

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

靈芝三萜 T-612 透過誘導細胞自噬以促進 Sorafenib

於肝癌細胞株之效能

Ganoderma Triterpenoid T-612 Enhances Efficacy of
Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma Cell Line through
Induction of Autophagy

蔡黛華

Dai-Hua Tsai

指導老師：林淑萍 博士

Advisor: Shwu-Bin Lin, Ph.D.

中華民國 101 年 6 月

June, 2012

摘要

肝癌位居世界十大癌症死因第三位，九成以上肝癌病患無法以手術切除，長久以來沒有有效的治療方式。多重激酶抑制劑 sorafenib 是目前唯一的肝癌標靶藥物，能有效延長病患的壽命及復發時間，然而病患常發生程度不一的副作用如皮膚紅疹及手足症候群，目前只能以降低劑量或中斷治療等會降低治療成效的方式減輕副作用，低劑量 sorafenib 合併其他藥物或佐劑以增強治療效果不啻為一解決之道。傳統中藥靈芝被廣泛使用於亞洲國家，其活性成分三萜類已有許多研究證實具抗癌功效，本研究發現靈芝三萜 T-612 能增強 sorafenib 的抗肝癌功效，並研究藥物作用機制。以 T-612 與 sorafenib 合併處理 Huh-7、HepG2、PLC5 及 Hep3B 四株人類肝癌細胞株，結果顯示 T-612 可增強 sorafenib 造成的細胞毒性及抑制細胞生長的能力， IC_{50} 比單獨處理 sorafenib 下降 12 % 至 51 % 不等，單獨處理 T-612 則未造成細胞毒性，合併使用造成的細胞活性抑制為一協同作用。進一步以 Huh-7 細胞進行作用機制探討，發現單獨使用 sorafenib 會抑制胞落形成，透過降低 cyclin D、E 及 CDK2 的表現使細胞週期停滯於 G0/G1 時期，造成細胞活性氧化物堆積、粒線體傷害及抑制 ERK 磷酸化，但沒有觀察到細胞染色體斷裂、caspase 活化或 AIF、PARP 蛋白質量的增加，排除細胞透過細胞凋亡死亡，另有輕微細胞自噬現象但非造成死亡的原因。合併使用 T-612 可有效加強 sorafenib 造成的各種影響，但無法加強抑制 ERK 磷酸化，也沒有細胞凋亡情形發生，而合併使用會促使嚴重的細胞自噬，包含細胞酸性囊狀胞器增加及 LC3-II 量的上升，抑制細胞自噬可恢復部分細胞活性。綜合以上結果，顯示 sorafenib 合併 T-612 使用可加強抑制細胞生長、並透過細胞自噬使細胞死亡，T-612 扮演著增強 sorafenib 抗癌功效的角色，未來可望成為臨床上輔助 sorafenib 治療肝癌的佐劑以加強治療效果。

關鍵詞：肝癌、sorafenib、靈芝三萜、抗癌佐劑、細胞週期停滯、細胞自噬

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third cause of cancer-related death in the world. There is no efficient treatment for unresectable HCC. Sorafenib, a multiple kinase inhibitor, is the only targeted therapy drug for the treatment of unresectable HCC. It can improve the overall survival and progression time of the HCC patients. In clinical, lowering dosage is the solution to reduce sorafenib-induced side effects, like rash and hand-foot skin reaction. However, it leads to lower effectiveness of treatment. Low-dose sorafenib combined with other drugs (or adjuvant) to improve sorafenib efficacy may resolve the dilemma. In this study, *Ganoderma* triterpenoid T-612 from Lingzhi, a traditional Chinese medicine, was developed as an adjuvant of sorafenib for HCC. In HCC cell lines, compared to sorafenib alone, the combination with T-612 displayed synergistic cytotoxicity and growth inhibitory effects (IC_{50} of sorafenib was reduced 12 % to 51 %). Sorafenib treatment decreased colony formation efficiency, arrested cell growth in G0/G1 phase resulted by insufficiency of cyclin D, E and CDK2, increased reactive oxygen species, induced mitochondrial membrane damage and inhibited ERK phosphorylation. Apoptosis phenotypes, such as DNA fragmentation, caspase activation and AIF activation, were not detected whereas slight autophagy occurred by sorafenib treatment. However, autophagy is not the reason of cell death. Combined treatment with T-612 reinforced the effects of sorafenib, except ERK phosphorylation. The combination treatment induced serious autophagy, indicated by the increases of LC3-II and acidic vacuole organelles. Autophagy could be partially restored by autophagy inhibitor 3-MA. In conclusion, T-612 is a potential anti-cancer adjuvant that enhances the therapeutic efficacy of sorafenib in HCC cells.

Keywords: hepatocellular carcinoma, sorafenib, *Ganoderma*, G0/G1 arrest, autophagy

英文名詞縮寫對照表

3-MA	3-Methyladenine
ACP assay	Acid phosphatase assay
AVO	Acidic vesicular organelles
AO	Acridine orange
AIF	Apoptosis inducing factor
Atg	Autophagy protein
BSA	Bovine serum albumin
CKIs	Cdk inhibitor proteins
CAK	Cdk-activating kinase
CI	Combination index
CDK	Cyclin-dependent kinase
Caspase	CysteinyI aspartate specific protease
DR	Death receptor
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EGF	Epidermal growth factor
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
HAIC	Hepatic arterial infusion of chemotherapy
HBV	Hepatitis B
HCV	Hepatitis C
HCC	Hepatocellular carcinoma
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Horseradish peroxidase
IGF	Insulin-like growth factor

mTOR	Mammalian target of rapamycin
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
NAC	N-acetyl-L-cysteine
PEI	Percutaneous ethanol injection
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phosphatidylethanolamine
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PDGF	Platelet derived growth factor
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PI	Popidium iodide
RFA	Radiofrequency ablation
ROS	Reactive oxygen species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
TACE	Transarterial chemoembolization
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-R1	TNF-receptor-1
TTBS	Tween-20 Tris-Buffered Saline
UVRAG	UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene
VEGF	Vascular endothelial growth factor

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
英文名詞縮寫對照表.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	VII
1.研究背景.....	1
1.1.肝癌（Hepatocellular carcinoma）.....	1
1.2.肝癌的訊息傳遞與標靶治療.....	4
1.3.蕾莎瓦（Sorafenib）.....	5
1.4.靈芝（ <i>Ganoderma</i> ）.....	7
1.5.細胞週期（Cell cycle）.....	7
1.6.細胞程序性死亡（Programmed cell death）.....	9
2.研究目標.....	12
3.材料與方法.....	13
3.1.細胞培養.....	13
3.2.細胞活性測定.....	13
3.3.細胞膜通透性測定.....	13
3.4.胞落形成試驗.....	13
3.5.細胞週期分析.....	14
3.6.西方墨點法.....	14
3.7.細胞內粒線體活性氧化物（Reactive oxygen species，ROS）測定.....	15
3.8.細胞內粒線體膜完整性測定.....	15
3.9.細胞內 Caspase 活性測定.....	15

3.10.細胞內酸性囊狀胞器測定.....	15
3.11.統計分析.....	15
4.研究結果.....	16
4.1.T-612 顯著地促進 sorafenib 對肝癌細胞株的抗癌活性	16
4.2.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞 G0/G1 時期停滯	18
4.3.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞活性氧化物累積及粒線體受損，移除活性 氧化物無法恢復細胞活性，但可減緩粒線體受損情形.....	19
4.4.合併使用 T-612 無法增強 sorafenib 造成之訊息傳遞抑制	20
4.5.Sorafenib 單獨處理或合併 T-612 皆不透過誘導細胞凋亡使細胞死亡.....	20
4.6.T-612 增強 sorafenib 誘導之細胞自噬並使細胞死亡	20
5.討論.....	22
6.圖.....	26
7.參考文獻.....	37
8.附錄.....	42
附錄 1.肝癌分期系統.....	42
附錄 2.細胞自噬過程與其抑制劑.....	44
9.藥品材料清單.....	45
9.1.藥品與試劑.....	45
9.2.抗體.....	46

圖目錄

圖 1.T-612 顯著地促進 sorafenib 對肝癌細胞株的抗癌活性。	26
圖 2.T-612 合併 sorafenib 處理 Huh-7 細胞具協同效果。	27
圖 3.T-612 顯著地促進 sorafenib 抑制 Huh-7 細胞之胞落形成能力。	28
圖 4.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞 G0/G1 時期停滯。	29
圖 5.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞活性氧化物累積及粒線體受損。	30
圖 6.移除活性氧化物無法改善 T-612 合併 sorafenib 造成的細胞活性下降,但可減緩粒線體受損情形。	31
圖 7.合併使用 T-612 無法增強 sorafenib 造成之訊息傳遞抑制。	32
圖 8.Sorafenib 單獨處理或合併 T-612 皆不透過誘導細胞凋亡使細胞死亡。	34
圖 9.T-612 增強 sorafenib 誘導之細胞自噬並使細胞死亡。	36



1.研究背景

1.1.肝癌（Hepatocellular carcinoma）

世界上每年有 760 萬人因癌症死亡，其中肝癌位居世界癌症死因第三位，每年有 70 萬人死於肝癌，肝癌發生率最高地區為東亞、東南亞、中非及西非，非開發及開發中國家的比例又高於已開發國家[1]。在台灣，衛生署統計資料顯示肝癌位居十大癌症死因第二位（2004—2011 年），每年有超過八千人死於肝癌。

罹患肝癌的主要危險因子為 B 型、C 型肝炎病毒（hepatitis B、C virus，HBV、HCV）感染、肝硬化、酒精性肝病及非酒精性脂肪肝等[2]。統計顯示半數以上肝癌病例源自 HBV 感染[3]，因 HBV 多透過母子垂直感染帶原[4]，在防治上疫苗是個很好的選擇，成功的例子如台灣自 1984 年新生兒施打 B 型肝炎疫苗以來，有效降低兒童及年輕人口 HBV 的感染人數，也進一步降低年輕族群罹患肝癌的人數[5]。另有超過 30 %肝癌病例源自 HCV 感染，雖然 HCV 主要感染途徑也是透過母子垂直感染帶原[3]，但近來許多國家包含美國及中歐，透過藥物濫用導致 HCV 感染人數上升，進而提高肝癌發生率也是不可小覷的原因[6, 7]。在美國，二十年來罹患肝癌人數多了三倍，由 HCV 感染導致的肝癌甚至成為上升最快的癌症相關死因[2]，可惜目前針對 HCV 感染仍無有效疫苗問世[1]，成為肝癌預防上的一大隱憂。

現行肝癌分期有幾個系統，如美國癌症聯合委員會（American joint committee on cancer，AJCC）的 TNM 分期、巴塞隆納肝癌分期與治療準則（Barcelona clinic liver cancer (BCLC) staging and treatment strategy）及日本肝病醫學會（Japan society of hepatology，JSH）的肝癌治療準則（詳見附錄 1.）。

根據美國癌症聯合委員會 2009 年公布的腫瘤分期標準第七版（AJCC cancer staging manual，seventh edition）的說明，利用 TNM 系統評估肝癌腫瘤本身狀態（primary tumor，T）、淋巴結轉移情形（regional lymph nodes，N）及有無遠處轉移（distant metastasis，M）將肝癌分成 I 至 IV 期，I 期為出現單顆腫瘤但無血管侵

犯，II 期為出現單顆腫瘤且有血管侵犯或是有多顆最大直徑不超過 5 公分的腫瘤，III 期又分成 IIIA、IIIB 及 IIIC，IIIA 為多顆腫瘤且最大直徑超過 5 公分，IIIB 為不限大小的單顆或多顆腫瘤侵襲肝門靜脈或肝靜脈，IIIC 為不限大小的單顆或多顆腫瘤侵犯膽囊及周邊器官或是貫穿臟層腹膜，以上三期皆無淋巴結或遠處轉移情形，IV 期分成 IVA 及 IVB，IVA 為任何大小的腫瘤，已轉移至局部淋巴結，IVB 為任何大小的腫瘤，不論有無轉移至淋巴結，但已有遠端器官轉移。這種以腫瘤大小及位置的分期屬於臨床分期（clinical staging），有助於醫師了解病人目前的疾病進展以制定治療方針。

巴塞隆納肝癌分期與治療準則多為歐洲國家參考的肝癌治療方式，以病人的健康情形（體能狀況，是否需臥床）、肝功能等級（Child-Pugh score，以總膽色素、白蛋白、凝血時間、腹水及肝腦病變五項計算得分）及腫瘤數目與大小將病人分成五期，分別制定建議的治療方式[8]。日本肝病醫學會的肝癌治療準則是日本、台灣等亞洲國家參考的肝癌治療方式，以病人有無遠端器官轉移、肝功能等級（Child-Pugh）、腫瘤有無侵犯血管及其大小與數目來制定建議治療方針[9]。

在肝癌治療方面，目前多採取 staging-guided treatment，遵循前述肝癌治療準則制定治療方法，依病情嚴重程度進行手術切除、肝臟移植、局部消除術、化學栓塞療法（transarterial chemoembolization，TACE）、肝動脈灌注化療（hepatic arterial infusion of chemotherapy，HAIC）及標靶治療等[2, 9]。

以外科手術切除肝癌腫瘤的方式，僅適用於非常早期且無肝硬化的肝癌病患，有肝硬化者須以 Child-Pugh 系統評估肝功能，以無門脈高壓、總膽紅素正常且腫瘤直徑小於 3 公分者預後較好[10, 11]，手術後病人的五年存活率可達 70 %[12]，但五年復發率也高達 70 %，復發率高乃因病患本身多有慢性肝臟疾病使易發展成新的腫瘤[2]。雖然手術切除可提高病患存活，但符合切除條件的病患並不多，如美國及歐洲只有 5 %，亞洲因有較多感染 HBV 導致肝癌但無肝硬化的年輕肝癌病患，可切除比例可提高至 40 %[2, 13]。

肝臟移植可同時移除腫瘤及肝硬化等存在之肝臟疾病，米蘭規約（Milan criteria）是評估病人是否適合進行移植的原則之一，由 Mazzaferro 等人於 1996 年提出，報告中指出肝臟腫瘤小於 5 公分或是至多 3 個小於 3 公分腫瘤的早期肝癌病人，進行移植後 5 年存活率可達 70 % 且復發率小於 15 % [14]，另有研究指出，稍微放寬腫瘤大小標準（肝臟腫瘤小於 6.5 公分或是至多 3 個小於 4.5 公分但加總小於 8 公分的腫瘤），移植後 5 年存活率可達 75 % [15]，但整體而言，肝臟移植所遇到的困境是捐贈者太少，供不應求。

當早期肝癌的病人無法施行手術切除或肝臟移植時，局部消除術是常見的選擇，有經皮酒精注射（percutaneous ethanol injection, PEI）及射頻電燒灼（radiofrequency ablation, RFA）等，前者藉由酒精注射、後者透過溫度改變使癌細胞壞死，不同研究團隊皆指出施行射頻電燒灼的病人比經皮酒精注射組別有較好的預後 [16, 17]，另比較射頻電燒灼及手術切除的病人預後，發現兩者並無顯著差異，射頻電燒灼侵入性及手術費用較低的優勢未來可望取代手術切除，但射頻電燒灼同樣面臨只適用於直徑較小的早期腫瘤及高復發率的問題 [18, 19]。

中期肝癌病人可選用化學栓塞療法，由於肝細胞主要透過肝門靜脈得到養分，肝癌細胞是透過肝動脈供給，化學栓塞療法就是以阻斷肝動脈血流的方式，使肝癌細胞因無法得到養分而壞死，並加入化療藥物加強治療功效，研究指出以化學栓塞方式治療的肝癌病患可有效延長存活時間 [20]，但有半數以上病患會因化療藥物產生發燒、腹痛及腸阻塞等副作用 [21]。

肝動脈灌注化療是直接將化療藥物（常用低濃度 5-fluorouracil 及 cisplatin）注射到肝動脈，使癌細胞持續暴露在高濃度的化療藥物中，以達殺死癌細胞的目的，可用於無法使用化學栓塞療法（如有肝門靜脈栓塞或是腫瘤侵入肝門靜脈）的病人，肝動脈灌注化療見於日本肝病醫學會的肝癌治療準則，在日本經常被使用，但一二期臨床試驗報告顯示病人可能有全血球減少（pancytopenia）等血液方面的副作用 [22]，台灣也常見以肝動脈灌注化療治療病人，臨床上的反應約 4 到 5 成。

上述的治療多侷限於早、中期的肝癌病人，因肝臟沒有神經無法感覺到疼痛，許多肝癌病人發現時已是無法切除的中晚期，在標靶藥物問世前，只能投以一般化療藥物如 doxorubicin，但是肝癌病人對化療藥物的反應率只有 10 到 15 %，且對病人存活並無幫助[21]，這使得過去幾十年來肝癌病人的存活率一直無法提升[23]，但隨著我們對肝癌分子機制層面的了解，研發針對特定分子的標靶藥物，是治療中晚期肝癌的熱門課題。

1.2.肝癌的訊息傳遞與標靶治療

在調控細胞生長、血管新生、侵犯及轉移等方面的訊息傳遞路徑上，常可見正常細胞及癌細胞的不同[24]，肝癌方面已知有數個路徑的調控上失常，包含血管新生相關因子如血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF) 和血小板衍生生長因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 及其受體 (receptor)、生長因子如表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF)、類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor, IGF) 和肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 及其受體、細胞內訊息傳遞 [Raf/MEK/ERK pathway 及 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT/mTOR pathway] 和細胞分化 (WNT/ β -catenin) 等[25]，這些分子成為研發標靶藥物的目標，其中又以針對 VEGF/VEGFR、EGF/EGFR 及多激酶抑制劑 (multikinase inhibitor) 的研究較多[26]。

肝癌細胞需要大量的血流供應，過度表現 VEGF 會因促進肝癌細胞的血管新生而加速癌細胞生長[27, 28]，臨床上可見 VEGF 的高度表現與肝癌的嚴重程度[29]、手術切除後的較差預後[30]、較高復發率及較短的存活時間[31]呈正相關。目前臨床試驗中藥物有 VEGF 的單株抗體 bevacizumab[32]、VEGFR 的酪氨酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitor) vatalanib[33, 34]及 cediranib[34]等。

在 40 %—70 %的肝癌病患檢體中看到 EGFR 過度表現的情形[35]，而 EGFR

的活化被認為和肝癌的進程相關[36, 37]，臨床試驗藥物有 EGFR 的酪胺酸激酶抑制劑 erlotinib、lapatinib、gefitinib 及 EGFR 的單株抗體 cetuximab，這些藥物皆已進行二期臨床試驗，不幸的是，除了 erlotinib 有不錯的效果[38]，目前與 sorafenib 合併使用進入三期臨床試驗外[26]，lapatinib[39]、gefitinib[40]及 cetuximab[41, 42]的治療成效皆不佳，無法有效發揮抗癌功效。

另外多激酶抑制劑也是研發重點，希望藉由抑制多重目標而加強治療的效果，目前除了已核准使用的 sorafenib 外，臨床研發藥物有 sunitinib 及 brivanib，sunitinib 是 VEGFR、PDGFR- β 、FLT-3 等目標的酪胺酸激酶抑制劑，雖在一個二期臨床試驗看到抗癌效果[43]，另一個二期臨床試驗卻觀察到肝癌病人反應率低且有嚴重毒性[44]，接下來與 sorafenib 合併使用的三期臨床試驗結果也因高毒性且無法有效治療肝癌而黯然中止[45, 46]；brivanib 是 VEGFR 及 FGFR 的抑制劑，目前在二期臨床試驗看到其安全性及抗癌效果[47]，目前已進入三期臨床試驗，希望其治療效果能使成為肝癌第一線治療藥物[26]。

1.3. 蕾莎瓦 (Sorafenib)

Sorafenib 由拜爾藥廠研發，是一口服的多激酶抑制劑，商品名為 Nexavar® (BAY43-9006，中譯蕾莎瓦)。

Raf/MEK/ERK 訊息傳遞路徑和細胞的生長、存活及分化相關，在許多癌症中看到活化的情形，Raf 及 MEK 都有其抑制劑的相關研究[46]。Raf 家族包含 A-Raf、B-Raf 及 C-Raf/Raf-1，Hwang 等人在 30 個肝癌病人中觀察到所有病人皆有 C-Raf 過度表現的情形[48]，而 Raf 抑制蛋白若失去活性則有助於肝癌細胞的生長及轉移[49]，sorafenib 最先被設計成 C-Raf 的抑制劑[50]，之後發現 sorafenib 也可抑制正常與突變的 B-Raf 及數個受體型酪胺酸激酶(receptor tyrosine kinase)包含 VEGFR、PDGFR、Flt-3、Ret 及 c-KIT[51]，前述可知 VEGFR 及 PDGFR 都是肝癌標靶治療的目標，因此 sorafenib 可藉由抑制多重目標來加強治療肝癌的效果。

在 *in vitro* 及 *in vivo* 的實驗中，sorafenib 皆可有效抑制肝癌細胞生長、腫瘤血管新生並誘發細胞凋亡[52, 53]，在東西方不同的大型三期臨床試驗中，皆可見 sorafenib 有效延長了肝癌病人存活時間及復發時間[54, 55]。sorafenib 在 2005 及 2007 年分別由美國食品藥物管理局 (U.S. food and drug administration, FDA) 核准治療晚期腎癌 (advanced renal cell carcinoma) 及無法切除的肝癌 (unresectable hepatocellular carcinoma)，台灣衛生署也分別於 2007 及 2010 年核准治療以上兩種癌症，劑量皆為每日兩次口服各 400 mg。

Sorafenib 是第一個治療肝癌的標靶藥物，的確為中晚期肝癌病患帶來曙光，但是其副作用卻是不可忽略的，在臨床階段就已知 sorafenib 會造成病人虛弱、腹瀉、手足症候群 (hand-foot syndrome) 及紅疹等副作用[54, 56, 57]，上市後許多報告指出病人會有手足症候群、紅疹潰爛等皮膚方面的嚴重副作用[58-60]，更甚者有角化棘皮瘤 (keratoacanthomas) 或鱗狀上皮細胞瘤 (squamous cell carcinomas) 的發生[61]，可是針對副作用的發生，只能採取減低劑量或是中斷治療等消極的策略，大大影響治療功效。

早在 sorafenib 上市前，就有許多臨床試驗將 sorafenib 合併其他藥物，觀察其安全性及抗癌功效，Takimoto 等人回顧數十個第一或二期臨床試驗、將近 600 個病人的結果，指出 sorafenib 不易和其他藥物產生意外的不良交互作用，且合併其他藥物使用常可見良好的抗癌功效[62]，一團隊採取 sorafenib 合併 doxorubicin 治療中晚期肝癌病患，目前已完成第三期臨床試驗，可見相較於單獨使用 doxorubicin，合併使用組別病人的存活時間及復發時間都較長[63]，另外有 sorafenib 合併 octreotide[64]或 tegafur/uracil[65]治療肝癌，皆已通過第二期臨床試驗。不過大部分研究中 sorafenib 的劑量還是維持每日兩次 400 mg，主要是希望能增強治療肝癌的效果，對於副作用的減輕並無多加著墨，當然若能以 sorafenib 合併其他藥物的模式，一方面增強治療效果，且藉著降低 sorafenib 劑量來減少副作用，必是眾人所樂見的。

1.4. 靈芝 (*Ganoderma*)

靈芝是一種高等真菌，在亞洲數千年來以高級中草藥之姿被廣泛運用於各種疾病，成書於秦漢、現存最早的中藥學著作神農本草經中，依色澤將靈芝分為赤芝、黑芝、青芝、白芝、黃芝及紫芝六種，皆列為藥之上品，並有「久食，輕身、不老、延年、神仙。」的描述，現代植物分類學上靈芝屬於真菌界擔子菌門同擔子菌綱無褶菌目靈芝科靈芝屬，現在一般所稱的靈芝 (lingzhi) 乃是赤芝 (*Ganoderma lucidum*) [66]。

靈芝現於中國、日本、韓國及其他亞洲國家被廣泛運用，其生化活性和藥理作用在近三十多年來持續被研究著[67]，作為現代中草藥，靈芝具有對人體無毒性且無副作用、不針對特定器官作用及可維持並改善人體器官功能等三大優點[66]。目前靈芝中研究最多、具生物活性的分子有多醣體、三萜類 (triterpenoid) 及功能性蛋白質三大類[66]，許多文獻證實靈芝具有抗癌、抗病毒、免疫調節、保肝、抗菌、抗發炎、抗氧化、降血脂及降血壓等藥理活性，其中多醣體的功能與免疫調節較為相關，目前已有超過 250 種靈芝三萜被純化鑑定出，它們的分子量約在 400~700 上下，其中約有半數靈芝三萜具有生物活性[68]。本次實驗所使用的靈芝三萜 T-612 是一種靈芝酸 (ganoderic acids)，研究指出靈芝酸有抗癌、抗氧化、抗發炎等功能[69]。

1.5. 細胞週期 (Cell cycle)

細胞週期是指生命體繁殖 (reproduction) 的基本機制，包含複製 (duplication) 與分裂 (division)。真核生物的細胞週期依序分為 G1 (gap)、S (DNA synthesis)、G2 (gap) 及 M (mitosis) 四個時期，前三者合稱為間期 (interphase)，占整個週期的大部分時間，G1 及 G2 時期讓細胞有足夠的時間，監控內外環境是否適合進行複製或分裂，及準備細胞進行複製及分裂所需之條件。

G1 時期的長短通常決定於外在環境的條件及其他細胞傳遞的訊息，若條件不

佳不適合細胞週期的進行，細胞就會延長 G1 時期，甚至進入 G0 時期，此時細胞會停止生長數天數周甚至數年之久，直到環境變得適合生長才會回到 G1 時期讓整個週期順利進行。細胞從 G1 進入 S 時期前，會經過一檢查點（G1 checkpoint，restriction point），確認環境適合進入 S 時期行染色體的複製，不合適則使細胞停滯於 G0/G1 時期。

S 時期中細胞進行染色體複製，染色體會自 2N 複製成 4N，新細胞所需之成分大部分於這個時期完成，S 時期約佔整體細胞週期一半的時間。

染色體完成複製、進入細胞分裂前的間隔期 G2，讓細胞可以繼續生長並合成酵素及蛋白質，進入 M 時期前會經過一檢查點（G2/M checkpoint），確保染色體複製正確而完全且環境合適才會進行分裂，否則會一直停滯在 G2 時期，等待問題解決才會進入 M 時期。

M 時期歷時很短，主要進行兩個活動，先是有絲分裂（mitosis，nuclear division），在兩個細胞核分開後進行胞質分裂（cytokinesis，cytoplasmic division），形成兩個相同的細胞。有絲分裂可再分為分裂前期（prophase）、前中期（prometaphase）、中期（metaphase）、後期（anaphase）及末期（telophase）共五個時期，在中期及後期之間有一檢查點（metaphase-to-anaphase transition），確定所有染色體已經和紡錘絲連接並排列於赤道板上，確保染色體能平均分配到兩個細胞中。

調控細胞週期的重要分子是細胞週期蛋白（cyclin）及細胞週期蛋白依賴型激酶（cyclin-dependent kinase，CDK），cyclin 藉由與 CDK 結合形成複合物來活化 CDK，細胞週期的各個時期藉由不同 cyclin-CDK 複合物大量表現所調控，調控 G1 時期的複合物為 cyclin D-CDK4 及 cyclin D-CDK6，G1 晚期 cyclin E-CDK2 會大量表現，幫助細胞通過 G1 檢查點，而 S 時期則是 cyclin A-CDK2 大量表現，M 時期為 cyclin A-CDK1 及 cyclin B-CDK1。

除 cyclin 外還有 Cdk-activating kinase（CAK）及 Cdc25 phosphatase 會促進 Cdk 的活性，Wee1 kinase、Cdk inhibitor proteins（CKIs）如 p21、p27 及 p16 會抑制 Cdk

的活性，而 ubiquitin ligase 如 APC/C 及 SCF 也會參與調控細胞週期。

1.6.細胞程序性死亡 (Programmed cell death)

細胞程序性死亡指細胞進行一連串有次序且不中斷的活動，以邁向細胞死亡的過程[70]，是細胞對外在或內在傳遞之訊息所做出的回應[71]，一般可分為細胞凋亡 (apoptosis, type I) 及細胞自噬 (autophagy, type II)。

細胞凋亡的觀念由 Kerr 等人於 1972 年提出，首重於觀察到的死亡細胞形態改變[72]，目前有關細胞凋亡的描述為細胞外型皺縮且有小泡產生 (shrinkage and blebbing)、細胞膜完整但有磷脂醯絲氨酸外翻 (exteriorization of phosphatidylserine)、細胞質有凋亡小體 (apoptotic body) 形成、細胞核皺縮與碎裂 (pyknosis and karyorrhexis)、染色體濃染且邊緣化 (chromatin condensation and marginalization)、DNA 斷裂 (DNA fragmentation) 等特點，另常有半胱氨酸天冬氨酸特異蛋白酶 (cysteiny aspartate specific protease, caspase) 的活化[70, 73]。

細胞凋亡有外源性 (extrinsic) 及內源性 (intrinsic) 兩條訊息傳遞路徑，外源性細胞凋亡通過細胞表面死亡受體 (death receptor, DR) 與其配體 (ligand) 結合使受體活化，死亡受體屬於腫瘤壞死因子受體家族 (tumor necrosis factor (TNF) receptor family)，有 FasR、TNF-receptor-1 (TNF-R1)、DR3、4 及 5 等，相配配體有 FasL、TNF- α 、Apo3L 及 Apo2L 等，受體被活化後傳訊至下游活化 caspase 中的啟動分子 (initiators) caspase-8 和 10，caspase-8 和 10 再進一步活化下游的執行分子 (effectors) caspase-3、6 及 7，導致細胞凋亡[73, 74]。

內源性路徑藉由刺激如生長因子、賀爾蒙及細胞素減少、或輻射、毒素、缺氧、高溫、病毒感染或氧化壓力等促使細胞凋亡的發生，當細胞接受到這些刺激後，Bcl-2 蛋白家族中的促進凋亡 (pro-apoptotic) 成員如 Bax 或 Bak 會改變粒線體的通透性，使粒線體中的細胞色素 C (cytochrome c) 釋出並活化下游 caspase-9，再進一步活化下游的 caspase-3、6 及 7，導致細胞凋亡，Bcl-2 家族中另有抑制凋

亡(anti-apoptotic)成員如 Bcl-2、Mcl-1 等，兩類成員共同調控內源性路徑[73, 74]。

Apoptosis inducing factor (AIF) 於細胞質被合成時為 67 kDa，接著會被送入粒線體雙層膜之間，當細胞受到環境壓力欲誘發細胞凋亡時，AIF 會被切成 57 kDa 大小，移動到細胞質再進入細胞核，產生大規模的 DNA 斷裂使細胞死亡，此種細胞凋亡可以不透過 caspase 進行，藉由測量 AIF 57 kDa 片段的產生可以得知細胞內有無 caspase-independent 的細胞凋亡發生[71, 75]。Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 參與修復 DNA、轉錄及細胞死亡等多種細胞生理現象，當細胞凋亡發生時，活化的 caspase-3 會將 PARP 切成 89 kDa 及 24 kDa 兩個片段使其失去活性，藉由測量 PARP 片段的產生可以得知細胞內有無經 caspase 路徑的細胞凋亡發生[76]。

細胞自噬是指細胞在較艱困如飢餓或藥物處理的環境下，把自身部分細胞質及不需要或失去功能的胞器及蛋白質以程序性步驟包於自噬體 (autophagosome) 中，自噬體與溶體 (lysosome) 融合形成自噬溶酶體 (autophagolysosome) 並以溶體中酵素 (lysosomal enzyme) 降解上述之胞器及蛋白質的過程，細胞經歷細胞自噬後可能因汰換老舊胞器與蛋白質後減輕細胞負擔及獲得能量而有助於生存，但若細胞自噬情形嚴重，剩下的胞器不足以維持細胞生存所需，細胞可能因此而死亡，或是因此走向凋亡[71, 77]。

細胞自噬體形成的詳細過程可參見附錄 2，簡言之，平時 mammalian target of rapamycin (mTOR) 會藉磷酸化細胞自噬蛋白 (autophagy protein、Atg) 13 來抑制細胞自噬，當 mTOR 受到抑制時，Atg13 與 Atg1 及 Atg17 結合並活化 Atg1、誘發細胞自噬開始；接下來是囊泡核化 (vesicle nucleation)，class III PI3K (Vps34) 藉由 beclin-1、UVRAG (UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene) 及 Vps15 形成的複合物活化，起始自噬體雙層膜的形成；再來是囊泡延展 (visicle elongation)，此過程包含 Atg12-Atg5 及 LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) - phosphatidylethanolamine (PE) 兩個類泛素共軛系統 (ubiquitin-like

conjugation system)，Atg12 及 Atg5 經由 Atg7 (E1-like enzyme) 及 Atg10 (E2-like enzyme) 協助結合後與 Atg16 結合以延長自噬體雙層膜，LC3 被蛋白酶 Atg4 切割後，經由 Atg7 及 Atg3(E2-like enzyme)協助與 PE 結合並接上雙層膜協助其延長，最後由 Atg9 終止延長，自噬體形成[71, 77]。



2.研究目標

本研究以靈芝三萜類 T-612 合併 sorafenib 處理肝癌細胞株，發現 T-612 能加強 sorafenib 的抗癌功效，進一步探討其造成細胞生長停滯及死亡的作用機制，研究 T-612 作為 sorafenib 治療肝癌的佐劑之可行性。



3.材料與方法

3.1.細胞培養

使用 Huh-7、HepG2、Hep3B 及 PLC5 人類肝癌細胞株，以內含 100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、2 mM L-glutamin、non-essential amino acid 及 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的培養液 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium) 培養於 37°C 恆溫含 5 % CO₂ 之培養箱。

3.2.細胞活性測定

以酸性磷酸酶實驗 (acid phosphatase assay, ACP assay) 測定藥物處理前後的細胞活性。細胞接種於 96 孔盤 (3000 cells/well)，貼附後加入藥物處理，分析時先以 PBS (phosphate buffered saline) 清洗，加入 100 µl assay buffer (含 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate、0.1 M sodium acetate、0.1 % triton X-100 調至 pH 5.5) 於 37°C 反應 30 分鐘後以 10 µl 1N NaOH 停止反應，用 SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, CA, USA) 於波長 405 nm 測定吸光值。

3.3.細胞膜通透性測定

細胞接種於 6 孔盤 (1×10^5 cells/well)，貼附後加入藥物處理，分析時加入最終濃度 2 µg/ml propidium iodide (PI) 於 37°C 避光染色 30 分鐘，經 PBS 清洗、trypsin 打下後以流式細胞儀 Epics XL-MCL Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., CA, USA) 分析，用 EXPO32 (Beckman Coulter, Inc., CA, USA) 軟體處理數據。

3.4.胞落形成試驗

將 1.4 % 的洋菜膠 (agarose) 及 20 % FBS-DMEM 等體積混合後加入 6 孔盤 (1 ml /well) 待凝，再將 0.7 % 的低熔點洋菜膠 (low melting point agarose) 與含 5000

cells/ml 及不同藥物濃度的 20 % FBS-DMEM 等體積混合後加入 6 孔盤(1 ml /well) 待凝，最後加入含不同藥物濃度的 10 % FBS-DMEM (2 ml /well)，培養 14 天後以 Olympus IX71 倒立式螢光顯微鏡計數每個孔洞內直徑大於 100 μ m 的胞落數。

3.5.細胞週期分析

細胞接種於 6 孔盤 (1×10^5 cells/well)，貼附後加入藥物處理，以 PBS 清洗、trypsin 打下、3000 rpm 離心去除 trypsin 後，再次清洗所得細胞以 300 μ l PBS 打散，加入 700 μ l 絕對酒精於 -20 $^{\circ}$ C 固定 (至少過夜)。接著以 1500 rpm、4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘去除酒精，清洗後所得細胞以 495 μ l PBS 打散，加入 5 μ l RNase A (1 mg/ml) 於 37 $^{\circ}$ C 處理 30 分鐘後，加入等體積 5 μ g/ml PI 避光染色 10 分鐘，以流式細胞儀分析，用 EXPO32 軟體及 multicycle (Phoenix Flow Systems, Inc., CA, USA) 處理數據。

3.6.西方墨點法

將 40 μ g 細胞蛋白萃取液與 4x loading dye (含 200 mM Tris、0.4 % bromophenol blue、40 % glycerol、8 % SDS 及 2 mM DTT) 以 3:1 混勻，以 95 $^{\circ}$ C 乾浴槽加熱 5 分鐘，進行 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)，完成後將蛋白質以濕式轉漬方式轉漬至 nitrocellulose 轉漬膜 (Millipore Corp., MA, USA) 上。將轉漬膜以 3 % BSA (bovine serum albumin) 於室溫下 blocking 1 小時，TTBS (Tween-20 Tris-Buffered Saline，含 32 mM Tris，137 mM NaCl，0.1 % Tween-20，pH=7.4) 清洗三次後加入一級抗體於 4 $^{\circ}$ C 作用過夜，次日以 TTBS 清洗三次後加入接有 horseradish peroxidase (HRP) 之次級抗體於室溫作用 1 小時，TTBS 清洗三次即可以冷光試劑 (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate) 反應呈色，用 Fujifilm LAS 4000 Imager 拍照分析。

3.7.細胞內粒線體活性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 測定

細胞接種於 6 孔盤 (1×10^5 cells/well)，貼附後加入藥物處理，分析時加入最終濃度 $2.5 \mu\text{M}$ MitoSOXTM RED 於 37°C 避光染色 30 分鐘，經 PBS 清洗、trypsin 打下後以流式細胞儀分析，用 EXPO32 軟體處理數據。

3.8.細胞內粒線體膜完整性測定

細胞接種於 6 孔盤 (1×10^5 cells/well)，貼附後加入藥物處理，分析時加入最終濃度 200 nM DiOC6(3)於 37°C 避光染色 1 小時，經 PBS 清洗、trypsin 打下後以流式細胞儀分析，用 EXPO32 軟體處理數據。

3.9.細胞內 Caspase 活性測定

細胞接種於 6 孔盤 (1×10^5 cells/well)，貼附後加入藥物處理，分析時加入最終濃度 $10 \mu\text{M}$ 的螢光受質 PhiPhiLux[®]-G₁D₂ (caspase-3 的受質，序列為 DEVDGI)、或 CaspaLux[®]9-L₂D₂ (caspase-9 的受質，序列為 LEHDGI) 於 37°C 避光染色 1 小時，經 PBS 清洗、trypsin 打下後以流式細胞儀分析，用 EXPO32 軟體處理數據。

3.10.細胞內酸性囊狀胞器測定

細胞接種於 6 孔盤 (1×10^5 cells/well)，貼附後加入藥物處理，分析時加入最終濃度 $5 \mu\text{M}$ acridine orange (AO) 37°C 避光染色 30 分鐘，經 PBS 清洗、trypsin 打下後以流式細胞儀分析，用 EXPO32 軟體處理數據，或染色 30 分鐘後，於螢光顯微鏡 E800 (Nikon instech company, Kawasaki, Japan) 下觀察。

3.11.統計分析

實驗之結果皆利用 Student's *t* test 做統計分析。

4.研究結果

4.1.T-612 顯著地促進 sorafenib 對肝癌細胞株的抗癌活性

首先選用 Huh-7、HepG2、Hep3B 及 PLC5 四株肝癌細胞株，分別加入 sorafenib、T612 及合併使用，測試兩者對肝癌細胞的毒性，並計算藥物抑制細胞 50 % 活性的濃度 (the half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。以 10 μ M T-612 單獨處理細胞，至 72 小時皆有 80 % 以上的活性，顯示 10 μ M T-612 對肝癌細胞並無毒性，而以 sorafenib 單獨處理則可在各細胞株造成程度不一的活性抑制，48 小時的 IC_{50} 為 9.7—20.5 μ M 不等，72 小時可下降至 7.8—16 μ M，整體而言以 Huh-7 感受性最好，HepG2 及 PLC5 次之，Hep3B 最差，合併 10 μ M T-612 處理後，可有效加強 sorafenib 抑制肝癌細胞活性，各細胞株 IC_{50} 下降 12.4 % 至 51.2 % 不等 (圖 1A)，圖中 Huh-7 及 HepG2 為 48 小時而 Hep3B 及 PLC5 為 72 小時的結果，呈現不同時間點乃因 T-612 在各細胞株達最佳抑制效果的時間不同，結果顯示 Huh-7 細胞以 sorafenib 單獨處理所得 IC_{50} 較低，且合併 T-612 在 48 小時即可觀察到顯著的加強抑制效果，故以 Huh-7 細胞研究相關分子機制。

接下來以 PI 染色測定藥物處理後細胞死亡情況，24 小時各組別沒有細胞膜破裂、PI 螢光強度上升的情形，36 小時可見單獨處理 sorafenib 輕微造成細胞死亡 (上升 2.1 %)，合併使用 T-612 可以加強細胞死亡 (與單獨處理 sorafenib 相比上升 5.7 %)，在 48 小時 sorafenib 本身造成 16.3 % 細胞死亡，合併 T-612 可使細胞死亡比例上升至 28.8 % (圖 1B)。

Combination index (CI) 的計算分析常用於評估合併使用藥物後兩者的交互作用，分析結果可分為協同 (synergism)、加成 (additive effect) 或是拮抗 (antagonism)，計算公式為：

$$CI = \frac{C_{A,X}}{IC_{X,A}} + \frac{C_{B,X}}{IC_{X,B}}$$

$IC_{X,A}$ 和 $IC_{X,B}$ 為分別單獨使用藥物 A 及 B 時，達到抑制細胞 X % 時的藥物濃度，

$C_{A,X}$ 及 $C_{B,X}$ 為合併使用藥物 A 和 B 時，達到抑制細胞 X % 時個別的藥物濃度，若 CI 值小於 1 為協同，等於 1 為加成，大於 1 則為拮抗，如此可預知兩種藥物合併使用後能否達到加強治療的效果[78, 79]。在看到 T-612 合併使用 sorafenib 可有效降低肝癌細胞株的 IC_{50} 後（圖 1A），我們想知道兩者合併使用是否有協同或只是單純的加成作用，先測出 T-612 及 sorafenib 單獨使用時的 IC_{25} 及 IC_{50} ，T-612 分別為 19.8 μM 和 39.5 μM ，sorafenib 分別為 5.5 μM 和 9.7 μM ，兩者以 IC_{25} 濃度合併並作兩倍系列稀釋處理 Huh-7 細胞，若兩者為加成作用（CI=1），則理論上以 IC_{25} 濃度合併處理的組別可達 50 % 抑制，系列稀釋後依序可達 25 %、12.5 %……抑制，若兩者為協同作用（CI 小於 1），則各組別抑制效果會大於上述數值， IC_{50} 的 CI 計算原理同上述，實驗結果發現，在 IC_{25} 組別中只要 1.02 μM sorafenib 合併 3.72 μM T-612 即可達抑制 25 % 細胞活性的效果，使用濃度遠低於加成作用理論值（2.8 及 9.9 μM ），CI 值為 0.38（圖 2A），而在 IC_{50} 組別只要 2.07 μM sorafenib 合併 8.46 μM T-612 即可達抑制 50 % 細胞活性的效果，濃度低於加成作用理論值（4.8 及 19.8 μM ），CI 值為 0.43（圖 2B），以 2.07 μM sorafenib 合併 8.46 μM T-612 處理細胞後，可測得細胞活性剩下 52 %，和上述 IC_{50} 組別計算所得數值相去不遠，確認兩者為協同作用。

In vitro 的單層細胞培養與腫瘤在體內的實際生長情形相差很大，胞落形成試驗讓腫瘤細胞以 anchorage independent growth 方式培養，模擬其於活體內生長條件，藉觀察胞落形成數目及大小來了解此腫瘤細胞的惡性程度及生長特性[80]，也有助於抗癌藥物的篩選與開發[81]。本實驗將細胞懸浮培養於洋菜膠中，14 天後觀察藥物對胞落數目及大小的影響，實驗結果發現，單獨處理 5 或 10 μM T-612 對胞落形成數目及大小無明顯抑制，而單獨處理 10 μM sorafenib 已可有效抑制胞落形成，雖仍可見直徑較大的胞落，但整體數目明顯下降，與對照組相比具統計意義（ $p < 0.05$ ），胞落形成效率自對照組 35 % 下降至 26 %，若以 10 μM sorafenib 合併 5 或 10 μM T-612 可清楚觀察到胞落大小及數目皆得到抑制，二者與單獨處理 sorafenib

相比皆具統計意義($p < 0.05$ 、 0.005)，形成效率可下降至 19 % 及 9 % (圖 3A & B)。

由上述實驗結果可知 T-612 促進 sorafenib 對肝癌細胞的抗癌活性，在細胞活性測試、細胞死亡情形、CI 值計算及胞落形成試驗中皆可見 T-612 的輔助效果。

4.2.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞 G0/G1 時期停滯

由於 sorafenib 合併 T-612 造成細胞活性下降，懷疑藥物是否影響細胞生長週期而使細胞生長受到抑制，於是觀察細胞生長週期中各時期的細胞所占整體比例，發現細胞經 10 μ M sorafenib 單獨處理後，G0/G1 時期細胞比例有些微上升，合併 5 或 10 μ M T-612 則都會增強此現象，讓原本佔整體不到 60 % 的 G0/G1 時期增加至 80 % (圖 4A)，顯示細胞在經藥物後有 G0/G1 停滯情形，細胞生長受到阻礙，無法進入染色體複製時期。

接著觀察調控 G0/G1 時期的細胞週期蛋白及細胞週期蛋白依賴型激酶是否受到藥物影響，cyclin D 會與 CDK4 或 6 結合形成複合物，於 G1 早期即大量表現至進入 S 時期前，可幫助調節 cyclin E-CDK2 以便通過檢查點，圖 4C 顯示，以 sorafenib 處理細胞後，cyclin D 蛋白質質量在 24 小時即可見明顯下降，合併 T-612 可進一步加強抑制 cyclin D 的表現，在 48 小時 sorafenib 對 cyclin D 抑制較不明顯，但合併 T-612 仍可見 cyclin D 的蛋白質質量降低 (圖 4B)；而 cyclin E 會結合並活化 CDK2，兩者幫助細胞通過 G1 檢查點以進入 S 時期，CDK2 乃完成 G1 時期與起始 S 時期 (G1/S transition) 所必須[82]，sorafenib 單獨處理可使 cyclin E 及 CDK2 蛋白質質量下降，合併 T-612 在 24 及 48 小時組別都可見增強抑制效果 (圖 4C)。

上述結果可得 sorafenib 本身可使細胞停滯於 G0/G1 時期，抑制 cyclin D、cyclin E 及 CDK 2 這些相關分子的表現，合併 T-612 可加強停滯現象，可能原因為透過加強降低 cyclin D、E 及 CDK 2 的蛋白質質量。

4.3.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞活性氧化物累積及粒線體受損，移除活性氧化物無法恢復細胞活性，但可減緩粒線體受損情形

實驗室先前的學長姐研究顯示，以 T-612 處理肺癌細胞會使細胞活性氧化物累積及造成粒線體受損，因此以 sorafenib 或合併 10 μ M T-612 處理 Huh-7 細胞，測定其粒線體活性氧化物累積及受損情形，圖 5A 顯示，細胞單獨處理 T-612 不造成活性氧化物累積；以 sorafenib 單獨處理則在 16 及 24 小時後皆可見細胞內有活性氧化物累積，兩個時間點上升比例相似，有隨濃度上升而累積較多的情形；合併使用 sorafenib 及 T-612 可使活性氧化物累積量增加，以 16 小時增加幅度較為明顯，5 及 10 μ M sorafenib 在合併使用 T-612 後，活性氧化物大量累積的細胞比例分別上升 22.9 % 及 15.1 %，皆具統計意義 ($p < 0.05$ 、 0.005)，而 24 小時組別則分別上升 5.5 % 及 10.1 %。

另以測定粒線體膜電位的方式測量細胞粒線體的受損情形，圖 5B 結果顯示，藥物處理 24 小時後，單獨處理 T-612 或 5 μ M sorafenib 不造成粒線體傷害，以 10 μ M sorafenib 處理則會增加 20 % 細胞粒線體受損，sorafenib 合併 T-612 處理後，可見在 5 μ M sorafenib 組別，粒線體受損細胞比例上升 9.2 %，10 μ M sorafenib 組別上升 19.3 %，後者具統計意義 ($p < 0.05$)。48 小時的組別因為看到的是殘存的細胞，所以不予定量討論。

以藥物處理細胞後觀察到活性氧化物的累積及粒線體受損，我們想知道活性氧化物的累積是否為藥物造成細胞死亡的原因，因此以 N-acetyl-L-cysteine(NAC) 移除細胞內因藥物累積的活性氧化物，試圖保護細胞，但圖 6A 結果顯示，以 NAC 保護的細胞，其活性仍會隨著處理 sorafenib 或合併 T-612 而下降，不過圖 6B 可見，以 NAC 保護的細胞經藥物處理後，粒線體受損的情形得到減緩，其中以 10 μ M sorafenib 合併 T-612 造成 40 % 細胞粒線體受損的組別減緩程度達 17.9 % 為最高並具統計意義 ($p < 0.05$)。

由此實驗結果我們得到合併 T-612 處理細胞會增強 sorafenib 造成的細胞活性

氧化物累積及粒線體傷害，但移除活性氧化物並無法恢復細胞活性，不過可確定的是，活性氧化物的累積的確是使粒線體受損的原因。

4.4.合併使用 T-612 無法增強 sorafenib 造成之訊息傳遞抑制

Sorafenib 會抑制 Raf/MEK/ERK 路徑的訊息傳遞[52]，其與 PI3K/AKT/mTOR 訊息傳遞路徑都和細胞生長、存活、血管新生等功能相關，也是最常被研究於肝癌標靶治療的兩條訊息傳遞路徑，故欲知 T-612 是否透過參與抑制此二路徑以加強 sorafenib 的抗癌功效。單獨處理 sorafenib 可抑制細胞中 ERK 的活化，且隨時間拉長抑制效果更好，在 4、16 及 24 小時有 Akt 被活化的情形（圖 7A），sorafenib 合併 T-612 的處理無法增強 sorafenib 抑制 ERK 磷酸化的效果，對於因處理 sorafenib 而上升的 pAkt 蛋白質量也無抑制效果（圖 7B），顯示 T-612 增強 sorafenib 抗癌功效並非透過抑制這兩條訊息傳遞路徑。

4.5.Sorafenib 單獨處理或合併 T-612 皆不透過誘導細胞凋亡使細胞死亡

前面實驗中可見以 sorafenib 合併 T-612 處理會造成細胞死亡，且觀察到氧化物大量累積造成粒線體傷害，粒線體的損傷又與內源性細胞凋亡相關，因此猜測細胞死亡方式乃透過細胞凋亡，但圖 8A 顯示以藥物處理細胞 24 及 48 小時後，皆沒有 sub-G1 細胞比例上升也就是細胞染色體斷裂的情形，且也未見 caspase-9 或 3 的活化（圖 8B，比例皆小於 20 %），另以西方墨點法觀察細胞凋亡相關分子表現，AIF 的 57 kDa form 及 PARP 的 89 kDa fragment 在藥物處理 24 小時後，蛋白質量皆無上升情形，綜合以上結果，顯示 sorafenib 和合併 T-612 造成的細胞死亡並非透過細胞凋亡方式。

4.6.T-612 增強 sorafenib 誘導之細胞自噬並使細胞死亡

排除細胞死亡乃透過凋亡方式後，我們進一步探討細胞經藥物處理後，是否

透過細胞自噬而死亡，首先測定細胞內酸性胞器 (acidic vesicular organelles, AVO) 變化量，單獨處理 T-612 不增加細胞內酸性胞器的量，單獨處理 sorafenib 則可見酸性胞器有累積情形 (上升 10—20 %)，合併使用 T-612 後可使細胞內酸性胞器大量累積，相較於單獨處理 sorafenib，在 5 及 10 μ M sorafenib 兩個組別分別上升 19.9 % 及 24.1 %，皆具統計意義 ($p < 0.05$ 、 0.005) (圖 9A)。

囊泡延展為細胞自噬中的重要階段，此階段中 LC3 分子經 lipid conjugation 從可溶性形式 (LC3-I) 轉換為自噬囊泡相關形式 (autophagic-vesicle-associated form, LC3-II)，脂化過程會使其分子量自 16 kDa 變成 14 kDa，LC3-II 的測定可說明細胞中有無細胞自噬現象發生[71]，本實驗將細胞處理 sorafenib 或合併 T-612 處理後測定 LC3 的蛋白質量，單獨處理 sorafenib 24 小時對 LC3-II 的量沒有影響，合併 T-612 後可大量增加 LC3-II 的蛋白質量，顯示 T-612 合併 sorafenib 可誘發嚴重的細胞自噬。3-Methyladenine (3-MA) 為 PI3K 抑制劑，可抑制囊泡核化過程中的 class III PI3K (Vps34)，於早期有效抑制細胞自噬的發生[83]，加入 3-MA 和藥物一同處理細胞，可見 sorafenib 合併 T-612 處理的組別 LC3-II 蛋白質量明顯下降，顯示以 3-MA 處理細胞可減輕 sorafenib 合併 T-612 造成的細胞自噬情形 (圖 9B)。

為了瞭解藥物處理所導致的細胞自噬現象是否為細胞死亡原因，以 0.5 mM 3-MA 減少細胞自噬的發生，同時加入 sorafenib 或合併 T-612 處理 48 小時後測定細胞活性，圖 9C 可知單獨處理 sorafenib 所造成的細胞活性下降，無法透過加入 3-MA 恢復，綜合酸性胞器產生、LC3-II 量沒有上升等結果推論以 sorafenib 處理細胞可能導致輕微細胞自噬，但並非細胞死亡原因；而合併 sorafenib 及 5 或 10 μ M T-612 的組別，加入 0.5 mM 3-MA 可以有效恢復細胞活性，活性分別上升了 19.3 % 及 13.9 %，皆具統計意義 ($p < 0.005$ 、 0.0005)，顯示合併 sorafenib 及 T-612 所造成的細胞死亡中，細胞自噬扮演重要的角色。

5. 討論

目前 sorafenib 臨床使用劑量為每日兩次各 400 mg，而臨床試驗中每日兩次各 200 mg 的組別，其人體血清濃度可達 4.64 μM [84]，已超過本實驗中 sorafenib 在合併 T-612 達 IC_{50} 時的濃度，顯示 sorafenib 合併 T-612 可達成以低劑量 sorafenib 治療、維持治療效果並降低副作用的構想，而 T-612 使用的 5 及 10 μM 為不影響 Huh-7 細胞活性濃度，之後的實驗也證實 5 及 10 μM 的 T-612 對細胞週期或程序性死亡等皆無影響，考慮未來應用性，人體血清中 T-612 濃度要達到實驗結果中的 IC_{50} —40 μM 較為困難，本實驗以低濃度 T-612 當成一佐劑來增強 sorafenib 的效果是合理的。

細胞週期的分析上我們看到以 sorafenib 或合併 T-612 處理後細胞有 G0/G1 時期停滯現象，數篇研究中可見以不同藥物處理肝癌細胞造成細胞停滯於 G0/G1 時期，而相關的 cyclin D、E 及 CDK 2、4 皆有降低[85-87]。

單獨處理 sorafenib 可看到 G0/G1 時期細胞比例上升 10%，cyclin D 蛋白質質量下降，文獻上細胞經 sorafenib 處理造成 G0/G1 時期停滯的現象，在許多癌症細胞如肝癌[52, 88]、血癌[89]、膽管癌[90]、髓母細胞癌[91]及神經母細胞瘤[92]等都可觀察到，且都有 cyclin D 蛋白質質量下降的情形，Tai 等人進一步指出以 10 μM sorafenib 處理 Huh-7 等不同肝癌細胞 24 小時，sorafenib 可透過 kinase-independent 的方式抑制 STAT 3 磷酸化，使 cyclin D 蛋白質質量下降[93]。而 sorafenib 合併 T-612 處理後，可見 G0/G1 時期細胞比例上升至 80%，顯示大部分細胞皆停止生長，T-612 也可加強抑制 cyclin D 蛋白質質量，由於 T-612 並不會影響 sorafenib 對 ERK 磷酸化的抑制，乃推論其加強 sorafenib 造成的細胞 G0/G1 時期停滯現象，可能透過加強上述 sorafenib 以 kinase-independent 方式抑制 STAT 3 磷酸化而得，實際調控機制有待進一步研究。由於 cyclin D 在細胞週期中的重要性，抑制其表現成為治療癌症的目標之一[94, 95]，除了新藥研發外[96, 97]，許多天然物如白藜蘆醇[98]、薑黃

素[99]也有報導指出其藉抑制 cyclin D 達抗癌功效，因此 T-612 增強 sorafenib 抑制 cyclin D 蛋白質質量，可視為其對抗肝癌細胞生長的手段之一。

另外單獨處理 sorafenib 能降低細胞 cyclin E 和 CDK2 的蛋白質質量，合併 T-612 處理後可顯著加強對兩者蛋白質質量的抑制。先前臨床顯示肝癌病人有 84 % CDK2 活性上升的情形[100]，Hanse 等人研究發現 CDK2 在肝細胞的生長上扮演重要角色，cdk2 基因剔除鼠或是以 CDK2 抑制劑處理的老鼠，其 cyclin D 表現下降，使肝細胞無法順利生長，因此作者認為目前研究熱烈的 cyclin D 標靶治療可以透過抑制 CDK2 來達成目標[101]，而針對 CDKs 的抑制劑也被視為抗癌藥物研發的重點，這些抑制劑通常可抑制多種 CDKs 以求增強治療效果[82, 102]，專一抑制 CDK2 的抑制劑反而對細胞 G0/G1 的停滯無太大作用[103]，顯示細胞週期的調控光是抑制或增強單一分子並不足以有效影響整體變化，像是本實驗的 sorafenib 合併 T-612 就至少抑制了細胞 cyclin D、E 及 CDK2 的蛋白質質量，順利地使細胞停滯於 G0/G1 時期。

Sorafenib 造成細胞氧化傷害的研究報導很少，目前只有 Chiou 等人的研究發現，以 20 μ M sorafenib 處理 HepG2 細胞 10 分鐘後即會造成粒線體活性氧化物的累積，雖然活性氧化物的累積現象在 3 小時後即會消失，但已會造成粒線體傷害，並引發內源性路徑細胞凋亡[104]，另 Park 等人的研究指出，vorinostat 和 3~6 μ M sorafenib 合併處理 15 分鐘會造成 Huh-7 細胞活性氧化物累積並且死亡，但無 sorafenib 單獨使用於 Huh-7 細胞的數據，只知其實驗中 3 μ M sorafenib 單獨處理 HepG2 細胞 15 分鐘並不會造成細胞活性氧化物的累積[105]，和 Chiou 等人的研究結果相比，也許是濃度太低以致於沒有觀察到活性氧化物累積。本次實驗觀察到 5 及 10 μ M sorafenib 在 16 及 24 小時皆造成細胞粒線體活性氧化物大量累積及粒線體傷害，合併 T-612 會增強上述結果，但不論合併使用與否皆沒有引發細胞凋亡，也許是細胞株不同而有不同機制，但對於 sorafenib 或合併 T-612 處理會造成細胞活性氧化物累積的結果是確定的。

以 sorafenib 處理肝癌細胞後，細胞中 Akt 的活化在各研究中有不同發現，Liu 等人指出，在 HepG2 及 PLC5 細胞中 sorafenib 對 Akt 的活化並無影響[52]，而 Gu 及 Chen 的研究中，HCCLM3 及 HepG2 細胞以 2 μ M sorafenib 處理 2 小時、PLC5 以 5 μ M sorafenib 處理 24 小時都可見 Akt 活化程度下降[106, 107]，但 Eggelpoel 等人卻在 Hep3B、PLC5 及 Huh-6 細胞中觀察到以 2 μ M sorafenib 處理 6 小時可使 Akt 活化，並認為是細胞適應藥物處理環境的結果[108]，另外 Fujimaki 等人發現對 sorafenib 有抗性的 HepG2 及 PLC5 細胞，以 5 μ M sorafenib 處理 2 小時會使 Akt 活化，加入 Akt 抑制劑能使細胞對 sorafenib 更敏感[109]，Chen 等人以 10 μ M sorafenib 處理 Huh-7 細胞 48 小時會促使 Akt 活化，其建立對 sorafenib 有抗性的 Huh-7 細胞中，Akt 活化程度更為明顯，並被認為是造成 sorafenib 抗性的原因[110]，本次實驗以 10 μ M sorafenib 處理 Huh-7 細胞後，在 4、16 及 24 小時都可見 Akt 活化程度上升數倍，參考上述文獻推論 Akt 活化應是細胞為了抵抗環境的生存機制。但本次實驗中 T-612 並沒有增強 sorafenib 對 ERK 活化的抑制，而對 Akt 的活化方面也沒有影響，顯示其並非藉調控這兩條訊息傳遞路徑達到加強抗癌的功效。

文獻指出以 sorafenib 處理 PLC5、HepG2 (5~15 μ M, 48 小時) 及 Huh-7 (5~15 μ M, 24 小時) 等肝癌細胞會造成細胞凋亡[52, 93]，但我們的 Huh-7 細胞以 10 μ M sorafenib 後，在細胞染色體斷裂分析、capase 的活化測定及凋亡相關分子 AIF 及 PARP 蛋白質質量上皆沒有觀察到細胞凋亡的情形，而合併 T-612 也沒有看到改變，由於實驗在短時間 (4 及 16 小時) 和長時間 (24 及 48 小時) 重複數次皆是相同的結果，且在 48 小時顯微鏡下已可清楚觀察到細胞變少並有死亡情形，所以可以確定本實驗以 sorafenib 或合併 T-612 處理造成細胞死亡並非透過細胞凋亡，與文獻結果不同的原因可能是細胞株的關係，由於癌細胞是不穩定的細胞，在長久的繼代培養過程中特性可能改變，導致使用同是使用 Huh-7 細胞卻得到不同死亡機制。

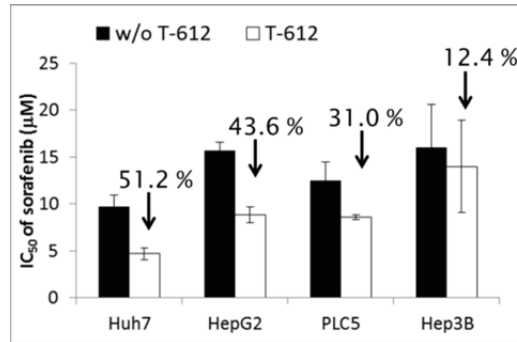
本次實驗中合併 sorafenib 及 T-612 後可使細胞產生明顯的細胞自噬而死亡，單獨處理 sorafenib 24 小時的組別雖有酸性胞器產生，卻沒有 LC3-II 蛋白質量的上升，顯示僅有輕微細胞自噬發生，在 Shimizu 及 Shi 等人的研究中，sorafenib 處理 HepG2 (20 μ M, 24 小時) 及 Huh-7 (10 μ M, 24 小時) 等肝癌細胞造成細胞自噬，抑制細胞自噬可增進細胞死亡，認為細胞自噬是細胞為了存活而採取的策略[111, 112]，另外在 Park 等人的研究中，以 3 μ M sorafenib 處理 HepG2 細胞 24 小時不會有細胞自噬現象，合併 vorinostat 會產生，細胞自噬的結果為幫助存活[113]，而 Bareford 等人的研究中，以 2 μ M sorafenib 處理 Huh-7 細胞 12 小時不會有細胞自噬現象，合併 pemetrexed 會產生，產生細胞自噬的結果是促進死亡[113, 114]，後兩篇研究中 sorafenib 使用的濃度較低或處理時間較短，可能因此沒有觀察到細胞自噬現象，本次實驗結果與 Bareford 等人的研究結果相似，10 μ M sorafenib 單獨處理 24 小時可造成輕微細胞自噬，合併 sorafenib 及 T-612 後可增強細胞自噬現象並造成細胞死亡。

3-MA 常用來抑制細胞自噬，但本次實驗發現，以 1 mM 3-MA 處理細胞 24 小時即會明顯造成細胞死亡，只能以 0.75 mM 處理，而分析細胞活性時，以 0.75 mM 3-MA 處理細胞 48 小時會使細胞活性降低 20 %，只能改以 0.5 mM 處理細胞，這樣的低濃度與 Shi 等人的研究中使用 10 mM 3-MA 處理肝癌細胞 24 小時[111]相比，可能因此使抑制細胞自噬無法完全而使細胞只恢復部分活性。

綜合以上結果，我們得到單獨處理 sorafenib 可抑制肝癌細胞生長，沒有細胞凋亡發生，另有輕微細胞自噬現象，但並非透過細胞自噬死亡；sorafenib 合併 T-612 可加強抑制細胞生長、並透過細胞自噬使細胞死亡，T-612 在本實驗扮演著增強 sorafenib 抗癌功效的角色，未來可望成為臨床上輔助 sorafenib 治療肝癌的佐劑以加強治療效果。

6.圖

(A)



(B)

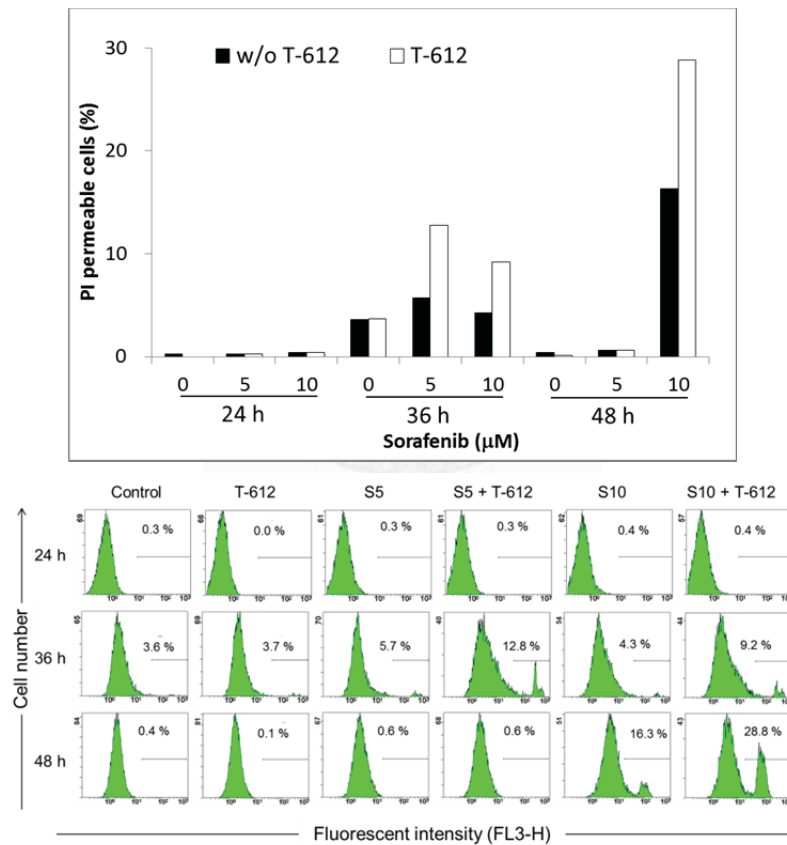
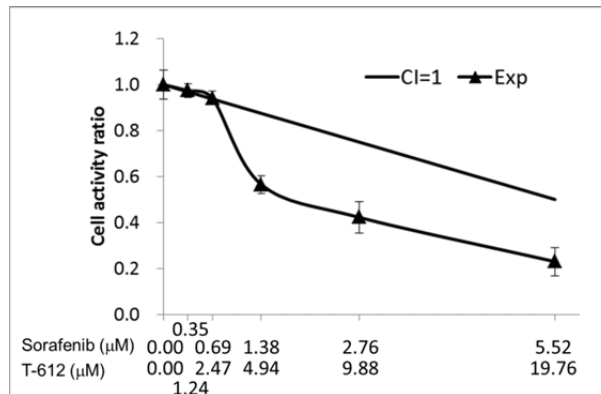


圖 1.T-612 顯著地促進 sorafenib 對肝癌細胞株的抗癌活性。

單獨使用 sorafenib 或合併 10 μ M T-612 處理(A)Huh-7、HepG2、PLC5 及 Hep3B 四株肝癌細胞株，以 ACP assay 測定細胞活性，圖為三重覆實驗下各細胞株的 IC₅₀，(B) Huh-7 細胞，於不同時間點以 PI 染劑染色，測定細胞死亡情形。

(A)



(B)

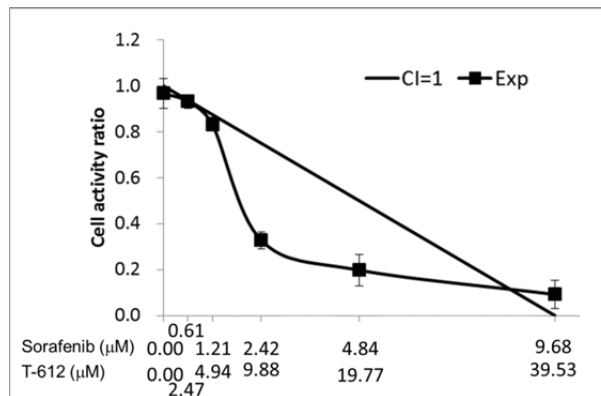
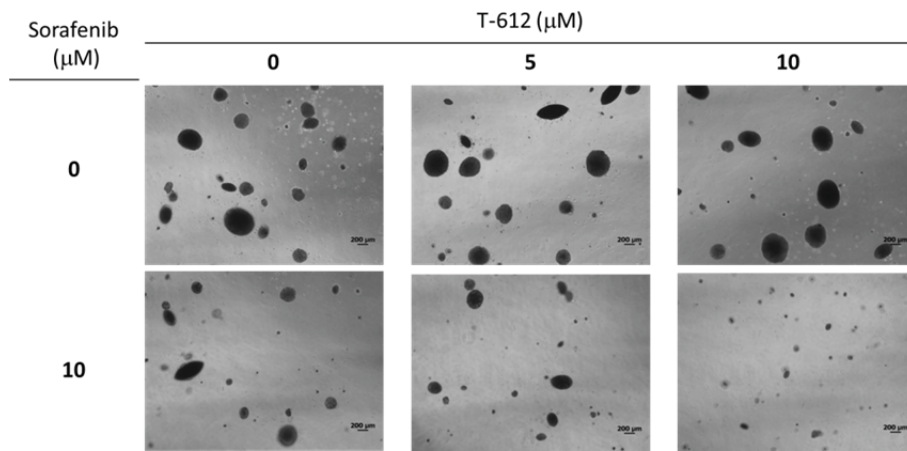


圖 2.T-612 合併 sorafenib 處理 Huh-7 細胞具協同效果。

以 sorafenib 或 T-612 處理 Huh-7 細胞 48 小時，用 ACP assay 測定細胞活性並計算其 IC_{25} 及 IC_{50} 後，(A)以兩者的 IC_{25} 濃度合併使用並做系列稀釋處理細胞，用 ACP assay 測定細胞活性，(B)以兩者的 IC_{50} 濃度合併使用並做系列稀釋處理細胞，用 ACP assay 測定細胞活性，CI=1 組別為兩者無協同作用下細胞活性比例理論值。

(A)



(B)

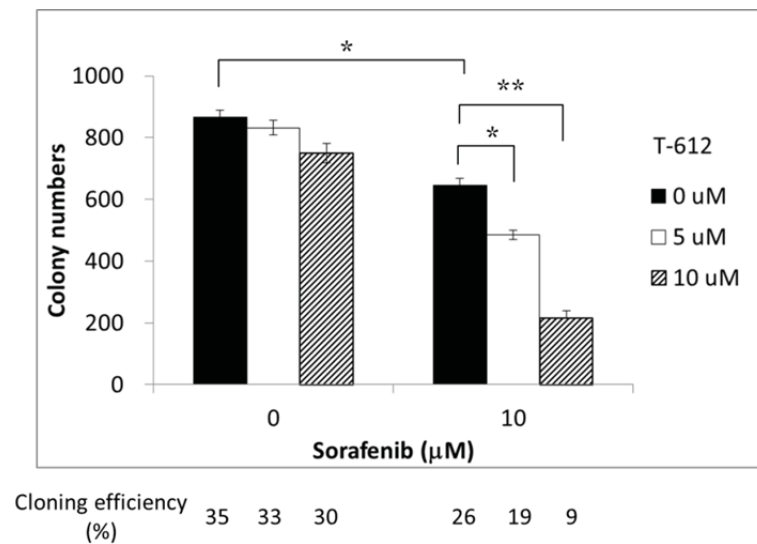
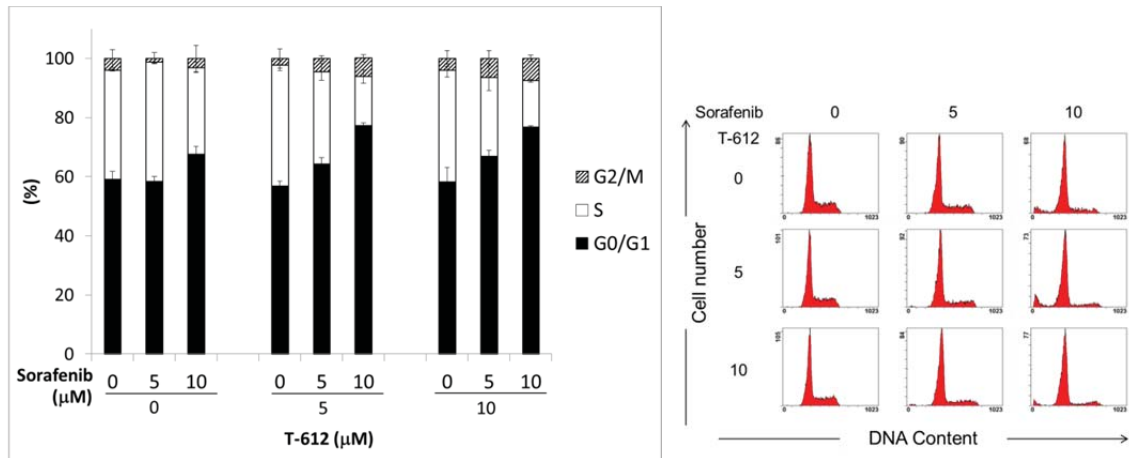


圖 3.T-612 顯著地促進 sorafenib 抑制 Huh-7 細胞之胞落形成能力。

(A)合併使用不同濃度 sorafenib 及 T-612 處理 Huh-7 細胞於低熔點洋菜膠中，14 天後於光學顯微鏡下照相。(B)計算 Huh-7 細胞直徑大於 100 μM 的胞落數目及胞落形成效率。三重覆實驗，*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.005$ 。

(A)



(B)

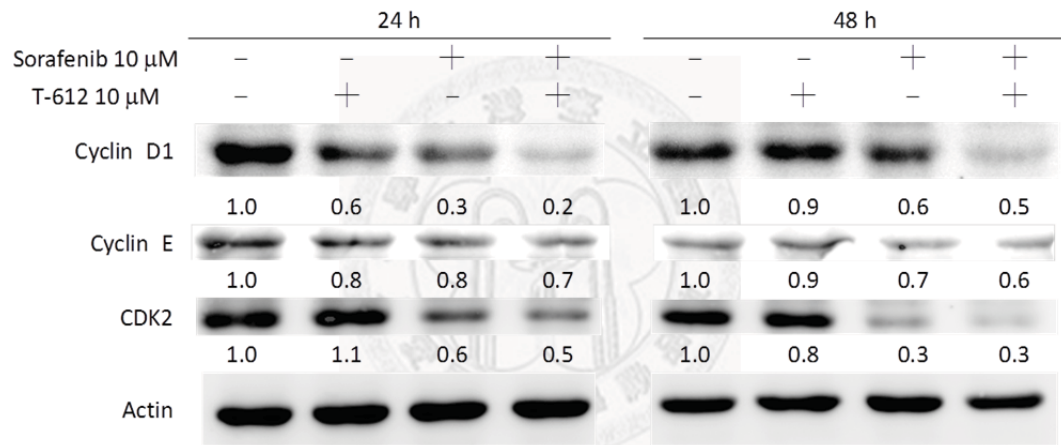
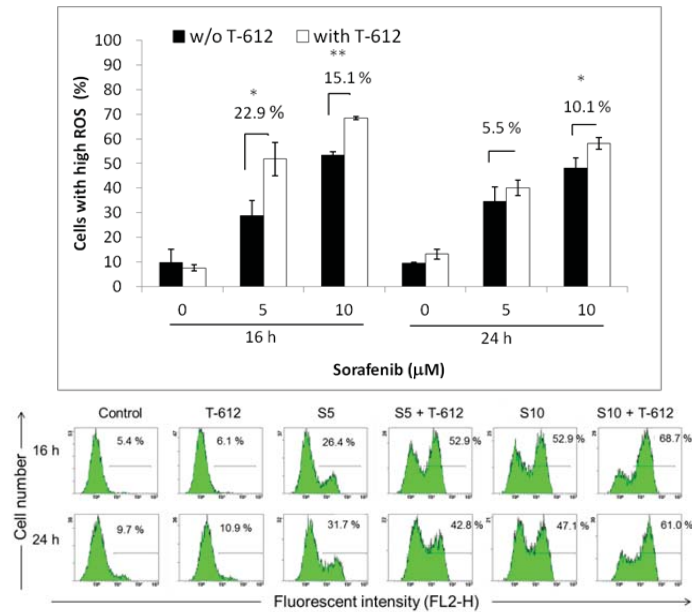


圖 4.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞 G0/G1 時期停滯。

(A)單獨使用 sorafenib 或合併 T-612 處理 Huh-7 細胞 48 小時，酒精固定後以 PI 染色，分析細胞週期變化。(B)單獨使用 sorafenib 或合併 T-612 處理 Huh-7 細胞 24 或 48 小時，以西方墨點法分析細胞週期相關分子蛋白質質量，actin 為 internal control。

(A)



(B)

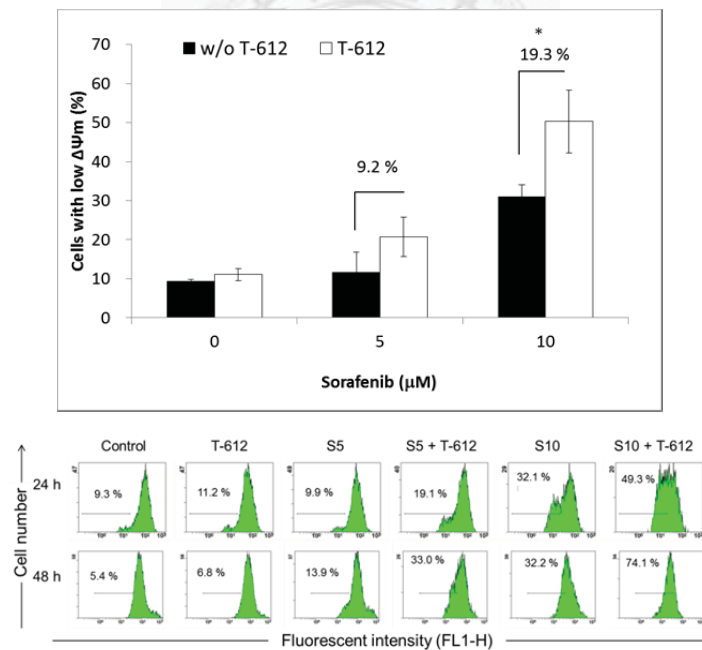
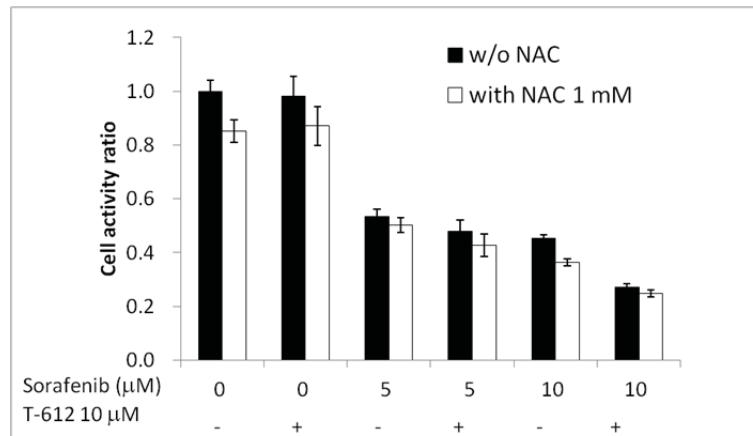


圖 5.T-612 促進 sorafenib 造成的細胞活性氧化物累積及粒線體受損。

單獨使用 sorafenib 或合併 10 μ M T-612 處理 Huh-7 細胞，於不同時間點以(A) MitoSOX 染色，測定細胞活性氧化物累積情形，圖為氧化物累積較高的細胞比例，(B) DiOC6(3)染色，測定細胞粒線體膜電位，圖為膜電位較低的細胞比例，三重覆實驗，*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.005$ 。

(A)



(B)

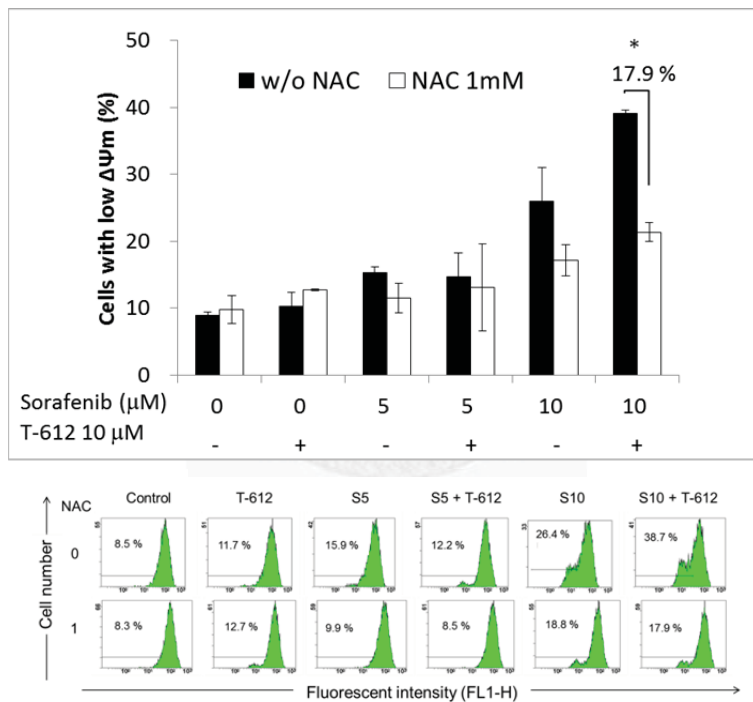
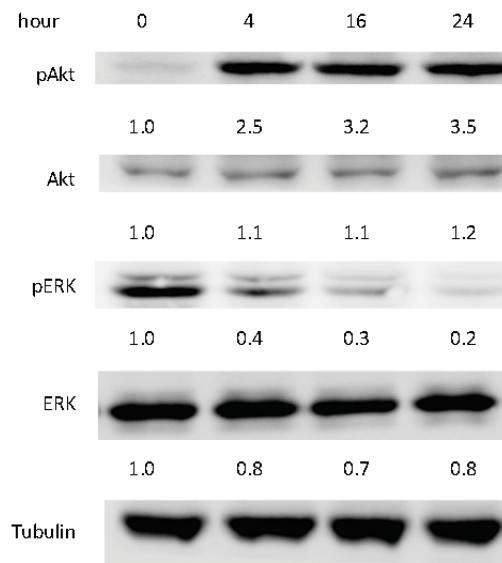


圖 6.移除活性氧化物無法改善 T-612 合併 sorafenib 造成的細胞活性下降，但可減緩粒線體受損情形。

先以 NAC 1mM 保護 3 小時後，以 sorafenib 或合併 10 μ M T-612 處理 Huh-7 細胞 (A) 48 小時，以 ACP assay 測定細胞活性，(B) 24 小時，以 DiOC6(3)染色，測定細胞粒線體膜電位，圖為膜電位較低的細胞比例，三重覆實驗，*， $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

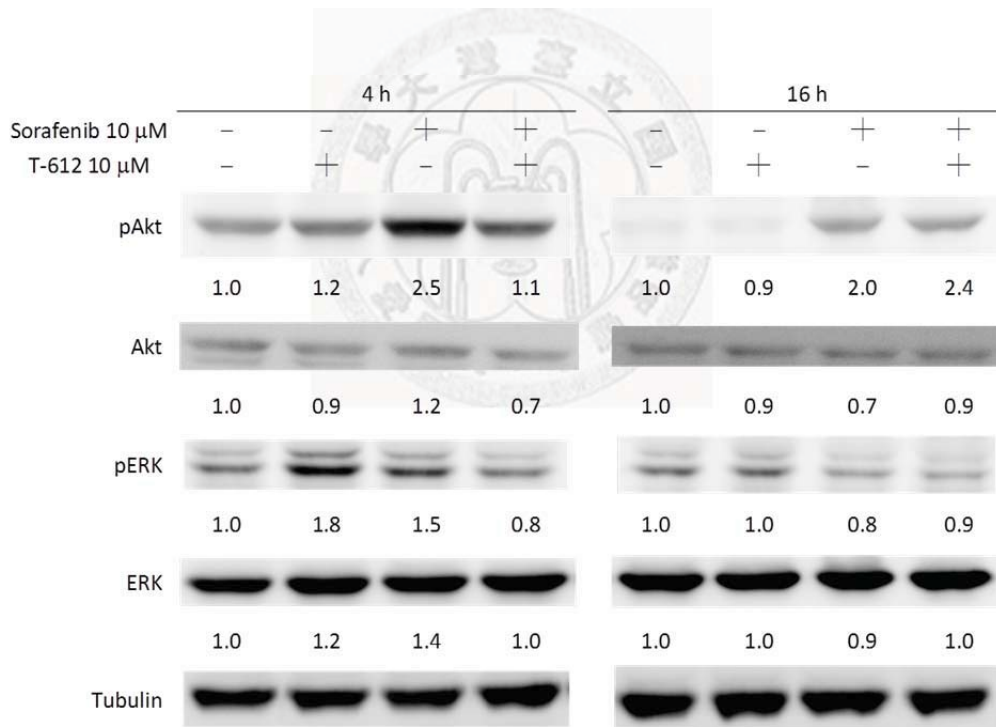
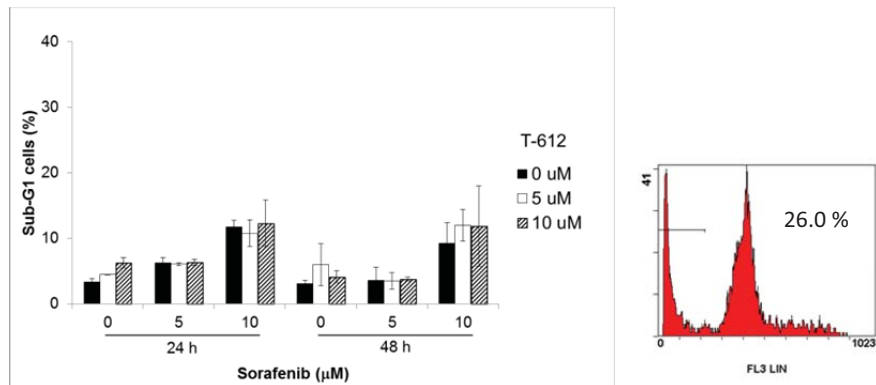


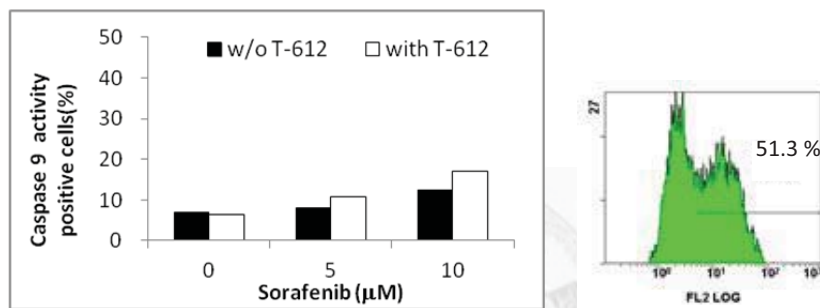
圖 7.合併使用 T-612 無法增強 sorafenib 造成之訊息傳遞抑制。

(A)以 sorafenib 處理 Huh-7 細胞，不同時間點 pAkt、Akt、pERK 及 ERK 的變化，以 tubulin 為 internal control。(B)單獨或合併使用 sorafenib 及 T-612 處理 Huh-7 細胞，於不同時間點觀察 pAkt、Akt、pERK 及 ERK 的變化，以 tubulin 為 internal control。

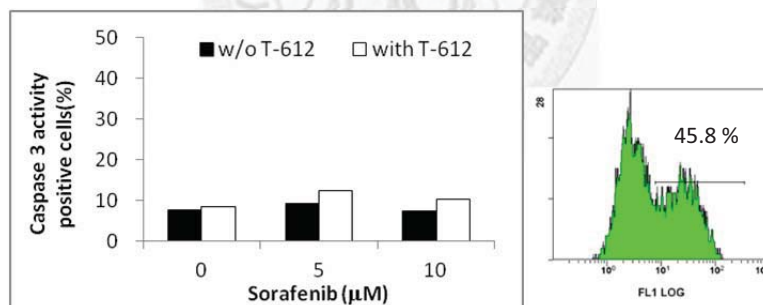
(A)



(B)



(C)



(D)

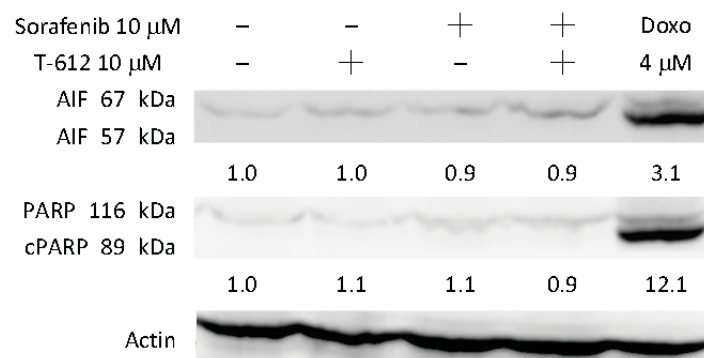
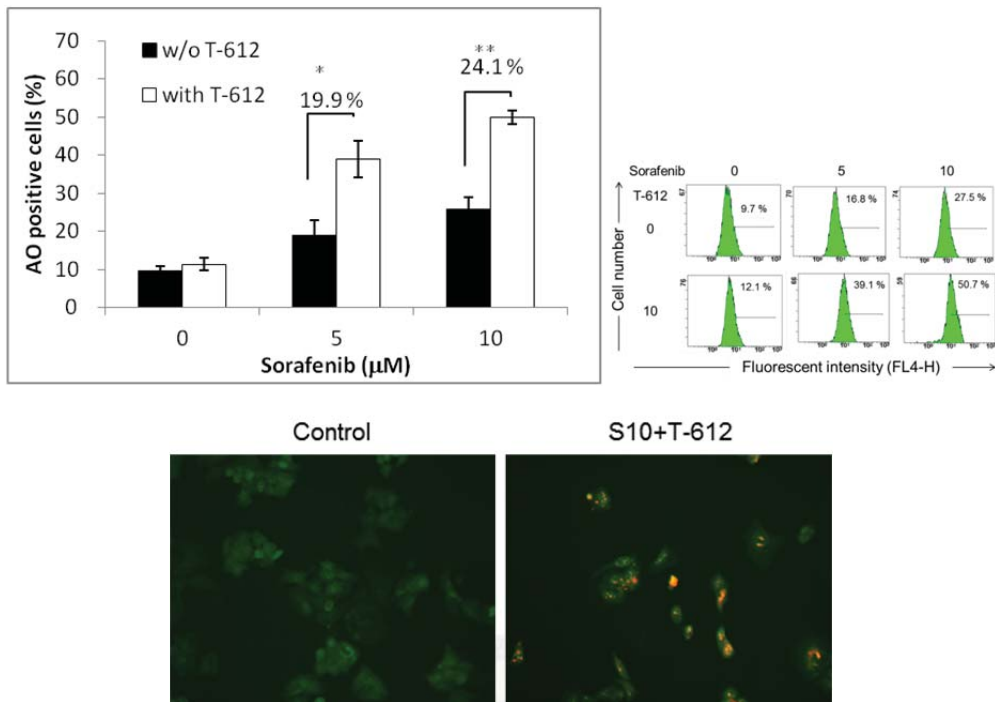


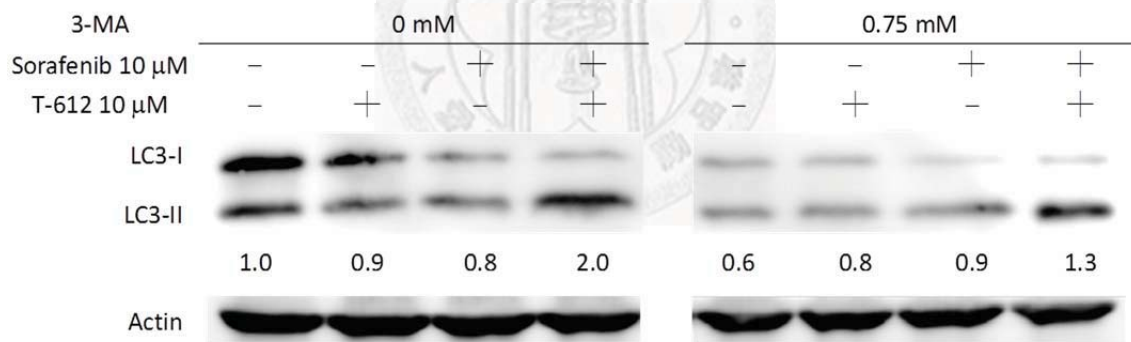
圖 8.Sorafenib 單獨處理或合併 T-612 皆不透過誘導細胞凋亡使細胞死亡。

單獨使用 sorafenib 或合併不同濃度 T-612 處理 Huh-7 細胞(A)48 小時，酒精固定後以 PI 染色，分析凋亡細胞比例，(B)36 小時，加入 caspase-9 受質，測定細胞內 caspase-9 活性，(C)36 小時，加入 caspase-3 受質，測定細胞內 caspase-3 活性，三圖右方為 positive control，1 mM H₂O₂ 處理 1 小時，(D) 24 小時，以西方墨點法分析 AIF 及 PARP，以 4μM doxorubicin 為 positive control，actin 為 internal control。

(A)



(B)



(C)

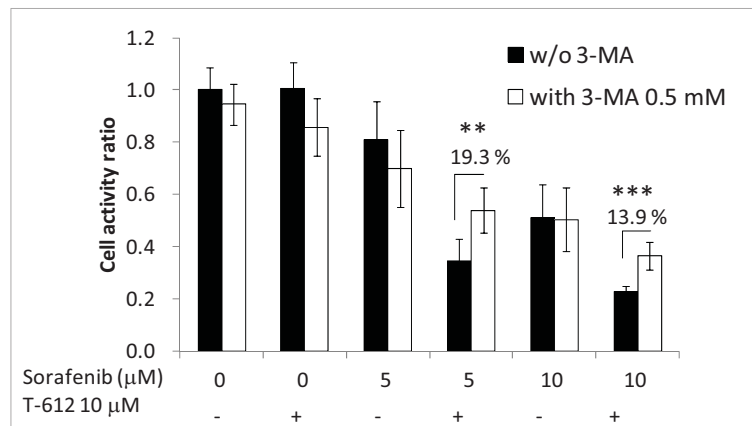
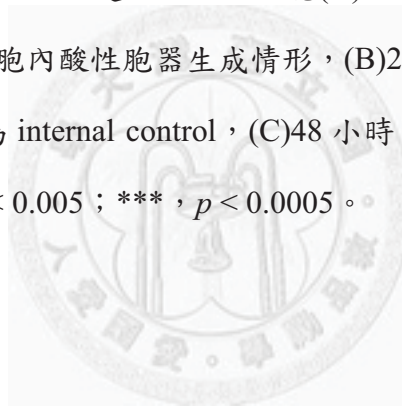


圖 9.T-612 增強 sorafenib 誘導之細胞自噬並使細胞死亡。

單獨使用 sorafenib 或合併 T-612 處理 Huh-7 細胞(A)24 小時，AO 染色，以流式細胞儀或螢光顯微鏡觀察細胞內酸性胞器生成情形，(B)24 小時，以西方墨點法分析 LC3 蛋白質量，以 actin 為 internal control，(C)48 小時，以 ACP assay 測定細胞活性，三重覆實驗，**， $p < 0.005$ ；***， $p < 0.0005$ 。



7. 參考文獻

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2011. **365**(12): p. 1118-27.
3. Parkin, D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. Int J Cancer, 2006. **118**(12): p. 3030-44.
4. Zanetti, A.R., P. Van Damme, and D. Shouval, *The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview*. Vaccine, 2008. **26**(49): p. 6266-73.
5. Chang, M.H., et al., *Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(19): p. 1348-55.
6. El-Serag, H.B., *Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA*. Hepatol Res, 2007. **37 Suppl 2**: p. S88-94.
7. Bosetti, C., et al., *Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 137-45.
8. Forner, A., et al., *Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(1): p. 61-74.
9. Kudo, M., *Current status of molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma: clinical practice*. Int J Clin Oncol, 2010. **15**(3): p. 242-55.
10. Pugh, R.N., et al., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices*. Br J Surg, 1973. **60**(8): p. 646-9.
11. Llovet, J.M., M. Schwartz, and V. Mazzaferro, *Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(2): p. 181-200.
12. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2003. **362**(9399): p. 1907-17.
13. Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1245-55.
14. Mazzaferro, V., et al., *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis*. N Engl J Med, 1996. **334**(11): p. 693-9.
15. Yao, F.Y., et al., *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival*. Hepatology, 2001. **33**(6): p. 1394-403.
16. Lin, S.M., et al., *Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or =4 cm*. Gastroenterology, 2004. **127**(6): p. 1714-23.
17. Shiina, S., et al., *A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 122-30.
18. Chen, M.S., et al., *A prospective randomized trial comparing percutaneous local ablative therapy and partial hepatectomy for small hepatocellular carcinoma*. Ann Surg, 2006. **243**(3): p. 321-8.
19. Livraghi, T., et al., *Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice?* Hepatology, 2008. **47**(1): p. 82-9.
20. Bruix, J., M. Sala, and J.M. Llovet, *Chemoembolization for hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S179-88.
21. Giuliani, F. and G. Colucci, *Treatment of hepatocellular carcinoma*. Oncology, 2009. **77 Suppl 1**: p. 43-9.
22. Ueshima, K., et al., *Hepatic arterial infusion chemotherapy using low-dose 5-fluorouracil and cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma*. Oncology, 2010. **78 Suppl 1**: p. 148-53.
23. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
24. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
25. Sia, D. and A. Villanueva, *Signaling pathways in hepatocellular carcinoma*. Oncology, 2011. **81 Suppl 1**: p. 18-23.
26. Whittaker, S., R. Marais, and A.X. Zhu, *The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2010. **29**(36): p. 4989-5005.

27. Yoshiji, H., et al., *Vascular endothelial growth factor tightly regulates in vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells*. Hepatology, 1998. **28**(6): p. 1489-96.
28. Moon, W.S., et al., *Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma?* Mod Pathol, 2003. **16**(6): p. 552-7.
29. Yamaguchi, R., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1998. **28**(1): p. 68-77.
30. Poon, R.T., et al., *High serum levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a prospective study*. Oncol Rep, 2004. **11**(5): p. 1077-84.
31. Chao, Y., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin in patients with resectable hepatocellular carcinoma after surgery*. Ann Surg Oncol, 2003. **10**(4): p. 355-62.
32. Siegel, A.B., et al., *Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma*. J Clin Oncol, 2008. **26**(18): p. 2992-8.
33. Liu, Y., et al., *Both antiangiogenesis- and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3691-9.
34. Wedge, S.R., et al., *AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4389-400.
35. Buckley, A.F., et al., *Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma*. Am J Clin Pathol, 2008. **129**(2): p. 245-51.
36. Altamari, A., et al., *Investigation of ErbB1 and ErbB2 expression for therapeutic targeting in primary liver tumours*. Dig Liver Dis, 2003. **35**(5): p. 332-8.
37. Schiffer, E., et al., *Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis*. Hepatology, 2005. **41**(2): p. 307-14.
38. Philip, P.A., et al., *Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(27): p. 6657-63.
39. Ramanathan, R.K., et al., *A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2009. **64**(4): p. 777-83.
40. O'Dwyer PJ, G.B., Levy DE, Kauh JS, Fitzgerald DB, Benson III AB. , *Gefitinib in advanced unresectable hepatocellular carcinoma: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group's Study E1203*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**: p. (Suppl): 213s.
41. Zhu, A.X., et al., *Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2007. **110**(3): p. 581-9.
42. Gruenewald V, W.V., Gebel M, Greten TF, Kubicka S, Ganser A, et al., *A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma: final results*. . J Clin Oncol 2007. **25**: p. (Suppl): 222s.
43. Zhu, A.X., et al., *Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study*. J Clin Oncol, 2009. **27**(18): p. 3027-35.
44. Faivre, S., et al., *Safety and efficacy of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: an open-label, multicentre, phase II study*. Lancet Oncol, 2009. **10**(8): p. 794-800.
45. Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix, *Sunitinib and the benefits of a negative study*. Lancet Oncol, 2009. **10**(8): p. 743-4.
46. Kudo, M., *Signaling pathway and molecular-targeted therapy for hepatocellular carcinoma*. Dig Dis, 2011. **29**(3): p. 289-302.
47. Park, J.W., et al., *Phase II, open-label study of brivanib as first-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(7): p. 1973-83.
48. Hwang, Y.H., et al., *Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2004. **29**(2): p. 113-121.
49. Lee, H.C., et al., *Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells*. Gastroenterology, 2006. **131**(4): p. 1208-17.

50. Lowinger, T.B., et al., *Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(25): p. 2269-78.
51. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
52. Liu, L., et al., *Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11851-8.
53. Huynh, H., et al., *Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8B): p. 2673-83.
54. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2008. **359**(4): p. 378-90.
55. Kudo, M., et al., *Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma*. Eur J Cancer, 2011. **47**(14): p. 2117-27.
56. Awada, A., et al., *Phase I safety and pharmacokinetics of BAY 43-9006 administered for 21 days on/7 days off in patients with advanced, refractory solid tumours*. Br J Cancer, 2005. **92**(10): p. 1855-61.
57. Abou-Alfa, G.K., et al., *Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(26): p. 4293-300.
58. Wolber, C., et al., *Perforating folliculitis, angioedema, hand-foot syndrome--multiple cutaneous side effects in a patient treated with sorafenib*. J Dtsch Dermatol Ges, 2009. **7**(5): p. 449-52.
59. Iijima, M., et al., *Sorafenib-associated hand-foot syndrome in Japanese patients*. J Dermatol, 2011. **38**(3): p. 261-6.
60. Williams, V.L., P.R. Cohen, and D.J. Stewart, *Sorafenib-induced premalignant and malignant skin lesions*. Int J Dermatol, 2011. **50**(4): p. 396-402.
61. Arnault, J.P., et al., *Keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in patients receiving sorafenib*. J Clin Oncol, 2009. **27**(23): p. e59-61.
62. Takimoto, C.H. and A. Awada, *Safety and anti-tumor activity of sorafenib (Nexavar) in combination with other anti-cancer agents: a review of clinical trials*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **61**(4): p. 535-48.
63. Abou-Alfa, G.K., et al., *Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial*. JAMA, 2010. **304**(19): p. 2154-60.
64. Prete, S.D., et al., *Sorafenib plus octreotide is an effective and safe treatment in advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II So.LAR. study*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010. **66**(5): p. 837-44.
65. Hsu, C.H., et al., *Phase II study of combining sorafenib with metronomic tegafur/uracil for advanced hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2010. **53**(1): p. 126-31.
66. Zhou, X.W., K.Q. Su, and Y.M. Zhang, *Applied modern biotechnology for cultivation of Ganoderma and development of their products*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **93**(3): p. 941-63.
67. J.J. Gao, A.H., B.S. Min, N. Nakamura and M. Hattori, *In vivo antitumor effects of bitter principles from the antlered form of fruiting bodies of Ganoderma lucidum*. J Nat Med, 2006. **60**: p. 42-48.
68. Paterson, R.R., *Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory*. Phytochemistry, 2006. **67**(18): p. 1985-2001.
69. Shi, L., et al., *Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **88**(6): p. 1243-51.
70. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Apoptosis, autophagy, and more*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2405-19.
71. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 741-52.
72. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
73. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
74. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *Apoptosis: mechanisms and relevance in*

- cancer*. Ann Hematol, 2005. **84**(10): p. 627-39.
75. Otera, H., et al., *Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space*. EMBO J, 2005. **24**(7): p. 1375-86.
 76. Soldani, C. and A.I. Scovassi, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update*. Apoptosis, 2002. **7**(4): p. 321-8.
 77. Ferraro, E. and F. Cecconi, *Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 210-9.
 78. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
 79. Zhao, L., M.G. Wientjes, and J.L. Au, *Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(23): p. 7994-8004.
 80. Cifone, M.A., *In vitro growth characteristics associated with benign and metastatic variants of tumor cells*. Cancer Metastasis Rev, 1982. **1**(4): p. 335-47.
 81. Shoemaker, R.H., et al., *Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening*. Cancer Res, 1985. **45**(5): p. 2145-53.
 82. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
 83. Seglen, P.O. and P.B. Gordon, *3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1889-92.
 84. Strumberg, D., et al., *Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 965-72.
 85. Varghese, L., et al., *Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(23): p. 8441-8.
 86. Relja, B., et al., *Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells*. Int J Mol Med, 2010. **26**(5): p. 735-41.
 87. Wang, J., et al., *MDM2 antagonist can inhibit tumor growth in hepatocellular carcinoma with different types of p53 in vitro*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(2): p. 371-7.
 88. Fernando, J., et al., *Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli*. J Cell Physiol, 2012. **227**(4): p. 1319-25.
 89. Auclair, D., et al., *Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells*. Leukemia, 2007. **21**(3): p. 439-45.
 90. Huether, A., et al., *Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(9): p. 1308-17.
 91. Yang, F., et al., *Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription 3 signaling associated with growth arrest and apoptosis of medulloblastomas*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(11): p. 3519-26.
 92. Kakodkar, N.C., et al., *Sorafenib inhibits neuroblastoma cell proliferation and signaling, blocks angiogenesis, and impairs tumor growth*. Pediatr Blood Cancer, 2011.
 93. Tai, W.T., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 1041-8.
 94. Alao, J.P., *The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 24.
 95. Musgrove, E.A., et al., *Cyclin D as a therapeutic target in cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(8): p. 558-72.
 96. Yu, Q., Y. Geng, and P. Sicinski, *Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation*. Nature, 2001. **411**(6841): p. 1017-21.
 97. Huang, J.W., et al., *Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents*. J Med Chem, 2006. **49**(15): p. 4684-9.
 98. Joe, A.K., et al., *Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 893-903.

99. Mukhopadhyay, A., et al., *Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation*. *Oncogene*, 2002. **21**(57): p. 8852-61.
100. Li, K.K., et al., *Activation of cyclin-dependent kinases CDC2 and CDK2 in hepatocellular carcinoma*. *Liver*, 2002. **22**(3): p. 259-68.
101. Hanse, E.A., et al., *Cdk2 plays a critical role in hepatocyte cell cycle progression and survival in the setting of cyclin D1 expression in vivo*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(17): p. 2802-9.
102. Lapenna, S. and A. Giordano, *Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(7): p. 547-66.
103. Shapiro, G.I., *Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(11): p. 1770-83.
104. Chiou, J.F., et al., *Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(20): p. 1904-13.
105. Park, M.A., et al., *Vorinostat and sorafenib increase CD95 activation in gastrointestinal tumor cells through a Ca(2+)-de novo ceramide-PP2A-reactive oxygen species-dependent signaling pathway*. *Cancer Res*, 2010. **70**(15): p. 6313-24.
106. Chen, K.F., et al., *Synergistic interactions between sorafenib and bortezomib in hepatocellular carcinoma involve PP2A-dependent Akt inactivation*. *J Hepatol*, 2010. **52**(1): p. 88-95.
107. Gu, F.M., et al., *Sorafenib inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by blocking STAT3*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(34): p. 3922-32.
108. Blivet-Van Eggelpeel, M.J., et al., *Epidermal growth factor receptor and HER-3 restrict cell response to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells*. *J Hepatol*, 2012.
109. Fujimaki, S., et al., *Blockade of ataxia telangiectasia mutated sensitizes hepatoma cell lines to sorafenib by interfering with Akt signaling*. *Cancer Lett*, 2012. **319**(1): p. 98-108.
110. Chen, K.F., et al., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **337**(1): p. 155-61.
111. Shi, Y.H., et al., *Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis*. *Autophagy*, 2011. **7**(10): p. 1159-72.
112. Shimizu, S., et al., *Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(3): p. 548-57.
113. Park, M.A., et al., *Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(10): p. 1648-62.
114. Bareford, M.D., et al., *Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy-dependent mechanism in cancer cells*. *Cancer Res*, 2011. **71**(14): p. 4955-67.

8.附錄

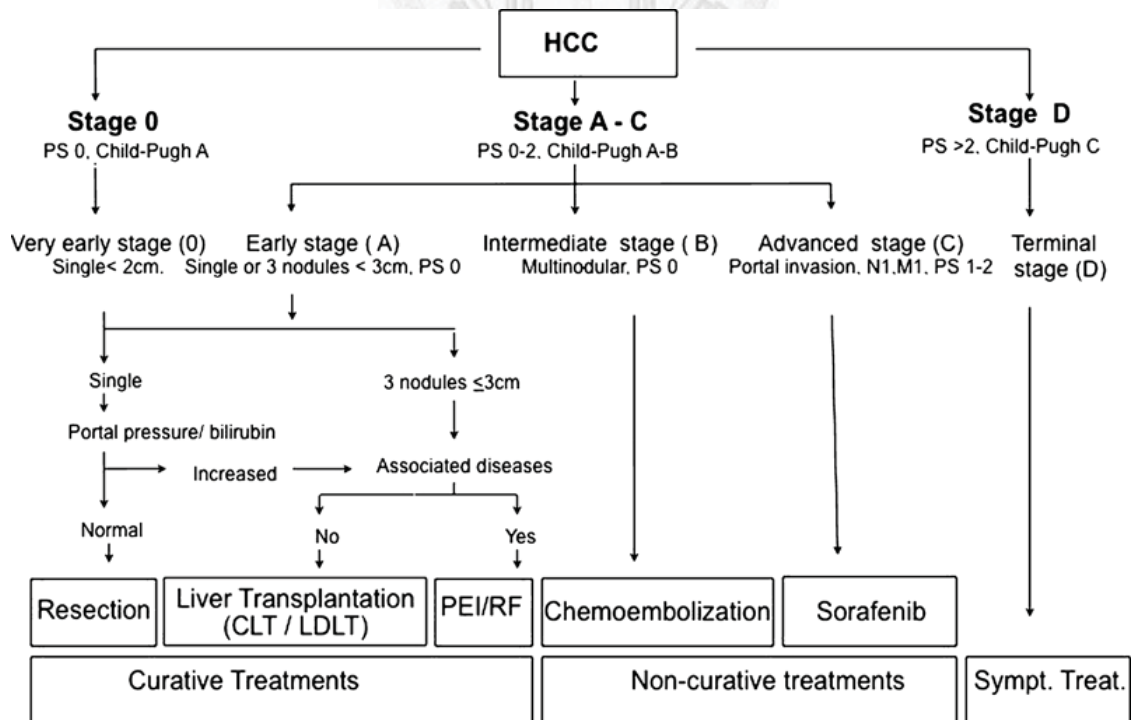
附錄 1.肝癌分期系統

(A)腫瘤分期標準第七版

Primary Tumor (T)		Distant Metastasis (M)	
TX	Primary tumor cannot be assessed	M0	No distant metastasis
T0	No evidence of primary tumor	M1	Distant metastasis
T1	Solitary tumor without vascular invasion	ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS	
T2	Solitary tumor with vascular invasion or multiple tumors none more than 5 cm		
T3a	Multiple tumors more than 5 cm		
T3b	Single tumor or multiple tumors of any size involving a major branch of the portal vein or hepatic vein		
T4	Tumor(s) with direct invasion of adjacent organs other than the gallbladder or with perforation of visceral peritoneum		
Regional Lymph Nodes (N)		Stage I	T1 N0 M0
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed	Stage II	T2 N0 M0
N0	No regional lymph node metastasis	Stage IIIA	T3a N0 M0
N1	Regional lymph node metastasis	Stage IIIB	T3b N0 M0
		Stage IIIC	T4 N0 M0
		Stage IVA	Any T N1 M0
		Stage IVB	Any T Any N M1

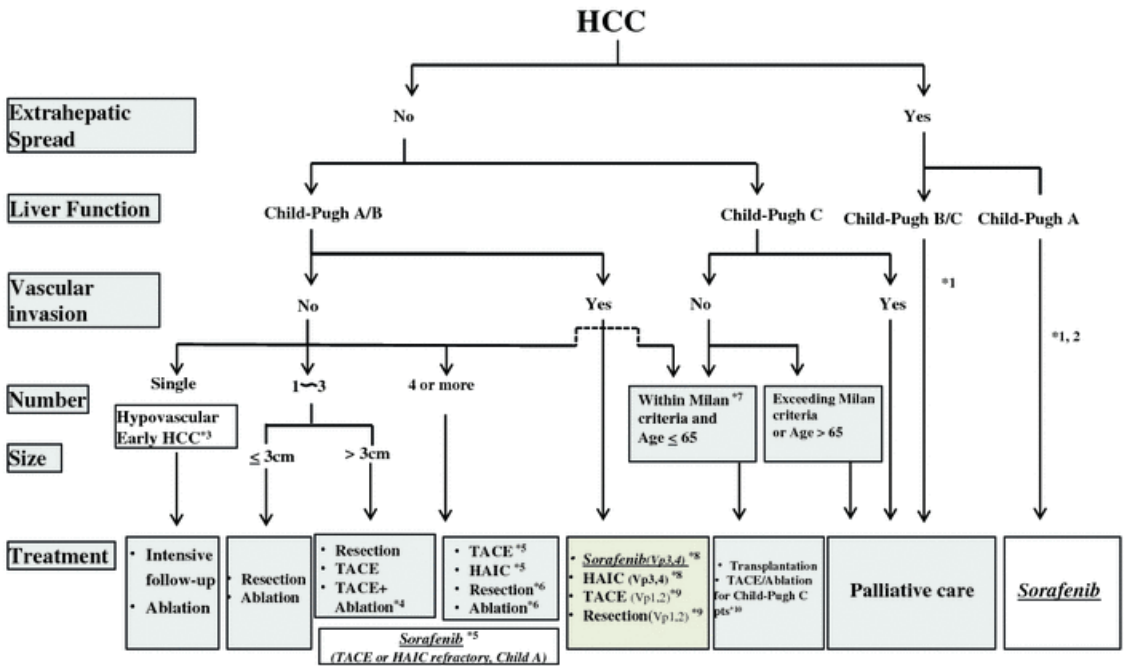
Cancer Staging Manual , AJCC , Seventh Edition , p194

(B)巴塞隆納肝癌分期與治療準則



Semin Liver Dis. 2010 Feb;30(1):61-74.

(C)日本肝病醫學會肝癌治療準則



Int J Clin Oncol, 2010. 15(3): p. 242-55.

(D)Child-Pugh 分期系統

Supplemental Table 1. Child-Pugh-Turcotte Score

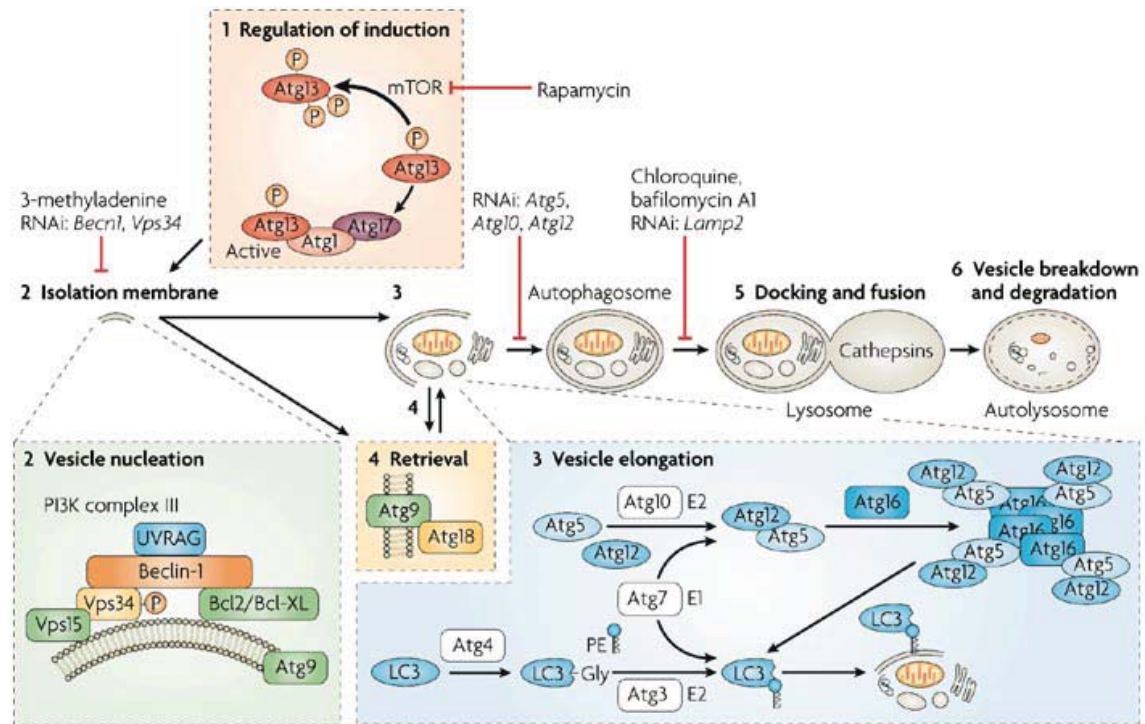
Measure	1 point	2 points	3 points	units
Bilirubin (total)	<2	2-3	>3	mg/dL
Serum albumin	>35	28-35	<28	mg/L
INR	<1.7	1.71-2.20	> 2.20	no unit
Ascites	None	Suppressed with medication	Refractory	no unit
Hepatic encephalopathy	None	Grade I-II (or suppressed with medication)	Grade III-IV (or refractory)	no unit

Interpretation

The score employs five clinical measures of liver disease. Each measure is scored 1-3, with 3 indicating most severe derangement. Chronic liver disease is classified into Child-Pugh Turcotte class A (5-6), B (7-9), and C (10-15), employing the added score from above.

N Engl J Med, 2011. 365(12): p. 1118-27.

附錄 2.細胞自噬過程與其抑制劑



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):741-52.

9. 藥品材料清單

9.1. 藥品與試劑

3-methyladenine (3-MA) (Sigma)

3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)) (Molecular probes)

acridine orange (AO) (Sigma)

agarose I (Amresco)

antibiotics (Biological industries)

bovine serum albumin (BSA) (Amresco)

PhiPhiLux[®]-G₁D₂ (OncoImmunin Inc)

CaspaLux[®]9-L₂D₂ (OncoImmunin Inc)

dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen)

DL-dithiothreitol (DTT) (Amresco)

ethanol (Riedel-de Haën)

fetal bovine serum (FBS) (Biological Industries)

glycerol (wako)

Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore)

L-glutamine (Biological Industries)

low melting point agarose (Sigma-Aldrich)

MitoSOX[™] RED (Molecular probes)

N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma)

non-essential amino acid (Biological Industries)

phosphate-buffered saline solution 10X (PBS) (Amresco)

p-nitrophenyl phosphate (PNPP) (Sigma)

propidium Iodide (PI) (Sigma)

RNase A (Macherey-Nagel)

sodium acetate (wako)
sodium chloride (Sigma-Aldrich)
sodium hydroxide (Sigma-Aldrich)
sorafenib (LC Laboratories)
tris (Amresco)
triton X-100 (Amerdham)
trypsin-EDTA (Biological Industries)
tween 20 (Sigma)

9.2.抗體

actin (Chemicon , MAB1501)
apoptosis inducing factor (AIF) (Santa Cruz , sc-55519)
 α -Tubulin (Cell Signaling , 2144)
Akt (Cell Signaling , 9272)
Bax (Santa Cruz , sc-526)
Bcl2 (Santa Cruz , sc-7382)
CDK2 (Santa Cruz , sc-6248)
cyclin E (BioLegend , B146016)
cyclin D1 (Santa Cruz , sc-20044)
ERK (Santa Cruz , sc-154)
LC3 (Cell Signaling , 2775s)
pAkt (Cell Signaling , 4060s)
PARP (Cell Signaling , 9542)
pERK (Cell Signaling , 9106s)
anti-mouse IgG-HRP (Cell Signaling , 7076s)
anti-rabbit IgG-HRP (Cell Signaling , 7074s)