼠蹊部淋巴結腫大，較硬且不可動，大多無疼痛感或壓痛。
- c. 血癌細胞侵入肝臟、脾臟、淋巴腺、胸腺等，引起器官腫大。
- d. 扁桃腺腫大、口腔、氣管因周圍淋巴組織腫脹而影響呼吸。
- e. 少數患者會因癌細胞侵入至中樞神經，導致腦壓增高引發頭痛嘔吐等現象，此病症機率不到十分之一。

## 2. 急性淋巴性白血病的診斷<sup>5,6</sup>

白血病的診斷，最初是靠病史，血液檢查(CBC)及血液抹片檢查。如果檢查的結果可疑，則必須進一步做骨髓檢查。主要檢查包括：

- (1) 患者的完整病史收集與身體檢查評估
- (2) 血液檢查：抽血檢查各種類血球數目以及白血球形態。
- (3) 骨髓檢查：由腰部附近腸骨後脊部位採樣。檢查項目包括分類、免疫型態分析診斷淋巴細胞型態(B or T-ALL)，並會檢查染色體轉位或異常情形。
- (4) 脊髓液檢查：在 ALL 為必要檢查，目的一為檢查是否有芽細胞存在，判斷中樞神經系統有無受白血病的侵犯；二為將化學藥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<sup>1,3,5,6,8</sup>

目前全國的兒童急性淋巴性白血病標準治療，是由台灣兒童癌症研究群 (Taiwan Pediatric Oncology Group, TPOG) 擬定的。根據患者發病時的年齡、血球數、是否帶有特殊染色體轉位等條件，將急性淋巴性白血病分成三群：標準危險群 (standard risk)、高危險群 (high risk)、最高危險群 (very high risk)，依嚴重程度高低分別給予不同的治療方針，治療計畫可分為化學性與支持性療法及骨髓移植：

(1) 化學性療法，可分為下列五個階段：

#### a. 引導緩解期 (Remission-induction therapy)

治療期為 4 到 6 週，此時期的主要目的為利用化療藥物清除患者體內 99% 的白血病細胞，使骨髓可恢復正常生理及造血功能，讓血球數目回歸正常。此階段常見化療藥物為醣化皮質類固醇 (glucocorticoid, 如 prednisone 或 dexamethasone)、vincristine 與 asparaginase 等藥物，如患者帶有特殊基因變異 (如 *BCR-ABL*) 可合併使用標靶藥物治療 (如 imatinib 及 dasatinib)。

#### b. 鞏固療法 (Consolidation therapy)

此階段為更換引導緩解期的藥物組合，清除體內殘存的癌細胞，使白血病細胞的數目達到萬分之一以下，降低癌症復發的風險。此階段常使用高劑量的 methotrexate, 6-mercaptopurine, vincristine 及 asparaginase 等藥物，需視患者疾病危險程度進行不同治療方案，且應注意合併藥物間不可相互干擾。

#### c. 再次引導緩解 (Re-induction therapy)

再次給予引導緩解期使用的藥物，將患者體內的癌細胞清除至最少量，以提高後續治療成效及降低復發機率。



d. 中樞神經系統預防

此階段會在引導緩解及鞏固治療的時期同時進行，因一般化學治療藥物無法進入中樞神經系統，所以在中樞神經系統的預防上會將抗癌藥物直接以腰椎注射注入至脊髓鞘內，使藥物得以隨脊髓液循環保護腦膜，或藉此清除已進入中樞神經系統內的白血病細胞。

e. 維持療法(Continuation therapy)

全程需二至三年，一般治療過程為每天給予 6-mercaptopurine 以及每週給予 methotrexate，若為高危險群(high risk)或最高危險群(very high risk)的患者，則會搭配 dexamethasone 或 vincristine 合併使用。

(2) 支持性療法

由於疾病本身或化療藥物治療的影響，患者常會出現貧血、出血或細菌病毒感染等症狀，支持性療法是針對這些症狀進行治療，如：注射紅血球及血小板治療貧血與出使用抗生素治療感染症狀、止吐及疼痛治療等。

(3) 造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)

對於少數帶有不良染色體變化(如  $BCR/ABL^+$ )或對化療反應不佳的高風險群患者，待病況得到緩解後，若有組織抗原相符合的捐贈者，施行造血幹細胞移植會有較高的治癒機率，並可降低腫瘤復發機率，但此治療風險程度也較高，須謹慎評估。



#### 4. 急性淋巴性白血病的不良預後因子<sup>1,8</sup>

- (1) 發病年齡：嬰兒(< 1 歲)、孩童( $\geq 10$  歲)、成人
- (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，例如西班牙裔的兒童急性淋巴性白血病較常發現 somatic CRLF2 (cytokine receptor-like factor 2) rearrangement<sup>10</sup>
- (4) 性別：男
- (5) Cell type：T-ALL
- (6) 帶有特殊染色體轉位，如染色體 11q 相關的 MLL gene rearrangement 或費城染色體(*BCR-ABL*)<sup>11</sup>

目前已知影響患者長期存活(long-term survival)的重要預後因子與 ALL 細胞本身帶有的基因特性有關，雖然兒童與成人 ALL 所帶有的基因型態不完全一致，但大部分造成白血病的致病機轉不外乎包括：致癌基因(proto-oncogenes)的不正常表現、染色體轉位(chromosomal translocation)導致融合基因產生，使激酶或轉錄因子不正常活化，以及多套體(hyperdiploidy)的發生等，導致造血幹細胞活性改變，自我更新與增生的能力上升，細胞停止分化，並且對於死亡訊號產生抗性<sup>11</sup>。預後因子是決定治療強度與程序的重要參考，雖然現階段在兒童 ALL 的治療上已有大幅的進步，但在成人患者群的整體存活率仍較差<sup>7,8</sup>，帶有費城染色體的 ALL 即是其中一例，患者經治療後容易復發且往往導致死亡。

#### 5. 費城染色體陽性急性淋巴性白血病 (Ph<sup>+</sup> ALL)

帶有名為費城染色體(Philadelphia chromosome)特殊染色體轉位結構的 ALL，被歸類在高風險群患者，成人患者中較為常見，在小兒 ALL 病例佔 3~5%，成人 ALL 中則佔 20-30%，年長者(50 歲以上)可上升至 50% (附錄一)。此種 ALL 患者




預後較差且易復發，患者復發後的治療也更加困難，3 年整體存活率(3-year overall survival)僅約 43%，並隨年紀越長，預後越差<sup>12-14</sup>。

## 6. 費城染色體

1960 年代，美國費城的科學家發現 90% 以上的慢性骨髓性白血病患者(CML) 的白血病細胞中，第 9 及 22 號染色體有異常轉位相接的現象，認為此染色體異常情形為導致 CML 的病因，並將之命名為費城染色體<sup>15,16</sup>。費城染色體的異常結構會導致嵌合基因(chimeric gene) *BCR-ABL* 的產生，並轉錄轉譯出 BCR-ABL 融合蛋白(fusion protein)，ABL 蛋白為蛋白酪胺酸激酶(tyrosine kinase)，會與 ATP 結合進而活化下游訊號傳遞，融合蛋白 BCR-ABL 會使 ABL 活性持續存在，並改變下游訊息分子的活性，包括 Ras/Raf、Jak-STAT、PI3K/Akt 等<sup>17</sup>，這些分子多與造血幹細胞的生長、存活與自我更新有關，過度活化會造成細胞轉型癌化。融合蛋白的分子量會根據 BCR 基因斷點位置的不同，分有 230kDa (p230), 210kDa (p210), 及 190kDa (p190)三種，慢性嗜中性顆粒細胞性白血病(chronic neutrophilic leukemia, CNL)與慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)患者分別表現 p230 與 p210，而 p190 則多表現於 B-ALL 患者<sup>18-20</sup>。(附錄二)

## 7. 費城染色體陽性急性淋巴性白血病治療

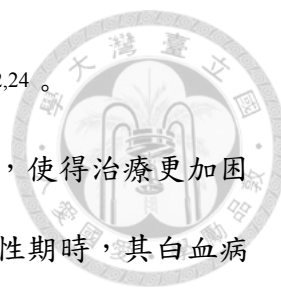
Ph<sup>+</sup> ALL 屬於高度惡性的疾病，治療上會使用最高劑量的複合性化學治療藉以控制疾病進程，目前在 Ph<sup>+</sup> ALL 的治療方針主要是高劑量化療藥物搭配蛋白酪胺酸激酶抑制劑(tyrosine kinase inhibitor, TKI)，TKI 的作用為佔據 BCR-ABL 上的 ATP 結合位置使其活性受到抑制，阻斷下游細胞增生的訊息傳遞。美國食品藥品管理局(FDA)已於 2001 年 5 月核准 TKI 藥物 Imatinib mesylate (IM)上市，IM 最初核准



之適應症為 CML，而後發現用於搭配治療 Ph<sup>+</sup> ALL 也能提升治療效果，約 90% 的病人於引導緩解期使用 IM 搭配化療藥物治療都能得到良好的反應，兩年 disease-free survival (DFS) 可從 28% (hyper-CAVD 化療) 提升至 87% (IM 搭配 hyper-CAVD 化療)。雖然 TKI 合併治療下可達到有效血液緩解，但仍有高比例的 Ph<sup>+</sup> ALL 患者會有復發情形。目前異體造血幹細胞移植是唯一可治癒 Ph<sup>+</sup> ALL 的治療法，而合併 TKI 藥物可為患者爭取時間以等待適合的捐贈者出現，TKI 藥物的介入使用亦提升了 Ph<sup>+</sup> ALL 患者整體存活率，採取幹細胞治療法在 TKI 發展前後三年間，整體存活率從 44% 上升至 65%<sup>13,21</sup>，未接受幹細胞移植的患者，三年存活率僅約 43%<sup>13,22</sup>。

#### 8. TKI 在 Ph<sup>+</sup> ALL 治療上所面臨的問題

如前所述，Ph<sup>+</sup> ALL 目前最有效的治療方法為高劑量化療搭配 TKI 藥物的合併處理，使患者首先達到血液學緩解後，再進行異體造血幹細胞移植。然而此種治療法目前仍存在許多限制，例如無法找到組織抗原配對匹配的捐贈者、年長的患者也不適合做高劑量的化療或造血幹細胞移植，且也存在移植後抗宿主反應 (graft-versus-host disease) 的風險。雖患者對 TKI 治療的反應迅速，但對於延長整體存活率 (overall survival) 的成效卻有限，多數患者會在治療後的 1-2 年內血癌復發。年輕病患群的復發率為 19% (有接受移植治療) 至 32% (未接受移植治療)，而年長患者的復發率則為 41% (有接受移植治療) 至 60% (未接受移植治療)<sup>23</sup>。另一方面，患者對 TKI 藥物的抗藥性問題也日益嚴重，過去文獻指出，約 80% 以上曾接受 IM 治療後復發的患者，其癌細胞帶有 ABL kinase domain 的突變，而約 40% 尚未接受治療的病人在診斷初期即被發現癌細胞本身帶有對 IM 具抗藥性的 ABL kinase domain 突變株存在，其中最棘手的為 T315I 突變，第一代 TKI 藥物 IM、第二代的



Dasatinib、Nilotinib 均對其無效，須仰賴第三代藥物 Ponatinib<sup>22,24</sup>。

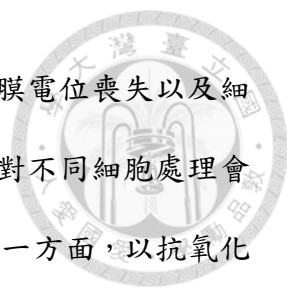
Ph<sup>+</sup> ALL 除了有 BCR-ABL，通常還會伴隨其他的基因異常，使得治療更加困難。根據過去 SNP array 結果指出，CML 病人在症狀輕微的慢性期時，其白血病細胞只帶有 0.47 個 somatic copy number alterations，當疾病進入到急性期進展成 ALL 或 AML 時則增加至 7.8 個，至於 Ph<sup>+</sup> ALL 患者的白血病細胞的 somatic copy number alteration 平均數即達 8.79，顯示其 genome 的不穩定性，而 Ph<sup>+</sup> ALL 常見的異常基因包含了 IKZF1、CDKN2A、PAX5 等，因此解釋為何單以 TKI 抑制劑的治療無法將疾病長期且有效的抑制<sup>25</sup>。

## 二、 對苯二酚衍生物 HQ17(3)簡介

### 1. 對苯二酚代謝與誘發細胞死亡型態

對苯二酚(hydroquinone, HQ)是苯(benzene)的代謝物，苯進入到人體後會藉由肝臟中細胞色素 p450 2E1(cytochrome p450 2E1)代謝成 benzene oxide，接著透過非酵素性重組(non-enzymatic rearrangement)轉換成酚(phenol)，再次藉由 p450 2E1 代謝成 HQ 並隨著血液流至骨髓中，透過骨髓中的過氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)，或自氧化(autoxidation)的方式，代謝氧化成 1,4-benzoquinone (BQ)，BQ 會與 DNA 結合而造成 DNA damage 以及細胞凋亡(apoptosis)，而 BQ 也可再透過 NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO1)作用還原回 HQ，而在 HQ 代謝成 BQ 的過程會伴隨 reactive oxygen species (ROS)的產生而造成細胞氧化壓力<sup>26-28</sup>。(附錄三)


以 HQ 處理富含 MPO 的 HL-60 細胞以及缺少 MPO 的 Jurkat 細胞，皆可造成細胞膜磷脂層(phosphatidyl, PS)外翻、粒線體膜電位喪失(mitochondrial membrane potential loss, MMP loss)、cytochrome C 釋放以及 caspase-3/8/9 活化，最導致細胞死亡；而以 pan-caspase inhibitor (z-VAD)預先處理細胞，抑制細胞的 caspase-3/8/9



活化，在 Jurkat 細胞中可進而避免 HQ 引起的 PS 外翻、粒線體膜電位喪失以及細胞死亡情形，在 HL-60 細胞則無法抑制上述現象，說明 HQ 針對不同細胞處理會誘發 caspase-dependent 或 caspase-independent 兩種凋亡路徑；另一方面，以抗氧化劑 N-acetylcysteine (NAC) 預先處理細胞，可減少 MMP loss 的發生，說明前述 HQ 在代謝路徑中所產生的 ROS 對細胞會造成一定程度的傷害<sup>29</sup>。此外，HQ 在試管實驗中被發現會抑制 Topoisomerase II (Topo II) 的活性，導致 DNA 斷裂；以 HQ 處理人類 CEM Leukemia Cells 會有 DNA 與 Topo II 結合增加的現象，同樣說明 HQ 造成 DNA 斷裂的原因是 Topo II 活性受到抑制所導致的。除此之外，HQ 也具有與硫醇基(sulfhydryl)結合的能力，試管試驗中與含硫醇基的試劑(DTT、glutathione) 結合後再與 Topo II 及 DNA 作用，HQ 會喪失抑制 Topo II 的能力<sup>26</sup>。

## 2. 對苯二酚衍生物相關文獻探討

10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone，以下簡稱 HQ17(3)，是取自台灣漆樹(*Rhus succedanea*)漆液中萃取出天然小分子化合物，其結構為對苯二酚的第二個碳上接有 17 個不飽和碳氫鍊，在第 10、13、15 號碳原子上帶有 C=C 雙鍵<sup>30</sup>。根據先前研究指出，HQ17(3)對多種腫瘤細胞株都具有顯著的毒殺效果，包含人類子宮頸癌細胞(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)及人類血液腫瘤細胞(HL-60)等，HQ17(3) 72 小時處理下的 IC<sub>50</sub> 介於 0.9~60μM，且於高濃度(50μM)處理對人類周邊血單核性細胞(PBMCs)不具毒殺能力，以腹腔注射持續 28 天給予 F334 大鼠 1mg/kg 的 HQ17(3)也無明顯致死毒性。過去研究指出，細胞對於 HQ17(3) 的感受性在 HL-60 與 Topo II 缺失的 HL-60/MX2 兩者間具有明顯差異，IC<sub>50</sub> 分別為 0.9μM 與 9.6μM，顯示 HQ17(3)會選擇性毒殺具有正常 Topo II 功能的細胞<sup>31</sup>。



於試管試驗中，HQ17(3)被發現會與 recombinant Topo II 半胱胺(Cys-427, -733, -977) 形成共價鍵，並在細胞實驗中發現 HQ17(3)在 Huh7 細胞中會與 Topo II $\alpha$ 的 Cys-427 形成共價鍵，Cys-427 位於 Topo II $\alpha$ 的 ATPase domain，因此認為 HQ17(3)與其形成共價鍵會影響 Topo II $\alpha$ 的酵素活性，導致 Topo II $\alpha$ -DNA complex 增加及 DNA 斷裂，最終引起細胞死亡。在 Huh7 及 HL-60 細胞株中均發現 HQ17(3)會造成 DNA 損傷指標  $\gamma$ -H2A.X 磷酸化的增加，啟動下游 DNA 受損相關基因的表現(如 *DDIT3*, *GADD45A*, *GADD45G*)。此外，HQ17(3)也被發現會促使 reactive oxygen species (ROS)的增加，導致細胞死亡<sup>32</sup>，但在 Huh7 細胞中，預先處理抗氧化劑 NAC 雖可部分減少 HQ17(3)造成的 DNA 斷裂、細胞膜破損及粒線體膜電位喪失，但對於細胞死亡則無顯著的抑制情形，顯示 HQ17(3)造成 Huh7 細胞死亡的主因為 Topo II 活性受抑制所導致<sup>30-32</sup>。

我們先前研究發現 HQ17(3)處理 HL-60, RS4;11, SUP-B15, Jurkat 急性白血病細胞株引發細胞死亡，但死亡型態有所不同，在 Jurkat 為引發 caspase-dependent cell death，以 caspase 抑制劑 z-VAD 可抑制 HQ17(3)引起的細胞死亡；而在 RS4;11 以及 SUP-B15 細胞則是引發 caspase-independent cell death，如預先或同時處理抗氧化劑(NAC, Glutathione, Vitamin C)可部分減少細胞死亡、DNA 斷裂、細胞膜破損以及粒線體膜電位喪失等情形，並在 SUP-B15 細胞中看到 HQ17(3)會造成細胞自嗜(autophagy)、內質網壓力(ER stress)等死亡相關路徑的活化，以 Chloroquine 或 Bafilomycin A1 抑制 autophagy 可緩解細胞死亡的發生<sup>33-35</sup>。

### 三、 活性氧分子 reaction oxygen species (ROS)

#### 1. 活性氧分子 ROS 介紹

ROS 泛指具有活性的氧衍生物，包含超氧陰離子(superoxide anion,  $O_2 \cdot^-$ )、過

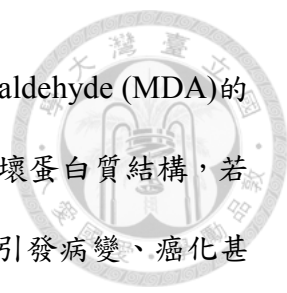




氧化氫(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、氫氧基自由基(hydroxyl radical,  $OH\cdot$ )，統稱活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)。

粒線體為細胞主要產生 ROS 的胞器，粒線體在有氧環境下行呼吸作用時，電子傳遞鏈的 complex I 及 complex III 在電子傳遞傳遞過程滲漏出的電子會與氧分子結合，或透過粒線體內的 coenzyme Q 將  $O_2$  轉變成  $O_2\cdot^-$  並迅速穿過粒線體內膜，接著經過超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)轉變為對細胞具有毒性的  $H_2O_2$ ，細胞有三個將  $H_2O_2$  代謝的途徑，第一個為 thioredoxine reductase(TR or TxR)；第二個為透過穀胱氨酸(Glutathione, GSH)由 glutathione peroxidase (GPx)將  $H_2O_2$  代謝成  $H_2O$  與  $O_2$ ；第三個則是藉由 catalase 的代謝。如  $H_2O_2$  未有效清除或細胞內 GSH 含量較低， $H_2O_2$  會與金屬離子( $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 等)產生 Fenton reaction，生成更具活性且對細胞破壞力更大的  $OH\cdot$ ，導致細胞內 ROS 放大造成細胞損傷<sup>36,37</sup>。除了粒線體外，內質網以及細胞內的酵素，包含 xanthine oxidase, lipoxygenase, NADPH oxidase 等也可還原  $O_2$  產生  $O_2\cdot^-$  透過 SOD 轉變成  $H_2O_2$ ，對細胞造成氧化壓力<sup>37</sup>。

細胞內主要的抗氧化機制可分為酵素性與非酵素性兩類，酵素性包含 SOD、GPx、catalase；非酵素性則是包含 ascorbic acid (vitamin C)、 $\alpha$ -tocopherol (Vitamin E)、glutathione (GSH)、carotenoids、flavonoids，而其中最主要的抗氧化劑為 GSH。細胞正常生長須仰賴微量的 ROS，少許的 ROS 可刺激細胞複製，並可作為次級訊息傳遞分子(secondary messengers)參與細胞生長及分化相關的訊息傳遞，當訊號與受器(receptor)結合會產生 ROS，ROS 可繼續活化下游訊號分子；此外，過去也有文獻指出，ROS 可活化轉錄因子，如 AP-1 與 NF- $\kappa$ B，活化基因表現，因此細胞中須維持定量的 ROS 以維持正常生理功能<sup>36,38</sup>。但當細胞內 ROS 產生過多或是抗氧化系統出現異常時，過度累積的 ROS 就會對細胞造成氧化壓力傷害，ROS 會攻擊 DNA 形成 8-Hydroxyguanine(8-OH-G)及造成脂質過氧化(lipid peroxidation)，脂質



過氧化會引起 lysosomal membrane permeability (LMP) 或 malondialdehyde (MDA) 的生成，而 MDA 也同樣會破壞 DNA 鹼基對，此外，ROS 亦可破壞蛋白質結構，若 ROS 無法正常清除，細胞長時間處於氧化壓力過大的情況下會引發病變、癌化甚至導致細胞死亡<sup>36</sup>。

## 2. ROS 與細胞死亡

過去文獻指出，TNF- $\alpha$  會使 HeLa 細胞內 ROS 上升，導致粒線體失去膜電位，Bax 對粒線體進行穿孔、cytochrome C 釋放、caspase 活化，促使核酸斷裂引起細胞凋亡(apoptosis)，若與抗氧化劑 BHA(Butylated hydroxyanisole) 共處理，則能抑制細胞受損發生；無法正常進行呼吸作用的 HeLa 細胞也對 TNF- $\alpha$  的毒性較不敏感<sup>38,39</sup>。除細胞凋亡外，ROS 也被認為參與計畫性細胞壞死(necroptosis)，以 TNF- $\alpha$  處理 L929 細胞會導致細胞 necroptosis，BHA 的共處理則能減緩細胞死亡<sup>40</sup>。由於 lysosome 位於粒線體附近，當粒線體產生 ROS，lysosome 也容易受到 ROS 攻擊，且 lysosome 缺乏可清除 ROS 的抗氧化機制又存有細胞代謝回收的鐵，當 ROS 進入 lysosome 後會受鐵的催化，易產生更具破壞力的 OH·，造成 lysosome 膜上脂質過氧化，導致 lysosome 膜不穩定而破裂發生 LMP，lysosome 內的酸性水解酶釋出造成細胞死亡<sup>40,41</sup>。ROS 可活化 AMPK (AMP-activated protein kinase)，進而抑制 mTOR 引起細胞自噬(autophagy)，受到 ROS 攻擊而損壞的胞器也會藉由 autophagy，幫助清除 ROS。但 autophagy 亦可清除抗氧化酵素，根據文獻指出，以 z-VAD 處理 L929 細胞會引起 autophagy，使 catalase 降解造成 ROS 累積導致細胞死亡，若以藥物抑制 autophagy 或是透過干擾核糖核酸(RNAi)抑制 ATG7/8 的表現，ROS 累積情形則會消失，並抑制細胞死亡<sup>42,43</sup>。由上述顯示 ROS 可啟動特定機制導致細胞死亡，但 ROS 亦與這些機制存在正向回饋或相互作用的關係。



#### 四、 計畫性細胞死亡(Programmed cell death, PCD)

Programmed cell death 原先只是對細胞死亡型態進行描述，代表具系統性細胞死亡形式。1973 年，schweichel 與 merker 將細胞死亡的型態再進行細分，分為 Type I、II、III 三種型態，分別代表 apoptosis、autophagic cell death 以及 necroptosis<sup>44</sup>。以下針對這三種細胞死亡形式進行介紹：

##### 1. 細胞凋亡(apoptosis, type I)

細胞凋亡時，外型上特徵可觀察到細胞萎縮成圓形、染色質濃縮(chromatin condensation)、核溶解(karyorrhexis)、細胞膜泡狀(plasma membrane blebbing)突形成凋亡小體；生化上的特徵則包括半胱氨酸類蛋白酶(caspase protease)的活化、DNA 切割成 200bp 倍數大小的片段、細胞內膜 phosphatidylserine (PS) 磷脂層外翻等現象。Caspase 為一種 cysteine aspartate-specific protease，依不同的扮演角色又可分為調控細胞凋亡起始的 initiators caspase (caspase-2/8/9/10) 和最後主導細胞死亡的 effector caspase (caspase-3/6/7)。Caspase 於正常生理情況下以不活化態廣泛存在細胞內，其可接觸凋亡訊號後自體活化(auto-activation)或透過其他 caspase 的切割，caspase 的活化會引起一連串凋亡級聯反應(caspase cascade)，切割活化下游其他 caspase，達到訊號放大最終導致細胞凋亡。

Effectors caspase 會切割 inhibitors of caspase-activated DNase (ICAD) 導致 caspase-activated DNase (CAD) 的釋出，CAD 會進入細胞核並帶有 endonuclease 的活性，將 nucleosome 間的 DNA 切割成約 200bp 倍數大小的片段，瓊指(agarose)凝膠電泳中會呈現”ladder”的現象<sup>45</sup>。此外，effectors caspase 活化後也會進入至細胞核對 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 進行切割。PARP 為一種核蛋白，DNA damage 時會活化並在損傷處添加 poly(ADP-ribose) polymers (PAR)，吸引 DNA 修復相關的蛋白聚集，但當 DNA 受損累積過多，PARP 即會被 protease (包括 caspase,

calpain, cathepsins 等)進行切割,導致DNA持續損傷,造成細胞死亡。不同的 protease 的切割也會產生不同的 PARP 切割型態,細胞凋亡時,PARP 主要被 caspase-3/7 切成 89、24kD 的型態,可作為細胞凋亡的 marker<sup>46</sup>。



細胞凋亡又可區分為 caspase-dependent 以及 caspase-independent (附錄四),以下針對這兩種死亡型態進行說明:

(1) Caspase-dependent apoptosis, 可區分為內源性以及外源性<sup>44,45,47,48</sup>:

a. 外源性路徑

透過細胞膜上的 death receptor, 包括 Fas/CD95、Tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor (TNFR)、TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (TRAILR1-2)等, 與外源的 ligand 結合後吸引 adaptor protein-Fas-associated death domain protein (FADD), FADD 會透過 death effector domain (DED)與 pro-caspase-8 組合成 death-inducing signaling complex (DISC), 活化 caspase-8 或-10 進而活化下游 effectors caspase, 最終導致細胞凋亡。

b. 內源性路徑

當細胞遭受內在壓力時, 如 DNA 受損、輻射、毒性、缺氧、病毒感染、氧化壓力、離子失衡、內質網壓力等, 都會造成粒線體損傷, 導致 Mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)的發生, 使得粒線體膜間(intermembrane space)的物質釋出, cytochrome C 即是一種粒線體膜間蛋白, 當 cytochrome 釋出至細胞質後會與 apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1)以及 pro-caspase-9 結合形成 apoptosome, 活化 caspase-9 進而活化下游 effectors caspase, 導致細胞凋亡。而前述透過外源性路徑活化的 caspase-8 同時也可將 BH3-interacting domain death

agonist (Bid)切割成 tBid，造成粒線體外膜受損，透過 mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)誘導內源性的細胞凋亡。



## (2) Caspase-independent apoptosis

當 MOMP 發生，某些粒線體膜間蛋白(intermembrane space protein)會釋出至粒線體外，導致 caspase-independent cell death<sup>44,45,47,48</sup>，包含以下幾種：

### a. Smac/DIABLO 及 high-temperature-requirement protein A2(HtrA2)/Omi


除了可干擾細胞內生性 caspase-3/7/9 抑制分子，X-linked inhibitors of apoptosis proteins (XIAPs)，使 caspase-3/7 活化導致細胞凋亡發生；HtrA2/Omi 也是 serine protease，可直接透過 protease 的活性導致 caspase independent cell death<sup>49</sup>。

### b. Endonuclease G (Endo G)

為核基因編碼的粒線體蛋白(Nuclear-encoded mitochondrial protein)，正常情況下會參與粒線體 DNA 的複製與修復。當 MOMP 發生時會釋出至粒線體外，並具有 nuclear translocation 的特性，會進入至細胞核降解 DNA，導致 oligonucleosomal DNA fragments 的發生<sup>50,51</sup>。

### c. Apoptosis inducing factor (AIF)

AIF 的 C-terminal 朝向 mitochondrial intermembrane space (IMS)，N-terminal 則是鑲嵌在 mitochondrial inner membrane (IMM)的 flavoprotein 上，並帶有 NADH oxidase 活性，調節並維持粒線體呼吸傳遞鍊 complex I 正常氧化磷酸化作用。當 MOMP 發生時，AIF 會被 calpain-I protease 切割成 57kDa 的片段，從 IMS 釋出至



細胞質，因其帶有 nuclear localization signals (NLS)，會進入至細胞核，並具有吸引 endonuclease 聚集的特性，造成 50-300 kb large-scale DNA 片段以及染色質濃縮，導致細胞死亡<sup>44,45,52</sup>。Calpains 被認為是會切割 IMS 中 AIF 的 protease，切位為 AIF 上的 Gly-102<sup>53</sup>，其為 Ca<sup>2+</sup>-dependent、non-lysosomal cysteine proteases，具 calpain-I ( $\mu$ -calpain) 及 calpain-II (m-calpain) 兩種 isoforms，calpain-I 帶有 mitochondrial localization signal (MLS)，存在於粒線體的 IMS 負責 AIF 的 processing<sup>54</sup>。當粒線體內 Ca<sup>2+</sup> 濃度增加時，便會活化 calpain-I 使其對 AIF 進行切割，此外，Ca<sup>2+</sup> 也會促進粒線體呼吸傳遞鏈的作用，導致 ROS 累積並促進 AIF 的 oxidative modification，與 non-modified AIF 相比，能更有效地被 calpain-I 作用<sup>55</sup>。(附錄五)


## 2. 細胞自嗜 (autophagy, type II)

Autophagy 又稱為 macroautophagy，是細胞為克服惡劣環境所發展出的保護機制<sup>43</sup>，可分為 non-selective 與 selective 兩種類型。當細胞遭受飢餓 (starvation)、缺氧 (hypoxia) 等養份缺乏的情況時，會誘導 non-selective autophagy 發生，確保細胞擁有足夠的氨基酸與養分，而 selective autophagy 則是在養分充足的情況下也會活化，目的為清除受損或老化的胞器，針對目標胞器進行 autophagy<sup>56</sup>。正常細胞本身也存在 basal level 的 autophagy，與細胞存活 (survival)、生長 (growth)、分化 (differentiation) 及恆定 (homeostasis) 相關<sup>57</sup>。

以下分別針對 non-selective 與 selective autophagy 進行介紹：

### (1) Non-selective autophagy<sup>57,58</sup>

當細胞處於養分充足時，mammalian target of rapamycin (mTOR) 會活化並磷酸化 autophagy protein 13 (Atg13)，使 Atg13 無法和帶有 Atg1/17 的 complex 結合，從而降低 Atg1 的活性，而當細胞處於缺乏養分的環境壓力下時，mTOR 的活性會被

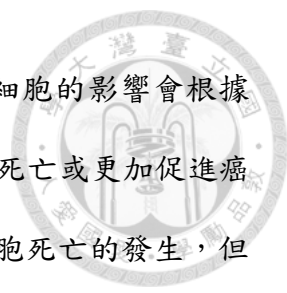


抑制，Atg13 與 Atg1 結合使 Atg1 活化導致囊泡核化(vesicle nucleation)，並透過 class III PI3K (Vps34)的活化與 Beclin1、UV irradiation resistance-associated tumor suppressor gene (UVRAG)、myristylated kinase (Vps15)等蛋白的參與形成 isolation membrane，又稱為 phagophore。細胞內有兩種 ubiquitin-like conjugation systems 幫助 phagophore 囊泡延展(vesicle elongation)及參與 autophagy 進程。首先，E1-like enzyme Atg7 與 E2-like enzyme Atg10 幫助 Atg5/12 complex 形成；另一方面，protease Atg4 會將 LC3-I (soluble form LC3)切割成 LC3-II (autophagic vesicle-associated form LC3)，透過 Atg7 與 E2-like enzyme Atg3 使其與 phosphatidylethanolamine (PE)結合形成 LC3-II/PE complex，再與 Atg5/Atg12 complex 結合並將欲分解的胞器或蛋白質包覆形成 autophagosome，此時 LC3-II 會聚集鑲嵌於 autophagosome 膜上，最後 autophagosome 會與 lysosome 融合形成自嗜溶酶體(autolysosome)，lysosome 內的酸性酵素將包裹於膜內的物質及 inner membrane 降解，完成 autophagy。(附錄六)

## (2) Selective autophagy <sup>56</sup>

在過去研究中已有發現許多針對特定胞器或對象發生 autophagy 的現象並將其命名，包含過氧化體 (peroxisome, pexophagy)、內質網(endoplasmic reticulum, erphagy)、核糖體 (ribosomes, ribophagy)、脂肪顆粒(lipid droplets, lipophagy)、侵入性微生物(invading microbes, xenophagy)，其中最被廣泛研究的 selective autophagy 對象為粒線體(mitochondria, mitophagy)，於後續會作詳細介紹。

雖然 autophagy 的機制為幫助細胞克服困難環境，但過度的 autophagy 反而會導致細胞死亡，例如 selective autophagy 的 mitophagy 若清除掉過多的粒線體，會導致細胞無法維持生理機能進而死亡。許多腫瘤細胞中都被發現具有較高活性的



autophagy 以支持其迅速增殖，抑制 autophagy 發生對於腫瘤細胞的影響會根據 tissue type、tumor grade 及搭配治療法的不同，可能導致癌細胞死亡或更加促進癌細胞存活<sup>43</sup>，而當細胞遭受到環境壓力時，autophagy 常伴隨細胞死亡的發生，但 autophagy 在其中是扮演促進死亡或保護機制的角色則會因細胞狀況而有所不同。Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)在 2012 年對 autophagic cell death 作出以下定義：細胞死亡若能被 autophagy 抑制劑(如：3-Methyladenine、Chloroquine)或基因層面抑制或突變 autophagy 相關基因(如：Atg5、Beclin1)的表現可抑制 autophagy 發生，此種細胞死亡方式稱為 autophagic cell death<sup>44</sup>。

### 3. 細胞壞死(necroptosis, type III)<sup>44,48</sup>

Apoptosis 與 necroptosis 可由細胞死亡的外觀做區分，apoptosis 會導致細胞皺縮出現 apoptotic body，necroptosis 的死亡型態則是細胞脹大並破裂。過去文獻將 U937 同時處理 TNF- $\alpha$ 及 z-VAD，發現細胞在 apoptosis 抑制的情況下會引發 necroptosis，利用 Necrostatin 1 (Nec-1)可專一性抑制 receptor- interacting protein 1 (RIP1)的活性，進而抑制細胞死亡的發生，這種須依靠 RIP1 活性的死亡形式被稱作 necroptotic cell death<sup>59</sup>。

目前已知由 RIP1 主導的 necroptosis 可分為外源性或內源性兩種誘導情形：

#### (1) 外源性路徑

當 death ligand 與 death receptor (如：Fas, TNF- $\alpha$ , TRAILR1) 結合後會促使 TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (TRADD), FADD, RIP1, RIP3 與 caspase-8 結合形成 complex，若 caspase-8 處於活化狀態，則會將 RIP1/3 分解使細胞走向 caspase-dependent apoptosis，若 caspase-8 的活性受藥物或基因層面的抑制，RIP1/3 可維持其活性並將細胞導向 necroptosis<sup>60</sup>。





## (2) 內源性路徑

透過特定刺激造成 genotoxic stress (如：化療藥物 etoposide)，促使細胞內如上述類似的 complex (缺少 death receptor)，稱為 ripoptosome，除了 caspase-8 之外，還伴隨了細胞內生性 apoptosis inhibitor 蛋白 IAP 與 FLICE-like inhibitory protein (FLIP)的參與，細胞走向 apoptosis 或 necroptosis 的決定因素則是在於細胞種類以及細胞生存環境狀況而定<sup>43</sup>。(附錄七)

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

內質網(endoplasmic reticulum, ER)為細胞內調控蛋白質正確生合成、控制與折疊的胞器，若過度的蛋白質生成，或過多未折疊及錯誤折疊蛋白的堆積會產生“內質網壓力(ER stress)”，而內質網同時也是細胞內主要保存  $Ca^{2+}$ 的胞器，因此內質網內  $Ca^{2+}$ 恆定受干擾也會導致 ER stress 發生，其他像是 glucose starvation 造成蛋白糖基化的減少或是缺氧環境造成雙硫鍵減少也會導致 ER stress。細胞內具有一套自我保護機制以恢復內質網的功能，稱為 unfolded protein response (UPR)，但若內質網壓力持續發生且無法排除，UPR 則會導致細胞走向凋亡<sup>61,62</sup>。

已知 UPR 下游至少有三條路徑，受三種穿膜蛋白(UPR sensor)調控，分別為 inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)、protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK) 以及 activating transcription factor 6 (ATF6)。正常狀況下，ER 內的 chaperone-Heat shock 70 kDa protein 5 / 78 kDa glucose-related protein / Binding immunoglobulin protein (HSPA5/Grp78/Bip)會與 UPR sensor 結合，使其維持不活化狀態，當內質網壓力發生，Grp78 會與 UPR sensor 分開，轉而去結合堆積在 ER 內的未折疊及錯誤折疊的蛋白，進而使 UPR sensor 活化，分別導致三種不同 UPR pathway 的發生，以下針對 UPR pathway 進行介紹<sup>61,63,64</sup>：(附錄八)



### 1. PERK 活化路徑

當 PERK 不受 chaperone 抑制，會 oligomerization 並自體磷酸化，進而對下游  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) 磷酸化使其活性受到抑制，降低細胞內 mRNA 的整體轉譯(translation)情形，減少內質網內蛋白質過多的壓力，但會選擇性增加 activating transcription factor 4 (ATF4) 表現，ATF4 會進入到細胞核活化與蛋白質折疊、抗氧化作用、細胞自嗜、氨基酸代謝以及細胞死亡相關的基因，ATF4 也可活化 GADD34 導致 growth arrest 以及 DNA damage，GADD34 同時也會抑制 phosphatase 1 (PP1) 使其無法將 p-eIF2 $\alpha$  去磷酸化，維持蛋白質生成的抑制。另外，PERK 也會對 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) 調控抗氧化反應。

### 2. IRE-1 $\alpha$ 活化路徑

IRE-1 $\alpha$  具有 endoribonuclease (RNase) 及 kinase domain，當 ER stress 發生，IRE-1 $\alpha$  會 oligomerization 而自體磷酸化而活化，並透過其 RNase 的活性對 X box binding protein-1 (XBP1) 的 mRNA 進行 unconventional splicing，切除 intron 1 上的 26 個鹼基，導致 frameshift 的發生而轉譯出具轉錄活性功能的 XBP1s<sup>65</sup>，其可活化 ER chaperones, ER associated degradation (ERAD) 與 phospholipid 的合成藉以抑制 UPR sensor 活性與蛋白質降解，緩解 ER stress。IRE-1 $\alpha$  也可透過 kinase domain 活化 apoptosis-signaling kinase-1 (ASK1)，進而活化下游 c-jun N-terminal kinase (JNK) 與 p38 使細胞走向凋亡路徑。

### 3. ATF6 活化路徑

ER stress 發生時，不受 chaperone 抑制的 ATF6 會從內質網轉移至高基氏體的



膜上，被蛋白酶 site1 (membrane-bound transcription factor peptidase site 1, MBTPS1) 與 site2 (MBTPS2) 透過 intramembrane proteolysis 切割成具活性的轉錄因子，進和活化 ER chaperone 與 ERAD 相關蛋白，緩解 ER stress。

UPR pathway 除了可緩解 ER stress 保護細胞，但同時也可能會導致細胞走向凋亡，如上述所指出的 IRE-1 $\alpha$  活化 JNK/ASK1 以及 PERK/ eIF2 $\alpha$  活化的 pro-apoptotic transcription factor CHOP 都會促使凋亡路徑活化。另外，CHOP 也被認為會活化 endoplasmic reticulum oxidoreductase-1 (Eor1 $\alpha$ )，使內質網過度氧化而造成細胞死亡，而 Eor1 $\alpha$  過去也被報導會去活化內質網上的鈣離子通道 inositol triphosphate receptor (IP3R)，IP3R 與粒線體外膜上的 VDAC 通道會透過 Grp75 相連接，因此會促使過量 Ca<sup>2+</sup> 從內質網導入至粒線體中，粒線體內 Ca<sup>2+</sup> 增加除了會刺激粒線體呼吸傳遞鏈導致 ROS 堆積，也會造成 mitochondrial permeability transition (MPT) 導致粒線體內膜蛋白流出引發內源性凋亡路徑<sup>66-68</sup>。

## 六、 粒線體恆定

### 1. 粒線體動態平衡

粒線體是一個動態的胞器，會持續進行融合(fusion)及分裂(fission)以改變其外形，粒線體的大小由兩者的平衡所決定，而這個動態平衡也會受到粒線體內部或細胞內環境而影響。粒線體的 fusion 與 fission 對於細胞生長、粒線體分佈以及維持健康粒線體的網絡十分重要。過去發現將 fusion 及 fission 進行突變會造成特定疾病的發展，且與 apoptosis 與 mitophagy 的發生有相關聯。因 fusion 與 fission 的恆定跟細胞健康與疾病發展具有相關性，因此粒線體的動態平衡被認為是細胞存活的必要條件，以下即針對 fusion 及 fission 做詳細的介紹<sup>69,70</sup>：



## (1) 融合(fusion)

粒線體的 fusion 是由三種基因進行調控，包含 *mitofusin 1/2 (mfn1/2)* 以及 *optic atrophy 1 (opa1)*。Mfn1/2 蛋白位於粒線體外膜上的 GTPase，調控外膜融合，並會透過 ubiquitination 機制抑制其活性，以藥物處理細胞使粒線體感受到壓力時，會活化不同 ligase 將 Mfn1/2 進行泛素化進而被 proteasome 降解，例如 Doxorubicin 處理 U2OS 細胞使 E3 ligase Huwe1 活化，或 selenite 處理 HeLa 細胞使粒線體氧化壓力產生導致 E3 ligase Muf1 活化，都會造成 Mfn2 泛素化<sup>71,72</sup>，因此 mitofusin 的活性被認為與 stress-induced pathway 有相關性。另一個與 fusion 相關蛋白為 Opa1，為 dynamin-related GTPase，位於粒線體內膜負責內膜的融合。Opa1 具有 8 種 isoforms，透過在 N 端 transmembrane segments 序列旁的 alternatively spliced exons 所表現的 S1、S2 與 S3 三個 proteolytic cleavage sites 而產生不同型態，S1 切割位會存在於全部 isoforms 中，S2 與 S3 則是存在於近半數的 isoform 中，且會被粒線體 intermembrane space 的 AAA protease Yme1 切割，因此 Opa1 的不同 isoform 又可區分為 long form (L-Opa1，未切割產物) 與 short form (S-Opa1，Yme1 切割產物)，並且維持 1:1 的平衡，L-Opa1 會鑲嵌於粒線體內膜促進內膜融合，S-Opa1 則是會游離於粒線體膜間，並促進粒線體 fission 發生<sup>73</sup>。除了 S2 與 S3 的切割生成 S-Opa1 之外，當粒線體失去極性(例如 carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydranzone (CCCP) 這類 uncoupler 藥物處理下造成粒線體膜電位喪失)，或粒線體喪失恆定調節能力時，會誘導 metalloprotease Oma1 的活化並對 S1 位點進行切割，導致未具有 S2 與 S3 的 L-form 也會被切割成 S-Opa1，使粒線體不走向 fusion 而傾向進行 fission<sup>74</sup>，並同時活化下游粒線體自噬機制的啟動。



## (2) 分裂 (fission)

粒線體的分裂由 dynamin-related GTPase Drp-1 負責，Drp1 平時存在於細胞質中，當粒線體欲分裂時會表現 mitochondrial fission 1 (Fis1) 蛋白於粒線體外膜上作為 adaptor protein 吸引 Drp1，Drp1 會藉由蛋白質磷酸化修飾而帶有不同功能，其有三個位點會被不同 kinase 磷酸化，第一個為 Ser-616，會被 protein kinase C (PKC), Rock kinase, CDK1/Cyclin B 或 CAMK-Ia 磷酸化，此位點的磷酸化被認為會促進與粒線體外膜上的 Fis1 結合，促使 fission 發生<sup>75</sup>；第二個位點是 Ser-637，會被 protein kinase A (PKA) 磷酸化，Ser637 磷酸化會使 Drp1 的活性受到抑制，並可透過 calcium-activated cytosolic phosphatase Calcineurin 使其去磷酸化<sup>76,77</sup>；第三個位點則是 Ser-693，被 GSK3B 磷酸化，並在細胞 apoptosis 時抑制 fission 發生<sup>78</sup>。另一方面，也有研究指出內質網與粒線體的分裂有相關性，內質網與粒線體間會透過 mitochondrion-associated membranes (MAMs) 將兩者相連並進行脂質與鈣離子的交換<sup>79</sup>，近年研究發現 ER tubules 會與發生 fission 時期的粒線體交叉相連在一起，而 Drp1 也會座落於內質網與粒線體的連接處，因此內質網也可能可直接調控粒線體分裂的發生<sup>80</sup>。

Fusion 與 fission 為連貫發生的現象，粒線體進行 fusion 時會透過 mitoPLD (phospholipase D superfamily proteins 中的一員) 產生 phosphatidic acid，進而活化 Lipin1 產生 diacylglycerol，並在鈣離子存在的情況下活化 PKC，PKC 會對 Drp1 的第 616 個 serine 磷酸化成 p-S616 活化態促進 fission 發生，藉由這些不同分子的活化順序可指出 fission 與 fusion 為連貫性發生的現象<sup>81,82</sup>。然而部分透過不同 kinase 磷酸化 Drp1 所導致的 alternative fission-inducing pathway 不需接在 fusion 後即可發生，例如以 CCCP 或 apoptosis-inducing 藥物處理細胞導致粒線體片段化發


生，被認為是大量 Drp1 以及 fission 相關蛋白活化，且與 fusion 相關蛋白無關聯<sup>83</sup>；此外，過去研究指出失去極性的粒線體所釋放出的鈣離子會誘導 Calcineurin 的活化，而 apoptosis-induced fission 也可能依賴內質網釋放出的鈣離子而發生<sup>84,85</sup>。

粒線體會利用 fusion 及 fission 的比例調控以抵消不同程度的細胞壓力，當細胞遭受較輕微的壓力(如：飢餓)，會促進 fusion 以保護粒線體不被 autophagosome 清除<sup>86</sup>，並使受損的粒線體透過與健康粒線體融合以恢復功能，若以低濃度藥物毒性處理細胞時也會有類似的現象，被稱為 stress-induced mitochondrial hyperfusion (SIMH)，並主要透過 Mfn1、L-Opal 與 SLP2 調控<sup>87</sup>；但當細胞遭受較強烈的壓力導致粒線體膜電位喪失時，會使 fusion 相關蛋白降解進而促進 fission 發生。透過 fission 分裂出來的片段化粒線體會根據其膜電位狀態決定進行 fusion 或是被清除，帶極性或膜電位稍低的粒線體會透過 fusion 再回到粒線體動態平衡的循環中，但當分裂出的粒線體膜電位過低時，會使其 fusion 受到抑制，而進入到後續的 mitophagy 清除過程<sup>69,70</sup>。(附錄九)

## 2. 粒線體自噬

Selective autophagy 的一種，為專一性清除粒線體的過程，細胞維持正常生理恆定的重要機制，近年來被大量研究於病理學的疾病發生疾病發生機轉，並已知其與紅血球分化、神經發育疾病、中風與藥物誘導的組織損傷有相關性。Mitophagy 於 2004 年被 Kissova et al. 於 yeast 中發現的新分子機制，在 yeast 中參與 mitophagy 調控的基因包含 *Atg32*、*Uth1p* 以及 *Aup1p*，然而在哺乳動物模式中尚未發現相關同源基因，而是發現哺乳動物細胞另有特殊的調控機制<sup>56,88</sup>。

在哺乳動物細胞中，粒線體通透性轉換(mitochondrial permeability transition, MPT)被認為是導致粒線體去極化並引發 mitophagy 發生的原因。MPT 是透過由三




種膜轉運蛋白所組合的 permeability transition (PT) pore 所調控，包含位於外膜的 voltage-dependent anion channel (VDAC)、內膜上的 adenine nucleotide translocator (ANT) 以及位於基質的 cyclophilin D (CypD)，其他粒線體膜蛋白(如：creatine kinase, hexokinase 及 Bax) 也被認為會參與 PT pore 的組成。當 MPT 開啟時，可使粒線體通透性增加，使分子量約 1500kDa 的蛋白可進入至粒線體中，進而導致粒線體去極化失去膜電位，過去於肝細胞中發現去極化的粒線體會與酸性胞器有結合的現象，並被帶有 LC3 的 autophagosome 進行包覆並進行 mitophagy。另一方面，失去膜電位的粒線體會傾向進入前述 mitochondrial fission 的過程，過去研究認為，透過 fission 而被片段化的粒線體，因其體積較小因此更易被 autophagosome 所包覆進行分解，並發現在 HeLa 細胞將調控 fission 的關鍵基因 Fis1 過表現的情形下會促進 mitophagy 的發生，而 fusion 相關基因 OPA1 的過表現則是被認為會抑制 mitophagy 的發生，說明 fission 與 mitophagy 進程具有相關聯<sup>56</sup>。

以下針對 yeast 與哺乳動物不同調控基因調控 mitophagy 的機制進行說明<sup>56,88-91</sup>：

(附錄十)

#### (1) Atg32 調控

Mitophagy 的機制最早於 yeast 中被發現，其被認為會在 stationary-phase 調控粒線體的 quality control，將過度使用或多餘的粒線體清除。近年來在研究 yeast 的 mitophagy 發生機制中，針對 mitophagy 發生時所包覆的蛋白進行分析，發現其中與 autophagy 相關並在 mitophagy 參與重要調控地位的蛋白為 Atg32。Atg32 為鑲嵌於粒線体外膜上的 autophagy protein，當細胞處於 mitophagy-inducing growth 環境下時，其面向細胞質的 N 端會與 Atg11 結合，Atg11 接著吸引 Atg8 連接，Atg8 會夾帶由一系列蛋白所建構的 isolation membrane 靠向粒線體。另一方面，Atg32



的 N 端本身也帶有 WXXL-like Atg8-binding domain，因此也可不透過 Atg11 直接與 Atg8 結合，而不論是直接或間接(透過 Atg11 連接)，Atg8 所牽引的 isolation membrane 隨後將粒線體進行包覆形成 autophagosome，進而發生 mitophagy。

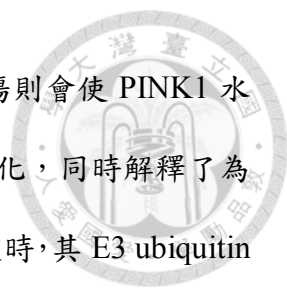
## (2) NIX 調控

透過 mitophagy 將正常的粒線體消化被認為參與在紅血球發育過程中，大多哺乳動物的成熟紅血球會不具有粒線體，而這需要靠未成熟紅血球在分化期間藉由 mitophagy 來達成，被認為調控此過程的關鍵蛋白為 NIP3-like protein X (NIX，亦稱做 BNIP3L)。NIX 為鑲嵌於粒線體外膜，面向細胞質的一端帶有 WXXL-like motif，會直接與 LC3 及 GABA receptor associated protein (GABARAP) 結合，吸引 isolation membrane 包覆至粒線體，誘導 mitophagy 發生。

## (3) Parkin-PINK1 調控

近年研究被發現哺乳動物細胞會利用 mitophagy 維持粒線體的品質與細胞正常機能，並找出兩種負責調控 mitophagy 發生的蛋白，分別是為位於粒線體外膜的 PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK1) 以及游離於細胞質的 E3 ubiquitin ligase parkin (Parkin)，這兩種蛋白的突變會導致 mitophagy 的抑制，並被認為與帕金森氏症的發生相關。Parkin 廣泛表現於不同組織的細胞中，包含腦、心臟、骨骼肌與肝臟等，過去發現以粒線體的 uncoupler 藥物(如：CCCP)處理不同細胞，或使用對粒線體具毒性的物質(如：百草枯)，都會使 Parkin 從細胞質匯集至受損的粒線體上，促使 mitophagy 發生，而不影響健康的粒線體；因此 Parkin 被認為會維持粒線體的品質以維持器官正常功能。而 Parkin 聚集到損傷粒線體導致 mitophagy 的過程需要有 PINK1 的參與，PINK1 是廣泛表現於粒線體內的 kinase 蛋白，在健康的



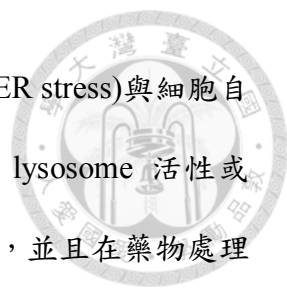


粒線體中會迅速被水解，維持低濃度的表現，若粒線體受到損傷則會使 PINK1 水解受到抑制，使 PINK1 維持高表現吸引 Parkin 結合並對其磷酸化，同時解釋了為何 Parkin 只會結合上受損粒線體的原因。當 Parkin 結合上粒線體時，其 E3 ubiquitin ligase 會對粒線體的外膜蛋白(包含 Mitofusin1/2 及 VDAC1)催化並接上調控訊息傳遞的 Lys63-linked polyubiquitin chains，引起 ubiquitin-binding adaptor p62 結合，p62 除了會自體結合更加吸引 ubiquitylated protein 的聚集，並且會透過與 LC3 的結合將 autophagosome 吸引並包覆粒線體，進而完成粒線體清除。另一方面，parkin 對 mfn1/2 造成的泛素化(ubiquitination)也被認為會引起蛋白質水解的路徑，藉此抑制破壞的粒線體重新融合，促進分裂以及 mitophagy 的發生。

雖然 mitophagy 被認為是一種保護機制，透過清除受損粒線體以維持細胞正常能量機能，但當 mitophagy 過度發生且無法和粒線體生合成達到平衡時，會導致細胞內粒線體總量減少，使細胞能量不足而導致 mitophagic cell death；同樣的，若 mitophagy 功能喪失，而粒線體的生合成仍持續進行時，則會使損傷的粒線體持續生合成累積在細胞內，無法提供細胞正常的能量供給，也會導致細胞死亡的發生，因此 mitophagy 的發生是為了幫助細胞存活抑或是導致細胞死亡，需視細胞內能量代謝的情況而定<sup>92</sup>。

## 七、 Preliminary data

本實驗室在過去研究中發現 HQ17(3)處理費城染色體陽性(Ph<sup>+</sup>)的 B-ALL 細胞株 SUP-B15 會導致 caspase-independent cell death，藥物處理 8 小時即可看到明顯的死亡情形，並伴隨 ROS 堆積與粒線體膜電位喪失等現象，而以抗氧化劑 Glutathione (GSH)或 vitamin C 的共處理可降低 ROS 產生並緩解細胞死亡。過去也



發現 SUP-B15 在 HQ17(3) 5 或 6 小時的處理下即有內質網壓力(ER stress)與細胞自  
嗜(autophagy)的發生，以 autophagy 抑制劑 chloroquine 抑制 lysosome 活性或  
bafilomycin A1 抑制 autolysosome 的形成均可減緩細胞死亡情形，並且在藥物處理  
24 小時下觀察到 apoptosis-inducing factor (AIF) 進入到細胞核，認為此現象可能與  
ER stress 及細胞死亡有所關聯<sup>34,35</sup>。



## 第二章 研究目的與實驗設計

### 一、 研究目的

#### 1. 研究動機

先前研究指出，HQ17(3)對癌症細胞具有選擇性毒性，對周邊血單核球細胞則不具抑制效果，且相較其他實體腫瘤細胞，針對 ALL 細胞的毒殺作用特別有效，說明 HQ17(3)可能會針對 ALL 細胞某個特殊弱點，導致藥物毒殺能力加強。我們將實驗專注在 SUP-B15 (Ph<sup>+</sup> B-ALL)細胞株上，因 *BCR-ABL*<sup>+</sup> ALL 被認為是惡性度較高的 ALL subtype，即使以高強度化療搭配 TKI 藥物的使用仍無法完全治癒，且因此類型 ALL 在老年患者中也佔很大的比率，無法接受高強度化療的副作用以及異體造血幹細胞移植的治療，因此目前仍需找出可有效針對這類惡性度高的 ALL 的替代/輔助治療方針。我們先前研究發現 HQ17(3)對 SUP-B15 所誘導的細胞死亡為 caspase-independent cell death，與其他腫瘤細胞(如 Huh7 與 HL-60)及另一株 T-ALL 細胞株 Jurkat 所誘導的 caspase-dependent apoptosis 不同，因此認為 HQ17(3)可能在 SUP-B15 細胞會誘導與其他腫瘤細胞不同的致死路徑，並可能與此細胞的特殊弱點有關。本研究即是要去探討 HQ17(3)對 SUP-B15 所誘導的毒殺路徑為何，藉此去找出 Ph<sup>+</sup> ALL 的特殊弱點，以利於將來在高惡性 ALL 治療開發上的參考。

目前已知 HQ17(3)會造成 SUP-B15 細胞內 ROS 堆積，以抗氧化劑可減緩細胞死亡情形，也觀察到 HQ17(3)處理 5 小時會誘導 ER stress 發生，以及 6 小時處理下會有 autophagy 的現象，並在藥物處理 24 小時觀察到 AIF 分子進入到細胞核的情形<sup>35</sup>，猜測這些路徑的活化具有相關性，ER stress 的發生可能導致粒線體內 Ca<sup>2+</sup> 的不平衡，進而導致 calpain-I 活化對粒線體內膜蛋白 AIF 進行切割，使其進入至細胞核，並可能與細胞死亡有關。



## 2. 研究目的

- (1) 針對過去所發現的 HQ17(3) 對 SUP-B15 細胞所誘導的不同路徑進行相互關係的探討。
- (2) 探討 HQ17(3) 所主導 SUP-B15 細胞死亡的路徑為何。

## 二、 實驗設計

### 第一部分—確認 mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ 增加以及 AIF 的切割與細胞死亡有關

- (1) 以  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fluo4 與 Rhod2 染色觀察 HQ17(3) 處理 5 小時後，粒線體的  $\text{Ca}^{2+}$  改變情形；以免疫螢光染色觀察 HQ17(3) 處理 24 小時後，AIF 分子進入到細胞核的情形，確認 ER stress 導致粒線體內  $\text{Ca}^{2+}$  的增加並促進 AIF 的修飾及核轉移。
- (2) 分別以  $\text{Ca}^{2+}$  chelator Bapta-AM 及 calpain-1 抑制劑 PD150606 與 HQ17(3) 共處理，以免疫螢光確認 AIF 切割情形是否可受到抑制，並以 Annexin V/PI 染色觀察細胞死亡情形，確認  $\text{Ca}^{2+}$  活性或 AIF 切割受到抑制是否可緩解細胞死亡。

### 第二部分—確認 HQ17(3) 造成的粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 失衡會導致粒線體損傷與粒線體自噬

- (1) 以粒線體 ROS 染劑 MitoSOX 與膜電位偵測染劑 JC1 觀察 HQ17(3) 處理 8 小時後造成的粒線體損傷情形；以西方墨點法偵測 mitochondrial dynamic 相關蛋白 Mfn1/2 及 Opa1 的改變情形；以 MitoView 染劑進行粒線體染色觀察粒線體型態改變的現象；以免疫螢光染色觀察 mitophagy 發生情形。
- (2) Bapta-AM 與 HQ17(3) 共處理，以 MitoSOX 染色、西方墨點法與免疫螢光染色法觀察粒線體上述損傷情形是否可受到緩解，確認 HQ17(3) 誘導的粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  失衡導致粒線體損傷，並與細胞死亡有關聯性。

### 第三章 材料與方法



#### 一、 實驗材料

##### 1. 細胞株

本論文研究所使用之 *BCR-ABL*<sup>+</sup> B-ALL 細胞株 SUP-B15 購買自 American Type Culture Collection (ATCC)。

ATCC 編號：CRL-1929<sup>TM</sup>

##### 2. 試藥/劑、抗體、儀器清單

試劑品名	廠牌 (catalog Number)
1-Butanol	Merck (1.01990.1000)
40% Acrylamide/bis-acrylamide (29:1)	AMRESCO (0311)
2-Mercaptoethanol	Gibco (21985-023)
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	ImmunoChemistry Technologies, LLC (6244)
Agarose I <sup>TM</sup>	AMRESCO (0710)
Ammonium persulfate (APS)	AMRESCO (0486)
Annexin V-FITC	BioVision (1001-200)
Albumin	Sigma (A4503)
HyClone <sup>TM</sup> Bovine serum albumin (BSA)	GE Healthcare (SH30574.02)
bis(2-aminophenoxy) ethane tetraacetic acid (Bapta-AM)	Molecular probes (B1205)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Wako (031-00435)

Chloroquine	Sigma (C6628)
Ethanol	Merck (1.00983.2500)
Fetal bovine serum	Gibco (26140-079)
Fluo-4, AM	Molecular probes (F14201)
FLUORO-GEL	Electron Microscopy
Glucose (Dextrose)	Wako (041-00595)
L-Glutathione (reduced) (GSH)	Sigma (G4251)
L-glutamine solution	Biological Industries (03-020-1B)
Glycine	Sigma (G-8898)
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (no calcium, no magnesium, no phenol red)	Gibco (14185052)
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (calcium, magnesium, no phenol red)	Gibco (14025092)
HCl	Wako
HEPES	Sigma (H-0891)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Biological Industries (11-058-1G)
Isoton	Beckman Coulter (8546719)
Methanol	Merck (1.06009.2500)
MitoSOX™	Molecular probes (M36008)
MitoView green	Biotium (70054-T)
NaCl	Sigma (S-7653)
Non-fat milk powder	安佳
PBS (10X ready pack)	Gibco (70011-044)



PD150606	Sigma (D5946)
Phosphatase Inhibitor cocktail (10X)	Roche (04906837001)
<i>p</i> -nitrophenyl phosphate (PNPP)	Sigma (S0942)
Protease Inhibitor cocktail (10X)	Roche (04 693 159 001)
Propidium iodide (PI)	BioVision (1056-1)
Rhod-2, AM	Molecular probes (R1244)
2X RIPA buffer (pH7.4)	Bio Basic (RB4475)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	AMRESCO (0227)
Sodium acetate trihydrate	Wako (198-01055)
Sodium bicarbonate	Sigma (S4019)
Sodium pyruvate	Biological Industries (03-042-1B)
TEMED	Sigma (T9281)
Tris-base	AMRESCO (0827)
Triton-X 100	Sigma (T9284)
Tween-20	Sigma (P1379)



抗體品名	廠牌/目錄編號
Mouse anti-human COX IV antibody	Cell signaling/11967
Mouse anti-human GAPDH antibody	GeneTex/GTX627408
Mouse anti-human MFN2 antibody	Abcam/ab56889
Mouse anti-human OPA1 antibody	BD Biosciences/612606
Rabbit anti-human AIF antibody	GeneTex/GTX102399
Rabbit anti-human LC3B antibody	GeneTex/GTX127375



Rabbit anti-human MFN1 antibody	Proteintech/13798-1-AP
Goat anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell signaling/7074
Horse anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell signaling/7076
Goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody,	Invitrogen/A-11008
Alexa Fluor® 488 conjugate	
Goat anti-mouse IgG secondary antibody,	Biolegend/405326
Alexa Fluor® 594 conjugate	

試劑組品名	廠牌/目錄編號
Bio-Rad Protein Assay Dye reagent concentrate	Bio-Rad/500-0006
ARROW Prestained Protein ladder	ARROWTEC/APM0671.250
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo/34075
Western Lighting Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence	PerkinElmer/NEL105001EA

儀器名稱	廠牌型號
LAS-4000 影像照相系統	FUJIFILM life science LAS-4000
Shandon Cytospin III cytocentrifuge	GMI 8358-30-0001
倒立螢光顯微鏡	Olympus IX83
倒立螢光顯微鏡	Olympus IX71
正立共軛焦螢光顯微鏡	ZEISS, LSM 510

(台大醫院醫學研究部第二共同研究室)



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 Z333MK-2
自動酵素免疫分析儀 (VERSAMax microplate reader)	VERSAMax
流式細胞儀	BD FACSCalibur
流式細胞儀	Beckman Coulter CytoFLEX™
二氧化碳培養箱	ESCO CO <sub>2</sub> incubator
迴旋水浴槽	STOVALL life science
蛋白質轉漬裝置	Amersham Biosciences
迷你垂直式電泳槽	Bio-Rad 165-8001





### 3. 各式溶液及其配方：

#### (1) 細胞培養液：IMDM contain 20% FBS (4°C保存)

材料	用量	濃度
IMDM	400ml	
FBS	100ml	20%
100mM Sodium pyruvate	5ml	1mM
2-Mercaptoethanol	0.5ml	0.1%

#### (2) 流式細胞儀相關實驗

##### 5X Annexin V-binding buffer, pH7.4 (100ml) (4°C保存)

材料	用量	濃度
HEPES	1.192g	50mM
NaCl	4.09g	700mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.675g	25mM

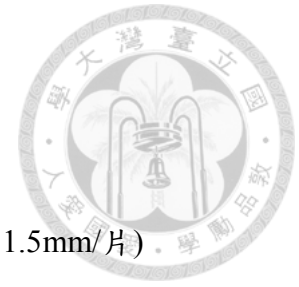
\*使用前以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋成 1X，並通過 0.22μm filter 後使用。

#### (3) 萃取細胞蛋白質

##### 細胞溶解液 (4°C保存)

材料	濃度
RIPA buffer	1X
Triton X-100	1%
10X protease inhibitor cocktail	1X
10X phosphatase inhibitor cocktail	1X

\*Protease inhibitor、phosphatase inhibitor 及 Triton X-100 使用前添加



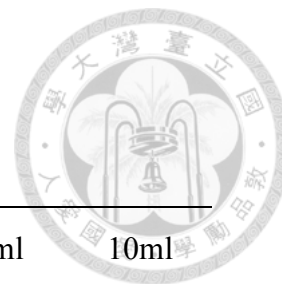
(4) 鈉十二烷基硫酸鹽聚丙烯胺凝膠電泳與膠體轉漬

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 <sub>2</sub> 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				

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

5% Stacking gel for Tris-glycine SDS-PAGE (3ml/一片膠)



材料	Stacking gel volume				
	3ml	4ml	5ml	8ml	10ml
40% Acryamide (29:1) (ml)	0.38	0.5	0.63	1	1.26
1.0M Tris-Cl, pH6.8 (ml)	0.38	0.5	0.63	1	1.26
H <sub>2</sub> O (ml)	2.18	2.92	3.64	5.84	7.28
10% SDS (ul)	30	40	50	80	100
10% APS (ul)	30	40	50	80	100
TEMED (ul)	3	4	5	8	10

6X SDS gel-loading buffer (-20°C保存)

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-Mercaptoehanol	2ml	20%
Total	10ml	



5X Tris-glycine electrophoresis buffer, pH8.3 (室溫保存)

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

\* 以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋成 1X 後使用

(5) 西方墨點法

1X Transfer buffer (pH8.5) (4°C保存)

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

10X TBS (pH7.6) (室溫保存)

材料	濃度(10X)
Tris	200mM
NaCl	1.36M



1X TBS/T (washing buffer) (室溫保存)

材料	終濃度
10X TBS	1X
Tween20	0.1%

Blocking buffer (5% non-fat milk in TBS/T) (4°C保存)

材料	終濃度
1X TBS/T	1X
Non-fat milk	5%

(6) 免疫螢光染色

4% paraformaldehyde (-20°C保存)

材料	用量
paraformaldehyde	4g
PBS	100ml

Blocking buffer (4°C保存)

材料	濃度
BSA	1%
Triton X-100	0.3%

BSA: Bovine serum albumin

\*以 PBS 製備



## 二、 實驗方法

### 1. 細胞解凍、培養與計數

本研究所使用的 *BCR-ABL*<sup>+</sup> ALL 細胞 SUP-B15 為懸浮性細胞，需以含 20% FBS 的 IMDM 培養液培養於 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱。細胞解凍時，先將液態氮凍存的細胞浸於 37°C 水浴槽於 90 秒內解凍完全，將細胞轉移至 15ml 離心管，逐滴加入 6ml 已回溫的培養液並混合均勻，再添加培養液至 10ml，以 ~70x g (800rpm/KUBOTA2100) 室溫離心 3 分鐘，去除上清液，將細胞重新懸浮於 5ml 培養液中，以 25T flask 進行培養，待至細胞存活率達 90% 以上即可進行實驗，並每隔兩天需進行繼代培養。繼代培養時，將 15μl 細胞液與等體積的 0.4% trypan blue (in 1xPBS) 混合，取 15μl 混合液注入細胞計數器中進行細胞計數。取所需的細胞數，利用培養液將細胞調整至 5x10<sup>5</sup>/ml，剩餘細胞即可進行實驗或丟棄。(SUP-B15 最適當培養密度範圍：5~20x10<sup>5</sup>/ml)

### 2. 細胞膜磷脂質 phosphatidylserine (PS) 外翻與細胞膜完整性分析

於 24 孔盤種入細胞(2x10<sup>5</sup>/ml，共 1ml)，分別處理 DMSO、HQ17(3)、抑制劑等藥物，放置於 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱培養。達指定時間後，將細胞取至 1.5ml 離心管中，以 1,000 x g 室溫離心 5 分鐘，去除上清液，拍散細胞團塊，加入 1ml 1XPBS 離心清洗細胞。去除上清液，將細胞懸浮於 500μl 1X Annexin V-binding buffer 中，加入 1μl 150μg/ml Annexin V-FITC 和 1μl 250μg/ml PI，於室溫避光反應 5 分鐘，再添加 500μl 1X Annexin V-binding buffer 避光反應 5 分鐘，以流式細胞儀 (Beckman, CytoFLEX) 上機，結果以 CytoExpert 軟體進行分析。



### 3. 粒線體 ROS 偵測

將細胞種於 24 孔盤內( $5 \times 10^5$ /ml, 共 1ml), 分別處理 DMSO、HQ17(3)與 Bapta-AM, 放置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  恆溫培養箱培養 4 至 8 小時。達指定時間後, 將細胞取出至 1.5ml 離心管,  $1,000 \times g$  室溫離心 5 分鐘, 去除上清液, 加入 1ml 1X PBS 離心清洗細胞, 加入 0.5ml 的  $5 \mu\text{M}$  MitoSOX (in 1X HBSS), 於  $37^\circ\text{C}$  避光反應 20 分鐘, 細胞離心清洗後重新懸浮於 0.5ml 1XPBS 中, 取  $100 \mu\text{l}$  以 cytopsin 方式打於蓋玻片上製作細胞抹片( $1 \times 10^5$  cells/ $100 \mu\text{l}$ , 450rpm, 5min), 利用 4% paraformaldehyde 室溫固定 10 分鐘, 將玻片以二次水浸潤清洗, DAPI 以二次水稀釋至  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 覆蓋於細胞上, 室溫作用 5 分鐘後, 以二次水浸潤清洗, 最後利用 FLUORO-GEL 封片液進行封片並避免氣泡產生, 再以透明指甲油將四邊封住, 待片子風乾後利用倒立螢光顯微鏡(Olympus IX83)進行觀察與拍照, 每組至少拍 5 個視野( $10 \times 40$ ), 每個視野隨機選取 10 顆細胞以 ImageJ 軟體分析單顆細胞的螢光強度, 以對照組的螢光強度當作 1, 進行相對倍數的比較。

### 4. 細胞內鈣離子偵測

將細胞種於 24 孔盤內( $5 \times 10^5$ /ml, 共 1ml), 分別處理 DMSO、HQ17(3)、Bapta-AM 等藥物, 放置於  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  恆溫培養箱培養 5 小時。達指定時間後, 將細胞取出至 1.5ml 離心管, 以  $1,000 \times g$  室溫離心 5 分鐘, 去除上清液, 以 PBS 離心清洗細胞。加入 1ml 含有  $2 \mu\text{M}$  Fluo 4-AM 與  $1 \mu\text{M}$  Rhod 2-AM 的 1X HBSS (no  $\text{Ca}^{2+}$ , no  $\text{Mg}^{2+}$ ), 於  $37^\circ\text{C}$  避光反應 30 分鐘後, 離心去除上清液, 重新懸浮於 35ul 含有 10% FBS 的 HBSS 中, 取  $17 \mu\text{l}$  細胞液滴於載玻片上, 覆上蓋玻片並避免氣泡產生, 利用倒立螢光顯微鏡(Olympus IX83)觀察, 每組至少拍 5 個視野( $10 \times 100$ )進行分析, 以細胞內超過 3 顆 Rhod-2 紅螢光 puncta 定義為  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  overload 細胞。





## 5. 粒線體膜電位偵測

### (1) 以螢光顯微鏡觀察

將細胞種於 24 孔盤內( $5 \times 10^5$ /ml, 共 1ml), 分別處理 DMSO、HQ17(3) 8 小時, 放置 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱培養, 達指定時間前 40 分鐘, 加入終濃度 2.5µg/ml JC-1 染劑至培養液中繼續培養至指定時間, 以 1,000 x g 室溫離心 5 分鐘, 去除上清液, 將細胞重新懸浮於 36µl 的 PBS 中, 以 17µl 滴於載玻片, 覆上蓋玻片並避免氣泡產生, 以倒立螢光顯微鏡(Olympus IX83)拍照並觀察紅綠螢光表現情形。


### (2) 以流式細胞儀分析

將細胞種於 24 孔盤內( $2 \times 10^5$ /ml, 共 1ml), 分別處理 DMSO、HQ17(3) 8 小時, 放置 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱培養, 達指定時間前 40 分鐘, 加入 2.5µg/ml JC-1 染劑至培養液中繼續培養至指定時間以 1,000 x g 室溫離心 5 分鐘, 去除上清液, 將細胞以 1ml PBS 重新懸浮於康氏管中, 以流式細胞儀(Beckman, CytoFLEX)分析細胞紅螢光(PE channel)與綠螢光(FITC channel)的表現情形, 以 CytExpert 軟體分析實驗結果, 取得 J-aggregate 紅螢光平均螢光強度(MFI)除以 monomer 綠螢光 MFI 的比值, 比較處理組與實驗組比值的相對改變情形。

## 6. 粒線體形態與總量分析

### (1) 以螢光顯微鏡觀察

將細胞種於 24 孔盤內( $5 \times 10^5$ /ml, 共 1ml), 分別處理 DMSO、HQ17(3), 放置 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱培養, 達指定時間前半小時, 添加終濃度 100µM MitoView 染劑至培養液中繼續培養至指定時間, 以 1,000 x g 室溫離心 5 分鐘, 去除上清液, 將細胞離心清洗後重新懸浮於 0.5ml 1XPBS 中, 取 100µl 以 cytospin



方式打於蓋玻片上製作細胞抹片( $1 \times 10^5$  cells/100 $\mu$ l, 450rpm, 5min), 利用 4% paraformaldehyde 室溫固定 10 分鐘, 將玻片以二次水浸潤清洗, DAPI 以二次水稀釋至 0.5 $\mu$ g/ml, 覆蓋於細胞上, 室溫作用 5 分鐘後, 以二次水浸潤清洗, 最後以 FLUORO-GEL 封片液進行封片, 以透明指甲油將四邊封住, 利用正立共軛焦螢光顯微鏡(ZEISS, LSM 510)於 10x100 倍下每組至少拍 5 個視野進行分析。

## (2) 以流式細胞儀分析

將細胞種於 24 孔盤內( $2 \times 10^5$ /ml, 共 1ml), 分別處理 DMSO、HQ17(3), 放置 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱培養, 達指定時間前半小時, 添加 100 $\mu$ M MitoView 染劑至培養液中繼續培養至指定時間, 以 1,000 x g 室溫離心 5 分鐘, 去除上清液後將細胞以 1ml 1XPBS 重新懸浮於康氏管中, 以流式細胞儀(Beckman, CytoFLEX)的 FITC channel 分析細胞綠螢光強度, 利用 CytExpert 軟體進行分析。

## 7. 免疫螢光染色

將細胞種於 24 孔盤內( $5 \times 10^5$ /ml, 共 1ml), 分別處理 DMSO、HQ17(3)或抑制劑藥物共處理後, 放置於 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱培養 24 小時。達指定時間, 將細胞以 cytopsin 方式打於蓋玻片上製作細胞抹片( $1.5 \times 10^5$  cells/100 $\mu$ l, 450rpm, 5min), 利用 4% paraformaldehyde 室溫固定 15 分鐘, 接著以 blocking buffer (PBS contain 1% BSA, 0.3% Triton X-100)室溫作用一小時。將一級抗體以 blocking buffer 1:200 稀釋, 覆於整個蓋玻片上, 4°C作用 overnight (in wet chamber), 之後將蓋玻片浸於 PBS 清洗三次, 每次 5 分鐘; 二級抗體同樣以 blocking buffer 1:200 (Alexa 594) 或 1:500 (Alexa 488)稀釋, 覆於整個蓋玻片上, 室溫作用一小時, 以 PBS 清洗三次; DAPI 以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋至 0.5 $\mu$ g/ml, 覆於蓋玻片上, 室溫作用 5 分鐘, 以 PBS 清洗

三次，利用 FLUORO-GEL 封片液將蓋玻片蓋於載玻片上，避免氣跑產生，再以透明指甲油將四邊封住，待片子風乾後利用螢光顯微鏡觀察，以正立共軛焦螢光顯微鏡(ZEISS, LSM 510)於 10x100 倍下每組至少拍 5 個視野進行分析。



## 8. 西方墨點法

### (1) 蛋白質萃取

接種細胞於 6cm 培養皿( $5 \times 10^5$ /ml, 共 6ml)，以 HQ17(3)處理後放置於 37°C、5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱培養。達指定時間後，將細胞取出至 15ml 離心管，以 400 x g (1,500 rpm/KUBOTA8800)，4°C 離心 5 分鐘，將上清液去除並拍散細胞團塊，以 3ml PBS (4°C)清洗細胞兩次。完全去除上清液，以 80 $\mu$ l 細胞裂解液將細胞懸浮至 1.5ml 離心管，置於冰上 15 分鐘，再將細胞於冰浴中進行 3 次 sonication，一次 10 秒，每次間隔需靜置 10 秒，之後以 22000 x g (15,000 rpm/HERMLE Z233MK-2)，4°C 離心 15 分鐘，將上清液轉移至新離心管，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。先以 albumin 製作標準曲線，將 stock (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)序列稀釋成六個濃度(0, 1/2X, 1/3X, 1/4X, 1/8X, 1/16X)，將待測樣品以滅菌水稀釋 20 倍，各取 10 $\mu$ l 加於 96 孔盤(三重複)。Bio-Rad protein assay reagent 以滅菌水稀釋五倍，每一孔加入 200 $\mu$ l，避光作用 5 分鐘，以自動酵素免疫分析儀 (VERSAMax)偵測波長 595nm 吸光值。依據 albumin 濃度梯度與吸光值製作標準曲線，依此標準曲線定量待測樣品濃度。定量完成後，將蛋白樣品以滅菌水稀釋至 30 $\mu$ g/15 $\mu$ l，並加入 3 $\mu$ l 6X SDS loading dye，98°C 加熱 10 分鐘，完成電泳樣品準備。



### (3) 納十二烷基硫酸鹽聚丙烯胺凝膠電泳與膠體轉漬

依欲分離蛋白的分子量大小配置適當濃度的 separating gel，stacking gel 都用 5%。將電泳樣品以及蛋白質標記(marker)注入齒孔中(well)，於 4°C 下進行電泳。先以 70 伏特(V)電壓進行聚焦(stackng)，待追蹤染劑(tracking dye)聚集於上下膠的交界，再以 130 伏特(V)電壓分離蛋白，藉由 marker 位置決定電泳停止時間，將膠體取出進行膠體轉漬。轉漬前，先將 PVDF 膜(polyvinylidene difluoride membrane)以甲醇活化，再負極往正極依序組裝轉漬裝置：海綿、濾紙三張、膠體、PVDF 膜、海綿。將轉漬裝置移至轉漬槽並倒入 transfer buffer，於 4°C 冰箱以 400 毫安培(mA)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 膜進行裁切並做記號，放入塑膠盒中以 washing buffer(1X TBS/T)清洗三次，每次 5 分鐘，將 washing buffer 去除，加入 blocking buffer 室溫反應一小時，再以 washing buffer 清洗三次。一級抗體以 blocking buffer 進行稀釋，於 4°C 下作用 overnight，再以 washing buffer 清洗三次，二級抗體同樣以 blocking buffer 稀釋，室溫作用 1 小時，以 washing buffer 清洗三次。最後以 ECL 呈色套組進行呈色反應，使用 LAS-4000 影像照相系統(FUJIFILM)進行拍照。

## 第四章 結果



### 一、 HQ17(3)誘粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 增加與 AIF translocation 與細胞死亡有關

我們過去研究已確定 HQ17(3)對 SUP-B15 具有細胞毒性且會導致 ER stress 的發生，以及看到 AIF 分子進入到細胞核的情形(nuclear translocation)<sup>35</sup>。AIF 為鑲嵌在粒線體的內膜蛋白，當  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease calpain-I 與  $\text{Ca}^{2+}$  結合而活化會對 AIF 進行切割，游離的 AIF 會轉移至細胞核並造成 DNA 濃縮以及誘導 endonuclease 的活化造成 DNA 斷裂等現象，被認為是導致 caspase-independent cell death 的主要因子之一<sup>51</sup>。

初步假設，當 ER stress 發生時會導致內質網內的  $\text{Ca}^{2+}$  過量流至粒線體，活化 calpain I 對鑲嵌於粒線體內膜的 AIF 進行切割，導致 AIF 游離至細胞核造成 caspase-independent cell death 的發生。

#### 1. HQ17(3)造成 mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ 增加

以 Fluo-4 及 Rhod-2 兩種鈣離子指示劑偵測細胞內  $\text{Ca}^{2+}$  分布情形，Fluo-4 會與 cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  結合產生綠色螢光，Rhod-2 則是帶有陽離子特性，會傾向進入帶負電的粒線體，與  $\text{Ca}^{2+}$  結合會產生紅色螢光。我們將細胞處理 3.5  $\mu\text{M}$  HQ17(3) ( $\text{IC}_{50}$  濃度)五小時，相當於過去發現 ER stress 發生的時間，直接以活細胞染色後利用螢光顯微鏡觀察。結果如圖一所示，A 圖為螢光表現情形，對照組 vehicle 可看到少量 Rhod-2 紅螢光聚集訊號，說明 SUP-B15 細胞的粒線體本身即帶有少量  $\text{Ca}^{2+}$  以維持正常作用，而在經過 HQ17(3)處理五小時後，Rhod-2 螢光聚集訊號明顯增加且分佈範圍變廣，在 3 個視野下計數統計，將帶有超過 3 顆 Rhod-2 紅螢光 puncta 的細胞定義為  $[\text{Ca}^{2+}_m]$  overload 的細胞，B 圖為三重複實驗計數統計結果，可看到  $[\text{Ca}^{2+}_m]$  overload 的細胞比例從  $6.38\% \pm 0.12\%$  顯著上升為  $28.79\% \pm 2.91\%$ ，說明 HQ17(3)造

成粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  的過度累積，若將 HQ17(3) 與  $5\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  螯合劑 Bapta-AM 共處理 (Bapta-AM 濃度選擇參考附錄十三)，則可使  $[\text{Ca}^{2+}_m]$  overload 的細胞比例從  $28.79\% \pm 2.91\%$  降至  $9.96\% \pm 1.60\%$ 。




## 2. HQ17(3)造成 AIF nuclear translocation 並與 mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ 增加有關

欲了解粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  的增加與 AIF 切割的關聯性，我們將細胞分別以 HQ17(3) 與  $5\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  chelator Bapta-AM 或  $70\mu\text{M}$  calpain I 抑制劑 PD150606 共處理 24 小時 (PD150606 濃度選擇參考附錄十四)，將細胞打片固定後進行 AIF 免疫螢光染色。結果如圖二所示，A 圖為螢光表現情形，綠色螢光代表 AIF 訊號，藍色螢光為代表細胞核的 DAPI，對照組 vehicle 即可看到部分細胞原本就有小量的綠色螢光進入到細胞核中，在 HQ17(3) 處理 24 小時後，多數細胞的綠色點狀螢光有明顯入到細胞核的情形。計數上，將 DAPI 上帶有 15 顆綠色點狀螢光的細胞定義為有 AIF nuclear translocation 的細胞，分別在 3 個視野下進行比例的計算，B 圖為三重複實驗統計結果，經 HQ17(3) 處理過後，細胞核帶有過多 AIF 的細胞比例從  $7.18\% \pm 0.65\%$  上升至  $22.33\% \pm 0.88\%$ ；HQ17(3) 與 PD150606 共處理可使比例降至  $5.00\% \pm 0.58\%$ ，相當於 vehicle 的比例；而與 Bapta-AM 共處理則使比例減低至  $12.67\% \pm 0.88\%$ ，說明 HQ17(3) 對 SUP-B15 造成的 AIF nuclear translocation 為粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  增加所導致，並透過 Calpain I 抑制劑 PD150606 共處理可完全抑制。

## 3. AIF 的切割不是導致細胞死亡的主因

為瞭解 AIF 的切割並進入到細胞核所引起的 DNA 斷裂是否為 HQ17(3) 造成細胞死亡的主要原因，我們將 HQ17(3) 與 Bapta-AM 及 PD150606 分別共處理 24 小時，利用 Annexin V/PI 染色搭配流式細胞儀分析細胞死亡比例。圖三 A 為流式細



胞儀結果分析圖，圖三 B 為三重複實驗統計圖，可看到 PD150606 與 HQ17(3) 共處理下，細胞存活比例可從單獨處理 HQ17(3) 的  $48.76\% \pm 1.29\%$  上升至  $58.52\% \pm 2.47\%$ ，減緩約 10% 左右的細胞死亡，雖抑制情形不明顯，但統計上仍具顯著差異 ( $p < 0.05$ )，說明 HQ17(3) 所造成的 AIF 的切割與轉位部分參與細胞死亡的發生，但在 AIF 切割被完全被抑制的情況下卻只能緩解小部分細胞死亡，暗示 AIF 的切割與核轉位並非是 HQ17(3) 造成 SUP-B15 細胞死亡的主要原因。

#### 4. 粒線體 $Ca^{2+}$ 增加調控其他死亡路徑的發生

為確認粒線體  $Ca^{2+}$  的增加除了調控 AIF 的切割外，是否有參與其他死亡路徑的調控導致細胞死亡，我們將  $Ca^{2+}$  螯合劑 Bapta-AM 與 HQ17(3) 共處理 24 小時後，同樣以 Annexin V/PI 染色進行細胞死亡的分析。三重複實驗統計結果如圖四 B 所示，細胞存活比例從 HQ17(3) 單獨處理的  $38.24\% \pm 3.47\%$  上升至  $60.87\% \pm 2.02\%$ ，約減緩 20% 的細胞死亡，與 PD150606 抑制 AIF 的切割與核轉位相比，Bapta-AM 抑制粒線體內  $Ca^{2+}$  的增加更能緩解 HQ17(3) 誘發的細胞死亡，說明 HQ17(3) 造成的粒線體  $Ca^{2+}$  上升除了增加 AIF 的切割與核轉位外，也參與其他致死機制的活化。

#### 二、 HQ17(3) 誘導的粒線體 $Ca^{2+}$ 增加導致粒線體損傷與自嗜

由於前面實驗顯示，Bapta-AM 相較於 PD150606 更能抑制 HQ17(3) 造成的細胞死亡，說明 HQ17(3) 所誘導的粒線體  $Ca^{2+}$  失衡可能誘導其他死亡路徑的發生。因粒線體為調控細胞恆定的重要胞器，HQ17(3) 導致  $Ca^{2+}$  增加造成的離子不平衡現象可能對粒線體產生壓力與損傷，最終導致粒線體失去功能。因此我們推測，HQ17(3) 所誘導的粒線體  $Ca^{2+}$  增加，除了調控 AIF 的切割與轉位，並且會直接對粒線體造成損傷累積，導致細胞死亡發生。



## 1. HQ17(3)導致粒線體損傷情形發生

過去研究顯示，當內質網壓力發生時，會導致過多  $\text{Ca}^{2+}$  從內質網流至粒線體，粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上升會加速電子傳遞鏈的作用，導致呼吸作用增加伴隨 ROS 的堆積，當 ROS 釋放至細胞質時又會去更加促使內質網壓力的發生，同時也會增加內質網與粒線體間的  $\text{Ca}^{2+}$  通道 IP3R channel 的活性，導致更多  $\text{Ca}^{2+}$  流至粒線體，使粒線體內壓力累積，導致粒線體損傷出現(附錄十一)<sup>68</sup>，因此我們接著分析 HQ17(3) 對 SUP-B15 細胞所造成的粒線體損傷情形。


### (1) 粒線體 ROS 上升

我們利用 mitoSOX 偵測粒線體 ROS 的堆積情形，mitoSOX 會與粒線體特異性結合，被超氧化物(superoxide)氧化後會產生紅色螢光，可用以觀察粒線體內的氧化壓力。我們將細胞處理 HQ17(3) 八小時，相當於過去發現開始細胞死亡發生的時間點，以 mitoSOX 染色並利用螢光顯微鏡拍照觀察，如圖五所示，從 A 圖即可看出 SUP-B15 細胞原本的粒線體即帶有氧化壓力水平，在經過 HQ17(3)八小時處理之下，mitoSOX 紅色螢光有增加的現象，在至少 5 個視野下，每個視野隨機選取 10 顆細胞，以 ImageJ 軟體分析細胞螢光強度進行平均，將 vehicle 所得的數值定為 1，比較 HQ17(3)處理過後螢光倍數增加情形。B 圖為三重複實驗統計結果，HQ17(3)處理 8 小時可看到螢光強度與 vehicle 相比增加了  $2.4 \pm 0.4$  倍，說明 HQ17(3) 在八小時處理之下即可誘導明顯粒線體 ROS 的累積。

### (2) 粒線體膜電位喪失

以 JC-1 染劑偵測粒線體膜電位改變情形，JC-1 為帶有正電荷的染劑，當粒線體功能正常且維持正常電荷時，JC-1 會進入到帶有負電荷的粒線體中，並在該






環境下聚集形成 J-aggregate 發出紅色螢光，若當粒線體損傷而失去膜電位時，J-aggregate 會游離至粒線體外，恢復原本呈綠色螢光的 monomer 型態。將細胞處理 8 小時後，進行 JC-1 染色後直接以螢光顯微鏡拍照觀察，或利用流式細胞儀分析紅綠螢光強度數值，實驗上以可破壞粒線體電位差造成膜電位喪失的 CCCP 作為陽性對照組。結果如圖六所示，從 A 圖即可看到在 HQ17(3) 8 小時處理之下會有 J-aggregate 聚集降低以及綠色螢光表現增加的情形，B 圖則是以流式細胞儀進行分析的結果，CCCP 處理與 HQ17(3) 8 小時處理均會造成 J-aggregate 紅色螢光曲線往左移，但相較於 CCCP 陽性對照組，HQ17(3)處理後 monomer 的綠色螢光表現變化較不明顯；C 圖為以流式細胞儀所測得 J-aggregate 平均螢光強度(mean fluorescence intensity, MFI)除以 monomer 的綠色螢光 MFI，所得到的比值愈小代表粒線體膜電位喪失的情形愈嚴重，我們將對照組所得到的比值定為 1，分析 HQ17(3) 8 小時處理下比值相對下降情形，可看到 HQ17(3)的紅綠螢光比值與 vehicle 相比降低至  $0.62 \pm 0.06$ ，說明在 HQ17(3)處理 8 小時之下即可造成 SUP-B15 細胞粒線體膜電位喪失。

### (3) 粒線體融合蛋白減少

過去文獻指出，當粒線體損傷時會導致粒線體恆定受到干擾，除了會使融合蛋白 Mfn1 與 Mfn2 被泛素化而降解，而粒線體膜電位的喪失也會使 Opa1 的 L-form 被切割成 S-form，這些現象都會促使粒線體不進行融合(fusion)，傾向以分裂(fission)將受損部分清除<sup>71,74</sup>。我們利用西方墨點法分析粒線體融合蛋白 Mfn1/2 以及 Opa1，觀察在 HQ17(3)不同時間點處理之後，這些蛋白的改變情形是否會受到影響。結果如圖七所示，CCCP 為陽性對照組，可使 Opa1 被完全切割成 S-form，以及使 Mfn1/2 蛋白降解，而在 HQ17(3)處理 12 小時之下，Opa1 的 L 與 S form 比值與 vehicle 相



比有開始下降的趨勢，說明有 L form 被切割成 S form 的情形，並且隨處理時間增長，比值下降愈多；Mfn1 同樣在藥物 12 小時處理下可看到表現量降低的情形，隨處理時間增長下降量愈多；Mfn2 雖然在 HQ17(3) 12-16 小時處理下無法看出有明顯下降的趨勢，但在 18-24 小時處理下即可看到明顯的表現量降低情形。

以上幾點實驗說明 HQ17(3)會造成 SUP-B15 細胞粒線體損傷，導致粒線體融合蛋白的降解，使粒線體不走向融合而傾向分裂的路徑，另一方面，在西方墨點法觀察 Opa1 的表現量中可看到除了有 L-form 被切割成 S-form 的現象之外，Opa1 的總蛋白表現量也有下降的趨勢，暗示 HQ17(3)導致粒線體損傷而走向分裂路徑，並可能有粒線體總量減少的情形。

## 2. HQ17(3)導致粒線體片段化與總量減少

為確認粒線體是否有進行分裂以及總量減少的現象，我們利用 MitoView 進行染色偵測粒線體型態與總量變化，MitoView 為一種類似 Mitotracker green 的染劑，會特異性與粒線體結合，且不依賴膜電位的存在，不論健康或受損的粒線體皆能染上，可用以觀察粒線體損傷後的形態變化或是細胞內粒線體總量的測定。我們將細胞以 HQ17(3)處理 16 或 24 小時後進行染色再打片固定觀察粒線體型態，或染色後直接以流式細胞儀分析綠螢光表現定義粒線體相對數量變化。結果如圖八所示，A 圖為染色後經打片固定以正立共軛焦螢光顯微鏡觀察粒線體的形態改變，可以看到 HQ17(3)處理 16 小時後與 vehicle 相比，MitoView 綠螢光分佈有明顯片段化的現象，HQ17(3) 24 小時處理之下的 MitoView 表現呈不規則分佈或聚集情形，且螢光表現明顯變弱，說明 HQ17(3)會造成細胞的粒線體走向裂解並有總量減少的趨勢；B 圖為利用流式細胞儀分析細胞內綠螢光的平均螢光強度，將 vehicle 定為



1，可看到 HQ17(3) 24 小時處理之下能使相對平均螢光強度降低至  $0.50 \pm 0.02$ ，說明粒線體總量的減少，並猜測有粒線體自嗜(mitophagy)的發生。

### 3. HQ17(3)造成粒線體自嗜(mitophagy)發生

Mitophagy 為細胞自我保護的一個機制，類似於 autophagy 但只針對粒線體進行吞噬的過程，當粒線體損傷導致裂解時，尚具有功能性的粒線體片段可再透過融合恢復其功能，但無法修復的粒線體則會進入到自嗜的階段，避免受損的粒線體影響整體能量代謝功能，然而當過度的 mitophagy 發生時，會使細胞無法維持正常生理功能，進而導致細胞死亡發生。

因 mitophagy 發生過程為帶有 LC3-II 聚集鑲嵌的 autophagosome 包覆粒線體，因此我們利用免疫螢光染色的方式觀察 LC3-II 與粒線體電子傳遞鍊上的 complex IV (COX IV)的重疊情形，判斷 HQ17(3)是否會造成 mitophagy 的發生。將細胞處理 HQ17(3) 24 小時，並在對照組與處理組中均添加  $100\mu\text{M}$  的 Chloroquine (CQ)抑制 lysosome 活性，將 mitophagy 進程維持在 autophagosome 包覆粒線體的狀態。結果如圖九所示，A 圖為以正立共軛焦螢光顯微鏡觀察螢光表現，紅螢光為 COX IV，代表粒線體，綠螢光 puncta 為 LC3-II 的聚集，可看到 HQ17(3)處理 24 小時後 LC3-II 與 COX IV 訊號出現明顯重疊的現象，每組拍至少 5 個視野，計算帶有 LC3-II 與 COX IV 螢光重疊的細胞佔所有細胞的百分比，統計結果如 B 圖，HQ17(3)導致帶有 mitophagy 的細胞比例從  $11.77 \pm 1.05\%$  上升為  $49.93 \pm 1.21\%$ ，說明 HQ17(3)的確能在 SUP-B15 細胞誘導 mitophagy 發生。

### 4. 粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 的累積參與 HQ17(3)所造成的粒線體損傷

為確認前述所看見的粒線體損傷與自嗜的情形為 HQ17(3)誘導的粒線體  $\text{Ca}^{2+}$



增加所導致，因此我們將 HQ17(3)與已知可抑制細胞死亡的  $\text{Ca}^{2+}$  螯合劑 Bapta-AM 共處理，觀察粒線體損傷現象是否能受到抑制。

#### (1) 粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 參與粒線體 ROS 的堆積

因過去文獻提到粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  的增加會導致 ROS 堆積，因此我們先分析 HQ17(3) 造成的粒線體 ROS 是否可透過螯合  $\text{Ca}^{2+}$  而得以抑制。圖十為利用 mitoSOX 分析粒線體 ROS，從 A 圖螢光圖即可看到 Bapta-AM 與 HQ17(3) 共處理可明顯減少螢光亮度，在至少 5 個視野下，每個視野隨機選取 10 顆細胞，以 ImageJ 軟體分析細胞螢光強度後進行平均，將 vehicle 所得的數值定為 1，比較螢光倍數增減情形。統計結果如 B 圖所示，HQ17(3) 處理 8 小時能使 mitoSOX 螢光強度與 vehicle 相比上升為  $1.85 \pm 0.06$ ，而與 Bapta-AM 共處理下則可降至  $1.36 \pm 0.14$ ，且 HQ17(3) 與 HQ17(3) 加上 Bapta-AM 相比具顯著差異 ( $p < 0.5$ )，說明 HQ17(3) 誘導細胞粒線體 ROS 的堆積為  $\text{Ca}^{2+}$  增加所導致。

#### (2) 粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 與 ROS 參與 HQ17(3) 誘導的融合蛋白 Opa1 的切割

已確定粒線體 ROS 的增加為 HQ17(3) 誘導  $\text{Ca}^{2+}$  增加所導致，接著分析粒線體融合蛋白 Opa1 的切割是否可透過 ROS 的清除或  $\text{Ca}^{2+}$  的螯合而獲得緩解，將細胞單獨處理 ROS 清除劑 Glutathione (GSH),  $\text{Ca}^{2+}$  螯合劑 Bapta-AM 或 HQ17(3)，以及將 HQ17(3) 與 GSH 或 Bapta-AM 共處理 24 小時後進行西方墨點法分析 Opa1 L-form 與 S-form 的比值。結果如圖十一所示，GSH 與 Bapta-AM 的單獨處理對 Opa1 L/S form 的比值沒有明顯影響，HQ17(3) 處理使 L/S form 比值從 1.45 降低至 0.21，若將 HQ17(3) 與 GSH 或與 Bapta-AM 共處理則可使 L/S form 比值回升至 0.68 與 0.67，說明 HQ17(3) 所導致的粒線體損傷為粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  累積誘導 ROS 增加所導致。



### (3) 粒線體自嗜為 HQ17(3) 誘導的粒線體 $\text{Ca}^{2+}$ 增加所導致

前面實驗已知 HQ17(3) 處理 SUP-B15 細胞所導致的 ROS 增加與粒線體損傷為粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  所造成的，並可透過 Bapta-AM 的處理而得到緩解，接下來我們欲確認 HQ17(3) 所造成的粒線體自嗜是否與因  $\text{Ca}^{2+}$  堆積而造成的粒線體損傷有關，因此我們將 HQ17(3) 與  $\text{Ca}^{2+}$  螯合劑 Bapta-AM 共處理，觀察 HQ17(3) 導致的粒線體總量減少與 mitophagy 的情形是否可透過 Bapta-AM 共處理以抑制。

首先以 MitoView 染色確認粒線體總數是否有明顯差異，如圖十二所示，從 A 圖的流式細胞儀分析圖即可看到 HQ17(3) 造成的螢光下降可透過與 Bapta-AM 共處理而得到緩解，B 圖為平均統計結果，將 Veh 組所測得的 MFI 數值定為 1，觀察 MFI 相對變化情形，可看到原本 HQ17(3) 處理使 MitoView 相對 MFI 降至  $0.50 \pm 0.02$ ，與 Bapta-AM 共處理則可上升至  $0.72 \pm 0.01$ ，說明 HQ17(3) 誘導的粒線體總量減少為  $\text{Ca}^{2+}$  增加造成的粒線體損傷所導致。


接著進一步確認 mitophagy 現象是否確實有受到抑制，我們以免疫螢光染色分析 COX IV 與 LC3-II 螢光訊號的重疊情形。結果如圖十三所示，A 圖為以正立共軛焦螢光顯微鏡觀察螢光表現，紅螢光為 COX IV，代表粒線體，綠螢光 puncta 為 LC3-II 的聚集，每組拍至少 5 個視野，計算帶有 LC3-II 與 COX IV 螢光重疊的細胞佔所有細胞的百分比。三重複實驗統計結果如 B 圖所示，HQ17(3) 導致帶有 mitophagy 的細胞比例從  $11.8 \pm 1\%$  上升至  $49.93 \pm 1.21\%$ ，而 HQ17(3) 與 Bapta-AM 共處理則可使 mitophagy 的細胞比例緩解至  $35.40 \pm 2.31\%$ ，更加確認 HQ17(3) 對 SUP-B15 細胞誘導的 mitophagy 為粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  增加而導致粒線體損傷，引發細胞的粒線體清除機制，從而導致細胞死亡的發生。

## 第五章 討論




根據我們先前的研究發現，低濃度 HQ17(3) 處理會造成 SUP-B15 細胞 ER stress 與 autophagy 發生，並伴隨粒線體膜電位喪失，最終導致 caspase-independent cell death<sup>34,35</sup>，然而過去對於這些現象的關聯性與相互調控機制仍不清楚。在本研究中我們看到 HQ17(3) 會誘導 SUP-B15 細胞 ER stress 發生，導致粒線體  $Ca^{2+}$  增加，一方面會去活化 calpain-1 對 AIF 分子進行切割，使其游離到細胞核造成 DNA 斷裂並導致 caspase-independent apoptosis 的發生，並小部分參與 HQ17(3) 所誘導的細胞死亡路徑；另一方面，HQ17(3) 促使 SUP-B15 細胞短時間內粒線體  $Ca^{2+}$  的增加也會造成 ROS 的累積，而對粒線體產生氧化壓力，導致粒線體膜電位喪失、融合蛋白降解、粒線體片段化，最終活化粒線體自噬清除機制大量清除受損粒線體，導致細胞失去能量代謝功能而走向死亡(圖十三)。在我們過去實驗中，我們看到在 HQ17(3) 在 T-ALL 細胞株 Jurkat 中誘導的細胞死亡為 caspase-dependent cell death<sup>35</sup>；而在另一株具有 *MLL* gene rearrangement (t(4;11)) 的 ALL 細胞株 RS4;11 中 HQ17(3) 亦造成 caspase-independent cell death<sup>33</sup>，並且 ROS 的累積也參與在細胞死亡中，根據以上結果可說明 HQ17(3) 對 ALL 細胞所造成的細胞毒性會根據細胞不同的基因背景/生物活性而導致不同的死亡途徑。

本篇研究結果顯示粒線體中  $Ca^{2+}$  的累積在 HQ17(3) 對 SUP-B15 細胞誘導的 caspase-independent cell death 或粒線體損傷均占有重要地位。過去即有看到 HQ17(3) 處理 SUP-B15 細胞 5 小時後會誘導 ER stress 的發生<sup>35</sup>，我們認為此現象可能是造成粒線體  $Ca^{2+}$  增加的原因。內質網為主要儲存  $Ca^{2+}$  的胞器，當內質網內有過多的未折疊或錯誤折疊的蛋白會導致 ER stress 的發生，過去文獻指出 ER stress 發生的下游分子 pro-apoptotic transcription factor CHOP 除了會促使凋亡路徑活化，也被認為會活化 endoplasmic reticulum oxidoreductase-1 (Eor1 $\alpha$ )，接著活化內質網



上的鈣離子通道 inositol triphosphate receptor (IP3R)，IP3R 與粒線體外膜上的 VDAC 通道之間會透過 Grp75 使兩者相連接，因此會 IP3R 的活化會促使過量的  $\text{Ca}^{2+}$  從內質網導入至粒線體中，造成 mitochondrial permeability transition (MPT) 導致細胞死亡<sup>67</sup>。我們認為 HQ17(3) 所誘導的粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  為 ER stress 發生所導致，而實驗結果也同樣顯示，在看到 ER stress 發生的 HQ17(3) 5 小時處理時間點以 Rhod-2 染劑偵測，同樣可看到粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  明顯增加的現象(圖一)，更加確定我們的假設。近年研究指出，內質網與粒線體的分裂具有相關性，內質網與粒線體間會透過 mitochondrion-associated membranes (MAMs) 相連並進行脂質與  $\text{Ca}^{2+}$  的交換<sup>79</sup>，而 ER tubules 被觀察到會與發生 fission 時期的粒線體相連在一起，Drp1 也座落於內質網與粒線體的連接處，推測內質網也可能直接調控粒線體分裂的發生<sup>80</sup>，因此我們推測 HQ17(3) 誘導的 ER stress 對於粒線體片段化及 mitophagy 發生佔有關鍵性的地位，除了是促使粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  增加，導致粒線體損傷，也可能會直接誘導粒線體分裂導致 mitophagy 的發生。然而目前我們仍無法完全確定在本研究中所看到的粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  增加的確為 ER stress 發生所導致，因此後續也可利用粒線體與內質網間  $\text{Ca}^{2+}$  運輸通道 IP3R 的抑制劑或是 ER stress 的抑制劑(如 :Paxilline, Araguspongin B) 與 HQ17(3) 共處理，觀察是否可抑制粒線體  $\text{Ca}^{2+}$  上升，進而抑制細胞死亡的發生，以更加確認我們對於此死亡途徑的假設為成立的。

Unfolded protein response (UPR) 為細胞內在面對 ER stress 所誘發的一套自我保護機制以恢復內質網的功能，但若 ER stress 持續發生且無法排除，UPR 則會導致細胞走向凋亡<sup>62</sup>。白血病細胞株在過去即被認為有較高的 UPR 背景，*BCR/ABL*<sup>+</sup> 被發現帶有高表現的 UPR sensor XBP1 以及 ER chaperone Grp78，在高風險群的 *Ph*<sup>+</sup> 及 *MLL*-rearranged 的 B-ALL 中也被發現 UPR sensor XBP1, IRE1- $\alpha$  以及 Grp78 的表現量有上調的現象，且在 primary B-ALL 也被發現具有 UPR 相關基因的高表




後，說明這類細胞本身即帶有較高程度的 ER stress，需要透過 UPR 相關基因的上調以維持細胞正常運作<sup>63</sup>。過去即有文獻指出可針對白血病細胞的 UPR 高表現進行毒殺，包含以藥物抑制 UPR sensor 或 Grp78 使保護機制關閉導致癌細胞死亡<sup>63</sup>，或是以藥物處理 ALL 細胞抑制 E3 ligase 阻斷 proteosomal degradation 使蛋白堆積導致過度 ER stress 發生，UPR 過度活化導致細胞死亡<sup>93</sup>。我們認為 HQ17(3)之所以可在短時間處理下及誘導 SUP-B15 細胞 ER stress 的發生，也是由於 SUP-B15 細胞本身即帶有較高的 ER stress，HQ17(3)導致更加嚴重的 ER stress，除了 ER stress 本身所活化的包含 CHOP 等致死因子活化，又因為 SUP-B15 細胞的粒線體壓力較高，所以連貫導致粒線體嚴重損傷造成細胞死亡，但 HQ17(3)是透過何種機制導致 SUP-B15 細胞 ER stress 的發生，仍是日後需再被探討的重點之一。

在過去認為 HQ17(3)對細胞所造成的氧化傷害是由於 HQ 在細胞內代謝為 BQ 的過程中會伴隨氧化壓力的產生<sup>27</sup>，並且過去也在不同的腫瘤細胞株中發現 HQ17(3)會誘導細胞氧化壓力增加，以及使用抗氧化劑(如 vitamin C 與 glutathione)可抑制細胞凋亡的現象<sup>31,33-35</sup>，因此我們認為 ROS 在 HQ17(3)所誘導的細胞死亡中可能參與重要的調控角色。在本篇實驗中我們發現了 HQ17(3)對 SUP-B15 所誘導的粒線體 ROS 增加是需要 Ca<sup>2+</sup>參與的，以 Bapta-AM 共處理可抑制 HQ17(3)對細胞造成的氧化壓力(圖十)，我們也發現到在以 GSH 直接清除 ROS 或以 Bapta-AM 抑制 ROS 堆積，都可抑制粒線體融合蛋白 Opa1 切割的情形(圖十一)，以 Bapta-AM 抑制 ROS 堆積可減少 SUP-B15 的粒線體損耗(圖十二)，因此我們認為 ROS 在細胞死亡過程中所扮演的角色為造成粒線體損傷導致粒線體功能喪失，而在 SUP-B15 細胞模型中，ROS 除了因細胞內 HQ 的代謝而產生之外，也可能源自於 HQ17(3)所誘導的 ER stress 造成 mitochondrial Ca<sup>2+</sup>增加導致 ROS 堆積。

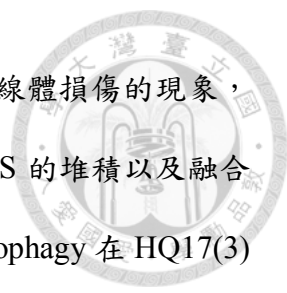
ROS 在正常其況下會在細胞內維持低濃度以幫助細胞存活，而在癌化的細胞






中常可發現 ROS 增加與細胞內生性 ROS scavenger 的降低，促進癌細胞的快速生長<sup>36</sup>，因此 ROS 也被認為可作為用以毒殺癌細胞的標的之一。過去文獻指出，*BCR/ABL*<sup>+</sup>的細胞被認為帶有較高的 ROS 水平，在帶有費城染色體的慢性淋巴性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)細胞中，發現 *BCR/ABL* 會仰賴較高濃度 ROS 的存在以抑制 protein-tyrosine phosphatases (PTPases)的作用，維持 *BCR/ABL* 的持續磷酸化<sup>94</sup>，而我們也在以 JC1 染劑偵測粒線體膜電位時看到 SUP-B15 細胞本身的 monomer 螢光表現量即較高(圖五)，粒線體融合蛋白 Opa1 的 L/S form 比例僅 0.09 (圖六)，說明細胞原本的粒線體膜電位即處於較不穩定的狀態；此外，在 mitophagy 實驗中 vehicle 組也有看到 SUP-B15 細胞本身就帶有一定水平的 mitophagy(圖七)，這些現象連同過去文獻的參照，均指向 *BCR/ABL*<sup>+</sup>的 SUP-B15 細胞可能本身承載較大的粒線體所壓力，因此我們猜測以 HQ17(3)處理造成 ROS 增加導致粒線體壓力上升時，更容易對 SUP-B15 細胞引發較高程度的粒線體傷害發生，這也可能是 HQ17(3)對 SUP-B15 細胞誘導的死亡路徑與其他腫瘤細胞不同的原因之一。但在該篇對於 *BCR/ABL* 與 ROS 的研究文獻也提到 *BCR/ABL*<sup>+</sup>的 CML 細胞若處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以增加 ROS 的濃度，會促進 ABL tyrosine kinase 的活性，造成 CML 細胞惡性度提高<sup>94</sup>，因此對於是否可針對這類惡性度高的白血病細胞內 ROS level 的調整以進行治療，可能還需要針對細胞本身的 ROS 濃度進行研究，了解其對癌細胞是帶有毒性抑或是促進惡化的角色。

Mitophagy 為 selective autophagy 的一種形式，在細胞養分充足的情況下也會因接收到粒線體受損的訊息而活化，目的為針對受損或老化的粒線體進行清除，以避免不正常運作的粒線體干擾能量代謝，因此 mitophagy 的發生一般被認為具有保護細胞的作用<sup>56</sup>，然而當 mitophagy 過度發生且無法和粒線體的生合成達到平衡時，會導致細胞內粒線體大量減少無法維持在正常範圍，造成能量供給不足而導



致細胞死亡的發生<sup>92</sup>。在本研究中我們發現到 HQ17(3) 會造成粒線體損傷的現象，並誘導 mitophagy 的發生，而利用 Bapta-AM 共處理可抑制 ROS 的堆積以及融合蛋白的切割以減緩 mitophagy 與細胞死亡的發生，但我們對 mitophagy 在 HQ17(3) 誘導 SUP-B15 細胞死亡中所扮演的角色為何仍然沒有一個肯定的答案，我們認為本實驗中所發現的 mitophagy 現象可能是由於 HQ17(3) 所誘導粒線體傷害而活化細胞保護機制的結果，抑或是 HQ17(3) 會直接參與 mitophagy 的相關路徑，使 mitophagy 的關鍵蛋白被過度活化而過度吞噬健康的粒線體造成細胞死亡。目前被認為調控哺乳動物細胞的 mitophagy 發生的主要分子為 Parkin 與 PINK1，PINK1 在健康的粒線體中會被 intramembrane protease presenilins-associated rhomboid-like protein (PARL) 切割水解而維持低濃度的表現，若粒線體受到損傷則會使 PINK1 的切割受到抑制，維持在粒線體膜上的 PINK1 會吸引游離在細胞質中的 Parkin，當 Parkin 透過 PINK1 結合上粒線體時，其 E3 ubiquitin ligase 的活性會對粒線體的外膜蛋白，如 Mitofusin1/2 及 VDAC1 等，催化並接上調控訊息傳遞的 Lys63-linked polyubiquitin chains，引起 ubiquitin-binding adaptor p62 (P62/A170/SQSTM1) 結合，而 p62 會再自體結合以更加吸引 ubiquitylated protein 的聚集，並會透過與 LC3-II 的結合吸引 autophagosome 靠近並對粒線體進行包覆吞噬，以完成粒線體的清除<sup>88</sup>。過去有研究指出，Ca<sup>2+</sup> 的存在會調控 PINK1 蛋白的表現，在神經母細胞瘤 SH-SY5Y 細胞中即被發現 CCCP 會增加 PINK1 的 mRNA 表現並維持其蛋白的穩定性以誘導的 mitophagy 的發生，而此現象可被 calcium chelator Bapta-AM 與 EDTA 抑制，因此認為 CCCP 所誘導的 mitophagy 的發生為 calcium-dependent manner<sup>95</sup>；在本篇實驗模型中，我們發現 HQ17(3) 會透過 ER stress 誘導粒線體 Ca<sup>2+</sup> 增加，除了導致粒線體損傷之外，也可能導致 PINK1 表現量與穩定性的增加，藉此活化 mitophagy 的發生。先前我們使用 chloroquine (CQ) 或 Bafilomycin A1 等抑制 autolysosome



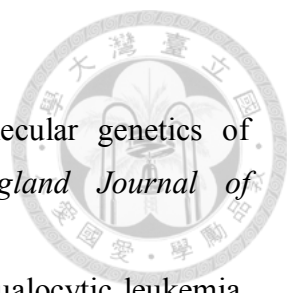
形成的抑制劑皆觀察到可以減輕 HQ17(3)對 SUP-B15 細胞的毒殺效果，指向細胞自嗜過程在 HQ17(3)對 SUP-B15 細胞的毒殺作用有一定的貢獻。若要確認 mitophagy 在 HQ17(3)對 SUP-B15 的細胞毒性中所扮演的角色，可藉由與粒線體分裂蛋白 Drp1 的抑制劑 Mdivi-1 的共處理，或是 knockdown PINK1 或 parkin 這些關鍵蛋白，以了解在 mitophagy 抑制的情況下 HQ17(3)對 SUP-B15 誘導的細胞毒性會減少抑或是增加。

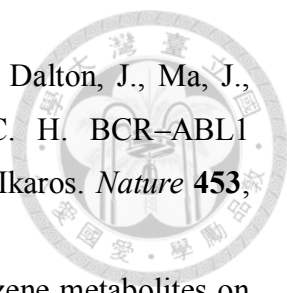
目前在急性淋巴性白血病(ALL)患者治療上，五年無事件存活率(five-year event-free survival rate)在兒童患者雖可達到 90%以上，然而成人患者僅 40%，且成人患者的白血病細胞的惡性程度也較高，Ph<sup>+</sup> ALL 即是一類好發於成人且惡性度高的 ALL subtype。目前 Ph<sup>+</sup> ALL 治療上以 TKI 合併高劑量化療為主要治療方式，但由於此類 ALL 細胞的基因變異度高，容易導致患者產生抗藥性並造成疾病的復發，因此仍須仰賴異體造血幹細胞移植的治療，但異體造血幹細胞移植存在組織抗原相符捐贈者難尋與移植後排斥問題等風險，且老年人患者也較無法承受高劑量化療或幹細胞移植，因此在治療上仍須研究這類 high-risk ALL 的弱點以開發新的治療策略<sup>19,25</sup>。本篇論文以研究 HQ17(3)對於 Ph<sup>+</sup> ALL 細胞 SUP-B15 的毒殺方式並配合過去相關報導中發現，Ph<sup>+</sup> ALL 細胞本身所帶有的 ROS 水平即較高，粒線體所承載的壓力較大，而利用藥物施加粒線體壓力更加容易造成細胞死亡的發生；另一方面，Ph<sup>+</sup> ALL 也被認為負擔較高的 ER stress 水平，過去即被認為可透過藥物促進 ER stress 更加活化 UPR 以造成 ALL 細胞死亡的發生。本篇研究除了探討 HQ17(3)針對 SUP-B15 細胞所引起的死亡機制，同時可以本篇論文研究作為基礎，更加深入探討 Ph<sup>+</sup> ALL 所帶有的細胞生理特徵，以提供未來對於此類 high-risk 患者治療策略開發的新方向。

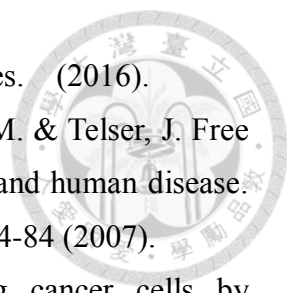
## 第六章 參考文獻

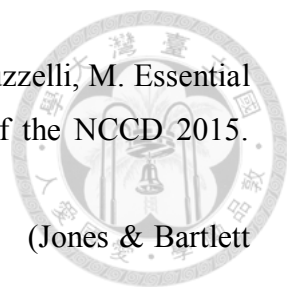


- 1 Pui, C. H. & Evans, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* **354**, 166-178 (2006).
- 2 Pui, C. H., Relling, M. V. & Downing, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* **350**, 1535-1548 (2004).
- 3 Pui, C. H., Robison, L. L. & Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* **371**, 1030-1043 (2008).
- 4 Nigro, L. L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* **35**, 245-252 (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 Faderl, S., O'brien, S., Pui, C. H., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D. & Kantarjian, H. M. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* **116**, 1165-1176 (2010).
- 8 Inaba, H., Greaves, M. & Mullighan, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* **381**, 1943-1955 (2013).
- 9 衛生福利部國民健康署. 中華民國 104 年癌症登記報告. (2017).
- 10 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. 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 (2010).
- 11 Pui, C. H. & Jeha, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 149-165 (2007).
- 12 Bentz, M., Cabot, G., Moos, M., Speicher, M. R., Ganser, A., Lichter, P. & Dohner, H. Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. *Blood* **83**, 1922-1928 (1994).
- 13 Carpiuc, K. T., Stephens, J. M., Botteman, M. F., Feng, W. & Hay, J. W. A review of the clinical and economic outcomes of imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opinion on*

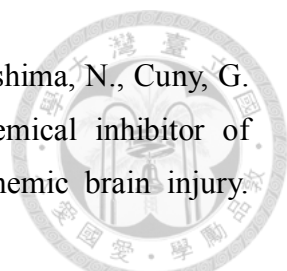
- 
- Pharmacotherapy* **8**, 2775-2787 (2007).
- 14 Kurzrock, R., Gutterman, J. U. & Talpaz, M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New England Journal of Medicine* **319**, 990-998 (1988).
  - 15 Nowell, P. C. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132**, 1497-1501 (1960).
  - 16 Rowley, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290-293 (1973).
  - 17 Sawyers, C. L. Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* **340**, 1330-1340 (1999).
  - 18 Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Dhingra, K., Estey, E., Keating, M. J., Ku, S., Trujillo, J., Huh, Y., Stass, S. & Kurzrock, R. Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood* **78**, 2411-2418 (1991).
  - 19 Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J. & Talpaz, M. Philadelphia chromosome positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Annals of Internal Medicine* **138**, 819-830 (2003).
  - 20 Li, S., Ilaria, R. L., Million, R. P., Daley, G. Q. & Van Etten, R. A. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *Journal of Experimental Medicine* **189**, 1399-1412 (1999).
  - 21 Mizuta, S., Matsuo, K., Yagasaki, F., Yujiri, T., Hatta, Y., Kimura, Y., Ueda, Y., Kanamori, H., Usui, N. & Akiyama, H. Pre-transplant imatinib-based therapy improves the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **25**, 41-47 (2011).
  - 22 Fielding, A. K. Current treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **95**, 8-12 (2010).
  - 23 Ko, B. S., Tang, J. L., Tsai, W., Chen, Y. C., Wang, C. H., Sheng, M. C., Lin, D. T., Lin, K. H. & Tien, H. F. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Annals of Hematology* **80**, 510-515 (2001).
  - 24 Fielding, A. K. How I treat Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **116**, 3409-3417 (2010).

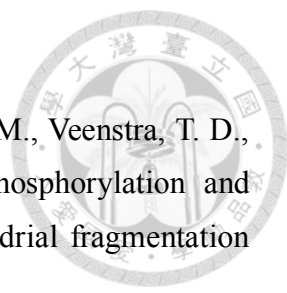
- 
- 25 Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T. P., Le Beau, M. M. & Pui, C. H. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **453**, 110-114 (2008).
- 26 Lindsey, R. H., Bender, R. P. & Osheroff, 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 (2005).
- 27 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 (2012).
- 28 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 and Medicine* **53**, 1616-1624 (2012).
- 29 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 (2005).
- 30 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).
- 31 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 (2008).
- 32 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 $\alpha$ , enhances DNA breakage, and induces apoptosis in cancer cells. *Chemical Research in Toxicology* **25**, 2340-2351 (2012).
- 33 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).
- 34 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).
- 35 陳佳瑋. Master Thesis : Inhibitory effects of the botanical alkyl hydroquinone

- 
- derivative HQ17(3) on acute lymphoblastic leukemia cell lines. (2016).
- 36 Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**, 44-84 (2007).
- 37 Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 579-591 (2009).
- 38 Fleury, C., Mignotte, B. & Vayssière, J. L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**, 131-141 (2002).
- 39 Sidoti-de Fraise, C., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B. & Vayssière, J. L. TNF- $\alpha$  activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* **17**, 1639-1651 (1998).
- 40 Berghe, T. V., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C., Brunk, U., Declercq, W. & Vandenabeele, P. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death and Differentiation* **17**, 922-930 (2010).
- 41 Boya, P. & Kroemer, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**, 6434-6451 (2008).
- 42 Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z. H., Freundt, E., Baehrecke, E. H. & Lenardo, M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 4952-4957 (2006).
- 43 Kreuzaler, P. & Watson, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? *Nature Reviews Cancer* **12**, 411-424 (2012).
- 44 Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., Dawson, T., Dawson, V., El-Deiry, W. & Fulda, S. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* **19**, 107-120 (2012).
- 45 Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**, 495-516 (2007).
- 46 Chaitanya, G. V., Alexander, J. S. & Babu, P. P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling* **8**, 31 (2010).
- 47 Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D.,

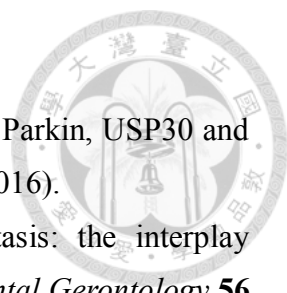
- 
- Alnemri, E., Altucci, L., Andrews, D. & Annicchiarico-Petruzzelli, M. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation* **22**, 58-73 (2015).
- 48 Cassimeris, L., Plopper, G. & Lingappa, V. R. *Lewin's cells*. (Jones & Bartlett Publishers, 2011).
- 49 Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S. & Fernandes-Alnemri, T. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 432-438 (2002).
- 50 Bröker, L. E., Kruyt, F. A. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research* **11**, 3155-3162 (2005).
- 51 Kroemer, G. & Martin, S. J. Caspase-independent cell death. *Nature Medicine* **11**, 725-730 (2005).
- 52 Cregan, S. P., Dawson, V. L. & Slack, R. S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **23**, 2785-2796 (2004).
- 53 Yuste, V., Moubarak, R., Delettre, C., Bras, M., Sancho, P., Robert, N., d'Alayer, J. & Susin, S. Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1445-1448 (2005).
- 54 Badugu, R., Garcia, M., Bondada, V., Joshi, A. & Geddes, J. W. N terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 3409-3417 (2008).
- 55 Norberg, E., Gogvadze, V., Vakifahmetoglu, H., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 791-797 (2010).
- 56 Ding, W. X. & Yin, X. M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry* **393**, 547-564 (2012).
- 57 Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42 (2008).
- 58 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 (2007).



- 
- 59 Degtarev, 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 (2005).
- 60 Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. V. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 700-714 (2010).
- 61 Flamment, M., Hajduch, E., Ferré, P. & Foufelle, F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **23**, 381-390 (2012).
- 62 Høyer-Hansen, M. & Jäättelä, M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death and Differentiation* **14**, 1576-1582 (2007).
- 63 Masouleh, B. K., 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 (2015).
- 64 Sano, R. & Reed, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1833**, 3460-3470 (2013).
- 65 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 (2009).
- 66 Li, G., Mongillo, M., Chin, K. T., Harding, H., Ron, D., Marks, A. R. & Tabas, I. Role of ERO1- $\alpha$ -mediated stimulation of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology* **186**, 783-792 (2009).
- 67 Vannuvel, K., Renard, P., Raes, M. & Arnould, T. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *Journal of Cellular Physiology* **228**, 1802-1818 (2013).
- 68 Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S. & Krizanova, O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biology* **6**, 260-271 (2015).
- 69 van der Bliek, A. M., Shen, Q. & Kawajiri, S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, a011072 (2013).
- 70 Youle, R. J. & Van Der Bliek, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress.

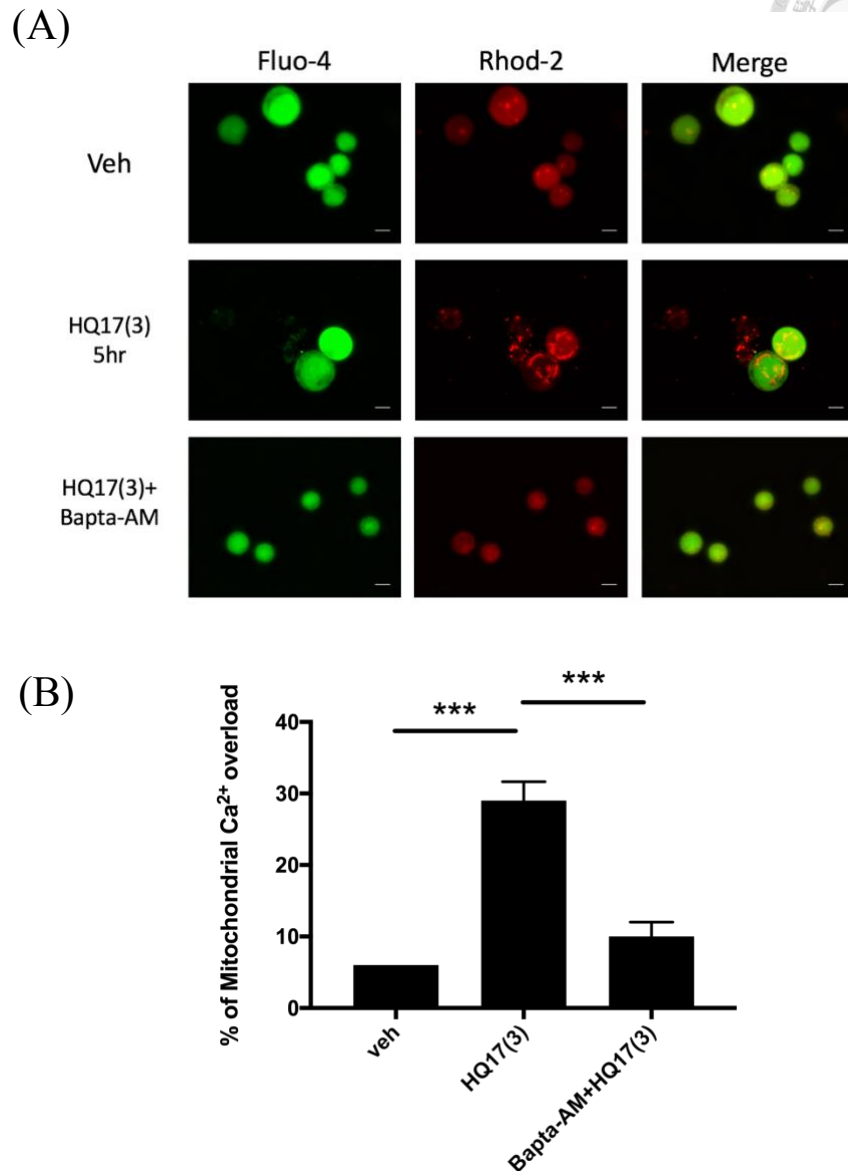
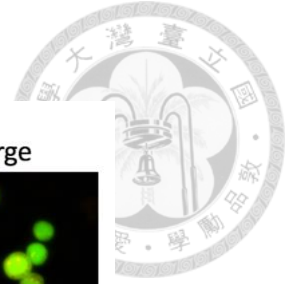
- 
- Science* **337**, 1062-1065 (2012).
- 71 Leboucher, G. P., Tsai, Y. C., Yang, M., Shaw, K. C., Zhou, M., Veenstra, T. D., Glickman, M. H. & Weissman, A. M. Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Molecular Cell* **47**, 547-557 (2012).
- 72 Li, J., Qi, W., Chen, G., Feng, D., Liu, J., Ma, B., Zhou, C., Mu, C., Zhang, W., Chen, Q., Zhu, Y. Mitochondrial outer-membrane E3 ligase MUL1 ubiquitinates ULK1 and regulates selenite-induced mitophagy. *Autophagy* **11**, 1216-1229 (2015).
- 73 Griparic, L., Kanazawa, T. & van der Bliek, A. M. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *Journal of Cell Biology* **178**, 757-764 (2007).
- 74 Ehses, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J. C., Westermann, B., Rugarli, E. I. & Langer, T. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *Journal of Cell Biology* **187**, 1023-1036 (2009).
- 75 Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. & Mihara, K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 11521-11529 (2007).
- 76 Cribbs, J. T. & Strack, S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports* **8**, 939-944 (2007).
- 77 Chang, C. R. & Blackstone, C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1201**, 34-39 (2010).
- 78 Chou, C. H., Lin, C. C., Yang, M. C., Wei, C. C., Liao, H. D., Lin, R. C., Tu, W. Y., Kao, T. C., Hsu, C. M. & Cheng, J. T. GSK3beta-mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS One* **7**, e49112 (2012).
- 79 Rowland, A. A. & Voeltz, G. K. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 607-625 (2012).
- 80 Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J. & Voeltz, G. K. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**,

- 358-362 (2011).
- 81 Choi, S. Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J. & Frohman, M. A. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nature Cell Biology* **8**, 1255-1262 (2006).
- 82 Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.-Y., Sarma, K., Ren, H., Morris, A. J. & Frohman, M. A. piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Developmental Cell* **20**, 376-387 (2011).
- 83 Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. & Youle, R. J. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell* **1**, 515-525 (2001).
- 84 Cereghetti, G., Stangherlin, A., De Brito, O. M., Chang, C., Blackstone, C., Bernardi, P. & Scorrano, L. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15803-15808 (2008).
- 85 Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T. & Korsmeyer, S. J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135-139 (2003).
- 86 Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology* **13**, 589-598 (2011).
- 87 Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I. & Merkwirth, C. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO Journal* **28**, 1589-1600 (2009).
- 88 Youle, R. J. & Narendra, D. P. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 9-14 (2011).
- 89 Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. & Klionsky, D. J. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Developmental Cell* **17**, 98-109 (2009).
- 90 Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Dorsey, F. C., Kundu, M., Cleveland, J. L. & Ney, P. A. Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and-independent mechanisms during reticulocyte maturation. *Blood* **114**,

- 
- 157-164 (2009).
- 91 Bingol, B. & Sheng, M. Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radical Biology and Medicine* **100**, 210-222 (2016).
- 92 Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Experimental Gerontology* **56**, 182-188 (2014).
- 93 Leclerc, G. M., Zheng, S., Leclerc, G. J., DeSalvo, J., Swords, R. T. & Barredo, J. C. The NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat activates the eIF2 $\alpha$  and mTOR pathways inducing UPR-mediated cell death in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* **50**, 1-10 (2016).
- 94 Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C. H., Pride, Y. B., Winkler, T., Greenfield, E. A., Salgia, R. & Griffin, J. D. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 24273-24278 (2000).
- 95 Gómez-Sánchez, R., Gegg, M. E., Bravo-San Pedro, J. M., Niso-Santano, M., Alvarez-Erviti, L., Pizarro-Estrella, E., Gutiérrez-Martín, Y., Alvarez-Barrientos, A., Fuentes, J. M. & González-Polo, R. A. Mitochondrial impairment increases FL-PINK1 levels by calcium-dependent gene expression. *Neurobiology of Disease* **62**, 426-440 (2014).

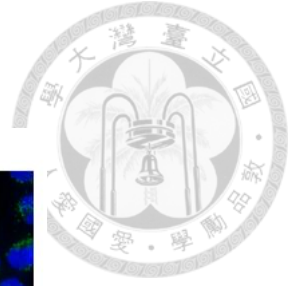


# 圖與表

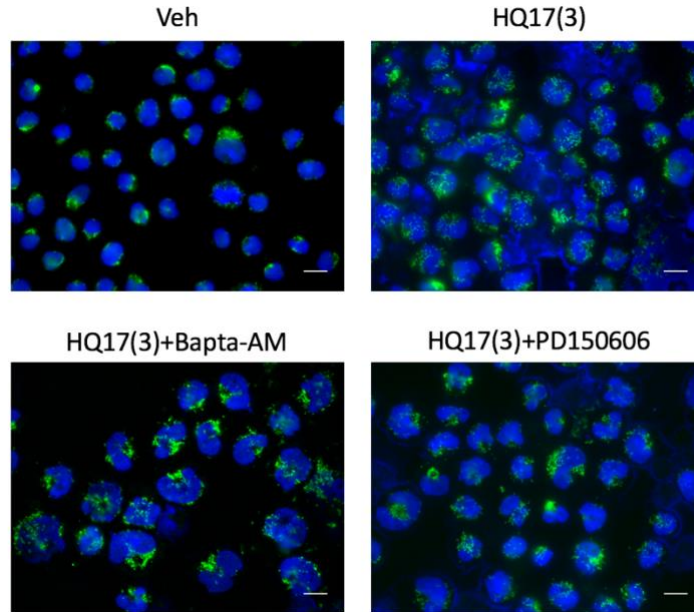


圖一、HQ17(3)處理 5 小時即造成 SUP-B15 細胞粒線體 Ca<sup>2+</sup> overload，且可透過 Ca<sup>2+</sup>螯合劑 Bapta-AM 抑制。

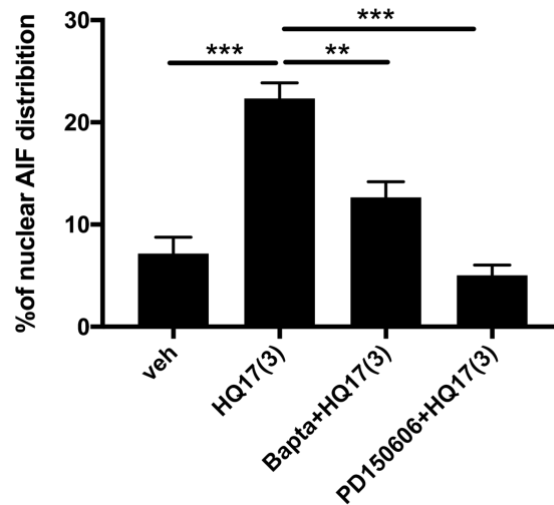
在 24 孔盤接種 5x10<sup>5</sup> 個細胞，分別以 DMSO (Veh), 3.5μM HQ17(3)或 HQ17(3)與 5μM Bapta-AM 處理 5 小時，達指定時間後以 2μM Fluo-4 與 1μM Rhod-2 於 37°C 下染色 30 分鐘，利用螢光顯微鏡進行觀察。(A)螢光顯微鏡圖。綠螢光為 Fluo-4，代表 cytosolic Ca<sup>2+</sup>；紅螢光為 Rhod-2，代表 mitochondrial Ca<sup>2+</sup>。(B)三次實驗平均量化圖。將細胞上帶有超過 3 顆 Rhod-2 紅螢光 puncta 定義為有 [Ca<sup>2+</sup><sub>m</sub>] overload 的細胞，每組至少拍三個視野(1000x)進行計數與計算平均比例，標準差畫於圖上，利用 t-test 統計分析，HQ17(3)與 veh，以及 HQ17(3)與 Bapta+HQ17(3)相比均達顯著差異，\*\*\* p<0.001。Scale bar = 10μm



(A)

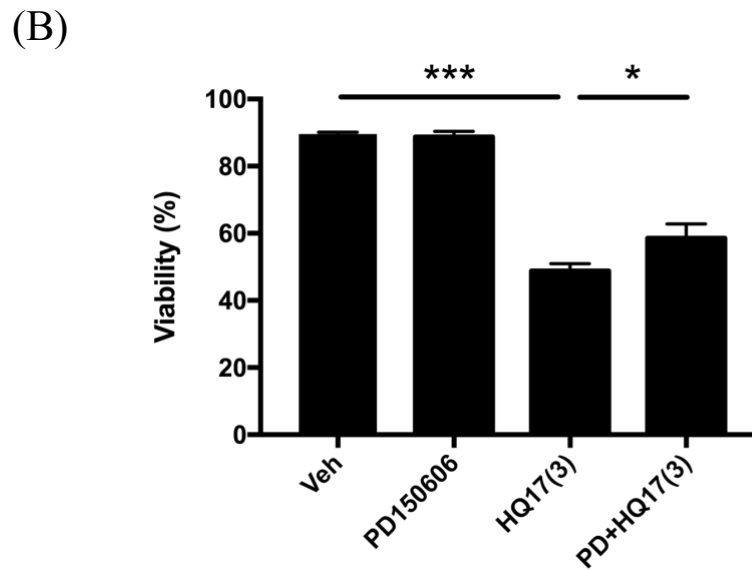
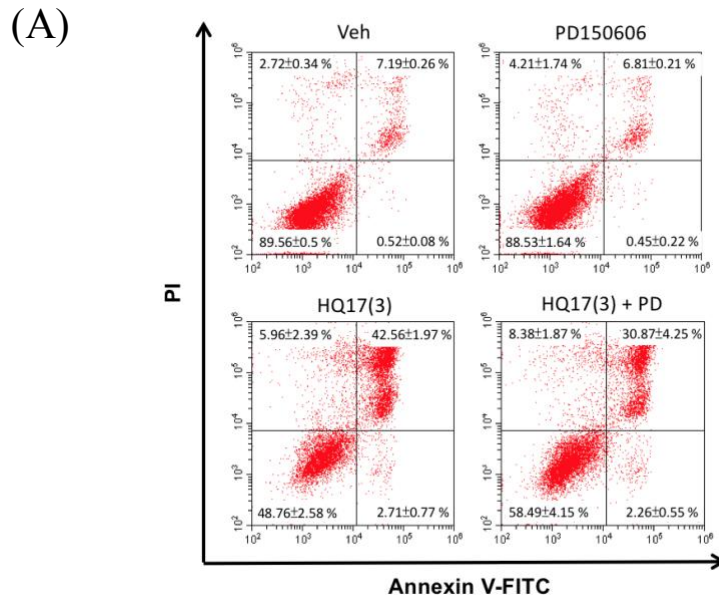


(B)



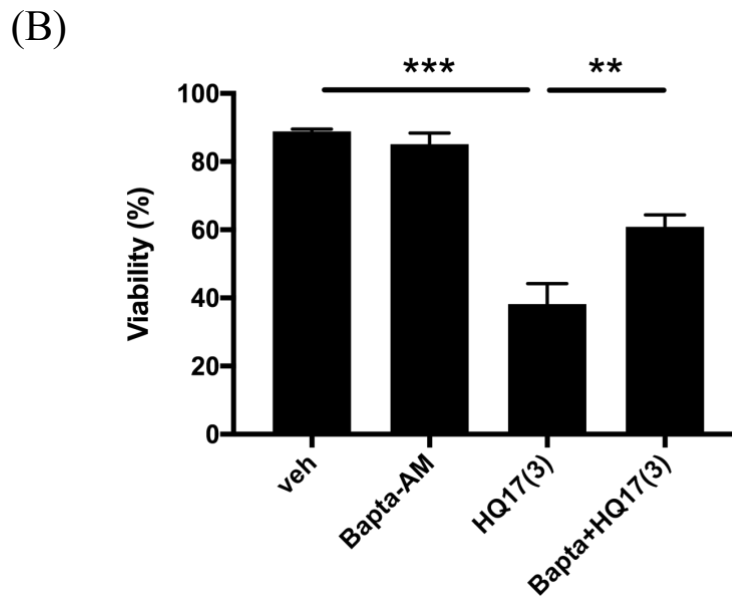
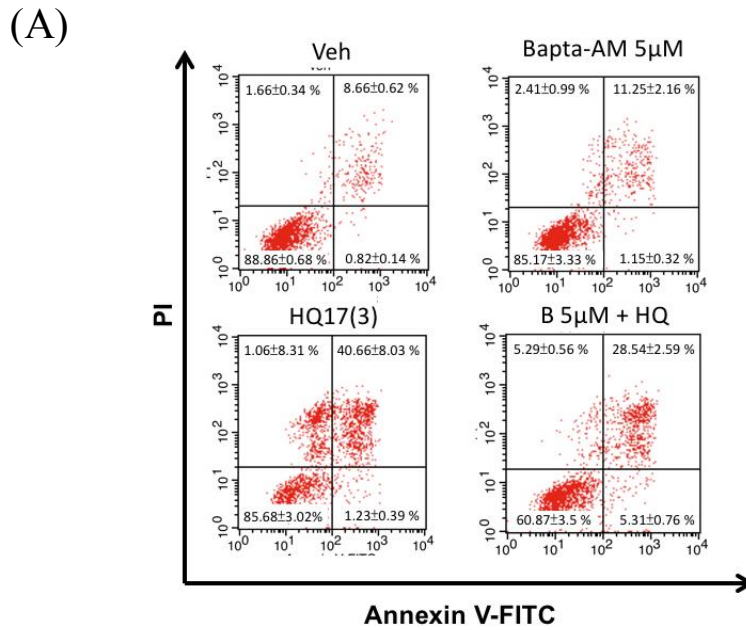
**圖二、HQ17(3)造成SUP-B15細胞Apoptosis-inducing factor (AIF)進入到細胞核**  
在24孔盤接種 $5 \times 10^5$ 個細胞，分別以DMSO (Veh), 3.5 $\mu$ M HQ17(3), HQ17(3)與5 $\mu$ M Bapta-AM, HQ17(3)與70 $\mu$ M PD150606處理24小時，達指定時間後進行免疫螢光染色。(A)螢光顯微鏡圖，綠色螢光為AIF，藍色螢光為DAPI。(B)三次實驗平均量化圖。將DAPI上帶有超過15顆綠螢光puncta定義為有nuclear AIF distribution的細胞進行計數，每組至少拍三個視野(1000x)計算比例平均，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，veh與HQ17(3)相比、Bapta-AM+HQ17(3)相比以及HQ17(3)與PD150606+HQ17(3)相比，均達顯著差異，\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

Scale bar = 10 $\mu$ m



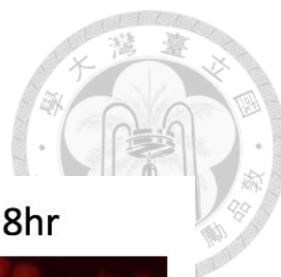
**圖三、Calpain inhibitor PD150606部分抑制HQ17(3)誘導的SUP-B15細胞死亡**  
在24孔盤接種 $2 \times 10^5$ 個細胞，分別以DMSO (Veh), 70 $\mu$ M PD150606, 3.5 $\mu$ M HQ17(3), HQ17(3)加PD150606處理24小時，達指定時間後進行Annexin V/PI染色分析細胞死亡情形。(A)流式細胞儀結果分析圖。各象限三次實驗平均後的結果與標準差標示於圖上。(B)三次實驗平均量化圖。Viability (%)定義為Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>的細胞比例，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，veh與HQ17(3)相比以及HQ17(3)與PD150606+HQ17(3)相比，均達顯著差異，\*\*\* $p < 0.001$ 、\* $p < 0.05$ 。



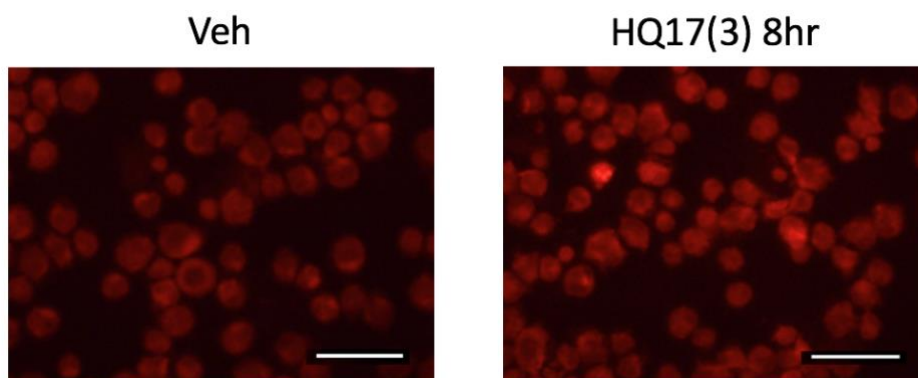


圖四、Bapta-AM明顯減緩HQ17(3)誘導的SUP-B15細胞死亡

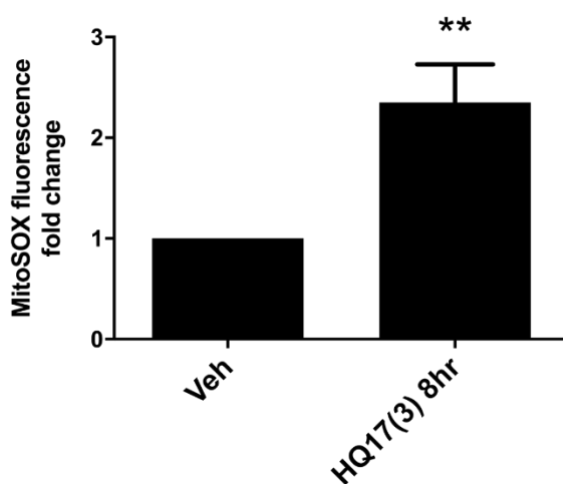
在24孔盤接種 $2 \times 10^5$ 個細胞，分別以DMSO (Veh), 5µM Bapta-AM, 3.5µM HQ17(3), HQ17(3)加Bapta-AM處理24小時，達指定時間後進行Annexin V/PI染色分析細胞死亡情形。(A)流式細胞儀結果分析圖。各象限三次實驗平均後的結果與標準差標示於圖上。(B)三次實驗平均量化圖。Viability (%)定義為Annexin V/PI的細胞比例，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，HQ17(3)與Bapta-AM+HQ17(3)相比達顯著差異，\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。



(A)

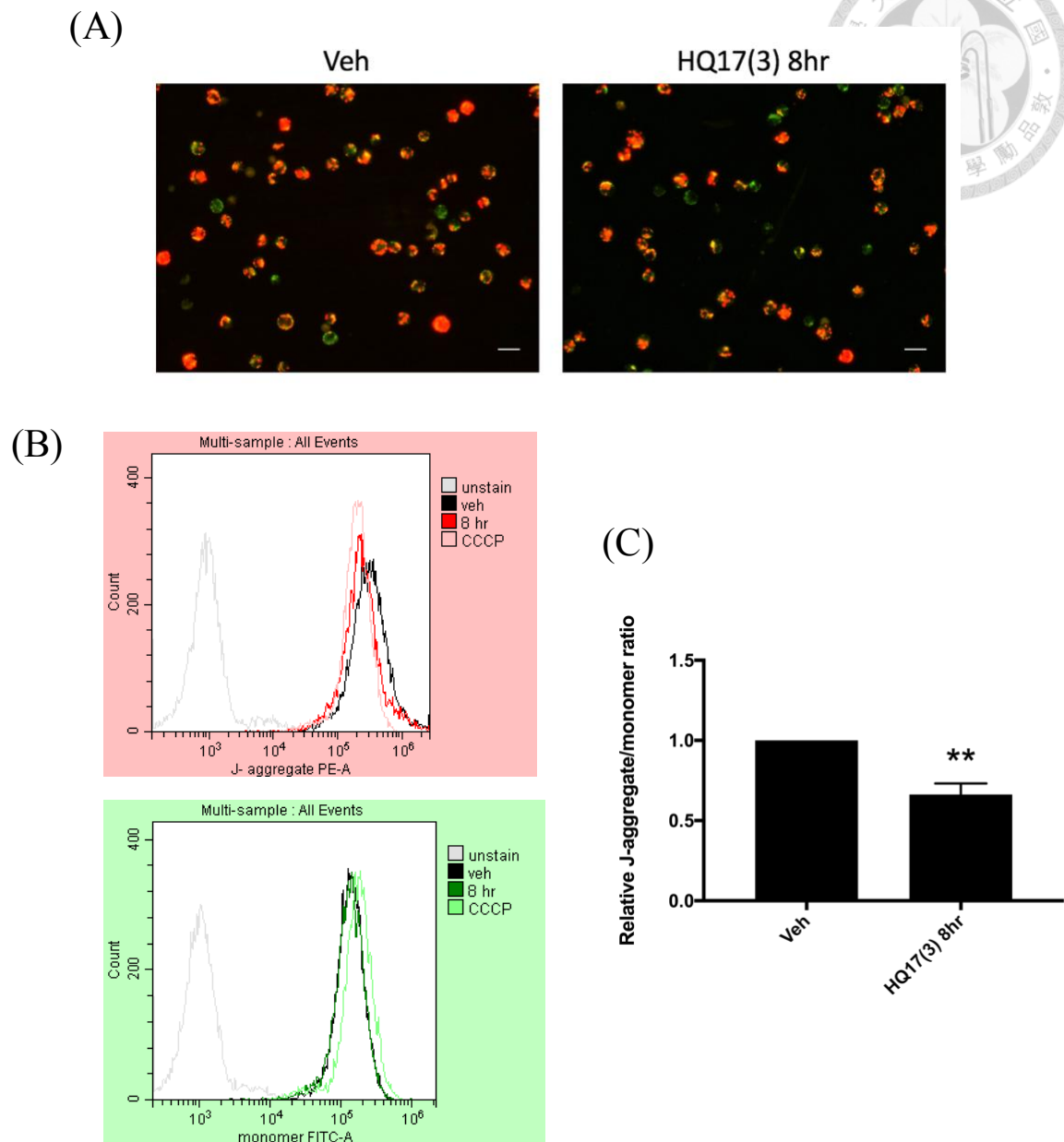
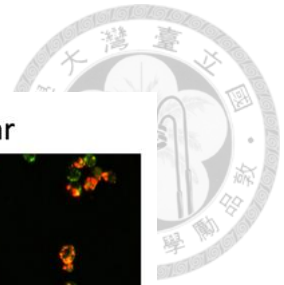


(B)



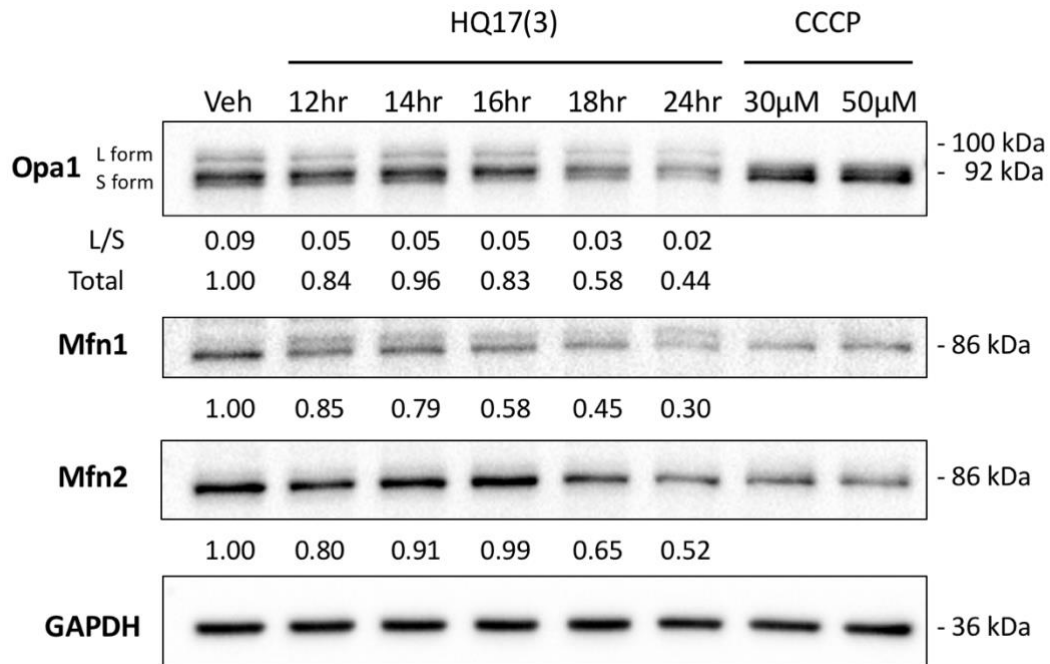
#### 圖五、HQ17(3)八小時處理造成SUP-B15細胞粒線體ROS堆積

在24孔盤接種 $5 \times 10^5$ 個細胞，分別處理8小時DMSO (Veh)或 $3.5 \mu\text{M}$  HQ17(3)，達指定時間後以 $5 \mu\text{M}$  MitoSOX於 $37^\circ\text{C}$ 染色20分鐘，利用螢光顯微鏡進行觀察與拍照分析。(A)螢光顯微鏡圖。(B)三次實驗平均量化圖。每組拍五個視野(400x)，每個視野隨機取十顆細胞以ImageJ軟體分析螢光亮度，將veh組的平均數值定為1，分析HQ17(3)處理8小時相較veh的螢光增加倍數，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，HQ17(3)不同時間的處理與veh相比均達統計意義，\*\*  $p < 0.01$ 。Scale bar =  $50 \mu\text{m}$



### 圖六、HQ17(3)處理八小時造成SUP-B15細胞粒線體膜電位喪失

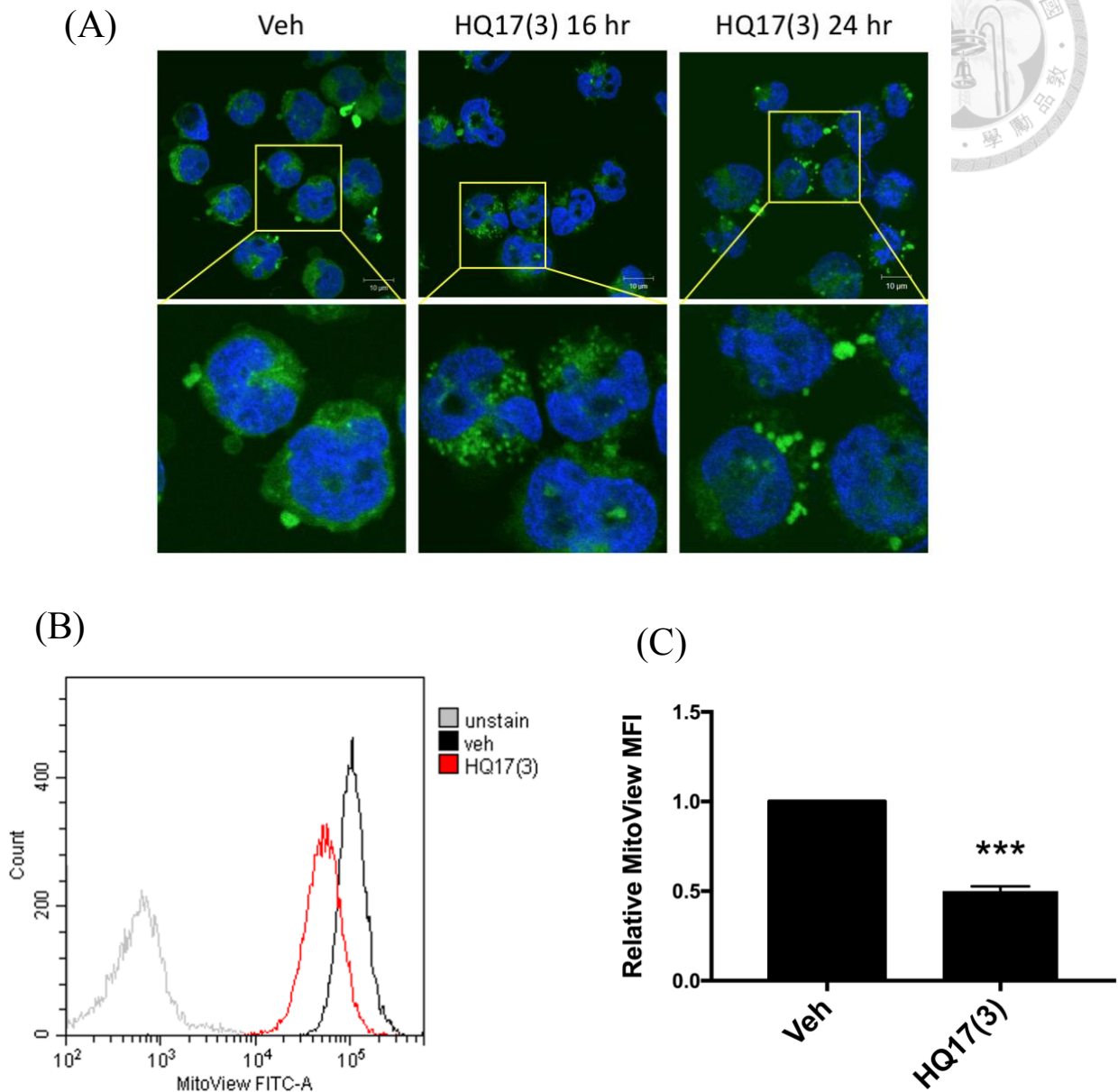
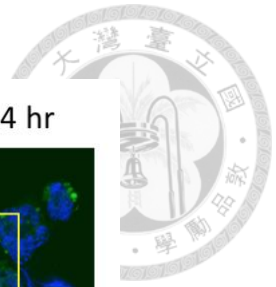
以24孔盤接種 $5 \times 10^5$ 個細胞，分別以DMSO (Veh)或 $3.5 \mu\text{M}$  HQ17(3)處理8小時，以 $50 \mu\text{M}$ 的CCCP處理40分鐘作為陽性處理組，達指定時間前40分鐘於培養液中加入 $2.5 \mu\text{g/ml}$  JC1於 $37^\circ\text{C}$ 染色40分鐘，分別利用螢光顯微鏡進行觀察，或以流式細胞儀結果分析圖。左圖為紅螢光，右圖為綠螢光。(C)三次實驗平均量化圖。J-aggregate的平均螢光強度(MFI)數值除以monomer之MFI求取比值，將veh的比值定為1，分析HQ17(3)相較veh的比值相對降低情形，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，HQ17(3) 8小時處理與veh相比達顯著差異，\*\*  $p < 0.01$ 。Scale bar =  $20 \mu\text{m}$



### 圖七、HQ17(3)導致SUP-B15粒線體損傷與融合蛋白降低

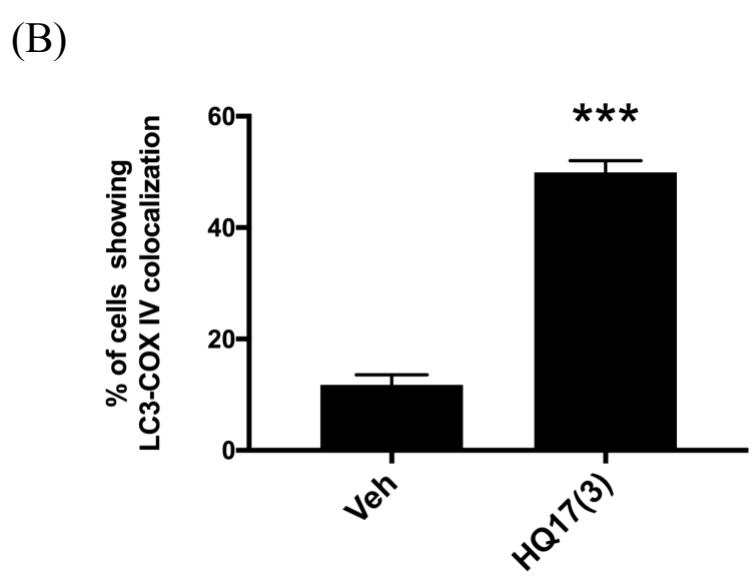
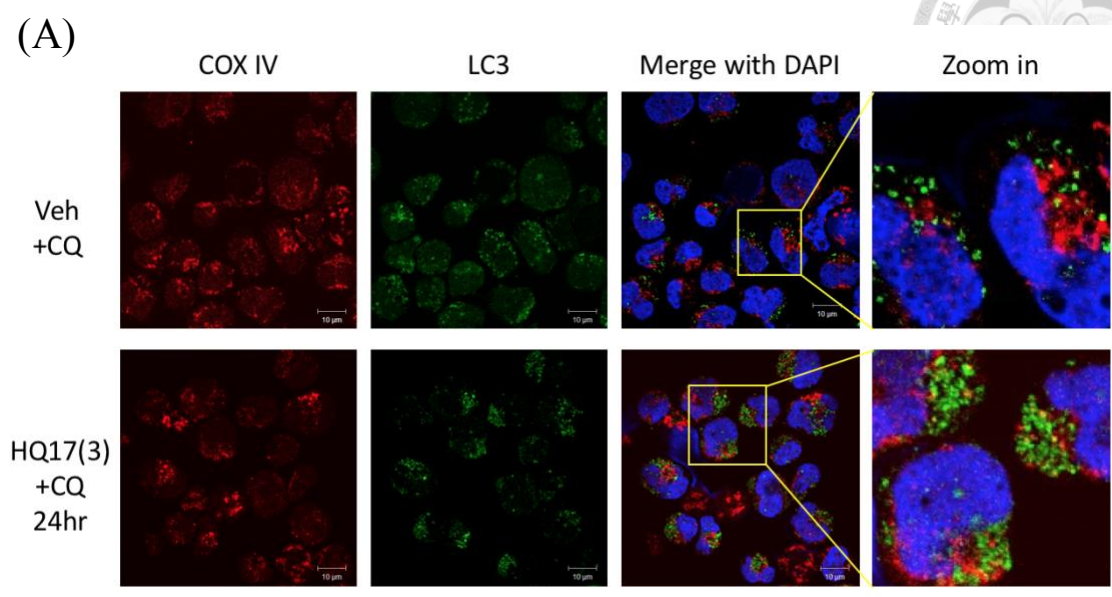
將SUP-B15細胞以3.5 $\mu$ M的HQ17(3)處理不同時間點，並以30及50 $\mu$ M的CCCP處理30分鐘作為陽性對照組，達指定時間後萃取細胞蛋白進行西方墨點法分析粒線體融合蛋白Opa1、Mfn1與Mfn2的表現，以GAPDH作為loading control，Opa1分析分為L-form/S-form比值以及總表現量比較。

Mfn1: Mitofusin 1、Mfn2: Mitofusin 2



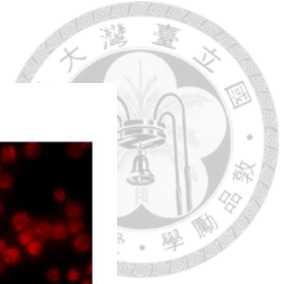
### 圖八、HQ17(3)導致細胞粒線體形態改變與粒線體總量減少

將細胞處理DMSO (Veh)或16及24小時的3.5 $\mu$ M HQ17(3)，達指定時間前30分鐘於培養液中加入100nM的MitoView於37 $^{\circ}$ C染色30分鐘後，利用共軛焦螢光顯微鏡進行觀察或以流式細胞儀進行分析。(A)螢光顯微鏡圖。上層為1000x視野下所拍到的視野，下層為將特定區域放大觀察粒線體形態改變的情形。Scale bar = 10 $\mu$ m(B)24小時處理組的流式細胞儀結果分析圖。(C)流式細胞儀三次實驗平均量化圖，將Veh的MFI平均數值定為1，比較處理組的MFI相對下降情形，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，HQ17(3)與veh相比達顯著差異，\*\*\* p<0.001。

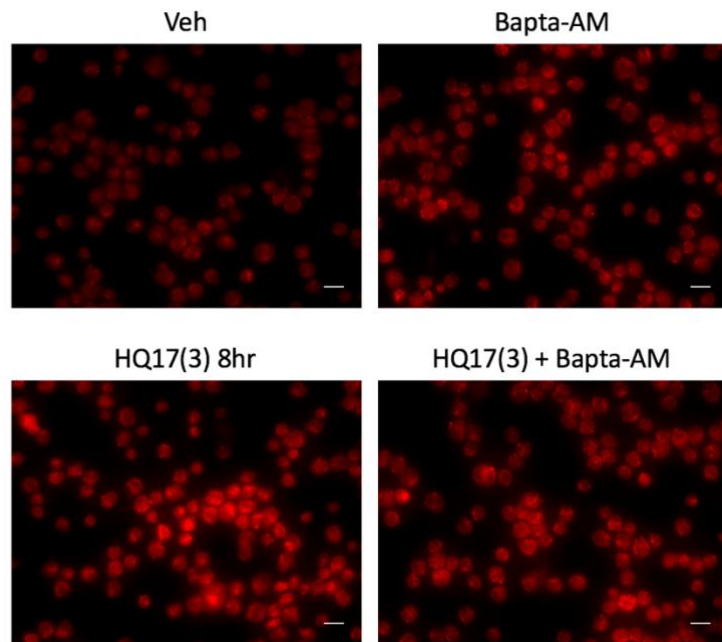


### 圖九、HQ17(3)造成SUP-B15細胞粒線體自嗜

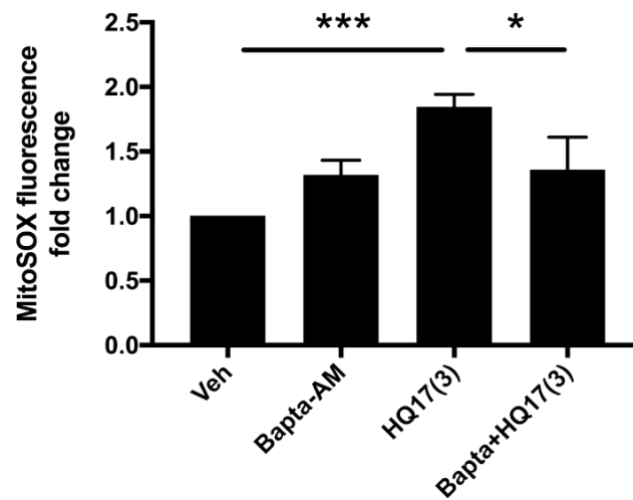
將細胞處理DMSO (Veh)或3.5 $\mu$ M的HQ17(3)24小時，每組均同時添加100 $\mu$ M的Chloroquine(CQ)抑制lysosome活性，達指定時間後進行細胞免疫螢光染色，利用共軛焦螢光顯微鏡進行觀察。(A)共軛焦螢光顯微鏡圖。紅螢光為COX IV，代表粒線體；綠螢光puncta為聚集於autophagosome的LC3-II，Scale bar = 10 $\mu$ m。(B)三次實驗平均量化圖。每組至少拍五個視野(1000x)，計算帶有COX IV與LC3-II puncta重疊的細胞的比例取其平均，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，HQ17(3)與veh相比達顯著差異，\*\*\* p<0.001。



(A)

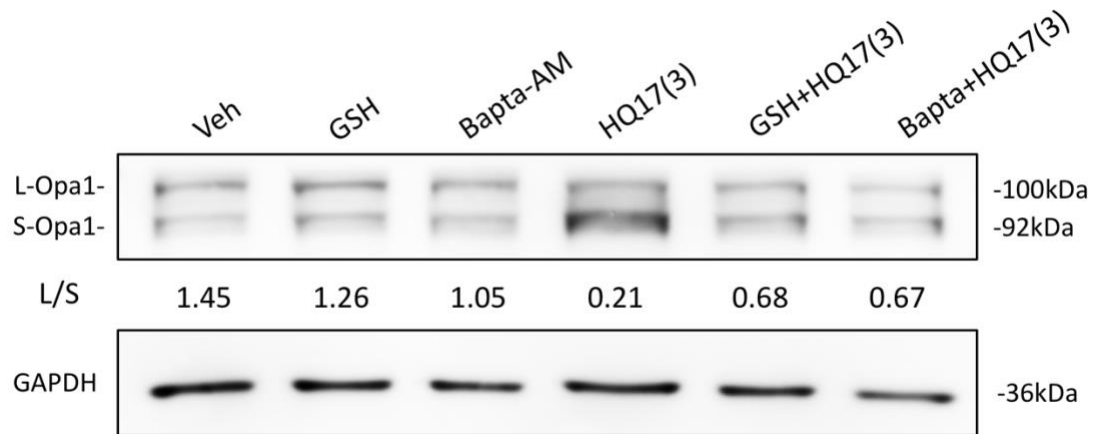


(B)



#### 圖十、 Bapta-AM抑制HQ17(3)導致的粒線體ROS堆積

在24孔盤接種 $5 \times 10^5$ 個細胞，分別以DMSO (Veh),  $5 \mu\text{M}$ 的Bapta-AM,  $3.5 \mu\text{M}$  HQ17(3)或Bapta-AM與HQ17(3)處理8小時，達指定時間後以 $5 \mu\text{M}$  MitoSOX於 $37^\circ\text{C}$ 染色20分鐘，利用螢光顯微鏡進行觀察與拍照分析。(A)螢光顯微鏡圖。紅螢光為MitoSOX, mitochondrial superoxide染色。(B)三次實驗平均量化圖。每組拍五個視野(400x)，每個視野取十顆細胞以ImageJ軟體分析細胞螢光強度，將Veh組的平均讀值定為1，分析處理組相較Veh的平均螢光增加倍數，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，HQ17(3)與Veh相比或HQ17(3)與Bapta+HQ17(3)相比均達顯著差異，\*  $p < 0.05$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。Scale bar =  $20 \mu\text{m}$



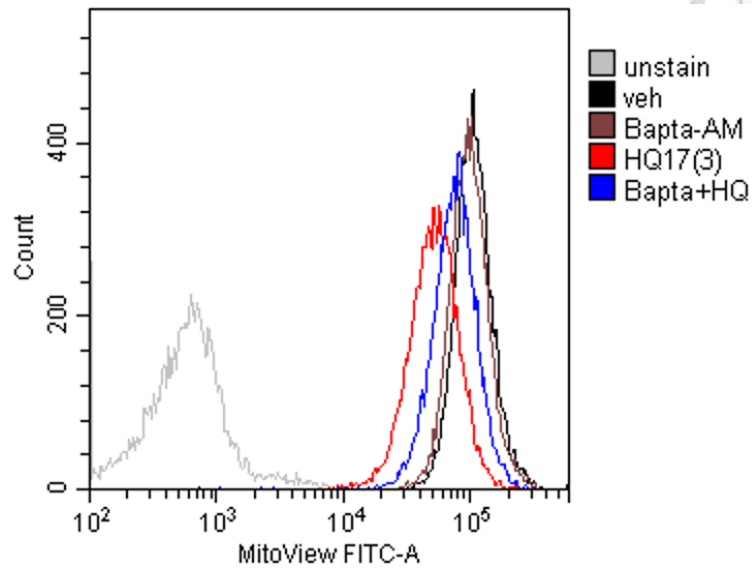
圖十一、ROS清除劑GSH或Bapta-AM均可緩解HQ17(3)導致的Opa1蛋白切割情形。將SUP-B15細胞處理DMSO (Veh), 10mM GSH, 5 $\mu$ M Bapta-AM, 3.5 $\mu$ M HQ17(3), GSH或Bapta-AM與HQ17(3)共處理24小時，達指定時間後萃取細胞蛋白進行西方墨點法分析粒線體融合蛋白Opa1的切割形式，以GAPDH作為loading control，Opa1的L-form/S-form比值標示於圖上。

GSH：Glutathione, ROS清除劑

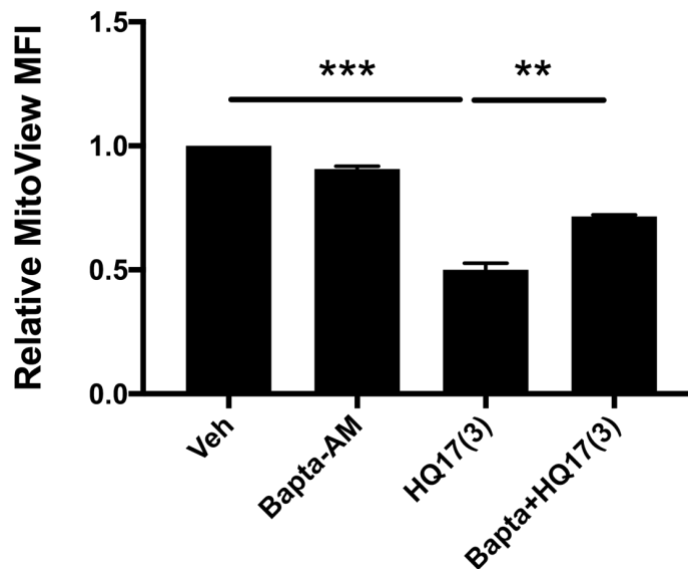




(A)

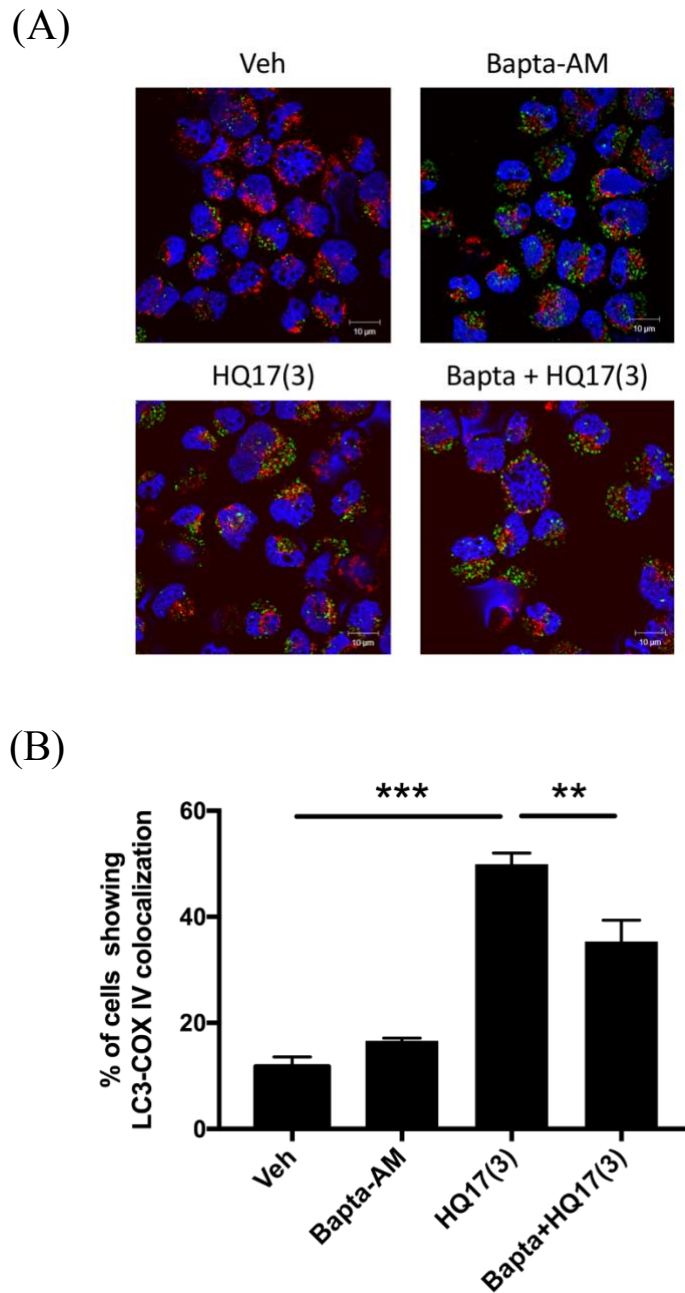


(B)



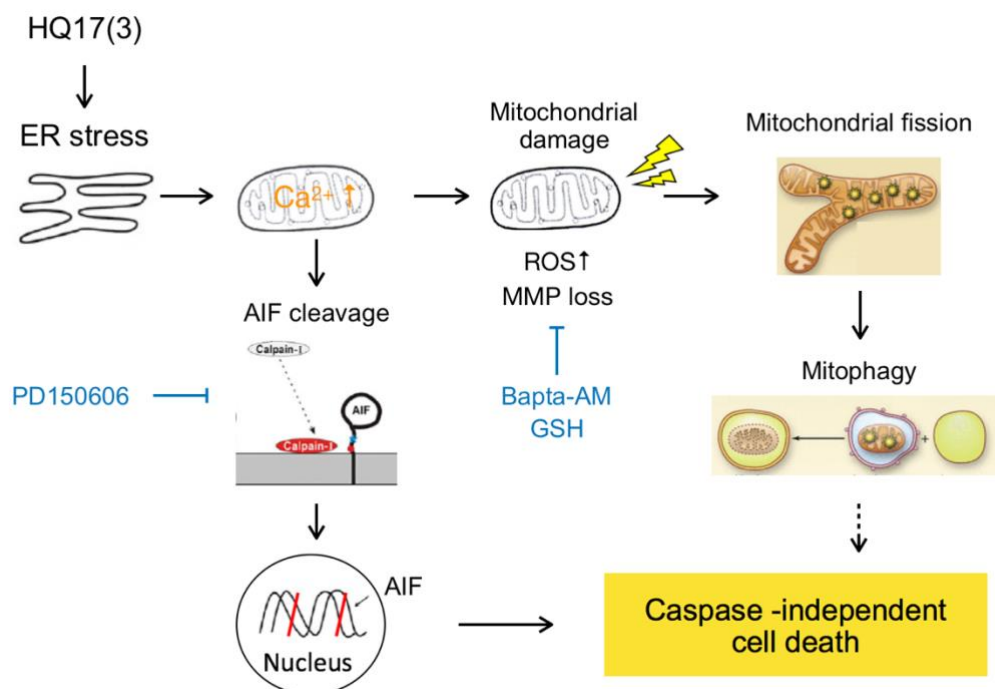
## 圖十二、 Bapta-AM緩解HQ17(3)所造成的粒線體總量減少

將細胞單獨處理3.5 $\mu$ M的HQ17(3)、5 $\mu$ M Bapta-AM或HQ17(3)與Bapta-AM共處理24小時，達指定時間前30分鐘於培養液中加入100nM的MitoView於37 $^{\circ}$ C染色30分鐘後，以流式細胞儀進行分析。(A)流式細胞儀結果分析圖。(B)三次實驗平均量化圖。將veh組的MFI定義為1，分析其他組別MFI相對改變情形，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，統計檢定\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。



### 圖十三、Bapta-AM可抑制HQ17(3)造成SUP-B15細胞粒線體自嗜

將細胞單獨處理3.5 $\mu$ M的HQ17(3)、5 $\mu$ M Bapta-AM或HQ17(3)與Bapta-AM共處理24小時，每組均同時添加100 $\mu$ M的Chloroquine(CQ)抑制lysosome活性，達指定時間後進行免疫螢光染色，利用共軛焦螢光顯微鏡進行觀察。(A)螢光顯微鏡圖，紅螢光為COX IV代表粒線體，綠螢光puncta為聚集於autophagosome的LC3-II，Scale bar = 10 $\mu$ m。(B)三次實驗平均量化圖，每組至少拍五個視野(1000x)，計算帶有COX IV與LC3-II puncta重疊的細胞比例，標準差畫於圖上，利用t-test統計分析，統計檢定\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。



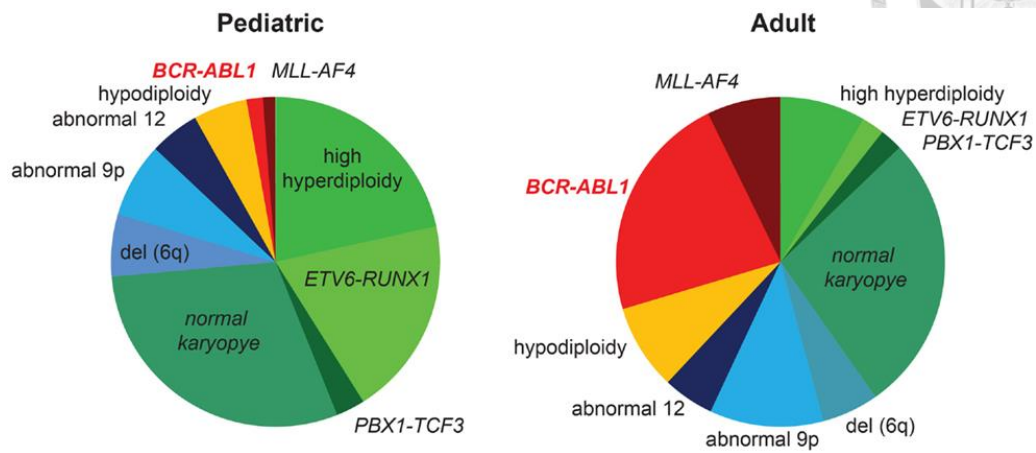
圖十四、HQ17(3)造成 $Ph^+$  B-ALL SUP-B15細胞株死亡的可能機轉示意圖

HQ17(3)進入到SUP-B15細胞會誘導內質網壓力發生，導致過多 $Ca^{2+}$ 從內質網流至粒線體，造成粒線體內calpain活化並對AIF進行切割，使AIF游離至細胞核導致caspase-independent cell death的發生，並以calpain抑制劑PD150606可緩解細胞死亡；粒線體內 $Ca^{2+}$ 的增加同時也會導致粒線體ROS上升與膜電位喪失，損傷的累積導致粒線體傾向進行分裂並活化mitophagy機制清除粒線體，致使細胞死亡發生，而此路徑也可藉由 $Ca^{2+}$  chelator Bapta-AM或ROS清除劑GSH抑制並緩解細胞死亡。



# 附錄

附錄一：ALL 基因變異分佈圖



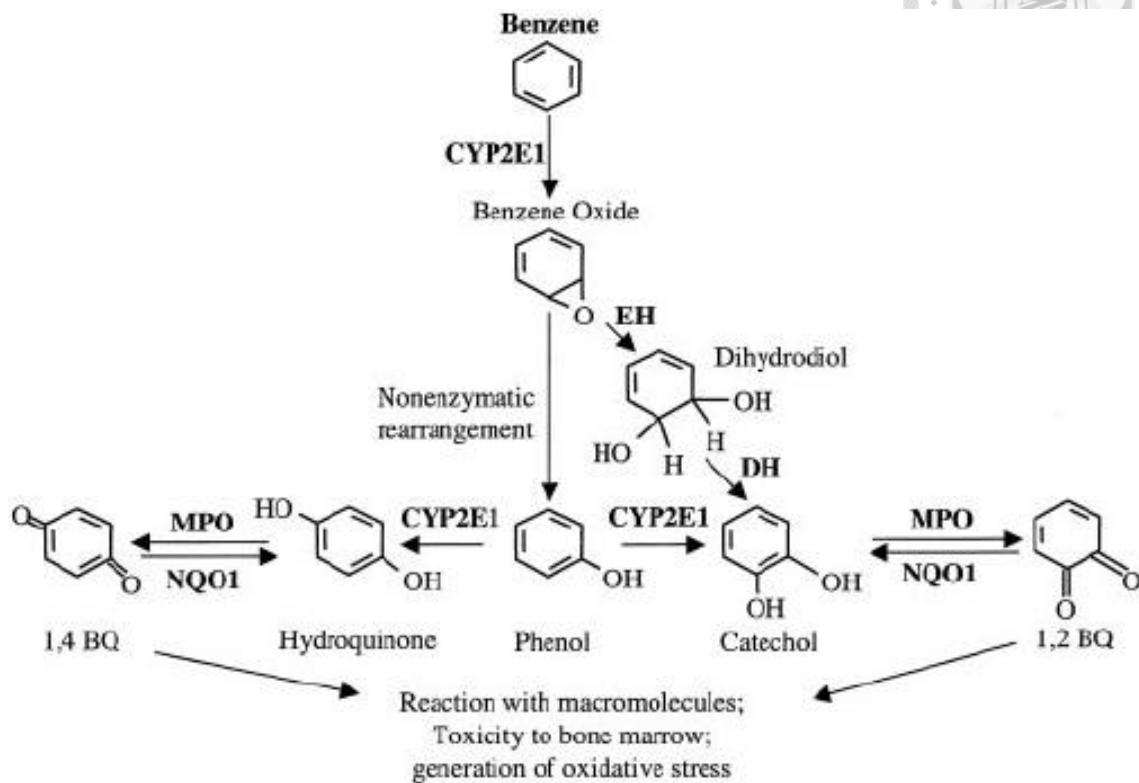
費城染色體陽性急性淋巴性白血病(Ph<sup>+</sup> ALL)在小兒病例約佔 3~5%，成人病例則佔 20-30%。

參考資料來源：

Bernt, K. M., & Hunger, S. P. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Oncology* 4, 54. (2014)



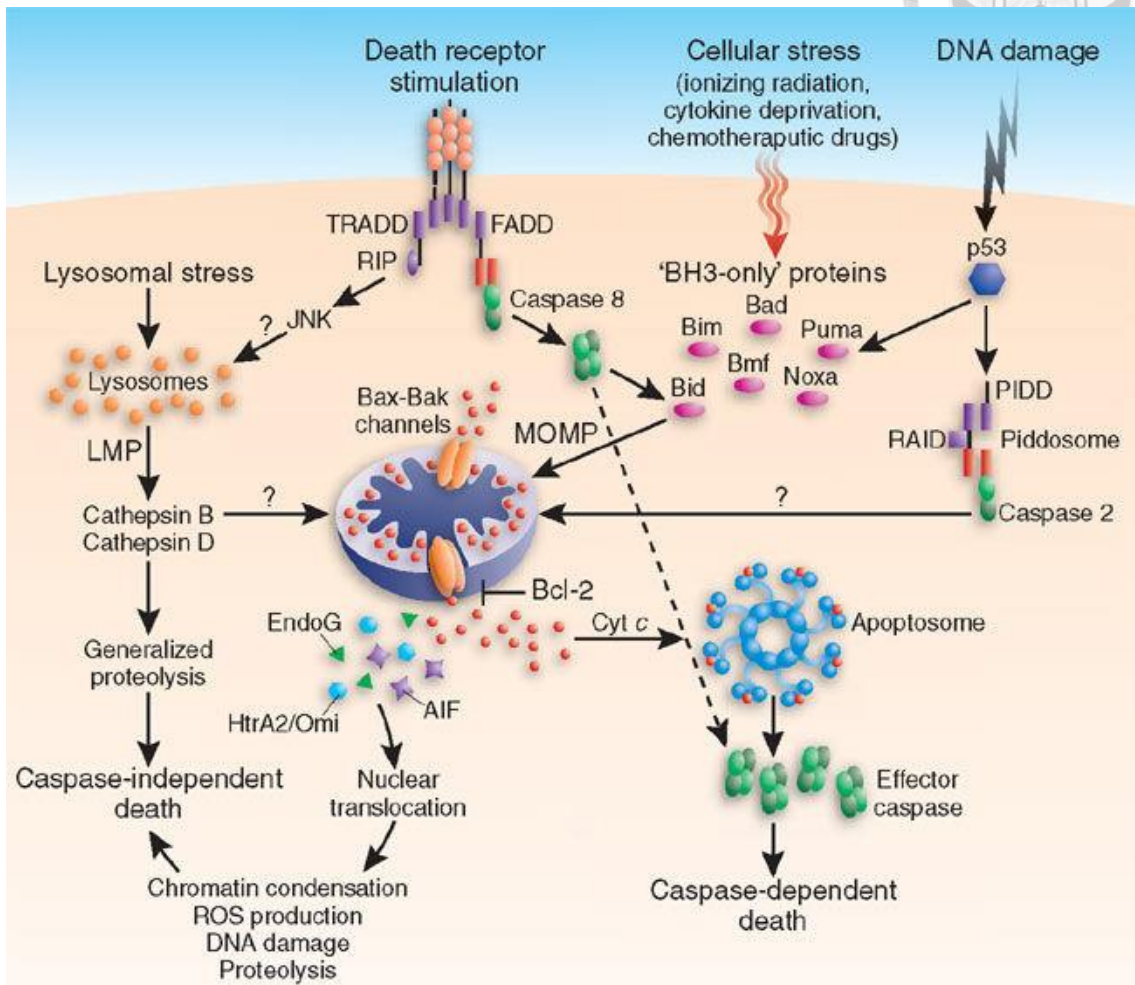
附錄三：苯(benzene)的代謝



操考資料來源：

Bauer, A. K., Faiola, B., Abernethy, D. J., Marchan, R., Pluta, L. J., Wong, V. A., ... & Borghoff, S. Genetic susceptibility to benzene-induced toxicity: role of NADPH: quinone oxidoreductase-1. *Cancer Research* 63(5), 929-935. (2003)

附錄四：caspase dependent/independent cell death

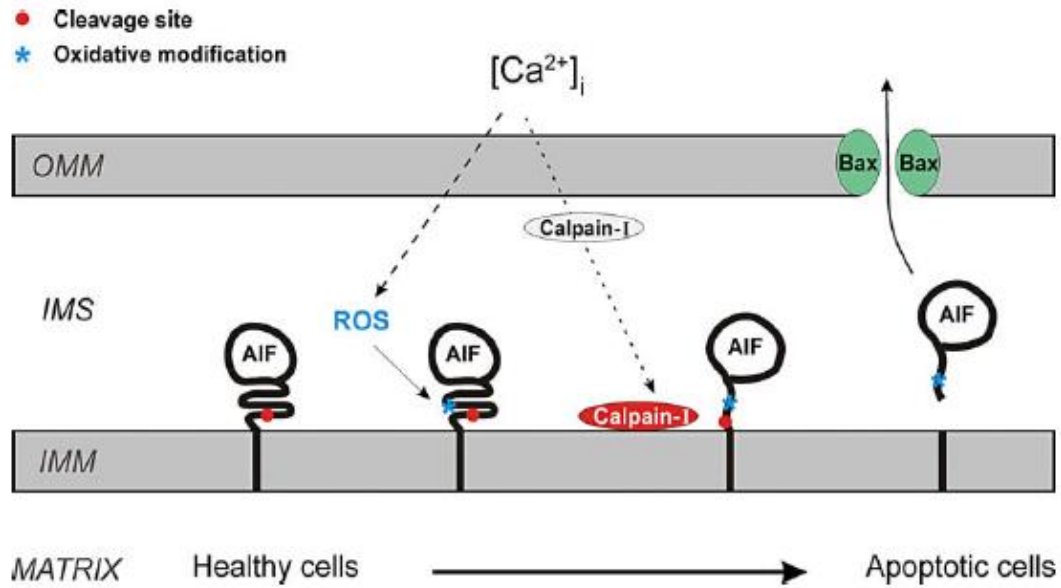


參考資料來源：

Kroemer, G., & Martin, S. J. Caspase-independent cell death. *Nature Medicine* 11(7), 725. (2005)



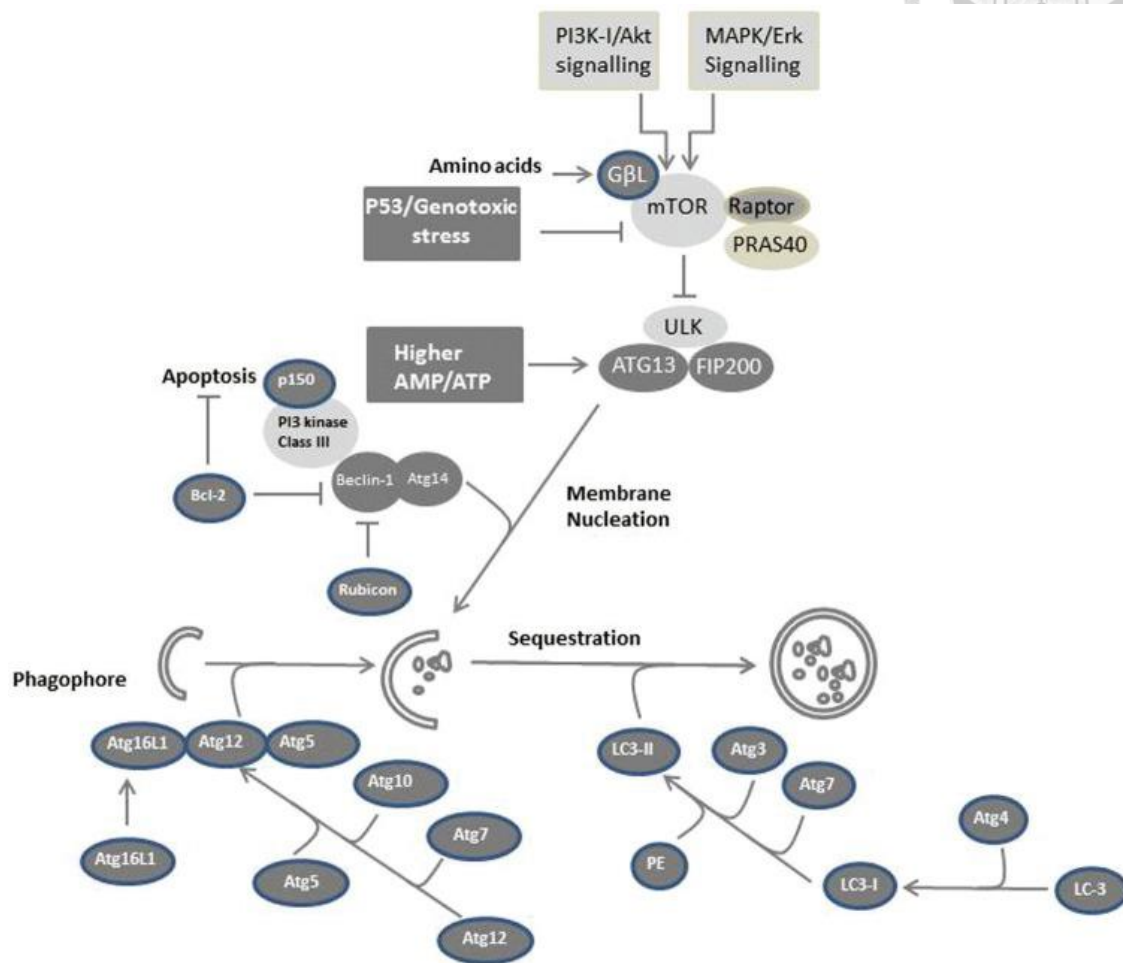
附錄五：AIF processing 過程



參考資料來源：

Norberg, E., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396(1), 95-100. (2010)

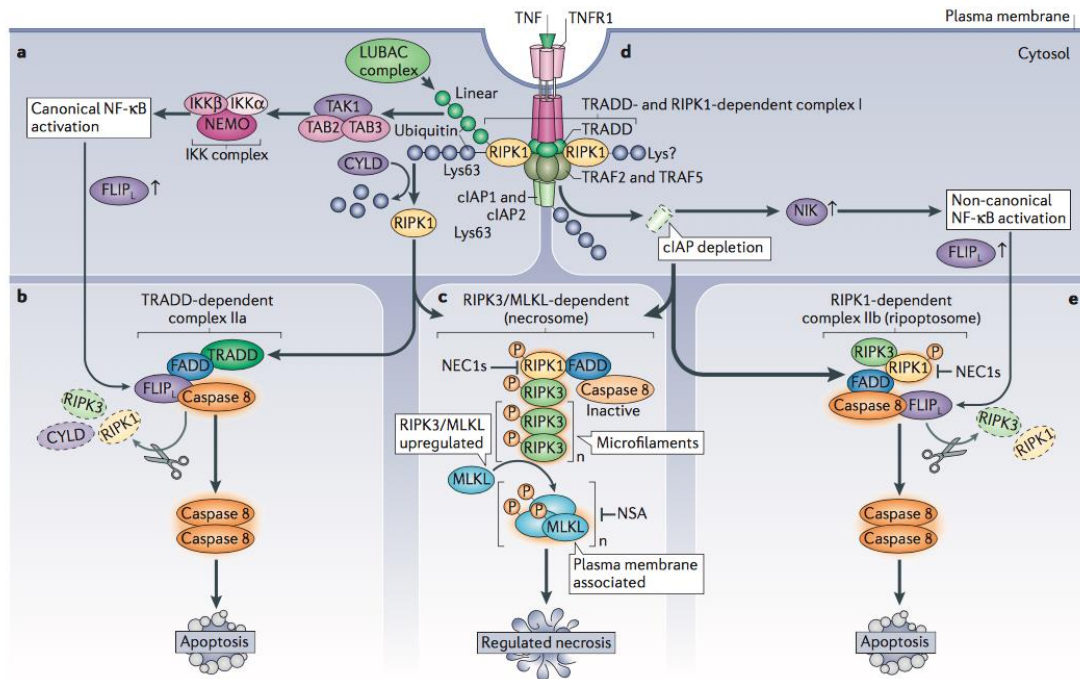
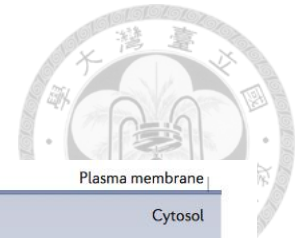
附錄六：non-selective autophagy 進程



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. *Journal of Cell Death* 6, JCD-S11034. (2013)

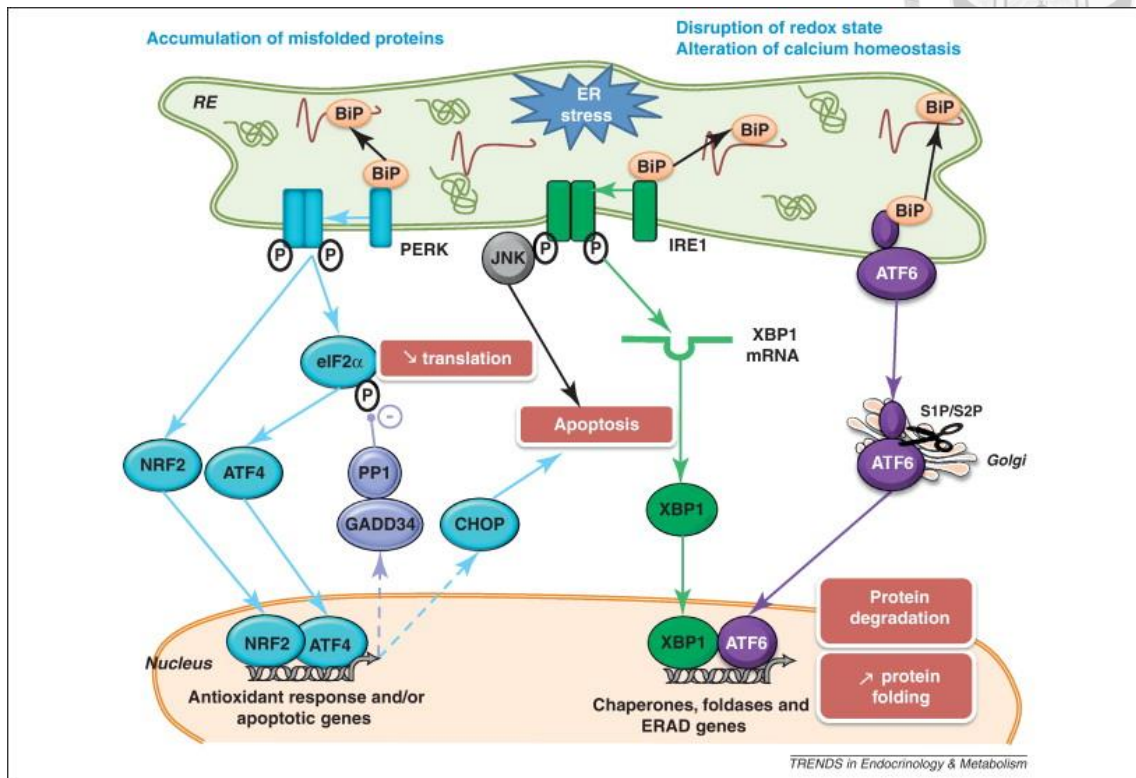
附錄七：由 RIP1 所誘導的 apoptosis 或 necroptosis



參考資料來源：

Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(2), 135. (2014)

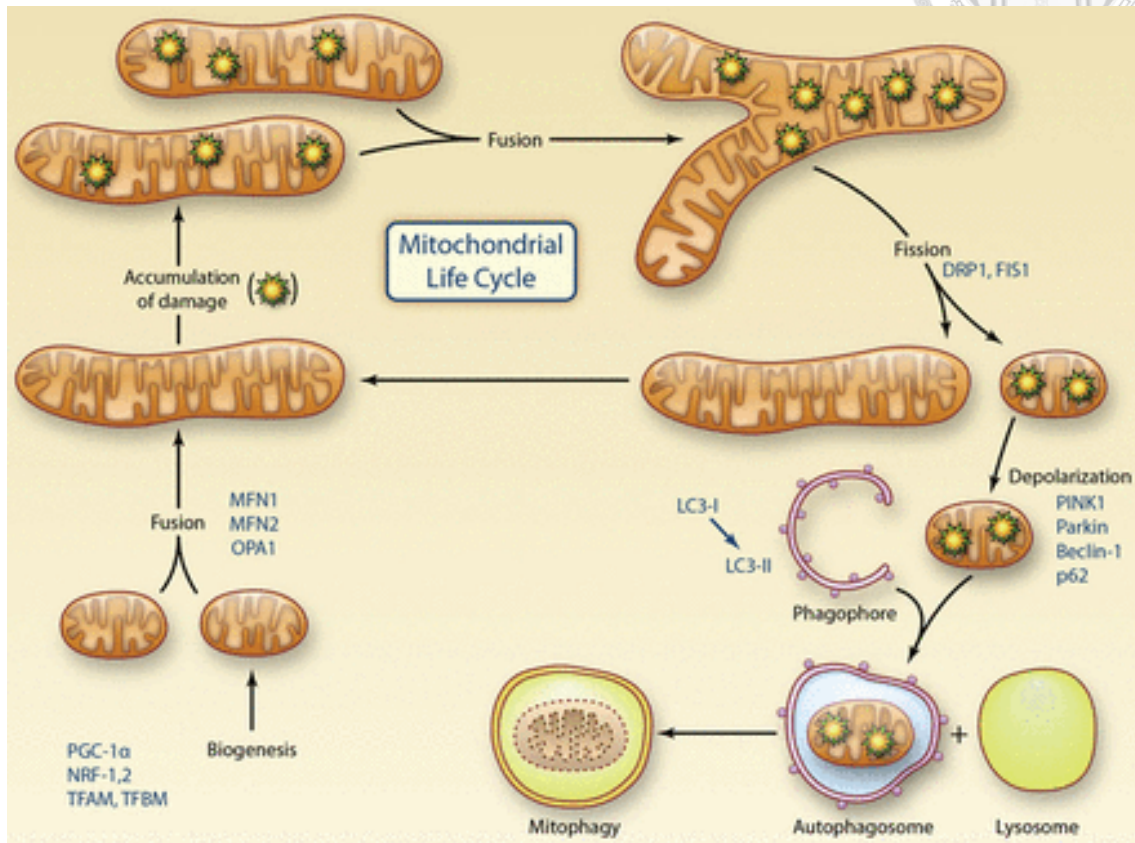
附錄八：UPR pathway 路徑



參考資料來源：

Flamment, M., Hajduch, E., Ferré, P., & Fougelle, F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23(8), 381-390. (2012)

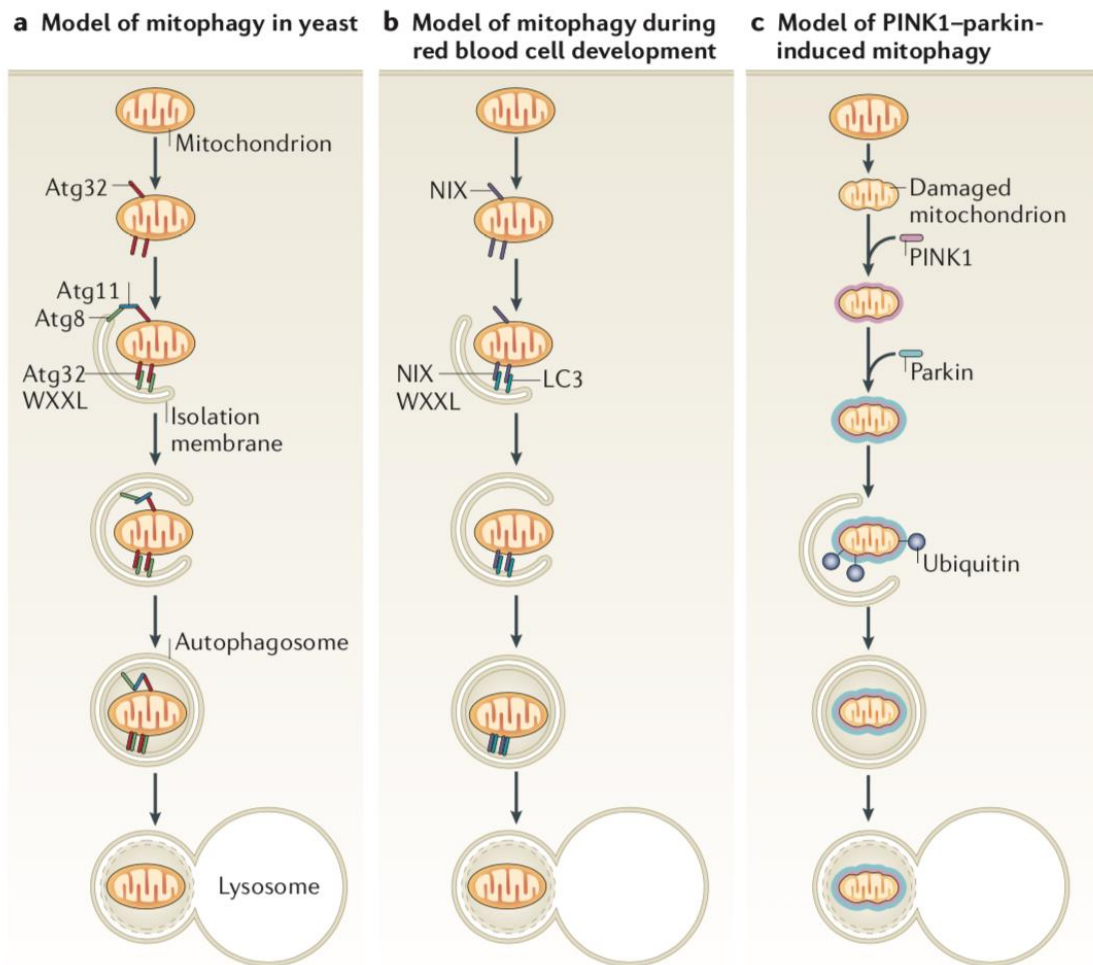
附錄九：粒線體動態平衡



參考資料來源：

Kluge, M. A., Fetterman, J. L., & Vita, J. A. Mitochondria and endothelial function. *Circulation Research* 112(8), 1171-1188. (2013)

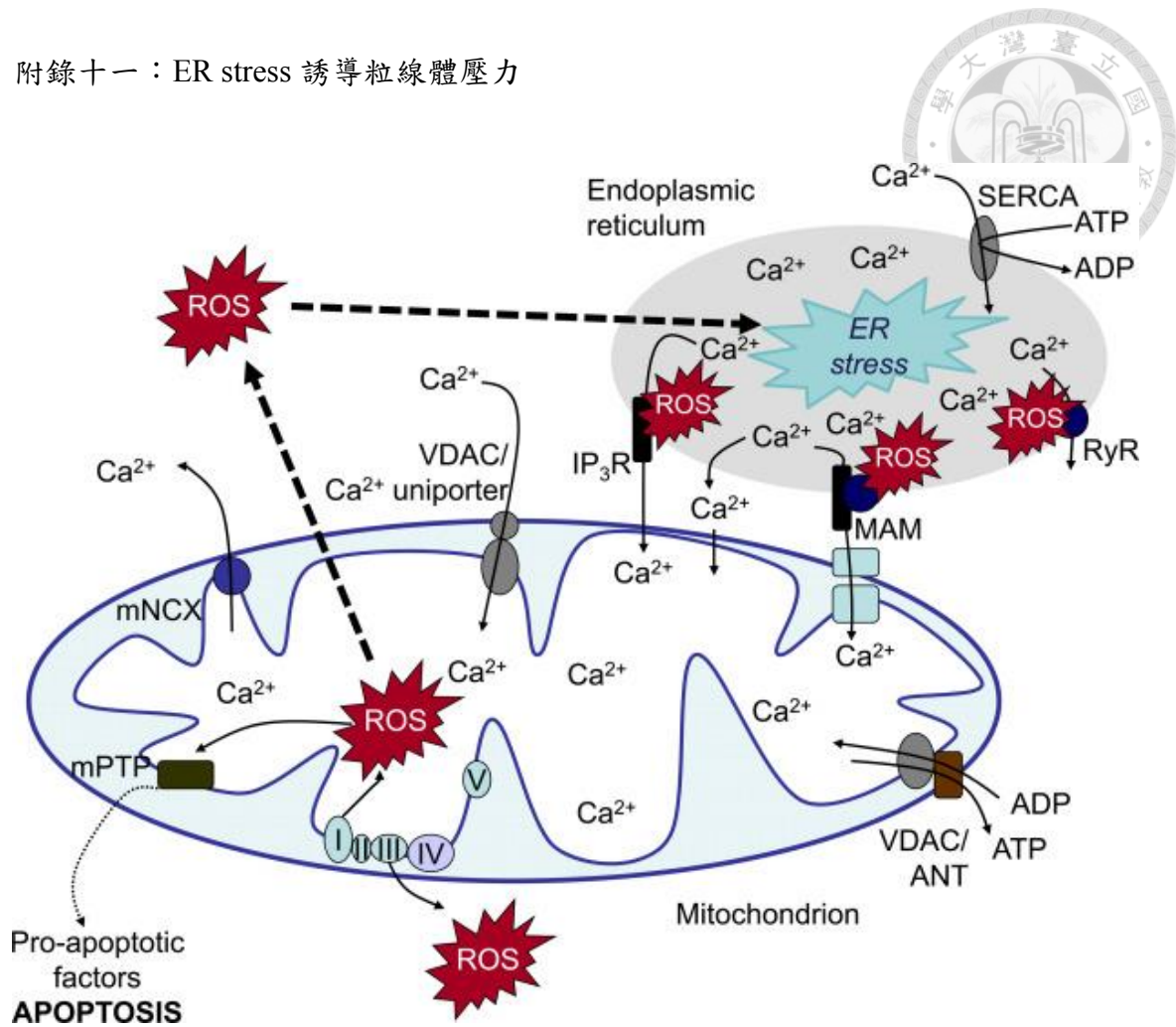
附錄十：粒線體自嗜(Mitophagy)分子機制



參考資料來源：

Youle, R. J., & Narendra, D. P. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(1), 9. (2011)

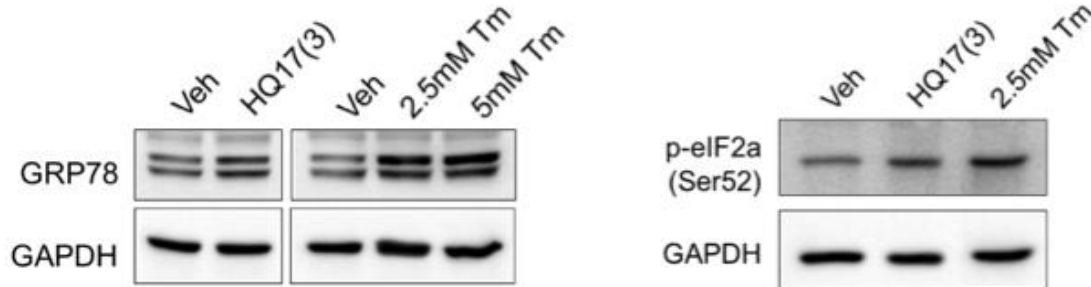
附錄十一：ER stress 誘導粒線體壓力



參考資料來源：

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biology* 6, 260-271. (2015)

附錄十二：HQ17(3)誘導 SUP-B15 細胞 ER stress 發生



Tm : Tunicamycin, ER stress 誘導劑

eIF2 $\alpha$  :  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2

參考資料來源：

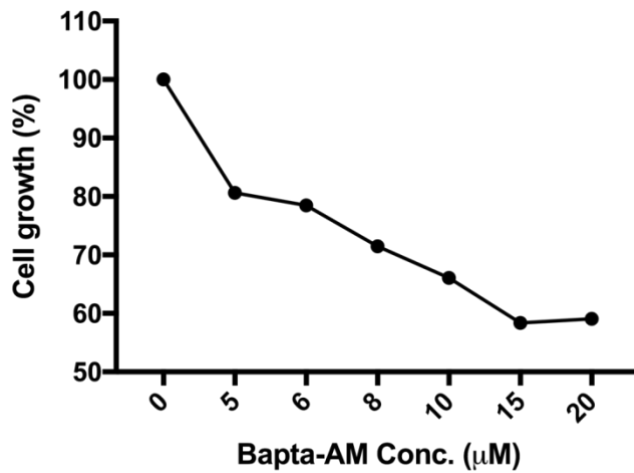
陳佳瑋. Master Thesis : Inhibitory effects of the botanical alkyl hydroquinone derivative HQ17(3) on acute lymphoblastic leukemia cell lines. (2016).



附錄十三：Ca<sup>2+</sup>螯合劑 Bapta-AM 對 SUP-B15 細胞的毒性測試



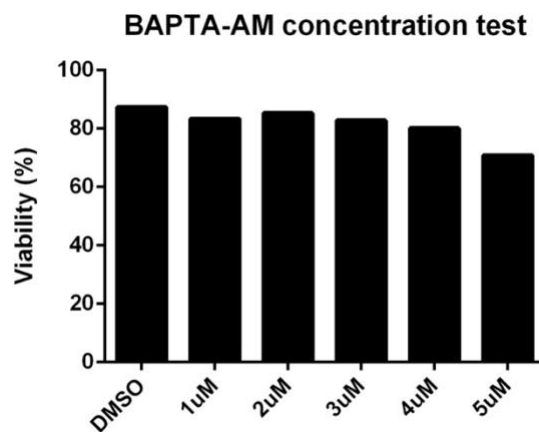
1. 以 ACP assay 測定 Bapta-AM 對 SUP-B15 細胞生長影響。



ACP assay 實驗方法參考：

Yang, T. T., Sinai, P., & Kain, S. R. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Analytical Biochemistry* 241(1), 103-108. (1996)

2. 以 Annexin-V/PI 染色分析 Bapta-AM 對 SUP-B15 細胞存活率影響。

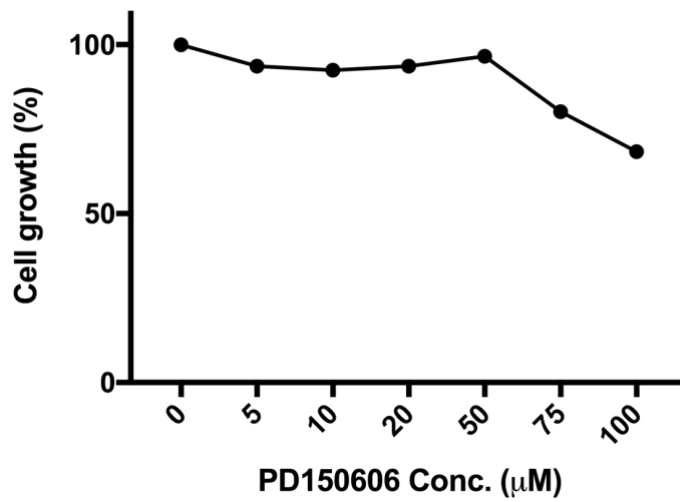


以此毒性測試選用無明顯致死毒性的最高濃度 5μM 為 Bapta-AM 使用濃度。

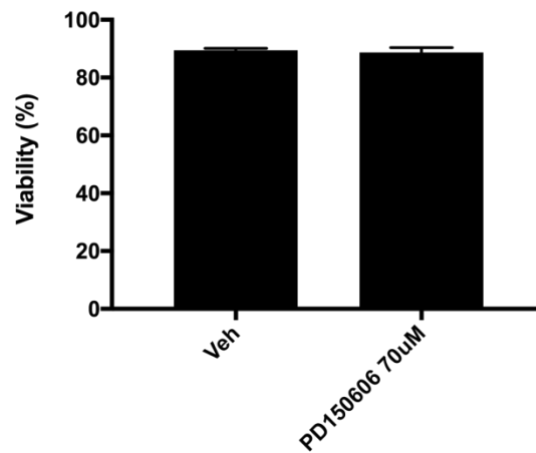
附錄十四：Calpain-I 抑制劑 PD150606 對 SUP-B15 細胞的毒性測試



1. 以 ACP assay 測定 PD150606 對 SUP-B15 細胞生長影響。



2. 以 Annexin-V/PI 染色分析 Bapta-AM 對 SUP-B15 細胞存活率影響。



以此毒性測試選用無明顯致死毒性的最高濃度 70 $\mu\text{M}$  為 PD150606 使用濃度。