

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation



組蛋白乙酰化修飾於光動力治療所引發

促存活分子表達之機制探討及臨床應用

Histone acetylation involves in the increased expression of  
prosurvival molecules induced by photodynamic therapy:  
mechanistic investigation and clinical implication

蔡宜珍

Yi-Jane Tsai

指導教授：陳進庭 博士

Advisor : Chin-Tin Chen, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月

July, 2015

# 目錄



摘要 .....	6
Abstract .....	8
第一章 緒論 .....	10
1.1 光動力治療 .....	10
1.1.1 光化學作用機制 .....	11
1.1.2 光動力發展與應用 .....	12
1.1.3 五氨基酮戊酸(5-Aminolevulinic Acid, ALA)光動力療法 .....	13
1.1.4 Chlorin e6(Ce6)及微脂體包埋光 Ce6 之光動力療法 .....	14
1.2 光動力致氧化效應 .....	15
1.2.1 活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS) .....	15
1.2.2 活性氧分子對訊息分子之調控 .....	16
1.2.3 MAPK (Mitogen-activated protein kinases) .....	17
1.2.4 NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) .....	21
1.3 氧化壓力造成的細胞死亡 .....	23
1.3.1 細胞凋亡(Apoptosis) .....	23
1.3.2 細胞壞死(Necrosis) .....	26
1.3.3 細胞自噬(Autophagy) .....	27
1.3.4 細胞死亡間的交互作用 .....	29
1.4 抗細胞凋亡家族 .....	30
1.4.1 生存素 Survivin .....	30
1.5 環氧化酵素-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) .....	32
1.6 組蛋白乙醯化(Histone acetylation) .....	34
1.7 研究動機與目的 .....	38
第二章 材料與方法 .....	41
2.1 細胞株與細胞培養 .....	41
2.2 <i>in vitro</i> 光動力治療 .....	41
2.3 細胞存活率試驗 .....	42
2.3.1 MTT assay .....	42
2.3.2 Colony-formation assay .....	42
2.4 基因表達分析 .....	43
2.4.1 萃取 RNA (RNA extraction) .....	43
2.4.2 反轉錄作用 (Reverse Transcription, RT) .....	44
2.4.3 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	44
2.5 蛋白質表達分析 .....	45
2.5.1 Total 蛋白質萃取 .....	45

2.5.2 細胞質/細胞核蛋白質萃取 .....	46
2.5.3 蛋白質定量.....	46
2.5.4 西方點墨法 (Western Blot).....	47
2.6 細胞凋亡(apoptosis)檢測.....	49
2.6.1 Hoechst 染色 .....	49
2.6.2 Annexin V/PI 染色 .....	49
2.6.3 Caspase-3 活性檢測 .....	50
2.7 細胞自噬(autophagy)檢測 .....	51
2.7.1 Monodansylcadaverine (MDC) 染色 .....	51
2.7.2 GFP-LC3 螢光檢測.....	51
2.8 HAT 活性偵測 .....	52
2.9 HDAC 活性偵測 .....	52
2.10 干擾性核醣核酸(RNA interference, RNAi).....	53
2.11 轉染(Transfection).....	53
2.12 免疫沉澱技術 (Immunoprecipitation assay, IP assay) .....	54
2.13 染色質免疫沉澱技術 (Chromatin Immunoprecipitation assay, ChIP assay) .....	54
2.14 活體動物實驗.....	57
2.14.1 動物與腫瘤模式.....	57
2.14.2 <i>In vivo</i> 光動力治療.....	57
2.14.3 <i>In vivo</i> 光動力與 HAT 抑制劑之結合型治療 .....	57
2.15 統計分析.....	58
第三章 結果 .....	59
3.1 光動力氧化效應透過 p300HAT 表現及活性增加，增加組蛋白乙醯化修飾.....	59
3.2 光動力氧化效應藉由 p300HAT 所引發之組蛋白乙醯化修飾，增加 COX-2 基因轉錄.....	60
3.3 光動力氧化效應透過 p38MAPK 訊息調控 p300HAT 表現、活性及組蛋白乙醯化修飾，加強 COX-2 基因轉錄.....	62
3.4 光動力氧化效應會藉由 p300HAT 增加 COX-2 轉錄因子 NF-κB 之乙醯化修飾，促進其對 COX-2 之轉錄活性.....	63
3.5 Ce6-PDT 藉由 p38-p300HAT-acetylation 增加 COX-2 轉錄表現.....	64
3.6 <i>In vivo</i> 光動力氧化效應會藉由 p300HAT 增加 COX-2 promoter 位置乙醯化修飾，促進對 COX-2 之轉錄.....	65
3.7 HAT 抑制劑 AA 顯著提升光動力治療對腫瘤細胞之細胞毒殺效果 .....	65
3.8 HAT 抑制劑 AA 增加光動力治療於小鼠 C26 腫瘤之治療效應 .....	66
3.9 光動力治療結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制 pro-survival 蛋白質 survivin 表現，加強細胞死亡.....	67

3.10 結合光動力治療和 HAT 抑制劑 AA 會誘發腫瘤細胞進行 apoptosis 導致細胞死亡.....	68
3.11 HAT 抑制劑 AA 結合光動力治療會藉由提升 caspase 活性而抑制 autophagy 發生.....	69
第四章 討論.....	71
4.1 光動力治療會引發 p38MAPK-p300HAT-hyperacetylation.....	71
4.2 光動力治療與乙醯化修飾.....	72
4.3 氧化壓力與乙醯化修飾.....	73
4.4 HATs 與 HDACs 活性改變之調控.....	74
4.5 光動力治療與 p38MAPK 活化.....	77
4.6 光動力氧化效應下 COX-2 轉錄機轉之探討.....	78
4.7 光動力作用與 COX-2 抑制劑之結合型治療.....	80
4.8 光動力氧化效應與 survivin 活化.....	81
4.9 ALA-PDT 與 ALA-PDT 結合 AA 引發之細胞死亡路徑探討.....	82
4.10 光動力治療結合 HAT 抑制劑於腫瘤治療之應用.....	85
第五章 結論.....	87
Figure 1 光動力致壓效應會導致組蛋白乙醯化程度上升。.....	88
Figure 2 光動力處理會導致 HAT 的活性上升。.....	89
Figure 3 光動力處理會導致 HDAC 的活性下降。.....	90
Figure 4 光動力處理會促使 p300HAT mRNA 的上升。.....	91
Figure 5 光動力處理不影響 HDACs mRNA 的表現量。.....	92
Figure 6 Pro-survival 蛋白質 COX-2 於光動力治療後顯著上升。.....	93
Figure 7 使用 HAT 抑制劑 AA 能有效阻止 COX-2 於光動力治療後上升。.....	94
Figure 8 使用 shp300 能抑制光動力治療後上升之 p300HAT 及 COX-2 mRNA 的表現。.....	96
Figure 9 使用 shp300 能抑制光動力治療後上升之組蛋白乙醯化及 COX-2 蛋白質的表現。.....	97
Figure 10 光動力治療促使大量 p300HAT 蛋白質結合至 COX-2 promoter 上，導致 COX-2 promoter 組蛋白乙醯化程度上升。.....	98
Figure 11 光動力治療會引發 p38MAPK 活化。.....	99
Figure 12 使用 p38MAPK 抑制劑能抑制光動力治療後 p38MAPK 磷酸化及 COX-2 的表現。.....	101
Figure 13 使用 p38MAPK 抑制劑能抑制光動力治療後上升之 p300HAT mRNA 表現、HAT 活性及組蛋白乙醯化程度。.....	103
Figure 14 光動力治療會造成 NF- $\kappa$ B lysine310 (K310) 乙醯化程度上升。.....	104
Figure 15 ALA-PDT 經由 p38MAPK 活化引發 p300 表現及 HAT 活性提升，導致 NF- $\kappa$ B 乙醯化程度上升。.....	105

Figure 16 ALA-PDT 後乙醯化 NF- $\kappa$ B 結合於 COX-2 promoter 上之分析。	106
Figure 17 Ce6-PDT 能藉由活化 p38MAPK 提升 HAT 活性，增加 COX-2 promoter 上 NF- $\kappa$ B p65 與組蛋白乙醯化程度。	108
Figure 18 ALA-PDT 藉由提升 HAT 活性，促使 C26 細胞內 COX-2 promoter 上組蛋白乙醯化程度提升，造成 COX-2 表現增加。	110
Figure 19 PL-Ce6-PDT 會提升 NU/NU 小鼠身上 A375 腫瘤之 HAT 活性，增加腫瘤內 COX-2 promoter 上組蛋白乙醯化程度，促進 COX-2 轉錄。	112
Figure 20 PL-Ce6-PDT 會提升 BALB/c 小鼠身上 C26 腫瘤之 HAT 活性，增加腫瘤內 COX-2 promoter 上組蛋白乙醯化程度，促進 COX-2 轉錄。	114
Figure 21 HAT 抑制劑 Anacardic acid (AA) 能提升 ALA-PDT 細胞毒殺效應。	115
Figure 22 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑能抑制 A375 細胞形成 colonies。	116
Figure 23 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑能抑制 C26 細胞形成 colonies。	117
Figure 24 單獨使用 AA 或 NS-398 不能抑制 C26 腫瘤生長。	118
Figure 25 PL-Ce6-PDT 結合 AA 能有效抑制 C26 腫瘤生長。	121
Figure 26 長期給予 HAT 抑制劑 AA 結合 PL-Ce6-PDT 能抑制 C26 腫瘤生長。	123
Figure 27 COX-2 抑制劑 NS-398 無法提升 ALA-PDT 後之細胞毒殺效應。	124
Figure 28 使用 HAT 抑制劑 AA 能有效阻止 survivin 於光動力治療後上升。	125
Figure 29 使用 HAT 抑制劑 AA 能有效阻止 survivin 於光動力治療後上升，且活化 caspase 3 及 PARP。	126
Figure 30 使用 HAT 抑制劑 AA 結合 ALA-PDT 能顯著提升 caspase 3 活性。	127
Figure 31 使用 shsurvivin 阻止 Survivin 於光動力治療後上升，能大幅提升活化態之 caspase 3 及 PARP 表現。	128
Figure 32 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會引發細胞核內染色質聚集。	129
Figure 33 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會強烈引發 Phosphatidylserine (PS) 外翻之 apoptosis 現象。	131
Figure 34 使用 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 能阻止 ALA-PDT 結合 AA 所引發之細胞死亡。	133
Figure 35 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagosomes 形成。	134
Figure 36 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagy。	135

Figure 37 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagosomes 形成，而加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 則阻止此現象發生。.....	136
Figure 38 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagy，而加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 則阻止此現象發生。 ...	137
Figure 39 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 活化之 caspases 會造成 autophagy 重要因子 Beclin-1 分解，而加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 則阻止此現象發生。 .....	138
Figure 40 光動力治療後一系列訊息傳遞之過程。 .....	139
Figure 41 結論示意圖。 .....	140
附圖一、光動力作用模式。 .....	141
附圖二、血紅素生成路徑(Adapted from [298])。 .....	142
附圖三、p38MAPK 參與調控的細胞反應(Adapted from[96])。 .....	143
參考文獻 .....	144

## 摘要



光動力治療(Photodynamic therapy, PDT)能藉由產生氧化壓力引發腫瘤毒殺效應，為極有潛力之癌症治療方式。但是近年研究發現，經過光動力治療後之腫瘤細胞可能會經由誘發促存活分子 cyclooxygenase-2 (COX-2)的表達，導致腫瘤復發。然而目前對於 COX-2 是如何在光動力治療後表現的相關機轉尚未明瞭，因此於本研究中，我們將深入探討光動力治療引發促存活分子 COX-2 轉錄的分子機轉，並藉此發展增進光動力治療之治療模式。本研究首先發現處以光感物質五氨基酮戊酸(ALA)或 chlorin e6 (Ce6)之光動力治療皆能活化 p38MAPK，並顯著提升人類黑色素瘤 A375 和老鼠大腸癌 C26 細胞中組蛋白乙醯化轉酶(histone acetyltransferase) p300HAT 的表現及活性，且能觀察到光動力治療後組蛋白乙醯化(Histone acetylation)顯著上升。以組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 anacardic acid (AA)或 p300HAT 之 shRNA 阻止 p300HAT 於光動力治療後上升，會大幅減低細胞核內組蛋白乙醯化程度，並抑制 COX-2 表現。使用染色質免疫沉澱(chromatin immunoprecipitation)分析，顯示光動力治療後會吸引更多 p300HAT 結合至 COX-2 的啟動子區域，加強組蛋白及轉錄因子 NF- $\kappa$ B 之乙醯化修飾，提升 COX-2 的轉錄，而類似的結果能經由處理過 PEGylated Liposome Ce6 (PL-Ce6)-PDT 之 A375 或 C26 小鼠腫瘤模式獲得證實。接著使用組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 anacardic acid (AA)處理 A375 和 C26 細胞，發現能有效提升光動力治療之細胞毒殺效果。進一步於植有 C26 腫瘤之 BALB/c 小鼠進行實驗，發現相較於只接受光動力治療，或光動力治療結合 COX-2 抑制劑組別，組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 AA 結合光動力治療能最為顯著抑制腫瘤生長。實驗更發現除了 COX-2 外，促存活分子 survivin 在光動力治療後，同樣也會受到活化的組蛋白乙醯化轉酶調控而加強其表現。最後證實結合組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 AA 與光動力治療之結合型治療能藉由抑制 survivin 表現，提升 caspase-3 活性，造成 Becline-1 裂解而阻礙光動力治療後之細胞自噬，同時加強細胞凋亡發生。綜合以上，顯示光動力治療能藉由

p38MAPK 路徑活化組蛋白乙醯化轉酶，而促使促存活分子表現，我們藉此發展組蛋白乙醯化轉酶抑制劑結合光動力治療之結合型治療模式，並證實在細胞和動物實驗中都能有效提升光動力之治療效益，希望對於將來臨床應用能提供新的治療方向。

關鍵字：光動力治療、組蛋白乙醯化、組蛋白乙醯化轉酶、COX-2、survivin

## Abstract



Oxidative stress induced by photodynamic therapy (PDT) mediates the tumoricidal effect, but has also been shown to induce the expression of pro-survival molecules, such as cyclooxygenase-2 (COX-2), which are involved in tumor recurrences after PDT. However, the molecular mechanism is still not fully understood. In this study, we found that PDT-induced p38MAPK activation could significantly up-regulate the activity and expression of histone acetyltransferase p300 (p300HAT) in A375 and C26 cells under ALA or chlorin e6 (Ce6) mediated photodynamic treatment. Colony-formation assay showed PDT-induced cytotoxicity was dramatically elevated in the presence of p300HAT inhibitor, anacardic acid (AA). Further studies showed that the increased p300HAT can transfer the acetyl group to histone H3 and NF- $\kappa$ B p65 subunit to up-regulate the COX-2 expression. The effect was reduced by the shRNA of AA or p300HAT. Using chromatin immunoprecipitation analysis, we found that the acetylation of histone H3 and NF- $\kappa$ B increases their binding to the COX-2 promoter region. These findings were further verified in the *in vivo* xenograft mouse model bearing murine C26 and human A375 tumors treated with PEGylated Liposome Ce6 (PL-Ce6) mediated PDT. Meanwhile, the combination of PDT and AA resulted in a greater tumor regression in BALB/c mice bearing C26 tumors, compared to those treated with PDT only or combined with COX-2 inhibitor. Finally, we demonstrated that suppression of the PDT-induced p300HAT activity also resulted in the decreased expression of survivin, restoring caspase-3 activity and sensitizing PDT-treated cells from autophagy to apoptosis due to the Becline-1 cleavage. This study demonstrates that the molecular mechanisms involved in histone

modification induced by PDT-mediated oxidative stress, suggesting that HAT inhibitors may provide a novel therapeutic approach for improving PDT response.



**Keywords :** Photodynamic therapy; Histone acetylation; Histone acetyltransferase;

COX-2; survivin

## 第一章 緒論



### 1.1 光動力治療

光動力治療(Photodynamic therapy, PDT)近年來廣泛應用於腫瘤治療[1-3]，主要由光感物質和光這兩種要素所組成。光動力治療的原理，是利用特定波長的光去激發光感物質，將光能量轉化產生單態氧和自由基，並藉由單態氧和自由基對細胞內核苷酸、蛋白質、脂質等物質造成氧化破壞，進而導致細胞死亡[4, 5]。早在 3000 多年前的古埃及、中國、印度等地區，就已經知道利用陽光可以用來治療一些疾病，像是經由陽光曝曬後，可以對於皮膚上牛皮癬(psoriasis)、軟骨病(rickets)、白斑病(vitiligo)達到治療之成效。直到十九世紀末時，這樣的照光治療才真正的被重視、發展開來，是由丹麥的生理學家 Niels Finsen 發現照射紅光可以治療天花(smallpox)，減緩天花痘瘡生包化膿的情況，以及以太陽光中的紫外光，治療皮膚尋常性狼瘡(lupus vulgaris)，也因為這兩項重大發現，Finsen 獲得了 1903 年的諾貝爾獎，自此之後以光為治療工具之療法被正式開啟[6]。

1900 年期間德國科學家 Oscar Raab 發現硃紅(acridine orange)染料對尾草履蟲(Paramecium caudatum)具有毒性，且經過強光照射後會增加硃紅對尾草履蟲的致死率，開始了以光來活化感應物質的概念，這也是歷史上經由科學證實光動力療法的首例。於 1903 年時，Herman Von Tappeiner 及 Jesionek 首先以伊紅(eosin)作為光感藥劑配合照光，運用在皮膚癌(skin cancer)之治療上，是第一個將 PDT 應用在臨床治療的例子。1910 年，Hausmann 發表血紫質(haematoporphyrin, Hp)引起的光動力損傷作用之文章。1924 年 Policard 發現 porphyrin 類的光敏感藥劑對於腫瘤部位，具有選擇性累積的情形。1960 年 Lipson 和 Baldes 發展出血紫質衍生物(haematoporphyrin derivative, HpD)，並嘗試使用於腫瘤治療上。1974 年 Dougherty 首先發表 HpD 在活體動物腫瘤之治療成果，發現注射入 HpD 並佐以

紅光的照射後，能有效消除移植的腫瘤，且對於周遭正常組織不造成傷害[7]。1975年，Kelly和Snell發表在HpD上PDT的詳盡臨床報告，他們將HpD-PDT用在治療膀胱癌(bladder cancer)上[8]。自此，光動力療法成為重要的癌症治療方式及在癌症醫學上研究重點。

### 1.1.1 光化學作用機制

光動力作用必須有三個必要條件存在：(1)光感物質；(2)特定波長的光線；(3)氧分子的存在，在這三個條件相互作用下，才能達到治療效果。其作用機制主要為當基態(ground state)的光感物質，吸收特定波長光源之光子，躍升為激發單態(excited singlet state)，歷時極短的過渡時間(life time：1-100 ns)，馬上又衰退回基態，此時也有可能形成兩個不成對電子軌域的激發三態(excited triplet state)，此種狀態具有較長之存在時間(life time： $\geq 500$  ns)，易與環境中其他分子產生碰撞，如此會出現兩種反應情況(附圖一)：

(1)Type I reaction：經過光激發後所生成的激發三態，會和周邊環境中的單態接收分子(singlet state acceptor molecular)碰撞，產生電子或質子的轉移，造成包含超氧陰離子(superoxide anion,  $O_2^-$ )、過氧化氫(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )及氫氧自由基(hydroxyl radical,  $OH^\cdot$ )等種類的自由基(free radical)形成[9]。

(2)Type II reaction：經過光激發後所生成的激發三態，會和周邊基態氧分子(ground state oxygen)碰撞，產生能量的轉移而生成單態氧(singlet oxygen)，單態氧於細胞中會容易與其中的核苷酸、蛋白質、脂質等物質作用，進而造成破壞，不過單態氧存在週期短(life time： $< 200$  ns)，移動擴散之距離也短(distribution distance  $< 45$  nm)，所以單態氧只能對其周遭相當近距離範圍內造成傷害[9]。

光動力作用對細胞所造成之毒殺成效，取決於光感物質與光源。不同種光感物質於細胞內分布位置及累積量都不盡相同，可能會累積在溶酶體(Lysosome)、

粒線體(Mitochondria)、高基氏體(Golgi apparatus)、內質網(Endoplasmic Reticulum)，也可能在細胞膜(Cell membrane)、細胞核(Nucleus)中，另外光源激發波長、光源強度及光照劑量等等因素，都會導致單態氧或自由基產率，而影響到整體光動力效果[10]。

### 1.1.2 光動力發展與應用

光動力作用對細胞所造成之毒殺成效，取決於光感物質與光源。不同種光感物質於細胞內分布位置及累積量都不盡相同。另外光源激發波長、光源強度及光照劑量等等因素，都會導致單態氧或自由基產率，而影響到整體光動力效果[11]。光動力治療主要產生兩種治療效果，分別是(1)直接殺死腫瘤細胞(2)破壞腫瘤組織周邊血管，造成腫瘤組織缺氧或血栓，間接導致腫瘤細胞死亡[12]。目前 PDT 在癌症臨床治療上，主要應用於口腔癌、食道癌、支氣管癌、肺癌、膀胱癌、皮膚癌、腦瘤和消化道、眼部、婦科之腫瘤，及各種腹腔內之惡性腫瘤[13-21]。此外 PDT 也被運用在非癌症之疾病治療上，像是類風濕性關節炎(Rheumatoid Arthritis)、心臟冠狀動脈阻塞(Coronary artery)、黃斑退化症(Macular degeneration)、乾癬症(Psoriasis)，還有一些皮膚疾病之治療應用[22-26]。目前已有多種光感藥物獲得美國食品與藥物管理局(food and drug administration, FDA)的批准，包括 Photofrin<sup>®</sup>、Visudyne<sup>®</sup>和五胺基酮戊酸(5-aminolaevulinic acid, ALA)等，其中 Photofrin<sup>®</sup>是第一個於 1990 年代通過用於治療癌症的光感物質，1993 年加拿大政府同意以它治療膀胱癌，美國分別在 1995 年通過得以用於治療食道癌、1998 年用於治療肺癌，以及 2003 年用於巴雷斯特食道症(Barrett's esophagus)之治療[14, 27]。美國 FDA 則是在 1999 年允許 Visudyne<sup>®</sup>用在老年性黃斑部病變(age related macular degeneration, AMD)治療[27]。ALA 於 1999 年被允許進行光化角質症(Actinic keratosis)治療，而 ALA 的衍生物 Hexaminolevulinate (*n*-hexyl ester of ALA, Hexvix<sup>®</sup>和 Cysview<sup>®</sup>)則能應用在膀胱癌的診斷[27, 28]。目前有越來越多國家已

將光動力治療作為新型癌症治療方式，並已獲政府審查批准，在許多醫院進行光動力治療療程，臨床應用日益廣泛。

近年光動力治療不論是在光感物質或光源開發上，都有相當大程度的進展，其中光感物質的發展朝向更具腫瘤親和性、低毒性、高自體清除或較長的吸收波長，以利增加對腫瘤穿透度。光感物質依其結構大致可以分為 porphyrins 及 chlorins 類，porphyrins 的結構具有一個 cyclic tetrapyrrole macrocycle，其內金屬複合物(metal complex)在生物氧化過程扮演重要角色，像是血紅素(heme)就是 porphyrin 與鐵離子螯合的化合物，目前各類 porphyrins 的研究與光動力治療發展上密切相關。臨床上使用廣泛的 porphyrin-based drug 為 photofrin<sup>®</sup> 吸收光譜最強在 400 nm，光穿透組織的能力低，且會造成表皮皮膚光敏感性，所以病人用藥後 4 到 6 週要避免曝露於陽光[29]。而 protoporphyrin IX (PpIX)是近年最常被利用的內生性光感物質，可用於光動力診斷及光動力治療[30]。chlorins 類結構近似於 porphyrin，其最強的吸收光譜在紅光區，使其呈現綠色狀，其優點除了能於腫瘤細胞內快速累積，當天即可進行照光治療，且其半衰期短，很快能從體內排除，光敏感等副作用不超過一週[31]。像 Chlorin e6 的吸收光波約在 667 nm [32]，benzoporphyrin derivative (BPD) 有光毒性短暫的特性 [33]，m-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC)又稱 Foscan<sup>®</sup>由於其激發波長較長，且三重態半衰期長，對腫瘤細胞又有很高的選擇性，相較於 photofrin<sup>®</sup> 有很強的細胞毒性[34]。

### 1.1.3 五胺基酮戊酸(5-Aminolevulinic Acid, ALA)光動力療法

五胺基酮戊酸(5-Aminolevulinic Acid, ALA)的化學結構，近似於五碳直鏈胺基酸，易溶於水及多數溶液。ALA 並非光感物質，而是光感物質的前驅物，必須經由細胞內血紅素生合成路徑(Heme biosynthesis pathway)代謝成為具 porphyrin 基本結構的 PpIX (附圖二)。血紅素生合成過程主要路徑於粒線體

(mitochondria)發生，部分在細胞質(cytosol)。體內自然生成的 ALA 是由 glycine 與 succinyl-CoA 縮合而成，此反應由粒線體內膜之  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase(ALA-S)催化，並調控 ALA 合成速率。ALA 合成後即被送往細胞質，兩分子 ALA 經 ALA dehydrase 縮合成 pyrrole ring 結構的 porphobilinogen(PBG)，再由 PpIX 合成的速率決定步驟酵素 PBG deaminase (PBGD)作用形成環狀結構的 uroporphyrinogen III。在經過一連串去碳作用(decarboxylation)及氧化作用(oxidation)形成 PpIX。最後 PpIX 藉由粒線體內膜上鐵離子螯合酶 ferrochelatase (FC)與  $Fe^{2+}$  結合，形成血紅素[35]。血紅素生合成過程具有負回饋抑制機轉(negative feedback)，終產物會抑制 ALA-S 活性，阻斷 ALA 合成，藉以調整體內血紅素濃度[36]。研究顯示投予過量外源性 ALA，於部分腫瘤有較高的 PpIX 累積量，可能原因為 ALA 為小分子胺基酸，可能藉由載體輸送提高 ALA 於腫瘤細胞的濃度，而增加 PpIX 累積量[35, 37, 38]。另外由部分腫瘤組織研究發現，腫瘤內血紅素合成路徑中 porphobilinogen deaminase (PBGD)酵素活性比正常組織高，而 ferrochelatase (FC)活性卻降低，且細胞內鐵離子較低，因此 ALA 生成 PpIX 被認為具有高度腫瘤選擇性[39, 40]。近年來，ALA 被廣泛運用於腫瘤的診斷與治療，包括基底細胞癌(basal cell carcinoma)[41]、鱗狀細胞癌(squamous cell carcinoma)[42]、波文式症(Bowen's disease)[43]、光化角質症(Actinic keratosis)[44, 45]，此外也能應用於治療皮膚疾病如:疣(warts)[46]、乾癬(psoriasis)[47]及皮膚 T 細胞淋巴瘤(cutaneous T cell lymphoma)[48]，皆有良好的治療成效。

#### 1.1.4 Chlorin e6(Ce6)及微脂體包埋光 Ce6 之光動力療法

Chlorins 類的化合物結構上近似於 Hematoporphyrin derivative (HpD)這類第一代的光感物質，其 porphyrin 環的一個外雙鍵(Exopyrrole double bond)被氫化，使得 Chlorins 類的化合物吸收波長紅位移(red shift)，在 650 nm 以上有一明顯吸收波峰 [31]。也因為 Chlorins 類吸收波長比 HpD 長，可以使用長波長、穿透力

高之光源進行激發，所以在腫瘤穿透效力上也來的更好，因此 Chlorins 類的光感藥物備受重視，也積極被運用在 PDT 相關研究上。此外相較於 HpD，Chlorins 類的化合物於皮膚上的累積量較低，比較沒有皮膚光敏性副作用產生，對於臨床使用上也較為方便[27]。Chlorin e6 (Ce6)是一由葉綠素 a (chlorophyll a)所得到之光感物質，當溶於乙醚時紅光波段的最大吸收波長為 667 nm，消光係數(extinction coefficient)  $\epsilon = 55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，為一極具潛力之光感物質[27]。

不過由於 Ce6 這類脂溶性的光感物質於水溶液環境中，會因為疏水性作用使其分子間容易相互聚集(aggregation)，造成光感物質在激發態的碰撞衰減(collisinal quenching)[49]，容易導致治療效果下降以及不良副作用產生[50]。而藉由微脂體等奈米載體包覆能降低脂溶性光感物質容易聚集之問題，為光動力治療開啟新的應用模式[51, 52]。

## 1.2 光動力致氧化效應

光動力治療利用特定波長的光激發光感物質，將光能量轉化產生單態氧和自由基等活性氧分子，對細胞內 DNA、蛋白質、脂質等物質造成氧化破壞，進而導致細胞死亡。因此細胞如何產生活性氧分子、活性氧分子下游的訊息調控，以及對細胞所造成的影響，是許多學者致力研究的重要課題。

### 1.2.1 活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS)

活性氧分子泛指以氧為中心的自由基(free radical)與其代謝產物，包括超氧陰離子(superoxide anion radical,  $\text{O}_2^-$ )、過氧化氫(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、氫氧自由基(hydroxyl radical,  $\text{OH}^\cdot$ )、單態氧(singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ )等[53]。此外一群自由基衍生物是由含碳或含氮自由基與氧分子反應而產生，包括：一氧化氮(NO)及 peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )等，稱之為活性氮分子(reactive nitrogen species, RNS)

[54-56]。活性氧分子或活性氮分子在正常生理上扮演訊息傳遞(signal transduction)的角色[57, 58]。不論是活性氧分子或是活性氮分子，都帶有不成對的電子，所以本身極不穩定，而這種特性造就了活性氧分子及活性氮分子很好的還原能力，容易造成其他的原子或分子失去電子，使其氧化。在生物體內，活性氧分子或活性氮分子搶奪電子的對象可能是脂質(lipids)、蛋白質(proteins)或核酸(nucleic acids)。因此活性氧分子或活性氮分子在生物體內的含量過多，將可能會破壞細胞裡的脂質、蛋白質或核酸，使細胞受到損傷，甚至死亡。

活性氧分子可和體內許多重要分子如核酸、蛋白質、或生物膜上之多元不飽和脂肪酸反應，導致生物體氧化性傷害，當多元不飽和脂肪酸受到自由基攻擊後會形成脂質自由基，而氧與這些自由基反應而形成過氧化自由基與過氧化氫，這些化合物會繼續進行連鎖反應而導致細胞膜的損壞，進而改變其結構功能及通透性[59, 60]。蛋白質在氧化狀態下，其胺基酸殘基會受到多種的氧化修飾[61]，如蛋白質羰基(carbonyls)的形成，許多活性氧也可以氧化蛋白質上的-SH 基，使許多重要的酵素失活。由於蛋白質上經常會結合過渡金屬離子，因此過氧化氫會在蛋白質的特定位置上形成氫氧自由基，使蛋白質成為攻擊目標[62]。另外在細胞內，DNA 亦是自由基攻擊的一個重要目標[63]。氫氧自由基攻擊 DNA 時會造成多種化學性的改變，進而造成 DNA 鹼基之修飾、交叉聯結(cross-linking)、改變 DNA 鹼基與蛋白質結合以及 DNA 斷裂等[64]。

### 1.2.2 活性氧分子對訊息分子之調控

訊息傳遞(signal transduction)是指細胞膜外的刺激，經過一系列的生化反應之後，活化了細胞內部的訊息，進而使細胞產生一些反應。這些刺激可能是光線、抗原、細胞表面的醣蛋白、生長因子、荷爾蒙、神經傳導物或一些化學物質等。訊息傳遞在生物體中各項生理作用中扮演著相當重要的角色，細胞內幾乎所有的

生理功能得以正常運作，皆是因為細胞內外的調控信號，藉由不同的訊息傳遞路徑，將訊息傳導到各個目標分子，以協調、控制各個分子的活性與運作。

許多文獻指出，活性氧分子調控許多胞內訊息傳遞分子，包括蛋白激酶 (protein kinase)、去磷酸酶(phosphatase)、脂質、鈣離子及轉錄因子(transcription factor)等[65]。在活性氧分子中的過氧化氫具有高度進出的膜通透性，能自由地進出細胞膜，目前已知過氧化氫能藉由調控磷酸化的作用，活化細胞內的蛋白激酶的活性。例如表皮生長因子(epidermal growth factor, EGF)與其受體結合後，會經由產生過氧化氫活化細胞內的 tyrosine phosphorylation 與 phospholipase C[66]。另外，活性氧分子具有調控轉錄因子的能力，如 AP-1 (activator protein-1)、NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)、USF (upstream stimulatory factor)、Egr-1 (early growth response 1)、c-Myb、p53 和 Ets (E26 transformation-specific ) [67, 68]。細胞質中的轉錄因子活化後，會進入細胞核中與特定基因上游調控區結合，啟動該基因的表現，可能與發炎、免疫反應、細胞分化、生長調控及發育有關[68]。一般而言，當細胞處於較低濃度的活性氧分子狀態時，細胞傾向進行細胞分裂或是細胞分化，當處於較高濃度活性氧分子時，細胞會脫離細胞生長的循環，進入生長休止(growth arrest)，而更高濃度活性氧分子，則會誘發細胞凋亡[68]，而活性氧分子也會活化存在細胞質中的 Serine/Threonine kinase，如：mitogen-activated protein kinases (MAPKs)和 protein kinases C (PKC)等來調節細胞生理活性[68, 69]。

### 1.2.3 MAPK (Mitogen-activated protein kinases)

過去文獻報導，光動力治療後會透過氧化壓力(oxidative stress)，引發包含 ERK、JNK 與 p38MAPK 等 MAPKs (mitogen-activated protein kinase) 訊息傳遞路徑，調控許多生理反應[70]。MAPKs 屬 serine/threonine kinase 的蛋白質，在演化上具高度保守性，MAPK cascade 有三級 kinase，第一級是 MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)，包括有 Raf、TAK1 與 ASK1，第二級是 MAP kinase kinase

(MAPKK)，包括有 MEK1/2、MEK4/7 與 MKK3/6 等，第三級是 MAPK，包括有 ERK (extracellular-signal-regulated kinase)、JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase)與 p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases) [71]。

當 MAPKKK 受到結合在細胞膜上的生長因子(growth factor)、細胞激素(cytokine)、氧化壓力等外來刺激活化時，會磷酸化 MAPKK 上的 serine/threonine，進而活化 MAPK。同一個 MAPKK 可被多個 MAPKKK 所活化，如此不僅提高 MAPK pathway 的複雜性與變異性，同時藉由各種 MAPK pathway 的連結與整合，進而對不同種的訊息產生多樣的生物反應。MAPK 受到外在刺激時會引發某個訊息路徑的活化，經由磷酸化分子中的 serine、threonine 或 tyrosine 進而活化下游的轉錄因子，細胞中三個重要的 MAPK 包含 ERK、JNK 與 p38MAPK。

### 1.2.3.1 ERK (extracellular-signal-regulated kinase)

ERK 存在兩種異構體(isoform)，分別為 ERK1 (分子量為 44 kDa)及 ERK2 (分子量為 42 kDa)，其活化是由 Raf (Raf-1, B-Raf 和 A-Raf)磷酸化 MEK (MEK1 和 MEK2)，活化的 MEK 再將 ERK 磷酸化的結果。ERK 訊息路徑可由多種胞外訊息所調控，包含生長因子或 mitogen 等。ERK 可經由活化轉錄因子如 Elk-1、c-Fos、c-Myc 等或 PLA2 (Phospholipase A2)、NF (neurofilament)、MAPKAPK-2 與 tyrosine hydroxylase 等，調控細胞生長(cell growth)、增生(proliferation)、分化(differentiation)與凋亡等作用[72]。除了上述影響外，研究指出 ERK 路徑在腫瘤血管新生、移動、入侵和轉移過程中扮演重要角色。過去文獻指出，光動力治療後會快速地活化 ERK，且可能與細胞保護作用有關。2002 年，Tong 等人發現在 Photofrin-PDT 後 3 小時內，就會透過 MEK kinase 將 ERK 磷酸化，而使用 ERK 抑制劑 PD98059 結合 Photofrin-PDT，則會大幅增加細胞毒殺效果[73]，因此 ERK 的活化可能具


有保護細胞，抵抗光動力治療的功能。而當光動力治療造成嚴重的氧化破壞時，則發現會抑制細胞中 ERK1/2 的磷酸化[74]。



### 1.2.3.2 JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase)

當細胞受到細胞激素、UV 照射或生長激素缺乏等刺激時，JNK 會大量被活化[75]。JNK 家族有三種異構體：JNK1 (分子量為 46 kDa)、JNK2 (分子量為 55 kDa) 與 JNK3 (分子量為 57 kDa)。JNK1 與 JNK2 能在各處表現，而 JNK3 則特定於腦、心臟及睪丸表現 [72]。JNK 的活化需要 MEK4 和 MEK7 對 tyrosine 和 threonine 進行雙磷酸化修飾，而 MEK4 和 MEK7 則是會經由數種 MAPKKs 包含 MEKK1-4、MLL2、MLL3、YTpl-2、DLK、TAO1、TAO2、TAK1、ASK1 以及 ASK2 等磷酸化修飾而活化。JNK 主要的受質為轉錄因子 c-Jun，c-Jun 被 JNK 磷酸化後會增進 AP-1 的轉錄活性[76]。JNK 也能磷酸化其他轉錄因子，包括 ATF-2、NF-ATc1、HSF-1 和 STAT3[77]。目前，JNK 路徑的活化被認為與調控細胞週期、細胞增生、細胞分化、細胞凋亡等多種生理和病理過程有關，研究指出 JNK 活化與 c-Jun 的磷酸化在 Ras 誘導腫瘤發生(tumorigenesis)中扮演重要角色[78, 79]。而研究發現，JNK 能在光動力治療後快速的被活化[80]，其活化在部分文獻被認為是會促進細胞死亡，如：Rose Bengal-PDT 會引起 JNK 磷酸化，並伴隨 caspases 活化與 apoptosis 發生[81]。然而於 hypericin-PDT 處理下卻有不同的結果，研究顯示 JNK1 的活化會保護 HeLa 細胞，免於 PDT 的氧化傷害[80]。顯示光動力治療後誘發之 JNK 活化，可能會因為細胞種類、光感物質等因素影響，而導致細胞反應有所差異，至於決定差異的關鍵分子為何，目前還尚未釐清，有待更多研究深入探討。

### 1.2.3.3 p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases)




p38MAPK 是一個重要的訊息分子，會反應外在環境的壓力刺激而引發一連串反應，且被認為與細胞存亡有密切關係。p38MAPK 的分子量約為 38 kDa，具有四種異構體: p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、p38 $\gamma$ 與 p38 $\delta$  (或被稱做 SAPK2a、SAPK2b、SAPK3 和 SAPK4)，都具有高度保守的 Thr-Gly-Tyr (TGY)磷酸化 motif[82]。這個 motif 會被 MEK3 和 MEK6 磷酸化，而 MEK3 和 MEK6 則會被多種經由物理或化學壓力如氧化壓力、缺氧(hypoxia)、細胞激素、X-ray 或 UV 照射誘發之 MAPKKs 活化。除了對於刺激反應外，目前已知 p38MAPK 路徑會參與在細胞凋亡、細胞週期、細胞生長及分化等生理機轉調控中(附圖三)，常應用於癌症治療上藥物設計的對象。

於細胞分化的調控上，發現以 dominant-negative p38 $\alpha$ 或 p38MAPK 抑制劑 SB203580 處理，會妨礙 3T3-L1 脂肪細胞分化[83]。相對地，若是表現 mutant 的 p38MAPK activator MEK6，使其持續活化，則會誘導脂肪細胞分化[84]。而研究發現 p38MAPK 路徑的活化，是促使 C2C12 myoblasts 分化成 myotubes (myogenic differentiation)的重要關鍵，使用 p38MAPK 抑制劑 SB203580 將會影響 myoblasts 的延長與排列，妨礙 myoblasts 形成 myotubes[85-87]。另外，神經細胞的分化也受到 p38MAPK 調控，p38MAPK 抑制劑 SB203580 的處理或表現 p38MAPK mutant，會導致 nerve growth factor (NGF)誘導老鼠嗜鉻細胞瘤 PC12 之 neurite outgrowth 受到抑制[88, 89]。而根據不同的細胞類型與刺激，p38MAPK 對於細胞增生的有 positive 和 negative 兩種不同角色，p38MAPK 於 FGF-2 刺激小鼠胚胎成纖維細胞 Swiss 3T3 增生上有著促進的功能[90]。然而在 CCL39 與 NIH 3T3 纖維母細胞上 p38MAPK 會透過阻止細胞週期進行，而抑制其細胞增生 [91, 92]。除了在細胞增生上角色多元外，p38MAPK 被報導在細胞存活調控上，也具有 positive 和 negative 兩面功能。研究顯示，p38MAPK 不同 isoforms 活化，

是決定促進死亡或促進存活的關鍵，其中當 p38 $\alpha$  受刺激而活化，被認為會促進細胞死亡，而 p38 $\beta$  的活化則會啟動細胞存活訊息，阻止細胞進行凋亡[93-96]。另外，有研究發現 p38MAPK 對於腫瘤細胞移動或入侵能力之影響，Junttila 等人的實驗顯示，使用 dominant-negative p38 $\alpha$  與 p38 $\delta$ 除了抑制鱗狀細胞癌 squamous cell carcinoma (SCC)細胞增生與存活外，也會減少 MMP-13 和 MMP-1 表現，認為 p38 $\alpha$  與 p38 $\delta$ 可能會參與腫瘤細胞入侵能力之調控[97]。近年探究光動力氧化效應與 p38MAPK 之間的關係，發現使用各種光感物質引發的光動力作用，都會在短時間內大量地活化 p38MAPK，然而活化不同的 p38 isoform，會對細胞產生不一樣的影響。如：hypericin-PDT 引發的 p38 $\alpha$  活化，被發現會調控細胞移動能力[98]。而抑制光動力作用後 p38 $\beta$  的活化，則會顯著加強光動力作用引起的細胞凋亡，意味 p38 $\beta$  於光動力氧化效應後活化，可能扮演促進細胞存活的角色[99]。目前的研究顯示，不同的光感物質、不同照光條件，及所治療的腫瘤細胞類型，可能都是決定光動力治療後，將活化何種 p38 isoform 的關鍵因素，因而影響細胞走向不同的生理反應。

#### 1.2.4 NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B 為調控細胞轉錄重要的轉錄因子之一，由五個次單元組成，分別為 p50、p52、p65 (RelA)、RelB 以及 Rel (c-Rel)，通常以同二聚體(homodimers)或異二聚體(heterodimers)形式存在於細胞質中[100, 101]。這五種蛋白質的氨基酸序列組成有 45% 以上的相似度，而其立體結構也大致相近。每個次單元皆具有一段氨基酸序列，稱為 Rel homology region (RHR)，可以與 DNA 鍵結或形成二聚體的結合區域[102]。其中 p65、Rel B 及 Rel 具有一段活化區域 (activation domains)，具促進基因活化表現的功能，而 p50 與 p52 則無此區域。p50 與 p52 的同二聚體與 p50/p52 異二聚體的作用被認為是 transcriptional repressor[103]。



目前可歸納出幾種能活化 NF- $\kappa$ B 的因子，包括氧化壓力(ROS)、放射線(Radiation)、脂多醣類(lipopolysaccharide, LPS)、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF $\alpha$ )、介白素(Interleukin, IL)等，它們能抑制 I $\kappa$ B，進而活化 NF- $\kappa$ B，使其進入細胞核中作用[104]。正常情況下，抑制 NF- $\kappa$ B 功能的負調控蛋白(I $\kappa$ B)經由與細胞質內的 NF- $\kappa$ B 結合而抑制其活性，當受到外來刺激時，會活化 NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK)，NIK 會進一步活化 I $\kappa$ B kinase (IKK)。而 IKK 磷酸化 I $\kappa$ B，造成 I $\kappa$ B 快速地泛素化(ubiquitination)，能被蛋白質水解酵素分解，失去 I $\kappa$ B 的抑制後，NF- $\kappa$ B 將可進入到細胞核內，展開轉錄因子活性[105]。研究顯示，I $\kappa$ B 的磷酸化可能還有 protein kinase C (PKC)、PKA、Raf-1 或 MAPKs 等路徑參與調節[105]。而活性氧分子可以藉由影響 I $\kappa$ B 的磷酸化，進而活化 NF- $\kappa$ B[106]。近年來學者更發現其他有別於經由 I $\kappa$ B 降解的途徑能活化 NF- $\kappa$ B，研究證實 PI3K/AKT、PKA、p38MAPK 或 casein kinase II 等蛋白質激酶能引發 NF- $\kappa$ B 次單元 p65 磷酸化，p65 上具有主要決定 NF- $\kappa$ B transactivating domain 的序列，當 p65 被磷酸化後會增加 NF- $\kappa$ B 與 DNA 結合能力[107]。除了磷酸化修飾外，實驗更發現 NF- $\kappa$ B 能受到乙醯化轉酶(histone acetyltransferases, HATs)影響而被修飾，特別是在 lysine 310 位置的乙醯化修飾，被證明能提升 NF- $\kappa$ B 的轉錄活性[108, 109]。

NF- $\kappa$ B 被認為能調控發炎相關基因表現，而參與在發炎反應中[110]。除了與發炎反應之關係外，NF- $\kappa$ B 的活化作用與癌症生成過程亦有關，其中包括調控細胞凋亡(apoptosis)、細胞週期(cell cycle)、分化以及移動(cell migration)等[111]。其中 NF- $\kappa$ B 能抑制細胞凋亡，可能是因為 NF- $\kappa$ B 活化後，能促進 cIAPs (caspase inhibitors of apoptosis proteins)、xIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)、BCLx (B cell lymphoma x)以及 BCL2 (B cell lymphoma 2)表現，而抑制細胞凋亡因子 caspase-3、-6、-7 和 -9 的活化作用[111]。由於光動力氧化效應會引發細胞凋亡及發炎反應，影響腫瘤生長，因此 NF- $\kappa$ B 在光動力治療領域中，一直是被致力探討的重要因

子之一。目前已知，許多種光感物質引起的光動力效應，會引發 I $\kappa$ B 降解，促使 NF- $\kappa$ B 由細胞質轉移至細胞核內進行作用[112-115]。此外研究更發現光動力治療後，NF- $\kappa$ B 結合至 DNA 的能力會有所增加[112]。過去有些研究發現光動力治療 NF- $\kappa$ B 的活化，時常伴隨著細胞凋亡發生，因此推論 NF- $\kappa$ B 可能在光動力氧化效應中，扮演促進 apoptosis 的角色[115, 116]。然而近年有越來越多文獻指出不一樣的看法，認為 NF- $\kappa$ B 於光動力治療後的活化，會促進發炎因子表現，而使用 NF- $\kappa$ B 抑制劑能加強光動力治療引發的細胞死亡，所以具有 anti-apoptosis 功能[114]。

### 1.3 氧化壓力造成的細胞死亡

氧化壓力可能造成細胞內訊息傳遞混亂、細胞膜的損害、細胞離子溝通損傷、引發細胞膜脂質過氧化，對細胞內蛋白質、DNA 等皆會產生影響，甚至引發細胞走向死亡。而光動力治療所產生的氧化效應，會造成細胞凋亡(Apoptosis)、細胞壞死(Necrosis)或細胞自噬(Autophagy)等細胞死亡發生[117]。

#### 1.3.1 細胞凋亡(Apoptosis)

細胞凋亡為一種生理性細胞死亡，是透過連串且詳盡的蛋白質訊息傳遞過程所調控，經由程序性死亡的方式[118]。細胞凋亡發生時，細胞型態會發生變化，細胞內層外翻出磷脂絲胺酸(Phosphatidylserine, PS)，導致原有對稱性消失，使細胞膜呈現皺摺狀態，染色質會有濃縮(Chromatin condensation)現象，細胞核崩解，DNA 會被降解成小片段，胞膜會將各種胞器和染色質碎片包圍形成細胞凋亡小體(Apoptotic bodies)，而被吞噬細胞吞噬清除，由於細胞凋亡內容物均在吞噬細胞內分解，因此不會引發免疫反應[119, 120]。執行凋亡過程的為一組蛋白質水解酵素(Protease)，稱為 Caspases (cysteiny l aspartate-specific protease)，目前已有多種 caspases 被確認參與在細胞凋亡過程[121]。它們最初被製造出來為無活性

之前驅物(inert zymogen)形式存在於細胞中，前驅物包含三個 domain，分別為 N-terminal prodomain、p20 domain 及 p10 domain，前驅酶必須被截切在特定 aspartate 位置上，產生兩個次單元(p20 subunit 及 p10 subunit)並組合成 heterodimer，且兩個 heterodimer 組合成 tetramer 後才具有活性[122]。細胞受到不同刺激可能會刺激不同 caspases 執行細胞凋亡作用，活化後的 caspases 可以活化同種 caspases，也能與不同種 caspases 間彼此作用而互相活化，將訊息放大再往下傳遞給其他的 apoptotic signal。一般而言，caspases 在細胞凋亡過程可大致分為兩類功能：第一類是細胞凋亡的啟動者(initiator caspases)如: caspases-2、caspases-8、caspases-9 和 caspases-10，第二類是凋亡的執行者(effector caspases)如: caspases-3、caspases-6、caspases-7 等[123]。最後執行凋亡的 caspases 被活化後，便開始截切其他的蛋白質，而這些能被辨認截切的蛋白質又稱為死亡受質(death substrate)，包含 gelsolin、lamin、fodrin 等結構蛋白，PAK2、PLA2、Akt-1 等訊息蛋白以及 DNA 修復酶 PARP 等[124]，受到 caspases 截切後，進一步引發細胞凋亡生化特性及型態變化。

細胞凋亡可分為幾種路徑，其中包括細胞內生性及外生性路徑。內生性路徑又因為粒線體在其中扮演相當重要的角色，被稱為粒線體路徑(mitochondria pathway)。研究顯示 Bcl-2 家族在內生性路徑中有重要的功能，可以分為兩類，一類是抗凋亡蛋白質(anti-apoptotic protein)，主要有 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-W、Mcl-1、CED9 等，另一類是促細胞死亡蛋白質(pro-apoptotic protein)，主要包括 Bax、Bak、Bcl-XS、Bad、Bik、Bid 等。Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1 等是細胞死亡的負調節因子，在許多類型的細胞受到外界刺激時，能保護細胞免於細胞凋亡[125]。Bcl-2 蛋白家族中 Bcl-2 與 Bcl-xL 大部分位於粒線體外膜上，而 Bax、Bad、Bim、Bid 等不是固定在粒線體膜上，而是在細胞質與粒線體間移動，它們在細胞質時屬於不活化狀態[125]。當細胞狀態正常時，粒線體膜外的 Bcl-2 蛋白與凋亡蛋白酶活化因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)結合而抑制 Apaf-1 活性，當細胞壓力過大、DNA 損傷或異常訊息傳遞時，如氧化性破壞，Bcl-2 蛋白家族成員(包

含 pro-apoptotic 與 anti-apoptotic 的 Bcl-2 蛋白質)會移轉到粒線體膜上,致使粒線體外膜穿孔,使粒線體間質釋放出細胞素 c (cytochrome c)和凋亡誘導因子 (apoptosis-inducing factor, AIF)等促進細胞凋亡物質至胞質。此時 Apaf-1 會與 cytochrome c 結合而活化,將 procaspases-9 活化成 caspases-9,三者形成 apoptosome,再活化下游 caspases 如: caspases-3、caspases-6、caspases-7 等,而引發細胞凋亡[118]。外部路徑則是經由死亡配體(death ligand)活化死亡接受體 (death receptor)如: FasL 與 Fas-CD95 或 TNF 與 TNFR 結合,使細胞內訊息分子能結合至 death domain 上,聚集形成 DISC (Death-inducing signaling complex),DISC 中之 procaspase-8 會自我切割成有活性的 caspase-8,活化後的 caspase-8 會繼續活化下游 caspases,啟動 cascade of caspases[118, 126]。

光動力作用後會藉由氧化壓力造成腫瘤細胞死亡,其中被發現多種 pro-apoptotic 或 anti-apoptotic 蛋白質受到調控,而導致細胞走向細胞凋亡。如:促細胞死亡蛋白質 Bax、Bad 或 Bak 被發現於 Lutetium texaphyrin-PDT、Hypericin-PDT 及 ALA-PDT 處理下,有顯著上升的現象[127-130]。anti-apoptotic 蛋白質像是 Bcl-2,則被觀察到在部分光動力作用後,表現量會有所下降[129]。此外在 Pc4-PDT 或 hypericin-PDT 後也能檢測到 cytochrome c 的釋放[131, 132],顯示光動力氧化效應會透過調節細胞凋亡相關因子,啟動細胞凋亡機制,而導致細胞死亡。雖然如此,還是有許多文獻發現,光動力治療後有機會誘發抗凋亡蛋白質表現,而阻礙了細胞凋亡進行。像是 NBA-PDT、Photofrin-PDT 或 AIPcS4-PDT 處理後,Bcl-2 會大量增加,並觀察到熱休克蛋白 HSP27 表現量大幅上升,以及 Bax 蛋白質表現量下降的現象[133]。實驗更證實,過量表現 anti-apoptotic 蛋白質 Bcl-2,會抑制光動力治療之細胞毒殺效果[134]。而本實驗室檢測經 LD<sub>50</sub> 之 ALA-PDT 或 Ce6-PDT 治療 A375 細胞,則發現 Bcl-2 mRNA 有上升之現象(data not shown)。顯示光動力治療可能會因為治療條件、腫瘤模式,甚至氧化破壞強度的差異,影響最終對於細胞的效應。



### 1.3.2 細胞壞死(Necrosis)

細胞壞死以往被認為是細胞受到物理或化學壓力時造成的結果，如缺氧、溫度改變、滲透壓改變、pH 值改變等。近年發現許多刺激也會引發細胞壞死，如 TNF、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理等[135]。細胞壞死可區分為幾種類型包含 oncosis、pyroptosis、necrapoptosis 及 necroptosis。其中 pyroptosis、necrapoptosis 及 necroptosis 為特殊的細胞壞死現象，一般所指細胞壞死主要為 Oncosis。細胞壞死的主要特徵有細胞膜失去選擇性通透功能、粒線體膨脹、細胞膜破裂、細胞內能量被消耗與細胞質空泡化，而細胞質從破裂的細胞膜外漏會引發細胞發炎反應。Oncosis 定義為細胞膨脹、胞器膨脹與細胞膜通透性增加，可能形成原因為毒物干擾 ATP 合成、細胞內能量被大量消耗，最後細胞膜上離子通道失去功能所引起[136]。Pyroptosis 定義為細胞被沙門氏桿(*Salmonella*)菌與志賀氏菌(*Shigella*)感染引起的發炎前反應(proinflammation)，最後會導致細胞膜破裂並釋放出促發炎(inflammatory)的細胞激素(cytokine)[137]。Necrapoptosis 是在 1999 年 Lemasters 等人提出，假設細胞死亡開始時是經由共同路徑，最後才由其他因子決定死亡形式為細胞凋亡抑或細胞壞死。例如：細胞內 ATP 濃度很低，會經由細胞壞死死亡，而細胞內 ATP 濃度很高或維持平衡時，細胞是走向細胞凋亡路徑死亡[138]。而 necroptosis 定義是在細胞被誘導產生細胞凋亡時，細胞凋亡機制被阻斷後，細胞改走向細胞壞死，例如：當死亡配體與死亡接受體結合後，細胞凋亡機制被 caspases 抑制劑阻斷，caspases-8 抑或 FADD (Fas-associated death domain)發生突變，導致細胞走向非細胞凋亡的細胞死亡。Necroptosis 型態的特徵有胞器膨脹、粒線體快速失去功能、細胞膜通透性增加，因此被歸類細胞壞死的一種[139]。事實上，光動力氧化效應後時常能同時觀察到 apoptosis 與 necrosis 發生，而主導細胞死亡模式的關鍵因素，被認為與細胞類型、apoptosis machinery 是否完整、光感物質累積位置及氧化破壞程度有關。Nagata 等人曾檢測過給予高劑量光感物質 ATX-S10(Na)，或高照光劑量(約造成 99% cytotoxicity)發現容易引發 necrosis，而 LD<sub>70</sub> 以下之


ATX-S10(Na) -PDT 處理，則是啟動 apoptosis 死亡模式[140]。因此不同光感物質引發之光動力氧化效應，作用於不同類型之腫瘤模式，可能會導致不甚相同的死亡路徑和模式，致使細胞死亡。



### 1.3.3 細胞自噬(Autophagy)

細胞自噬為有核生物在演化上重要且高度保留的機制，是一種依靠細胞的溶酶體(lysosome)來分解細胞內蛋白質或胞器的途徑，主要的功能是調節蛋白質或胞器的代謝[141]。目前至少發現四種形式的細胞自噬，第一種為巨細胞自噬(macroautophagy)，也是一般所稱的細胞自噬，其特徵是細胞內會合成具有雙層膜構造的小體，包裹需要代謝之蛋白質或胞器，稱之細胞自噬體(autophagosome)，最後 autophagosome 會與 lysosome 融合形成細胞自噬溶解體(autolysosome)，利用其中的酵素將蛋白質或胞器分解成小分子[142]。第二種為微細胞自噬(microautophagy)，由 lysosome 利用胞器上的膜將細胞質內的物質直接包入，於 lysosome 分解的過程[143]。第三種為 chaperone 主導的細胞自噬(chaperone-mediated autophagy)，位於 lysosome 上的 chaperone 將摺疊不完全的蛋白質直接送入 lysosome 分解的過程[144]。第四種小片似細胞自噬(piecemeal autophagy)，將部分細胞核送入 lysosome 中分解的過程，此現象目前只有於酵母菌中發現[145]。


當細胞自噬發生時，細胞內會先形成 autophagosome，此過程由一群稱為 ATG (autophagy-related protein)的自噬基因所調控[146]，第一個酵母自噬基因於 1997 年被日本科學家 Yoshinori Ohsumi 等人發現，命名為 Atg1[147]。第一個哺乳動物自噬基因則是於 1999 年被美國科學家 Beth Levine 等人發現，命名為 Beclin 1[148]，目前已有許多 ATG 基因被找到。當細胞處於飢餓時，細胞內 AKT/PKB (protein kinase B)先被去磷酸化，而會抑制 mTOR (mammalian target of rapamycin)的活性，mTOR 受到抑制便無法對 ATG 基因 Atg13 進行磷酸化修飾，使 Atg13



與其他 ATG 基因 Atg1、Atg17 形成複合物，啟動雙層膜合成。接下來活化態的 PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)、Vps34、Beclin-1 (Atg6)、UVRAG (UV radiation resistance-associated gene protein)、Bif-1 (BAX-interacting factor-1)及 Vps15 形成複合物，並結合在小片段的雙層膜上進行 vesicle nucleation，接下來延長雙層膜並形成完整 autophagosome 則需要 Atg5-Atg12 的接合系統幫忙，首先在 Atg7 與 Atg10 的協助下，將 Atg12 接到 Atg5 上形成 Atg5-Atg12 的複合蛋白。另一套系統則是將 PE (phosphatidylethanolamine)接到 LC3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3)/Atg8 上，過程由 Atg4 與 Atg7 執行。LC3 一般為 LC3-I 形式，接上 PE 會轉換成為 LC3-II。之後 Atg5-Atg12 複合蛋白與脂化的 LC3-II 則會將剩餘的雙層膜延長形成 autophagosome，在 autophagosome 與 lysosome 融合前，Atg5-Atg12 複合蛋白會從 autophagosome 上分離，最後 autophagosome 與 lysosome 形成 autolysosome[149]。

過去的研究認為細胞自噬是細胞用來抵抗不適當環境，尋求生存的方法。不過越來越多證據顯示，當細胞過度誘發細胞自噬時，反而會促進細胞死亡，稱作細胞自噬死亡 (autophagic cell death) 或第二型的細胞程序性死亡 (type II programmed cell death)[150]。相對於細胞凋亡，細胞自噬所造成的細胞死亡沒有染色體濃縮、細胞核 DNA 片段化，通常也無 caspases 活化現象。以細胞自噬死亡的細胞可以觀察到細胞質中有大量 autophagosomes 存在，並包裹許多細胞內的蛋白質及胞器，或以 LC3-GFP 複合蛋白或 LC3 抗體染色，可觀察到 LC3 蛋白在細胞質中的分布由均勻轉變為小亮點 (punctate staining)。

2006 年，Buytaert 等人首次證實光動力治療後會誘發細胞自噬發生，他們以 hypericin-PDT 處理 Bak/Bax double-knockout 細胞株 (細胞凋亡缺陷細胞株)，發現會誘發 LC3-I 轉換為 LC3-II 等細胞自噬現象，若以 autophagy 抑制劑共同處理，則會減少光動力治療導致之細胞死亡[151]。爾後，陸續證實不同光感物質引發



的光動力作用，能偵測到細胞自噬發生，然而對於光動力治療引發細胞自噬的目的，目前還有許多爭論。除了先前所提到，細胞自噬可能扮演非細胞凋亡的另一種死亡模式外，也有其它證據顯示光動力治療後的細胞自噬現象，可能是幫助細胞抵抗光動力氧化壓力的過程。如：Kessel 等人於 2007 年發表的文獻指出，若抑制 Atg7 於低劑量光動力治療後表現，將會增加光毒殺效應[152]，顯示不同程度的光動力氧化效應下，細胞自噬的活化可能存在不同功能。而本實驗室則是以 ALA-PDT 處理老鼠嗜鉻細胞瘤 PC12 細胞及肺腺癌 CL1-0 細胞，首次證實光動力氧化效應會透過活化 AMPK 訊息路徑，引發細胞自噬，導致細胞死亡，更解釋光動力治療後 AMPK 活化在 autophagy 形成的重要性[153]。

### 1.3.4 細胞死亡間的交互作用

近年許多證據指出，細胞凋亡與細胞自噬間是互相調控的，在細胞凋亡機制被抑制時，細胞就容易走向細胞自噬性死亡；反之，在細胞自噬受到壓抑時，細胞凋亡現象更趨明顯。許多分子被發現同時參與細胞凋亡與細胞自噬過程，例如活性氧分子、ceramide、p53、Bcl-2、Bcl-xL、BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3)、DAPK (Death-associated protein kinase)或 p19ARF/p14ARF 等[154]。細胞自噬能藉由清除蛋白質聚集(protein aggregation)和錯誤折疊蛋白(Misfolding protein)，而維護內質網(Endoplasmic reticulum, ER)功能，阻止內質網壓力(ER stress)誘發的細胞凋亡[155]。在細胞能量缺乏時，細胞自噬還能經由分解回收胞器和蛋白質等大分子，為細胞提供能量和營養，延長細胞壽命。因而在成年小鼠的饑餓期、乳鼠出生後的餵養適應期，甚至營養不足的細胞中，均顯示出細胞自噬為細胞存活所必需[156]。當細胞遭進行藥物處理和放射性刺激時，細胞自噬也是維護基因完整性的重要機制。因此，在乳腺癌、前列腺癌及結腸癌細胞中抑制細胞自噬，能夠提高腫瘤細胞對放射線及化療的敏感性[157]。粒線體在細胞凋亡與細胞自噬，這兩種死亡機制中扮演重要角色，當粒線體老化


或受到損壞導致膜電位  $\Delta\psi_m$  發生改變時，被發現會由 autophagosomes 來清除這些粒線體，預防細胞受到傷害，此反應又稱為粒線體自噬(mitophagy)，它能通過清除去極化粒線體來減少活性氧分子產生，達到保護細胞的目的[158]。粒線體自噬甚至可藉由減少線粒体外膜通透性(mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)和減少 cytochrome c 等粒線體促凋亡蛋白的釋放，抑制細胞凋亡發生[159]。近年研究更發現，細胞自噬重要蛋白質 Beclin 1 可能會經由促進抗細胞凋亡蛋白質 survivin 表現量增加，來抑制 caspases 活性，藉此阻止細胞凋亡進行[160]。

## 1.4 抗細胞凋亡家族

人類抗細胞凋亡蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP 或 BIR-containing proteins, BIRCs)家族包含 BIRC1 (NAIP)、BIRC2 (cIAP1)、BIRC3 (cIAP2)、BIRC4 (xIAP)、BIRC5 (survivin)、BIRC6 (apollon)、BIRC7 (ML-IAP)和 BIRC8 (ILP2)等成員。IAPs 含有至少一個特殊的作用區域 inhibitor of apoptosis domain，又稱 baculovirus IAP Repeat (BIR)，是與 caspases 作用的重要位置[161]，IAPs 可以與 caspases 結合，抑制 caspases 活性，研究指出過度表現 IAPs 可保護細胞，而阻礙細胞凋亡發生[162]。IAPs 各成員具有自己獨特的組織特異性，比較特別是其中的 survivin 不在正常、已分化的組織表現，僅在胎盤、胚胎組織和大多數的腫瘤組織中被發現，因此 survivin 被認為與腫瘤發生、惡化可能有所關連[163]。


### 1.4.1 生存素 Survivin

Survivin 是在 1997 年由 Altieri 團隊發現的一個抗細胞凋亡蛋白質，基因位在染色體 17q25 上，蛋白質分子量為 16.5 kDa，包含一個可與  $Zn^{2+}$  結合的 BIR 區域，以及一個 c-terminal  $\alpha$ -helical coiled-coil domain 結構，通常呈現 dimer 形式作用[164, 165]。研究顯示 survivin 可以直接結合並抑制 caspases-3 和 caspases-7



活性，使細胞凋亡受到抑制，反之當 survivin 功能受到破壞時，則會增加細胞死亡[166]。它與其他抗細胞凋亡蛋白質家族成員不同處，在於可與周期蛋白依賴性激酶(Cyclin-dependent kinases, CDKs)中 CDK4、CDK2 交互作用而阻斷細胞凋亡訊息傳導路徑，當 survivin 與 CDK4 結合時，會使 CDK2/cyclin E 活化和視網膜母細胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)磷酸化，磷酸化的 Rb 促進細胞週期從 G1 轉變成 S，DNA 開始合成，細胞開始複製[167]。此外 survivin 被認為參與有絲分裂的調控，有絲分裂期間 survivin 與中心粒(centriole)共同處於細胞質中，到分裂中期 survivin 便轉移至核內染色體著絲粒 (centromere)，分裂後期則與赤道板(equatorial plate)上的紡錘體微管(microtubule)結合，因此被發現若失去 survivin 會造成自發性細胞凋亡，或使細胞分裂不正常[168]，因此除了有抗細胞凋亡功能外，同時具有調控細胞週期、分裂進行的雙重功能。

與其他 IAPs 家族成員廣泛分布的特性不同，survivin 主要分布胚胎及未分化成熟組織中，成人體內除胸腺及胎盤有微量表現外，所有分化成熟的組織均不表現，但在大多數的腫瘤組織中都會表現，包括肺癌、皮膚癌、乳癌、胰腺癌、前列腺癌和血癌等，另外在結腸息肉、乳腺炎、角化皮炎等癌前損傷發炎組織也能偵測到 survivin 存在[164, 169]，survivin 出現於腫瘤惡性轉化前期，意味其表現可能與損傷惡性轉化作用有關。最近的研究更發現，正常人尿液中幾乎檢測不到 survivin，因此尿液中的 survivin 含量，能作為膀胱癌患者的檢驗指標[170]。除了在癌組織或癌症病患尿液中檢測到 survivin 外，也發現以化療藥物治療癌症可能會引發 survivin 大量表現，例如使用抗癌藥物 adriamycin 或 taxol 治療乳癌細胞 MCF-7 及子宮頸癌細胞 HeLa 會使 survivin 增加[171]，因此 survivin 被當作化學治療甚至是放射線治療產生抗性或癒後指標因子。近年來對於如何抑制 survivin 路徑的研究相當重視，期望能應用於癌症治療上，增加治療效力[169]。




目前已發現有許多轉錄因子能調控 survivin 表現，包括 NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)、Ap-2 (Activating Protein-2)、STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)、Sp1 (Transcription factor Sp1 or specificity protein 1)和 p53 (Tumor proteins p53)等[172]。此外，研究發現 survivin 蛋白質 threonine-34 位置，會被細胞週期激素 Cdc2-cyclinB1 磷酸化，而活化 survivin 功能，並使其蛋白質穩定度增加[173]。最近研究指出，腫瘤細胞中 COX-2 過度表達，可能會間接調控 survivin 表現，其調控方式是透過 COX-2 代謝所形成的前列腺素 prostaglandin (PG)，阻止 survivin 降解，使 survivin 能更穩定存在於細胞中[174]。而細胞中的 p53，則可藉直接結合至 survivin 啟動子(promoter)位置，阻礙 survivin 轉錄作用(transcription)。另外 p53 還能藉由抑制 survivin 啟動子位置組蛋白乙醯化 (Histone acetylation)，而干擾啟動子功能，影響轉錄過程，使腫瘤細胞內 survivin 表現量下降，而失去抗細胞凋亡和促進細胞生長之能力[175]。

光動力治療會透過氧化壓力引發細胞死亡，卻也被發現會活化促存活蛋白質表現，而干擾細胞毒殺效應。其中 survivin 的表現在許多光感物質引起的光動力作用都被證實會有所上升[176-178]，除此之外也觀察到光動力治療 survivin 有磷酸化現象發生[176]，可能會因此加強其功能，而避免細胞走向死亡。因此對於光動力治療後，是透過何種調控路徑啟動 survivin 表現或修飾，是研究光動力治療的重要課題。近年研究發現，光動力治療後可能藉由活化 NF- $\kappa$ B，提升 inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS)蛋白質表現量，而促使 survivin 表達[178]。

## 1.5 環氧化酵素-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)

已知 Cyclooxygenase (COX)存在兩種異構體，分別是 COX-1 和 COX-2[179]。COX 在體內主要生理功能，是利用其環氧化酵素將細胞膜上磷脂質(phospholipid)水解而來花生四烯酸(Arachidonic acid, ARA)氧化、環化成前列腺素 prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>)，在利用過氧化酵素(oxidase)還原成 PGH<sub>2</sub>，之後經由



不同酵素合成各種下游產物，如 PGF<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 或 PGE<sub>2</sub> 等，為細胞合成前列腺素之速率決定酵素[180]。COX-1 為常態表現之蛋白質，在大部分組織中都能被發現，不受刺激影響其表現，對於維持腸胃道黏膜完整性、腎血流的調節以及血小板聚集的控制等生理恆定有關。COX-2 是在 1991 年首次由勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)轉殖的小雞胚胎纖維母細胞中純化出來[181]。COX-2 屬於立即且早期反應的基因，位在染色體 1q25.2-25.3 位置，分子量約為 72 kDa。在大部分正常組織是偵測不到 COX-2 mRNA 或蛋白質存在的，可藉由生長因子、致癌基因、致癌物質、缺氧或 cytokines、LPS 等刺激，快速且大量的活化其表現量，特別是與發炎有關的細胞，如巨噬細胞、單核球等中表現，以影響 PG 生成，促使慢性或急性發炎反應發生[182]。此外 COX-2 被證實與癌症發展進程有關，在許多癌症皆發現 COX-2 表現會高於其周邊正常組織[183, 184]，文獻指出 COX-2 及其下游因子 PG 的活化與癌症的致癌機制有相當密切的關係，像是影響細胞增生、血管新生(angiogenesis)及細胞凋亡(apoptosis)以及腫瘤轉移(metastasis)等[185, 186]。

COX-2 在細胞中表現的調控包含轉錄及轉錄後修飾。在 COX-2 的 promoter 上被發現有多種轉錄因子的結合位置，包括 Sp1、NF- $\kappa$ B、CREB (cAMP response element-binding protein)、C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins)、AP2 (Activating Protein 2)等[187]。不同的刺激來源或不同的細胞種類，可能會引發不同的訊息路徑和轉錄因子調控 COX-2 表現。研究發現許多生長因子或致癌基因會活化 PKC、RAS 或 MAPK 訊息路徑刺激 COX-2 表達[188]。雖然許多因子能促進 COX-2 轉錄，也有另外一些因子是能負調控 COX-2，其中 p53 就具有抑制 COX-2 表現的能力，其能抑制 COX-2 主要經由跟 TATA 結合蛋白質(TATA-binding protein)競爭 TATA box 結合位置[189]。另外研究也發現，除了轉錄調控外，轉錄後修飾(post-transcriptional modification)也具有影響 COX-2 的能力。COX-2 mRNA 3'端非轉譯區(untranslated region, UTR)有一 Shaw/Kamen

(AU-enriched elements, ARE)序列片段，此序列會讓 COX-2 mRNA 表現後快速分解[189]，實驗發現 COX-2 之所以在腫瘤細胞中能大量表現，除了與 COX-2 轉錄增加有關外，可能也與降低 COX-2 mRNA 轉換(turn-over)有關[190]，其中 RNA 結合蛋白質(RNA binding protein) HuR 被證實能結合至 COX-2 ARE 序列上，增加 COX-2 mRNA 穩定性[191]。ERK1/2 與 p38MAPK 也被發現能影響 COX-2 mRNA 穩定度[192, 193]。


許多文獻報導光動力治療後，會立即地誘發大量 COX-2 表達[194, 195]，更於動物實驗中證實，使用 COX-2 抑制劑能顯著提升光動力治療於腫瘤抑制之效應[195, 196]。目前已知，p38MAPK 在光動力氧化效應後，COX-2 表現增加中扮演關鍵角色[194, 197]，而 NF- $\kappa$ B 則是被認為主要調節 COX-2 的重要轉錄因子[110]。然而目前的研究對於 NF- $\kappa$ B 是否受到 p38MAPK 調控，參與在光動力作用後 COX-2 轉錄中還尚未釐清，此外是否還有其他調控機轉影響 COX-2 表現也不甚明白，還有待更多深入的研究探討。

## 1.6 組蛋白乙醯化 (Histone acetylation)

染色體上的蛋白質包括組蛋白(Histone)與非組蛋白(non-histone)，其中組蛋白是 DNA 包裝蛋白(DNA-packaging protein)，其功能是和 DNA 纏繞在一起形成核小體(Nucleosome)，組蛋白分為 H1、H2A、H2B、H3 和 H4，而核小體是由 146 bp 長的 DNA 與組蛋白八聚體(包括兩個 H2A、兩個 H2B、兩個 H3 及兩個 H4)折疊而成，為鏈狀 DNA 形成更堅韌染色體的第一級結構，H1 則作為兩個核小體間的連結，成串的核小體所構成的染色質可進一步摺疊，並壓縮成更緊密的染色體(Chromosome)[198]。許多研究證實核小體的緊密型態會阻礙基因轉錄作用，核小體的結構或組蛋白與 DNA 的交互作用，使基因被調控的區間無法被轉錄聚合物(Transcription machinery)或其他的活化者結合，因此染色體結構的改變

與轉錄作用的活化關係，在近幾年被廣泛的研究。其中組蛋白的轉譯後修飾 (Post-translational modifications) 能影響基因表達，主要即是因為當 DNA 與組蛋白間纏繞發生改變時，即可能造成基因表現的改變[198]。組蛋白(尤其是 H3 和 H4) N端暴露於八聚體的核心外圍，可作為多種酵素的受質，並可以引導轉譯後修飾，這些修飾包括乙醯化(acetylation)、甲基化(methylation)、泛素化(ubiquitylation)、磷酸化(phosphorylation)以及 sumoylation，其中組蛋白乙醯化在近年廣泛被研究[198]。研究顯示，組蛋白的乙醯化可能會促使基因活化表達，其原因為 DNA 骨架上的磷酸帶負電，能與組蛋白上帶正電的 lysines 互相吸引，當帶正電的 lysines 被乙醯化修飾後，會轉變為電中性，使 DNA 與組蛋白之間結合變疏鬆，因此轉錄因子便能結合至 DNA 上，利於基因轉錄發生[198-200]。而組蛋白乙醯化程度取決於組蛋白乙醯化轉酶(histone acetyltransferases, HATs)及組蛋白去乙醯化酶(histone deacetylases, HDACs)兩者間之活性平衡[200]。

HATs 的功能是將 acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) 上的乙醯基團移至組蛋白 N 端的 lysine 側鏈上  $\epsilon$ -胺基酸基團，使組蛋白 N 端正電減弱，進而減少組蛋白與 DNA 親和性 [199]。組蛋白乙醯化轉酶可分為五個家族 GCN5-related acetyltransferases (GNATs)、p300/CBP、MYST、TBP-associated factors II 250 (TAF II 250)、Nuclear receptor coactivators 及 ATF2[199]。其中 GNATs 家族被研究相當多，為轉錄輔助活化因子(transcriptional co-activator)，其家族成員包含 GCN5、PCAF (p300/CREB-binding protein-associated factor)、Ada、SAGA、EIp3、Hpa2 及 Hat1 等[201]。GCN5 與 PCAF 皆具有 160 個胺基酸所組成的 HAT domain，在 C 端含有一個 bromodomain，亦可與組蛋白上乙醯化的 lysine 結合，促進基因表現[202]。另外 PCAF 也被發現能與 p300 交互作用，更能將乙醯基移轉至非組蛋白蛋白質(Non-histone protein)如 NF- $\kappa$ B、p53、MyoD、Tat 等[203]。p300/CBP 家族則包含有 p300 及 CBP (CREB-binding protein)，其具有 500 個胺基酸組成的 HAT domain，並含有一個 bromodomain 以及三個 cysteine-histidine rich 的 CH domain，



CH domain 主要功能是幫助 p300 或 CBP 與其他蛋白質結合[201]。p300/CBP 家族同樣為 transcriptional co-activator，在細胞週期(cell cycle)、細胞分化(cell differentiation)或細胞凋亡等功能上扮演重要角色，此外也發現 p300/CBP 家族可藉由和許多轉錄因子交互作用，進而刺激特定基因轉錄的進行[204]。MYST 家族包括 MOZ、YBF2/SAS3、SAS2、Tip60、HBO 等，含有 250 個胺基酸組成 HAT domain，其家族調控的範圍很廣，包含轉錄活化作用、transcriptional silencing、dosage compensation 和 cell cycle progrssion 等[205]。TAF II 250 家族是 general transcriptional factor TFIID 的次單元，可與 TATA-binding protein 結合，並具有一個 HAT domain、兩個 bromodomain 及 kinase domain，因此除了 HAT 活性還具有 kinase 活性，可控制細胞週期及 DNA 合成[206]。Nuclear receptor coactivators 家族包括 SRC-1 與 ATCR，可與 Nuclear hormone receptor 結合，具有一個 HAT domain、basic helix-loop-helix homology (bHLH) domain、Nuclear receptor interaction region (RID)[207]。ATF2 家族含有 HAT domain、能與 DNA 結合的 basic zinc binding (bZIP) domain 以及有轉錄活性的 transcriptional activation (Act) domain，是同時具有轉錄因子和 HAT 活性的蛋白質[208]。HATs 因為其不同家族特性使其相對乙醯化受質會有所差異，研究發現 GNATs 家族通常乙醯化 H3 的 lysine 14，p300/CBP 家族能乙醯化四種核心組蛋白，MYST 家族的主要乙醯化受質是組蛋白 H4[209]。

HDACs 的功能為去除組蛋白 N 端乙醯基，因此能使 DNA 與組蛋白間纏繞更加緊密，抑制基因轉錄。目前可將 HDACs 分為四型，分別是第一型 HDAC1、HDAC2、HDAC3 和 HDAC8、第二型 HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9 和 HDAC10、第三型 Sirtuin1-7 及第四型 HDAC11[210]。第一型 HDACs 位於細胞核，常與轉錄因子共同作用，主要功能是調控細胞存活、細胞生長。第二型 HDACs 則可能會存在細胞質與細胞核中，具有組織特異性，特別是其中 HDAC6 能在細胞質中抑制微管蛋白(tubulin)之乙醯化，而影響細胞移動。研究也

發現抑制 HDAC6 會使 Hsp90 (heat shock protein 90) 乙醯化，降低其蛋白質保護功能。有別於第一型與第二型，第三型 HDACs 為酵母菌 sir2 的同源蛋白質，需要 NAD<sup>+</sup> 作為輔酶才有活性。第四型 HDAC11 活性區序列與第一型與第二型類似，被發現能與 HDAC6 交互作用[210]。

將乙醯基轉移至組蛋白 lysine 位置時，轉錄因子與 chromatin regulators 能直接或間接結合至乙醯化的組蛋白上，因此組蛋白或其他蛋白質乙醯化及去乙醯化作用的平衡在正常細胞增生、生長與分化上極為重要[200, 211]，這樣的機制功能喪失會導致不同疾病發生。許多文獻發現 HATs 或 HDACs 活性喪失或錯誤調節與腫瘤生成或惡化有關[212]。目前已有多種 HATs 抑制劑被應用，1992 年研發出的 polyamine-CoA conjugates 可抑制乙醯轉移酶的活性[213]。2000 年學者合成 peptide CoA conjugates 作為篩選 HATs 抑制劑的工具，發現 Lys-CoA 能專一抑制 p300，而 H3-CoA-20 能針對抑制 PCAF 活性[214]。Balasubramanyam 等人在 2003 年，從 cashew nut shell liquid 中萃取出天然 HATs 抑制劑 anacardic acid，專一性抑制 p300 活性[215]，此外也合成具有活化 p300 活性的小分子 N-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-2-ethoxy-6-pentadecyl-benzamide[215]。此後，學者又陸續從植物中萃取出各種天然 HATs 抑制劑如 EGCG、curcumin、garcinol 等，被證實對於 p300 及 PCAF 活性具有抑制效果，能抑制轉錄作用進行[216-218]。

目前對於光動力治療後，是否引發 epigenetics modification 的相關研究相當有限，只有在 2009 年 Flores-Ancona 等人使用 ALA-PDT 發現會引起細胞內 histone H4 乙醯化程度上升[219]，和同年 Mamoon 團隊指出 Indocyanine green (ICG)-PDT 會顯著抑制細胞中 HDAC 活性，推論可能因此影響組蛋白乙醯化修飾[220]。然而，光動力治療是如何導致組蛋白乙醯化修飾改變，以及組蛋白乙醯化修飾改變對於細胞又會造成何種影響，目前都還尚未清楚，有待更多研究進行探討。




## 1.7 研究動機與目的

已知光動力治療會藉由產生氧化壓力導致腫瘤細胞死亡，為極有潛力之癌症治療方式。但近年研究指出，光動力治療後可能會經由引發促存活分子 COX-2 蛋白質表達，而阻礙光動力治療成效[194, 195]，因此學者們致力探討光動力治療引發 COX-2 之相關分子機轉，希望藉由了解促存活分子 COX-2 的活化機制路徑，發展增強光動力治療成效的治療模式。過去研究曾利用 COX-2 抑制劑降低 COX-2 於光動力治療後表現，發現能提升光動力腫瘤抑制效果[196, 221]，但是對於光動力治療是透過何種分子調控機轉導致 COX-2 上升仍尚未明瞭。目前已知光動力治療會透過 p38MAPK 路徑活化，促使 COX-2 表達[194, 197]。此外發現 COX-2 轉錄會受到轉錄因子 NF- $\kappa$ B 影響[110]，光動力治療後也確實發現 NF- $\kappa$ B 的活化受到 p38MAPK 調控[222, 223]，然而目前卻無任何證據顯示光動力治療後會經由 p38MAPK 路徑活化 NF- $\kappa$ B，而促進 COX-2 轉錄。根據 Hendrickx 等人的研究指出，hypericin-PDT 雖然會活化 NF- $\kappa$ B，但上升的 COX-2 表現可能與活化的 NF- $\kappa$ B 無關[194]，顯示對於光動力治療後 p38MAPK 如何調控 COX-2 轉錄過程還需更深入研究探討。近年研究發現 COX-2 的表現除了與其轉錄因子調控有關，還會受到其啟動子上組蛋白乙醯化修飾所影響[224-226]。已有許多發表顯示氧化壓力可能會活化組蛋白乙醯化轉酶，增加對組蛋白乙醯化之修飾，然而目前對於光動力治療後是否會引發組蛋白乙醯化修飾改變之研究相當有限。因此，本篇論文將分析光動力治療後，是否造成組蛋白乙醯化修飾改變，並將深入探討組蛋白乙醯化與 p38MAPK、NF- $\kappa$ B 活化和 COX-2 表現之間的關係，希望藉由對於此調控路徑之瞭解，開發增進光動力作用效應之治療方式，期待對於日後光動力治療療效提升能有更進一步的應用。

所以本研究欲完成具體目標如下：

### 一、檢測光動力治療後組蛋白乙醯化修飾程度改變與 COX-2 表現的關係

- 
- 1.實驗將以西方點墨法分析 ALA-PDT 後組蛋白乙醯化修飾程度，並檢測組蛋白乙醯化轉酶及組蛋白去乙醯化酶的表現及活性。
  - 2.確認 ALA-PDT 後 COX-2 的表現，並利用組蛋白乙醯化轉酶抑制劑或以 RNAi 改變組蛋白乙醯化轉酶表現，以瞭解光動力治療後組蛋白乙醯化修飾程度和 COX-2 表現是否有所關連，並以 ChIP assay 分析組蛋白乙醯化修飾對 COX-2 轉錄之影響。

## 二、探究光動力治療後啟動組蛋白乙醯化修飾之訊息路徑

- 1.將針對過去已知能調控 COX-2 表現的 p38MAPK 進行分析，並檢測 ALA-PDT 後 p38MAPK 是否活化。
- 2.將使用 p38MAPK 抑制劑處理，觀察其對 ALA-PDT 後組蛋白乙醯化轉酶表現、活性和組蛋白乙醯化修飾程度之調節。

## 三、分析光動力治療後組蛋白乙醯化轉酶對 COX-2 轉錄因子 NF- $\kappa$ B 之影響

- 1.以西方點墨法檢測 ALA-PDT 後，NF- $\kappa$ B 是否也會受到組蛋白乙醯化轉酶修飾。
- 2.利用組蛋白乙醯化轉酶抑制劑確認 ALA-PDT 後增加的 NF- $\kappa$ B 乙醯化修飾是否影響下游 COX-2 表現，並以 ChIP assay 分析 NF- $\kappa$ B 乙醯化修飾對 COX-2 轉錄之影響。

## 四、以 xenograft tumor models 和 syngeneic tumor models 驗證細胞層次的結果

將使用植有 C26 腫瘤之 BALB/c 小鼠以及植有 A375 腫瘤之 NU/NU 小鼠，驗證經過光動力治療後是否誘發組蛋白乙醯化修飾，並以 ChIP assay 分析活體腫瘤組織中組蛋白乙醯化修飾上升對 COX-2 轉錄之影響。

## 五、試驗組蛋白乙醯化轉酶抑制劑是否能增強光動力治療效應

- 1.使用組蛋白乙醯化轉酶抑制劑結合光動力治療，以 MTT 和 Colony formation assay 檢測對細胞毒殺效應。
- 2.使用組蛋白乙醯化轉酶抑制劑結合光動力治療，檢測對植有 C26 腫瘤之 BALB/c 小鼠之腫瘤抑制效果。

3.觀察組蛋白乙醯化轉酶抑制劑結合光動力治療後，是透過何種死亡路徑加強細胞死亡，將分別分析此結合型治療對細胞凋亡、細胞壞死或細胞自噬的影響。



## 第二章 材料與方法



### 2.1 細胞株與細胞培養

人類黑色素瘤 A375 細胞株培養於含 10% Fetal bovine serum (FBS) (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel)之 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 購自 Gibco®, Life Technologies Corporation, Waltham, MA, USA)培養液。A375 細胞株經由 PromegaGenePrint® 10 System (Promega, Madison, WI, USA)與 ABI PRISM 3730 GENETIC ANALYZER 和 GeneMapper® software V3.7. (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)認證為 A375 細胞株。小鼠大腸癌 C26 細胞株培養於含 10% FBS 之 RPMI 1640 (Life Technologies Corporation)培養液，所有細胞培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的恆溫細胞培養箱中。C26 細胞株，由台北醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系劉俊仁教授提供。

### 2.2 *in vitro* 光動力治療

ALA-PDT 將細胞種入 60-mm 培養盤中，培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的恆溫細胞培養箱中 24 小時。移除培養液後，加入 1 mM ALA (Sigma, St. Louis, MO, USA) (以未含 FBS 及 phenol red 的培養液稀釋)，避光於恆溫細胞培養箱中培養三小時。接著使用波長為 635 ± 20 nm，強度為 60 mW/cm<sup>2</sup> 之 LED 光源，進行特定劑量之照光。照光後，將培養液移除，加入含有 10% FBS 之培養液於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的恆溫細胞培養箱中培養至特定實驗時間點。

Ce6-PDT 將細胞種入 60-mm 培養盤中，培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的恆溫細胞培養箱中 24 小時。移除培養液後，加入 0.5 µg/µl Ce6 (Frontier Scientific, Inc., Logan, UT, USA) (以未含 FBS 及 phenol red 的培養液稀釋)，避光於恆溫細胞培養箱中培養兩小時。接著使用波長為 650 ± 5 nm，光源強度為 32 mW/cm<sup>2</sup> 之 LED

光源進行  $0.5 \text{ J/cm}^2$  照光。照光後，將培養液移除，加入含有 10% FBS 之培養液於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恆溫細胞培養箱中培養至特定實驗時間點。



## 2.3 細胞存活率試驗

### 2.3.1 MTT assay

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma) 為可溶於水的黃色粉末，經過細胞內粒線體中的去氫酵素 (dehydrogenase) 代謝後，能使水溶性的 tetrazolium salt 還原成藍紫色結晶產物 formazan [227]。由於粒線體去氫酵素只有在活細胞中才有活性，故使用此方法檢測細胞存活率。將 A375 或 C26 細胞種於 96 well plates (8000 cells/well)，置於細胞培養箱 ( $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ) 培養 24 小時後，進行後續實驗。細胞與 1 mM ALA 培養三小時後，以波長為  $635 \pm 20 \text{ nm}$ ，強度為  $60 \text{ mW/cm}^2$  之 LED 光源進行照光 (照光劑量為  $2 \text{ J/cm}^2$ )，照光前 30 分鐘，加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA (Abcam, Cambridge, MA, USA)，之後將細胞培養在含 10% FBS 之培養液，於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培養箱中培養 24 小時。移除培養液後，加入 2 mg/ml MTT 溶液 (以未含 FBS 之培養液稀釋，使 MTT 溶液最終濃度為 0.4 mg/ml)。避光培養 2 小時後移除 MTT 溶液，所產生的藍紫色結晶產物 formazan 以 DMSO 溶解，使用 microplate readers (Amersham Biosciences, Amersham, UK) 檢測於波長 570 nm 之吸光值，以代表 formazan 的量。細胞存活率公式： $\text{MTT activity (\%)} = (\text{mean absorbance of treated cells} / \text{mean absorbance of control cells}) \times 100\%$ 。

### 2.3.2 Colony-formation assay

將  $1 \times 10^3$  顆細胞種於 60 mm 培養盤中，培養於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恆溫細胞培養箱中 24 小時。移除培養液後，加入 1 mM ALA 培養 3 小時，於照光前 30 分

鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA 共同培養，隨後以 635 nm 光源(照光劑量為 2 J/cm<sup>2</sup>)進行光動力照光。隨後移除廢液，並將細胞培養在含 10% FBS 之培養液，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱中培養 5 天。移除培養液後，使用 PBS 潤洗 2 次，加入 4% formaldehyde (Sigma)於室溫下作用 2 小時，以固定細胞。移除 formaldehyde 後，使用 0.005% crystal violet (Sigma)於室溫下作用 24 小時，進行 colony 染色，之後移除 crystal violet，於室溫下自然風乾。最後照相記錄並計數 colony 數量，而至少需由 50 個細胞組成，始能被計數成一個 colony。

## 2.4 基因表達分析

### 2.4.1 萃取 RNA (RNA extraction)

將培養盤上之細胞，以 PBS 潤洗細胞兩次，移除 PBS 後，加入 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (1 ml/10<sup>7</sup> cells) (Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies Corporation)，輕輕搖晃使其與細胞作用完全，作用 5 分鐘後，將上述溶液吸取至 1.5 ml 微量離心管中，加入 chloroform (0.2 ml/1 ml TRIzol reagent) (Sigma)，充分混合，於室溫下靜置 3 分鐘後，以 12000 rpm、4°C 離心 15 分鐘。將溶液分為三層。抽取水層至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 isopropanol 沉澱 RNA (0.5 ml/1 ml TRIzol reagent) (Sigma)，於室溫下靜置 10 分鐘後，以 12000 rpm、4°C 離心 15 分鐘，RNA 將沉澱於底部。接著清除上清液，以 75% 酒精潤洗 pellet (1 ml/1 ml TRIzol reagent)，於 7500 rpm、4°C 離心 10 分鐘。去除上清液，風乾後將其溶於 Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma) 水中，並於 55°C 水浴槽加熱 10 分鐘回溶 RNA，樣品保存於 -20°C。



## 2.4.2 反轉錄作用 (Reverse Transcription, RT)

偵測 OD260/280 吸收值，換算自細胞中抽取之 RNA 濃度。取 1  $\mu\text{g}$  RNA，並以 DEPC 水補充至終體積為 10.5  $\mu\text{l}$ ，混和均勻，接著加入 1  $\mu\text{l}$  Random Hexamers (Invitrogen™, Life Technologies Corporation) 後，置於 70°C 作用 10 分鐘。之後於每反應管中加入以下試劑：4  $\mu\text{l}$  5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ )、2  $\mu\text{l}$  0.1 M DTT、2  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP、0.5  $\mu\text{l}$  RiboLock RNase inhibitor (全購自 Invitrogen™, Life Technologies Corporation)，置於 42°C 作用 2 分鐘。再加入 1  $\mu\text{l}$  的 SuperScript II (Invitrogen™, Life Technologies Corporation)，充分混和後，於 25°C 作用 10 分鐘，42°C 作用 50 分鐘，70°C 作用 15 分鐘，保存於 -20°C。

## 2.4.3 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR 為利用反轉錄作用反應所獲得的 cDNA，及使用特定的引子片段針對目標基因進行放大作用之反應。PCR 反應中需含有以下試劑：2.5 Unit Tag DNA polymerase、3 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1X PCR buffer、0.4 mM dNTP (上述購自 Invitrogen™, Life Technologies Corporation)、0.1  $\mu\text{M}$  Forward Primer、0.1  $\mu\text{M}$  Reverse Primer 和 1  $\mu\text{l}$  RT product，最後以 DEPC 水將體積補至 25  $\mu\text{l}$ ，置入 PCR 反應器內進行聚合酶連鎖反應，反應為 95°C 作用 5 分鐘，再依照不同基因進行不同次數的循環反應，其條件為 95°C 作用 1 分鐘，55°C 作用 50 秒，72°C 作用 50 秒的循環反應，再以 72°C 作用 10 分鐘，最後溫度維持在 4°C，完成聚合酶連鎖反應。PCR 實驗使用之 Primers 序列如下：

Primers	序列
COX-2(forward)	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'
COX-2(reverse)	5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'

survivin(forward)	5'-CTTTCTCAAGGACCACCGCATC-3'
survivin(reverse)	5'-CAATCCATGGCAGCCAGCTGC-3'
PCAF(forward)	5'-TCCTGTCGGAGTTGTAGCCA-3'
PCAF(reverse)	5'-GTTCTGGAAGAGGCTGAGAG-3'
p300(forward)	5'-AGCCCTGGCAGTATGTCGAT-3'
p300(reverse)	5'-GAATCCAGCAGGCCAGATGA-3'
GCN5(forward)	5'-GTCAGGCTTCACCATGCCAC-3'
GCN5(reverse)	5'-TGCCGATGACATGGAACCTCG-3'
HDAC1(forward)	5'-AACCTGCCTATGCTGATGCT-3'
HDAC1(reverse)	5'-CAGGCAATTCGTTTGTGTCAGA-3'
HDAC2(forward)	5'-GGGAATACTTTCCTGGCACA-3'
HDAC2(reverse)	5'-ACGGATTGTGTAGCCACCTC-3'
HDAC3(forward)	5'-TGGCTTCTGCTATGTCAACG-3'
HDAC3(reverse)	5'-GCACGTGGGTTGGTAGAAGT-3'
$\beta$ -actin(forward)	5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'
$\beta$ -actin(reverse)	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3'

PCR 反應產物以瓊脂膠體電泳(Agarose Gel Electrophoresis)分析基因表現。首先使用 TAE (Tris-acetate-EDTA) Buffer (Life Technologies Corporation)配製 2% 瓊脂膠體，待膠體凝固後放入含 TAE buffer 電泳槽中，隨後將 PCR 產物與 DNA Gel Loading Dye (6X) (Life Technologies Corporation)混合均勻，加入樣品槽，通入適當電壓進行電泳。電泳結束後以 ethidium bromide (EtBr) (Sigma)染劑染色，於 BioDoc-It<sup>®</sup> Imaging System (UVP, Upland, CA, USA)觀察並擷取電泳結果。

## 2.5 蛋白質表達分析

### 2.5.1 Total蛋白質萃取

將A375或C26細胞種於60 mm培養皿中，依照實驗所需之條件進行處理。隨後移除細胞廢液，以PBS潤洗兩次，隨後加入40  $\mu$ l Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer)，混和均勻後，靜置於冰上10分鐘。利用細胞刮杓收集細胞細胞萃取液，以14000 g、4°C離心10分鐘，離心後保留上清液並保存於-80°C冰箱。RIPA buffer配方如下：50 mM Tris、150 mM NaCl、0.1% SDS、0.5% sodium deoxycholate、1% Triton X-100 (上述購自Sigma)和cocktail protease inhibitors (Calbiochem<sup>®</sup>, Millipore, Temecula, CA, USA)。

### 2.5.2 細胞質/細胞核蛋白質萃取

將A375或C26細胞種於60 mm培養盤中，依照實驗所需之條件進行處理。隨後使用NE-PER<sup>™</sup> Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Life Technologies Corporation)分別提取細胞質和細胞核蛋白質。首先將細胞自培養盤上收集下來，以500 g離心5分鐘，經PBS潤洗後，加入CER I試劑並震盪15秒，使細胞完全懸浮後，靜置於冰上10分鐘。接著加入CER II試劑並震盪5秒，置於冰上1分鐘。以16000 g離心5分鐘(離心前先震盪5秒)後，快速將上清液(此上清液為細胞質萃取蛋白質)移至新的eppendorf，保存於-80°C。最後以NER試劑懸浮離心後殘留物，震盪15秒後置於冰上40分鐘(期間每10分鐘震盪15秒)，以16000 g離心10分鐘後，快速將上清液(此上清液為細胞核萃取蛋白質)移至新的eppendorf，保存於-80°C。CER I：CER II：NER試劑比例為200：11：100  $\mu$ l，依照細胞數調整試劑使用量。

### 2.5.3 蛋白質定量

抽取細胞蛋白質後，使用bicinchoninic acid (BCA)方法分析並定量其中蛋白質之含量。參照Micro BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kit (Life Technologies Corporation)，首先將Albumin (BSA)進行序列稀釋，濃度從1000  $\mu$ g/ml至15.625  $\mu$ g/ml，建立Albumin (BSA) Standard。接著將蛋白質樣品稀釋至適當濃度後，加入BCA

Reagent後，於37°C作用30分鐘進行反應(BCA Reagent MA : MB : MC比例為25 : 24 : 1)，檢測標準品與細胞萃取液中的蛋白質濃度，利用 microplate readers (Amersham Biosciences)於波長570 nm下測量樣品之吸光值，繪製標準曲線，並利用樣品的吸光值與標準曲線進行迴歸運算，計算出蛋白質濃度。

#### 2.5.4 西方點墨法 (Western Blot)

從各個樣品中分別取出 50 µg 之蛋白質，並加入 4X SDS sample buffer 均勻混合後，於沸水中加熱 5 分鐘。利用 12% SDS-PAGE 於進行蛋白質電泳，分離樣品中的蛋白質。SDS-PAGE 電泳進行完畢之後，取下膠片以固定電壓方式將膠片上的蛋白質轉漬至 Nitrocellulose (NC) membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)上。轉漬過後，將 NC membrane 浸泡於含有 5% Skim Milk (Difco, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)的 TBST buffer 中，於 37°C blocking 1 小時。隨後以 TBST buffer 潤洗三次，每次 10 分鐘。接著以含有 5% BSA (Sigma)的 TBST buffer 稀釋一級抗體，並於 4°C 下進行雜合反應 overnight。反應完畢後以 TBST buffer 潤洗三次，每次 10 分鐘，加入二級抗體(以含有 5% BSA 的 TBST 稀釋)，於室溫下反應 1 小時後，用 TBST buffer 潤洗三次，每次 10 分鐘。最後於 membrane 上加入 ECL Western Blotting Substrate (Pierce™, Life Technologies Corporation)進行反應，並以 FluorChem™ System (ProteinSimple, San Jose, CA, USA)擷取冷光影像。

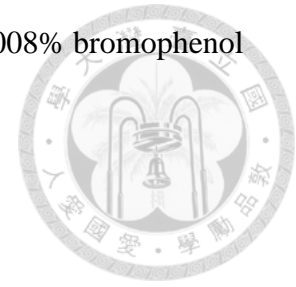
Western Blot 試劑與抗體如下：

##### RIPA buffer

20 mM Tris-HCl, pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、25 mM β-glycerophosphate、10% Glycerol、1% Triton X-100

##### 4X SDS sample buffer

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8、8 mM EDTA、8% SDS、40% Glycerol、0.008% bromophenol blue、20%  $\beta$ -mercaptoethanol



#### 5X Running Buffer

0.05 M Tris-base, pH 8.3、0.38 M Glycine、0.2% SDS

#### 1X Transfer Buffer

25 mM Tris-base、100 mM Glycine、10% Methanol

#### TBST buffer

20 mM Tris-HCl, pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、0.05% Tween 20

#### Seperating Gel

ddH<sub>2</sub>O、2.0 M Tris-HCl, pH 8.8、40% Acrylamide、10% SDS、10% ammonium persulfate (APS)、TEMED

#### Stacking Gel

ddH<sub>2</sub>O、1.0 M Tris-HCl, pH 6.8、40% Acrylamide、10% SDS、10% ammonium persulfate (APS)、TEMED

#### 抗體

COX-2、p38MAPK、Lamin A/C 抗體購自 Epitomics (Cambridge, MA, USA)。  
phosphorylated p38、p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、cleaved caspase-3、acetyl-NF- $\kappa$ B p65 (K310)抗  
體購自 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)。  
acetyl-Histone H3 抗體購自 Millipore。  
GAPDH、Histone H3、survivin 抗體購自 GeneTex (Irvine, CA, USA)。  
cleaved PARP 抗體購自 Abcam。  
Beclin-1 抗體購自 BD Biosciences。  
p300HAT 抗體購自 Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)。



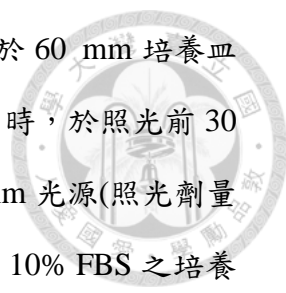
## 2.6 細胞凋亡(apoptosis)檢測

### 2.6.1 Hoechst 染色

將 A375 或 C26 細胞種入 60-mm (含兩片蓋玻片)培養盤中，培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱中 24 小時。移除培養液後，加入 1 mM ALA 培養 3 小時，於照光前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA 共同培養，隨後以 635 nm 光源(照光劑量為 2 J/cm<sup>2</sup>)進行光動力照光。隨後移除廢液，並將細胞培養在含 10% FBS 之培養液，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱中培養 4 小時。隨後加入 5 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes<sup>®</sup>, Life Technologies Corporation)共同培養 30 分鐘，Hoechst 33342 是 DNA 染劑，其對細胞膜的通透性佳，可以直接通過細胞膜進入細胞核內，與含氮鹽基 A-T 配對結合，藉此來觀察細胞核中 DNA 分布情形。在細胞正常之情況下，DNA 於細胞核內分布均勻，此時可觀察到 Hoechst 33342 因染到 DNA 而均勻分布於細胞核內。然而細胞若進行細胞凋亡(Apoptosis)時，會因為核中 DNA 有濃縮(Condensation)或因內切酶作用而使 DNA 有斷裂(Fragmentation)等現象出現，而使其螢光影像之亮度增加。在 Hoechst 33342 染色後，使用 PBS 潤洗兩次，製成玻片後，使用螢光顯微鏡(Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan)觀察(激發波長：330-385 nm)。

### 2.6.2 Annexin V/PI 染色

利用鈣依賴性磷脂結合蛋白質 Annexin V，可以結合並偵測到細胞在早期性細胞凋亡時，細胞膜內層上 phosphatidylserine (PS)外翻的現象，而 Propidium Iodide (PI)為一種 DNA 染劑，其對細胞膜通透性較差，所以當細胞膜完整時，PI 無法進入細胞內，但是當細胞經由細胞壞死(Necrosis)路徑死亡時，會因為細胞膜破損，使得 PI 能進入細胞中，到達細胞核內與 DNA 作用，故能偵測到 PI 螢



光，因此能作為細胞壞死之檢測依據。將 A374 或 C26 細胞種於 60 mm 培養皿中，培養 24 小時。移除培養液後，加入 1 mM ALA 培養 3 小時，於照光前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA 共同培養，隨後以 635 nm 光源(照光劑量為  $2 \text{ J/cm}^2$ )進行光動力照光。隨後移除廢液，並將細胞培養在含 10% FBS 之培養液，於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恆溫培養箱中培養 4 小時。隨後將培養液移除，以 PBS 清洗兩次，加入 1 ml PBS，並以刮杓將細胞收集至微量離心管，使用 1X binding buffer (BD Biosciences)將細胞濃度調整為  $1 \times 10^6$  cells/ml 後，吸取 100  $\mu\text{l}$  細胞液至新的離心管中，加入 Annexin V-APC (BD Biosciences)及 PI (Molecular Probes<sup>®</sup>, Life Technologies Corporation)於室溫下避光培養 15 分鐘。最後加入 1X binding buffer 補至 500  $\mu\text{l}$ ，一小時內以 FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences)分析。

### 2.6.3 Caspase-3 活性檢測

本研究使用 Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit (BioVision, Mountain View, CA, USA)進行分析。主要原理為活化態之 caspase-3 能辨認受質 DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) 序列進行截切。此試驗組附有一段 DEVD-p-nitroaniline (DEVD-pNA) 序列，待細胞中活化之 caspase-3 將其截切，形成發色基團 pNA，經由偵測波長 405 nm 吸光值，來檢測 caspase-3 活化程度。首先將 A374 或 C26 細胞種於 60 mm 培養皿中，培養 24 小時。移除培養液後，加入 1 mM ALA 培養 3 小時，於照光前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA 共同培養，隨後以 635 nm 光源(照光劑量為  $2 \text{ J/cm}^2$ )進行光動力照光。隨後移除廢液，並將細胞培養在含 10% FBS 之培養液，於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恆溫培養箱中培養 4 小時。隨後將細胞自培養盤中收集下來，加入 50  $\mu\text{l}$  Cell Lysis Buffer 於冰上培養 10 分鐘，以 10000 g 離心一分鐘，收集上清液，並進行蛋白質定量。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白質/50  $\mu\text{l}$  Cell Lysis Buffer，加入 50

µl 2X Reaction Buffer (含10 mM DTT)和5 µl 4 mM DEVD-pNA, 於37°C培養1小時, 使用microplate readers (Amersham Biosciences)檢測於波長405 nm之吸光值。



## 2.7 細胞自噬(autophagy)檢測

### 2.7.1 Monodansylcadaverine (MDC) 染色

MDC 為一種能標定酸性液泡的染劑, 當細胞發生細胞自噬(autophagy), 細胞中會產生酸性自噬囊泡, 而能以顯微鏡偵測到 MDC 螢光反應[228]。將 A375 或 C26 細胞( $3 \times 10^5$  cells/dish)種於 60 mm 培養盤中(培養盤中放置二片蓋玻片), 培養 24 小時後, 移除廢液, 並以 PBS 清洗兩次, 加入 1 mM ALA 培養 3 小時, 於照光前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA 共同培養, 隨後以 635 nm 光源(照光劑量為  $2 \text{ J/cm}^2$ )進行光動力照光。照光後 8 小時將培養液移除, 加入 50 µM MDC 在 37°C 下反應 30 分鐘進行染色, 隨後將培養盤中蓋玻片移至載玻片上進行封片, 以 Leica TCS SP8 光譜式共軛焦顯微鏡系統(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)觀察螢光結果(MDC-fluorescence : excitation 355 nm/emission 460 nm)。

### 2.7.2 GFP-LC3 螢光檢測

利用 LC3 在細胞自噬形成過程中發生聚集的現象偵測細胞自噬發生。無細胞自噬時, Green Fluorescent Protein (GFP)-LC3 融合蛋白彌散在細胞質中, 當細胞自噬體形成時, GFP-LC3 融合蛋白轉位至自噬體(autophagosome)膜上, 在螢光顯微鏡下形成明亮的綠色螢光斑點(GFP-LC3 puncta), 可以通過觀察或計數來判斷細胞自噬活化情形。首先以 400 µl serum-free 細胞培養液稀釋 4 µg GFP-LC3 plasmid (GFP-LC3 plasmid 由日本大阪大學 Tamotsu Yoshimori 教授提供), 接著加入 6 µl TurboFect Transfection Reagent (Life Technologies Corporation) (並混和均勻, 於室溫下作用 20 分鐘。隨後將此混和液加入已種入 A375 或 C26 細胞之

6-well plate 中(不須移除原有細胞培養液)，搖晃培養盤使其均勻分佈，於 37°C 恆溫培養箱中培養 48 小時。將已轉染入 GFP-LC3 之細胞重新種入 60 mm 培養盤中(培養盤中放置二片蓋玻片)，培養 24 小時後，移除廢液，並以 PBS 清洗兩次，加入 1 mM ALA 培養 3 小時，於照光前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA 共同培養，隨後以 635 nm 光源(照光劑量為 2 J/cm<sup>2</sup>)進行光動力照光。照光後 8 小時將培養液移除，以 Leica TCS SP8 光譜式共軛焦顯微鏡系統(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)觀察螢光結果(LC3-GFP fluorescence : excitation 488 nm/emission 550 nm)。

## 2.8 HAT 活性偵測

首先將 A374 或 C26 細胞種於 60 mm 培養皿中，培養 24 小時。移除培養液後，加入 1 mM ALA 培養 3 小時，以 635 nm 光源(照光劑量為 2 J/cm<sup>2</sup>)進行光動力照光。培養 2、4、8、24 小時後，移除廢液，並以 PBS 清洗兩次，以 NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Life Technologies Corporation)分離收集細胞核內蛋白質，並利用 Micro BCA™ Protein Assay Kit (Life Technologies Corporation)檢測樣品蛋白質濃度，接著使用 HAT colorimetric activity assay kit (BioVision)測定 HAT 活性。取 50 µg 蛋白質/40 µl ddH<sub>2</sub>O，加入 68 µl Assay Mix (包含 50 µl 2X HAT Assay Buffer、5 µl HAT Substrate I、5 µl HAT Substrate II、8 µl NADH Generating Enzyme)，於 37°C 培養 1 小時，使用 microplate readers (Amersham Biosciences)檢測於波長 440 nm 之吸光值。

## 2.9 HDAC 活性偵測

首先將 A374 或 C26 細胞種於 60 mm 培養皿中，培養 24 小時。移除培養液後，加入 1 mM ALA 培養 3 小時，以 635 nm 光源(照光劑量為 2 J/cm<sup>2</sup>)進行光動力照光。培養 2、4、8、24 小時後，移除廢液，並以 PBS 清洗兩次，以 NE-PER™

Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Life Technologies Corporation) 分離收集細胞核內蛋白質，並利用 Micro BCA™ Protein Assay Kit (Life Technologies Corporation) 檢測樣品蛋白質濃度，接著使用 HDAC colorimetric activity assay kit (BioVision) 測定 HDAC 活性。取 50 μg 蛋白質/85 μl ddH<sub>2</sub>O，加入 10 μl 10X HDAC Assay Buffer 和 5 μl HDAC colorimetric substrate，於 37°C 培養 2 小時，接著加入 10 μl Lysine Developer，混和均勻後，於 37°C 培養 30 分鐘，隨後使用 microplate readers (Amersham Biosciences) 檢測於波長 405 nm 之吸光值。

## 2.10 干擾性核糖核酸(RNA interference, RNAi)

干擾性核糖核酸可特異性的抑制基因表現，是新興且有效的逆向遺傳研究技術。透過 RNAi 的應用，可使特定核糖核酸專一性地被降解，或無法轉譯成蛋白質。本論文以 short hairpin RNA (shRNA) 抑制細胞中 p300HAT 與 survivin 表現，p300HAT shRNA (TRCN0000009883, TRCN0000039886)、survivin/ BIRC5 shRNA (TRCN0000073718, TRCN0000054613) 以及 empty vector pLKO\_TRC001 (TRC1 vector) 皆由中研院 RNAiCore 核心設施購得。

shRNA TRCN	Targeting Sequence
TRCN0000009883	CAATTCCGAGACATCTTGAGA
TRCN0000039886	CCCGGTGAACTCTCCTATAAT
TRCN0000073718 (for human)	CCGCATCTCTACATTCAAGAA
TRCN0000054613 (for mouse)	GAAGAACTAACCGTCAGTGAA

## 2.11 轉染(Transfection)

轉染作用的進行主要是利用 Transfection Reagent 將 plasmid 或 siRNA 送入細胞中表達。首先以 400 μl serum-free 細胞培養液稀釋 4 μg plasmid，接著加入 6 μl

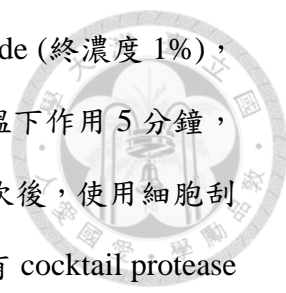
TurboFect Transfection Reagent (Life Technologies Corporation), 混和均勻, 於室溫下作用 20 分鐘。隨後將此混和液加入已種入 A375 或 C26 細胞之 6-well plate 中, 不須移除原有細胞培養液, 搖晃培養盤使其均勻分佈, 於 37°C 恆溫培養箱中培養 48 小時, 最後萃取出已轉染 plasmid 細胞的 RNA, 進行 PCR 確認目標基因是否有效的受到調控。

## 2.12 免疫沉澱技術 (Immunoprecipitation assay, IP assay)

將A374細胞種於60 mm培養盤中, 培養24小時。移除培養液後, 加入1 mM ALA培養3小時, 以635 nm光源(照光劑量為2 J/cm<sup>2</sup>)進行光動力照光。培養2、4、8、24小時後, 移除廢液, 並以PBS清洗兩次。加入500 µl RIPA buffer, 於冰上培養5分鐘, 使用細胞刮杓將細胞從培養盤上收集下來, 以14000 g離心10分鐘, 保留上清液, 儲存於-80°C。取200 µl蛋白質與10 µl p-p38抗體於4°C培養overnight, 接著加入預先清洗過之50 µl Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads (Life Technologies Corporation)混和均勻, 於室溫下作用30分鐘。隨後置於magnetic separation rack (Life Technologies Corporation)上15秒, 移除上清液, 以1X RIPA buffer潤洗三次。置於magnetic separation rack, 移除上清液, 加入40 µl 3X SDS sample buffer使pellet重新懸浮, 再置於100°C下作用5分鐘, 之後以14000 g離心1分鐘, 將上清液保留, 加入SDS-PAGE膠片樣品槽中, 並使用p38α和p38β抗體進行西方點墨法分析, 偵測p-p38α及p-p38β於光動力治療後之活化情形。

## 2.13 染色質免疫沉澱技術 (Chromatin Immunoprecipitation assay, ChIP assay)

將 A374 細胞種於 60 mm 培養盤中, 培養 24 小時。移除培養液後, 加入 1 mM ALA 培養 3 小時, 以 635 nm 光源(照光劑量為 1、1.5、2 J/cm<sup>2</sup>)進行光動力照光,



於特定時間點移除廢液，並以 PBS 清洗兩次。加入 formaldehyde (終濃度 1%)，於 37 °C 作用 10 分鐘，隨後加入 glycine (終濃度 0.125 M) 於室溫下作用 5 分鐘，以終止 formaldehyde cross-linking 的作用。接著以 PBS 潤洗兩次後，使用細胞刮杓將細胞從培養盤上收集下來，以 800 g 離心 5 分鐘，加入含有 cocktail protease inhibitors (Calbiochem®, Millipore) 的 hypotonic cell lysis buffer，於冰上培養 30 分鐘。以 5000 rpm 離心 5 分鐘後，加入 nuclear lysis buffer 使 pellet 重新懸浮，於冰上培養 1 小時，使用 ChIP dilution buffer 稀釋，並利用超音波震盪法(sonication)處理細胞溶解物，以獲得 200-1000 bp 的染色質片段，儲存於-80°C 備用，同時留取部分溶液作為 input 控制組使用。之後將樣品與特定抗體混和均勻，於 4°C 培養 overnight，以形成免疫複合物(immune complexes)。再將此 immune complexes 與 Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads (Life Technologies Corporation) 混和均勻，於 4°C 作用 2 小時，隨後置於 magnetic separation rack (Life Technologies Corporation) 上 15 秒，移除上清液，依序以 Low salt washing buffer 潤洗 5 分鐘、High salt washing buffer 潤洗 10 分鐘、LiCL washing buffer 潤洗 15 分鐘，最後以 TE buffer 潤洗 1 小時。潤洗結束後，置於 magnetic separation rack 移除上清液，加入新鮮配置的 SDS elution buffer，於室溫下作用 20 分鐘，將上清液與 5 M NaCl 置於 65 °C 水浴作用 4 小時，再加入 proteinase K，於 45 °C 水浴作用 2 小時，最後使用 DNA clean/extraction kit (GMBiolab, Taiwan) 抽取 DNA 以進行 PCR。

ChIP 試劑與抗體如下：

Hypotonic cell lysis buffer

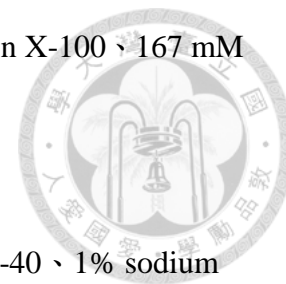
5 mM HEPES, pH 8、85 mM KCl、0.5% NP40、1 mM DTT、1 mM PMSF

nuclear lysis buffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0、10 mM EDTA、1% SDS、1 mM DTT、1 mM PMSF

ChIP dilution buffer

16.7 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA、0.01% SDS、1% Triton X-100、167 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM PMSF



Low salt washing buffer

50 mM Tris-HCl, pH 9.0、5 mM EDTA、150 mM NaCl、1% NP-40、1% sodium Deoxycholate、0.1% SDS

High salt washing buffer

50 mM Tris-HCl, pH 9.0、5 mM EDTA、300 mM NaCl、1% NP-40、1% sodium Deoxycholate、0.1% SDS

LiCl washing buffer

10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、250 mM LiCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate

Tris-EDTA (TE) buffer

10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA.

SDS elution buffer

50 mM NaHCO<sub>3</sub>、1% SDS

抗體

acetyl-NF-κB p65 (K310)抗體購自 Cell Signaling Technology。acetyl-Histone H3 抗體購自 Millipore。p300HAT 抗體購自 Novus Biologicals。

PCR primer for specific promoter

Primers	序列
human COX-2 promoter (forward)	5'-GGCAAAGACTGCGAAGAAGA-3'
human COX-2 promoter (reverse)	5'-GGGTAGGCTTTGCTGTCTGA-3'
mouse COX-2 promoter (forward)	5'-CTAATTCCACCAGTACAGATG-3'
mouse COX-2 promoter (reverse)	5'-TTCGCTGAGTCTGCGCCTAGT-3'



## 2.14 活體動物實驗

### 2.14.1 動物與腫瘤模式

分別以 syngeneic model 與 xenograft model 進行後續動物實驗。syngeneic model 使用公 BALB/cByJ 小鼠(年齡約 6-8 週大)，購自財團法人國家實驗動物中心。植入之腫瘤細胞為小鼠大腸癌 C26 細胞，以含 10% FBS 之 RPMI 1640 培養液培養，C26 細胞以皮下注射方式，植入小鼠右上背部( $2 \times 10^5$ /mouse)。xenograft model 使用公 NU/NU 小鼠(年齡約 6-8 週大)，購自樂斯科生物科技(Taiwan)。植入之腫瘤細胞為人類黑色素瘤 A375 細胞，以含 10% FBS 之 DMEM 培養液培養，並以皮下注射方式，植入小鼠右上背部( $1 \times 10^6$ /mouse)。

### 2.14.2 *In vivo* 光動力治療

動物實驗分為 2 組(每組 3 隻小鼠):(1) PEGylated Liposome Ce6 (PL-Ce6) (控制組)，(2) PL-Ce6-PDT。當 BALB/cByJ 或 NU/NU 小鼠背上腫瘤大小約在  $100 \text{ mm}^3$  左右時，以尾部靜脈注射濃度為  $1.75 \text{ mg/kg}$  之 PL-Ce6，隨後將小鼠避光 2 小時，使用波長為  $662 \text{ nm}$ ，光源強度為  $95 \text{ mW/cm}^2$  之光源進行照光，照光劑量為  $100 \text{ J/cm}^2$ ，歷時約 18 分鐘。照光後 2 小時，犧牲小鼠，取出腫瘤，萃取腫瘤蛋白質，以 HAT colorimetric activity assay kit (BioVision) 檢測 HAT 活性，並使用西方點墨法和 ChIP assay 分析蛋白質表現及蛋白質結合至特定 promoter 的程度。

### 2.14.3 *In vivo* 光動力與 HAT 抑制劑之結合型治療

#### 給予一次 HAT 抑制劑

動物實驗分為 4 組(每組 6 隻小鼠)：(1) 50% DMSO，(2) PL-Ce6-PDT，(3) PL-Ce6-PDT+NS-398，(4) PL-Ce6-PDT+AA。當 BALB/cByJ 小鼠背上 C26 腫瘤

大小約在 100 mm<sup>3</sup> 左右時，以尾部靜脈注射濃度為 1.75 mg/kg 之 PL-Ce6，隨後將小鼠避光 1 小時，再以腹腔注射 10 mg/kg NS-398 或 AA，小鼠避光 1 小時後，使用波長為 662 nm，光源強度為 95 mW/cm<sup>2</sup> 之光源進行照光，照光劑量為 100 J/cm<sup>2</sup>，歷時約 18 分鐘。照光後 3 天，犧牲小鼠，取出腫瘤並秤重紀錄。

### 持續給予 HAT 抑制劑

動物實驗分為 3 組(每組 6 隻小鼠)：(1)50% DMSO，(2)PL-Ce6-PDT，(3)PL-Ce6-PDT+AA。當 BALB/cByJ 小鼠背上 C26 腫瘤大小約在 100 mm<sup>3</sup> 左右時，以尾部靜脈注射濃度為 1.75 mg/kg 之 PL-Ce6，隨後將小鼠避光 1 小時，再以腹腔注射 10 mg/kg AA，小鼠避光 1 小時後，使用波長為 662 nm，光源強度為 95 mW/cm<sup>2</sup> 之光源進行照光，照光劑量為 100 J/cm<sup>2</sup>，歷時約 18 分鐘。之後每三天以電子測量器量測腫瘤大小，腫瘤體積計算公式：腫瘤體積 = 1/2 (最短邊)<sup>2</sup> × 最長邊。為了檢測所注射入之藥物毒性，每三天測量老鼠體重，若當藥物對老鼠有毒性，會使老鼠體重下降，而下降幅度若超過起始體重 20%，定為有顯著藥物毒性產生，故以體重變化評估藥物對老鼠之毒性。此外每天持續監控老鼠存活情形，直到老鼠死亡，而根據人道考量，當老鼠腫瘤大小超過 2500 mm<sup>3</sup> 時，便施以 CO<sub>2</sub> 安樂死。

## 2.15 統計分析

所有實驗均至少重複三次，將結果在相同的條件下以平均後以 mean ± SD 呈現。結果中，兩組結果間使用雙尾 t 檢定法(Student's t-test)或在多組比較中，使用單因子變異數統計分析法(ANOVA)，比較組間是否有意義的差異存在。當 P value < 0.05 視為有統計意義，即顯著差異存在(< 0.05 或 < 0.01 分別以 \* 或 \*\* 標示)。

### 第三章 結果



#### 3.1 光動力氧化效應透過 p300HAT 表現及活性增加，增加組蛋白乙

#### 醯化修飾

欲了解光動力治療(Photodynamic therapy, PDT)後是否會引發組蛋白乙醯化修飾(Histone acetylation)，而調控基因表現，影響腫瘤細胞存活。我們將人類黑色素瘤 A375 細胞進行 ALA-PDT 照光處理，並以西方點墨法分析其蛋白質表現情形，如 Figure 1 所示，ALA-PDT 後第 2 小時組蛋白乙醯化程度即顯著上升，隨著培養時間增加，依然維持較高的乙醯化程度，直到 PDT 後 24 小時乙醯化才逐漸下降。若給予 A375 腫瘤細胞不同光動力照光劑量，則發現乙醯化程度會隨照光劑量加強而上升(Figure 1)，顯示光動力治療後組蛋白乙醯化程度升高之現象，可能與光動力治療造成的氧化破壞程度有關。由於組蛋白乙醯化程度受到組蛋白乙醯化轉酶(Histone acetyltransferase, HAT)及組蛋白去乙醯化酶(Histone deacetylase, HDAC)這兩個重要酵素活性調控，因此分析光動力治療是否藉由改變組蛋白乙醯化轉酶或組蛋白去乙醯化酶酵素活性，而影響組蛋白乙醯化程度。檢測發現，隨著 ALA-PDT 處理後時間增加，A375 細胞中的 HAT 活性逐漸增加，於第 4 小時有最高的活性表現，之後活性會漸漸下降，此外 HAT 活性也會隨著 PDT 照光劑量加強，而有較高的活性反應(Figure 2)。HDAC 活性則是隨著 ALA-PDT 照光後培養時間增加，以及 ALA-PDT 照光劑量加強而下降(Figure 3)，顯示 ALA-PDT 後組蛋白乙醯化程度上升，可能受到 HAT 活性提升以及 HDAC 活性下降所調控。接著進一步探討光動力治療後，這兩個酵素活性的改變是否源自於基因層次表現的影響，因此各檢測三個重要的 HAT 基因 p300、PCAF 和 GCN5，以及 HDAC 基因 HDAC1、HDAC2 和 HDAC3 在光動力治療後的表現情形。由 Figure 4 得知，p300 mRNA 會於 ALA-PDT 照光治療 2 小時後顯著上升，

而使用 ROS 抑制劑 N-acetylcysteine (NAC)共同處理，能成功抑制 ALA-PDT 誘發之 p300 mRNA 表現，然而 PCAF 和 GCN5 之 mRNA 則在 ALA-PDT 後無明顯改變。檢測 HDAC1、HDAC2 和 HDAC3 之 mRNA 則在 ALA-PDT 後皆無明顯變化(Figure 5)。

### 3.2 光動力氧化效應藉由 p300HAT 所引發之組蛋白乙醯化修飾，增加 COX-2 基因轉錄

組蛋白乙醯化修飾的改變意味著在 ALA-PDT 處理後，細胞中有部分基因表現可能因此受到調控，前人文獻已知光動力作用會引發細胞中 pro-survival 蛋白質 COX-2 表現，而影響細胞存活[194, 195]。另外也有文獻報導，發現 COX-2 基因表現能直接受到組蛋白乙醯化提升而增加[224-226]。因此我們欲探討光動力氧化壓力是否會藉由組蛋白乙醯化程度上升，而增加 pro-survival 蛋白質 COX-2 表達。首先在 Figure 6 實驗中，我們確認除了基因層次外，COX-2 蛋白質表現也明顯受到 ALA-PDT 效應影響，隨著照光後時間增加及照光劑量提升，皆能顯著促進 COX-2 表達。結果顯示 COX-2 於照光後 2 小時即會表現，在第 8 小時會達到最高的表現量，24 小時後表現量會開始逐漸下降。若使用組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 anacardic acid (AA)抑制 ALA-PDT 引發之 HAT 活性上升，如 Figure 7A 所示，會顯著抑制 PDT 誘發之 COX-2 基因表現。分析蛋白質層次，發現以 AA 抑制 ALA-PDT 後乙醯化上升現象，將能成功阻止 ALA-PDT 誘發之 COX-2 蛋白質表現(Figure 7B)，顯示光動力氧化效應所引起的組蛋白乙醯化可能與上升的 COX-2 表現有關。

由 Figure 4 已知 p300 可能為 ALA-PDT 後調控 HAT 活性及組蛋白乙醯化修飾的重要因子，我們接著使用 RNAi 技術抑制 p300 表現，觀察對於 COX-2 表達的影響。首先以分別以#3 和#6 shp300 成功抑制 A375 細胞中 p300 的 mRNA 表現 (#3 和#6 shp300 之 knockdown 效率分別為 40%和 50%) (Figure 8)，接著將轉

染#3 和#6 shp300 的 A375 細胞株處以 ALA-PDT，發現皆能顯著抑制因光動力氧化效應提升之 p300 及 COX-2 mRNA 表現量(Figure 8)。更進一步使用 knockdown 效率較高的#6 shp300 處理 A375 細胞株，並進行 ALA-PDT，以西方點墨法檢測蛋白質表現，實驗發現#6 shp300 能有效抑制細胞內 p300 蛋白質表現(Figure 9A)，轉染#6 shp300 且給予 ALA-PDT 組別能成功降低光動力效應所引發的 p300 蛋白質表達(Figure 9A)，進而減少細胞中組蛋白乙醯化程度(Figure 9B)，最後更觀察到其細胞內 COX-2 蛋白質表達，會因此而大幅下降(Figure 9C)，顯示 ALA-PDT 可藉由 p300 基因及蛋白質表達，促使組蛋白乙醯化，增加 COX-2 等 pro-survival 蛋白質表現，進而調控細胞存亡。

為了更加確認組蛋白乙醯化上升與 COX-2 基因表達之間的關聯性，我們使用染色質免疫沉澱技術(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP assay) 針對 COX-2 基因啟動子(promoter) 位置進行分析，Figure 10A 為實驗設計針對 COX-2 promoter (-320 to +107)的 forward 和 reverse primers，PCR 產物大小約為 427 bp。進行 ChIP 前，我們以 ALA-PDT 處理 A375 細胞株，固定染色質(chromatins)後，利用專一的 anti-acetyl H3 或 p300 抗體進行抗體-染色質免疫反應，最後以 PCR 反應檢視 ALA-PDT 後乙醯化組蛋白或 p300 蛋白質對 COX-2 promoter 的結合情形。由 Figure 10B 可知，隨著 ALA-PDT 照光劑量增強，有更多的 p300 蛋白質被吸引並結合至 COX-2 promoter 上，致使 COX-2 promoter 位置上大量組蛋白被 p300 乙醯化修飾，此區域的組蛋白乙醯化程度因此上升，使 COX-2 promoter 與組蛋白間纏繞更為疏鬆，利於轉錄因子(transcription factor)結合至 promoter 位置，進而加強 COX-2 基因轉錄。

### 3.3 光動力氧化效應透過 p38MAPK 訊息調控 p300HAT 表現、活性及組蛋白乙醯化修飾，加強 COX-2 基因轉錄



已知 ALA-PDT 會透過 p300 基因及蛋白質表達，促使組蛋白乙醯化上升，加強 COX-2 表現。為探究光動力氧化效應後，調節 p300 表現或活性的上游因子，我們參考過去文獻，發現光動力作用能藉由 p38MAPK 活化路徑引發 COX-2 表達[194, 197]，且 p38MAPK 被報導與 p300 活化有關[229]，因此我們推測 p38MAPK 可能是光動力氧化效應下，導致 p300 表現及活性上升的關鍵因子。首先我們確認 ALA-PDT 後 2 小時磷酸化 p38MAPK 顯著增加，且隨著 PDT 照光劑量增加，其磷酸化現象更趨明顯，表示在光動力氧化效應後很短的時間內就會引發 p38MAPK 路徑活化(Figure 11A)。p38MAPK 存在於不同 isoforms，其中當 p38 $\alpha$  受刺激而活化，被認為會促進細胞死亡，而 p38 $\beta$  的活化則會啟動細胞存活訊息，阻止細胞進行凋亡[93-96]。因此進一步檢測 p38MAPK 其中兩種 isoforms p38 $\alpha$  及 p38 $\beta$  的活化情形，實驗發現 p38 $\alpha$  及 p38 $\beta$  皆會在光動力作用後活化(Figure 11B)，顯示 ALA-PDT 產生的氧化壓力除了誘發細胞死亡外，也會藉由 p38 $\beta$  之活化，引發保護細胞存活之訊息調控，及下游促存活基因表現，導致部分細胞能存活下來。接下來使用 p38MAPK 專一性抑制劑 SB203580 結合 ALA-PDT，觀察是否影響光動力效應後 COX-2 表現量。實驗發現，抑制 ALA-PDT 後 p38MAPK 活化，將大幅抑制 COX-2 mRNA 表現(Figure 12A)。利用西方點墨法檢測蛋白質表現，發現 p38MAPK 抑制劑 SB203580 能顯著抑制 ALA-PDT 後 p38MAPK 磷酸化現象，並因此降低 ALA-PDT 後 COX-2 蛋白質表現(Figure 12B)，意味 ALA-PDT 後 p38MAPK 的活化，在 COX-2 表達上扮演相當重要角色。

更進一步，我們想了解光動力氧化效應後 p38MAPK 的活化是否與 p300 活化及組蛋白乙醯化上升有所關連，進而控制下游 COX-2 基因轉錄。分析乙醯化重要酵素 p300 活性及表現，發現使用 p38MAPK 抑制劑能顯著降低 ALA-PDT

後上升的 p300 mRNA 表現量和 HAT 活性，因此顯著抑制 ALA-PDT 後組蛋白乙醯化上升(Figure 13)，顯示 ALA-PDT 會經由 p38MAPK 路徑提升 p300 mRNA 表現及活性，增加組蛋白乙醯化修飾，最後加強 COX-2 基因轉錄。

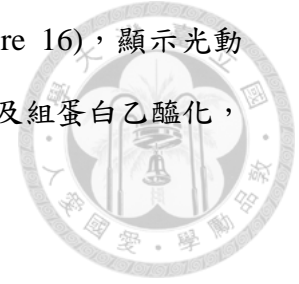


### 3.4 光動力氧化效應會藉由 p300HAT 增加 COX-2 轉錄因子 NF- $\kappa$ B 之乙醯化修飾，促進其對 COX-2 之轉錄活性

過去文獻分析 COX-2 基因 promoter 位置，發現有幾個重要的轉錄因子包括 cAMP responsive element (CRE)、NF-IL6、AP-2、SP-1、NF- $\kappa$ B 以及 STAT[187]。其中 NF- $\kappa$ B 被認為在光動力氧化效應中扮演重要的角色，參與在調控細胞死亡路徑[230]。前人研究發現光動力治療會引發 NF- $\kappa$ B 抑制者 I $\kappa$ B 降解，引起 NF- $\kappa$ B 活化後，進入細胞核內助於基因表現[230]。研究也發現細胞中的 HAT 除了會乙醯化組蛋白外，也會乙醯化核內其他蛋白質，其中 NF- $\kappa$ B 被報導其 lysine310 位置乙醯化會加強其轉錄活性，有助於基因表達[108, 109]。因此，我們將檢測在 ALA-PDT 後，活化的 HAT 除了會乙醯化組蛋白外，是否會對細胞核內的 NF- $\kappa$ B 進行特定位置的乙醯化修飾，而加強其對 COX-2 基因轉錄能力。實驗發現 NF- $\kappa$ B K310 (lysine310) 乙醯化程度隨著光動力處理後培養時間增加，或照光強度提升，而大幅增加(Figure 14)。

欲確認是否是透過 p38MAPK 活化 HAT 活性，造成 NF- $\kappa$ B 乙醯化，我們利用 p38MAPK 抑制劑 SB203580 處理後，再進行 ALA-PDT。實驗結果現顯示 ALA-PDT 誘發的 NF- $\kappa$ B 乙醯化，會因為 p38MAPK 活化受到抑制而降低(Figure 15A)。接下來分別利用 HAT 抑制劑 AA 或 shp300 減低 p300HAT 活性及表現，如 Figure 15B 和 C 所示，ALA-PDT 後上升的 NF- $\kappa$ B 乙醯化，會因 p300HAT 活性或基因表現下降而降低。為了解 NF- $\kappa$ B 乙醯化程度提升與 COX-2 基因表達之間的關聯性，我們使用 ChIP assay 分析乙醯化 NF- $\kappa$ B 是否直接結合於 COX-2 promoter，而增加 COX-2 基因轉錄。實驗結果發現隨著 ALA-PDT 照光劑量增強，

有更多乙醯化 NF- $\kappa$ B 被吸引並結合至 COX-2 promoter 上(Figure 16)，顯示光動力治療會透過 p38MAPK-p300HAT，引發細胞核內 NF- $\kappa$ B K310 及組蛋白乙醯化，增加對 COX-2 基因轉錄能力。



### 3.5 Ce6-PDT 藉由 p38-p300HAT-acetylation 增加 COX-2 轉錄表現

已知 ALA-PDT 會透過 p38MAPK 活化路徑，提升 p300 mRNA 表現及活性，增加組蛋白與 NF- $\kappa$ B 乙醯化修飾，促進人類黑色素瘤 A375 細胞中 COX-2 基因轉錄。為確認此現象非細胞株專一性或光感物質專一性所造成的結果，我們分別使用來自小鼠大腸癌的 C26 細胞以及另一種光感物質 Chlorin e6 (Ce6) 觀察經光動力治療後 HAT 活性是否改變。實驗結果顯示，於 A375 細胞處以 Ce6-PDT (Figure 17A)或是在 C26 細胞進行 ALA-PDT (Figure 18A) 皆會使 HAT 活性顯著提升。接著檢測經過上述處理後，細胞中 COX-2 蛋白質表現及組蛋白乙醯化修飾情形，實驗結果與 ALA-PDT 作用於 A375 細胞類似，以 Ce6-PDT 處理 A375 細胞(Figure 17B) 或是以 ALA-PDT 處理 C26 細胞株(Figure 18B) 皆會促使大量 COX-2 蛋白質表現，同時我們也觀察到 Ce6-PDT 處理後同樣會造成 A375 細胞內 p38MAPK 活化，以及細胞核內的組蛋白和 NF- $\kappa$ B 乙醯化修飾會大幅增加。ChIP assay 分析結果顯示，不論是 ALA 或是 Ce6 誘發的光動力效應，皆會造成 A375 或 C26 細胞內 COX-2 promoter 位置，有更多的組蛋白被乙醯化修飾(Figure 17C 和 18C)，此一結果與這兩株細胞中 COX-2 蛋白質表現上升成正相關，顯示光動力治療誘發 HAT 活性上升，造成組蛋白乙醯化修飾，而促進 COX-2 表現並非細胞株專一性或光感物質專一性所造成的影響。

### 3.6 *In vivo* 光動力氧化效應會藉由 p300HAT 增加 COX-2 promoter

#### 位置乙醯化修飾，促進對 COX-2 之轉錄



已知光動力氧化效應會經由增加組蛋白乙醯化，促使 COX-2 蛋白質大量表現，為了解在活體動物上是否也是透過類似現象，而導致光動力處理後 COX-2 蛋白質表現，我們分別以皮下植有 C26 腫瘤的 BALB/c 小鼠和植有 A375 腫瘤的 NU/NU 小鼠，進行 PEGylated Liposome Ce6 (PL-Ce6)-PDT，照光後 2 小時犧牲老鼠，取出腫瘤進行後續分析。研究發現，經光動力治療後，從小鼠分離的腫瘤相較於無治療組別，皆有較高的 HAT 活性(Figure 19A 和 20A)。隨後以西方點墨法檢視蛋白質表現，實驗顯示不論是植有 C26 腫瘤的 BALB/c 小鼠和植有 A375 腫瘤的 NU/NU 小鼠，經過光動力治療後 2 小時，腫瘤部分皆會有大量 COX-2 表現，並伴隨組蛋白乙醯化現象發生(Figure 19B 和 20B)。以 ChIP 分析，經過 PL-Ce6-PDT 後 2 小時，不論 A375 腫瘤或是 C26 腫瘤皆發現細胞內 COX-2 promoter 位置有更多的組蛋白被乙醯化修飾(Figure 19C 和 20C)，而促進大量 COX-2 表現。

### 3.7 HAT 抑制劑 AA 顯著提升光動力治療對腫瘤細胞之細胞毒殺效果

已知光動力治療能藉由提升組蛋白乙醯化，促使 pro-survival 蛋白質 COX-2 表現，我們欲使用 HAT 抑制劑 AA 結合 ALA-PDT 處理腫瘤細胞，希望透過抑制 pro-survival 蛋白質 COX-2 表現，增加光動力治療之細胞毒殺效果。如同 Figure 21 所示，於 ALA-PDT 照光前 30 分鐘處以不同濃度 AA，會隨著加入的 AA 濃度增加，使細胞存活率顯著下降，顯示抑制光動力治療後提高的組蛋白乙醯化修飾，能加強細胞死亡。接著使用 colony formation assay 確認抑制光動力治療後組蛋白乙醯化程度，能有效抑制 A375 細胞存活率，除了檢測人類黑色素瘤細胞外

(Figure 22)，我們同時觀察此一現象也能在老鼠大腸癌 C26 細胞中觀察到(Figure 23)，顯示組蛋白乙醯化可能參與在調節光動力治療後細胞存亡路徑中。

### 3.8 HAT 抑制劑 AA 增加光動力治療於小鼠 C26 腫瘤之治療效應

已知光動力治療結合 HAT 抑制劑 AA 能加強細胞死亡，欲檢測此結合治療是否能應用於治療小鼠腫瘤，故以皮下植有 C26 腫瘤的 BALB/c 小鼠，進行光動力結合 HAT 抑制劑 AA 的療效檢測。首先測試單獨使用 HAT 抑制劑或 COX-2 抑制劑是否會對老鼠產生影響，當老鼠腫瘤長至約 100 mm<sup>3</sup> 大小時，以腹腔注射打入 10 mg/kg HAT 抑制劑 AA 或 10 mg/kg COX-2 抑制劑 NS-398，處理流程如 Figure 24A 所示，治療後七天犧牲小鼠，取出腫瘤秤重。實驗結果顯示，單獨使用此劑量之 AA 或 NS-398 並不會對老鼠腫瘤有治療效果(Figure 24B)。接著進行光動力治療搭配 HAT 抑制劑 AA 的療效檢測，當老鼠腫瘤長至約 100 mm<sup>3</sup> 大小時，以靜脈注射打入 1.75 mg/kg PL-Ce6，1 小時後再以腹腔注射打入 10 mg/kg HAT 抑制劑 AA 或 10 mg/kg COX-2 抑制劑 NS-398，1 小時後以波長為 662 nm，光源強度為 105 mW/cm<sup>2</sup> 之光源進行照光治療，照光劑量為 100 J/cm<sup>2</sup>。於光動力治療後三天犧牲小鼠，取出腫瘤秤重。在這樣的劑量和治療方式下，可以發現相較於只有 PL-Ce6-PDT 處理的組別，PL-Ce6-PDT 前給予 AA 對腫瘤的治療效果最佳，甚至優於 PL-Ce6-PDT 搭配 COX-2 抑制劑(Figure 25B)。

為模擬實際治療，我們以皮下植有 C26 腫瘤的 BALB/c 小鼠，進行光動力治療，並搭配長期給予 HAT 抑制劑 AA 的治療療程，長期觀察對腫瘤治療效果，以及此治療方式對罹癌老鼠存活率的影響。實驗流程為當老鼠腫瘤長至約 100 mm<sup>3</sup> 大小時，以靜脈注射打入 1.75 mg/kg PL-Ce6，1 小時後再以腹腔注射打入 10 mg/kg HAT 抑制劑 AA，1 小時後以波長為 662 nm，光源強度為 105 mW/cm<sup>2</sup> 之光源進行照光治療，照光劑量為 100 J/cm<sup>2</sup>，光動力治療後每三天測量老鼠體重與腫瘤大小。實驗結果如 Figure 26A 所示，直至光動力治療後 18 天，不論光

動力組別或是光動力結合 AA 組別，老鼠體重無明顯變化，顯示光動力治療搭配持續給予 AA 應該不會造成老鼠生理負擔。觀察腫瘤大小，發現長期給予 HAT 抑制劑 AA 能顯著增加光動力治療對腫瘤治療療效，能大幅抑制腫瘤生長 (Figure 26B)。我們同時觀察到相較於無治療或單純使用光動力治療組別，光動力搭配 AA 能有效延長老鼠壽命，提升老鼠存活情形 (Figure 26C)。

### 3.9 光動力治療結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制 pro-survival 蛋白質 survivin 表現，加強細胞死亡

先前細胞實驗中證實光動力治療前給予 AA 確實會增強細胞毒殺效果 (Figure 21、22 和 23)。然而研究卻發現光動力治療前直接給予 COX-2 抑制劑 NS-398，卻無法增加細胞毒殺效果 (Figure 27)，意味 HAT 抑制劑 AA 處理能增加細胞毒殺效益，極有可能是透過影響其他 pro-survival 蛋白質所導致的結果。除了 COX-2 外，pro-survival 蛋白質 survivin 也被報導在光動力治療後大量表現，而影響光動力效果 [176]。欲了解 HAT 抑制劑 AA 是否因為影響光動力治療後 survivin 表現，而增加細胞毒殺效果，我們利用西方點墨法分析 A375 或 C26 腫瘤細胞，經光動力治療和 HAT 抑制劑 AA 處理後之蛋白質表現，如 Figure 29 所示，單純使用光動力治療會引發 survivin 表現，而於光動力治療前加入 HAT 抑制劑 AA 處理，則會顯著抑制 survivin 表達。pro-survival 蛋白質 survivin 主要經由抑制 apoptosis 路徑中 caspases 活化，而阻止 apoptosis 發生。因此我們觀察光動力治療結合 HAT 抑制劑 AA 抑制 survivin 表現時，是否影響 caspases 活化情形。結果顯示結合型治療抑制 survivin 表現的同時，會大幅提升活化態的 caspase 3 (cleaved caspase 3) 表現，因而增加 caspase 3 對下游目標分子 PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) 的截切 (cleaved PARP) (Figure 29)。除了觀察 cleaved caspase 3 表現外，我們也證實經過光動力治療和 HAT 抑制劑處理的結合治療，確實會誘發 A375 或 C26 細胞中 caspase 3 活性大幅上升 (Figure 30)。為確認動力

治療結合 HAT 抑制劑 AA 是透過抑制 survivin 表現而增加活化態 caspase 3 表現，我們使用 shsurvivin 抑制 A375 或 C26 細胞中 survivin 表現，再以此細胞進行光動力治療。研究顯示，當抑制腫瘤細胞中正常 survivin 表現即會活化 caspase 3，抑制 survivin 表現後再進行光動力治療，則會活化更多 caspase 3，造成更多 PARP 被截切(Figure 31)，顯示光動力治療搭配 HAT 抑制劑 AA 是因為阻止 survivin 表現而加強 caspase 3 活化。

### 3.10 結合光動力治療和 HAT 抑制劑 AA 會誘發腫瘤細胞進行 apoptosis 導致細胞死亡

先前結果已知抑制 HAT 活性能藉由抑制 survivin 表現，提升 caspases 活性，而增加光動力治療之細胞毒殺效應，接下來我們將更進一步分析 HAT 抑制劑 AA 結合光動力治療是否真的引發 apoptosis 死亡路徑，導致細胞死亡。首先我們以 Hoechst 染色觀察細胞的死亡情形，Hoechst 33342 是 DNA 染劑，可以進入細胞核內與 DNA 結合，藉此來觀察細胞核中 DNA 分布情形。在細胞正常之情況下，DNA 於細胞核內分布均勻，此時可觀察到 Hoechst 33342 因染到 DNA 而均勻分布於細胞核內。然而細胞若進行 apoptosis 時，會因為核中 DNA 有濃縮(Condensation)或因內切酶作用而使 DNA 有斷裂(Fragmentation)等現象出現，而使其螢光影像之亮度增加。實驗發現在 A375 與 C26 細胞中，與不加藥、不照光之控制組、只加入 AA 組別或是單純進行光動力治療比較，細胞加入 AA 並經光動力治療後 4 小時，Hoechst 33342 螢光有增加之現象(Figure 32)，表示此時細胞核內的 DNA 產生濃縮、聚集，使得螢光量增加，推測此時細胞可能走向 apoptosis 之死亡形式。接著以 Annexin V /PI 染色進行分析，發生初期 apoptosis 時，會使細胞膜中的磷脂絲氨酸(PS, phosphatidylserine) 由細胞膜內側外翻至細胞膜外側，Annexin V 蛋白質對 PS 具有高度親合性，能結合於 PS 上，將處理過後的細胞與帶有 APC 耦合的 Annexin V 結合進行染色，再藉由流式細胞儀分析結合之多

寡來檢測細胞凋亡的程度。分析發現，不論是 A375 或是 C26 腫瘤細胞皆會因為結合光動力治療和 HAT 抑制劑 AA 處理，能偵測到更多細胞具有 Annexin V 螢光反應，統計結果也顯示結合光動力治療與 AA 會使更多腫瘤細胞走向 apoptosis 死亡型式(Figure 33 A 和 B)。最後以 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 處理細胞，以確認光動力治療搭配 AA 是否會經 caspases dependent apoptosis 路徑造成細胞死亡。在此之前，先以 Z-VAD-FMK 處理 A375 或 C26 腫瘤細胞，確認能成功抑制 PDT 結合 AA 治療後上升之 caspases 3 活性(Figure 34A)。以 MTT assay 分析，發現不論在 A375 或 C26 腫瘤細胞中，以 Z-VAD-FMK 抑制結合治療所引發之 caspases 3 活性，會降低結合治療所引發之細胞毒殺效果(Figure 34B)。由此得知，結合光動力治療及 HAT 抑制劑的結合型治療，是透過 caspase-dependent apoptosis 之細胞死亡型式導致細胞死亡。

### **3.11 HAT 抑制劑 AA 結合光動力治療會藉由提升 caspase 活性而抑制 autophagy 發生**

實驗室前人研究發現，ALA-PDT 除了透過傳統死亡路徑外，還可能經由細胞自噬(autophagy)路徑控制腫瘤細胞存活[153]。在前述實驗中，我們已發現光動力治療結合 HAT 抑制劑會抑制 survivin，而引發 caspase-dependent apoptosis，接下來欲探究除了影響 apoptosis 路徑外，是否也會改變 autophagy，造成細胞毒殺效果增加。首先分別以 MDC (monodansylcadaverine)染色與 LC3-GFP 螢光分析光動力治療搭配 HAT 抑制劑 AA 對 autophagy 現象的影響。其中 MDC 染劑能與細胞自噬而產生的酸性囊狀胞器自噬體(autophagosomes)相結合，另外 LC3-GFP 結合蛋白則是能結合至 autophagosome 上，而能檢測 autophagosomes 形成，助於判斷 autophagy 是否發生。實驗發現，於 A375 或 C26 腫瘤細胞處理 ALA-PDT，與只加入 ALA 不照光或加入 ALA 和 AA 不照光的組別相比較，皆能觀察到顯著聚集的 MDC 及 LC3-GFP 螢光，然而此一現象在 ALA-PDT 搭配 AA 處理後則觀察

不到(Figure 35 和 36)，顯示加入 HAT 抑制劑 AA 會影響原本光動力治療引發的細胞自噬現象。過去文獻報導 apoptosis 與 autophagy 這兩種調控細胞存活、死亡的路徑之間可能存在互相結抗的關係[160]，而我們先前觀察到結合 PDT 與 AA 會促進 apoptosis 發生，於此又發現此結合治療會抑制 autophagy，接下來我們欲探討細胞處以光動力治療結合 HAT 抑制劑 AA 後，其引發之 apoptosis 與 autophagy 之間是否有所關連。實驗在 ALA-PDT 與 HAT 抑制劑 AA 結合治療組別中，再加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 抑制其活化的 caspase 活性，分別以 MDC 染色與 LC3-GFP 螢光進行 autophagy 分析，結果發現原本在 ALA-PDT 與 AA 結合治療組別中被抑制的 autophagosomes 螢光，在阻止 caspases 活化後，能重新觀察到螢光聚集亮點(Figure 37 和 38)，意味可能在 ALA-PDT 結合 AA 處理下會經由活化 caspases，抑制 autophagy 發生。過去文獻報導，在 autophagy 形成初期扮演關鍵角色的蛋白質 Beclin-1 胺基酸序列中，比對出能被 caspases 截切的序列，並證實原本分子量大小約為 60 kDa 的 Beclin-1 會受到活化的 caspases 剪切成大小約 35kDa 的片段，而失去原本功能，進而抑制 autophagy 形成[231]。因此我們將檢測 ALA-PDT 結合 AA 處理下，以及於結合治療中加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 之後，Beclin-1 蛋白質表現情形。如 Figure 39 所示，當 ALA-PDT 搭配 HAT 抑制劑 AA 處理引發 caspase 3 活化時，能偵測 Beclin-1 被切成大小約 35kDa 的片段出現，而若加入 Z-VAD-FMK 抑制 caspase 3 活性後，則會減少 Beclin-1 被分解。結合以上，顯示 ALA-PDT 結合 AA 處理會藉由提升 caspases 活性，導致 autophagy 關鍵蛋白質 Beclin-1 分解，因而抑制 autophagy 發生。

## 第四章 討論



### 4.1 光動力治療會引發 p38MAPK-p300HAT-hyperacetylation

本研究證實光動力治療後，會藉由引發 p38MAPK 活化，增加 p300HAT 活性，造成組蛋白乙醯化增加，促使促存活蛋白質轉錄。過去本實驗室曾經檢測老鼠嗜鉻細胞瘤 PC12 細胞，經過 ALA-PDT 後 MAPKs 活化情形，發現 p38MAPK 會快速地在 ALA-PDT 後 15 分鐘，即有磷酸化現象發生，而加入 ROS scavenger NAC 能有效抑制 p38MAPK 的磷酸化修飾[232]。本研究中也於 ALA-PDT 後 2 小時(最短的檢測時間點)，偵測到 p38MAPK 活化的跡象，顯示 ALA-PDT 後引發的氧化壓力，能很快的引發 p38MAPK 活化。接著於 ALA-PDT 後 2 小時，檢測到 p300HAT 活性開始上升，使用 p38MAPK 抑制劑 SB203580 能顯著阻止 ALA-PDT 後升高的 HAT 活性，意味光動力治療後是透過 p38MAPK 訊息路徑的活化，使 HAT 活性上升。研究中，p300HAT 活性自 ALA-PDT 後 2 小時逐漸升高，至 4 小時達到活性高峰，隨後開始逐步下降，如此的結果，與觀察到的組蛋白乙醯化程度增加時間點符合。ALA-PDT 後 HAT 活性開始上升(第二小時)，即能觀測到組蛋白乙醯化隨之升高，一直到 8 小時以後，乙醯化程度才有所降低。在 NF- $\kappa$ B 乙醯化修飾方面，能觀察到同樣自第二小時之後有所上升，不同的是，NF- $\kappa$ B 乙醯化直至 ALA-PDT 後 24 小時，還是保持在高度乙醯化狀態，推測與 HDAC 活性此時依然處於低活性有關。而受到組蛋白和 NF- $\kappa$ B 乙醯化程度上升影響，COX-2 和 survivin 蛋白質表現量自 ALA-PDT 後第 2 小時開始上升，到第 8 小時達到其蛋白質表現量最高峰，之後漸漸下降，直到第 24 小時，表現量依然高於未經照光處理組別，而使用 HAT 抑制劑 AA 能有效抑制 ALA-PDT 後上升的 COX-2 和 survivin 蛋白質表現量，顯示這些促存活蛋白質的表現，確實是受到 HAT 活性上升所導致的結果。本論文首次證實光動力治療能藉由 p38MAPK 路徑，提升 HATs 活性，而造成光動力治療後細胞內整體乙醯化程度上升之現象，

透過此一系列訊息傳遞過程(Figure 40)，最終進而調控細胞內促存活蛋白質之表現，保護細胞，免於光動力氧化破壞。



## 4.2 光動力治療與乙醯化修飾

過去部分研究曾提到，光動力治療會造成細胞乙醯化修飾的改變，如：2009年 Flores-Ancona 等人使用 ALA-PDT 應用於人類星狀細胞瘤(Human astrocytoma) U373-MG 和 D54-MG 細胞株治療，經由免疫組織染色，首次發現 ALA-PDT 會引起細胞內 histone H4 乙醯化程度上升[219]；同年，Mamoon 團隊指出以光感物質 Indocyanine green (ICG)引發之光動力氧化效應處理人類皮膚黑色素瘤(Human skin melanoma) Sk-Mel-28 細胞株，會顯著抑制細胞中 HDAC 活性[220]；Gamal-Eldeen 等人於 2013 年發表使用 ICG-PDT 治療以致癌物 DMBA/TPA 誘導 CD1 小鼠生成之皮膚癌，同樣發現會引起 HDAC 活性大幅下降[233]；而 Demyanenko 等人經由 Proteomic study 發現 ALA-PDT 處理後之 CD1 小鼠，許多影響乙醯化修飾之蛋白質表現發生改變[234]。文獻中雖然曾提及光動力治療將造成細胞啟動 epigenetic processes，但對於這樣的改變究竟會造成細胞中何種轉錄影響以及生理反應並沒有更深入的研究探討。而在本篇論文中，首次證實光動力氧化效應會引起 p300HAT 活化，增加對組蛋白乙醯化修飾，而促進下游包含 COX-2、survivin 等基因轉錄。使用 ALA-PDT( $2 \text{ J/cm}^2$ )後 2 小時，即會引發 p300HAT mRNA 表現，而 p300HAT mRNA 表現的增加，反映在 HAT 活性上，使 HAT 活性於 ALA-PDT 後顯著上升(Figure 2)。雖然在 ALA-PDT 後無觀察到 HDAC1、HDAC2 或 HDAC3 mRNA 有所改變，但 HDAC 活性依然隨光動力作用後時間增加，呈現明顯下降的趨勢(Figure 3)。而細胞中整體組蛋白乙醯化程度，受到 ALA-PDT 後 HAT 活性上升和 HDAC 活性下降之影響，呈現顯著上升(Figure 1)，這樣的結果與過去文獻報導以不同光感物質引發之光動力治療可能會促進組蛋白乙醯化修飾增加相符合。除此之外，本論文更進一步發現此現象與促存活因

子 COX-2、survivin 大量表現有關(Figure 10 和 27)，這樣的結果首次說明了，光動力治療後所產生的乙醯化修飾提升，是腫瘤細胞為因應光動力效應所帶來破壞的重要方式之一。



### 4.3 氧化壓力與乙醯化修飾

事實上，除了光動力治療會造成組蛋白乙醯化修飾改變外，有許多不同介質或藥物處理產生的氧化壓力，也被報導會藉由改變乙醯化修飾來調節基因表現，以因應氧化壓力帶來的影響[212]。像是 Fiona M 等人發現以香菸濃縮物(cigarette smoke condensate, CSC)或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理人類肺泡上皮細胞，會引發細胞之氧化壓力增加，使 HDAC 活性和 HDAC2 表現下降，使 histone H4 乙醯化顯著上升，促使發炎相關基因之表現[235]。此外有研究指出，會引發慢性肺部及新血管疾病的環境細懸浮微粒 PM10，能經由誘發細胞產生 ROS，進而活化 HATs 活性與 histone H4 乙醯化修飾，導致 IL-8 表現[236]。近年來，研究指出氧化壓力與阿茲海默症 Alzheimer's disease (AD) 等神經退化疾病之致病有密切關係，2013 年 Gu 等人檢測人類神經母細胞瘤(Human neuroblastoma) SH-SY5Y 細胞經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理下，會導致 amyloid- $\beta$  (A $\beta$ )大量表現，探究結果發現，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理下會誘導 p300HAT 上升及 HDAC3 的下降，因而造成 A $\beta$  表現，作者推測氧化壓力會透過引發組蛋白乙醯化改變，影響疾病的發生或發展[237]。以上研究均顯示氧化壓力下，細胞會透過增加乙醯化修飾，以因應氧化壓力帶來的影響，這也符合本篇研究所發現，使用 ALA-PDT(2 J/cm<sup>2</sup>)後 2 小時，即能觀察到 p300HAT mRNA 表現上升，以 ROS 抑制劑 NAC 阻止 ALA-PDT 後氧化壓力產生，會抑制 p300HAT mRNA 的升高(Figure 4)，說明光動力作用是經由氧化壓力引發細胞產生反應，在短時間內使 p300HAT 表現上升，因而促使乙醯化程度上升，增加 COX-2、survivin 等基因轉錄，讓腫瘤細胞得以避免死亡而存活下來。



#### 4.4 HATs 與 HDACs 活性改變之調控


於本論文中，首次發現於光動力治療後提升的組蛋白乙醯化程度，會影響基因轉錄，此外更發現光動力治療後組蛋白乙醯化修飾的增加，主要是受到光動力治療後 HATs 活性的上升、HDACs 活性下降所影響，接下來將分別針對光動力治療後，HATs 和 HDACs 活性如何被調控進行探討。

近年來許多證據顯示，HATs 的活性高低除了與其蛋白質表現量有關外，也會透過各種轉譯後修飾，如：MAPK 或 AKT 等 kinase 磷酸化修飾所調節。如 2001 年發表的研究指出，給予造血細胞(hematopoietic cell)顆粒性白血球聚落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)藉此誘發 cytokine 刺激，會活 MAPK 路徑，促進 p300HAT 活化，並結合至 myeloid differentiation-associated genes, myeloperoxidase (MPO)啟動子，協助 MPO 表達[238]。另外研究也發現，UV 引發之組蛋白乙醯化會因為加入 p38MAPK 抑制劑而下降，並減少 NER 因子 XPC、TFIIH 結合至 DNA 受損位置，顯示 UV 照射導致的組蛋白乙醯化是經由 p38MAPK 活化路徑所調節[239]。而在我們的研究中發現，p38MAPK 的活化也是調控光動力治療後，p300HAT 活性上升的重要訊息(Figure 13)。深入探究 MAPK 或 AKT 活化是如何調控組蛋白乙醯化程度，與其活化後能磷酸化 HATs 蛋白質有關。文獻指出 ERK 的活化會磷酸化 HAT，促進其組蛋白乙醯化轉酶活性[240]。而 Chen 團隊證實 AKT 對於 p300HAT Serine 1834 位置進行磷酸化，能增加 p300HAT 組蛋白乙醯化轉酶活性[241]。2013 年 Wang 等人研究也顯示，p38MAPK 和 Akt 能磷酸化 p300HAT Serine 1834 位置，進而增加對組蛋白乙醯化，提升 chromatin relaxation [229]，因此我推論於本研究中發現 p300HAT 活性的上升，除了與其 mRNA 表現量增加有關外，也同時與 p38MAPK 活化後對 p300HAT 磷酸化修飾有所關聯。未來的研究能以西方點墨法檢測光動力治療後，

p300HAT 蛋白質是否確實增加，另外可以觀察 p300HAT 蛋白質是否有磷酸化情形發生，以確認光動力治療後如何調控 p300HAT 活性，並瞭解光動力治療後 p38MAPK 之活化，在調節 p300HAT 活性上所扮演的角色。



HDACs 的活性則被報導會受到許多種方式所調控，包含(1)其蛋白質表現量、(2)其蛋白質 dimer 組成和(3)蛋白質轉譯後修飾，如：磷酸化、乙醯化、泛素化等。本論文雖然於光動力治療後，檢測到整體細胞核內 HDACs 活性下降，但未能觀察到 HDAC1、HDAC2 或 HDACs3 等第一型 HDACs 的 mRNA 有所改變，由於 HDACs 具有多種家族，未來若能針對其他家族 mRNA 和蛋白質進行分析，才能了解光動力治療對於 HDACs 基因或蛋白質表現量之影響，並確認其改變是否會調控光動力治療後 HDACs 之活性。而過去研究發現 HDACs 會兩兩會形成 homo-或 heterodimers，研究發現 HDACs 須以 dimers 形式才具有活性[242-244]，如果破壞 dimers 組合將抑制 HDACs 活性[244]。曾有文獻報導，腺病毒(adenoviral)蛋白質 GAM1 會藉由結合至 HDAC1 的 N-terminal 區域，迫使 HDAC1 homodimer 或 HDAC1/HDAC2 heterodimer 分離，而抑制 HDACs 活性[245]。除此之外，蛋白質轉譯後修飾對 HDACs 活性也會有所影響，HDACs 被發現會受到各種轉譯後修飾而改變活性。在 HDACs 磷酸化修飾部分，Pflum 等人首先證實 casein kinase 2 (CK2)會磷酸化 HDAC1 蛋白質上 Serine 421 和 Serine 423，增加 HDACs 的活性[246]。但若是磷酸化位置是在 HDAC1 上 Serine 406 或 HDAC2 上 Serine 407 時，則是會抑制 HDACs 活性[247]。另外 HDAC3 能被 CK2 磷酸化於 Serine 424 位置而增加 HDACs 活性[248]。而 HDAC8 則是經由 PKA 磷酸化其 Serine 39 處來抑制活性[249]，目前已陸續發現各種 HDACs 會被磷酸化修飾的特定位置，不同刺激來源會引發不同的位置的磷酸化修飾，而導致截然不同之活性調控。雖然過去未曾報導過 p38MAPK 對於 HDACs 會進行磷酸化修飾，但是光動力治療引發的氧化壓力，被認為能引發複雜的訊息分子活化，所以 HDACs 的活性可能會受到光動力治療後其他活化的 kinase 磷酸化影響，而抑制其活性。除了磷酸化之



外，HDACs 乙醯化修飾也是調節其活性的方式之一，不同 HDACs 有各種被乙醯化修飾的特定位置，其中對於 HDAC1 乙醯化修飾之研究最多，其 Lysine 218、220、432、438、439 和 441 被報導會被接上乙醯基，影響其活性[250]，而 Lysine 432 位置若受到乙醯化修飾，會使 HDAC 活性顯著降低[251]，研究更顯示 p300HAT 是主要能乙醯化 HDAC1 的 HAT 蛋白質[250]，因此本論文中發現的 p300HAT 活性增加，也可能會對 HDACs 進行乙醯化修飾，而抑制其活性。未來可使用 p300HAT 抑制劑，分析光動力治療後 p300HAT 對 HDAC 活性之影響，並可利用西方點墨法檢測光動力治療後，HDACs 乙醯化程度是否有所變化，而致使活性下降。此外，泛素化修飾也是能影響 HDACs 活性的轉譯後修飾之一。過去報告指出，泛素化修飾 HDACs 的結果，會引起細胞中組蛋白過度乙醯化修飾[252]。研究顯示，HDAC1、HDAC2 和 HDAC4 會受到 polyubiquitination 修飾，經由蛋白酶體系統(proteasome machinery)，而分解 HDAC 蛋白質，如此的結果可能會使得細胞內整體 HDAC 活性大幅下降[253-256]。過去的研究曾發現光動力治療後，會引發細胞內大量蛋白質泛素化[257]，未來可檢測 HDACs 泛素化修飾是否會因光動力作用而增加，以確認光動力治療下，泛素化修飾對 HDAC 蛋白質之影響。

本論文中，我們發現光動力治療後 HATs 活性增加(Figure 2)，推測除了與 p300 基因表現上升有關外(Figure 4)，可能也受到 p38MAPK 能磷酸化修飾 p300HAT 影響。另外雖然光動力治療後 HDACs mRNA 表現沒有明顯變化(Figure 5)，但仍然檢測到 HDACs 活性下降(Figure 3)，則可能是 HDACs 蛋白質受到磷酸化、乙醯化甚至是泛素化等轉譯後修飾所造成的結果，而這些推論還有待更多實驗深入探討才能加以證實。



#### 4.5 光動力治療與 p38MAPK 活化

p38MAPK 的活化，被認為與光動力治療後細胞存亡調節有相當密切的關係。曾有文獻發現 p38 MAPK 抑制劑能抑制 hypericin-PDT 誘發之 COX-2 表現，並增加人類子宮頸癌 HeLa 細胞或人類膀胱癌 T24 細胞毒殺效果，相對地，若過度表現 WT-p38MAPK，則會提升細胞對 PDT apoptosis 的抗性[194]。然而卻有部分學者的研究指出，使用 p38 MAPK 抑制劑會避免 PDT 後的腫瘤細胞走向死亡[258]。同樣是於 PDT 後引發 p38MAPK 活化，卻對細胞卻有不同影響，如此的結果可能與其活化的是哪種 p38MAPK isoforms 有關。目前已知 p38MAPK 有 4 種不同 isoforms，包括 p38 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ ，所有 isoforms 皆能被 MAPK kinase 磷酸化修飾，活化其下游訊息路徑。近年來研究證實，會因為活化的 isoform 不同，會有促進死亡或抑制死亡兩種截然不同的結果。雖然 p38MAPK 訊息傳遞最終導致細胞走向存活抑或死亡，會因細胞所遭遇的刺激或細胞類型而有所差異，但許多證據顯示當 p38 $\alpha$  被活化時會啟動 proapoptotic 訊息傳達，而 p38 $\beta$  被活化時將促使細胞表現 prosurvival 訊息[93-96]。而本研究所使用之光感物質及照光劑量下所產生的光動力氧化效應，會在短時間內誘發 p38MAPK 活化，加入 p38MAPK 抑制劑則提升細胞毒殺效應，顯示 ALA-PDT 後 p38MAPK 的活化，可能是為了避免細胞死亡發生。欲了解 p38MAPK 活化是否與我們預期相同，是導致細胞存活的重要訊息，因此檢測 p38MAPK 其中兩種 isoforms，p38 $\alpha$  及 p38 $\beta$  的活化情形。實驗發現 p38 $\alpha$  及 p38 $\beta$  皆會在光動力作用後活化(Figure 11B)，如此結果顯示光動力氧化壓力下，除了會透過 p38 $\alpha$  活化造成細胞死亡外，也同時會引發 p38 $\beta$  活化，而促進促存活因子訊息傳遞，使得腫瘤細胞有機會在光動力氧化壓力下，修復損傷而存活。文獻也曾分析以不同光感物質引發之光動力作用所調節的 p38MAPK isoforms，發現以 siRNA Knockdown p38 $\beta$  會增進 hypericin 引發之光動力細胞毒殺效應[259]。使用光感物質 Zn-BC-AM 引發之光動力作用，會很快活化

p38MAPK，而以 siRNA Knockdown p38 $\beta$  能顯著增加 Zn-BC-AM-PDT 所造成的 apoptosis[260]。這些文獻報導顯示於不只是 ALA 或 Ce6-PDT，不同光感物質引發之光動力氧化效應，可能會藉由誘導細胞中 p38 $\beta$  活化，而得以存活下來。除了 p38MAPK 在光動力效應下的角色外，目前對光動力治療後 p38MAPK 活化所影響的下游目標也還尚未明瞭，在本論文中，我們首次證實光動力氧化效應所引發之 p38MAPK 活化會影響 p300HAT 表現及 HAT 活性，而加強對於 pro-survival 蛋白質 COX-2 啟動子的組蛋白乙醯化修飾，增加 COX-2 表現(Figure 10B)。而 p38MAPK 對其下游因子 p300HAT 表現及 HAT 活性之調控，除了提升組蛋白乙醯化修飾外，也增加對轉錄因子 NF- $\kappa$ B 之乙醯化修飾，因此能間接加強 NF- $\kappa$ B 對 COX-2 啟動子的轉錄活性(Figure 14)。這些實驗首次證實光動力治療會藉由提升 p38MAPK 訊息傳遞，促使 p300HAT 活性升高，同時乙醯化修飾 COX-2 啟動子上組蛋白及轉錄因子 NF- $\kappa$ B，而促進 COX-2 轉錄。

#### 4.6 光動力氧化效應下 COX-2 轉錄機轉之探討

過去 Hendrickx 等人的研究認為，雖然於 hypericin-PDT 後發現會活化 NF- $\kappa$ B，但是 hypericin-PDT 所引發之 p38MAPK 活化所導致的 COX-2 表現，並非經由 NF- $\kappa$ B 所調控[194]。這樣的結果與本論文中發現光動力治療後會引發 HAT 活性，乙醯化 NF- $\kappa$ B 而增加其轉錄活性，幫助 COX-2 表現的結果不盡相同。雖然兩種發現彼此之間略有矛盾，但依舊能夠解釋為何會有如此差異，可能原因之一是因為光動力氧化效應所產生的作用，與其使用的光感物質和照光劑量有關，更受到其產生氧化壓力破壞的位置的影響，可能因此有所差異。此外我們跟 Hendrickx 等人研究結果不同，也可能與實驗驗證方法有關。正常時，NF- $\kappa$ B 會與 NF- $\kappa$ B 的抑制蛋白 I $\kappa$ B 結合，以不活化態存於細胞質中；一旦細胞受到刺激後，透過一連串的訊息傳遞，I $\kappa$ B kinase (IKK) complex 會使得 I $\kappa$ B 磷酸化，導致 I $\kappa$ B 能被 ubiquitin ligase Skp1-cullin-1-F-box SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> complex 所辨識而接上 poly-ubiquitin，

進而被帶到蛋白酶體(Proteasome)中降解(ubiquitination)，此時被釋放自由的 NF- $\kappa$ B 便進入細胞核[261, 262]。進入細胞核內後，會與被調控基因的啟動子結合進而促使基因表現。除了以 I $\kappa$ B 調控 NF- $\kappa$ B 活化與否外，近年來轉譯後修飾(post-translational modification)被認為同樣是影響 NF- $\kappa$ B 活性的重要因素，其中 NF- $\kappa$ B 的磷酸化、乙醯化、甲基化及泛素化等修飾及修飾間的交互作用，能調控 NF- $\kappa$ B 的轉錄活性[263]。在本論文中，發現經過光動力作用後會誘發 p300HAT 活性上升，而促進 NF- $\kappa$ B 之乙醯化修飾(Figure 15)。Huang 等人的研究也證實，當 NF- $\kappa$ B 經由 p300 /CBP 對其次單元 p65 第 310 位置 lysine 進行乙醯化修飾後，能增加特異性辨識及專一性結合至 BET (bromodomain and extra terminal domain) 蛋白家族 BRD4 的兩個結構區，而 BRD4 又能吸引並活化 CDK9，使 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 磷酸化，促進 NF- $\kappa$ B 目標基因的轉錄[264]。Hendrickx 的研究中，利用過度表達 I $\kappa$ B，或使用 I $\kappa$ B 磷酸化抑制劑 BAY117085 阻止 I $\kappa$ B 與 NF- $\kappa$ B 分離，來抑制 NF- $\kappa$ B 進入細胞核協助轉錄，他觀察到以此兩種方式皆無法有效降低 hypericin-PDT 引發之 COX-2 表現，因此推測 hypericin-PDT 後上升的 COX-2 並非透過 NF- $\kappa$ B 所調控[194]。然而 Hendrickx 所使用的這兩種方法，雖然能阻止 NF- $\kappa$ B 入核執行其轉錄功能，但卻無法抑制原本已在細胞核內 NF- $\kappa$ B 被 PDT 後活化的 p300HAT 乙醯化修飾，因而即便阻止 NF- $\kappa$ B 入核，依然還是偵測到 COX-2 於 PDT 後上升之情形。

事實上，我們觀察到光動力氧化效應造成 p38MAPK 磷酸化、引起 p300HAT 活性升高，並藉由乙醯化 NF- $\kappa$ B 而加強其轉錄活性的過程，在許多刺激引發的氧化壓力或 cytokines 處理下，也能發現類似的調節路徑，並參與 COX-2 或特定基因轉錄。研究發現 LPS 會藉由 p38MAPK、p300HAT 活性，促進對 NF- $\kappa$ B 乙醯化修飾，而加入 melatonin 能抑制 LPS 處理後此一路徑之活化，避免 IL-1 $\beta$ 、COX-2 等發炎介質表現[265, 266]。另外實驗以致癌物 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 塗抹至 ICR 小鼠背部，會引發氧化壓力而造成 COX-2 表現，若

於 TPA 使用前先以抗氧化物 resveratrol 處理，能透過抑制 p38MAPK-p300-NF- $\kappa$ B 路徑，阻止 TPA 後 COX-2 產生[267]。過去瞭解高血糖將引發細胞產生氧化壓力，實驗利用 high glucose 處理內皮細胞，發現會藉由引發氧化壓力促使 PKC、JNK、p38MAPK 等訊息路徑及轉錄因子 FOXO、NF- $\kappa$ B 活化，並觀察到會因此增強 p300HAT 與抑制 class III HDACs sirtuins 的活性，而使 COX-2 等發炎相關基因表現[268]。

#### 4.7 光動力作用與 COX-2 抑制劑之結合型治療

過去的研究顯示，光動力治療搭配 COX-2 抑制劑能增加光動力對腫瘤治療成效。在本論文中，以 PL-Ce6-PDT 治療 C26 腫瘤，於活體動物實驗同樣能達到加強腫瘤抑制之療效(Figure 25)。然而在 *in vitro* 研究中，分別使用不同濃度的 COX-2 抑制劑 NS-398，來抑制 ALA-PDT 於 A375 細胞中引發之 COX-2 表現，即便使用到 200  $\mu$ M 高濃度的 COX-2 抑制劑，卻依然無法加強光動力細胞毒殺效果(Figure 27)。這樣的結果在 Makowski 等人的研究中也發現，使用與我們實驗相同劑量之 NS-398，同樣無法增加 Photofrin-PDT 後的細胞毒殺效應，甚至利用其它 COX-2 抑制劑如：rofecoxib 或 nimesulide 等，也不能提升光動力作用後對細胞之毒殺效益[221]。雖然如此，同一篇文獻中應用 nimesulide 結合 Photofrin-PDT 治療植有 C26 腫瘤之 BALB/c 老鼠，依然能達到相當良好抑制腫瘤生長之效果[221]，顯示光動力治療搭配 COX-2 抑制劑能有效控制腫瘤生長，不是經由加強對腫瘤細胞直接的毒殺，而可能是間接破壞腫瘤週邊環境像是血管損傷等造成的結果。


事實上，*In vivo* 光動力治療後被發現會引發血管破壞，導致血管收縮、血管通透性增加、血小板活化、血栓及血細胞滲出等現象[269]。其中血管收縮與血小板的活化，能在光動力照光作用後數分鐘被觀察到[270]。而研究也發現對於腫瘤微血管的破壞，將會增加光動力治療抗腫瘤效應，其原因來自當微血管阻塞

或萎縮，將阻礙對於腫瘤組織養分或氧氣的供應[271]。由於腫瘤週邊血管的損傷能有效抑制腫瘤生長，因此一般認為若能在光動力治療後，持續造成血管破壞或抑制受損血管修復，將能提升光動力抑癌效應。而過去研究證實，COX-2 表現與 VEGF 以及腫瘤血管新生成正相關[272]，因而 COX-2 抑制劑被認為是抗血管新生的重要藥物。研究發現，給予 COX-2 抑制劑 NS-398 能減少腫瘤釋放血管新生因子[273]，或在 COX-2 knockout 小鼠上觀察到腫瘤生長遲緩，且血管密度降低的現象[274]，顯示抑制 COX-2 將能造成腫瘤血管新生受到抑制，或影響腫瘤內血管分佈情形。因此，我們推論 COX-2 抑制劑在活體實驗中，能有效加強光動力抑癌成效，可能是源自抑制腫瘤血管新生，或是阻礙光動力治療後血管修復之結果。

#### 4.8 光動力氧化效應與 survivin 活化

光動力治療除了直接毒殺腫瘤細胞外，也會引起腫瘤附近局部發炎反應和立即性的血管損傷破壞[275]，因此光動力治療後，被發現會誘發許多因子活化，包含與細胞存亡相關的促存活蛋白、影響炎症發生的發炎介質，以及促血管新生的因子表現。於本研究中，不論是在細胞實驗或動物實驗，相較於使用 COX-2 抑制劑 NS-398，光動力治療搭配 p300HAT 抑制劑 AA 皆能有更好的細胞毒殺或腫瘤治療成果，意味 p300HAT 的活化會誘發其他促存活因子表達，阻止細胞走向死亡，我們也確實於 ALA-PDT 後，偵測到除了 COX-2 外，其他 pro-survival 蛋白質像是 survivin 及 Bcl-2 的表現也會有所上升，而在光動力作用前使用 p300HAT 抑制劑 AA 處理細胞，能顯著抑制 survivin 提升，並活化 caspase-3 及 apoptosis 路徑(Figure 29)，顯示 PDT 透過 p300HAT 引發之 survivin 表現，與腫瘤細胞能抵抗光動力氧化效應導致之細胞死亡有極密切關係。

Survivin 為抗凋亡(anti-apoptosis)蛋白質家族一員，在細胞存活上扮演相當重要的角色，有許多轉錄因子及訊息傳遞控 survivin 的表現。在本論文中，我們觀



察到光動力氧化效應上升的 p300HAT 會增進 survivin 表達，使用 p300HAT 抑制劑 AA 可逆轉上升的現象(Figure 28)。然而目前尚無文獻佐證 survivin 轉錄會受到 p300HAT 調控，因此還需更深入以 ChIP 分析，在光動力作用後上升的 p300HAT 是否會被吸引至 survivin 啟動子位置，造成附近組蛋白乙醯化，而促使 survivin 轉錄。目前已知能促進 survivin 表現的轉錄因子 NF- $\kappa$ B[172]，在許多不同類型光感物質造成的光動力效應中都能被顯著誘發[230]，且在本論文中，更發現光動力氧化效應能透過 p300HAT 引發 NF- $\kappa$ B 乙醯化，提升 NF- $\kappa$ B 轉錄活性。另外文獻也證實使用 p300HAT 抑制劑 AA 能經由抑制 NF- $\kappa$ B 活化，促進細胞死亡[276]。因此推論在我們使用的光動力作用系統中，可能是藉由 p300HAT 乙醯化 NF- $\kappa$ B 來增加 NF- $\kappa$ B 轉錄活性，而促進 survivin 表現，Gomer 等人的研究也發現 PDT 後 survivin 轉錄與 NF- $\kappa$ B 活化有關[277]。另外，NF- $\kappa$ B 能促進 survivin 表現可能也受到 nitric oxide synthase (iNOS)升高影響[178, 278]，過去文獻已知，光動力氧化效應引發之 iNOS 在細胞抵抗死亡上扮演相當重要的角色[178]，Bhowmick 和 Girotti 研究指出 ALA-PDT 活化的 NF- $\kappa$ B 會觸發 iNOS，使 survivin 表現量增加[178]。然而於本論文中所觀察到光動力氧化效應後，p300HAT 上升所活化的 NF- $\kappa$ B 是否因此引發 iNOS 造成 survivin 表現，則需賴日後更深入的研究。

#### **4.9 ALA-PDT 與 ALA-PDT 結合 AA 引發之細胞死亡路徑探討**

細胞存活與細胞死亡程序之間不正常調節或不平衡，被認為是導致腫瘤發生的源頭，甚至有許多疾病的發生也與這樣的現象有關，例如過度的細胞凋亡會使細胞萎縮。而無法順利執行細胞凋亡，則會導致細胞無法控制的增生，如癌細胞的形成。目前有許多治療癌症的方法是藉由引發細胞凋亡或細胞壞死導致癌細胞死亡，本篇所使用的光動力治療是藉由其誘發之氧化壓力，促使細胞啟動細胞凋亡等死亡路徑，而達到毒殺腫瘤細胞之效果。我們過去發表的文章中曾發現，

在老鼠嗜鉻細胞瘤 PC12 處以 ALA-PDT 能活化 caspase-9 和 caspase-3，但是 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 卻無法阻止在 ALA-PDT 後細胞的死亡[153]，顯示 ALA-PDT 雖然會誘導 caspases 活化，卻不能因此導致細胞死亡。本篇論文的研究結果可能可以對此提出解釋，因為我們發現 ALA-PDT 除了引發 caspase-3 活性上升外，同時也會促進 survivin 表現，當死亡與存活路徑同時被啟動下，部分損傷細胞可能因此得以修復，因而躲過細胞凋亡而殘存下來，這樣的論點從我們以 p300HAT 抑制劑 AA 抑制 survivin 表現後，caspase-3 活性更加上升得以證實 (Figure 29 和 30)。

近年文獻指出另一種細胞自我修復的程序細胞自噬 (autophagy)，可能參與在光動力治療後細胞存亡的生理調控中[279]。一開始學者們認為 autophagy 是 apoptosis-resistant 細胞會進行的新形態死亡模式[280, 281]，然而後來陸續發現細胞自噬可能也扮演 pro-survival 角色，研究利用各種 autophagy 抑制劑如 3-MA、LY294002 或 Wortmannin 處理細胞，發現在某些條件或刺激下也能促進細胞死亡發生[282]。在光動力治療處理下，也能發現 autophagy 發生帶給細胞不同結果的研究報告，本實驗室先前的研究發現對於 PC12 細胞處以 ALA-PDT，會經由 AMPK 路徑引起 autophagy 發生，且加入 autophagy 抑制劑 3-MA 能抑制細胞死亡[153]，另外抑制 Pc 4-PDT 後細胞自噬現象，能大幅提高 MCF-7 細胞存活情形[283]。相反地，部分研究發現抑制 autophagy-related gene Atg7 表現，反而會促進老鼠 leukemia L1210 細胞死亡[284]，而使用 autophagy 抑制劑 3-MA 也發現能提升 chlorophyllin e4-PDT 處理後 5637 與 T24 之細胞死亡率[285]。

探究 Autophagy 同時具有促進存活或導致死亡的功能，可能跟刺激其發生的源頭及強度有關，細胞自噬原本是細胞接受到飢餓或細胞遭受損傷時，分解老舊胞器或蛋白質，再回收利用成為材料，幫助細胞得以在逆境存活的作用方式。不過有時候在嚴重受損的細胞中，損傷無法負荷時，細胞為顧全大局，也可能同時

釋放訊號引發細胞凋亡，因此細胞凋亡與細胞自噬彼此呈現密切又謹慎地相互平衡，近年文獻更指出細胞凋亡與細胞自噬間可能存在互相拮抗的作用，以維持細胞存亡間的平衡。Beclin 1 是細胞自噬關鍵條控蛋白質之一，參與自噬體膜形成 [286]，被發現具有細胞保護功能，能協助細胞對抗 starvation 引發之細胞凋亡 [287, 288]。2010 年，Wirawan 等人發現若移除生長因子 IL-3，會活化 Ba/F3 細胞中的 caspases，導致細胞走向細胞凋亡，更首次證實活化的 caspases 更會造成 Beclin-1 cleavage [231]。當 Beclin 1 被 proteases caspases 截切時，會使 60 kDa 的 Beclin-1 剪切成大小約 35kDa 的片段，而使 Beclin-1 失去功能，另外更發現截切後其 C-terminal 片段會結合至粒線體，促進 cytochrom c 釋放 [231]。這樣的證據顯示確實存在 autophagy 與 apoptosis 之間的 crosstalk，這兩種細胞反應會透過分子間的交互作用，相互調控以控制細胞存亡。深入檢測發現其中 caspase-3、7 和 8 皆能造成 Beclin-1 cleavage [231]，caspase-3 另外還能促使 Atg4D 蛋白質分裂 [289]，而 caspase-6 則能截切 Atg3 和 p62 [290]，顯示細胞凋亡路徑中的蛋白質水解酵素 caspases 能破壞這些細胞自噬蛋白質功能，影響自噬體形成，而抑制 autophagy 發生。相反地，autophagy 也能透過分解 apoptosis 相關蛋白質如 Bak、Bax 等，達到抑制細胞凋亡的結果 [291]。本篇研究發現以 HAT 抑制劑結合 ALA-PDT 能藉由減少 survivin 表現來提升 caspase-3 活性，並觀察到染色質濃縮、磷脂絲胺酸外翻等細胞凋亡現象產生 (Figure 29、32 和 33)，然而同時發現原本 PDT 後出現的細胞自噬，會因為 ALA-PDT 結合 AA 共同處理後消失 (Figure 35 和 36)，這兩種現象的消長意味可能有 apoptosis 與 autophagy 交互作用的發生，檢測 ALA-PDT 結合 AA 處理的細胞，發現活化的 caspase-3 會造成 beclin-1 cleavage，原本大小約 60 kDa 的 beclin-1 蛋白質，會被 caspases 辨認其 TDVD 胺基酸序列，而分解成約 35 kDa 的片段 (Figure 39)，顯示光動力治療結合 HAT 抑制劑會透過活化 caspases 來破壞 beclin-1 蛋白質，且當我們加入 caspases 抑制劑共同處理下，能逆轉 beclin-1 蛋白質被分解的命運 (Figure 39)，這樣的結果解釋了在 ALA-PDT 與 AA 結合型治療下細胞凋亡增加，而細胞自噬受到抑制的現象。

然而本研究並無法完全排除 beclin-1 蛋白質表現量的減少，也有部分原因是受到泛素-蛋白酶體系統(ubiquitin-proteasome system, UPS)分解的結果。當細胞中蛋白質需要被分解去除時，會被接上聚泛素(polyubiquitin)修飾，蛋白酶體可以識別連接在蛋白質上的聚泛素，並透過蛋白酶體中的蛋白酶啟動降解過程，經過蛋白酶體的降解後，蛋白質一般會被切割成約 7-9 個胺基酸長度的肽鏈大小[292]。而本實驗以西方點墨法觀察 beclin-1 蛋白質分解情形時，由於肽鏈太小，無法偵測到是否有蛋白酶體分解系統參與在其中。事實上，光動力治療後確實被發現會引起大量蛋白質 polyubiquitin 現象[257]，因此未來可以檢測光動力治療後，beclin-1 蛋白質是否有受到 polyubiquitin 修飾，或於 ALA-PDT 結合 AA 共同處理下，以蛋白酶體抑制劑 MG132 抑制此分解過程，觀察是否會因此影響 beclin-1 蛋白質表現量，以釐清 ubiquitin-proteasome system 是否參與在結合型治療後 beclin-1 蛋白質降解中，來影響細胞自噬發生。

#### 4.10 光動力治療結合 HAT 抑制劑於腫瘤治療之應用

由於發現光動力治療後會引發組蛋白乙醯化轉酶活性增加，而提升 Histone H3 乙醯化修飾，促使促存活蛋白質轉錄，因此我們利用組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 AA 結合光動力治療，希望能藉由抑制光動力氧化效應後，組蛋白乙醯化轉酶活性上升，阻止促存活蛋白質表現。實驗結果證實，不論是細胞實驗或動物實驗在 AA 結合光動力治療後，皆能顯著減少 COX-2 及 survivin 表達，並大幅增進光動力效應。過去文獻曾針對促存活蛋白質 COX-2 進行抑制，發現能提升光動力治療對腫瘤抑制效果[196, 221]，我們於本論文中，也比較光動力治療結合 COX-2 抑制劑 NS-398 或 HAT 抑制劑 AA 之間對於腫瘤治療的成效，結果顯示，相較於同樣濃度的 NS-398 處理 BALB/c 小鼠，AA 更能增加光動力作用對 C26 腫瘤之抑制效應，由於抑制組蛋白乙醯化轉酶活性，能減少下游整體組蛋白乙醯化修飾，推測除了能抑制 COX-2 外，也能有效阻止許多於光動力治療後上升的

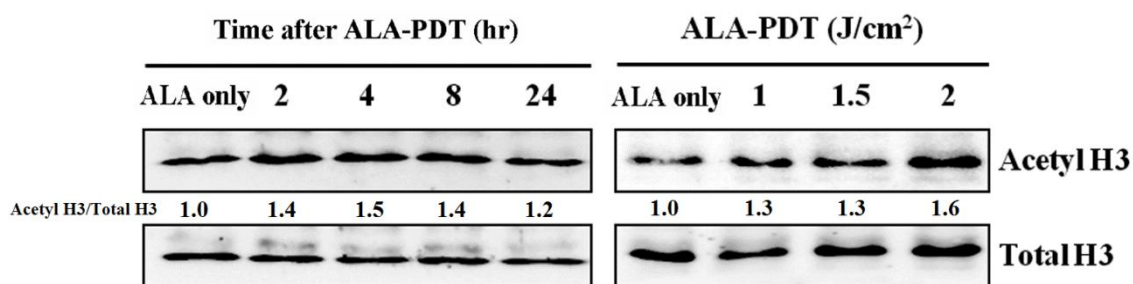
促存活相關蛋白質表現，因此相較於專一性 COX-2 抑制劑，組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 AA 更能增進光動力效應。

近年來很多研究也嘗試使用不同藥物搭配光動力治療，藉此提升治療成效，而我們發現有許多用來結合光動力作用的化合物，其實被證實具有抑制組蛋白乙醯化轉酶活性的功效。2011 年 Ferrario 等人利用綠茶萃取物兒茶素 epigallocatechin gallate (EGCG) 合併 PH-PDT 處理植有 mouse mammary carcinoma (BA) 之 C3H 老鼠，發現能藉由抑制促存活蛋白質 GRP-78、survivin 表現，和減少 PGE2 釋放，增進腫瘤對光動力腫瘤治療之反應[293]。而 EGCG 在 2009 年由 Choi 等人發表，證實具有組蛋白乙醯化轉酶抑制劑功效，並能專一性抑制 p300HAT 活性，而不影響其他 epigenetic enzymes 如 HDAC、SIRT1 或 HMTase 功能[218]。此外以 Radachlorin-PDT 結合 EGCG 也被確認能有效治療植有人類卵巢癌細胞 TC-1 之 C57BL/6 小鼠腫瘤[294]。另一個被驗證為組蛋白乙醯化轉酶抑制劑的薑黃萃取物 curcumin[216]，同樣能促進光動力治療對人類頭頸部腫瘤 AMC-HN3 的細胞毒殺，促使細胞凋亡發生[295]。本文使用的組蛋白乙醯化轉酶抑制劑 anacardic acid (AA) 則是由腰果殼中萃取出來，在 2003 年經由 Balasubramanyam 等人證實具組蛋白乙醯化轉酶抑制功能，近年來廣為使用以抑制 p300HAT 活性[215, 296]。由於 AA 的 salicylate 部位與 CoA 的 pyrophosphate group 相似，能和 HATs 蛋白質結構裡的 V582、G584、G586、T587 等形成氫鍵；另一方面，AA 的疏水性烷基鏈會停留在 HATs 蛋白質結構中的 pantothenic acid binding pocket，因此能與 acetyl-CoA 競爭，而抑制 HAT 活性[297]。學者也陸續發現 AA 的生物活性能應用於糖尿病、氣喘等疾病或抗腫瘤治療，甚至結合其他癌症治療如化療、放射線治療，以加強治療效應[297]。本論文使用 AA 結合 ALA-PDT 達到良好的腫瘤抑制效果，也顯示 HATs 為光動力治療與其他藥物合併治療的重要目標之一。目前其中一種 HAT 抑制劑 EGCG 已進行臨床二期研究，對於實際應用上極具希望，也盼望未來對於 epigenetic change 的更深入瞭解，能為更多疾病或腫瘤治療帶來福音。

## 第五章 結論



過去已知於光動力治療後，可能引發促存活蛋白質表現，而導致腫瘤細胞有機會從光動力毒殺效應後殘存，致使治療效應受到影響。然而目前對於光動力治療後如何致使 COX-2 表現的調節機轉還有許多地方需要釐清。因此本篇論文針對光動力氧化效應後，所引發的一連串訊息傳遞深入研究，如 Figure 41 所示，我們發現在光動力治療後，將會啟動組蛋白乙醯化轉酶 p300HAT 表現，並同時在細胞及動物實驗中都發現，光動力治療後上升的 p300HAT 在 COX-2 之表現上扮演相當重要的角色。我們在 ALA-或 Ce6-這兩種光感物質引發的光動力效應，皆能觀察到光動力效應會藉由活化 p38MAPK 訊息傳遞路徑，引發 p300HAT 表現，導致光動力治療後，腫瘤細胞核內 COX-2 啟動子上之組蛋白乙醯化情形上升。除此之外，光動力氧化效應後上升的 p300HAT 除了乙醯化組蛋白外，也同時加強對 COX-2 啟動子上轉錄因子 NF- $\kappa$ B 次單位 p65 之乙醯化修飾，提升 NF- $\kappa$ B 對 COX-2 啟動子之結合能力，利於 COX-2 轉錄。光動力氧化效應下提升的 p300HAT 除了影響 COX-2 表達外，也會促進 pro-survival 蛋白質 survivin 的表現，進而抑制 caspase-3 活性，減少光動力處理後 apoptosis 發生，並增加 autophagy 機轉調節，使腫瘤細胞有機會修復存活。本論文提出使用 p300HAT 抑制劑 anacardic acid 結合光動力治療之結合型治療模式，加強光動力治療對腫瘤之治療效應，並證實此種結合型治療能有效應用於細胞及動物實驗中，且優於過去光動力治療結合 COX-2 抑制劑之治療型式。相信對於光動力氧化效應後，促存活蛋白質被活化相關機轉的更加了解，能針對其中開發出彌補光動力治療缺失之結合型治療，加強整體癌症治療效應。



**Figure 1** 光動力致壓效應會導致組蛋白乙醃化程度上升。

A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )後，萃取出細胞核內蛋白質，以西方點墨法觀察各時間點及不同照光劑量(第 4 小時)下，細胞核內組蛋白乙醃化之變化。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。

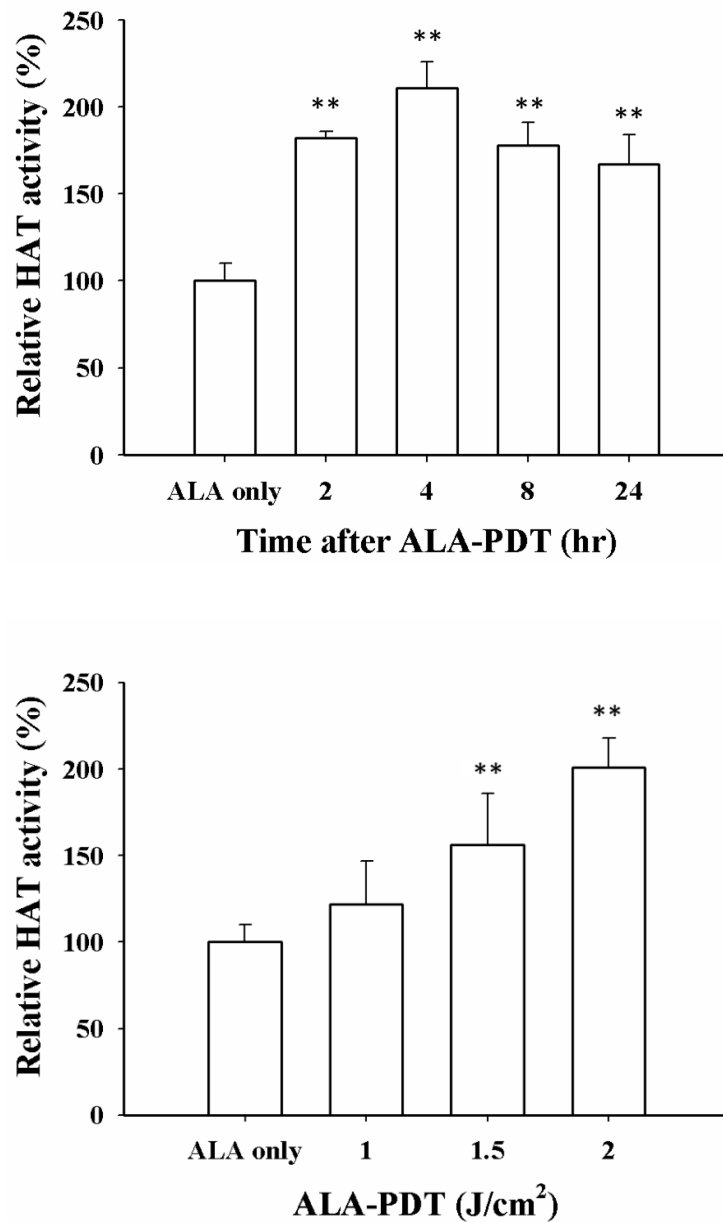
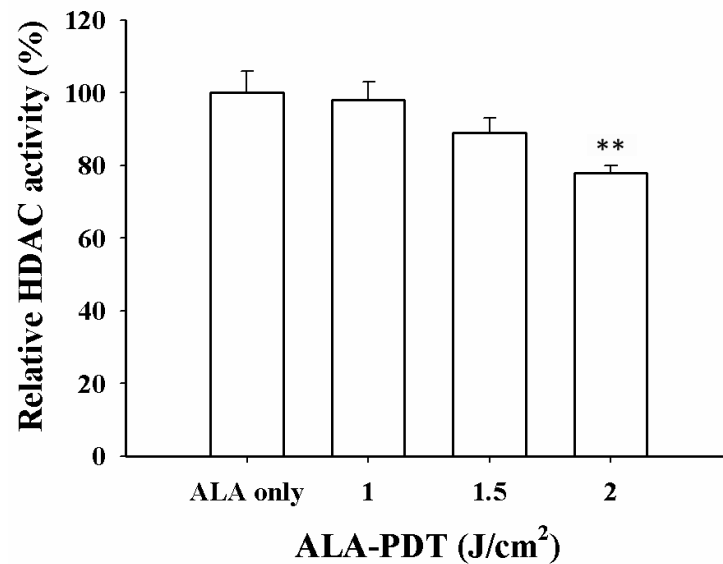
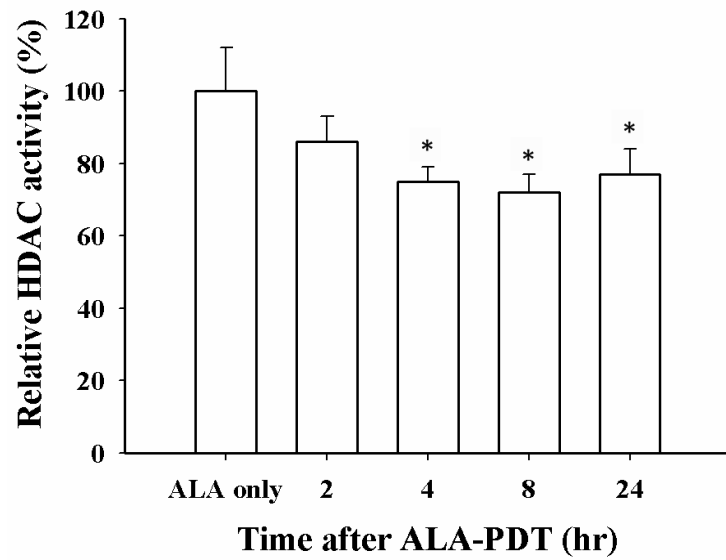


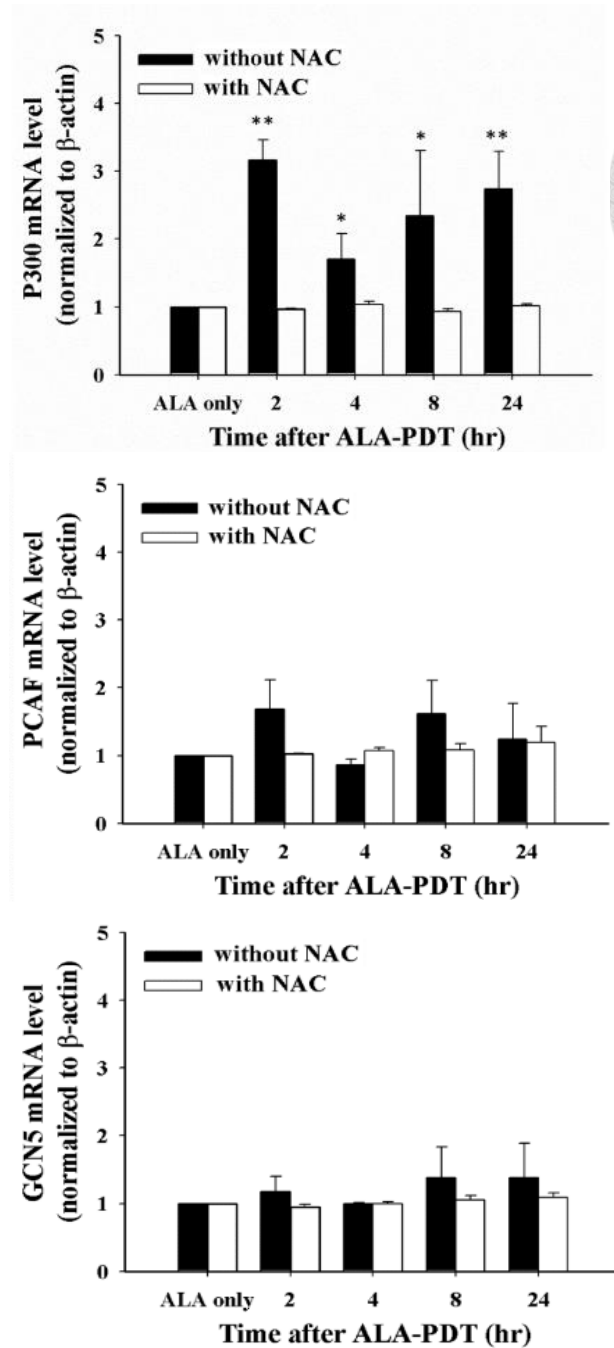
Figure 2 光動力處理會導致 HAT 的活性上升。

A375 細胞經過 ALA-PDT (2 J/cm<sup>2</sup>)後，萃取出細胞核內蛋白質，以 HAT assay kit 檢測各時間點及不同照光劑量(第 4 小時)下，細胞核內 HAT 之活性。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 ALA only 組別有顯著差異(p<0.05 或 p<0.01 分別以\*或\*\*標示)。



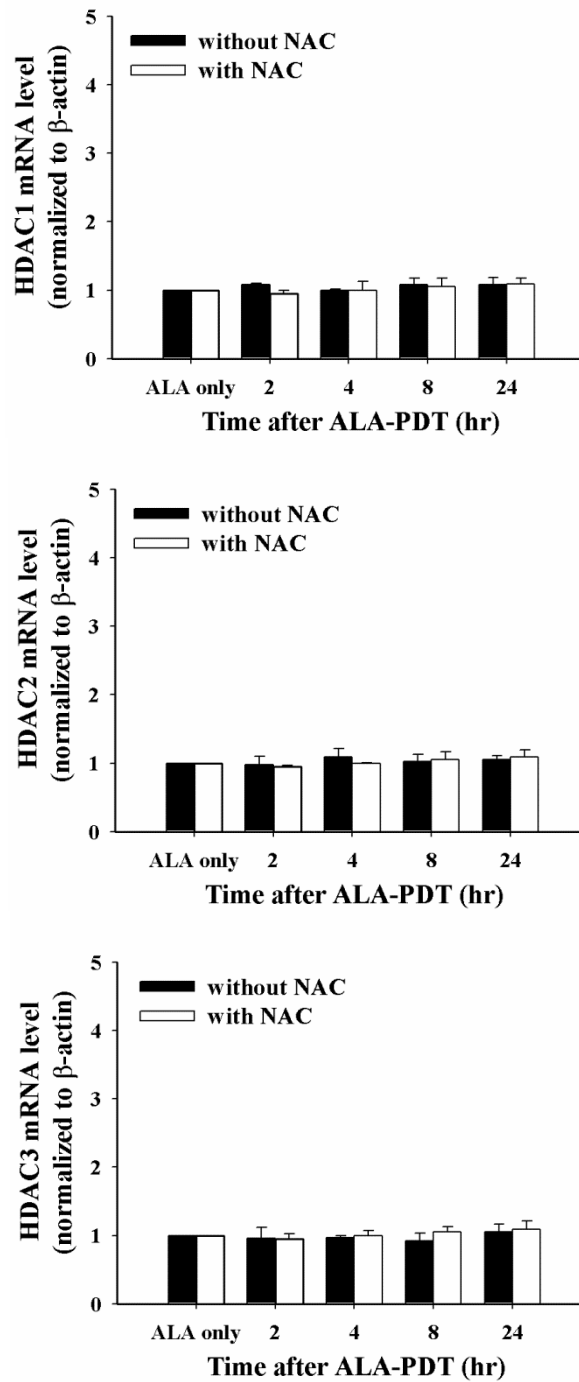
**Figure 3** 光動力處理會導致 HDAC 的活性下降。

A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )後，萃取出細胞核內蛋白質，以 HDAC assay kit 檢測各時間點及不同照光劑量(第 4 小時)下，細胞核內 HDAC 之活性。此為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 ALA only 組別有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。



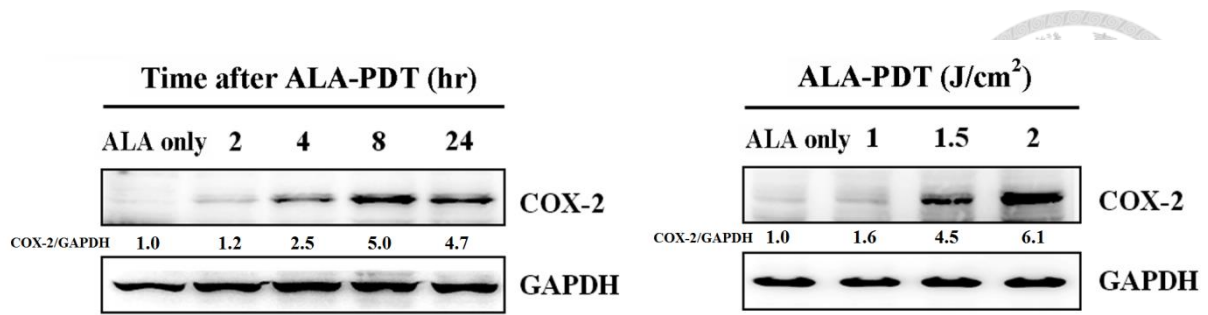
**Figure 4** 光動力處理會促使 p300HAT mRNA 的上升。

A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前加入 10 mM N-acetylcysteine (NAC)共同處理後，於不同時間點使用 RT-PCR 檢測 p300、PCAF 和 GCN5 基因表現。此為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 ALA only 組別有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。



**Figure 5** 光動力處理不影響 HDACs mRNA 的表現量。

A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前加入 10 mM N-acetylcysteine (NAC)共同處理後，於不同時間點使用 RT-PCR 檢測 HDAC1、HDAC2 和 HDAC3 基因表現。此為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 ALA only 組別有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。

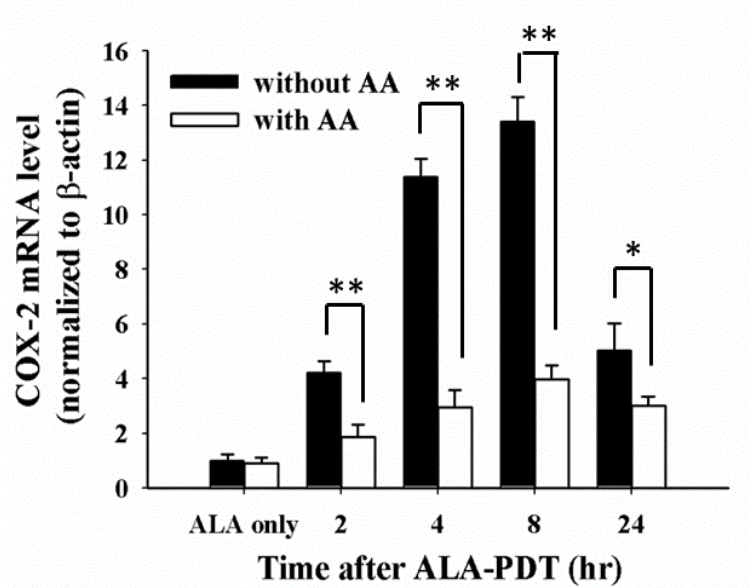


**Figure 6 Pro-survival 蛋白質 COX-2 於光動力治療後顯著上升。**

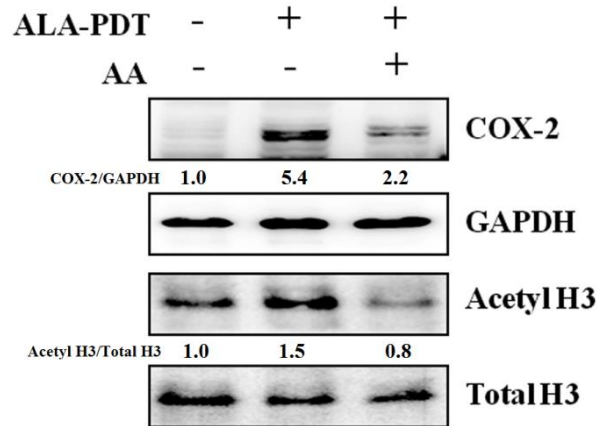
A375 細胞經過 ALA-PDT (2 J/cm<sup>2</sup>)後，以西方點墨法觀察各時間點及不同照光劑量(第 8 小時)下，細胞內 COX-2 蛋白質表現量。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。



(A)

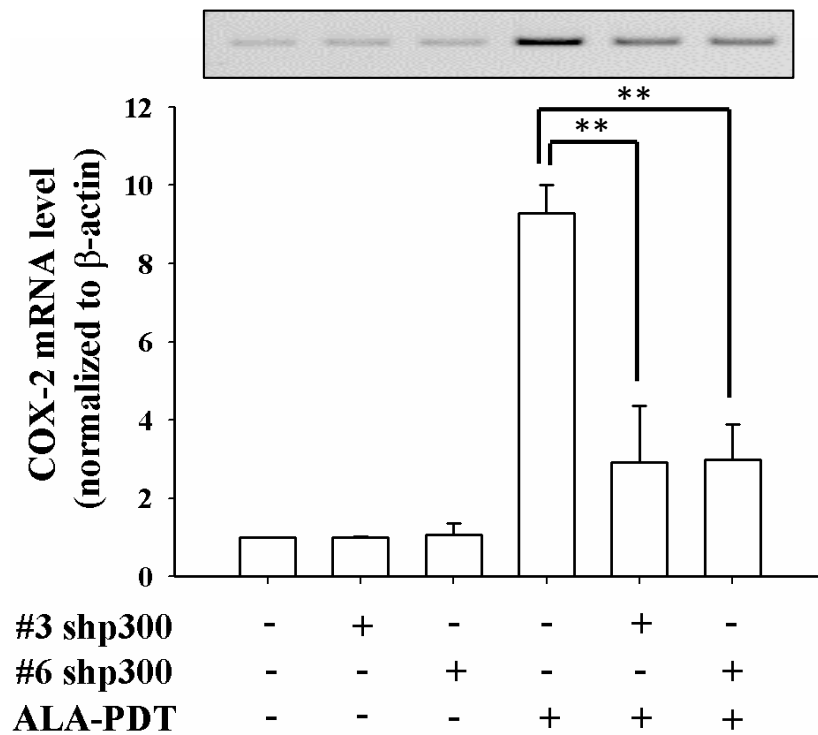
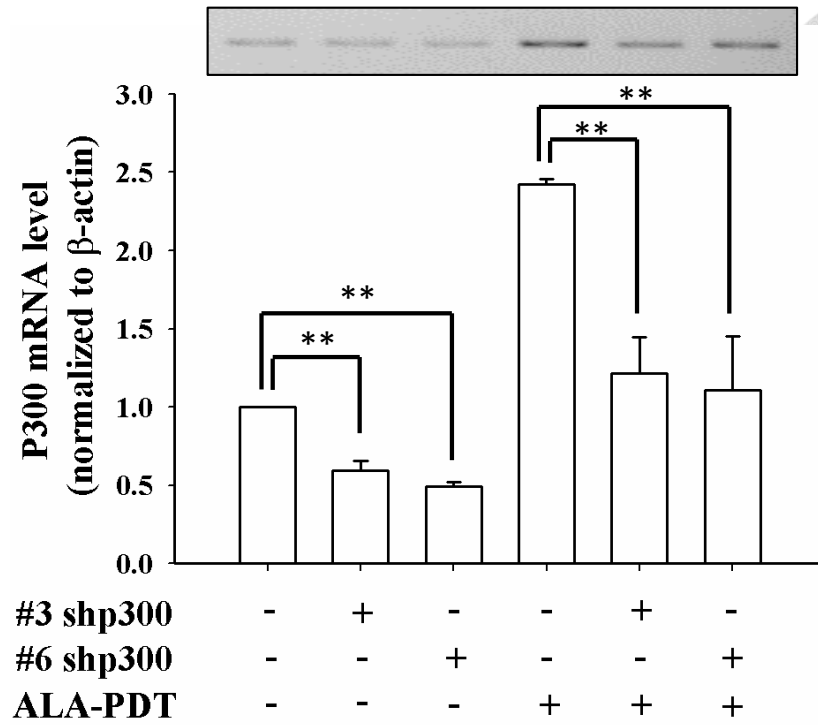


(B)



**Figure 7** 使用 HAT 抑制劑 AA 能有效阻止 COX-2 於光動力治療後上升。

(A) A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ), 或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  AA 共同處理下, 於不同時間點使用 RT-PCR 檢測 COX-2 mRNA 表現量。此為三次獨立實驗之結果, 以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計, 具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。(B) A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ), 或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  AA 共同處理下, 以西方點墨法觀察第 8 小時後, 細胞內 COX-2 蛋白質表現量。本實驗進行三次獨立實驗, 選取本圖作為代表性結果, 並以影像分析軟體 ImageJ 定量。

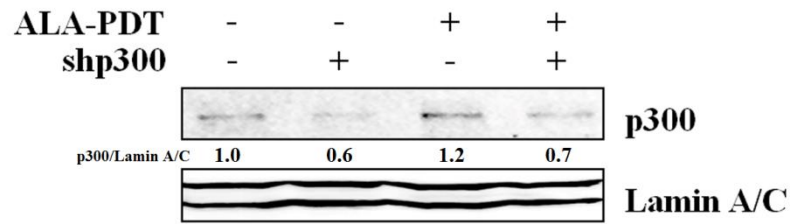


**Figure 8 使用 shp300 能抑制光動力治療後上升之 p300HAT 及 COX-2 mRNA 的表現。**

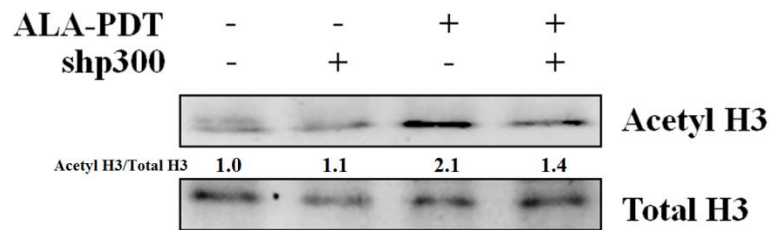
使用 shRNA 抑制 p300HAT 基因表現，將 shp300 質體轉染入 A375 細胞 48 小時後，處以 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，再於照光後二小時，以 RT-PCR 分析#3 shp300 (TRCN0000009883)和#6 shp300 (TRCN0000039886)對 p300HAT 及 COX-2 之影響。此為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。



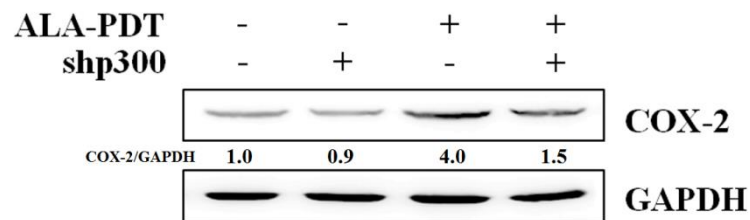
(A)



(B)



(C)

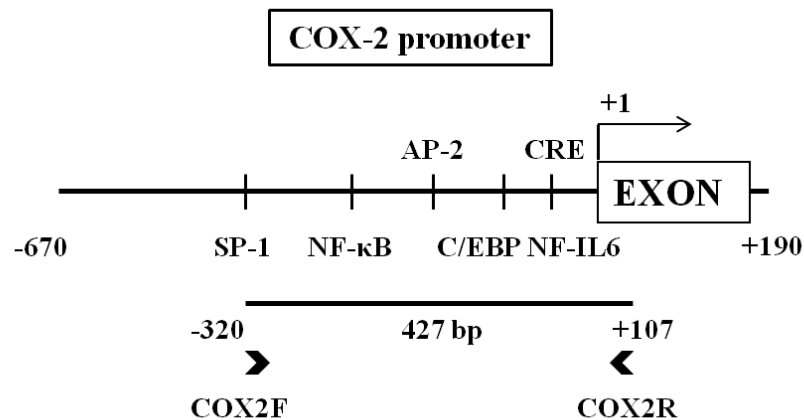


**Figure 9** 使用 shp300 能抑制光動力治療後上升之組蛋白乙醯化及 COX-2 蛋白質的表現。

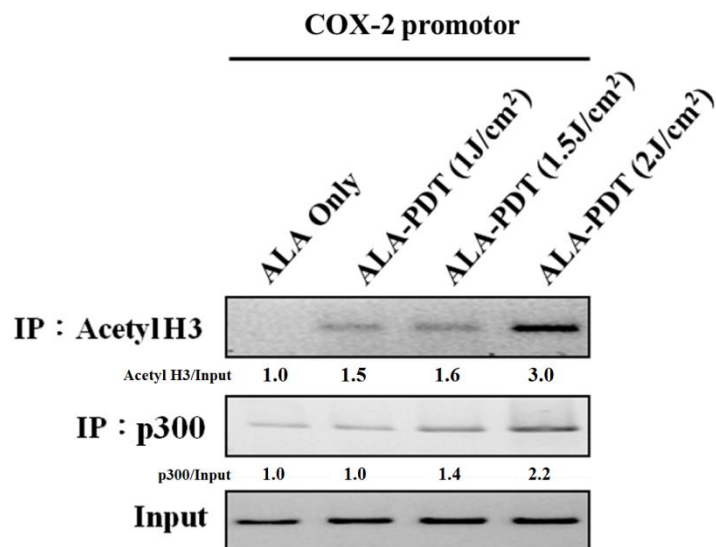
將 shp300 質體轉染入 A375 細胞 48 小時後，處以 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，再於照光後二小時，以西方點墨法分析對於(A) p300HAT (B)組蛋白乙醯化(C) COX-2 蛋白質表現量之影響。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。



(A)



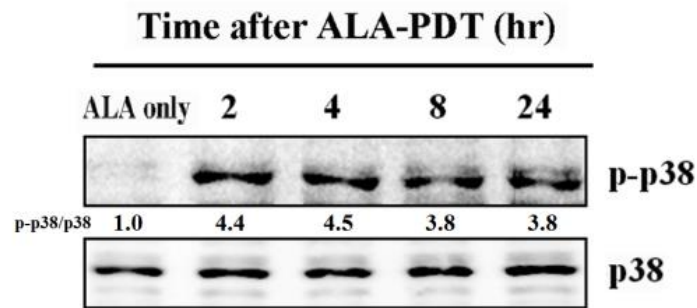
(B)



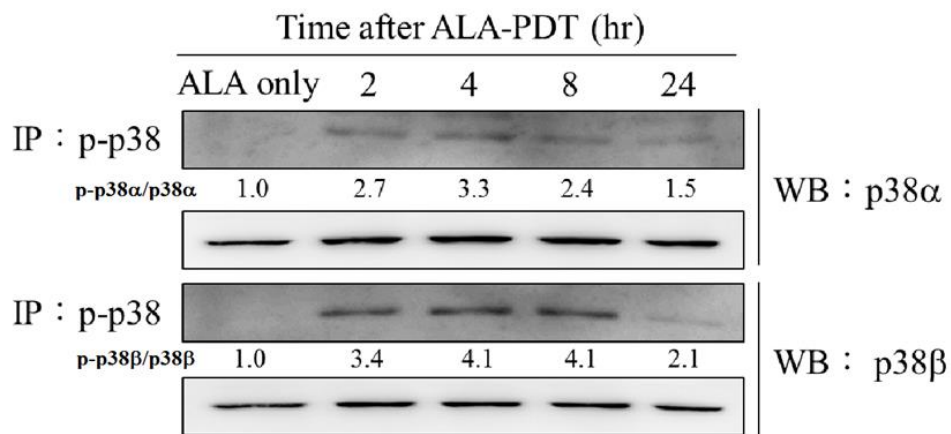
**Figure 10** 光動力治療促使大量 p300HAT 蛋白質結合至 COX-2 promoter 上，導致 COX-2 promoter 組蛋白乙醯化程度上升。

(A) COX-2 promoter 及 ChIP assay 後 PCR 引子位置示意圖。(B) ChIP assay 後進行 PCR，分析經過不同照光劑量之 ALA-PDT 後 4 小時，A375 細胞中 p300HAT 蛋白質結合至 COX-2 promoter 情形，以及在光動力作用後 COX-2 promoter 組蛋白乙醯化程度。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。

(A)



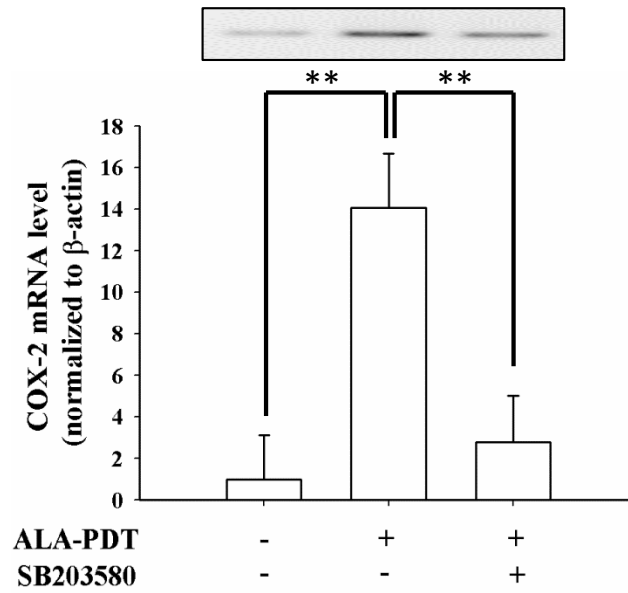
(B)



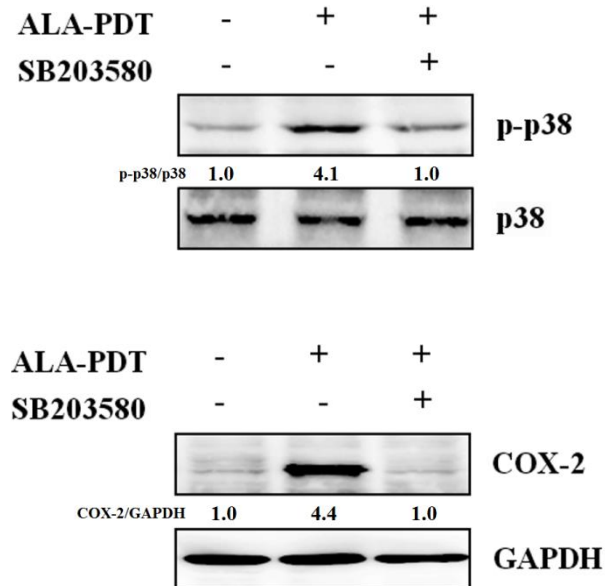
**Figure 11** 光動力治療會引發 p38MAPK 活化。

(A)經由西方點墨法檢測 p38MAPK 蛋白質於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )處理後，在不同時間點下磷酸化的情形。(B)以免疫沉澱分析 immunoprecipitation (IP) assay 分析 p-p38α 與 p-p38β 於 A375 細胞處以 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )後磷酸化程度。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。

(A)

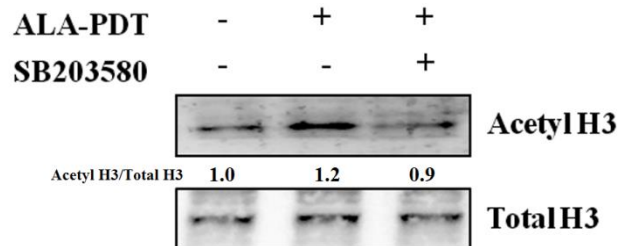
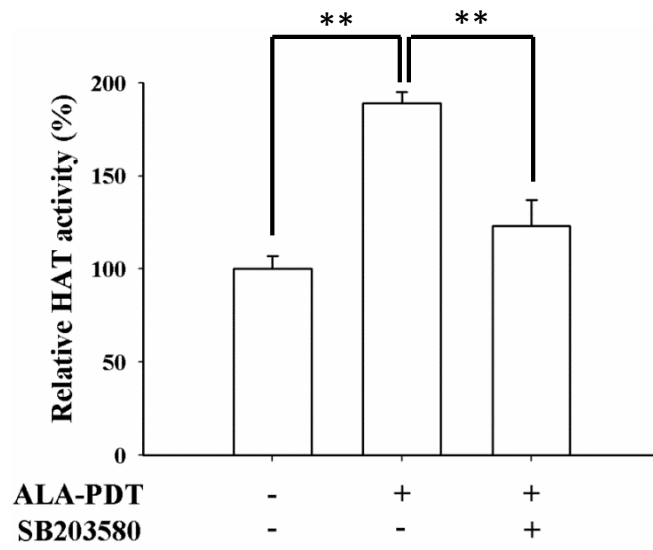
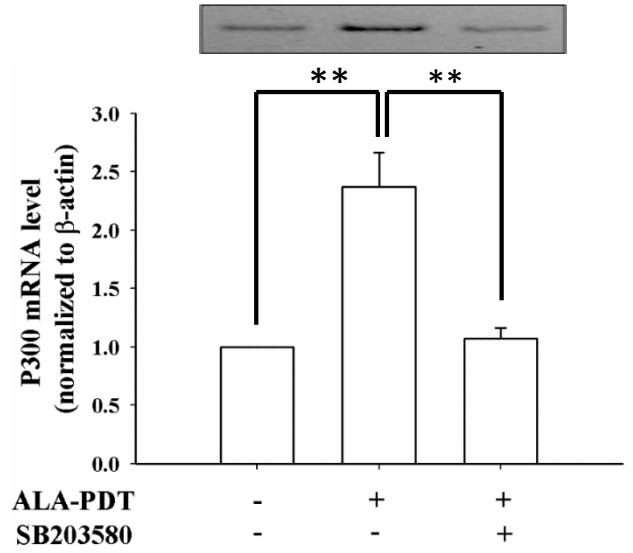


(B)



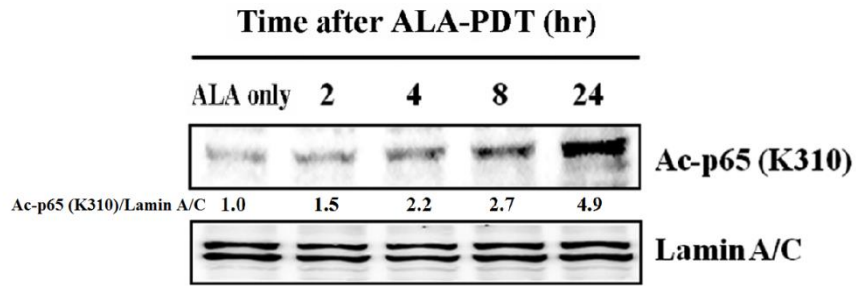
**Figure 12 使用 p38MAPK 抑制劑能抑制光動力治療後 p38MAPK 磷酸化及 COX-2 的表現。**

(A)A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $40 \mu\text{M}$  SB203580 共同處理下，於第 8 小時使用 RT-PCR 檢測 COX-2 mRNA 表現量。此為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。(B)A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $40 \mu\text{M}$  SB203580 共同處理下，以西方點墨法分別於第 2 小時和第 8 小時後，觀察細胞內 p38MAPK 磷酸化程度和 COX-2 蛋白質表現量。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。



**Figure 13 使用 p38MAPK 抑制劑能抑制光動力治療後上升之 p300HAT mRNA 表現、HAT 活性及組蛋白乙醯化程度。**

A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $40 \mu\text{M}$  SB203580 共同處理下，檢測 p300HAT mRNA 表現量(第 2 小時)、HAT 活性(第 4 小時)及組蛋白乙醯化程度(第 4 小時)。RT-PCR 和 HAT 活性檢測皆為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。而西方點墨法實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。

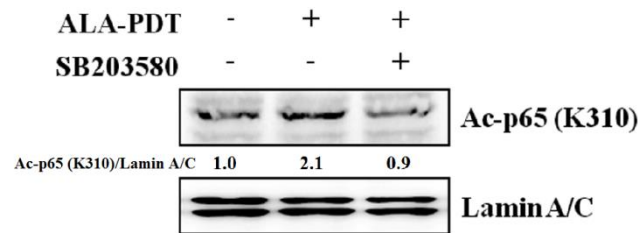


**Figure 14** 光動力治療會造成 NF- $\kappa$ B lysine310 (K310) 乙醯化程度上升。

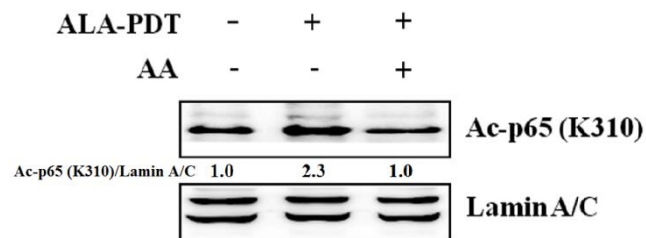
經由西方點墨法檢測 A375 細胞經 ALA-PDT (2 J/cm<sup>2</sup>)後，NF- $\kappa$ B subunit p65 (K310)乙醯化程度。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。



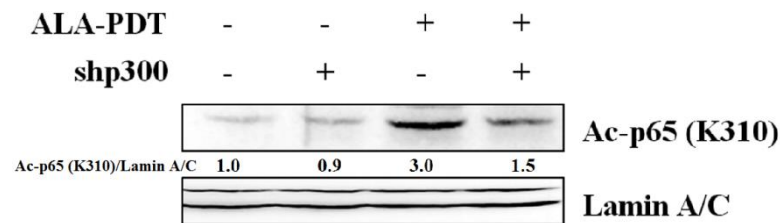
(A)



(B)

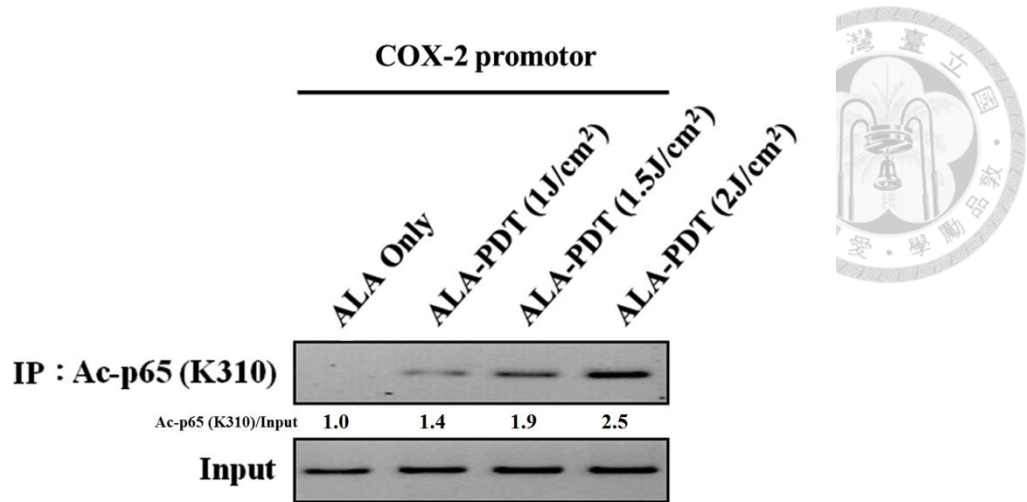


(C)



**Figure 15** ALA-PDT 經由 p38MAPK 活化引發 p300 表現及 HAT 活性提升，導致 NF- $\kappa$ B 乙醯化程度上升。

(A) A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $40 \mu\text{M}$  SB203580 共同處理下，以西方點墨法分析第 8 小時 NF- $\kappa$ B p65 (K310) 乙醯化程度。(B) A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  AA 共同處理下，以西方點墨法分析第 8 小時 NF- $\kappa$ B p65 (K310) 乙醯化程度。(C) 將 shp300 質體轉染入 A375 細胞 48 小時後，處以 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，於照光後 8 小時，觀察 NF- $\kappa$ B p65 (K310) 乙醯化程度。上述實驗皆進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。

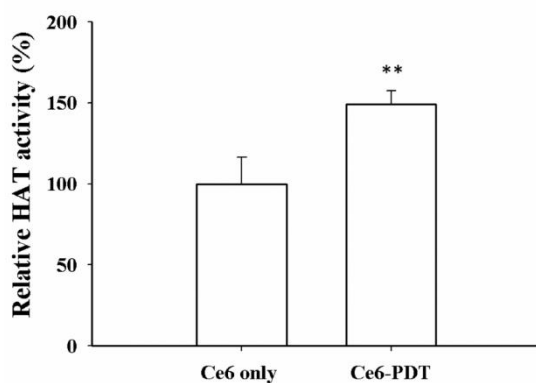


**Figure 16** ALA-PDT 後乙醯化 NF- $\kappa$ B 結合於 COX-2 promoter 上之分析。

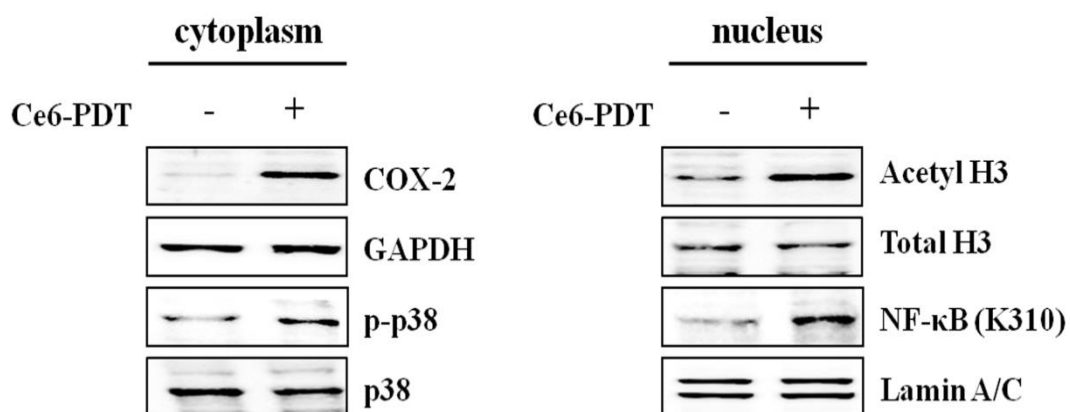
ChIP assay 後，使用 PCR 分析於不同照光劑量之 ALA-PDT 後，A375 細胞中結合至 COX-2 promoter 之 NF- $\kappa$ B p65 (K310)乙醯化程度(第 8 小時)。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。



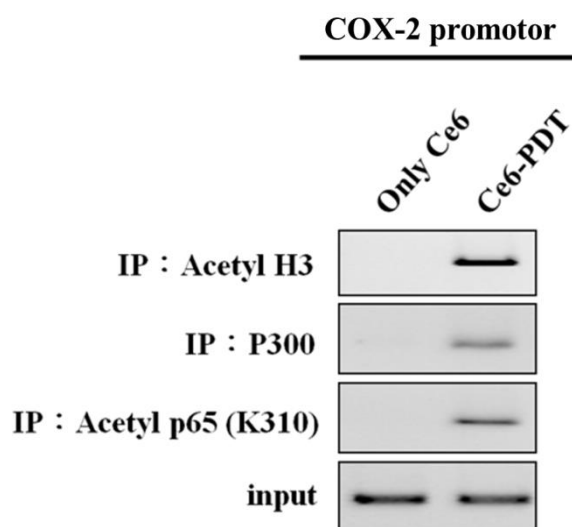
(A)



(B)



(C)

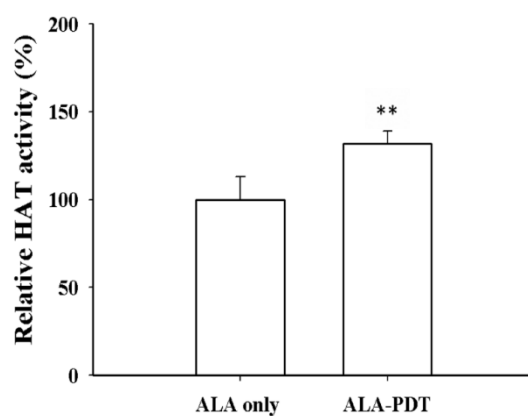


**Figure 17 Ce6-PDT 能藉由活化 p38MAPK 提升 HAT 活性，增加 COX-2 promoter 上 NF-κB p65 與組蛋白乙醯化程度。**

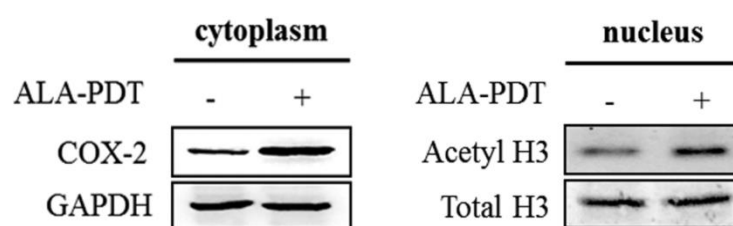
(A) A375 細胞經過 Ce6-PDT 後，於第 4 小時使用 HAT assay kit 檢測 HAT 活性。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 Ce6 only 組別有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。(B) A375 細胞經過 Ce6-PDT 後，於第 4 小時使用西方點墨法分析 p38MAPK 磷酸化程度、COX-2 表現量，以及 NF-κB p65 (K310) 與組蛋白乙醯化情形。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。(C)與上述同樣的實驗條件下，使用 ChIP assay 分析於 Ce6-PDT 後 4 小時，A375 細胞中 p300HAT 蛋白質結合至 COX-2 promoter 情形，以及 Ce6-PDT 後乙醯化組蛋白與 NF-κB 結合於 COX-2 promoter 程度。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



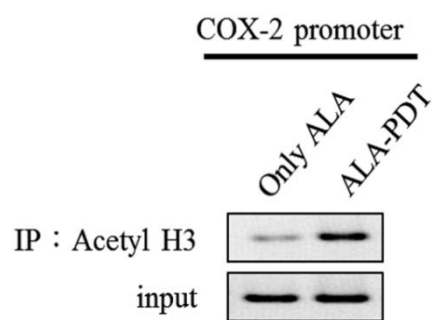
(A)



(B)



(C)

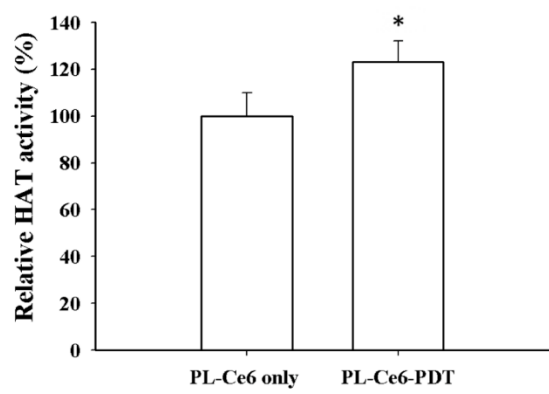


**Figure 18 ALA-PDT 藉由提升 HAT 活性，促使 C26 細胞內 COX-2 promoter 上組蛋白乙醯化程度提升，造成 COX-2 表現增加。**

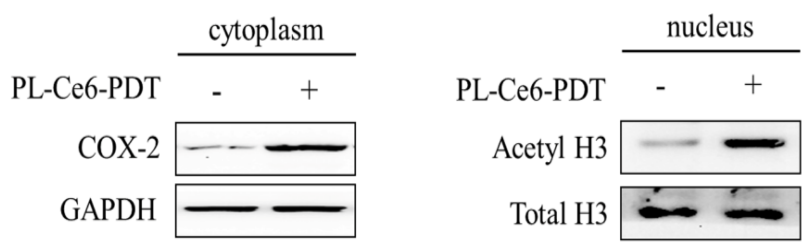
(A) C26 細胞經過 ALA-PDT 後，於第 4 小時使用 HAT assay kit 檢測 HAT 活性。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 ALA only 組別有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。(B) C26 細胞經過 ALA-PDT 後，於第 4 小時使用西方點墨法分析 COX-2 表現量及組蛋白乙醯化情形。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。(C) 與上述同樣的實驗條件下，使用 ChIP assay 分析於 ALA-PDT 後 4 小時，C26 細胞中乙醯化組蛋白結合於 COX-2 promoter 程度。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



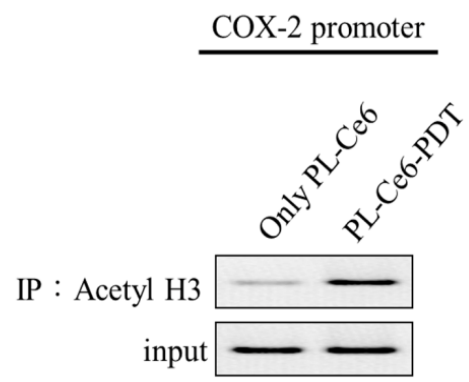
(A)



(B)



(C)

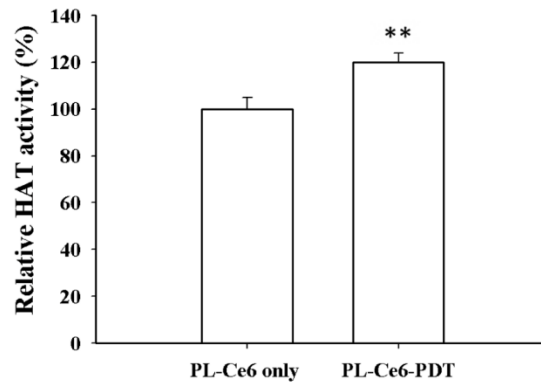


**Figure 19 PL-Ce6-PDT 會提升 NU/NU 小鼠身上 A375 腫瘤之 HAT 活性，增加腫瘤內 COX-2 promoter 上組蛋白乙醯化程度，促進 COX-2 轉錄。**

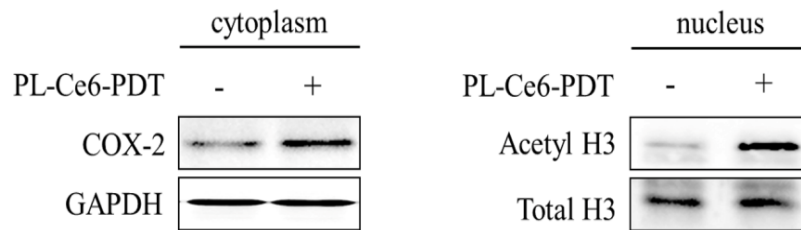
(A)植有 A375 腫瘤之 NU/NU 老鼠經過 PL-Ce6-PDT 處理後，於第 2 小時犧牲老鼠，取出腫瘤，使用 HAT assay kit 檢測 HAT 活性。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 PL-Ce6 only 組別有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。(B)植有 A375 腫瘤之 NU/NU 老鼠經過 PL-Ce6-PDT 處理後，於第 2 小時犧牲老鼠，取出腫瘤，使用西方點墨法分析 COX-2 表現，以及組蛋白乙醯化情形。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。(C)與上述同樣的實驗條件下，使用 ChIP assay 分析於 PL-Ce6-PDT 處理後 2 小時，A375 腫瘤中乙醯化組蛋白結合於 COX-2 promoter 程度。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



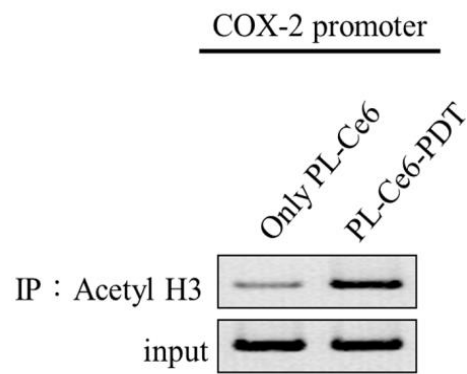
(A)



(B)

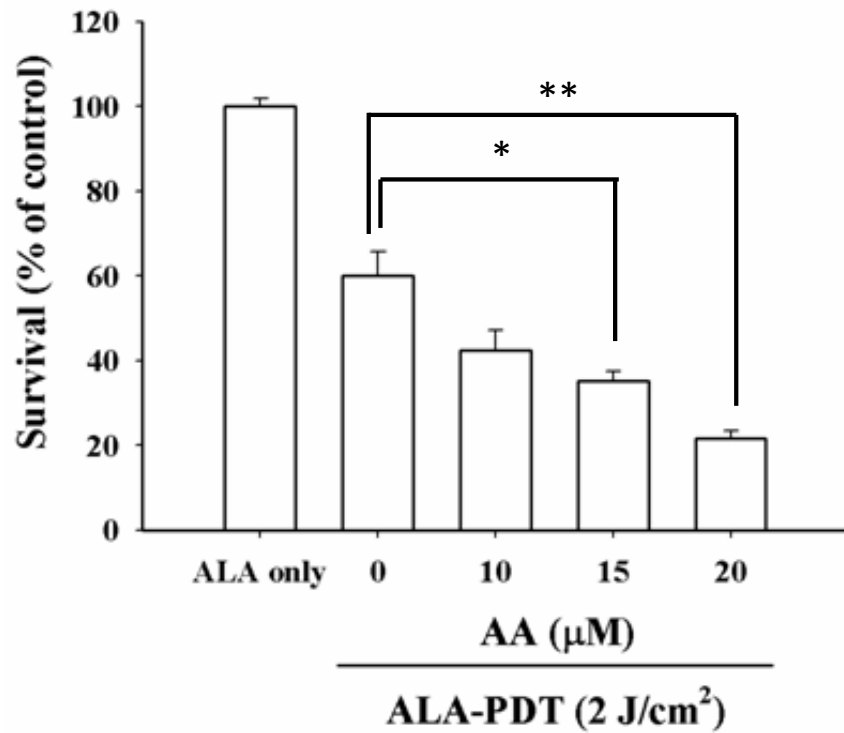


(C)



**Figure 20 PL-Ce6-PDT 會提升 BALB/c 小鼠身上 C26 腫瘤之 HAT 活性，增加腫瘤內 COX-2 promoter 上組蛋白乙醯化程度，促進 COX-2 轉錄。**

(A)植有 C26 腫瘤之 BALB/c 老鼠經過 PL-Ce6-PDT 處理後，於第 2 小時犧牲老鼠，取出腫瘤，使用 HAT assay kit 檢測 HAT 活性。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，與 PL-Ce6 only 組別有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。(B)植有 C26 腫瘤之 BALB/c 老鼠經過 PL-Ce6-PDT 處理後，於第 2 小時犧牲老鼠，取出腫瘤，使用西方點墨法分析 COX-2 表現，以及組蛋白乙醯化情形。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。(C)與上述同樣的實驗條件下，使用 ChIP assay 分析於 PL-Ce6-PDT 處理後 2 小時，C26 腫瘤中乙醯化組蛋白結合於 COX-2 promoter 程度。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



**Figure 21 HAT 抑制劑 Anacardic acid (AA) 能提升 ALA-PDT 細胞毒殺效應。**  
 於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA，再進行照光處理 (2 J/cm<sup>2</sup>)，24 小時後以 MTT assay 分析對 A375 細胞之細胞毒殺效果。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異(p<0.05 或 p<0.01 分別以\*或\*\*標示)。

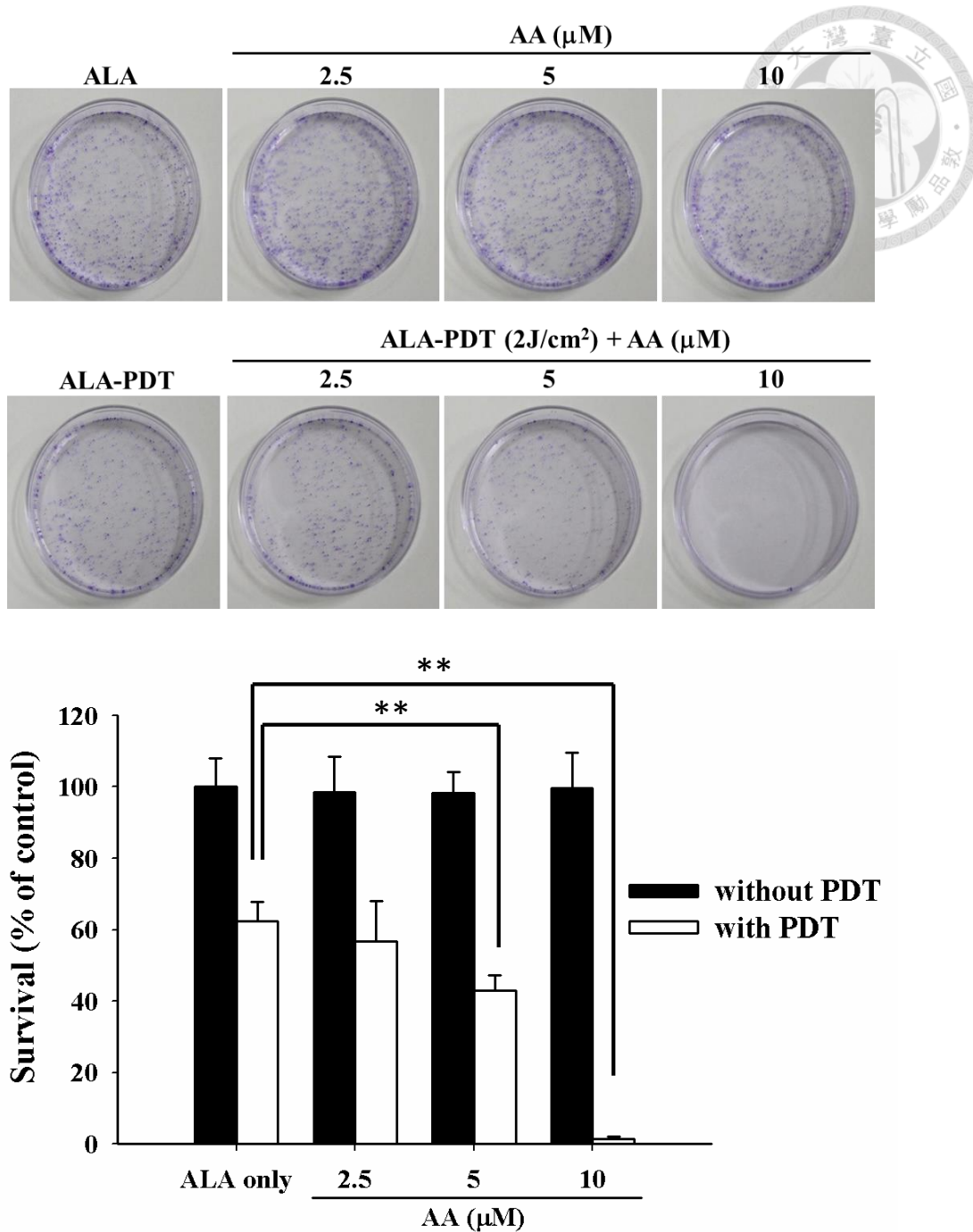
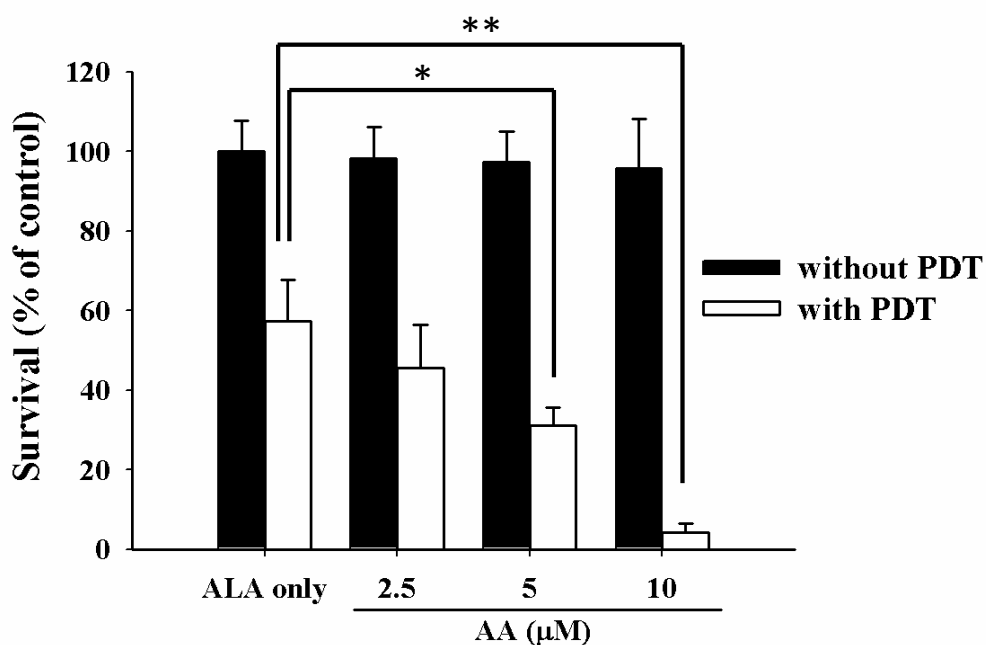
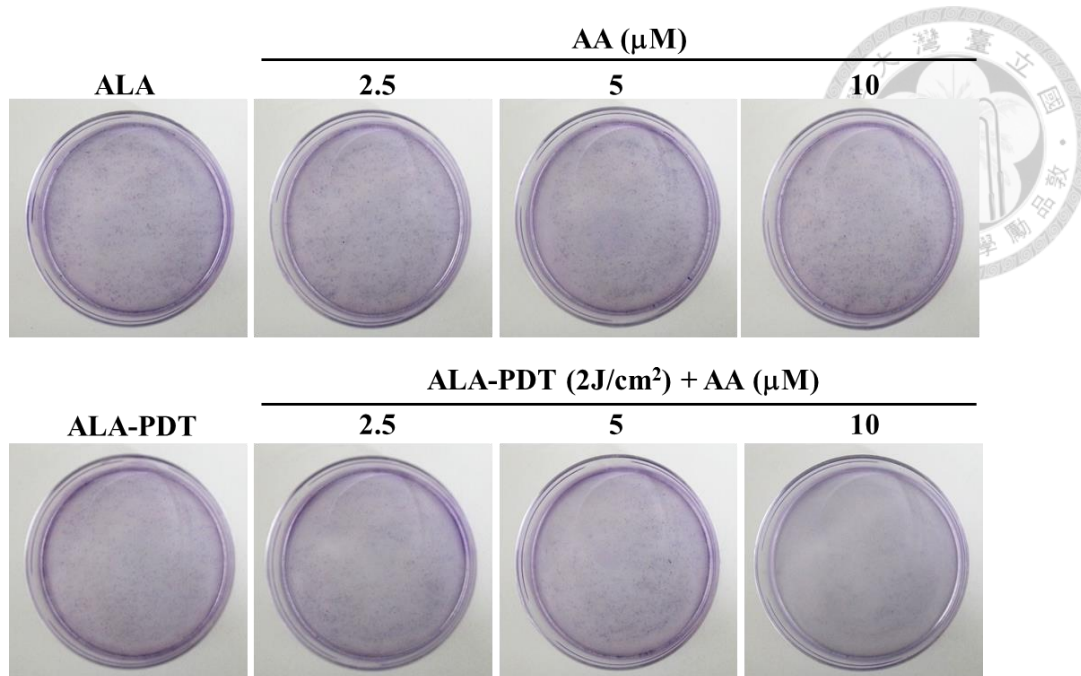


Figure 22 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑能抑制 A375 細胞形成 colonies。

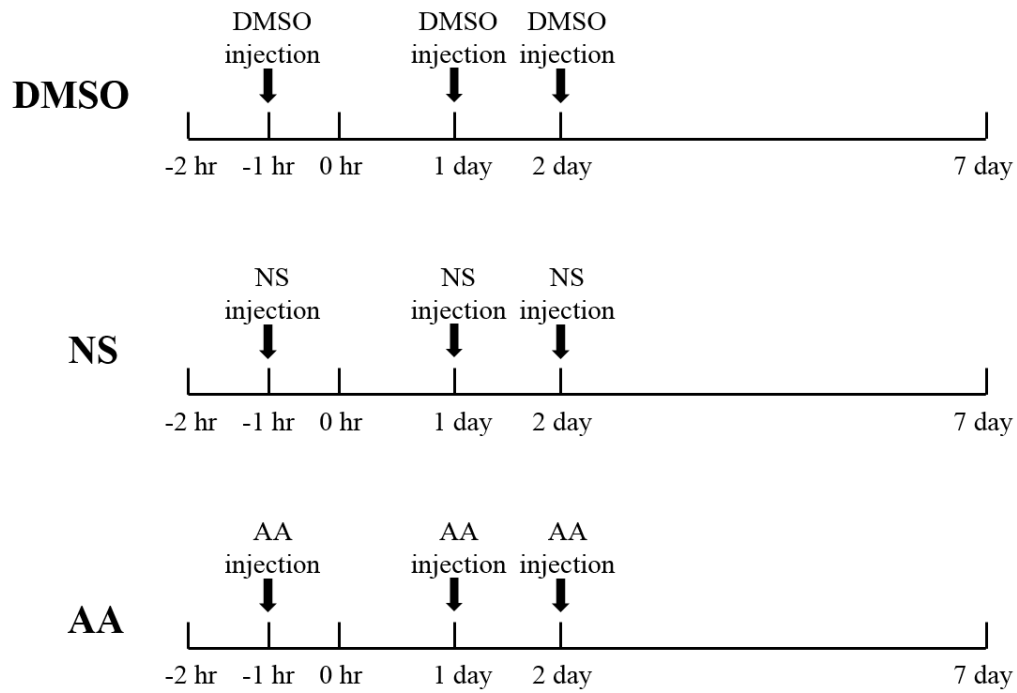
於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA，再進行照光處理 (2 J/cm<sup>2</sup>)，持續培養 5 天後以 crystal violet 染色，分析並計數 A375 細胞形成 colonies 之數目。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異(p<0.05 或 p<0.01 分別以\*或\*\*標示)。



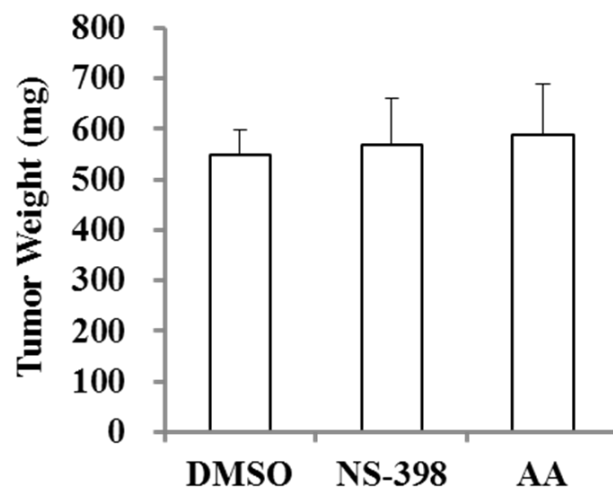
**Figure 23 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑能抑制 C26 細胞形成 colonies。**

於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入不同濃度之 HAT 抑制劑 AA，再進行照光處理 (2 J/cm<sup>2</sup>)，持續培養 5 天後以 crystal violet 染色，分析並計數 C26 細胞形成 colonies 之數目。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異(p<0.05 或 p<0.01 分別以\*或\*\*標示)。

(A)

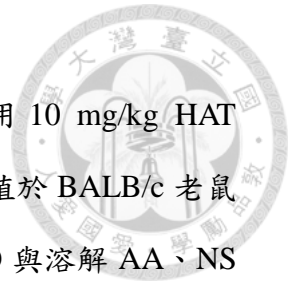


(B)

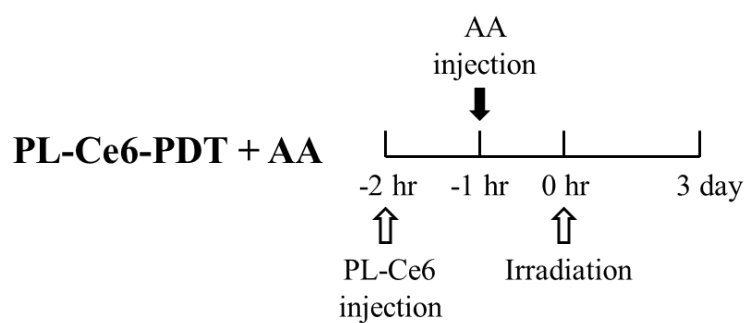
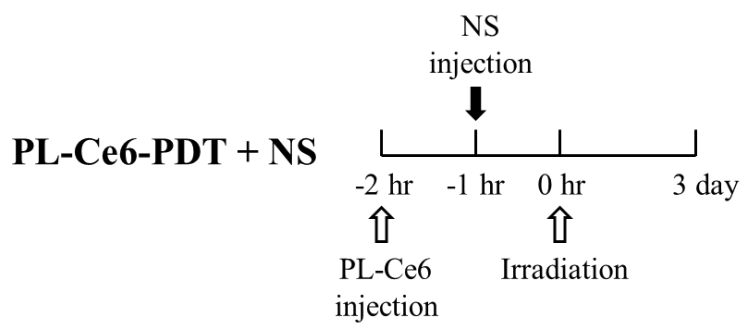
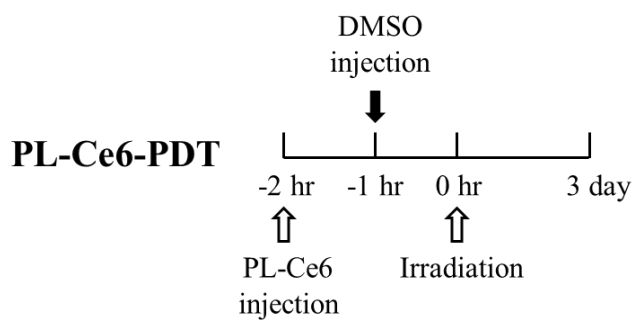
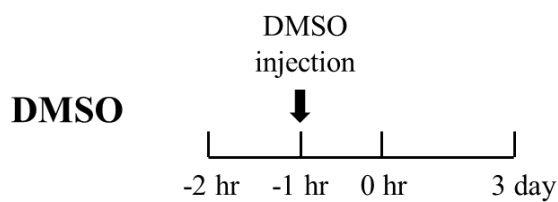


**Figure 24 單獨使用 AA 或 NS-398 不能抑制 C26 腫瘤生長。**

(A)動物實驗組別與治療流程，每組各有 4 隻老鼠。(B)實驗使用 10 mg/kg HAT 抑制劑 AA 或 10 mg/kg COX-2 抑制劑 NS-398 (NS)，分別治療植於 BALB/c 老鼠右背上之 C26 腫瘤(DMSO 組別為控制組，劑量為 50% DMSO 與溶解 AA、NS 之 DMSO 濃度相同)，治療後 7 天犧牲老鼠，取出腫瘤秤重紀錄。實驗結果以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。



(A)



(B)

DMSO  
PL-Ce6-PDT  
PL-Ce6-PDT + NS  
PL-Ce6-PDT + AA

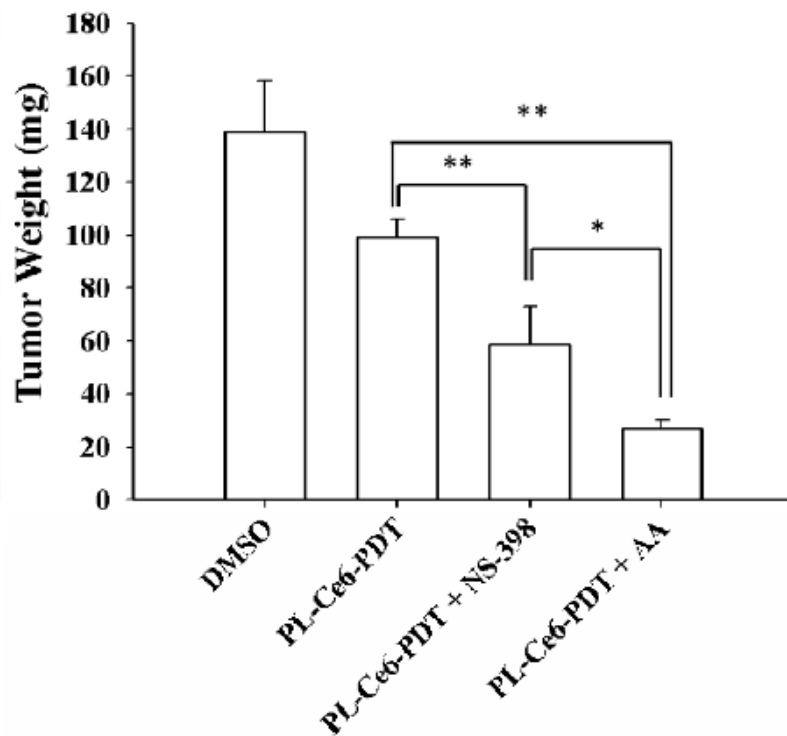
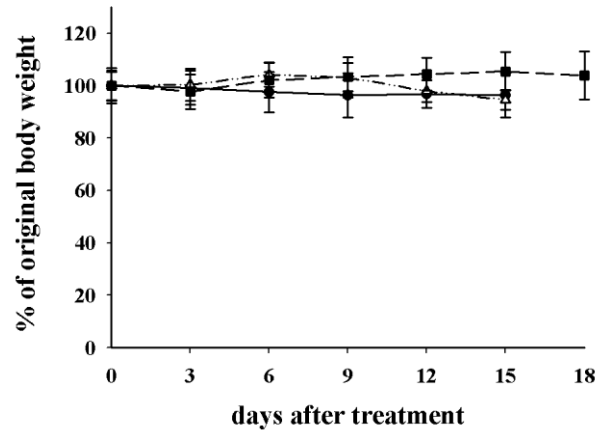


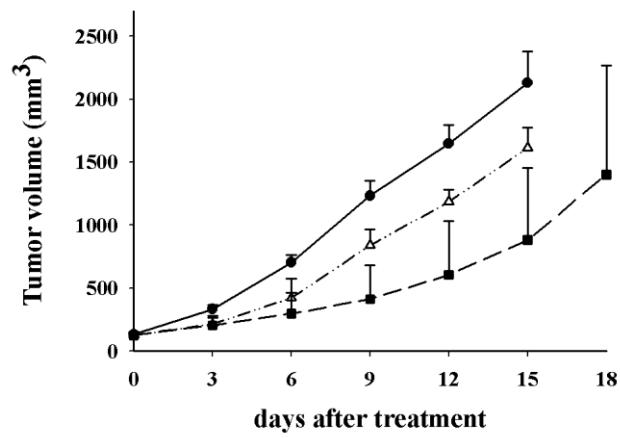
Figure 25 PL-Ce6-PDT 結合 AA 能有效抑制 C26 腫瘤生長。

(A)動物實驗組別與治療流程，每組各有 6 隻老鼠。(B)實驗分為只處理 PL-Ce6-PDT、PL-Ce6-PDT 結合 10 mg/kg HAT 抑制劑 AA，或 PL-Ce6-PDT 結合 10 mg/kg COX-2 抑制劑 NS-398 (NS)，分別治療植於 BALB/c 老鼠右背上之 C26 腫瘤(DMSO 組別為控制組，劑量為 50% DMSO 與溶解 AA、NS 之 DMSO 濃度相同)，治療後 3 天犧牲老鼠，取出腫瘤秤重紀錄。實驗結果以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。

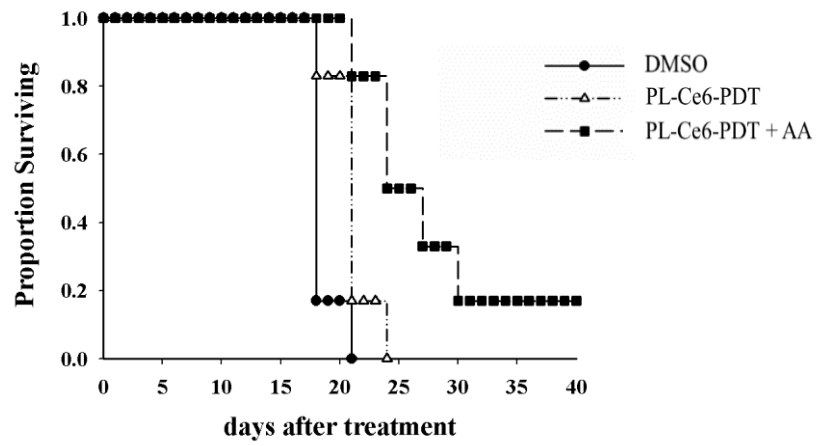
(A)



(B)

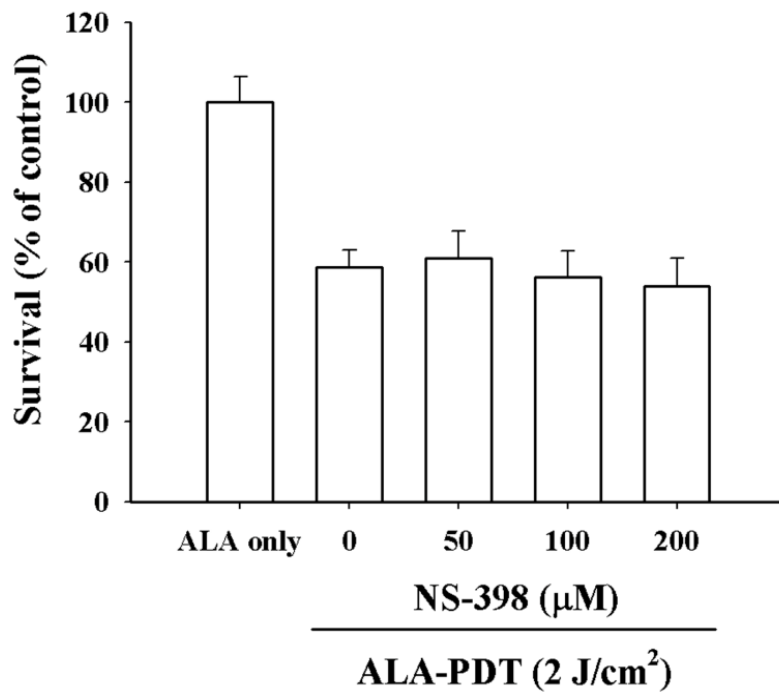


(C)



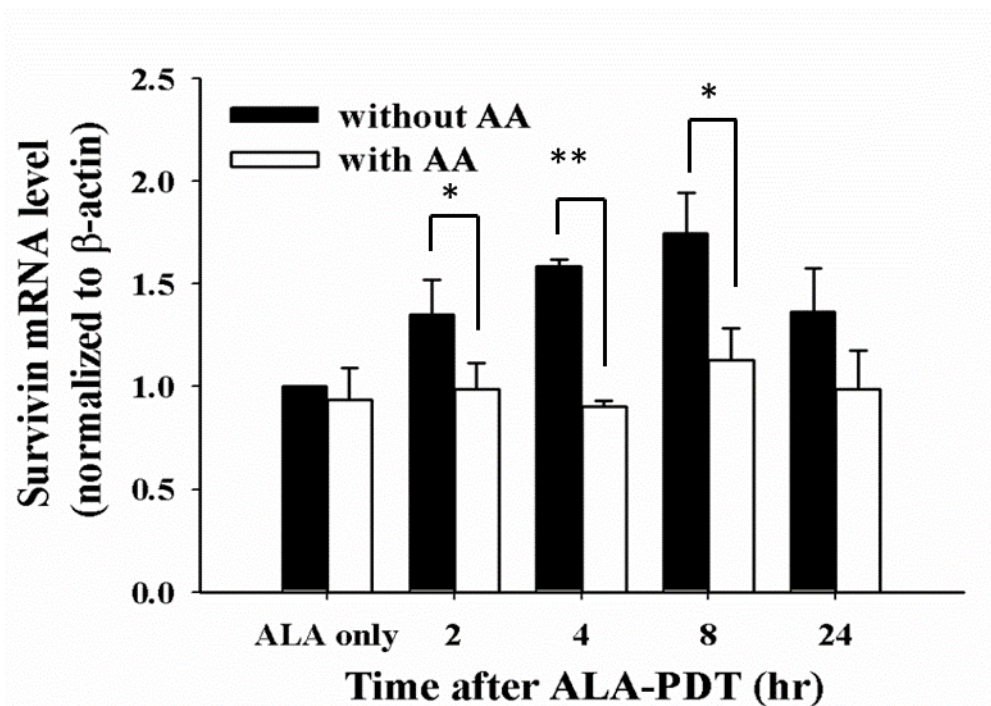
**Figure 26 長期給予 HAT 抑制劑 AA 結合 PL-Ce6-PDT 能抑制 C26 腫瘤生長。**

實驗分為只處理 PL-Ce6-PDT、PL-Ce6-PDT 結合 10 mg/kg HAT 抑制劑 AA，分別治療植於 BALB/c 老鼠右背上之 C26 腫瘤(DMSO 組別為控制組，劑量為 50% DMSO)，給藥及光動力治療流程與 Figure 25 (A)相同，治療後每隔一天給予 10 mg/kg AA，而 DMSO 與 PL-Ce6-PDT 組別則每隔一天給予 50% DMSO，每隔三天測量老鼠體重及腫瘤大小。本實驗每組各有 6 隻老鼠。



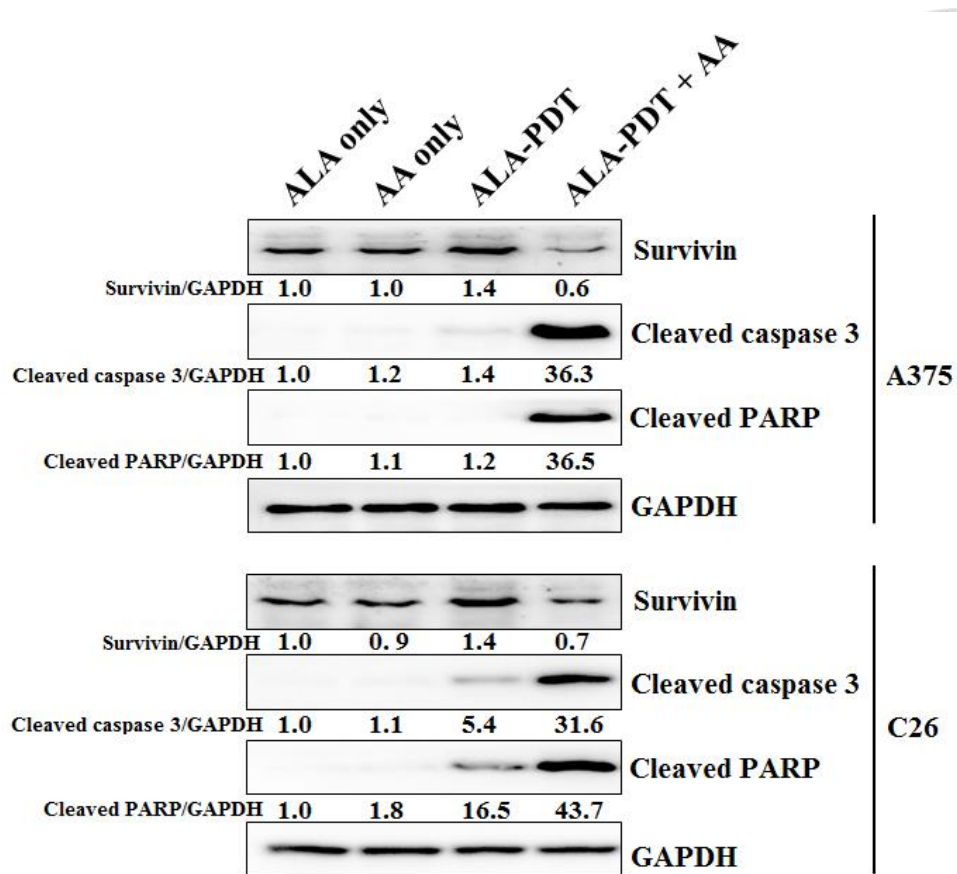
**Figure 27 COX-2 抑制劑 NS-398 無法提升 ALA-PDT 後之細胞毒殺效應。**

於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入不同濃度之 COX-2 抑制劑 NS-398，再進行照光處理 (2 J/cm<sup>2</sup>)，24 小時後以 MTT assay 分析對 A375 細胞之細胞毒殺效果。此為三次獨立實驗之結果，以平均值±標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異(p<0.05 或 p<0.01 分別以\*或\*\*標示)。



**Figure 28** 使用 HAT 抑制劑 AA 能有效阻止 survivin 於光動力治療後上升。

A375 細胞經過 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，或於 ALA-PDT 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  AA 共同處理下，於不同時間點使用 RT-PCR 檢測 survivin mRNA 表現量。此為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。

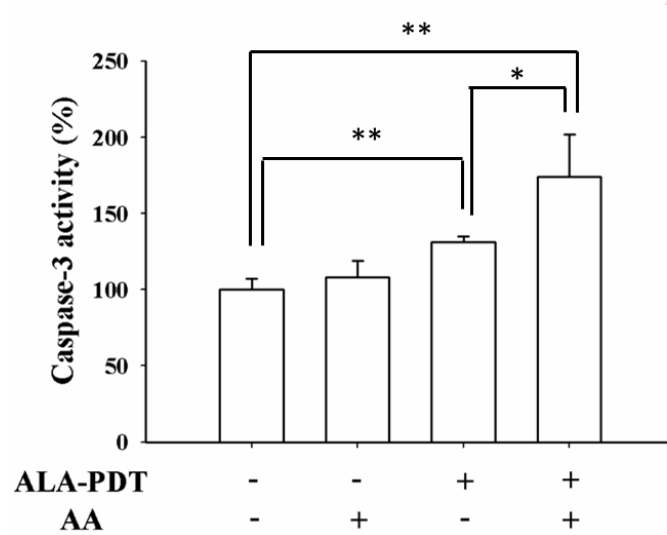


**Figure 29** 使用 HAT 抑制劑 AA 能有效阻止 survivin 於光動力治療後上升，且活化 caspase 3 及 PARP。

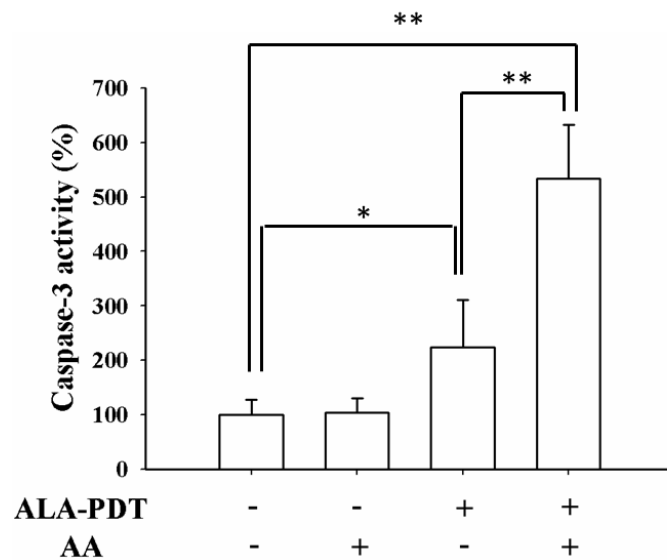
於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA，光動力處理後 4 小時經由西方點墨法檢測 survivin、cleaved caspase 3 及 cleaved PARP 之蛋白質表現量。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。



(A)

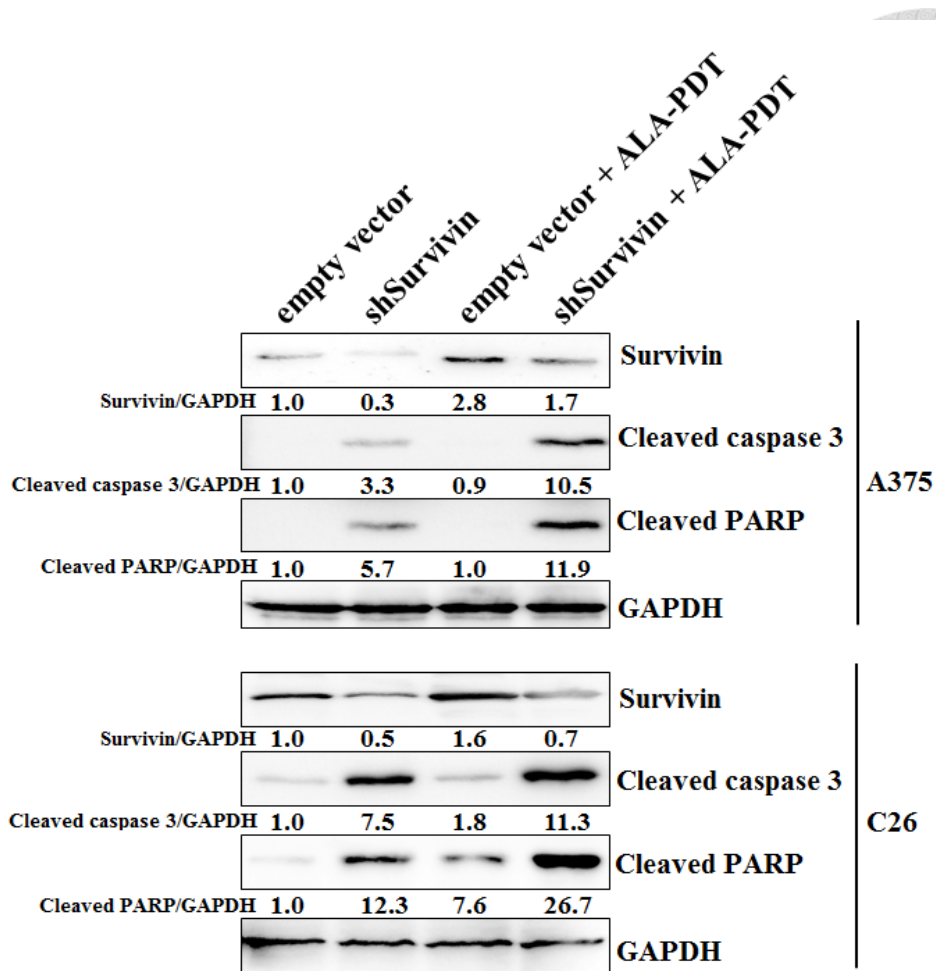


(B)



**Figure 30 使用 HAT 抑制劑 AA 結合 ALA-PDT 能顯著提升 caspase 3 活性。**

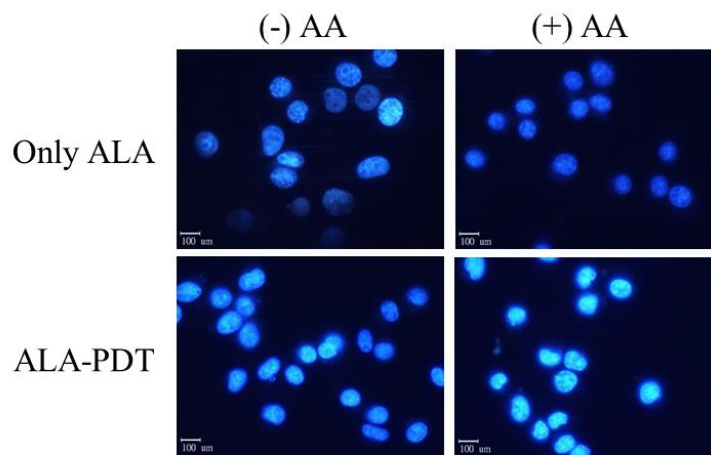
於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA，光動力處理後 4 小時以 Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit 分析(A) A375 細胞與(B) C26 細胞中 caspase 3 活性。此為三次獨立實驗之結果，以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。



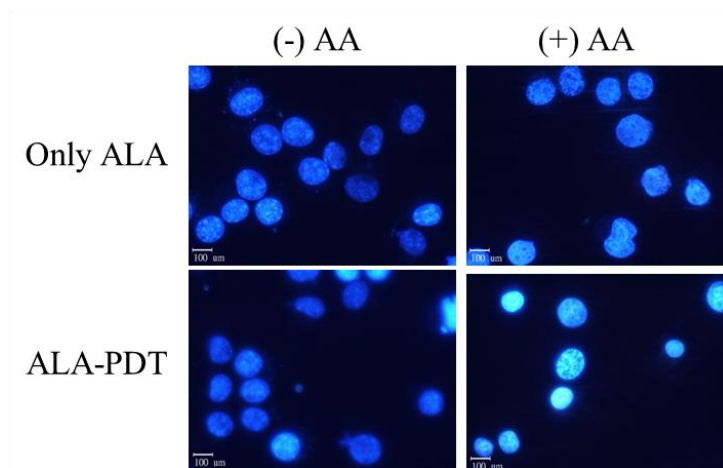
**Figure 31** 使用 shsurvivin 阻止 Survivin 於光動力治療後上升，能大幅提升活化態之 caspase 3 及 PARP 表現。

使用 shRNA 抑制 survivin 基因表現，培養 48 小時後，處以 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )，於照光後 4 小時，以西方點墨法觀察對 survivin、cleaved caspase 3 及 cleaved PARP 蛋白質表現量之影響。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，並以影像分析軟體 ImageJ 定量。

(A)

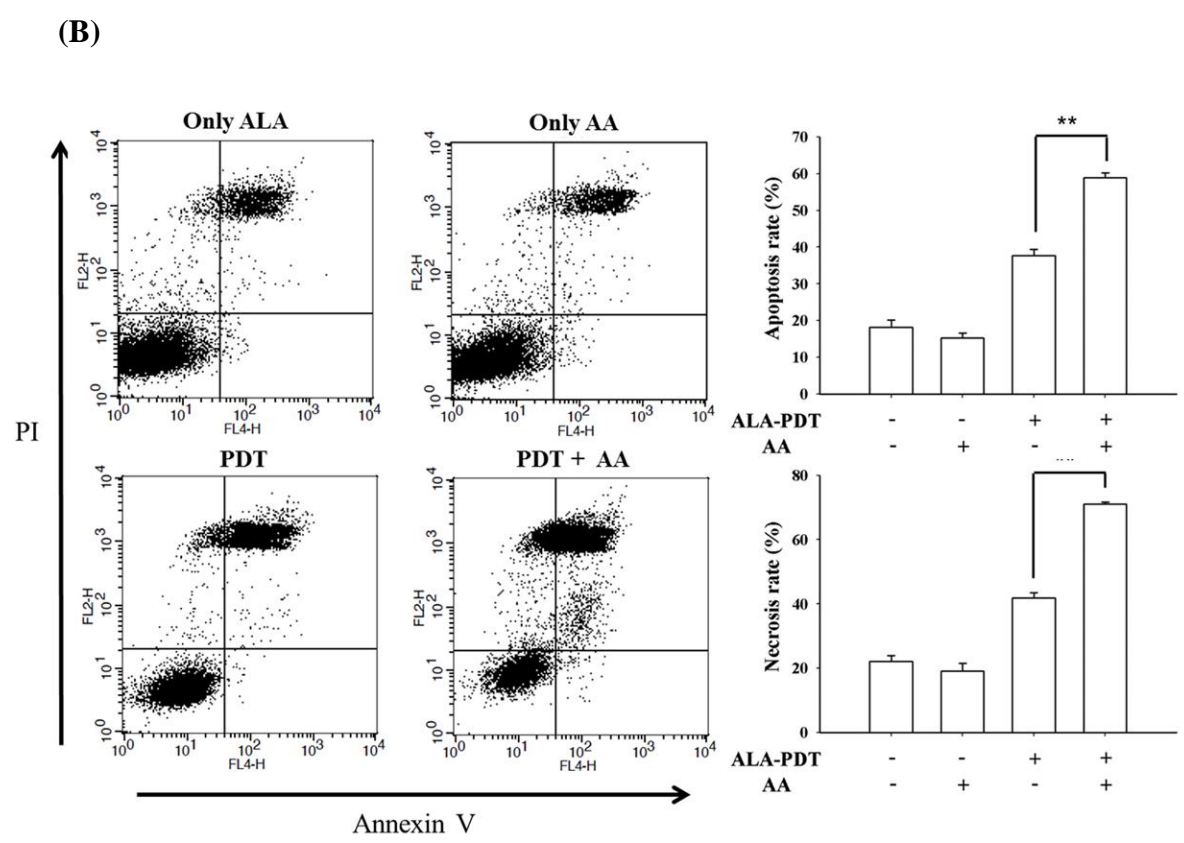
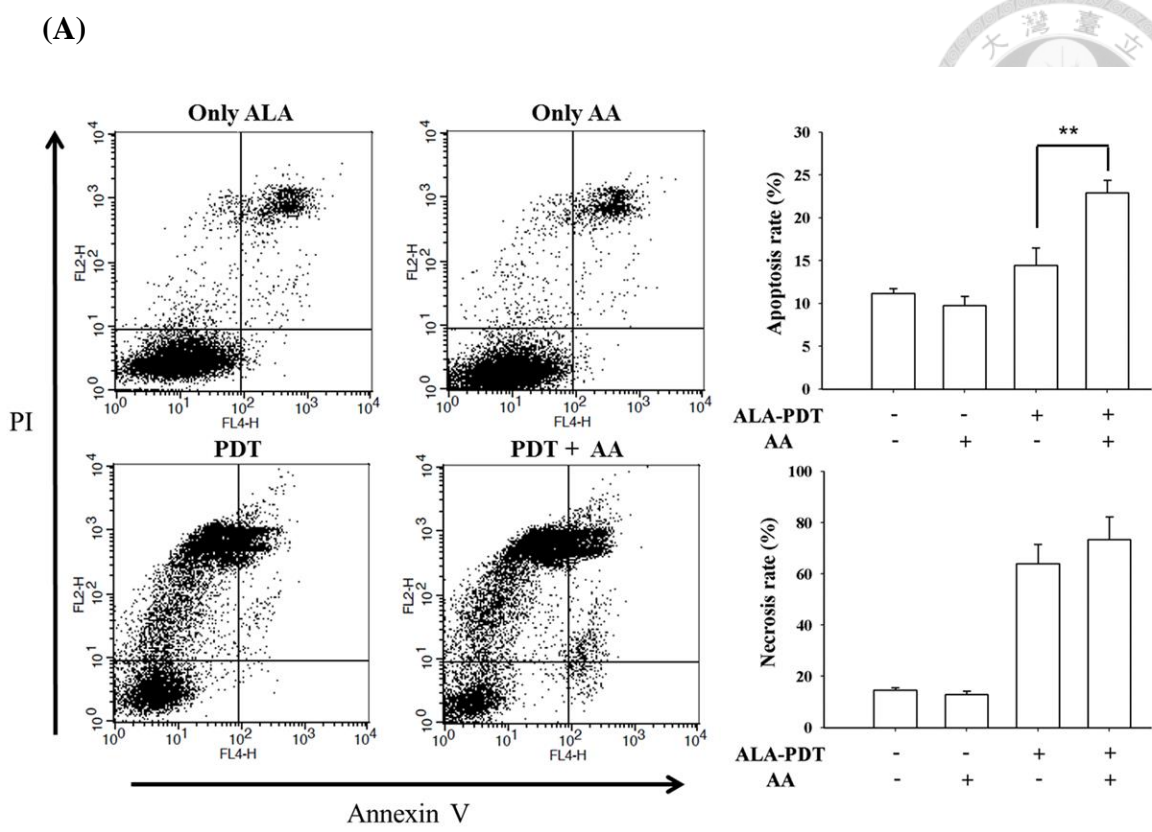
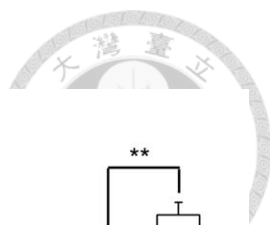


(B)



**Figure 32 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會引發細胞核內染色質聚集。**

於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA，光動力處理後 4 小時進行 Hoechst 染色，以共軛焦顯微鏡觀察(A) A375 細胞與(B) C26 細胞中細胞核內染色質之變化。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。

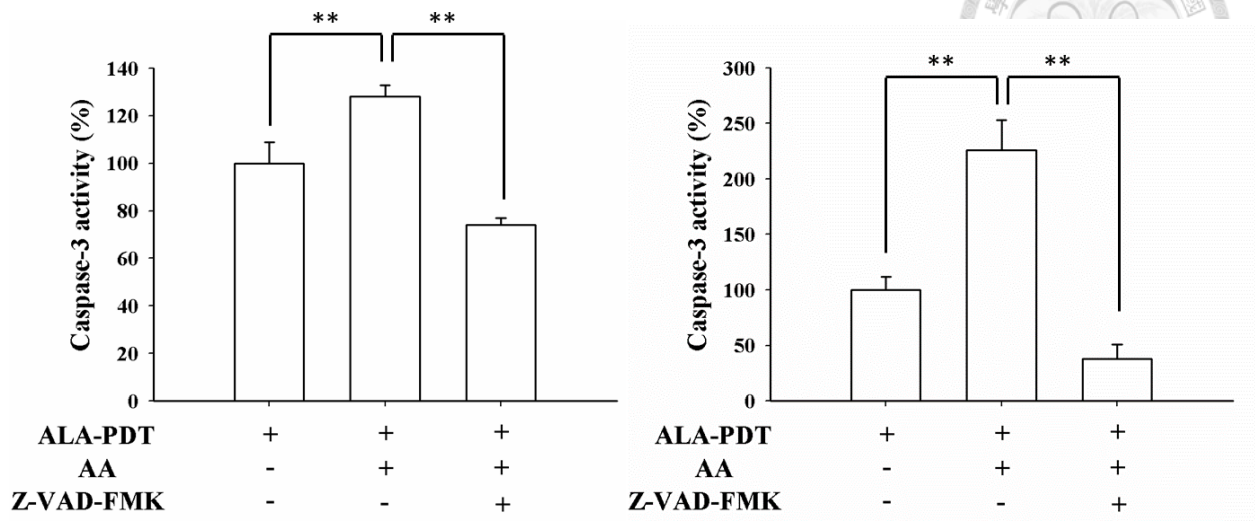


**Figure 33 ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會強烈引發 Phosphatidylserine (PS) 外翻之 apoptosis 現象。**

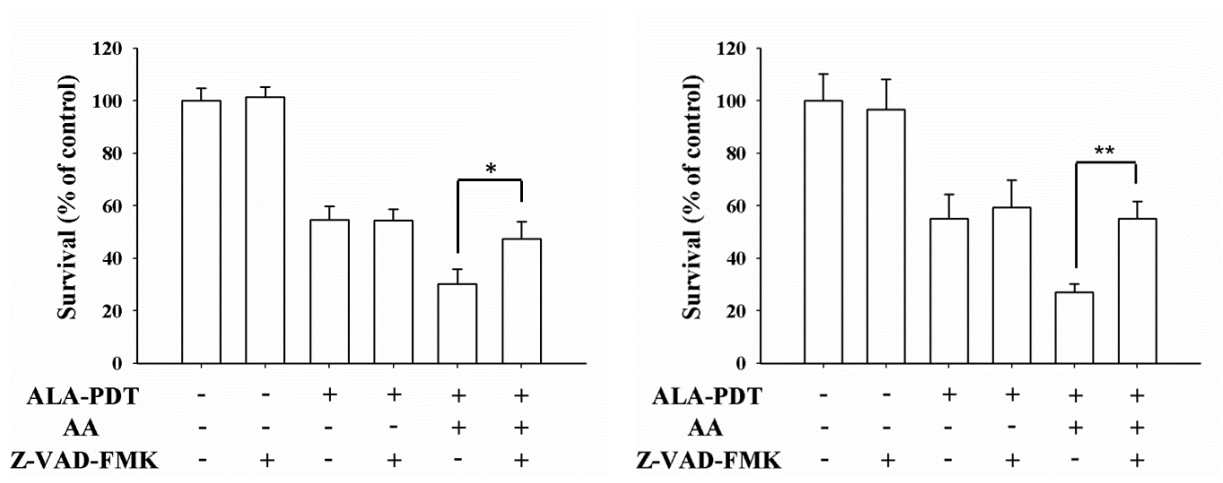
於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA，光動力處理後 4 小時進行 Annexin V/PI 染色，並以流式細胞儀檢測於(A) A375 細胞或(B) C26 細胞中 annexin V(+)之細胞數量。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果，另以流式細胞儀內建軟體進行分析，結果以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。



(A)

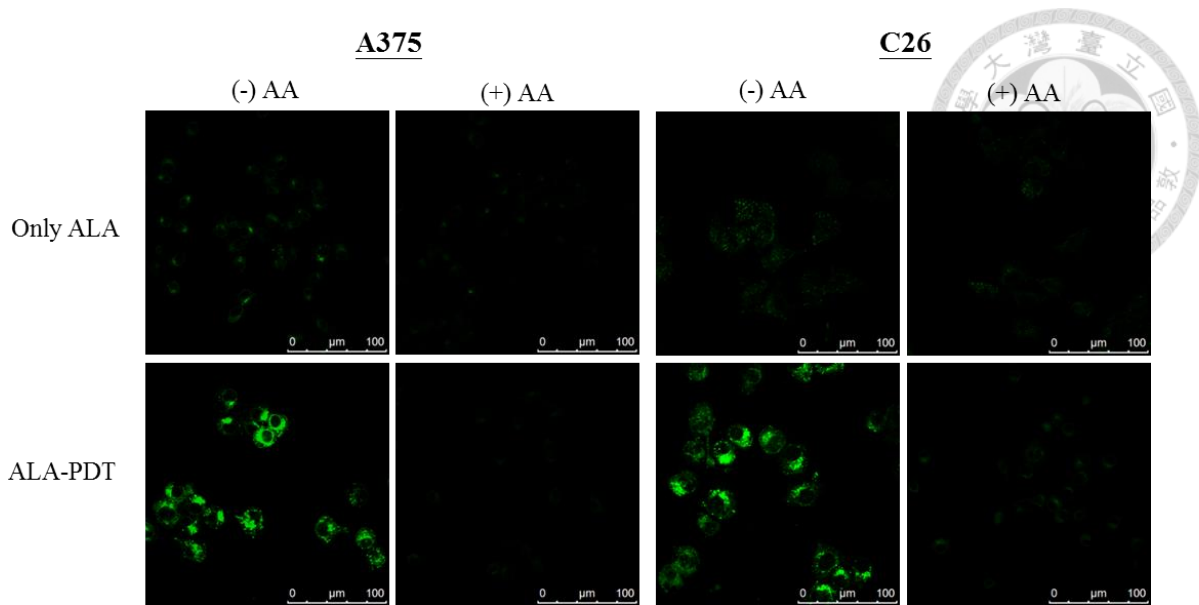


(B)



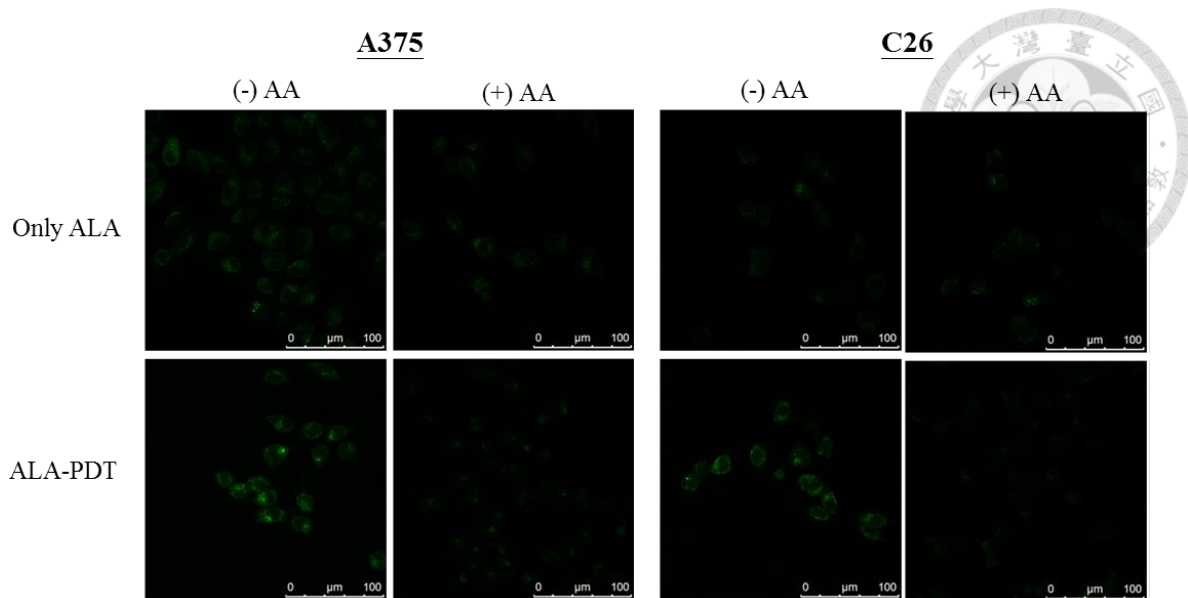
**Figure 34 使用 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 能阻止 ALA-PDT 結合 AA 所引發之細胞死亡。**

於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )前 30 分鐘同時加入  $20 \mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA 及  $40 \mu\text{M}$  Z-VAD-FMK 觀察(A) 4 小時後引發之 caspase 3 活性(以 Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kit 檢測)及(B) 24 小時後引發之細胞毒殺效應(以 MTT assay 檢測)(左側：A375 細胞；右側：C26 細胞)。本實驗進行三次獨立實驗，結果以平均值 $\pm$ 標準誤差呈現。\*表示以 Student's t-test 進行統計，具有顯著差異( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  分別以\*或\*\*標示)。

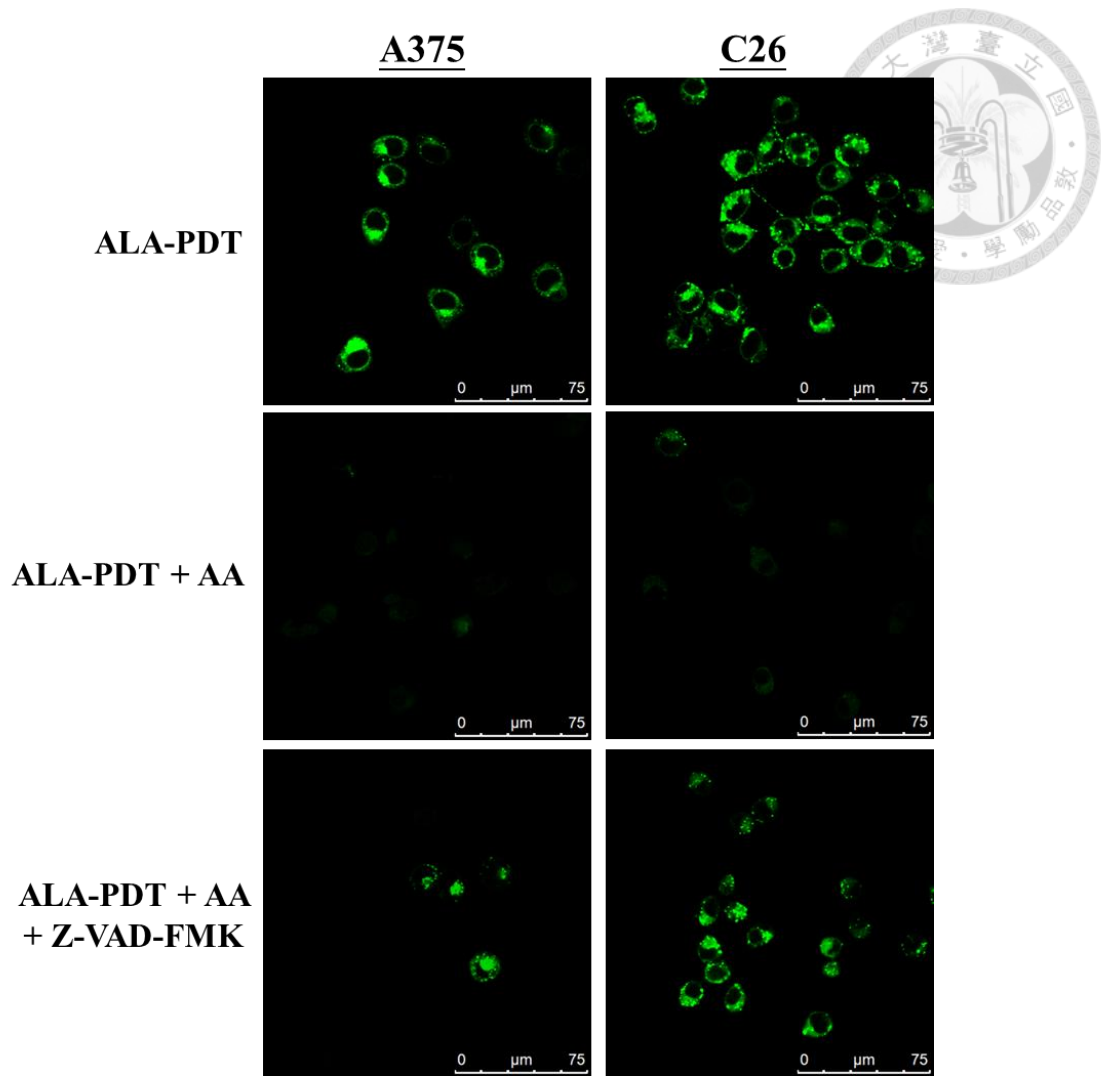


**Figure 35** ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagosomes 形成。

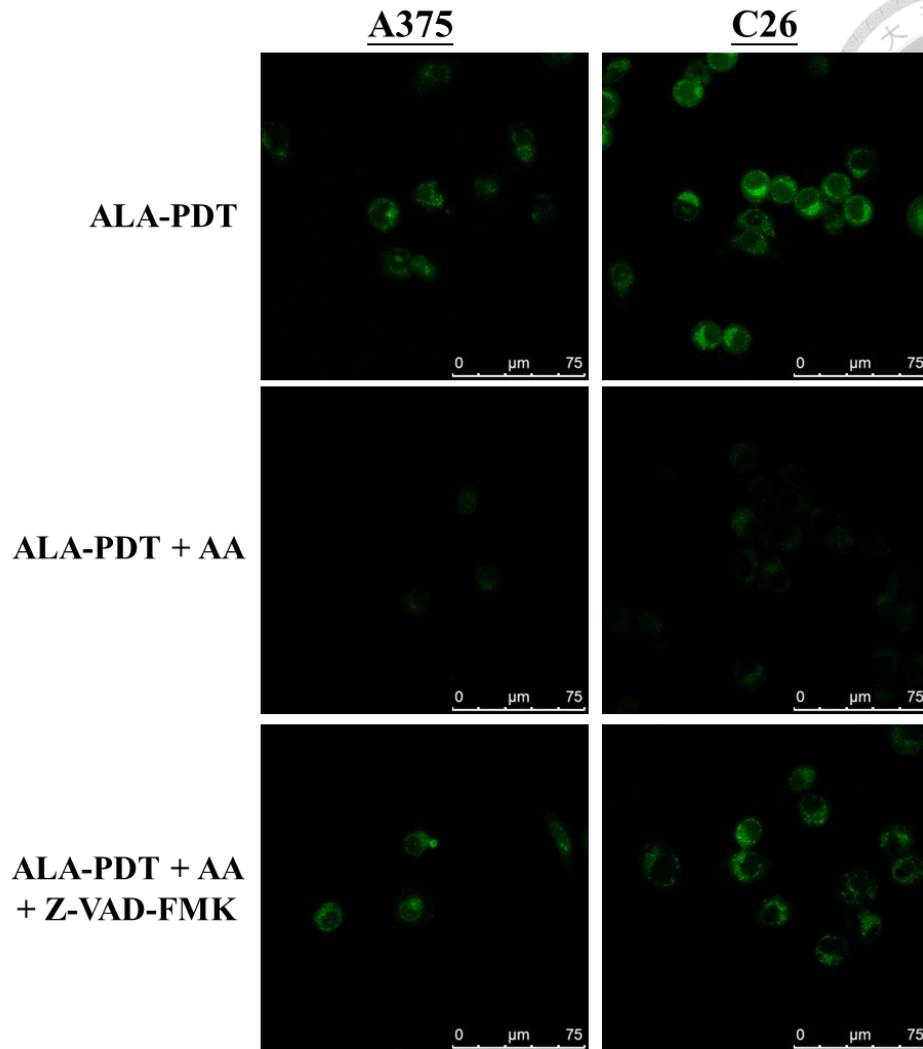
於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ )前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA，在光動力處理後 8 小時進行 monodansylcadaverine (MDC) 染色，並以共軛焦顯微鏡觀察 MDC 螢光。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



**Figure 36** ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagy。送入 LC3-GFP plasmid 進細胞內表現，培養 48 小時後，於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \text{ }\mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA，在光動力處理後 8 小時，以共軛焦顯微鏡觀察 GFP 螢光。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



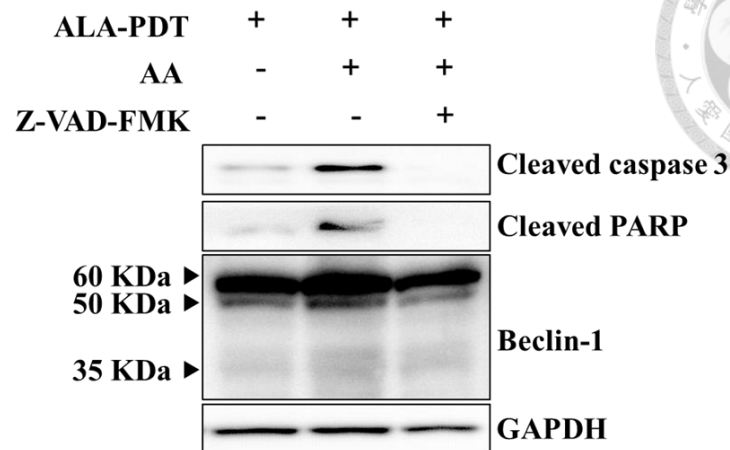
**Figure 37** ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagosomes 形成，而加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 則阻止此現象發生。於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \text{ μM}$  HAT 抑制劑 AA 及  $40 \text{ μM}$  Z-VAD-FMK，在光動力處理後 8 小時，以共軛焦顯微鏡觀察 MDC 螢光。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



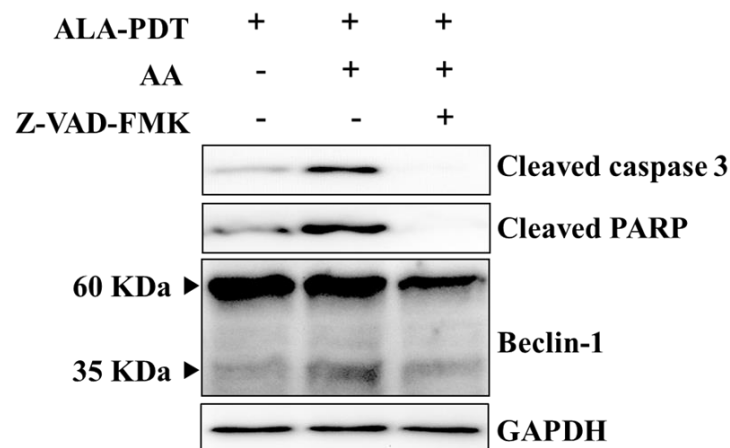
**Figure 38** ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 會抑制光動力效應引發之 autophagy，而加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 則阻止此現象發生。

於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \text{ μM}$  HAT 抑制劑 AA 及  $40 \text{ μM}$  Z-VAD-FMK，在光動力處理 8 小時後，以共軛焦顯微鏡觀察 LC3 螢光。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。

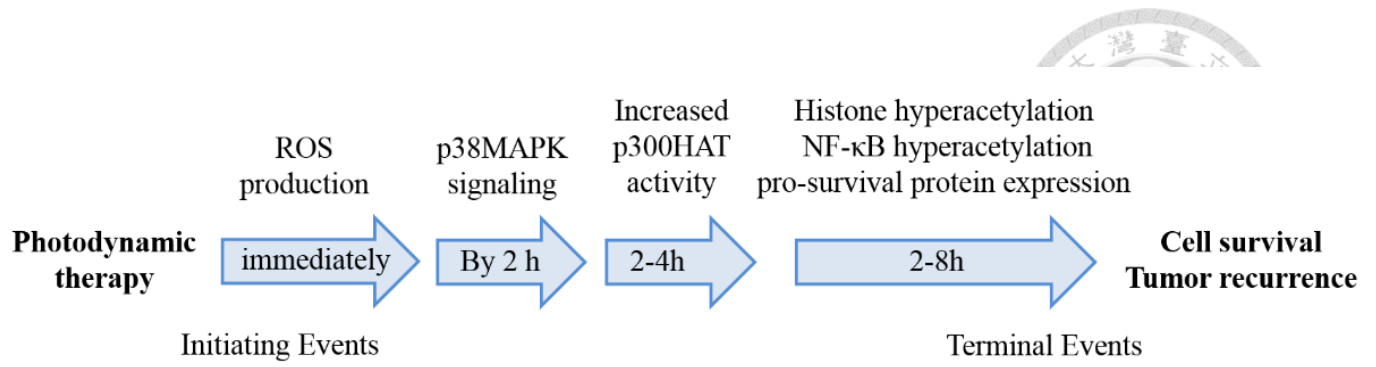
(A)



(B)

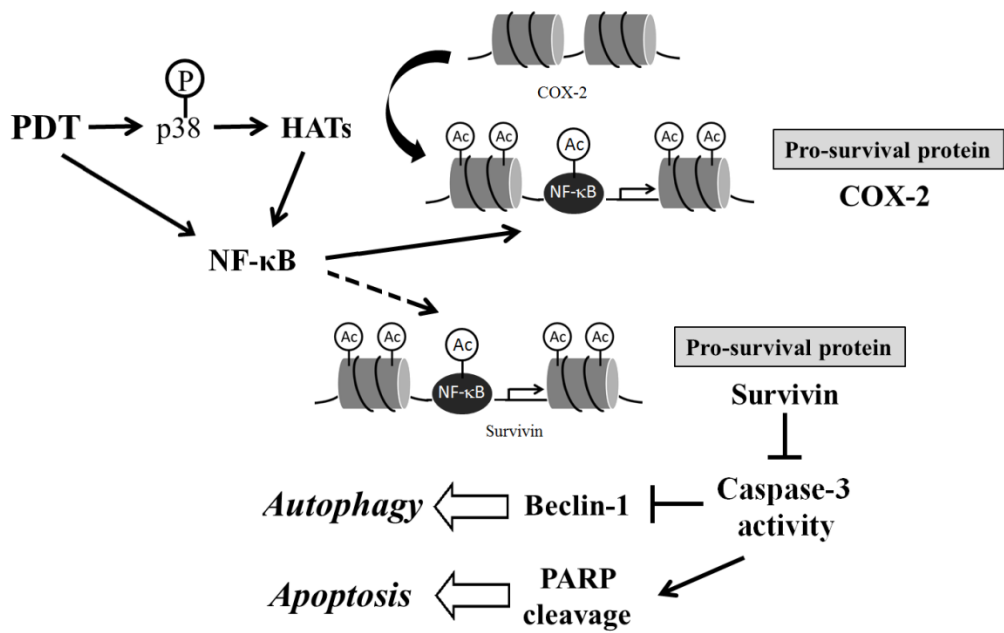


**Figure 39** ALA-PDT 結合 HAT 抑制劑 AA 活化之 caspases 會造成 autophagy 重要因子 Beclin-1 分解，而加入 caspases 抑制劑 Z-VAD-FMK 則阻止此現象發生。於 ALA-PDT ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) 前 30 分鐘加入  $20 \mu\text{M}$  HAT 抑制劑 AA 及  $40 \mu\text{M}$  Z-VAD-FMK，在光動力處理 4 小時後，以西方點墨法觀察於(A) A375 細胞或(B) C26 細胞中 cleaved caspase 3 與 cleaved Beclin-1 表現量。本實驗進行三次獨立實驗，選取本圖作為代表性結果。



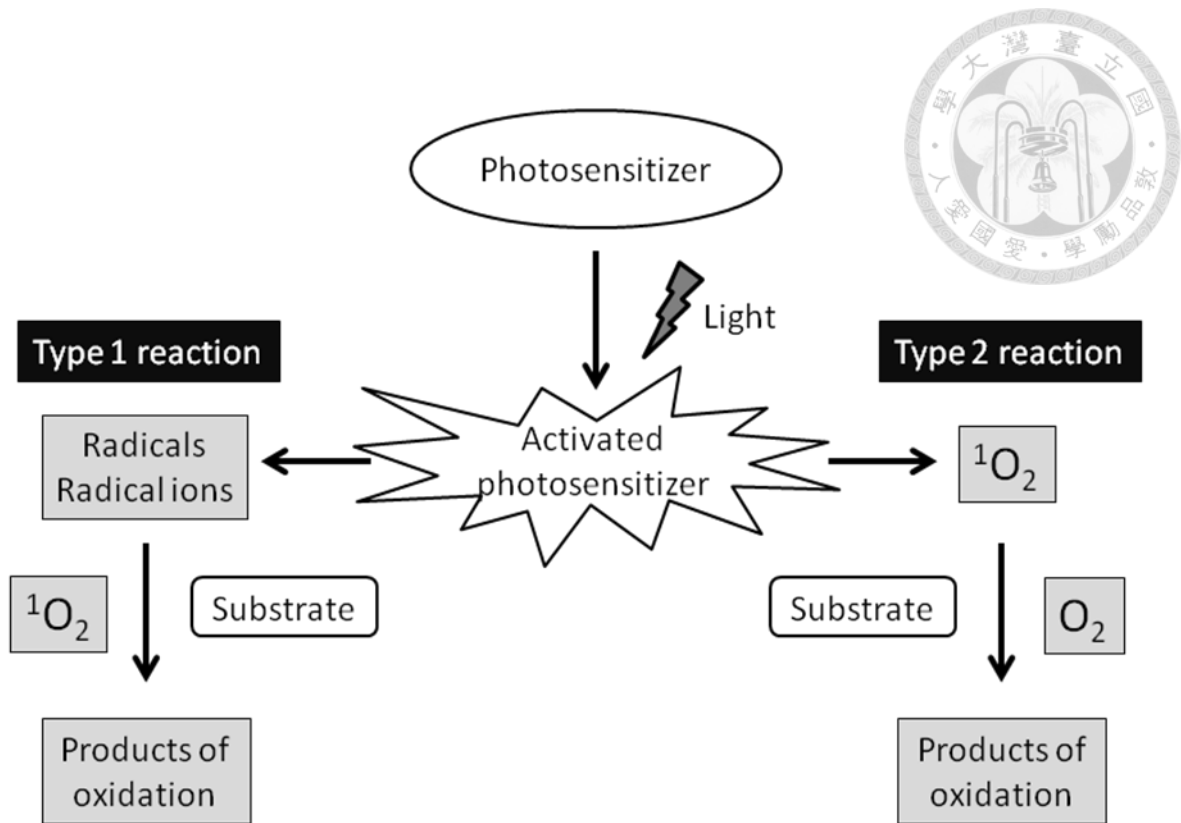
**Figure 40** 光動力治療後一系列訊息傳遞之過程。

光動力治療後立即引發氧化壓力，誘發 p38MAPK 於 2 小時內活化，活化的 p38MAPK 隨後促進組蛋白乙醯化轉酶活性提升，在光動力作用後 2 至 8 小時間，引起組蛋白與 NF-κB 乙醯化修飾增加，而促進促存活蛋白質表現。

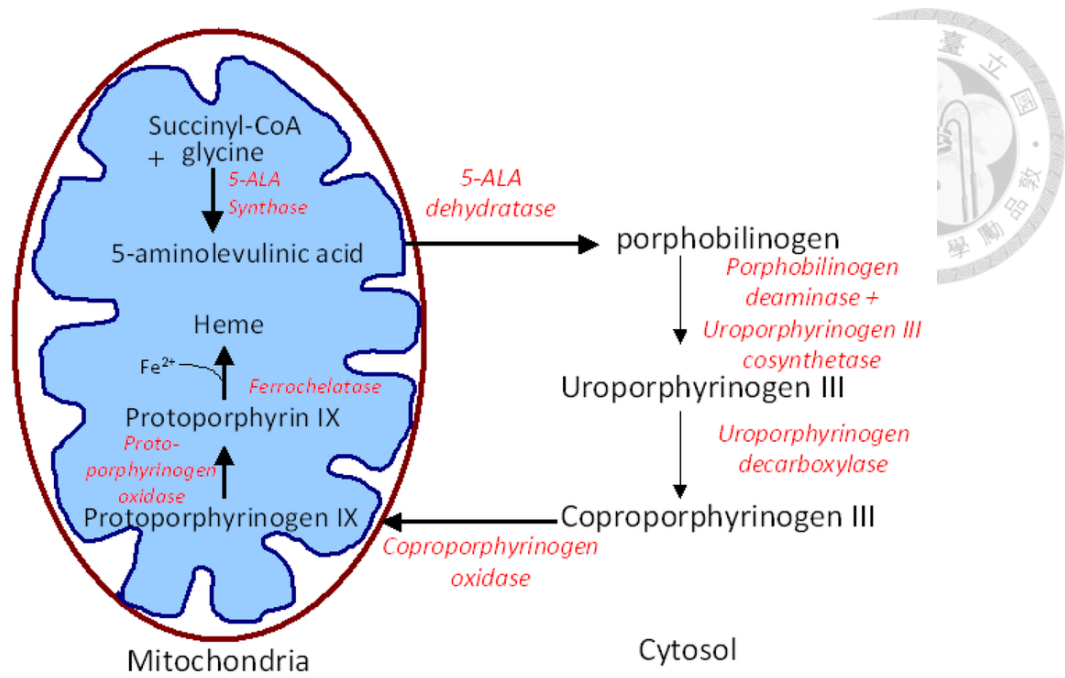


**Figure 41** 結論示意圖。

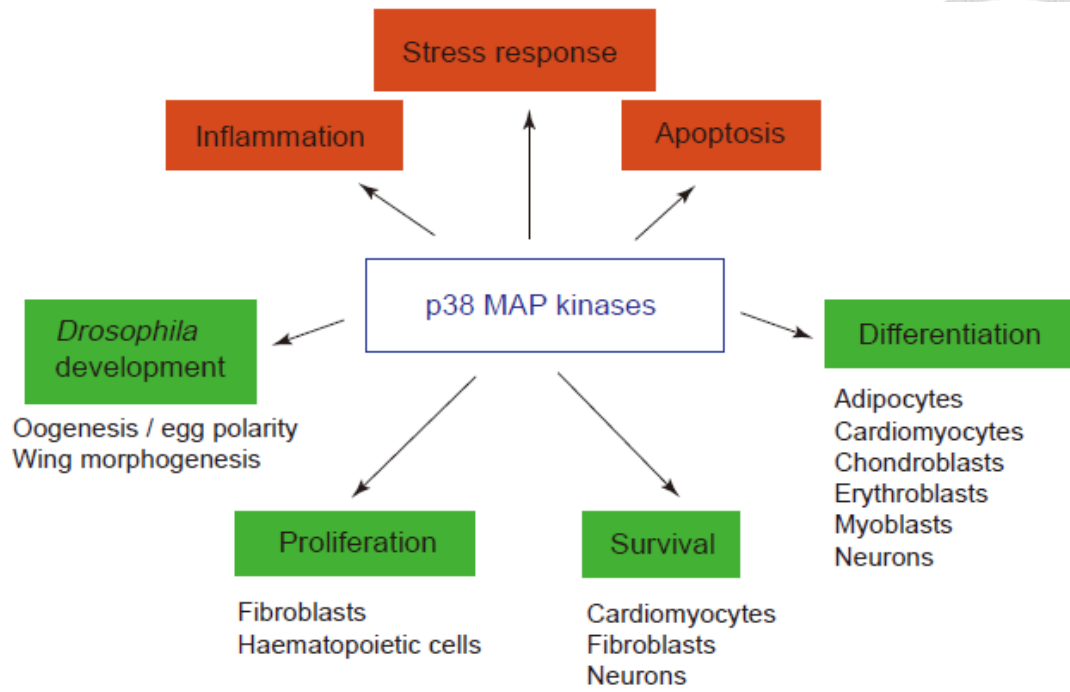
光動力治療會透過 p38MAPK 調控組蛋白與 NF-κB 乙醯化修飾，促進 pro-survival protein 表現，進而抑制 apoptosis 和誘發 autophagy，使細胞得以修復損傷，而增進細胞存活。



附圖一、光動力作用模式。



附圖二、血紅素生合成路徑(Adapted from [298])。

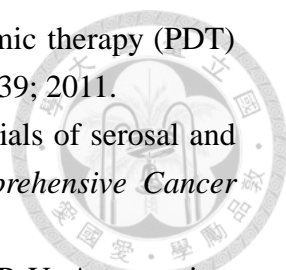


附圖三、p38MAPK 參與調控的細胞反應(Adapted from[96])。

## 參考文獻



- [1] Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **90**:889-905; 1998.
- [2] Dolmans, D. E.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews. Cancer* **3**:380-387; 2003.
- [3] Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**:250-281; 2011.
- [4] Gomer, C. J.; Rucker, N.; Ferrario, A.; Wong, S. Properties and applications of photodynamic therapy. *Radiation research* **120**:1-18; 1989.
- [5] Oleinick, N. L.; Evans, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiation research* **150**:S146-156; 1998.
- [6] Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* **74**:656-669; 2001.
- [7] Dougherty, T. J. Activated dyes as antitumor agents. *Journal of the National Cancer Institute* **52**:1333-1336; 1974.
- [8] Kelly, J. F.; Snell, M. E.; Berenbaum, M. C. Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *British journal of cancer* **31**:237-244; 1975.
- [9] Foote, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science (New York, N.Y.)* **162**:963-970; 1968.
- [10] Peng, Q.; Moan, J.; Nesland, J. M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastructural pathology* **20**:109-129; 1996.
- [11] Nowak-Stepniowska, A.; Pergol, P.; Padzik-Graczyk, A. [Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy--mechanisms and applications]. *Postepy biochemii* **59**:53-63; 2013.
- [12] Juarranz, A.; Jaen, P.; Sanz-Rodriguez, F.; Cuevas, J.; Gonzalez, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* **10**:148-154; 2008.
- [13] Rigual, N. R.; Shafirstein, G.; Frustino, J.; Seshadri, M.; Cooper, M.; Wilding, G.; Sullivan, M. A.; Henderson, B. Adjuvant intraoperative photodynamic therapy in head and neck cancer. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery* **139**:706-711; 2013.

- 
- [14] Allison, R.; Moghissi, K.; Downie, G.; Dixon, K. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **8**:231-239; 2011.
- [15] Cengel, K. Adapting preclinical concepts for use in clinical trials of serosal and interstitial photodynamic therapy. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **10 Suppl 2**:S18-22; 2012.
- [16] Yavari, N.; Andersson-Engels, S.; Segersten, U.; Malmstrom, P. U. An overview on preclinical and clinical experiences with photodynamic therapy for bladder cancer. *The Canadian journal of urology* **18**:5778-5786; 2011.
- [17] Plonka, J.; Latocha, M. [Photodynamic therapy in the treatment of breast cancer]. *Polski merkurusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* **33**:173-175; 2012.
- [18] Canal-Fontcuberta, I.; Salomao, D. R.; Robertson, D.; Cantrill, H. L.; Koozekanani, D.; Rath, P. P.; Pulido, J. S. Clinical and histopathologic findings after photodynamic therapy of choroidal melanoma. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **32**:942-948; 2012.
- [19] Baldea, I.; Filip, A. G. Photodynamic therapy in melanoma--an update. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **63**:109-118; 2012.
- [20] Muragaki, Y.; Akimoto, J.; Maruyama, T.; Iseki, H.; Ikuta, S.; Nitta, M.; Maebayashi, K.; Saito, T.; Okada, Y.; Kaneko, S.; Matsumura, A.; Kuroiwa, T.; Karasawa, K.; Nakazato, Y.; Kayama, T. Phase II clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. *Journal of neurosurgery* **119**:845-852; 2013.
- [21] Fayter, D.; Corbett, M.; Heirs, M.; Fox, D.; Eastwood, A. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health technology assessment (Winchester, England)* **14**:1-288; 2010.
- [22] Lang, K.; Lehmann, P.; Bolsen, K.; Ruzicka, T.; Fritsch, C. Aminolevulinic acid: pharmacological profile and clinical indication. *Expert opinion on investigational drugs* **10**:1139-1156; 2001.
- [23] Neupane, J.; Ghimire, S.; Shakya, S.; Chaudhary, L.; Shrivastava, V. P. Effect of light emitting diodes in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **7**:44-49; 2010.
- [24] Kossodo, S.; LaMuraglia, G. M. Clinical potential of photodynamic therapy in cardiovascular disorders. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* **1**:15-21; 2001.
- [25] Stoffelns, B. M.; Kramann, C.; Schoepfer, K. [Laser photocoagulation and photodynamic therapy (PDT) with verteporfin for retinal angiomatous proliferation

(RAP) in age-related macular degeneration (AMD)]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* **225**:392-396; 2008.

[26] Kuonen, F.; Gaide, O. [New light on skin photodynamic therapy]. *Revue medicale suisse* **10**:754, 756-759; 2014.

[27] Ormond, A. B.; Freeman, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* **6**:817-840; 2013.

[28] Dougherty, T. J. An update on photodynamic therapy applications. *Journal of clinical laser medicine & surgery* **20**:3-7; 2002.

[29] Garland, M. J.; Cassidy, C. M.; Woolfson, D.; Donnelly, R. F. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. *Future medicinal chemistry* **1**:667-691; 2009.

[30] Almerie, M. Q.; Gossedge, G.; Wright, K. E.; Jayne, D. G. Photodynamic diagnosis for detection of peritoneal carcinomatosis. *The Journal of surgical research* **195**:175-187; 2015.

[31] Spikes, J. D. Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **6**:259-274; 1990.

[32] Nyman, E. S.; Hynninen, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **73**:1-28; 2004.

[33] Scott, L. J.; Goa, K. L. Verteporfin. *Drugs & aging* **16**:139-146; discussion 147-138; 2000.

[34] Senge, M. O.; Brandt, J. C. Temoporfin (Foscan(R), 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer. *Photochemistry and photobiology* **87**:1240-1296; 2011.

[35] Fukuda, H.; Casas, A.; Batlle, A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**:272-276; 2005.

[36] Collaud, S.; Juzeniene, A.; Moan, J.; Lange, N. On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* **4**:301-316; 2004.

[37] Kalka, K.; Merk, H.; Mukhtar, H. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology* **42**:389-413; quiz 414-386; 2000.

[38] Iinuma, S.; Farshi, S. S.; Ortel, B.; Hasan, T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *British journal of cancer* **70**:21-28; 1994.

[39] Heyerdahl, H.; Wang, I.; Liu, D. L.; Berg, R.; Andersson-Engels, S.; Peng, Q.; Moan, J.; Svanberg, S.; Svanberg, K. Pharmacokinetic studies on 5-aminolevulinic



acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tumours and normal tissues. *Cancer letters* **112**:225-231; 1997.

[40] Hinnen, P.; de Rooij, F. W.; van Velthuysen, M. L.; Edixhoven, A.; van Hillegersberg, R.; Tilanus, H. W.; Wilson, J. H.; Siersema, P. D. Biochemical basis of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation: a study in patients with (pre)malignant lesions of the oesophagus. *British journal of cancer* **78**:679-682; 1998.

[41] Tehranchinia, Z.; Rahimi, H.; Ahadi, M. S. Aminolevulinic Acid-photodynamic therapy of Basal cell carcinoma and factors affecting the response to treatment: a clinical trial. *Indian journal of dermatology* **58**:327; 2013.

[42] Fagnoli, M. C.; Kostaki, D.; Piccioni, A.; Di Stefani, A.; Peris, K. Photodynamic therapy for the treatment of micro invasive squamous cell carcinoma of the lower lip: a case report. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*; 2014.

[43] Sunohara, M.; Ozawa, T.; Morimoto, K.; Harada, T.; Ishii, M.; Fukai, K. Dye laser photodynamic therapy for Bowen's disease in a patient with epidermodysplasia verruciformis. *Osaka city medical journal* **58**:77-82; 2012.

[44] Berman, B.; Nestor, M. S.; Newburger, J.; Park, H.; Swenson, N. Treatment of facial actinic keratoses with aminolevulinic acid photodynamic therapy (ALA-PDT) or ingenol mebutate 0.015% gel with and without prior treatment with ALA-PDT. *Journal of drugs in dermatology : JDD* **13**:1353-1356; 2014.

[45] Lane, K. L.; Hovenic, W.; Ball, K.; Zachary, C. B. Daylight photodynamic therapy: the Southern California experience. *Lasers in surgery and medicine* **47**:168-172; 2015.

[46] Kim, J. E.; Kim, S. J.; Hwang, J. I.; Lee, K. J.; Park, H. J.; Cho, B. K. New proposal for the treatment of viral warts with intralesional injection of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *The Journal of dermatological treatment* **23**:192-195; 2012.

[47] Szeimies, R. M.; Landthaler, M.; Karrer, S. Non-oncologic indications for ALA-PDT. *The Journal of dermatological treatment* **13 Suppl 1**:S13-18; 2002.

[48] Leman, J. A.; Dick, D. C.; Morton, C. A. Topical 5-ALA photodynamic therapy for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Clinical and experimental dermatology* **27**:516-518; 2002.

[49] MacRobert, A. J., S.G. Bown, and D. Phillips What Are the Ideal Photoproperties for a Sensitizer?, in Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use. In: Harnett, G. B. a. S., ed. Chichester: Wiley; 1989: 4-16.

- [50] Konan, Y. N.; Gurny, R.; Allemann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **66**:89-106; 2002.
- [51] Namiki, Y.; Namiki, T.; Date, M.; Yanagihara, K.; Yashiro, M.; Takahashi, H. Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **50**:65-76; 2004.
- [52] Peng, P. C.; Hong, R. L.; Tsai, Y. J.; Li, P. T.; Tsai, T.; Chen, C. T. Dual-effect liposomes encapsulated with doxorubicin and chlorin e6 augment the therapeutic effect of tumor treatment. *Lasers in surgery and medicine* **47**:77-87; 2015.
- [53] Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* **59**:527-605; 1979.
- [54] Deby, C.; Goutier, R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical pharmacology* **39**:399-405; 1990.
- [55] Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science (New York, N.Y.)* **201**:875-880; 1978.
- [56] Stamler, J. S.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science (New York, N.Y.)* **258**:1898-1902; 1992.
- [57] Del Maestro, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* **492**:153-168; 1979.
- [58] Emerit, J.; Michelson, A. M. [Free radicals in medicine and biology]. *La semaine des hopitaux : organe fonde par l'Association d'enseignement medical des hopitaux de Paris* **58**:2670-2675; 1982.
- [59] Siems, W. G.; Grune, T.; Esterbauer, H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life sciences* **57**:785-789; 1995.
- [60] Bast, A. Oxidative stress and calcium homeostasis. *DNA and free radicals. London: Ellis Horwood*:95-108; 1993.
- [61] Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* **324 ( Pt 1)**:1-18; 1997.
- [62] Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **272**:20313-20316; 1997.
- [63] Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine* **32**:1102-1115; 2002.
- [64] Phaniendra, A.; Jestadi, D. B.; Periyasamy, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* **30**:11-26; 2015.

- [65] Schieber, M.; Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB* **24**:R453-462; 2014.
- [66] Min, D. S.; Kim, E. G.; Exton, J. H. Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Swiss 3T3 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **273**:29986-29994; 1998.
- [67] Gamaley, I. A.; Klyubin, I. V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *International review of cytology* **188**:203-255; 1999.
- [68] Covarrubias, L.; Hernandez-Garcia, D.; Schnabel, D.; Salas-Vidal, E.; Castro-Obregon, S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Developmental biology* **320**:1-11; 2008.
- [69] Wu, W. S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer metastasis reviews* **25**:695-705; 2006.
- [70] Uzdensky, A. B. Signal transduction and photodynamic therapy. *Current Signal Transduction Therapy* **3**:55-74; 2008.
- [71] Hirt, H. Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:2405-2407; 2000.
- [72] Dhillon, A. S.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**:3279-3290; 2007.
- [73] Tong, Z.; Singh, G.; Rainbow, A. J. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer research* **62**:5528-5535; 2002.
- [74] Zhang, H.; Shen, B.; Swinarska, J. T.; Li, W.; Xiao, K.; He, P. 9-Hydroxypheophorbide alpha-mediated photodynamic therapy induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in Hep-2 cells via ROS-mediated suppression of the ERK pathway. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **11**:55-62; 2014.
- [75] Weston, C. R.; Davis, R. J. The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in genetics & development* **12**:14-21; 2002.
- [76] Adler, V.; Franklin, C. C.; Kraft, A. S. Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: regulation by the N-terminal delta domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:5341-5345; 1992.
- [77] Ip, Y. T.; Davis, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Current opinion in cell biology* **10**:205-219; 1998.
- [78] Kennedy, N. J.; Davis, R. J. Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle* **2**:199-201; 2003.

- [79] Smeal, T.; Binetruy, B.; Mercola, D. A.; Birrer, M.; Karin, M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**:494-496; 1991.
- [80] Assefa, Z.; Vantieghem, A.; Declercq, W.; Vandenabeele, P.; Vandenheede, J. R.; Merlevede, W.; de Witte, P.; Agostinis, P. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *The Journal of biological chemistry* **274**:8788-8796; 1999.
- [81] Chan, W. H.; Yu, J. S.; Yang, S. D. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *The Biochemical journal* **351**:221-232; 2000.
- [82] Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **2**:717-726; 2003.
- [83] Engelman, J. A.; Lisanti, M. P.; Scherer, P. E. Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* **273**:32111-32120; 1998.
- [84] Engelman, J. A.; Berg, A. H.; Lewis, R. Y.; Lin, A.; Lisanti, M. P.; Scherer, P. E. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* **274**:35630-35638; 1999.
- [85] Cuenda, A.; Cohen, P. Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *The Journal of biological chemistry* **274**:4341-4346; 1999.
- [86] Galbiati, F.; Volonte, D.; Engelman, J. A.; Scherer, P. E.; Lisanti, M. P. Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *The Journal of biological chemistry* **274**:30315-30321; 1999.
- [87] Zetser, A.; Gredinger, E.; Bengal, E. p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *The Journal of biological chemistry* **274**:5193-5200; 1999.
- [88] Morooka, T.; Nishida, E. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* **273**:24285-24288; 1998.
- [89] Iwasaki, S.; Iguchi, M.; Watanabe, K.; Hoshino, R.; Tsujimoto, M.; Kohno, M. Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and

induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *The Journal of biological chemistry* **274**:26503-26510; 1999.

[90] Maher, P. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *The Journal of biological chemistry* **274**:17491-17498; 1999.

[91] Lavoie, J. N.; L'Allemain, G.; Brunet, A.; Muller, R.; Pouyssegur, J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *The Journal of biological chemistry* **271**:20608-20616; 1996.

[92] Molnar, A.; Theodoras, A. M.; Zon, L. I.; Kyriakis, J. M. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *The Journal of biological chemistry* **272**:13229-13235; 1997.

[93] Mackay, K.; Mochly-Rosen, D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *The Journal of biological chemistry* **274**:6272-6279; 1999.

[94] Wang, Y.; Huang, S.; Sah, V. P.; Ross, J., Jr.; Brown, J. H.; Han, J.; Chien, K. R. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *The Journal of biological chemistry* **273**:2161-2168; 1998.

[95] Nemoto, S.; Sheng, Z.; Lin, A. Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy. *Molecular and cellular biology* **18**:3518-3526; 1998.

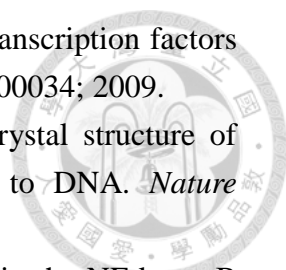
[96] Nebreda, A. R.; Porras, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends in biochemical sciences* **25**:257-260; 2000.

[97] Junttila, M. R.; Ala-Aho, R.; Jokilehto, T.; Peltonen, J.; Kallajoki, M.; Grenman, R.; Jaakkola, P.; Westermarck, J.; Kahari, V. M. p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* **26**:5267-5279; 2007.

[98] Hendrickx, N.; Dewaele, M.; Buytaert, E.; Marsboom, G.; Janssens, S.; Van Boven, M.; Vandenheede, J. R.; de Witte, P.; Agostinis, P. Targeted inhibition of p38alpha MAPK suppresses tumor-associated endothelial cell migration in response to hypericin-based photodynamic therapy. *Biochemical and biophysical research communications* **337**:928-935; 2005.

[99] Koon, H.; Chan, P.; Wu, Z.; Wong, R.; Lung, M.; Chang, C.; Mak, N. Role of mitogen-activated protein kinase in Zn-BC-AM PDT-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Biochem Funct* **28**:239-248; 2010.

[100] May, M. J.; Ghosh, S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Seminars in cancer biology* **8**:63-73; 1997.

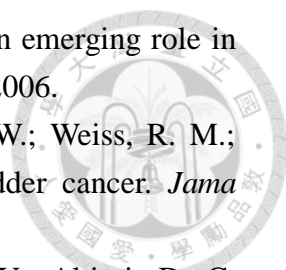
- 
- [101] Oeckinghaus, A.; Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**:a000034; 2009.
- [102] Chen, F. E.; Huang, D. B.; Chen, Y. Q.; Ghosh, G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* **391**:410-413; 1998.
- [103] Smale, S. T. Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-kappaB family of transcription factors. *Immunological reviews* **246**:193-204; 2012.
- [104] Gloire, G.; Legrand-Poels, S.; Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology* **72**:1493-1505; 2006.
- [105] Iwai, K. Functions of Linear Ubiquitin Chains in the NF-kappaB Pathway : Linear Polyubiquitin in NF-kappaB Signaling. *Sub-cellular biochemistry* **54**:100-106; 2010.
- [106] Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology* **192**:1-15; 2002.
- [107] Diamant, G.; Dikstein, R. Transcriptional control by NF-kappaB: elongation in focus. *Biochimica et biophysica acta* **1829**:937-945; 2013.
- [108] Chen, L. F.; Mu, Y.; Greene, W. C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *The EMBO journal* **21**:6539-6548; 2002.
- [109] Kiernan, R.; Bres, V.; Ng, R. W.; Coudart, M. P.; El Messaoudi, S.; Sardet, C.; Jin, D. Y.; Emiliani, S.; Benkirane, M. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *The Journal of biological chemistry* **278**:2758-2766; 2003.
- [110] Tak, P. P.; Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation* **107**:7-11; 2001.
- [111] Dolcet, X.; Llobet, D.; Pallares, J.; Matias-Guiu, X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **446**:475-482; 2005.
- [112] Ryter, S. W.; Gomer, C. J. Nuclear factor kappa B binding activity in mouse L1210 cells following photofrin II-mediated photosensitization. *Photochemistry and photobiology* **58**:753-756; 1993.
- [113] Piret, B.; Legrand-Poels, S.; Sappey, C.; Piette, J. NF-kappa B transcription factor and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activation by methylene blue photosensitization. *European journal of biochemistry / FEBS* **228**:447-455; 1995.
- [114] Matroule, J. Y.; Carthy, C. M.; Granville, D. J.; Jolois, O.; Hunt, D. W.; Piette, J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene* **20**:4070-4084; 2001.

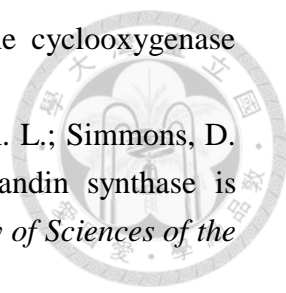
- [115] Granville, D. J.; Carthy, C. M.; Jiang, H.; Levy, J. G.; McManus, B. M.; Matroule, J. Y.; Piette, J.; Hunt, D. W. Nuclear factor-kappaB activation by the photochemotherapeutic agent verteporfin. *Blood* **95**:256-262; 2000.
- [116] Matroule, J. Y.; Hellin, A. C.; Morliere, P.; Fabiano, A. S.; Santus, R.; Merville, M. P.; Piette, J. Role of nuclear factor-kappa B in colon cancer cell apoptosis mediated by aminopyropheophorbide photosensitization. *Photochemistry and photobiology* **70**:540-548; 1999.
- [117] Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G. B.; Hamblin, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers* **3**:2516-2539; 2011.
- [118] Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**:495-516; 2007.
- [119] Arends, M. J.; Morris, R. G.; Wyllie, A. H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *The American journal of pathology* **136**:593-608; 1990.
- [120] Wyllie, A. H.; Kerr, J. F.; Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* **68**:251-306; 1980.
- [121] Nicholson, D. W.; Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences* **22**:299-306; 1997.
- [122] Earnshaw, W. C.; Martins, L. M.; Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* **68**:383-424; 1999.
- [123] MacKenzie, S. H.; Clark, A. C. Death by caspase dimerization. *Advances in experimental medicine and biology* **747**:55-73; 2012.
- [124] Nicholson, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* **6**:1028-1042; 1999.
- [125] Hardwick, J. M.; Soane, L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**; 2013.
- [126] Fulda, S.; Debatin, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**:4798-4811; 2006.
- [127] Renno, R. Z.; Delori, F. C.; Holzer, R. A.; Gragoudas, E. S.; Miller, J. W. Photodynamic therapy using Lu-Tex induces apoptosis in vitro, and its effect is potentiated by angiostatin in retinal capillary endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **41**:3963-3971; 2000.
- [128] He, G. F.; Bian, M. L.; Zhao, Y. W.; Xiang, Q.; Li, H. Y.; Xiao, C. A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in vitro and in vivo in cervical cancer. *Oncology reports* **21**:861-868; 2009.
- [129] He, G. F.; Bian, M. L.; Zhao, Y. W.; Xiang, Q.; Li, H. Y.; Xiao, C. [Effects of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy on cervical cancer: in vivo experiment with nude mice]. *Zhonghua yi xue za zhi* **88**:635-640; 2008.

- [130] Koval, J.; Mikes, J.; Jendzelovsky, R.; Kello, M.; Solar, P.; Fedorocko, P. Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* **86**:200-205; 2010.
- [131] Chiu, S. M.; Oleinick, N. L. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *British journal of cancer* **84**:1099-1106; 2001.
- [132] Varnes, M. E.; Chiu, S. M.; Xue, L. Y.; Oleinick, N. L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochemical and biophysical research communications* **255**:673-679; 1999.
- [133] Shen, X. Y.; Zacal, N.; Singh, G.; Rainbow, A. J. Alterations in mitochondrial and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of HT29 colon carcinoma cells. *Photochemistry and photobiology* **81**:306-313; 2005.
- [134] He, J.; Agarwal, M. L.; Larkin, H. E.; Friedman, L. R.; Xue, L. Y.; Oleinick, N. L. The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene BCL-2. *Photochemistry and photobiology* **64**:845-852; 1996.
- [135] Vanden Berghe, T.; 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**:135-147; 2014.
- [136] Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* **146**:3-15; 1995.
- [137] Fink, S. L.; Cookson, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* **73**:1907-1916; 2005.
- [138] Lemasters, J. J. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *The American journal of physiology* **276**:G1-6; 1999.
- [139] de Almagro, M. C.; Vucic, D. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Seminars in cell & developmental biology* **39**:56-62; 2015.
- [140] Nagata, S.; Obana, A.; Gohto, Y.; Nakajima, S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers in surgery and medicine* **33**:64-70; 2003.
- [141] Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes & development* **21**:2861-2873; 2007.
- [142] Klionsky, D. J. Autophagy. *Current biology : CB* **15**:R282-283; 2005.

- [143] Kunz, J. B.; Schwarz, H.; Mayer, A. Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *The Journal of biological chemistry* **279**:9987-9996; 2004.
- [144] Majeski, A. E.; Dice, J. F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *International Journal Of Biochemistry & Cell Biology* **36**:2435-2444; 2004.
- [145] Kvam, E.; Goldfarb, D. S. Nucleus-vacuole junctions and piecemeal microautophagy of the nucleus in *S. cerevisiae*. *Autophagy* **3**:85-92; 2007.
- [146] Klionsky, D. J.; Cregg, J. M.; Dunn, W. A., Jr.; Emr, S. D.; Sakai, Y.; Sandoval, I. V.; Sibirny, A.; Subramani, S.; Thumm, M.; Veenhuis, M.; Ohsumi, Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell* **5**:539-545; 2003.
- [147] Noda, T.; Matsuura, A.; Wada, Y.; Ohsumi, Y. Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* **210**:126-132; 1995.
- [148] Aita, V. M.; Liang, X. H.; Murty, V. V.; Pincus, D. L.; Yu, W.; Cayanis, E.; Kalachikov, S.; Gilliam, T. C.; Levine, B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**:59-65; 1999.
- [149] Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* **221**:3-12; 2010.
- [150] Baehrecke, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**:505-510; 2005.
- [151] Buytaert, E.; Callewaert, G.; Hendrickx, N.; Scorrano, L.; Hartmann, D.; Missiaen, L.; Vandenheede, J. R.; Heirman, I.; Grooten, J.; Agostinis, P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**:756-758; 2006.
- [152] Kessel, D.; Reiners, J. J., Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and photobiology* **83**:1024-1028; 2007.
- [153] Ji, H. T.; Chien, L. T.; Lin, Y. H.; Chien, H. F.; Chen, C. T. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. *Molecular cancer* **9**:91; 2010.
- [154] 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.

- [155] Senft, D.; Ronai, Z. A. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in biochemical sciences* **40**:141-148; 2015.
- [156] Kuma, A.; Hatano, M.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakaya, H.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y.; Tokuhiya, T.; Mizushima, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**:1032-1036; 2004.
- [157] Guo, J. Y.; Xia, B.; White, E. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* **155**:1216-1219; 2013.
- [158] Wei, H.; Liu, L.; Chen, Q. Selective removal of mitochondria via mitophagy: distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochimica et biophysica acta*; 2015.
- [159] Saita, S.; Shirane, M.; Nakayama, K. I. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nature communications* **4**:1410; 2013.
- [160] Kang, R.; Zeh, H. J.; Lotze, M. T.; Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation* **18**:571-580; 2011.
- [161] Crook, N. E.; Clem, R. J.; Miller, L. K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology* **67**:2168-2174; 1993.
- [162] Salvesen, G. S.; Duckett, C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**:401-410; 2002.
- [163] Hunter, A. M.; LaCasse, E. C.; Korneluk, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**:1543-1568; 2007.
- [164] Ambrosini, G.; Adida, C.; Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine* **3**:917-921; 1997.
- [165] Kawamura, K.; Sato, N.; Fukuda, J.; Kodama, H.; Kumagai, J.; Tanikawa, H.; Shimizu, Y.; Tanaka, T. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Developmental biology* **256**:331-341; 2003.
- [166] Tamm, I.; Wang, Y.; Sausville, E.; Scudiero, D. A.; Vigna, N.; Oltersdorf, T.; Reed, J. C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research* **58**:5315-5320; 1998.
- [167] Suzuki, A.; Hayashida, M.; Ito, T.; Kawano, H.; Nakano, T.; Miura, M.; Akahane, K.; Shiraki, K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* **19**:3225-3234; 2000.
- [168] Mita, A. C.; Mita, M. M.; Nawrocki, S. T.; Giles, F. J. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**:5000-5005; 2008.

- 
- [169] Fukuda, S.; Pelus, L. M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular cancer therapeutics* **5**:1087-1098; 2006.
- [170] Smith, S. D.; Wheeler, M. A.; Plescia, J.; Colberg, J. W.; Weiss, R. M.; Altieri, D. C. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *Jama* **285**:324-328; 2001.
- [171] Wall, N. R.; O'Connor, D. S.; Plescia, J.; Pommier, Y.; Altieri, D. C. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer research* **63**:230-235; 2003.
- [172] Zhang, M.; Yang, J.; Li, F. Transcriptional and post-transcriptional controls of survivin in cancer cells: novel approaches for cancer treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **25**:391-402; 2006.
- [173] O'Connor, D. S.; Grossman, D.; Plescia, J.; Li, F.; Zhang, H.; Villa, A.; Tognin, S.; Marchisio, P. C.; Altieri, D. C. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:13103-13107; 2000.
- [174] Konturek, P. C.; Kania, J.; Burnat, G.; Hahn, E. G.; Konturek, S. J. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **56 Suppl 5**:57-73; 2005.
- [175] Mirza, A.; McGuirk, M.; Hockenberry, T. N.; Wu, Q.; Ashar, H.; Black, S.; Wen, S. F.; Wang, L. Q.; Kirschmeier, P.; Bishop, W. R.; Nielsen, L. L.; Pickett, C. B.; Liu, S. X. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* **21**:2613-2622; 2002.
- [176] Ferrario, A.; Rucker, N.; Wong, S.; Luna, M.; Gomer, C. J. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer research* **67**:4989-4995; 2007.
- [177] Zhang, T.; Lan, R.; Chan, C. F.; Law, G. L.; Wong, W. K.; Wong, K. L. In vivo selective cancer-tracking gadolinium eradicant as new-generation photodynamic therapy agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:E5492-5497; 2014.
- [178] Bhowmick, R.; Girotti, A. W. Cytoprotective signaling associated with nitric oxide upregulation in tumor cells subjected to photodynamic therapy-like oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **57**:39-48; 2013.
- [179] Feng, L.; Sun, W.; Xia, Y.; Tang, W. W.; Chanmugam, P.; Soyoola, E.; Wilson, C. B.; Hwang, D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Archives of biochemistry and biophysics* **307**:361-368; 1993.

- 
- [180] van der Donk, W. A.; Tsai, A. L.; Kulmacz, R. J. The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry* **41**:15451-15458; 2002.
- [181] Xie, W. L.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:2692-2696; 1991.
- [182] Seibert, K.; Masferrer, J. L. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor* **4**:17-23; 1994.
- [183] Diduk, S. V.; Smirnova, K. V.; Gurtsevich, V. E. [COX-2 as an early diagnostic marker of virus-associated human malignant neoplasms]. *Voprosy virusologii* **57**:4-8; 2012.
- [184] Shao, N.; Feng, N.; Wang, Y.; Mi, Y.; Li, T.; Hua, L. Systematic review and meta-analysis of COX-2 expression and polymorphisms in prostate cancer. *Molecular biology reports* **39**:10997-11004; 2012.
- [185] Dore, M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Veterinary pathology* **48**:254-265; 2011.
- [186] Ghosh, N.; Chaki, R.; Mandal, V.; Mandal, S. C. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological Reports* **62**:233-244; 2010.
- [187] Tazawa, R.; Xu, X. M.; Wu, K. K.; Wang, L. H. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochemical and biophysical research communications* **203**:190-199; 1994.
- [188] Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry* **69**:145-182; 2000.
- [189] Subbaramaiah, K.; Altorki, N.; Chung, W. J.; Mestre, J. R.; Sampat, A.; Dannenberg, A. J. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *The Journal of biological chemistry* **274**:10911-10915; 1999.
- [190] Shao, J.; Sheng, H.; Inoue, H.; Morrow, J. D.; DuBois, R. N. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **275**:33951-33956; 2000.
- [191] Dixon, D. A.; Tolley, N. D.; King, P. H.; Nabors, L. B.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; Prescott, S. M. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *The Journal of clinical investigation* **108**:1657-1665; 2001.
- [192] Lasa, M.; Mahtani, K. R.; Finch, A.; Brewer, G.; Saklatvala, J.; Clark, A. R. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Molecular and cellular biology* **20**:4265-4274; 2000.

- [193] Zhang, Z.; Sheng, H.; Shao, J.; Beauchamp, R. D.; DuBois, R. N. Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 in rat intestinal epithelial cells. *Neoplasia* **2**:523-530; 2000.
- [194] Hendrickx, N.; Volanti, C.; Moens, U.; Seternes, O. M.; de Witte, P.; Vandenhede, J. R.; Piette, J.; Agostinis, P. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **278**:52231-52239; 2003.
- [195] Volanti, C.; Hendrickx, N.; Van Lint, J.; Matroule, J. Y.; Agostinis, P.; Piette, J. Distinct transduction mechanisms of cyclooxygenase 2 gene activation in tumour cells after photodynamic therapy. *Oncogene* **24**:2981-2991; 2005.
- [196] Ferrario, A.; Von Tiehl, K.; Wong, S.; Luna, M.; Gomer, C. J. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer research* **62**:3956-3961; 2002.
- [197] Luna, M.; Wong, S.; Ferrario, A.; Gomer, C. J. Cyclooxygenase-2 expression induced by photofrin photodynamic therapy involves the p38 MAPK pathway. *Photochemistry and photobiology* **84**:509-514; 2008.
- [198] Gregory, P. D.; Wagner, K.; Horz, W. Histone acetylation and chromatin remodeling. *Experimental cell research* **265**:195-202; 2001.
- [199] Roth, S. Y.; Denu, J. M.; Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* **70**:81-120; 2001.
- [200] Kouzarides, T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Current opinion in genetics & development* **9**:40-48; 1999.
- [201] Sterner, D. E.; Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**:435-459; 2000.
- [202] Dhalluin, C.; Carlson, J. E.; Zeng, L.; He, C.; Aggarwal, A. K.; Zhou, M. M. <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF. *Journal of biomolecular NMR* **14**:291-292; 1999.
- [203] Yang, X. J.; Ogryzko, V. V.; Nishikawa, J.; Howard, B. H.; Nakatani, Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**:319-324; 1996.
- [204] Chan, H. M.; La Thangue, N. B. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of cell science* **114**:2363-2373; 2001.
- [205] Avvakumov, N.; Cote, J. Functions of myst family histone acetyltransferases and their link to disease. *Sub-cellular biochemistry* **41**:295-317; 2007.
- [206] Marmorstein, R. Structure and function of histone acetyltransferases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **58**:693-703; 2001.

- [207] Spencer, T. E.; Jenster, G.; Burcin, M. M.; Allis, C. D.; Zhou, J. X.; Mizzen, C. A.; McKenna, N. J.; Onate, S. A.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J.; O'Malley, B. W. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**:194-198; 1997.
- [208] Kawasaki, H.; Schiltz, L.; Chiu, R.; Itakura, K.; Taira, K.; Nakatani, Y.; Yokoyama, K. K. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* **405**:195-200; 2000.
- [209] Marmorstein, R.; Roth, S. Y. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Current opinion in genetics & development* **11**:155-161; 2001.
- [210] Micelli, C.; Rastelli, G. Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity. *Drug discovery today*; 2015.
- [211] Kuo, M. H.; Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **20**:615-626; 1998.
- [212] Selvi, R. B.; Kundu, T. K. Reversible acetylation of chromatin: implication in regulation of gene expression, disease and therapeutics. *Biotechnology journal* **4**:375-390; 2009.
- [213] Cullis, P. M.; Wolfenden, R.; Cousens, L. S.; Alberts, B. M. Inhibition of histone acetylation by N-[2-(S-coenzyme A)acetyl] spermidine amide, a multisubstrate analog. *The Journal of biological chemistry* **257**:12165-12169; 1982.
- [214] Lau, O. D.; Kundu, T. K.; Soccio, R. E.; Ait-Si-Ali, S.; Khalil, E. M.; Vassilev, A.; Wolffe, A. P.; Nakatani, Y.; Roeder, R. G.; Cole, P. A. HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Molecular cell* **5**:589-595; 2000.
- [215] Balasubramanyam, K.; Swaminathan, V.; Ranganathan, A.; Kundu, T. K. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *The Journal of biological chemistry* **278**:19134-19140; 2003.
- [216] Balasubramanyam, K.; Varier, R. A.; Altaf, M.; Swaminathan, V.; Siddappa, N. B.; Ranga, U.; Kundu, T. K. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *The Journal of biological chemistry* **279**:51163-51171; 2004.
- [217] Balasubramanyam, K.; Altaf, M.; Varier, R. A.; Swaminathan, V.; Ravindran, A.; Sathale, P. P.; Kundu, T. K. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *The Journal of biological chemistry* **279**:33716-33726; 2004.
- [218] Choi, K. C.; Jung, M. G.; Lee, Y. H.; Yoon, J. C.; Kwon, S. H.; Kang, H. B.; Kim, M. J.; Cha, J. H.; Kim, Y. J.; Jun, W. J.; Lee, J. M.; Yoon, H. G. Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced

B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation. *Cancer research* **69**:583-592; 2009.

[219] Flores-Ancona, R. M.; Garcia-Gomez, F. Y.; Jimenez-Betanzos, A. M.; Solis-Paredes, M.; Castro-Leyva, V.; Cruz-Orea, A.; Arenas-Huertero, F.; Ramon-Gallegos, E. Effects of sodium butyrate on cell death induced by photodynamic therapy in U373-MG and D54-MG astrocytoma cell lines. *Photochemistry and photobiology* **85**:1182-1188; 2009.

[220] Mamoon, A. M.; Gamal-Eldeen, A. M.; Ruppel, M. E.; Smith, R. J.; Tsang, T.; Miller, L. M. In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **6**:105-116; 2009.

[221] Makowski, M.; Grzela, T.; Niderla, J.; M, L. A.; Mroz, P.; Kopee, M.; Legat, M.; Strusinska, K.; Koziak, K.; Nowis, D.; Mrowka, P.; Wasik, M.; Jakobisiak, M.; Golab, J. Inhibition of cyclooxygenase-2 indirectly potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**:5417-5422; 2003.

[222] Madrid, L. V.; Mayo, M. W.; Reuther, J. Y.; Baldwin, A. S., Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *The Journal of biological chemistry* **276**:18934-18940; 2001.

[223] Korus, M.; Mahon, G. M.; Cheng, L.; Whitehead, I. P. p38 MAPK-mediated activation of NF-kappaB by the RhoGEF domain of Bcr. *Oncogene* **21**:4601-4612; 2002.

[224] Park, G. Y.; Joo, M.; Pedchenko, T.; Blackwell, T. S.; Christman, J. W. Regulation of macrophage cyclooxygenase-2 gene expression by modifications of histone H3. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **286**:L956-962; 2004.

[225] Nie, M.; Pang, L.; Inoue, H.; Knox, A. J. Transcriptional regulation of cyclooxygenase 2 by bradykinin and interleukin-1beta in human airway smooth muscle cells: involvement of different promoter elements, transcription factors, and histone h4 acetylation. *Molecular and cellular biology* **23**:9233-9244; 2003.

[226] Coward, W. R.; Watts, K.; Feghali-Bostwick, C. A.; Knox, A.; Pang, L. Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Molecular and cellular biology* **29**:4325-4339; 2009.

[227] Bank, U.; Reinhold, D.; Ansorge, S. [Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method]. *Allergie und Immunologie* **37**:119-123; 1991.

- [228] Biederbick, A.; Kern, H. F.; Elsasser, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *European journal of cell biology* **66**:3-14; 1995.
- [229] Wang, Q. E.; Han, C.; Zhao, R.; Wani, G.; Zhu, Q.; Gong, L.; Battu, A.; Racoma, I.; Sharma, N.; Wani, A. A. p38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair. *Nucleic acids research* **41**:1722-1733; 2013.
- [230] Matroule, J. Y.; Volanti, C.; Piette, J. NF-kappaB in photodynamic therapy: discrepancies of a master regulator. *Photochemistry and photobiology* **82**:1241-1246; 2006.
- [231] Wirawan, E.; Vande Walle, L.; Kersse, K.; Cornelis, S.; Claerhout, S.; Vanoverberghe, I.; Roelandt, R.; De Rycke, R.; Verspurten, J.; Declercq, W.; Agostinis, P.; Vanden Berghe, T.; Lippens, S.; Vandenabeele, P. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell death & disease* **1**:e18; 2010.
- [232] 林郁欣 粒線體功能異常所引發 PC12 細胞生長與死亡之相關訊息傳遞機制探討。 微生物與生化學研究所: 國立臺灣大學; 2007.
- [233] Gamal-Eldeen, A. M.; El-Daly, S. M.; Borai, I. H.; Wafay, H. A.; Abdel-Ghaffar, A. R. Photodynamic therapeutic effect of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles and their anti-EGFR-conjugate in skin cancer in CD1 mice. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **10**:446-459; 2013.
- [234] Demyanenko, S. V.; Uzdensky, A. B.; Sharifulina, S. A.; Lapteva, T. O.; Polyakova, L. P. PDT-induced epigenetic changes in the mouse cerebral cortex: a protein microarray study. *Biochimica et biophysica acta* **1840**:262-270; 2014.
- [235] Moodie, F. M.; Marwick, J. A.; Anderson, C. S.; Szulakowski, P.; Biswas, S. K.; Bauter, M. R.; Kilty, I.; Rahman, I. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**:1897-1899; 2004.
- [236] Gilmour, P. S.; Rahman, I.; Donaldson, K.; MacNee, W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **284**:L533-540; 2003.
- [237] Gu, X.; Sun, J.; Li, S.; Wu, X.; Li, L. Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: potential epigenetic

mechanisms in gene transcription in Abeta production. *Neurobiology of aging* **34**:1069-1079; 2013.

[238] Miyata, Y.; Towatari, M.; Maeda, T.; Ozawa, Y.; Saito, H. Histone acetylation induced by granulocyte colony-stimulating factor in a map kinase-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications* **283**:655-660; 2001.

[239] Zhao, Q.; Barakat, B. M.; Qin, S.; Ray, A.; El-Mahdy, M. A.; Wani, G.; Arafa el, S.; Mir, S. N.; Wang, Q. E.; Wani, A. A. The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation. *The Journal of biological chemistry* **283**:32553-32561; 2008.

[240] Ait-Si-Ali, S.; Carlisi, D.; Ramirez, S.; Upegui-Gonzalez, L. C.; Duquet, A.; Robin, P.; Rudkin, B.; Harel-Bellan, A.; Trouche, D. Phosphorylation by p44 MAP Kinase/ERK1 stimulates CBP histone acetyl transferase activity in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **262**:157-162; 1999.

[241] Huang, W. C.; Chen, C. C. Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity. *Molecular and cellular biology* **25**:6592-6602; 2005.

[242] Brunmeir, R.; Lagger, S.; Seiser, C. Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation. *The International journal of developmental biology* **53**:275-289; 2009.

[243] Taplick, J.; Kurtev, V.; Kroboth, K.; Posch, M.; Lechner, T.; Seiser, C. Homo-oligomerisation and nuclear localisation of mouse histone deacetylase 1. *Journal of molecular biology* **308**:27-38; 2001.

[244] Luo, Y.; Jian, W.; Stavreva, D.; Fu, X.; Hager, G.; Bungert, J.; Huang, S.; Qiu, Y. Trans-regulation of histone deacetylase activities through acetylation. *The Journal of biological chemistry* **284**:34901-34910; 2009.

[245] Chiocca, S.; Kurtev, V.; Colombo, R.; Boggio, R.; Scieurpi, M. T.; Brosch, G.; Seiser, C.; Draetta, G. F.; Cotten, M. Histone deacetylase 1 inactivation by an adenovirus early gene product. *Current biology : CB* **12**:594-598; 2002.

[246] Pflum, M. K.; Tong, J. K.; Lane, W. S.; Schreiber, S. L. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *The Journal of biological chemistry* **276**:47733-47741; 2001.

[247] Walters, M. S.; Erazo, A.; Kinchington, P. R.; Silverstein, S. Histone deacetylases 1 and 2 are phosphorylated at novel sites during varicella-zoster virus infection. *Journal of virology* **83**:11502-11513; 2009.

[248] Zhang, X.; Ozawa, Y.; Lee, H.; Wen, Y. D.; Tan, T. H.; Wadzinski, B. E.; Seto, E. Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes & development* **19**:827-839; 2005.

- [249] Lee, H.; Rezai-Zadeh, N.; Seto, E. Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Molecular and cellular biology* **24**:765-773; 2004.
- [250] Qiu, Y.; Zhao, Y. M.; Becker, M.; John, S.; Parekh, B. S.; Huang, S. M.; Hendarwanto, A.; Martinez, E. D.; Chen, Y.; Lu, H. X.; Adkins, N. L.; Stavreva, D. A.; Wiench, M.; Georgel, P. T.; Schiltz, R. L.; Hager, G. L. HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transcription. *Molecular cell* **22**:669-679; 2006.
- [251] Qiu, Y.; Zhao, Y.; Becker, M.; John, S.; Parekh, B. S.; Huang, S.; Hendarwanto, A.; Martinez, E. D.; Chen, Y.; Lu, H.; Adkins, N. L.; Stavreva, D. A.; Wiench, M.; Georgel, P. T.; Schiltz, R. L.; Hager, G. L. HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transcription. *Molecular cell* **22**:669-679; 2006.
- [252] Zhou, Q.; Melkounian, Z. K.; Lucktong, A.; Moniwa, M.; Davie, J. R.; Strobl, J. S. Rapid induction of histone hyperacetylation and cellular differentiation in human breast tumor cell lines following degradation of histone deacetylase-1. *The Journal of biological chemistry* **275**:35256-35263; 2000.
- [253] Kramer, O. H.; Zhu, P.; Ostendorff, H. P.; Golebiewski, M.; Tiefenbach, J.; Peters, M. A.; Brill, B.; Groner, B.; Bach, I.; Heinzl, T.; Gottlicher, M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *The EMBO journal* **22**:3411-3420; 2003.
- [254] Li, Y.; Li, X.; Guo, B. Chemopreventive agent 3,3'-diindolylmethane selectively induces proteasomal degradation of class I histone deacetylases. *Cancer research* **70**:646-654; 2010.
- [255] Gaughan, L.; Logan, I. R.; Neal, D. E.; Robson, C. N. Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation. *Nucleic acids research* **33**:13-26; 2005.
- [256] Scognamiglio, A.; Nebbioso, A.; Manzo, F.; Valente, S.; Mai, A.; Altucci, L. HDAC-class II specific inhibition involves HDAC proteasome-dependent degradation mediated by RANBP2. *Biochimica et biophysica acta* **1783**:2030-2038; 2008.
- [257] Szokalska, A.; Makowski, M.; Nowis, D.; Wilczynski, G. M.; Kujawa, M.; Wojcik, C.; Mlynarczuk-Bialy, I.; Salwa, P.; Bil, J.; Janowska, S.; Agostinis, P.; Verfaillie, T.; Bugajski, M.; Gietka, J.; Issat, T.; Glodkowska, E.; Mrowka, P.; Stoklosa, T.; Hamblin, M. R.; Mroz, P.; Jakobisiak, M.; Golab, J. Proteasome Inhibition Potentiates Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Mice through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response. *Cancer research* **69**:4235-4243; 2009.

- [258] Weyergang, A.; Kaalhus, O.; Berg, K. Photodynamic therapy with an endocytically located photosensitizer cause a rapid activation of the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase, p38, and c-Jun NH2 terminal kinase with opposing effects on cell survival. *Molecular cancer therapeutics* **7**:1740-1750; 2008.
- [259] Chan, P. S.; Koon, H. K.; Wu, Z. G.; Wong, R. N.; Lung, M. L.; Chang, C. K.; Mak, N. K. Role of p38 MAPKs in hypericin photodynamic therapy-induced apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells. *Photochemistry and photobiology* **85**:1207-1217; 2009.
- [260] Koon, H. K.; Chan, P. S.; Wu, Z. G.; Wong, R. N.; Lung, M. L.; Chang, C. K.; Mak, N. K. Role of mitogen-activated protein kinase in Zn-BC-AM PDT-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Biochemistry and Function* **28**:239-248; 2010.
- [261] Karin, M.; Delhase, M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in immunology* **12**:85-98; 2000.
- [262] Mansur, D. S.; Maluquer de Motes, C.; Unterholzner, L.; Sumner, R. P.; Ferguson, B. J.; Ren, H.; Strnadova, P.; Bowie, A. G.; Smith, G. L. Poxvirus targeting of E3 ligase beta-TrCP by molecular mimicry: a mechanism to inhibit NF-kappaB activation and promote immune evasion and virulence. *PLoS pathogens* **9**:e1003183; 2013.
- [263] Gupta, S. C.; Sundaram, C.; Reuter, S.; Aggarwal, B. B. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et biophysica acta* **1799**:775-787; 2010.
- [264] Huang, B.; Yang, X. D.; Zhou, M. M.; Ozato, K.; Chen, L. F. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Molecular and cellular biology* **29**:1375-1387; 2009.
- [265] Shi, D.; Xiao, X.; Wang, J.; Liu, L.; Chen, W.; Fu, L.; Xie, F.; Huang, W.; Deng, W. Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF-kappaB, c/EBPbeta, and p300 signaling. *Journal of pineal research* **53**:154-165; 2012.
- [266] Liu, Y. W.; Chen, C. C.; Wang, J. M.; Chang, W. C.; Huang, Y. C.; Chung, S. Y.; Chen, B. K.; Hung, J. J. Role of transcriptional factors Sp1, c-Rel, and c-Jun in LPS-induced C/EBPdelta gene expression of mouse macrophages. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**:3282-3294; 2007.
- [267] Kundu, J. K.; Shin, Y. K.; Kim, S. H.; Surh, Y. J. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis* **27**:1465-1474; 2006.

- [268] Feng, B.; Ruiz, M. A.; Chakrabarti, S. Oxidative-stress-induced epigenetic changes in chronic diabetic complications. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **91**:213-220; 2013.
- [269] Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and photobiology* **55**:145-157; 1992.
- [270] Fingar, V. H.; Wieman, T. J.; Wiehle, S. A.; Cerrito, P. B. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer research* **52**:4914-4921; 1992.
- [271] Fingar, V. H.; Henderson, B. W. Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: a study of tumor and normal tissue response. *Photochemistry and photobiology* **46**:837-841; 1987.
- [272] Toomey, D. P.; Murphy, J. F.; Conlon, K. C. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* **7**:174-180; 2009.
- [273] Fosslien, E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Annals of clinical and laboratory science* **31**:325-348; 2001.
- [274] Howe, L. R.; Chang, S. H.; Tolle, K. C.; Dillon, R.; Young, L. J.; Cardiff, R. D.; Newman, R. A.; Yang, P.; Thaler, H. T.; Muller, W. J.; Hudis, C.; Brown, A. M.; Hla, T.; Subbaramaiah, K.; Dannenberg, A. J. HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. *Cancer research* **65**:10113-10119; 2005.
- [275] Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2**:91-106; 2005.
- [276] Sung, B.; Pandey, M. K.; Ahn, K. S.; Yi, T.; Chaturvedi, M. M.; Liu, M.; Aggarwal, B. B. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* **111**:4880-4891; 2008.
- [277] Gomer, C. J.; Ferrario, A.; Luna, M.; Rucker, N.; Wong, S. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. *Lasers in surgery and medicine* **38**:516-521; 2006.
- [278] Fetz, V.; Bier, C.; Habtemichael, N.; Schuon, R.; Schweitzer, A.; Kunkel, M.; Engels, K.; Kovacs, A. F.; Schneider, S.; Mann, W.; Stauber, R. H.; Knauer, S. K.

Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin. *International Journal of Cancer* **124**:2033-2041; 2009.

[279] Inguscio, V.; Panzarini, E.; Dini, L. Autophagy Contributes to the Death/Survival Balance in Cancer PhotoDynamic Therapy. *Cells* **1**:464-491; 2012.

[280] Shimizu, S.; Kanaseki, T.; Mizushima, N.; Mizuta, T.; Arakawa-Kobayashi, S.; Thompson, C. B.; Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology* **6**:1221-1228; 2004.

[281] Yu, L.; Alva, A.; Su, H.; Dutt, P.; Freundt, E.; Welsh, S.; Baehrecke, E. H.; Lenardo, M. J. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science (New York, N.Y.)* **304**:1500-1502; 2004.

[282] Hara, T.; Nakamura, K.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakahara, Y.; Suzuki-Migishima, R.; Yokoyama, M.; Mishima, K.; Saito, I.; Okano, H.; Mizushima, N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**:885-889; 2006.

[283] Xue, L. Y.; Chiu, S. M.; Oleinick, N. L. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. *Autophagy* **6**:248-255; 2010.

[284] Kessel, D.; Arroyo, A. S. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **6**:1290-1295; 2007.

[285] Du, L.; Jiang, N.; Wang, G.; Chu, Y.; Lin, W.; Qian, J.; Zhang, Y.; Zheng, J.; Chen, G. Autophagy inhibition sensitizes bladder cancer cells to the photodynamic effects of the novel photosensitizer chlorophyllin e4. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **133**:1-10; 2014.

[286] Cao, Y.; Klionsky, D. J. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell research* **17**:839-849; 2007.

[287] Sinha, S.; Levine, B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* **27 Suppl 1**:S137-148; 2008.

[288] Boya, P.; Kroemer, G. Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene* **28**:2125-2127; 2009.

[289] Betin, V. M.; Lane, J. D. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of cell science* **122**:2554-2566; 2009.

[290] Norman, J. M.; Cohen, G. M.; Bampton, E. T. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy* **6**:1042-1056; 2010.

- [291] Harhaji-Trajkovic, L.; Vilimanovich, U.; Kravic-Stevovic, T.; Bumbasirevic, V.; Trajkovic, V. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *Journal of cellular and molecular medicine* **13**:3644-3654; 2009.
- [292] Voges, D.; Zwickl, P.; Baumeister, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry* **68**:1015-1068; 1999.
- [293] Ferrario, A.; Luna, M.; Rucker, N.; Wong, S.; Gomer, C. J. Pro-apoptotic and anti-inflammatory properties of the green tea constituent epigallocatechin gallate increase photodynamic therapy responsiveness. *Lasers in surgery and medicine* **43**:644-650; 2011.
- [294] Mun, S. T.; Bae, D. H.; Ahn, W. S. Epigallocatechin gallate with photodynamic therapy enhances anti-tumor effects in vivo and in vitro. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **11**:141-147; 2014.
- [295] Ahn, J. C.; Kang, J. W.; Shin, J. I.; Chung, P. S. Combination treatment with photodynamic therapy and curcumin induces mitochondria-dependent apoptosis in AMC-HN3 cells. *International journal of oncology* **41**:2184-2190; 2012.
- [296] Ghizzoni, M.; Boltjes, A.; Graaf, C.; Haisma, H. J.; Dekker, F. J. Improved inhibition of the histone acetyltransferase PCAF by an anacardic acid derivative. *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**:5826-5834; 2010.
- [297] Dekker, F. J.; Haisma, H. J. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug discovery today* **14**:942-948; 2009.
- [298] Olivo, M.; Bhuvaneshwari, R.; Keogh, I. Advances in bio-optical imaging for the diagnosis of early oral cancer. *Pharmaceutics* **3**:354-378; 2011.