

國立臺灣大學牙醫專業學院口腔生物科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology

School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis

Chk2 於檳榔成分誘發細胞毒性過程中所扮演之角色

The Role of Chk2 in Areca Nuts-Induced Cytotoxicity

王維霆

Wei-Ting Wang

指導教授：鄭景暉 博士、郭彥彬 博士、張美姬 博士

Advisor: Jiiang-Huei Jeng, Ph.D.

Mark Yen-Ping Kuo, Ph.D.

Mei-Chi Chang, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

謝誌

現在時間：民國九十八年七月二十八日，論文正式送印的當天中午，兩年的研究所生涯也即將畫上句點。回首當日考上台大時的激動，對比今日準備辦理離校手續時收成的喜悅，一切都得感謝兩年來始終陪伴在我身邊的各位對我的種種提攜與幫助。

首先感謝鄭景暉醫師與張美姬老師，非常榮幸有機會加入老師的研究團隊，謝謝您們常常給我指導與鼓勵，不僅僅是碩士論文的完成，更重要的是我從您們身上學會了對於科學追根究底的研究精神與獨立思考的啟發，更感謝您們在研究的過程中給予我極大的自由與包容，日常生活上無微不至的關心也讓初來乍到台北這個完全陌生城市的我，心理上不再寂寞、不再惶恐。也感謝口試委員們：郭彥彬醫師以及李勝揚醫師的寶貴意見，讓我的論文能夠更加完整。

接著要感謝 347 實驗室的各個成員們，在我滿布荊棘的實驗路途上，所給予我的種種幫助，鄭姊總是像菩薩心腸的好媽媽一樣叮嚀我好多事；剛進實驗室時有好脾氣的桂文指導我做 western blot，並帶著我熟悉醫院附近的環境；面惡心

善的軍智開設的 PCR 和 IF 教室；刀子嘴豆腐心的

暄暄

總是一邊抱怨

我很煩人一邊幫我預約 flow 時間，還帶著我大老遠走到新院共研上機；師父秉田則總是在我無助地漂浮在挫折的苦海中時，即時丟下一把救命的稻草。

也謝謝我碩士班中可愛的同學們，有吳怡霈眼睛的無敵大麥克希文，在碩士生涯晚期突然變成正妹的公主病大屁股凱文，走路撞到冰箱的大胃王笨蛋吳番人、誇下海口要前進哈佛的臭屁謝史丹，還有我一直搞不懂他們在做甚麼鬼發育的斑馬魚雙人祖：超愛大腳桶文裕和房間在板橋宣貿，衷心感謝各位一路走來的陪伴，讓我這兩年來的日子充滿歡笑不孤單，有你們在我身旁，我感到非常幸福。

最後得感謝我親愛的家人，扛著肩膀上的重擔辛苦栽培我念完研究所，接下來的日子，我會盡我所能讓你們感到驕傲。謹以本文獻上我誠摯的感謝，因為有你們的愛才讓我擁有今天的成果。



中文摘要

嚼食檳榔是一項普遍風行於亞洲、非洲、歐洲部分地區各個社會階層的流行嗜好，尤其是泰國、馬來西亞、印尼、印度、中國、台灣等地區，根據統計，全世界有嚼食檳榔習慣的人口達到六億人之譜。嚼食檳榔也被證明是多種口腔粘膜病變：口腔白斑、口腔黏膜下纖維化甚至口腔癌的主要致病因子之一，國際癌症研究中心也發表專論指出，檳榔子本身即為一級致癌物，許多研究指出檳榔萃取物的確存在著具細胞與基因毒性物質，能夠造成 DNA 斷裂、DNA 與蛋白質交互連結、非正常程序的 DNA 合成、細胞週期改變等異常現象。目前已經有研究指出，當細胞發生 DNA 傷害時，會有 ATM/ATR-Chk1/Chk2 路徑的活化，使細胞週期停滯，並活化其他參與 DNA 修補蛋白的表現。但由於檳榔成分過於複雜，對於檳榔成分究竟是如何造成各種細胞變異甚至口腔疾病的詳細致病機轉目前並不清楚，因此本篇研究的主要目的即是針對細胞內兩種細胞週期檢查點 Chk1/Chk2 在檳榔成分所造成的基因與細胞毒性中所扮演的角色進行探討。在 dose dependent 的實驗中發現，隨著檳榔子萃取物與檳榔素濃度的提高，SAS 舌癌細胞不只外型出現了明顯變圓，較不貼附於培養皿的現象，細胞內也出現大量空泡。在細胞的存活性實驗也發現，隨著檳榔子萃取物與檳榔素濃度提高，分別在 800 $\mu\text{g/ml}$ 與 0.8 mM 濃度時，SAS 細胞存活率會有明顯下降的情況。利用流式細胞儀進行細胞週期分析也發現隨著檳榔子萃取物濃度提高，SAS 細胞會有 G₂/M phase arrest 的現象。進一步使用 RT-PCR 與西方點墨法研究檳榔子萃取物與檳榔素是否能有效活化各個與細胞週期調控以及細胞凋亡有關之指標分子表現，發現檳榔子萃取物與檳榔素能夠活化細胞內 Chk2 訊息傳遞路徑表現，藉由 Chk2 的磷酸化，進一步促進下游分子如 p-Cdc25C、p-Cdc2 表現，而 Chk2 的活化同時也影響了與細胞週期有關的 cyclin B1、cyclin D 表現，檳榔子萃取物與檳榔素也能調控和細胞凋亡有關的 p-p53、Bcl-2、Bax 在細胞內的表現。而 ATM/ATR 抑制劑咖啡因與 Chk2 抑制劑的

使用則更進一步的釐清了 Chk2 訊息傳遞路徑中各分子的上下游關係，令人意外的是，使用 Chk2 抑制劑降低 Chk2 表現後，SAS 細胞的 G₂/M phase arrest 現象消失了，取而代之的是細胞大量堆積在 G₁ 時期。總結來說，我們提供了檳榔子萃取物與檳榔素對於細胞變異的可能分子機制，檳榔子萃取物與檳榔素能夠活化 SAS 細胞 Chk2 訊息傳遞路徑，證實了 Chk2 的表現在檳榔成分引起的細胞變異中的確扮演著舉足輕重的角色，而在未來臨床應用上，Chk2 也許可以做為檳榔引起的口腔疾病治療中一個新的標的。

關鍵字：檳榔子萃取物、檳榔素、Chk2、細胞毒性、細胞週期

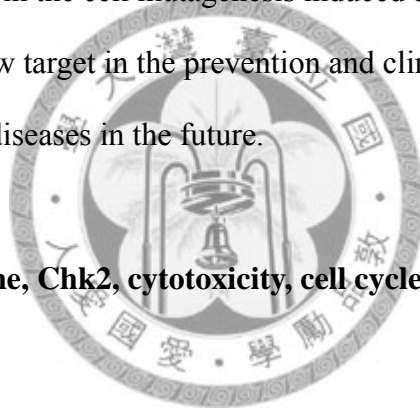


Abstract

Betel quid (BQ) chewing is a very common habit in Asia, Africa, and a portion of Europe. It enjoys complete social acceptance in many societies especially in Thailand, Malaysia, Indonesia, India, China and Taiwan. It has been estimated that there are about 6 million BQ-chewers living in different regions of the world. BQ chewing is demonstrated to be one of the major risk factors leading to leukoplakia, oral submucous fibrosis, and oral cancer. In a monograph published by the International Agency for Research on Cancer (IARC) for the evaluation of cancer risks (IARC, 2004), areca nut was ranked as a group I carcinogen to humans. There are many reports indicating the components of areca nuts have genotoxicity and cytotoxicity leading to DNA strands breaks, DNA-proteins crosslink, unscheduled DNA synthesis and cell cycle aberration. When DNA damage occurs, the ATM/ATR-Chk1/Chk2 pathway is activated, cell cycle arrested, and induces the activation of other DNA-repair proteins. So far, because of the components of AN are very complex, the mechanisms of AN-induced cytotoxicity to cause cell aberrations and oral diseases are not clearly understood. The purpose of this study is trying to investigate the roles of two check point kineses: Chk1/Chk2 in the ANE-induced geno- and cytotoxicity. In the ANE-dose dependent experiments, the morphology of SAS cells became much roundly, lost the connection to the plate and many vacuoles appeared in the cells due to the increased ANE-concentration. The viability of SAS cells decreased obviously because of the raised of the ANE and arecoline, especially in the concentration of 800 $\mu\text{g/ml}$ and 0.8 mM respectively. By using flow-cytometry assay, we found that the SAS cells arrested in G₂/M phase because of the effects of the components of areca nuts. We further analysed whether the ANE and the arecoline can regulate the cell cycle- and apoptosis-related molecules by

RT-PCR and western blot. ANE and arecoline activated the Chk2 pathway and induced the downstream p-Cdc2, p-Cdc25C expression through the Chk2 phosphorylation. The ANE and arecoline also regulated the cell cycle-related cyclin B1, cyclin D1 and the apoptosis-related p-p53, Bax and bcl-2. By using caffeine, an ATM/ATR inhibitor and Chk2 inhibitor, we clarified the correlation between the molecules of the ATM-Chk2 signaling transduction pathway. Unexpectedly, Chk2 inhibition not only blocked the ANE-induced G₂/M phase arrest of SAS cells but also resulted in the G₁ phase arrest. In conclusion, we provide the possible molecular mechanism of Chk2 pathway, which is induced by ANE and arecoline to cause aberration in SAS cells. Chk2 activation indeed plays a very important role in the cell mutagenesis induced by areca nuts components. Maybe Chk2 can be the new target in the prevention and clinical treatment of the areca nuts-induced oral mucosa diseases in the future.

Key words: ANE, arecoline, Chk2, cytotoxicity, cell cycle



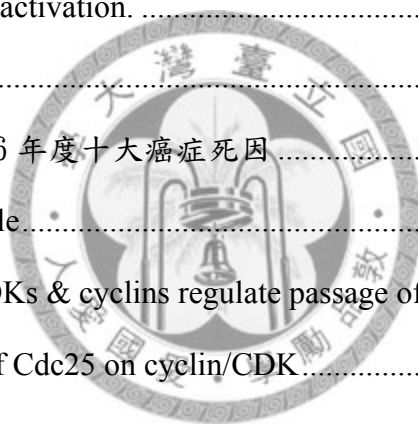
第一章 緒論	1
檳榔嚼食與口腔疾病	1
檳榔嚼塊之組成成分	1
檳榔萃取物的基因毒性、細胞毒性與致癌性	2
細胞週期	3
Cyclin B	4
CDK1-Cdc2	5
Cdc25C	6
檢查點 (Check Points)	6
BCL2 Family 與細胞週期	8
研究動機與目的	8
第二章 實驗材料與方法	10
1. 檳榔子成分萃取	10
2. 細胞株與細胞培養	10
3. 細胞生長評估	11
4. MTT (3-(4,5)-dimethylthiazolium (-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazoliumromide) 分析	12
5. 流式細胞儀 (Flow Cytometry) 分析	13
6. 西方點墨法 (Western Blotting)	14
6.1 細胞處理與蛋白質萃取	14
6.2 蛋白質定量	14
6.3 膠體配製與電泳	15
6.4 蛋白質轉漬 (Transfer)	16
6.5 抗體使用	16
7. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction)	18
7.1 RNA 分離法	18



7.2 RNA 定量.....	19
7.3 RNA 反轉錄 (Reverse Transcription)	20
7.4 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)	20
8. 統計分析	22
第三章 實驗結果	23
檳榔成分對於 SAS 舌癌細胞之影響.....	23
檳榔成分與 SAS 舌癌細胞型態變異.....	23
檳榔子萃取物導致 SAS 舌癌細胞型態變異	23
檳榔素 (Arecoline, ACO) 導致 SAS 舌癌細胞型態變異	24
檳榔成分之細胞毒性	24
檳榔子萃取物與細胞毒性.....	25
檳榔素與細胞毒性.....	25
檳榔成分對 SAS 舌癌細胞之細胞週期的影響.....	26
檳榔子萃取物對 SAS 細胞之細胞週期的影響.....	26
檳榔素對 SAS 細胞之細胞週期的影響.....	27
檳榔成分影響 SAS 細胞之細胞週期調控分子.....	27
檳榔子萃取物對 SAS 舌癌細胞之細胞週期調控分子的影響.....	28
檳榔素對 SAS 舌癌細胞之細胞週期調控分子的影響.....	29
ATM/ATR 在檳榔子萃取物對 SAS 舌癌細胞所造成之影響中所扮演之角色 30	
咖啡因對檳榔子萃取物引起的 SAS 舌癌細胞外表型態變異之影響.....	30
Chk2 在檳榔子萃取物對 SAS 舌癌細胞所造成之影響中所扮演之角色	31
抑制 Chk2 對檳榔子萃取物引起的 SAS 細胞外表形態變異之影響	31
抑制 Chk2 對檳榔子萃取物細胞毒性之影響	32
抑制 Chk2 對檳榔子萃取物引起的 SAS 細胞之細胞週期變異之影響	32
抑制 Chk2 影響檳榔子萃取物調控 SAS 細胞之細胞週期分子	33
第四章 討論	35

檳榔子萃取物與檳榔素對於細胞生長的影響	35
檳榔成分活化 Check Point Kinase 2 (Chk2)	36
ATM 與 Chk2 對 SAS 細胞存活能力的影響	37
Chk2 對 SAS 細胞之細胞週期調控分子的影響	38
第五章 總結	41
第六章 參考文獻	43
圖次:	52
Figure 1 : Effect of AN extraction on morphological changes in SAS cells.	52
Figure 2 : Effect of Arecoline on morphological changes in SAS cells.	53
Figure 3 : Dose dependent effects of ANE on cells proliferation in SAS cells.	54
Figure 4 : Dose-dependent effects of ANE on SAS cells.	55
Figure 5 : Dose-dependent effects of ACO on SAS cells.	56
Figure 6 : Effect of ANE on the expression of p-Chk2、Chk2、p-Chk1 and Chk1 in SAS cells.	57
Figure 7 : Effect of ANE to expression of cell cycle regulatory proteins in SAS cells.	58
Figure 8 : Effect of ANE to mRNA expression of cell cycle regulatory proteins in SAS cells.	59
Figure 9 : Effect of ACO on the expression of p-Chk2、Chk2、p-Chk1 and Chk1 in SAS cells.	60
Figure 10 : Effect of ACO to expression of cell cycle regulatory proteins in SAS cells.	61
Figure 11 : Effect of ACO to mRNA expression of cell cycle regulatory proteins in SAS cells.	61
Figure 12 : Effect of caffeine on ANE-induced morphological changes in SAS cells. .	63

Figure 13 : Effect of Chk2 inhibitor on ANE-induced morphological changes in SAS cells.....	64
Figure 14 : Dose-dependent effects of ANE - Chk2 inhibitor on cells proliferation in SAS cells.	65
Figure 15 : Dose-dependent effects of ANE - Chk2 inhibitor on SAS cells.	66
Figure 16 : Effect of ANE-Chk2 inhibitor to expression of p-Chk2 and Chk2.....	67
Figure 17 : Effect of Chk2 inhibitor on ANE-induced changes of cell cycle-related proteins.	68
Figure 18 : Schematic diagram illustrating possible molecular mechanism of areca nuts components-induced Chk2 activation.	69
附錄 :	70
附錄一 中華民國 96 年度十大癌症死因	70
附錄二 The cell cycle.....	71
附錄三 Multiple CDKs & cyclins regulate passage of the cell cycle	71
附錄四 The effect of Cdc25 on cyclin/CDK.....	71
附錄五 The check point signaling.....	72
附錄六 The mechanism of apoptosis	73



第一章 緒論

檳榔嚼食與口腔疾病

長久以來，嚼食檳榔是一項普遍風行於亞洲、非洲、歐洲部分地區，甚至於北美洲國家、深入各個社會階層的流行嗜好，尤其是泰國、馬來西亞、印尼、印度、中國、台灣等地區。檳榔也是目前世界上第四種常被使用來提振精神的物質，排名僅次於咖啡因、酒精與尼古丁三種成分之後（Gupta and Ray, 2004）。根據統計，全世界大約有二至六億人口有嚼食檳榔的習慣，而每個檳榔嚼食者每一天大約嚼食十五至二十顆檳榔（Jeng *et al.*, 2000）。截至目前已經有許多文獻指出，嚼食檳榔與各種口腔疾病間著明確關聯，嚼食檳榔是多種口腔粘膜病變：口腔白斑（leukoplakia）、口腔黏膜下纖維化（oral submucous fibrosis）甚至口腔癌的主要致病因子之一（IARC, 1985）。除此之外，有許多其他研究報告也指出，嚼食檳榔習慣也確實提高了口咽部（oropharynx）、咽部（pharynx）、食道（esophagus）等頭頸部腫瘤的產生（Wu *et al.*, 2001; Phukan *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005）。行政院衛生署公布的統計資料也指出，口腔癌為台灣常見癌症第六位，更是台灣地區男性十大致死癌症第四位（Health and Vital Statistics, 2008）。根據統計，嚼食檳榔者若是同時有吸菸與飲酒習慣，將會使口腔癌發生機率提高為一般正常人的一百二十三倍（Ko *et al.*, 1995）。

檳榔嚼塊之組成成分

依據生活地區的不同，不一樣的生活習慣、社會風俗的歧異，檳榔嚼塊的組

成也會根據當地住民偏好口味的不同而有所差異。一般來說，檳榔嚼塊的組成包含檳榔子 (areca nut)、荖葉 (leaf of *piper betle* line)、荖花 (unripened fruit of *piper betel* linn) 等成分，並加入熟石灰 (slaked lime)，在巴基斯坦、印度、馬來西亞等國家甚至會加入菸草與其他添加物進行調味。以往有許多人認為，只要不加入石灰之類的其他有害添加物，嚼食檳榔子本身對人體健康並沒有傷害，如今此等不正確的錯誤觀念應被及時導正過來，世界癌症研究中心已有專論將檳榔子本身歸類為一級致癌物，也就是即使沒有任何其他添加物，檳榔子本身就具有致癌力 (IARC, 2004)。目前已有許多學者針對檳榔嚼塊與檳榔子的內含物質之毒理藥理作用進行研究，檳榔子的主要內含物為檳榔素 (Arecoline)，通常佔了檳榔子成分的 0.15~1% 左右 (Nair *et al.*, 1985)，同時含有其他如檳榔啖 (Arecaidine)、四氫菸酸 (Guvacine)、四氫菸酸甲酯 (Guvacoline)、單寧 (tannin)、脂肪 (fats)、多酚化合物 (polyphenolic compounds)、粗纖維、醣類及鐵等物質 (IARC, 1985)，而這類檳榔子內含的檳榔鹼被認為是檳榔造成各種口咽部腫瘤的主要致病原因 (Dusgupta *et al.*, 2006)，但也正因為檳榔嚼塊成分過於複雜，目前對於檳榔嚼塊之毒性與致癌機制仍然未能全盤了解。

檳榔萃取物的基因毒性、細胞毒性與致癌性

許多體外 (in vitro) 與活體實驗 (in vivo) 已經證實，檳榔子萃取物的確造成各種不同細胞的基因毒性與細胞毒性。隨著檳榔子與荖花萃取物濃度的提高，口腔纖維母細胞 (oral mucosal fibroblast) 產生了 DNA 斷裂、DNA 與蛋白質交互連結、非正常程序的 DNA 合成 (unscheduled DNA synthesis) 等情形，並且降低了細胞的存活率與生長能力 (survival and proliferation) (Jeng *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2002)。而檳榔子萃取物亦會使口腔角化細胞 (oral keratinocytes) 產生細胞變圓，

細胞內出現大量不正常空泡與細胞週期停滯等不正常現象 (Chang *et al.*, 2001) , 而長時間暴露在較低濃度檳榔子萃取液下的口腔纖維母細胞, 也出現了細胞生長停滯與細胞內 MMP2 蛋白活化上升的現象, 若將此類因檳榔子萃取液而生長停滯的纖維母細胞注射入裸鼠體內, 則會使裸鼠出現不正常的口腔腫瘤細胞 (Lu *et al.*, 2008) 。在其他許多動物模式的研究中也證實, 檳榔子多酚 (polyphenol) 促使實驗動物出現唾液腺腫瘤與肝腫瘤的生成, 檳榔子的水、酒精、DMSO 等等各種萃取物也同樣會造成實驗動物包含肝、胃、肺、口腔在內的不同器官腫瘤與癌症的發生 (Jeng *et al.*, 2001; IARC, 2004) 。

檳榔子萃取物中的主要物質檳榔鹼, 尤其是其中的檳榔素 (arecoline) 目前被認為是造成檳榔毒性的主要因素之一 (IARC, 2004; Jeng *et al.*, 2001; Shirname *et al.*, 1983) 。雖然檳榔素本身並不造成 DNA 斷裂與非正常程序的 DNA 合成 (Sundqvist *et al.*, 1989) , 但有研究指出檳榔素在 Ames test 上的確存在致突變性 (Shirname *et al.*, 1983) , 並且在許多不同的細胞中皆可以誘使細胞內的姊妹染色體互換、產生小核 (micronuclei) 、染色體異常 (IARC, 2004; Jeng *et al.*, 2001) , 檳榔素也被證實能夠停止口腔纖維母細胞、口腔角化細胞的細胞週期並抑制其生長與存活率 (Chang *et al.*, 2001) , 近年來也有研究指出, 檳榔素會造成細胞內 glutathione (GSH) 的消耗 (Jeng *et al.*, 1994; Jeng *et al.*, 1999) , glutathione 為一種抗氧化物質, 存在於身體的細胞中, 可藉由自身氧化以中和細胞內 $\cdot\text{OH}$ 等自由基對脂肪酸或遺傳物質的傷害, 因此檳榔素造成的細胞內 glutathione 消耗, 將使得細胞對於檳榔內其他成分、菸草或是自然界中其他有害致癌物質失去抵抗能力。

細胞週期

當一個細胞由第一次有絲分裂結束後繼續生長直到第二次有絲分裂的一個完

整過程稱為細胞週期。而一個完整的細胞週期又可粗分為分裂間期 (inter phase) 與分裂期 (mitotic phase)，而分裂間期又可以進一步細分為 DNA 合成前期 (G₁, Gap1)，DNA 合成期 (S, Synthesis) 與 DNA 合成後期 (G₂, Gap2)，整個分裂間期即是為了之後即將到來的分裂期進行物質的準備與累積，主要是完成遺傳物質的複製以及相關所需蛋白質的合成，整個完整細胞週期可表示為 G₁ 期→S 期→G₂ 期→M 期 (Hartwell and Weinert, 1989)。

整個細胞週期進行，受到一群蛋白激酶 (serine/threonine protein kinases family) 所調控，在細胞週期中各個不同的子時期，都有特定的蛋白激酶 (Cyclin-Dependent Kinases, CDKs) 和各自相對應的 Cyclin proteins 結合成為具有磷酸激酶活性的複合物，藉由細胞週期內各個不同的 cyclin proteins 狀態變化，調控整個細胞週期的進行 (Sherr, 1994; Sherr, 1995)。當細胞受到生長因子刺激，開始進入細胞週期時，cyclin D 首先被轉譯出來，並與細胞內的 CDK4 及 CDK6 形成活化的 cyclin D/CDK4/6 複合物，而這樣的複合物能使得 Rb 被磷酸化，使得 Rb 被釋放出來，並開始活化 cyclin E 的轉譯。Cyclin E 又能夠與細胞內的 CDK2 形成 cyclin E/CDK2 複合物並進一步調控 E2F 的表現，E2F 則可促進 cyclin A 的活化，被活化的 cyclin A 能夠與 CDK1 (Cdc2)、CDK2 分別形成活化的複合物，cyclin A/Cdc2 使得細胞週期能通過 G₂ 進入 M 期，而 cyclin A/CDK2 則可以使細胞由 G₁ 進入 S 期 (Shackelford *et al.*, 2000; Cakir *et al.*, 2005; Shackelford *et al.*, 1999)。

Cyclin B

Cyclin B 是細胞內主要調控細胞週期的 cyclin proteins 的一員，其合成由 S 期時開始，G₂ 時期持續進行，最後在 M 期裡的 anaphase 時分解 (Shackelford *et al.*,

2000), cyclin B 的存在是細胞週期進入 M 期所必需 (Luch, 2002)。在哺乳動物細胞中, 有三種 cyclin B 的 isoforms 存在, 分別是 cyclin B1、cyclin B2 與 cyclin B3 (Shackelford *et al.*, 2000), cyclin B3 一般存在於細胞核內, 而 cyclin B1 與 cyclin B2 平常則存在於細胞質中, 直到細胞週期由 G₂ 期準備進入 M 期時才會被磷酸化並行使其正常功能 (Touny and Banerjee, 2006)。有研究指出, 在細胞出現 DNA 傷害的情況下, 細胞內的 p21 會與 cyclin B1 形成交互作用, 使得 cyclin B1/CDK1 轉移到細胞核內, 因而無法被 Cdc25C 所活化, 而進入細胞核內的 cyclin B1 也會更容易被分解掉, 使得細胞週期停滯 (Gillis *et al.*, 2009; Charrier-Savourin *et al.*, 2004)。另外 cyclin B1 與 cyclin B2 也可促進細胞生長與存活, 並且是細胞週期 G₂/M 的重要調控分子, 另外 cyclin B1 在許多不同細胞中也被發現與細胞凋亡有重要關係 (Shackelford *et al.*, 2000; Maddika *et al.*, 2007)。



CDK1-Cdc2

Cdc2 是所有 CDK 家族成員中唯一非持續存在的分子, 並且已被發現與細胞生長有關 (Maddika *et al.*, 2007), 同時細胞週期內的 G₂/M 期亦是由 cyclin B1/Cdc2 組成的 MPF (mitosis-promoting factor) 藉著被磷酸化、去磷酸化、往核內的位置轉移等機制所調控 (Touny *et al.*, 2006)。在細胞週期 S 期時, cyclin B 即會與 Cdc2 形成複合物, 但此時的 cyclin B/Cdc2 複合物由於在 Cdc2 上的 Thr¹⁴、Tyr¹⁵ 的抑制位置 (inhibitory site) 上仍保持著磷酸化狀態, 在這兩個位置上的磷酸根, 會妨礙 ATP 與 Cdc2 的結合所以此時期的 cyclin B/Cdc2 複合物仍然沒有激酶活性 (Cakir *et al.*, 2005; Shackelford *et al.*, 2000), 而 Cdc2 上的 Thr¹⁴、Tyr¹⁵ 磷酸化是由細胞內另外兩個磷酸激酶 Wee1 與 Myt1 所造成 (Shackelford *et al.*, 2000)。在失去活性的 cyclin B1/Cdc2 的狀態下, 細胞無法進入細胞週期的 M 期, 如此結果將使得細胞週

期持續停留在 G₂/M 時期 (Touny *et al.*, 2006)。

Cdc25C

由 Wee1、Myt1 造成的 Cdc2 上 Thr¹⁴、Tyr¹⁵ 抑制位置的磷酸化可以由細胞內一種雙專一性的去磷酸酶 Cdc25C 所去除，Cdc25C 可藉由這樣的方式調控 cyclin B/Cdc2 的活性 (Touny *et al.*, 2006)，在缺乏 Cdc25C 的情況下，Cdc2 上 Thr¹⁴、Tyr¹⁵ 會持續維持磷酸化狀態而沒有活性，一旦 Cdc25C 將 Cdc2 上 Thr¹⁴、Tyr¹⁵ 位置的磷酸根去除後，cyclin B/Cdc2 被活化，使得細胞週期能夠順利由 G₂ 期進入 M 期，開始進行細胞分裂 (Cakir *et al.*, 2005)。Cdc25C 活化 cyclin B/Cdc2 的過程十分迅速，這是因為在 Cdc25C 去磷酸根的同時，Cdc25C 本身也是 cyclin B/Cdc2 的受質，被活化的 cyclin B/Cdc2 同時也會回過頭來進一步加強了 Cdc25C 去磷酸的活性 (Shackelford *et al.*, 2000)，Cdc25C 最初的活化被認為是受到與細胞核內部 Cdc2 有關的自我催化回饋迴圈 (autocatalytic feedback loop) 機制的調控 (Chen *et al.*, 2000)。一旦細胞發生 DNA damage 或受其他刺激時，原本細胞核內的 Cdc25C 在 Ser²¹⁶ 的位置會被磷酸化，使得磷酸化後的 Cdc25C (p-Cdc25C) 結合上 14-3-3 蛋白，離開細胞核並且失去了去磷酸酶的能力，造成 G₂/M 時期的細胞週期停滯 (Chen *et al.*, 2000; Touny *et al.*, 2006)。

檢查點 (Check Points)

細胞週期的進行乃是一項由許多不同分子各司其職、共同參與的許多精密步驟所組成的浩大工程。細胞週期控制失調將導致多倍數染色體出現、染色體分離

失常、不正確的細胞分裂等結果 (Elledge, 1996)。因此，細胞週期控制失調正是細胞突變乃至於癌症發生的主要原因之一 (Shackelford *et al.*, 1999)。除了前文所述的各種 cyclin proteins 與 CDKs 之外，細胞內同時存在著許多其他分子與檢查機制來確保細胞週期進行的過程中，每一個細節都正確無誤，避免細胞的不正常增生，使遺傳物質可以順利的傳到子代細胞當中 (Nyberg *et al.*, 2002)，而這些細胞內特殊的檢查機制就被命名為 Check Points (Hartwell, 1989)。

當細胞發生DNA damage時，真核細胞能活化一連串複雜的訊息傳遞網路，使細胞週期暫時停止在G₁、S以及G₂時期，並活化產生許多參與DNA修補的必要蛋白 (Hartwell, 1989)，使得細胞有更多時間能夠進行DNA修補 (Kastan *et al.*, 2004; Zhou and Elledge, 2000)。傳統上將這樣的訊息傳遞網路分為：Ataxia-Telangiectasia mutated (ATM) - Chk2以及Ataxia-Telangiectasia and Rad-3-related (ATR) - Chk1兩大部分 (Bartek *et al.*, 2003; Shiloh *et al.*, 2003)，雖然ATM/Chk2與ATR/Chk1兩條路徑之間存有部分交互作用，但一般認為這兩條check point訊息傳遞路徑各自有自己所負責的部分，ATM/Chk2主要是針對DNA雙股螺旋斷裂進行反應，而ATR/Chk1則是會被bulky DNA傷害與細胞週期S期時的DNA複製叉 (DNA replication fork) 錯誤所活化 (Zhou *et al.*, 2000)。當細胞發生DNA damage時，ATM能活化細胞內p53表現 (Kastan *et al.*, 1992)，並進一步轉錄出CDK的抑制分子p21^{CIP1/WAF1}使得細胞週期停止在G₁期 (Deng *et al.*, 1995)，而受到DNA damage活化的Chk1、Chk2也被證實能磷酸化下游的Cdc25A，被磷酸化的Cdc25A會被分解掉，因而失去調控細胞內cyclin E/CDK2的能力，使細胞週期停止在S期 (Mailand *et al.*, 2000; Eastman, 2004)，同時ATM亦可以使得細胞內Cdc2維持在Tyr¹⁵的磷酸化狀態，使細胞週期暫時停止在G₂期，避免細胞在DNA存在缺損的情況下進行DNA複製與細胞分裂 (Elledge, 1996)。

BCL2 Family 與細胞週期

一般來說，BCL2家族的成員可以大致歸類為anti-或pro-apoptosis兩類 (Manion and Hockenbery, 2003; Manion *et al.*, 2004; Susnow, 2009)。在哺乳動物細胞中，BCL2家族共有十八個成員，其中六個成員被認為能夠促進細胞存活，十二個則與細胞死亡有關，而BCL2家族的所有成員都至少擁有四個具高度保留性的BCL-2 homology domains其中之一。在BCL2家族中第一個被發現具有促進細胞凋亡能力的成員是BAX，有研究指出，有多量表現Bax的細胞，能夠直接引起細胞凋亡的發生 (Antonsson *et al.*, 2000)，相反的，Bcl-2則被認為與細胞存活有關，尤其在許多不同類型的癌症中，當癌細胞受到細胞毒性物質的刺激時，細胞內的Bcl-2表現量會有大幅度提升的現象發生 (Cardillo *et al.*, 1997; Tu *et al.*, 1996)。另外，在來自Walter and Eliza Hall Institute研究團隊的許多報告也指出，Bcl-2不只和細胞週期G₀/G₁停滯有關，也參與了細胞週期的進展 (Zinkel *et al.*, 2006)。



研究動機與目的

在南亞以及東南亞有二到六億人有嚼食檳榔的習慣，光是在台灣地區就有大約兩百萬人嚼食檳榔。在許多流行病學的研究已指出嚼食檳榔與口腔癌及多數口腔疾病有關，甚至在許多關於檳榔毒理與藥理學的研究中也發現，檳榔成分確實能夠造成細胞內DNA傷害與基因不穩定，例如：低代數的細胞在極低毒性的檳榔子萃取物環境下，檳榔子萃取物可以抑制DNA合成，並使細胞週期停留在G₁期，並可以觀察到sub-G₁細胞比率有些微增加的趨勢，而較高代數的細胞則會因檳榔子萃取物的作用發生細胞週期G₂期停滯的現象 (Lu *et al.*, 2006)，但由於檳榔成分過於複雜，目前對於檳榔毒性的研究仍然流於片斷，未能全盤了解。

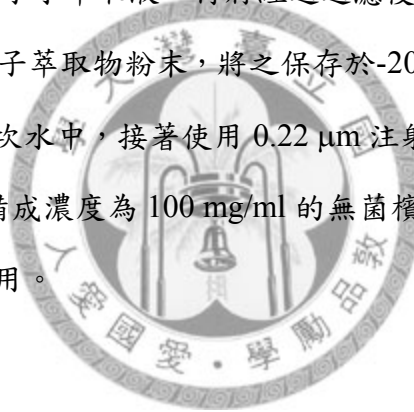
因此本研究的主要目的即在探討究竟檳榔成分如何影響細胞週期進行、細胞死亡與細胞凋亡？以及 Chk1、Chk2 在檳榔成分之毒性誘發一連串細胞反應的訊息傳遞過程中所扮演的角色。期待能對此本土問題有更多了解，並提供此本土問題未來治療的策略。



第二章 實驗材料與方法

1. 檳榔子成分萃取

購買產自台灣之檳榔子，首先以清水洗淨並將檳榔子切成小塊狀，將已切片之檳榔子進行冷凍乾燥，接著將乾燥後之小塊檳榔子以粉碎機（佑崎機械有限公司，台灣）製成檳榔粉末。取 50 公克檳榔子乾燥粉末與五百毫升二次水浸泡四小時，加以過濾後可得檳榔子水萃取液，再將經過過濾後得到的檳榔子水萃取液冷凍乾燥後，可得乾燥檳榔子萃取物粉末，將之保存於 -20°C 中。取 1 公克乾燥檳榔子粉末，溶解於 10 ml 二次水中，接著使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 注射器濾膜（MILLIPORE Co. Cork, Ireland）過濾，製備成濃度為 100 mg/ml 的無菌檳榔子萃取液，分裝後保存於 -20°C 以備之後實驗使用。



2. 細胞株與細胞培養

SAS :

Animal:

Human.

Scientific name:

Homo sapiens.

Tissue:

Tongue.

Passage method:

0.02% EDTA-PBS.

0.02% EDTA and 0.1% trypsin

Life span:

Infinite.

Morphology:

Epithelial-like.

Medium:

RPMI-1640 + supplemented with 10% FBS and Fungizone (1 μ /ml) .

45% Dulbecco's modified Eagle's medium with 45% Ham's F12 medium and
10% fetal calf serum

Characteristics:

Squamous cell carcinoma of tongue. Established from primary lesion. HLA-A
24/

References:

Nippon Koukuka Gakkai Zassh, 38, 20-28, 1989.

3. 細胞生長評估

將 5×10^5 的 SAS 細胞培養於 6-well culture dish 中，經過大約 24 小時，待細胞完全貼附於培養皿底部後，更換新的含血清 DMEM 培養液，再以檳榔成分與各項藥物處理適當時間後，將 6 well 內的培養液以滴管吸入 15 ml 離心管中，之後以 1 drop 外用 PBS (Phosphate buffer saline) 沖洗細胞後，亦將每 well 的 PBS 吸入 15 ml

離心管中，加入 1 ml 外用 1× trypsin/EDTA 至每個 well 中，置於 37°C 恆溫箱中數分鐘使細胞自 well 上作用下來，將經過 trypsin/EDTA 作用下來的細胞，使用可調式微量吸管 (pipetman) 輕輕將細胞打散後收至 15 ml 離心管內，以 1000 rpm 離心五分鐘後，小心去除上清液並加入 1 ml PBS 回溶細胞，最後再從中取 10 μl 細胞與 10 μl trypan blue 均勻混合後，在顯微鏡下以血球計數盤 (counting chamber) 計算活細胞數目，因為健康的活細胞能夠將 trypan blue 染劑排出胞外，因此可在顯微鏡下觀察到晶亮的存活細胞，將結果以每毫升含血清培養液之存活細胞數 (cell number/ml) 相對於對照組之細胞存活百分率 (100%) 來表示。

4. MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl-4-methyl-5-phenyltetrazolium bromide) 分析

將 5×10^5 的 SAS 細胞培養於 6-well culture dish 中，經過大約 24 小時，待細胞完全貼附於培養皿底部後，更換新的含血清之 DMEM 培養液，再以濃度分別為 0.1、0.2、0.4 和 0.8 mM 的檳榔素 (arecoline, ACO) 處理 24 小時，之後更換新的培養液，於每毫升培養液加入 20 μl 的 MTT 染劑 (5 mg/ml)，並於 37°C 下作用兩小時。之後將培養液吸除，再加入 2 ml 的 DMSO 以溶解活細胞反應所生成的 formazan crystal，將其混合均勻後，由每個 well 吸取 100 μl 混合液注入 96-well 培養皿中，以 DMSO 當作 blank，在 OD₅₄₀ 下測量其吸光值。實驗結果以吸光值相對於對照組 (100%) 之百分比率來表示。

5. 流式細胞儀 (Flow Cytometry) 分析

將 5×10^5 的 SAS 細胞培養於 6-well culture dish 中，經過大約 24 小時，待細胞完全貼附於培養皿底部後，更換新的含血清之 DMEM 培養液，再以檳榔成分與各項藥物處理適當時間後，將 6 well 內的培養液以滴管吸入 15 ml 離心管中，之後以 1 drop 外用 PBS (Phosphate buffer saline) 沖洗細胞後，亦將每 well 的 PBS 吸入 15 ml 離心管中，加入 1 ml 外用 $1 \times$ trypsin/EDTA 至每個 well 中，置於 37°C 恆溫箱中數分鐘使細胞自 well 上作用下來，將經過 trypsin EDTA 作用下來的細胞以可調式微量吸管輕輕打散並收至 15 ml 離心管內，以 1000 rpm 離心五分鐘後，小心去除上清液後，將沉澱於離心管底部的細胞小心打散，加入 1 ml 70% 乙醇後將離心管管蓋蓋緊於 -20°C 冷凍至少三十分鐘將細胞固定。上機前，仍然將 15 ml 離心管以 1000 rpm 離心五分鐘，去除乙醇後，加入 PBS 以洗去殘餘的乙醇，同樣以 1000 rpm 離心五分鐘並去除上清液後，加入大約 300 μl staining buffer (含 2 mg/ml RNase A 及 40 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide, PI)，並將細胞液轉移至康氏管中於暗室中反應三十分鐘，之後以流式細胞儀 (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, USA) 上之 CELLQuest (Becton Dickinson) 進行細胞週期分析，分析時以系統讀取得到的 M1 值代表 sub-G₀/G₁ 所佔的細胞比例，同時並以 FL2 channel (波長：564nm~606nm) 偵測細胞內 PI 的螢光，每一個 sample 均分析一萬個細胞數，最後再以 ModFit LT version 2.0 (Verity Software House, Inc., 有 SA) 軟體計算 SAS 細胞內各細胞週期的分佈情形。

6. 西方點墨法 (Western Blotting)

6.1 細胞處理與蛋白質萃取

將 3×10^6 的 SAS 細胞培養於 10 公分 culture dish 中，經過大約 24 小時，待細胞完全貼附於培養皿底部後，更換新的含血清之 DMEM 培養液，接著加入檳榔成分與各項藥物處理適當時間後，抽取細胞內蛋白質進行分析。

首先將細胞以 PBS 沖洗四次後，加入 200 μ l lysis buffer 將細胞打破，lysis buffer 的成分為：25 mM Tris \cdot HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、5 mM $MgCl_2$ 、1% NP-40、1M DTT (Dithiothreitol)、5% glycerol、50 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride)、1 mg/mL aprotinin、1 mg/mL leupeptin。將收集下來之細胞液抽取至微量離心管中，放置於冰上十五到二十分鐘，並且每五分鐘震盪混合一次後，置於高速離心機中，於 4°C，13000 rpm 下離心 15 分鐘，取離心後之上清液進行蛋白質濃度定量。

6.2 蛋白質定量

將 Bio-Rad protein assay dye 與二次水依照 1 : 4 的比例稀釋後，以 2 μ g/ml 的 BSA (bovine serum albumin) 標準液配製成 0.125、0.25、0.5、1 μ g/ml 四種蛋白標準濃度，取 2 μ l 的 cell lysate sample 與 1ml 稀釋過後的 Bio-Rad protein assay dye 均勻混合後在 OD_{595nm} 下測定其吸光值 (Multiskan Spectrum, CA, USA)，並求出標準曲線 ($R^2 > 0.98$)，並將 cell lysate sample 的吸光值以內插法帶入所得的標準曲線

中，定量樣本 cell lysate sample 的蛋白質濃度。

6.3 膠體配製與電泳

配製 10% 的 polyacrylamide 電泳膠片，其組成如下表所示。膠有兩層，下層為 Resolving gel，上層為 Stacking gel。

10% Resolving Gel	1 片	2 片	3 片	4 片	5 片	6 片	7 片	8 片
ddH ₂ O (mL)	3.05	6.1	9.15	12.2	15.25	18.3	21.35	24.4
3M Tris pH 8.9 (mL)	0.85	1.7	2.55	3.4	4.25	5.1	5.95	6.8
40% Acrylamide (mL)	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10
10% SDS (λ)	50	100	150	200	250	300	350	400
10% APS (λ)	50	100	150	200	250	300	350	400
TEMED (λ)	10	15	15	20	20	20	30	30

泡好下層膠後，立即加入玻璃中並加水壓平，待膠凝固後去除水，將泡好的上層膠加入玻璃中，並插入製作 well 的塑膠片，靜置等待凝固（約 40 分至 1 小時）。

Stacking Gel	1 片	2 片	3 片	4 片	5 片	6 片	7 片	8 片
ddH ₂ O (mL)	1.574	3.148	4.722	6.296	7.87	9.444	11.018	12.592
1.5M Tris pH 6.8 (mL)	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2
40% Acrylamide (mL)	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2

將 SDS-PAGE 電泳膠片裝置於電泳槽（Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA），取 40 μl 的等量蛋白混合適量 loading dye 後以 95°C 熱水浴加熱五分鐘使蛋白質變性，經離心後將樣本蛋白置於已裝載好的電泳膠片 well 中，以 80 伏特進行 stacking gel 電泳分離，待樣本蛋白齊平後將電源調整至 120 伏特繼續進行電泳分離，經過適當時間後停止電泳，並進行蛋白質轉漬。

6.4 蛋白質轉漬 (Transfer)

本次實驗用於蛋白質轉漬的 transfer membrane 為 Polyvinylidene Fluoride Transfer Membrane (PVDF)，將已完成電泳的膠片取下，並以負極至正極：濾紙→膠片→PVDF membrane→濾紙之順序將膠片與 membrane 組合後置入轉漬槽 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)，以 320 毫安培 120 分鐘進行蛋白質樣本轉漬。待完成轉漬後，PVDF membrane 置於含 5% 脫脂奶粉之 TBST 中，在室溫下 blocking 至少一小時。



6.5 抗體使用

在系列實驗中使用以下一級抗體在冷房中反應 overnight，一級抗體作用結束後，以 TBST 緩衝液 (Tris-base、NaCl、Tween-20、ddH₂O) 清洗四次，每次五分鐘，之後再以各自對應的二級抗體 HRP conjugated antibody 於室溫下作用一小時後，以 TBST 緩衝液清洗至少六次，每次十分鐘，之後加入 ECL 感應試劑 (Enhanced Chemiluminescence Reagent, Millipore, Billerica, MA, USA)，最後再以 X 光片適度感光。

一級抗體

抗體	稀釋 比例	Source
Anti GAPDH antibody	1:3000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Chk1 antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Chk2 antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti p-Chk1 antibody	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti p-Chk2 antibody	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Cdc25C antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti p-Cdc25C antibody	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Cdc2 antibody	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti p-Cdc2 antibody	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Cyclin B1 antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Cyclin D1 antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti P21 antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti p-H3 antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti P53 antibody	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti p-P53 antibody	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Bcl-2 antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti Bax antibody	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA
Anti p-ERK antibody	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA

二級抗體

抗體	稀釋比例	Source
Goat anti-Mouse IgG	1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Baltimore, USA
Goat anti-Rabbit IgG	1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Baltimore, USA
Rabbit anti-Goat IgG	1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Baltimore, USA

7. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction)



將 3×10^6 SAS 細胞培養於含有血清之 DMEM 的 10 公分 culture dish 中，經過大約 24 小時，待細胞完全貼附於培養皿底部後，更換新的培養液，接著進行檳榔成分與各項藥物處理適當時間後，萃取細胞的 RNA 以半定量聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 對細胞內各基因之表現進行分析。

7.1 RNA 分離法

完全將 culture dish 中的培養液去除後以 PBS 清洗數次後，使用 Macherey-Nagel RNA isolation kit 進行 SAS 細胞的 RNA 萃取。使用 350 μ l kit 提供的 Buffer RA1 與 3.5 μ l β -mercaptoethanol 混合成的 lysis buffer 配合刮勺將細胞收下，將 cell lysate

置入 NucleoSpin Filter Unit 中並套上一收集管，以 14000 rpm 離心一分鐘，收取離心後之產物，加入 350 μ l 的 70%酒精均勻混合，接著再將其置入 Nucleospin RNA column 與離心管的組合，以 10000 rpm 離心 30 秒後，丟棄下層離心產物，接著再加入 350 μ l MDB buffer (Membrane Desalting Buffer) 以 14000 rpm 離心一分鐘並拋棄下層產物。將 10 μ l DNase I 與 90 μ l DNase I Reaction Buffer 混合後取其中 95 μ l 加入套有離心管的 RNA column，於室溫下靜置 15 分鐘。隨後在套有離心管的 RNA column 中加入 200 μ l buffer RA2 離心 10000rpm 三十秒，拋棄下層物後再加入 600 μ l buffer RA3，混合均勻後以 10000rpm 離心三十秒，拋棄下層物後再加入 250 μ l buffer RA3 以 14000rpm 離心 1 分鐘，拋棄下層液後將 RNA column 置入一新的 nuclease-free 1.5 ml 離心管，最後加入 60 μ l RNase-free water 以 14000 rpm 離心一分鐘將 RNA 純化出來並保存在-20 $^{\circ}$ C 以備後續使用。



7.2 RNA 定量

將前述方式所萃取出之 RNA 10 μ l 與 1000 μ l DEPC-water 在 1.5ml 微量離心管內均勻混和後，以分光光度計(Hitachi U-2001)測量 RNA sample 在 260nm 與 280nm 的吸光值，若 260nm/280nm 的比值大於 1.8，則代表 RNA sample 的純度足夠進行實驗。RNA 濃度 (μ g/ml) 的計算公式為： $OD_{260nm} \times 40 \times \text{RNA 稀釋倍率} (1010/10)$ ，亦即當 $OD_{260nm} = 1$ 時，RNA sample 的濃度為 40 μ g/ml。

7.3 RNA 反轉錄 (Reverse Transcription)

經過前述方式定量後，將包含 negative control (NC) 在內以及不同檳榔成分濃度與藥物處理過的各實驗組 RNA sample，以 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, CA, USA) 進行 RNA 反轉錄。每個實驗組取等量 RNA sample 先與適量 DEPC-water 混合均勻，加入 8 μ l 由 kit 提供的 Random Hexamer 與 8 μ l 的 10mM dNTP，使總體積為 64 μ l。各組 RNA sample 接著以 PCR machine (Perkin Elmer 4800, City of Industry, CA, USA) 進行 65 $^{\circ}$ C 五分鐘處理，之後置於 4 $^{\circ}$ C 兩分鐘。於此同時，也依照廠商的建議以 2 μ l 10 \times RT Buffer、4 μ l 25 mM MgCl₂、2 μ l 0.1 M dithiothreitol (DTT)、1 μ l RNaseOUT™、1 μ l SuperScript™ III RT 配製成 cDNA Synthesis Mix。待 RNA sample 自 PCR machine 取出後，於各組 sample 中加入 80 μ l cDNA Synthesis Mix，接著再以 PCR machine 依照 25 $^{\circ}$ C 10 分鐘 \rightarrow 50 $^{\circ}$ C 50 分鐘 \rightarrow 85 $^{\circ}$ C 5 分鐘的順序進行反轉錄，之後再將 sample 置於 4 $^{\circ}$ C，接著分別加入 2 μ l RNase H 後，再以 37 $^{\circ}$ C 20 分鐘進行最後步驟，當所有流程完成後，合成好的 cDNA 便可保存於 -20 $^{\circ}$ C 中以備之後實驗。

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

取前述方式獲得的 cDNA sample 5 μ l，與 5 μ l 10 \times PCR buffer、4 μ l 之 2.5 mM dNTP、1.5 μ l 之 50 mM MgCl₂、forward primer 與 reverse primer 各 2 μ l、0.5 μ l 之 Taq (5U/ μ l) (Genet Bio, Chungnam, Korea) 與適量的 DEPC-water 混合均勻，使總體積為 50 μ l 後，置入 PCR machine 以 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘進行 denature，之後依照 94 $^{\circ}$ C 1

分鐘→55°C 1 分鐘→72°C 1 分鐘的流程進行 20~35 個循環，最後以 72°C 7 分鐘完成循環並將 sample 置於 4°C。於此同時並配製 1.8% 的 agarose gel，每 100 ml 的 0.5x TBE buffer 含有 1.8g agarose，溶液混合均勻後以微波將其加熱至 agarose 完全溶解後，加入 5μl 的 0.625 mg/ml ethidium bromide (EtBr) (Amresco, Ohio, USA) 混合後倒入製膠槽，待冷卻凝固後完成 DNA 電泳膠片製作。將 15 μl PCR 產物與 3 μl DNA loading dye 混合均勻後以電壓一百伏特進行電泳分離，經過適當時間後以 Alphaimager system (Alpha Innotech Corporation, USA) 讀取影像。

本實驗所使用的 primer 如下表所示：

Primer 名稱	Sequence	Size
β-actin	Sense:5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3' Antisense:5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'	218bp
Cyclin B1	Sense:5'-AAGAGCTTTAAACTTTGGTCTGGG-3' Antisense:5'-CTTTGTAAGTCCTTGATTACCATG-3'	317bp
P21	Sense:5'-GAGCGATGGAACCTTCGACTTTGTCACC-3' Antisense:5'-CTGAGACTAAGGCAGAAGATGTAGAGCG-3'	450bp
Cdc25C	Sense:5'-CCTGGTGAGAATTCGAAGACC-3' Antisense:5'-GCAGATGAAGTACACATTGCATC-3'	456bp
Cdc2	Sense:5'-GGGGATTCAGAAATTGATCA-3' Antisense:5'-TGTCAGAAAGCTACATCTTC-3'	288bp

8. 統計分析

本論文每組實驗結果皆為每樣本至少三重複且進行至少兩次以上之獨立實驗。實驗結果以平均值 \pm 標準差 (mean \pm S.E.) 表示之，並使用 SPSS (SPSS 10.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 軟體進行統計分析，以 one-way ANOVA 及 Post-hoc analysis with Bonferroni correction 進行分析比較樣本間之差異是否有統計學上之意義，以 $p < 0.05$ 作為樣本間具有顯著差異之判斷依據。



第三章 實驗結果

檳榔成分對於 SAS 舌癌細胞之影響

我們比較了檳榔子萃取物與檳榔素對於 SAS 舌癌細胞之影響。將 SAS cells 分別暴露在不同濃度的檳榔子萃取物與檳榔素下作用二十四小時後，進行觀察。

檳榔成分與 SAS 舌癌細胞型態變異

檳榔子萃取物導致 SAS 舌癌細胞型態變異



SAS 舌癌細胞暴露在高濃度的檳榔子萃取物 (Areca Nuts Extraction, ANE) 環境下，其外表形態會出現明顯的改變。在沒有檳榔子萃取物的情況下，SAS 舌癌細胞呈現正常貼附於培養皿底部的多邊形 (Figure 1a)，而在濃度 ANE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ANE 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理 SAS 舌癌細胞二十四小時後，細胞外表型態並無太大改變 (Figure 1b、Figure 1c)，但是在檳榔子萃取物濃度達到 ANE 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，細胞外表開始有些許皺縮的現象出現，型態變得稍圓，細胞內部也出現少量空泡等不正常現象 (Figure 1d)，在檳榔子萃取物濃度達到 ANE 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，上述現象變得更加明顯，細胞變圓，內部出現大量空泡，並且可以觀察到有許多已經死亡的細胞懸浮在培養液中，無論是細胞數目或密度都大幅下降 (Figure 1e)，這可能肇因於在此高濃度的檳榔子萃取物環境中，SAS 舌癌細胞失去了與細胞增生、細胞運動有關的 filopodia、lamellipodia (Chang *et al.*, 2005)。一旦檳榔子萃取物濃度達

到 ANE 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，許多細胞會死亡並懸浮在培養液中，僅有部分細胞能繼續存活 (Figure 1f)。

檳榔素 (Arecoline, ACO) 導致 SAS 舌癌細胞型態變異

在沒有檳榔子萃取物的情況下，SAS 舌癌細胞呈現正常貼附於培養皿底部的多邊形 (Figure 2a)，以濃度 0.1 mM ACO 處理 SAS 細胞二十四小時後，細胞外表型態並無太大改變 (Figure 2b)，但是在檳榔素濃度達到 ACO 0.2 mM 時，細胞外表開始變圓，細胞內部出現空泡 (Figure 2c)，而在檳榔素濃度上升到 0.4 mM 時，前述現象變得更為明顯，並有許多細胞已經死亡 (Figure 2d)，當檳榔素濃度繼續上升到 0.8 mM 時，有大量細胞死亡懸浮於培養液中，即使存活的細胞其形態顯得十分不規則且看起來支離破碎 (Figure 2e)。



檳榔成分之細胞毒性

為了證明檳榔成分所造成 SAS 細胞外表型態的改變是由於檳榔成分所具有的毒性所造成，因此我們將 SAS 舌癌細胞以不同濃度的檳榔子萃取物與檳榔素分別作用二十四小時後，進行了檳榔成分的細胞毒性分析。

檳榔子萃取物與細胞毒性

由 Figure 3a 中可以知道，SAS 細胞經檳榔子萃取物濃度 100、200、400、800 $\mu\text{g/ml}$ 中處理二十四小時後，再經由 trypan blue 染色計算活細胞，相對於控制組的細胞存活百分比分別是 97.4%、95.7%、96.8%、77.1%。也就是說在濃度 ANE 400 $\mu\text{g/ml}$ 以下的實驗組中，SAS 舌癌細胞的存活率與對照組間沒有顯著差異，但是在較高濃度的 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ 環境下處理二十四小時，SAS 細胞的存活率明顯較其他組別為低，因此可以證明，對 SAS 細胞來說，檳榔子萃取物的確存在有細胞毒性，能夠造成 SAS 細胞不論是外表型態，或者是存活能力上的改變。



檳榔素與細胞毒性

從 Figure 3b 可得知，經檳榔素濃度 0.1、0.2、0.4、0.8 mM 在 SAS 舌癌細胞中處理二十四小時後，再利用 MTT 染劑分析細胞存活情形，相對於控制組的細胞存活百分比分別是 101.34%、102.38%、80.38% 以及 66.71%。雖然濃度在 ACO 0.2 mM 以下的實驗組中，SAS 舌癌細胞的存活率與對照組間沒有顯著差異，但是在較高濃度的 ACO 0.4、0.8 mM 環境下暴露二十四小時，SAS 舌癌細胞的存活率出現明顯下降的情形，此結果可以證明，對 SAS 細胞來說，檳榔素與檳榔子萃取物雷同，都存在有細胞毒性物質，兩者皆能夠造成 SAS 細胞不論是外表形態，或者是存活能力上的改變。

檳榔成分對 SAS 舌癌細胞之細胞週期的影響

為了探討檳榔成分對 SAS 細胞之細胞毒性與外表形態所造成的改變，是否牽涉到細胞週期的變化，我們分別以不同濃度的檳榔子萃取物以及檳榔素對 SAS 細胞處理二十四小時後，以流式細胞儀分析其細胞週期的進行。

檳榔子萃取物對 SAS 細胞之細胞週期的影響

在檳榔子萃取物的作用下，代表細胞凋亡的 sub-G₀/G₁ 比例在各個實驗組中分別為 NC : 5.85%、ANE 100 µg/ml : 5.75%、ANE 200 µg/ml : 6.36%、ANE 400 µg/ml : 6.74%、ANE 800 µg/ml : 10.49% 與 ANE 1200 µg/ml : 15.23% (Figure 4a)，與前述以 trypan blue 所進行的細胞存活分析相對照下，本實驗再一次證明了在高濃度檳榔子萃取物 (ANE 800 µg/ml、ANE 1200 µg/ml) 環境下，檳榔成分確實展現了抑制 SAS 細胞存活的能力。

而在細胞週期的部分，由 Figure 4b 也可以很明顯得看到 SAS 細胞在 ANE 800 µg/ml 的實驗條件下，比起沒有檳榔子萃取物處理的對照組 (10.4%) 來說有明顯的 G₂/M 期上升 (22.92%) 的情形出現，這樣的結果也和之前實驗所得到的：在 ANE 800 µg/ml 情況下，SAS 細胞的外表形態與存活能力都會明顯受到檳榔子萃取物影響互相呼應。而隨著檳榔子萃取物濃度的提高，SAS 細胞除了在細胞週期 G₂/M 期有顯著上升之外，同時也可以發現 SAS 細胞的細胞週期 G₁ 期與 S 期都有些許下降，而此細胞週期的變化，正是細胞週期出現 G₂/M 期停滯的明顯特徵，也就是說在高濃度的環境中，檳榔子萃取物的確可以造成 SAS 細胞發生細胞週期變異。

檳榔素對 SAS 細胞之細胞週期的影響

在檳榔素的作用下，代表細胞凋亡的 sub-G₀/G₁ 比例在各個實驗組中分別為 NC：6.37%、ACO 0.1 mM：7.44%、ACO 0.2 mM：9.31%、ACO 0.4 mM：13.53% 與 ACO 0.8 mM：28.03% (Figure 5a)，與前述以 MTT 所進行的細胞存活分析相對照下，本實驗也再一次證明了在高濃度檳榔素 (ACO 0.4 mM、ACO 0.8 mM) 環境下，檳榔成分確實展現了抑制 SAS 細胞存活的能力。

至於細胞週期的部分，由 Figure 5b 也可以很明顯看到 SAS 細胞隨著檳榔素濃度越來越高，細胞週期分布的情形 G₀/G₁ 期越來越低，反之 S 期與 G₂/M 期則越來越高，在 ACO 0.2 mM 的實驗條件下，比起沒有檳榔子萃取物處理的對照組 (43.43%) 來說有明顯的 G₀/G₁ 期下降 (27.37%) 的情形出現，而在 ACO 0.4 mM 的條件下，相對於對照組 (7.71%) 來說，也能夠發現明顯的 G₂/M 期上升 (30.63%)，而在 ACO 0.8 mM 的情況下，相對於對照組 (52.37%) 來說，也出現了 S 期上升，並達到統計學上的顯著差異 (80.63%)，這樣的結果也和之前實驗所得到的：在 ACO 0.4 Mm 開始，SAS 細胞的外表形態與存活能力都會明顯受到檳榔子萃取物影響互相呼應。而此細胞週期的變化，正是細胞週期出現 S 期和 G₂/M 期停滯的明顯特徵，也就是說在高濃度的環境中，檳榔素的確可以造成 SAS 細胞發生細胞週期變異。

檳榔成分影響 SAS 細胞之細胞週期調控分子

為了更深入研究 SAS 細胞暴露於檳榔成分所造成的細胞週期停滯背後的分子機制，是否真的與 Chk1、Chk2 兩個檢查點蛋白有關，我們在以不同濃度的檳榔子

萃取物與檳榔素分別對 SAS 細胞處理二十四小時後，利用西方點墨法分析 SAS 細胞中與細胞週期調控相關的各個分子表現。

檳榔子萃取物對 SAS 舌癌細胞之細胞週期調控分子的影響

以表現恆定的 GAPDH 作為對照組，可以發現隨著檳榔子萃取物濃度的提高，SAS 細胞內代表活化態的 p-Chk2 (Thr 68) 會有表現上升的情形發生，而 Chk1 則否 (Figure 6)。除此之外，一旦檳榔子萃取物濃度提高，SAS 舌癌細胞內的 p53 蛋白表現也隨之增加，並出現了被磷酸化 (Ser-20) 的情形，其下游分子 P21 表現也有明顯上升的趨勢出現。檳榔子萃取物也促進了 Cyclin D1 的表現，相對的 Cyclin B1 表現則是隨著檳榔子萃取物濃度增加而逐漸減弱，而在細胞週期調控中會與 Cyclin B1 結合的 Cdc2 蛋白表現量雖然無明顯變化，但是在 Tyr 15 抑制位置上被磷酸化的 p-Cdc2 表現則是有些許上升，這樣的結果也和檳榔子萃取物造成了 SAS 細胞內 Cdc25C 被磷酸化 (p-Cdc25C) 而喪失去磷酸酶功能相吻合。另外隨著檳榔子萃取物濃度的提高，SAS 細胞內代表抗細胞凋亡的 Bcl2 蛋白與代表進入細胞週期 M 期的 p-H3 蛋白表現也越來越低，這樣的結果也和前述檳榔子萃取物存在細胞毒性並且能夠使 SAS 細胞之細胞週期停滯的結論遙相呼應 (Figure 7)。

我們也利用聚合酶連鎖反應往上追溯這些與細胞週期調控有關的幾個主要基因受檳榔子萃取物影響後，在 RNA 層面的表現。以 Beta-actin (BAC) 作為對照組，可以發現隨著檳榔子萃取物濃度提高，Cyclin B1 的基因表現越來越低，Cdc2 的表現量則沒有明顯變化，P21 的表現則是有越來越高的情況，這樣的結果大致上都與檳榔子萃取物對這些基因在蛋白質層面表現所造成的改變一致，稍有不同的是在 p53 和 Cdc25C 的 RNA 表現上似乎無明顯變化 (Figure 8)，這也許可以解釋為，檳榔子萃取物對於 p53、Cdc25C 表現的影響，是利用蛋白酶或其他方式進行，

不改變其基因的 RNA 轉錄，屬於蛋白質層面的調控。

檳榔素對 SAS 舌癌細胞之細胞週期調控分子的影響

實驗同樣以恆定表現的 GAPDH 作為對照組，隨著檳榔素濃度的提高，SAS 舌癌細胞內代表活化態的 p-Chk2 (Thr 68) 同樣有表現上升的情形發生，而 Chk1 則否 (Figure 9)，除此之外，伴隨著檳榔素濃度提高，SAS 舌癌細胞內的 p53 蛋白表現也同樣隨之增加，P21，與檳榔子萃取物不同的是，檳榔素似乎能夠促進 Cyclin B1 的表現，而 Cyclin D1 表現則是隨著檳榔素濃度提高而逐漸減弱。細胞裡面磷酸化狀態的 p-Cdc2 (Tyr15) 則無明顯趨勢，只在 ACO 0.8 mM 時有些許變弱。去磷酸酶 Cdc25C 的表現則是呈現波形，一開始先隨著檳榔素濃度提高而變高，在 ACO 0.4 mM 時達到最高，在 ACO 0.8 mM 時則下降，而抗細胞凋亡的 Bcl-2 也有類似表現，都是在 ACO 0.4 mM 時達到高峰，在 ACO 0.8 mM 開始下降，另一個被認為能夠促進細胞凋亡的 Bax 蛋白則是會隨著檳榔素濃度提高而有表現下降的現象 (Figure 10)。

在 RNA 層面的表現方面，以 Beta-actin (BAC) 作為表現恆定的對照組，可以得知隨著檳榔素濃度提高，SAS 細胞內的 Cyclin B1 與 p53 基因的表現都有逐漸上升的情形，Cdc25C 表現則是先隨著檳榔素濃度提高而上升，同樣在 ACO 0.4 mM 達到最高，在 ACO 0.8 mM 時才再度下降 (Figure 11)，這樣的結果和之前我們在蛋白質層面的分析所得到的結果是一致的。

ATM/ATR 在檳榔子萃取物對 SAS 舌癌細胞所造成之影響中所扮演之角色

為了更進一步探討受到檳榔子萃取物所影響的各個分子間之上下游關係，我們在 SAS 細胞培養液中預先加入咖啡因處理三十分鐘，咖啡因是一種廣效型的 ATM/ATR 抑制劑，待其將 Chk1、Chk2 上游的 ATM/ATR 抑制後，接著以檳榔子萃取物處理 SAS 舌癌細胞二十四小時後，進行觀察。


咖啡因對檳榔子萃取物引起的 SAS 舌癌細胞外表型態變異之影響

在沒有檳榔子萃取物的情況下，SAS 舌癌細胞呈現正常貼附於培養皿底部的多邊形 (Figure 12a)，而 ANE 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度的檳榔子萃取物處理二十四小時後，細胞的外表出現了如前所述的明顯變化，而在濃度 caffeine 0.5 mM、caffeine 1 mM 處理 SAS 細胞二十四小時後，細胞外表形態並無太大改變 (Figure 12c、Figure 12e)，而當 caffeine 濃度提高到 2 mM 時，細胞有稍微變圓與細胞內出現空泡的現象發生 (Figure 12g)，但與 ANE 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的實驗組 (Figure 12b) 比較下，該現象並不算太明顯，但是一旦 SAS 細胞同時處理了 caffeine 與檳榔子萃取物 ANE 後，即使是在咖啡因濃度最低的 ANE 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +caffeine 0.5 mM 實驗組中，都可以發現 SAS 細胞的外表形態有明顯的皺縮的現象並有許多死亡細胞出現 (Figure 12d)，若將咖啡因濃度繼續往上提高時，在 ANE 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +caffeine 1 mM 的實驗組中，細胞外表形態的改變與死亡狀況都更加明顯 (Figure 12f)，而在最高濃度咖啡因的 ANE 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +caffeine 2 mM 實驗組中，大多數的 SAS 舌癌細胞已經死亡，僅有少數細胞能夠勉強繼續存活 (Figure 12h)。

Chk2 在檳榔子萃取物對 SAS 舌癌細胞所造成之影響中所扮演之角色

除了咖啡因之外，我們也利用 Chk2 的專一性抑制劑 (2-(4-(4-chlorophenoxy)phenyl)-1H-benzimidazole-5-carboxamide) (Arienti *et al.*, 2005) 來研究受到檳榔子萃取物所影響的各個分子間之上下游關係，我們在 SAS 細胞培養液中預先加入 Chk2 抑制劑處理三十分鐘，待其將細胞內的 Chk2 抑制之後再以檳榔子萃取物處理二十四小時，之後進行觀察。

抑制 Chk2 對檳榔子萃取物引起的 SAS 細胞外表形態變異之影響



在沒有檳榔子萃取物的情況下，SAS 舌癌細胞呈現正常貼附於培養皿底部的多邊形 (Figure 13a)，但在檳榔子萃取物濃度達到 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ 時，SAS 細胞外表形態會出現明顯變化，細胞變圓，內部出現大量空泡，並且有許多已經死亡的細胞懸浮在培養液中，細胞數目或密度都大幅下降 (Figure 13b)，而在單純加入較低濃度的 Chk2 抑制劑 (50 nM) 時，除了有少數懸浮細胞外，細胞的外表形態基本上與沒有任何處理的對照組細胞一樣 (Figure 13c)，若單純將 Chk2 抑制劑濃度提高為 100 nM 後，可以發現 SAS 細胞外表稍微變圓，漂浮在培養液中的死亡細胞也明顯變多 (Figure 13e)，而若是對 SAS 舌癌細胞先進行 Chk2 抑制劑處理後再加入檳榔子萃取物，在兩種 Chk2 抑制劑濃度，細胞外表形態都會出現類似經過檳榔子萃取物 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ 處理後的變化 (Figure 13d、Figure 13f)。

抑制 Chk2 對檳榔子萃取物細胞毒性之影響

依照前述實驗方法，首先將 SAS 細胞預先以 Chk2 抑制劑處理三十分鐘，接著再加入檳榔子萃取物作用二十四小時後，以 trypan blue 染劑計算細胞存活數與相對於對照組的存活比率。由 Figure 14 可得，經過各種處理後的 SAS 細胞之細胞存活總數對於沒有受到任何處理的對照組細胞之存活率分別為 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$: 56.9%、Chk2 inhibitor 50 nM : 82.64%、ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ +Chk2 inhibitor 50 nM : 66.42%、Chk2 inhibitor 100 nM : 71.7%、ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ +Chk2 inhibitor 100 nM : 58.32%，由此也再一次證明了檳榔子萃取物本身的確存在著細胞毒性，而雖然較低濃度的 Chk2 抑制劑（50 nM）對於細胞存活的影響並不明顯，但是一旦 Chk2 抑制劑濃度提高到 100 nM 時，則可以清楚發現將 SAS 舌癌細胞內的 Chk2 抑制之後，會導致 SAS 細胞死亡，而這樣子的結果，在抑制 Chk2 後並進一步加入檳榔子萃取物 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ 的兩個實驗組中表現得更加明顯。綜合本實驗結果可知，Chk2 檢查點分子的表現，的確在 SAS 細胞面對檳榔子萃取物造成之傷害時的存活中扮演重要角色。

抑制 Chk2 對檳榔子萃取物引起的 SAS 細胞之細胞週期變異之影響

在檳榔子萃取物與 Chk2 抑制劑的作用下，代表細胞凋亡的 sub-G₀/G₁ 比例在各個實驗組中分別為 NC : 6.52%、ANE 800 $\mu\text{g/ml}$: 12.19%、Chk2 inhibitor 50 nM : 7.16%、ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ +Chk2 inhibitor 50 nM : 9.91%、Chk2 inhibitor 100 nM : 10.18%、ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ +Chk2 inhibitor 100 nM : 10.44% (Figure 15a)。此結果也

與之前在 Chk2 抑制劑對檳榔子萃取物細胞毒性影響實驗中所得到的結果雷同，都證明了 Chk2 的存在與否，的確能夠影響 SAS 細胞的存活能力。

在細胞週期的分析方面，由 Figure 15b 可知，隨著 Chk2 抑制劑濃度的提高，SAS 細胞比起沒有經過任何處理的對照組細胞有著明顯的 G₁ 期停滯的現象發生，其 G₁ 期比例分別為 NC：32.46%、ANE 800 mg/ml：30.66%、Chk2 inhibitor 50nM：34.54%、ANE 800 µg/ml+Chk2 inhibitor 50 nM：35.11%、Chk2 inhibitor 100 nM：41.69%、ANE 800 µg/ml+Chk2 inhibitor 100 nM：45.54%。因此證明，SAS 細胞內的 Chk2 存在與否，除了影響細胞的存活能力之外，也影響了細胞週期的調控。

抑制 Chk2 影響檳榔子萃取物調控 SAS 細胞之細胞週期分子

實驗以恆定表現的 GAPDH 作為對照組，可以發現檳榔子萃取物的確能夠有效磷酸化 Chk2，使得 Chk2 活化，而隨著 Chk2 抑制劑濃度提高，Chk2 磷酸化的情形也會越來越低，而 Chk2 抑制劑對於 Chk2 活性的抑制作用，似乎並不牽涉到蛋白質層面上量的改變 (Figure 16)。檳榔子也能夠降低 Cyclin B1 的表現，且利用 Chk2 抑制劑將細胞內 Chk2 抑制之後，似乎也降低了 Cyclin B1 的表現，而檳榔子萃取物與 Chk2 抑制劑對於 Cyclin B1 的向下調控作用似乎有加成性。在高濃度的 Chk2 抑制劑環境下 (100 nM)，對於 p-Cdc2 (Tyr15) 與 Cdc2 蛋白本身來說，都有抑制的情形。和早先 ANE dose dependent 實驗中所得到的結果一致，檳榔子萃取物能提高 SAS 細胞中 Cdc25C 蛋白的表現，相反的，Chk2 抑制劑則能降低 Cdc25C 蛋白的表現量。Cyclin D1 則是會受到檳榔子萃取物的影響而增加，若是抑制細胞內的 Chk2，則 Cyclin D1 的表現也會受到影響。檳榔子萃取物同樣也能促進 p53 的磷酸化與 p53 下游基因 p21 的表現，而隨著 Chk2 抑制劑濃度的提高，檳

椰子萃取物引起的 p53 活化與 p21 表現都會受到抑制。檳榔子萃取物使得 p-H3 表現降低，這樣的結果也與之前檳榔子萃取物能導致細胞週期 M 期停滯吻合，而 Chk2 抑制劑的使用，也能夠降低細胞內 p-H3 的表現 (Figure 17)。



第四章 討論


檳榔子萃取物與檳榔素對於細胞生長的影響

檳榔嚼食是造成口腔癌及口腔粘膜下纖維化等口腔疾病最主要的致病因素，除了流行病學的研究之外，近年來也有越來越多的文獻開始探討檳榔成分所存在的基因毒性與細胞毒性。我們將不同濃度的檳榔子萃取物與檳榔素分別加入 SAS 細胞中處理二十四小時。檳榔子萃取物造成 SAS 細胞形態變化，細胞內空泡增加的情形皆與以往在 KB 細胞裡的研究結果雷同，而在檳榔子萃取物濃度 ANE 400 $\mu\text{g/ml}$ 之前的實驗組中，SAS 細胞的存活比率都至少有 95% 以上，當檳榔子萃取物濃度提高至 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ 時，SAS 細胞的存活率才有明顯降低的情形出現，而在檳榔素與 SAS 細胞存活的實驗中，隨著檳榔素的濃度提高，在 ACO 0.1 mM 到 ACO 0.2 mM 的範圍中，SAS 細胞的存活比率反而比沒有任何處理的對照組高，這樣的結果也與本實驗室在血管內皮細胞 EAHY 中所發現的，低濃度的檳榔素具有促進細胞存活的能力一致，而一旦檳榔素的濃度提高到 ACO 0.4 mM 時，SAS 舌癌細胞的存活能力迅速降低至 80% 左右，甚至在 ACO 0.8 mM 時，細胞存活率更是只有 66.71%。

從以上結果中可發現，SAS 細胞對於檳榔子萃取物與檳榔素有不同的毒性耐受力，為甚麼來自於檳榔子萃取物內的主要成分檳榔素和檳榔子萃取物本身之間對於 SAS 細胞的作用會有如此不同的結果？這可能是由於檳榔子萃取物的成分過於複雜，除了檳榔素之外還包含有像是檳榔啖 (Arecaidine)、四氫菸酸 (Guvacine)、四氫菸酸甲酯 (Guvacoline)、單寧 (tannin)、脂肪 (fats)、多酚化合物 (polyphenolic compounds)、粗纖維、醣類及鐵等其他物質，是否因為這些其它複雜成分的存在

而影響了檳榔素對於 SAS 細胞的細胞毒性，在我們的研究中並不清楚，而複雜的檳榔成分也正是目前科學界對於檳榔毒性的研究中所面臨到的主要困難。另外我們在實驗中所使用的檳榔素是直接向廠商購買的純化合物，而檳榔子萃取物則是由本實驗室自行經過冷凍乾燥等繁瑣步驟配製而成，因此在檳榔子萃取物的製備過程中，是否有某些檳榔成分的流失？這樣的因素是否導致檳榔子萃取物毒性的改變也應該列入考慮。

檳榔成分活化 Check Point Kinase 2 (Chk2)



有報告指出，檳榔素能夠引起人類表皮細胞中的 DNA damage pathway 的活化，磷酸化細胞內的 ATM、Chk1、Chk2，造成細胞週期 G₂/M 期停滯的情形 (Tsai *et al.*, 2008)，而本實驗也發現檳榔子萃取物與檳榔素對於 SAS 細胞內的 Chk2 有活化的作用。根據目前為止的許多報告指出，當細胞內的 DNA 發生雙股螺旋斷裂時，細胞內的 ATM 首先受到活化，活化狀態的 ATM 會更進一步將其下游的 Chk2 上 Thr-68 的位置磷酸化 (Ahn *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2007)，而 Chk1 則主要由上游的 ATR 所活化，主要是細胞受到紫外光、放射線、某些基因毒性造成的複製叉停滯或是 DNA 交互連結等傷害時發生 (Cimprich *et al.*, 2008; Mordes *et al.*, 2008)。在先前的許多報告中，檳榔子萃取物被證實能夠造成老鼠腎細胞 (Wary and Sharan, 1988)、人類口腔上皮細胞 (Sundqvist *et al.*, 1989) 以及人類口腔黏膜纖維母細胞 (Jeng *et al.*, 1994) 之 DNA 斷裂，而檳榔素也能夠造成老鼠骨髓細胞 (Panigrahi and Rao, 1982) 以及老鼠腎細胞 (Wary and Sharan, 1988) 的 DNA 斷裂。綜合這許多前人的研究結果以及由本實驗所得到的結論似乎正暗示了檳榔成分能夠造成 SAS 舌癌細胞之 DNA 螺旋斷裂，並進一步啟動了細胞內的 ATM-Chk2 訊息傳遞路徑之檢查點機制，惟檳榔成分所造成之 SAS 舌癌細胞之 DNA 斷裂與 ATM 活化的直接

證據仍需待之後更深入的研究。

ATM 與 Chk2 對 SAS 細胞存活能力的影響

本研究已經證實檳榔子萃取物與檳榔素皆能活化SAS細胞內的Chk2表現，因此為了進一步釐清Chk2以及其上游ATM在檳榔子萃取物誘發細胞毒性過程中所扮演的角色，我們使用了不同的抑制劑進行研究。

2-(4-(4-chlorophenoxy)phenyl)-1H-benzimidazole-5-carboxamide為一種專一性的Chk2抑制劑 (Arienti *et al.*, 2005)，而咖啡因 (1,3,7-Trimethylxanthine) 則是一種廣效型的phosphoinositide-3-kinase-related kinases (PI3KKs) 抑制劑，被證實能夠有效的抑制細胞內的ATM與ATR活性 (Russell *et al.*, 1995; Sarkaria *et al.*, 1999; Hall-Jackson *et al.*, 1999; Blasina *et al.*, 1999)。在我們的實驗中可以發現，咖啡因本身對於SAS舌癌細胞外表型態的影響很有限，僅在最高濃度的2 mM時，SAS舌癌細胞有較為明顯的異常出現，但是即使在最低濃度的咖啡因環境(0.5 mM)下，一旦合併使用檳榔子萃取物，SAS細胞除了外表改變外，更會有明顯的死亡情況發生；而在使用Chk2抑制劑的各個實驗中也有和使用咖啡因類似的結果，同時處理Chk2抑制劑以及檳榔子萃取物的實驗組中，SAS舌癌細胞的外表形態都會比單單處理Chk2抑制劑的細胞有著更明顯的變化，在SAS細胞的存活性實驗與由流式細胞儀所分析得到的細胞凋亡實驗中，也得到類似的結果，同時處理Chk2抑制劑與檳榔子萃取物的細胞，其死亡程度與細胞凋亡比例都高於僅有Chk2抑制劑作用的實驗組別。如此有趣的現象可能與ATM和Chk2等Check Points檢查點蛋白在細胞中所扮演的角色有關，當細胞受到DNA damage時，細胞內會啟動一連串的機制使得細胞週期暫時停止，直到細胞內所受到的損傷被修補完成後，細胞週期才會繼續往前進，這樣的機制即稱為檢查點 (Check Point) (Hartwell and Weinert, 1989)，

而ATM除了參與Check Point機制的活化外，也被認為參予了許多DNA repair的機制（Cortez *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000; Gatei *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000），在正常的一般細胞中，ATM是以homodimer的結構存在，但是一旦細胞受到DNA damage時，ATM會發生結構上的改變，其上serine-1981的位置會被磷酸化，並開始活化下游的許多參與DNA repair的分子，像是NBS1(Nijmegen breakage syndrome 1)、BRCA1 (breast cancer 1) 與SMC1 (structural maintenance of chromosomes 1) 等等分子（Bakkenist and Kastan, 2003）。而目前臨床上所使用的Chk1抑制劑UCN-01也被證實因為破壞了細胞內的檢查點機制而能夠增加腫瘤細胞對化學治療與放射線的敏感性（Kawabe, 2004），因此若是使用Chk2抑制劑或是咖啡因將細胞內的Chk2以及ATM等分子抑制後，將會破壞SAS舌癌細胞內的檢查點與DNA修補機制，使得SAS細胞無法面對檳榔子萃取物所造成的細胞毒性，在DNA受到損傷的情況下繼續進行錯誤的細胞分裂，因而造成由mitotic catastrophe引起的細胞凋亡（Castedo *et al.*, 2004），這也許可以解釋為何在同時處理抑制劑與檳榔子萃取物的實驗組中，其細胞存活率都遠較對照組與單純處理抑制劑的組別為低，除此之外，檳榔成分所造成的細胞死亡是否包含病理性死亡或其他死亡方式則須更進一步研究。

Chk2 對 SAS 細胞之細胞週期調控分子的影響

在以往有許多研究指出，當細胞面臨DNA damage的情況下，細胞內的檢查點機制（Check Point）會受到調控，Chk2能被活化，並進一步磷酸化下游Cdc25C蛋白上的Serine-216位置（Matsuoka *et al.*, 1998; Blasina *et al.*, 1999; Chaturvedi *et al.*, 1999），使Cdc25C失去活性，喪失對Cyclin/CDK complex活性的調控，造成細胞週期暫時停滯，避免細胞週期進入M期而開始有絲分裂。而p53是另一個主要的DNA-damage kinase路徑的下游分子（Harris and Levine, 2005; Jin and Levine,

2001), 在細胞出現DNA damage的情況下, p53-dependent的訊息傳遞路徑會加強其下游p21的轉錄, 使細胞週期會有G₁期停滯的現象 (Vogelstein et al., 2000), 而p21本身在 γ 放射線所造成的DNA傷害中, 也足以造成細胞週期M期停滯 (Bunz et al., 1998), 若是細胞內的DNA損傷持續擴大, 則p53-dependent的訊息傳遞路徑將活化一連串的細胞凋亡機制使細胞死亡, 避免對個體產生更大傷害 (Fridman and Lowe, 2003; Vousden and Lu, 2002)。在Tsai等學者的實驗中發現檳榔素能夠藉由抑制人類表皮細胞中p53的活性而降低DNA repair的能力 (Tsai et al., 2008)。而在我們的研究中則提供了其背後可能的分子機制, 我們發現檳榔子萃取物與檳榔素等檳榔成分確實能夠活化SAS細胞的Chk2表現, 檳榔子萃取物也能調控Cdc25C的表現量, 並且使得p53有表現提高和磷酸化活化的情形發生, 並進而促進p21的生成, 這樣的結果不僅與目前學者們在DNA damage與Check Point上的報告吻合, 也和我們發現的檳榔子萃取物導致了SAS細胞有G₂/M期的細胞週期停滯現象以及檳榔成分存在細胞毒性物質一致。另外我們的實驗中也發現了, 檳榔子萃取物與檳榔素都能夠直接影響參與細胞週期進行的Cyclin B1和Cyclin D1基因, 不管是在RNA層面或蛋白層面的表現量都會受到檳榔子萃取物與檳榔素調控, 令人感到有趣的是, Chk2活性同樣也影響了Cyclin B1、Cyclin D1以及Cdc2在SAS細胞內的表現情形, 如此結果也與Lee等學者在GK以及KB細胞中發現檳榔素能提高Cyclin B1和p-Cdc2的表現雷同 (Lee et al., 2006), 而這樣的上下游關係, 或許正是檳榔子萃取物對於SAS舌癌細胞之細胞週期調控的可能機制之一。

總的來說, 檳榔嚼食等不良習慣已經深入台灣各個社會階層, 而口腔癌以及其他口腔疾病正虎視眈眈的威脅著國人的健康, 由我們的實驗證實了Chk2的表現在檳榔成分引起的細胞變異中的確扮演著舉足輕重的角色, 並且提供了檳榔子萃取物與檳榔素對於細胞變異的可能分子機制, 希望藉由我們的研究, 在未來臨床應用上, 能更進一步釐清Chk2在口腔癌與口腔疾病中所佔的地位, 而Chk2也許可以做為檳榔引起的口腔疾病治療中一個新的標的, 也希望能透過我們對此一本

土特色問題的研究，提供對此本土問題的治療策略。



第五章 總結

從本實驗結果可以得到：

1. 檳榔子萃取物與檳榔素在高濃度下對於 SAS 舌癌細胞都存在有細胞毒性，尤其是分別在 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ 與 ACO 0.4、0.8 mM 時最為明顯，而該濃度的範圍可做為未來進一步研究的標準。
2. 高濃度的檳榔子萃取物與檳榔素都能造成細胞凋亡 (apoptosis) 情形的發生，這樣的結果也與細胞存活性實驗的結果一致。這暗示檳榔子萃取物與檳榔素對於 SAS 舌癌細胞的細胞毒性可能是透過細胞凋亡路徑，而其中是否與細胞壞死 (necrosis) 有關仍需進一步研究。
3. 檳榔子萃取物與檳榔素能夠活化 SAS 細胞內的 Chk2 檢查點分子，但 Chk1 的角色則需更進一步研究。
4. 檳榔子萃取物可以造成 SAS 細胞有細胞週期之 G_2/M 期停滯，尤其在 ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下與對照組具有顯著差異，這樣的結果應與細胞內的 Chk2 活性受到活化有關。
5. Chk2 能夠調控下游的 p53、p21 以及 Cdc25C 的活性，這樣的機制似乎正是檳榔子萃取物所造成 SAS 細胞有細胞週期之 G_2/M 期停滯的主要路徑。
6. Chk2 不僅參與了 SAS 細胞內的檢查點機制，本實驗也證明了 Chk2 也能夠直接調控細胞內之細胞週期調控分子如 Cyclin B1、Cyclin D1 和 Cdc2 的表現。
7. 咖啡因以及 Chk2 抑制劑的使用，證明了 ATM 與 Chk2 在 SAS 舌癌細胞面對外界壓力時的存活能力上的確扮演著重要角色，因此在未來對於口腔疾病的臨床治療上，ATM-Chk2 訊息傳遞路徑也許可作為一項新的標的。
8. 檳榔子萃取物與檳榔素活化 SAS 舌癌細胞內檢查點機制之總模型圖可由 Figure 18 表示。

9. 本研究提供了嚼食檳榔導致口腔疾病的可能分子機制，也希望能透過我們對此一本土特色問題的研究，提供對此本土問題的治療策略。



第六章 參考文獻

1. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):1039-47.
2. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):50-7.
3. Arienti KL, Brunmark A, Axe FU, McClure K, Lee A, Blevitt J, Neff DK, Huang L, Crawford S, Pandit CR, Karlsson L, Breitenbucher JG. Checkpoint kinase inhibitors: SAR and radioprotective properties of a series of 2-arylbenzimidazoles. *J Med Chem*. 2005 Mar 24;48(6):1873-85.
4. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003 Jan 30;421(6922):499-506.
5. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5):421-9.
6. Blasina A, de Weyer IV, Laus MC, Luyten WH, Parker AE, McGowan CH. A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr Biol*. 1999 Jan 14;9(1):1-10.
7. Blasina A, Price BD, Turenne GA, McGowan CH. Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr Biol*. 1999 Oct 7;9(19):1135-8.
8. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998 Nov 20;282(5393):1497-501.
9. Cakir Y, Ballinger SW. Reactive species-mediated regulation of cell signaling and

- the cell cycle: the role of MAPK. *Antioxid Redox Signal*. 2005 May-Jun;7(5-6):726-40.
10. Cardillo M, Berchem G, Tarkington MA, Krajewski S, Krajewski M, Reed JC, Tehan T, Ortega L, Lage J, Gelmann EP. Resistance to apoptosis and up regulation of Bcl-2 in benign prostatic hyperplasia after androgen deprivation. *J Urol*. 1997 Jul;158(1):212-6.
 11. Castedo M, Kroemer G. [Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis]
 12. Chang JC, Chang HH, Lin CT, Lo SJ. The integrin alpha6beta1 modulation of PI3K and Cdc42 activities induces dynamic filopodium formation in human platelets. *J Biomed Sci*. 2005 Dec;12(6):881-98.
 13. Chang MC, Ho YS, Lee JJ, Kok SH, Hahn LJ, Jeng JH. Prevention of the areca nut extract-induced unscheduled DNA synthesis of gingival keratinocytes by vitamin C and thiol compounds. *Oral Oncol*. 2002 Apr;38(3):258-65.
 14. Chang MC, Ho YS, Lee PH, Chan CP, Lee JJ, Hahn LJ, Wang YJ, Jeng JH. Areca nut extract and arecoline induced the cell cycle arrest but not apoptosis of cultured oral KB epithelial cells: association of glutathione, reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis*. 2001 Sep;22(9):1527-35.
 15. Charrier-Savournin FB, Château MT, Gire V, Sedivy J, Piette J, Dulic V. p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol Biol Cell*. 2004 Sep;15(9):3965-76.
 16. Chaturvedi P, Eng WK, Zhu Y, Mattern MR, Mishra R, Hurle MR, Zhang X, Annan RS, Lu Q, Faucette LF, Scott GF, Li X, Carr SA, Johnson RK, Winkler JD, Zhou BB. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*. 1999 Jul 15;18(28):4047-54.
 17. Chen W, Wilborn M, Rudolph J. Dual-specific Cdc25B phosphatase: in search of the catalytic acid. *Biochemistry*. 2000 Sep 5;39(35):10781-9.

18. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Aug;9(8):616-27.
19. Cortez,D., Wang, Y., Qin, J.& Elledge, S. J. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science.* 1999 Nov 5;286(5442):1162-6.
20. Dasgupta R, Saha I, Pal S, Bhattacharyya A, Sa G, Nag TC, Das T, Maiti BR. Immunosuppression, hepatotoxicity and depression of antioxidant status by arecoline in albino mice. *Toxicology.* 2006 Oct;227(1-2):94-104.
21. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.* 1995 Aug 25;82(4):675-84.
22. Eastman A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 1;91(2):223-31.
23. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1664-72.
24. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003 Dec 8;22(56):9030-40.
25. Gatei M, Young D, Cersaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):115-9.
26. Gillis LD, Leidal AM, Hill R, Lee PW. p21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. *Cell Cycle.* 2009 Jan 15;8(2):253-6.
27. Gupta PC, Ray CS. Epidemiology of betel quid usage. *Ann Acad Med Singapore.* 2004 Jul;33(4 Suppl):31-6.
28. Hall-Jackson CA, Cross DA, Morrice N, Smythe C. ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK.

- Oncogene. 1999 Nov 18;18(48):6707-13.
29. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. Oncogene. 2005 Apr 18;24(17):2899-908.
30. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science. 1989 Nov 3;246(4930):629-34.
31. Health and Vital Statistics, 2008
32. IARC, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. 37, IARC, Lyon, 1985
33. IARC, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. 85, IARC, Lyon, 2004
34. Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. Oral Oncol. 2001 Sep;37(6):477-92.
35. Jeng JH, Ho YS, Chan CP, Wang YJ, Hahn LJ, Lei D, Hsu CC, Chang MC. Areca nut extract up-regulates prostaglandin production, cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression of human oral keratinocytes. Carcinogenesis. 2000 Jul;21(7):1365-70.
36. Jeng JH, Kuo ML, Hahn LJ, Kuo MY. Genotoxic and non-genotoxic effects of betel quid ingredients on oral mucosal fibroblasts in vitro. J Dent Res. 1994 May;73(5):1043-9.
37. Jeng JH, Tsai CL, Hahn LJ, Yang PJ, Kuo YS, Kuo MY. Arecoline cytotoxicity on human oral mucosal fibroblasts related to cellular thiol and esterase activities. Food Chem Toxicol. 1999 Jul;37(7):751-6.
38. Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. J Cell Sci. 2001 Dec;114(Pt 23):4139-40.
39. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature. 2004 Nov

- 18;432(7015):316-23.
40. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 1992 Nov 13;71(4):587-97.
41. Kawabe T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther*. 2004 Apr;3(4):513-9.
42. Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 1995 Nov;24(10):450-3.
43. Lee PH, Chang MC, Chang WH, Wang TM, Wang YJ, Hahn LJ, Ho YS, Lin CY, Jeng JH. Prolonged exposure to arecoline arrested human KB epithelial cell growth: regulatory mechanisms of cell cycle and apoptosis. *Toxicology*. 2006 Mar 15;220(2-3):81-9.
44. Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):613-7.
45. Lin SC, Lu SY, Lee SY, Lin CY, Chen CH, Chang KW. Areca (betel) nut extract activates mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB in oral keratinocytes. *Int J Cancer*. 2005 Sep 10;116(4):526-35.
46. Lu SY, Chang KW, Liu CJ, Tseng YH, Lu HH, Lee SY, Lin SC. Ripe areca nut extract induces G1 phase arrests and senescence-associated phenotypes in normal human oral keratinocyte. *Carcinogenesis*. 2006 Jun;27(6):1273-84.
47. Lu HH, Liu CJ, Liu TY, Kao SY, Lin SC, Chang KW. Areca-treated fibroblasts enhance tumorigenesis of oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2008 Nov;87(11):1069-74.

48. Luch A. Cell cycle control and cell division: implications for chemically induced carcinogenesis. *Chembiochem*. 2002 Jun 3;3(6):506-16.
49. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2007 Feb-Apr;10(1-2):13-29.
50. Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuâsen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*. 2000 May 26;288(5470):1425-9.
51. Manion MK, Hockenbery DM. Targeting BCL-2-related proteins in cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2003 Jul-Aug;2(4 Suppl 1):S105-14.
52. Manion MK, O'Neill JW, Giedt CD, Kim KM, Zhang KY, Hockenbery DM. Bcl-XL mutations suppress cellular sensitivity to antimycin A. *J Biol Chem*. 2004 Jan 16;279(3):2159-65.
53. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*. 1998 Dec 4;282(5395):1893-7.
54. Mordes DA, Cortez D. Activation of ATR and related PIKKs. *Cell Cycle*. 2008 Sep 15;7(18):2809-12.
55. Nair J, Ohshima H, Friesen M, Croisy A, Bhide SV, Bartsch H. Tobacco-specific and betel nut-specific N-nitroso compounds: occurrence in saliva and urine of betel quid chewers and formation in vitro by nitrosation of betel quid. *Carcinogenesis*. 1985 Feb;6(2):295-303.
56. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*. 2002;36:617-56.
57. Oliver AW, Knapp S, Pearl LH. Activation segment exchange: a common

- mechanism of kinase autophosphorylation? *Trends Biochem Sci.* 2007 Aug;32(8):351-6.
58. Panigrahi GB, Rao AR. Chromosome-breaking ability of arecoline, a major betel-nut alkaloid, in mouse bone-marrow cells in vivo. *Mutat Res.* 1982 Feb;103(2):197-204.
59. Phukan RK, Ali MS, Chetia CK, Mahanta J. Betel nut and tobacco chewing; potential risk factors of cancer of oesophagus in Assam, India. *Br J Cancer.* 2001 Sep 1;85(5):661-7.
60. Russell KJ, Wiens LW, Demers GW, Galloway DA, Plon SE, Groudine M. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res.* 1995 Apr 15;55(8):1639-42.
61. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4375-82.
62. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect.* 1999 Feb;107 Suppl 1:5-24.
63. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 2000 May 1;28(9):1387-404.
64. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 1994 Nov 18;79(4):551-5.
65. Sherr CJ. The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol.* 1994 Jan;4(1):15-8.
66. Sherr CJ. Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells.* 1994;12 Suppl 1:47-55; discussion 55-7.
67. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am*

- Physicians. 1995 Jul;107(2):181-6.
68. Shiloh Y. ATM: sounding the double-strand break alarm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2000;65:527-33.
69. Shiloh Y. ATM: ready, set, go. *Cell Cycle.* 2003 Mar-Apr;2(2):116-7.
70. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 2003 Mar;3(3):155-68.
71. Shirname LP, Menon MM, Nair J, Bhide SV. Correlation of mutagenicity and tumorigenicity of betel quid and its ingredients. *Nutr Cancer.* 1983;5(2):87-91.
72. Sundqvist K, Liu Y, Nair J, Bartsch H, Arvidson K, Grafström RC. Cytotoxic and genotoxic effects of areca nut-related compounds in cultured human buccal epithelial cells. *Cancer Res.* 1989 Oct 1;49(19):5294-8.
73. Susnow N, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol.* 2009 Feb;19(1):42-9.
74. Touny LH, Banerjee PP. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate.* 2006 Oct 1;66(14):1542-55.
75. Tsai YS, Lee KW, Huang JL, Liu YS, Juo SH, Kuo WR, Chang JG, Lin CS, Jong YJ. Arecoline, a major alkaloid of areca nut, inhibits p53, represses DNA repair, and triggers DNA damage response in human epithelial cells. *Toxicology.* 2008 Jul 30;249(2-3):230-7.
76. Tu H, Jacobs SC, Borkowski A, Kyprianou N. Incidence of apoptosis and cell proliferation in prostate cancer: relationship with TGF-beta1 and bcl-2 expression. *Int J Cancer.* 1996 Oct 21;69(5):357-63.
77. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

78. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594-604.
79. Wary KK, Sharan RN. Aqueous extract of betel-nut of north-east India induces DNA-strand breaks and enhances rate of cell proliferation in vitro. Effects of betel-nut extract in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1988;114(6):579-82.
80. Wu X, Ranganathan V, Weisman DS, Heine WF, Ciccone DN, O'Neill TB, Crick KE, Pierce KA, Lane WS, Rathbun G, Livingston DM, Weaver DT. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):477-82.
81. Wu MT, Lee YC, Chen CJ, Yang PW, Lee CJ, Wu DC, Hsu HK, Ho CK, Kao EL, Lee JM. Risk of betel chewing for oesophageal cancer in Taiwan. *Br J Cancer*. 2001 Sep 1;85(5):658-60.
82. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000 Nov 23;408(6811):433-9.
83. Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. 2006 Aug;13(8):1351-9.

圖次：

Figure 1a

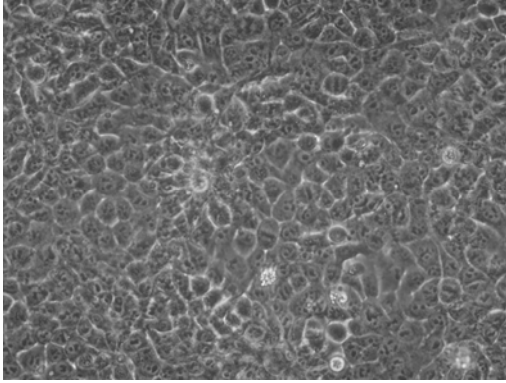


Figure 1b

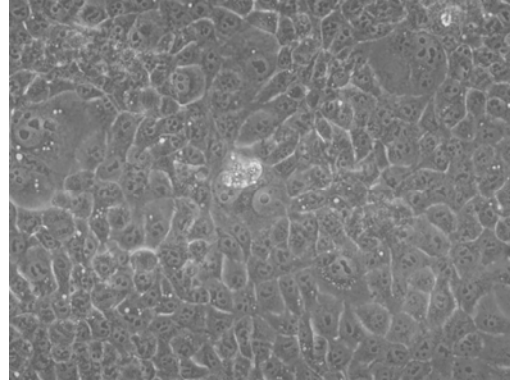


Figure 1c

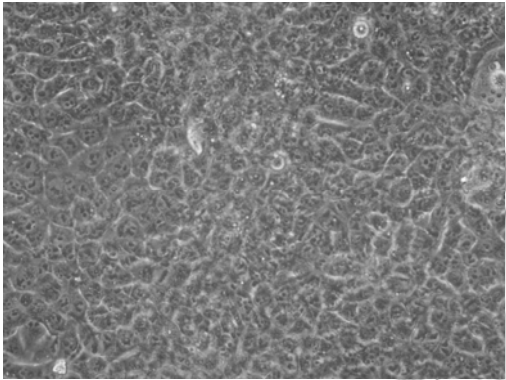


Figure 1d

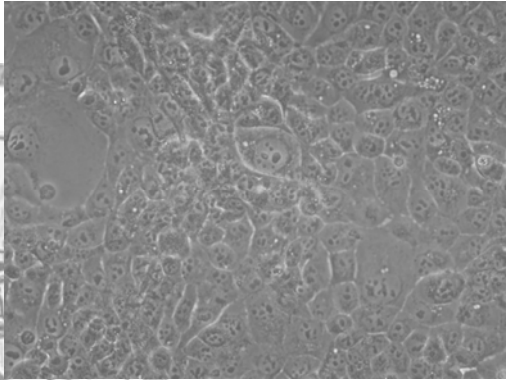


Figure 1e

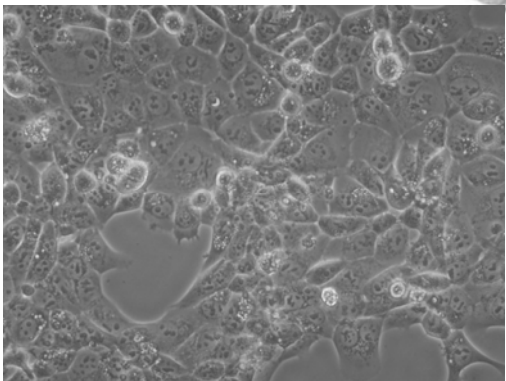


Figure 1f

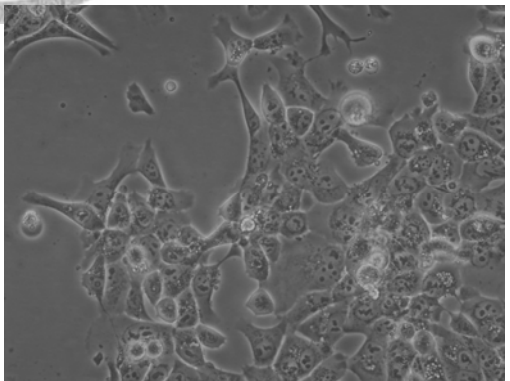


Figure 1 : Effect of AN extraction on morphological changes in SAS cells. (a) untreated SAS cells; (b) SAS cells treated with ANE 100 µg/ml for 24 hours; (c) SAS cells treated with ANE 200 µg/ml for 24 hours; (d) SAS cells treated with ANE 400 µg/ml for 24 hours; (e) SAS cells treated with ANE 800 µg/ml for 24 hours; (f) SAS cells treated with ANE 1200 µg/ml for 24 hours

Figure 2a

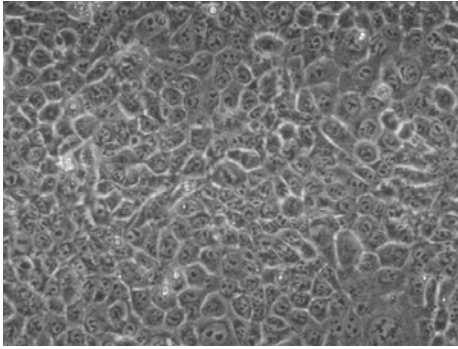


Figure 2b

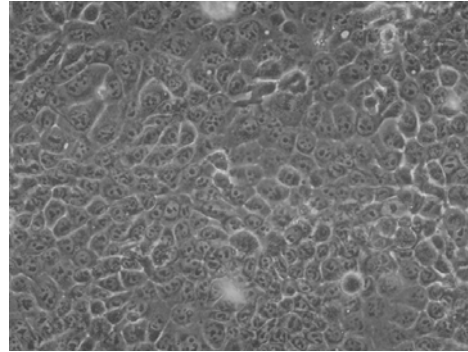


Figure 2c

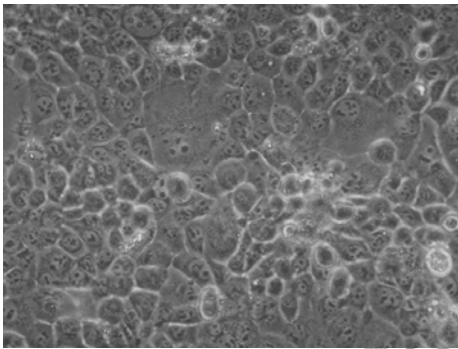


Figure 2d

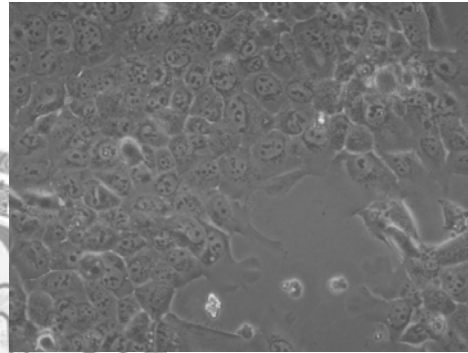


Figure 2e

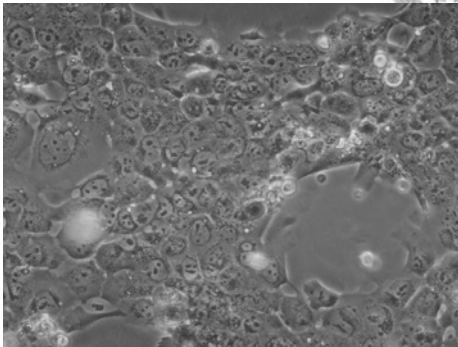


Figure 2 : Effect of Arecoline on morphological changes in SAS cells. (a) untreated SAS cells; (b) SAS cells treated with ACO 0.1 mM for 24 hours; (c) SAS cells treated with ACO 0.2 mM for 24 hours; (d) SAS cells treated with ACO 0.4 mM for 24 hours; (e) SAS cells treated with ACO 0.8 mM for 24 hours

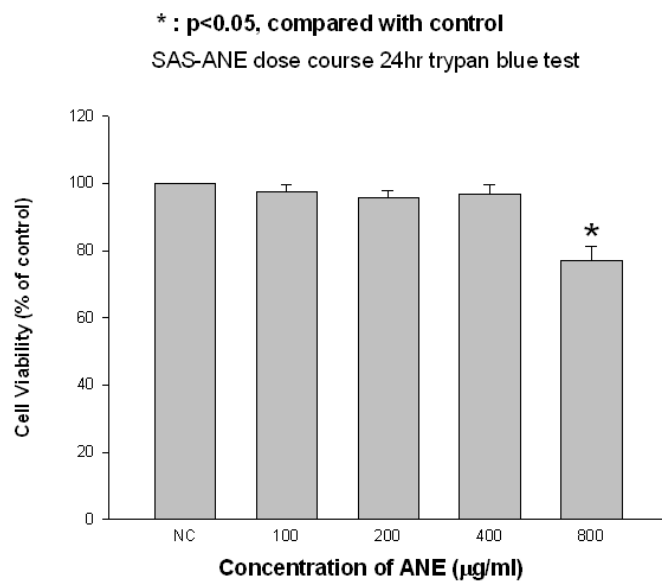


Figure 3a

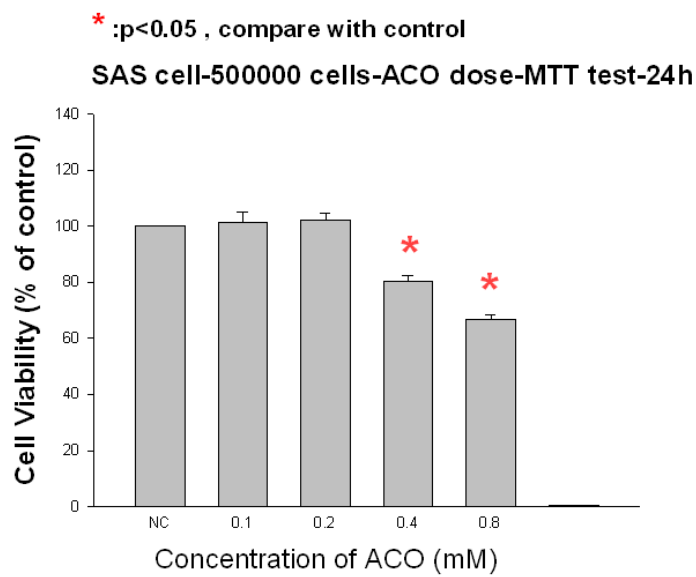


Figure 3b

Figure 3 : Dose dependent effects of ANE on cells proliferation in SAS cells. 5×10^5 Cells were exposed to (a) ANE (100-800 µg/ml) for 24 hours. Cell viability was measured by the trypan blue assay. (b) ACO (0.1-0.8 mM) for 24 hours. Cell viability was measured by the MTT assay. The results were expressed as the mean percentage of control (mean \pm S.E.) . * P<0.05: Compared with negative control

Figure 4a

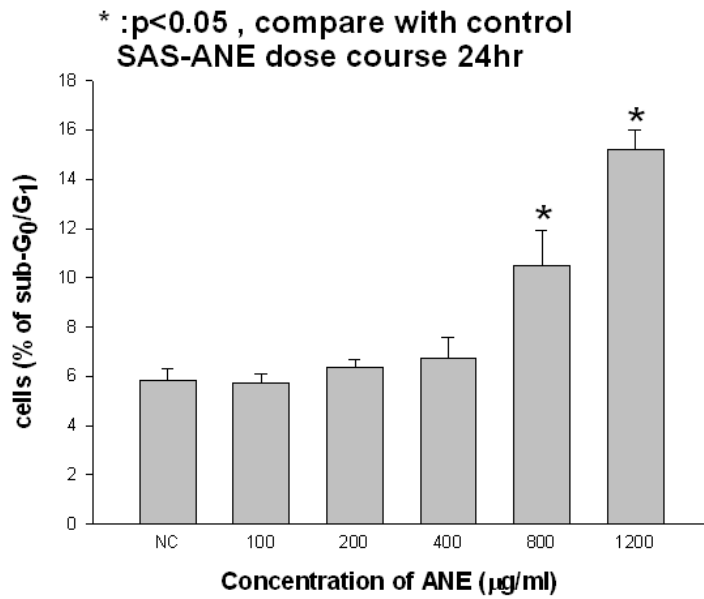


Figure 4b

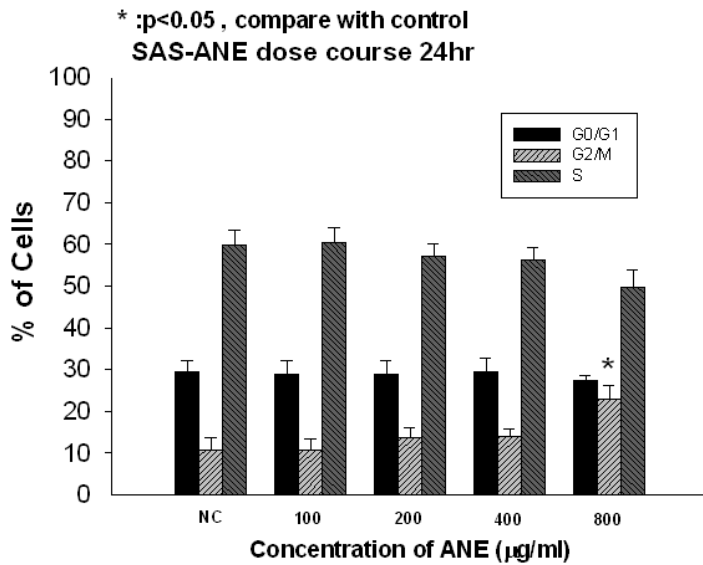


Figure 4 : Dose-dependent effects of ANE on SAS cells. (a) sub-G₀/G₁ population in SAS cells and (b) cell cycle distribution in SAS cells. 5×10^5 Cells were exposed to ANE (100-800 µg/ml) for 24 hours. The results were expressed as the mean percentage of total cells (mean \pm S.E.) . * P<0.05: Compared with negative control

Figure 5a

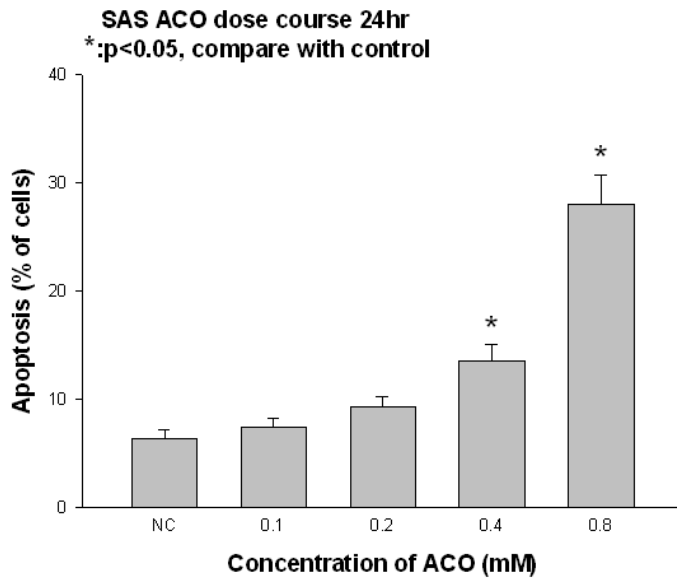


Figure 5b

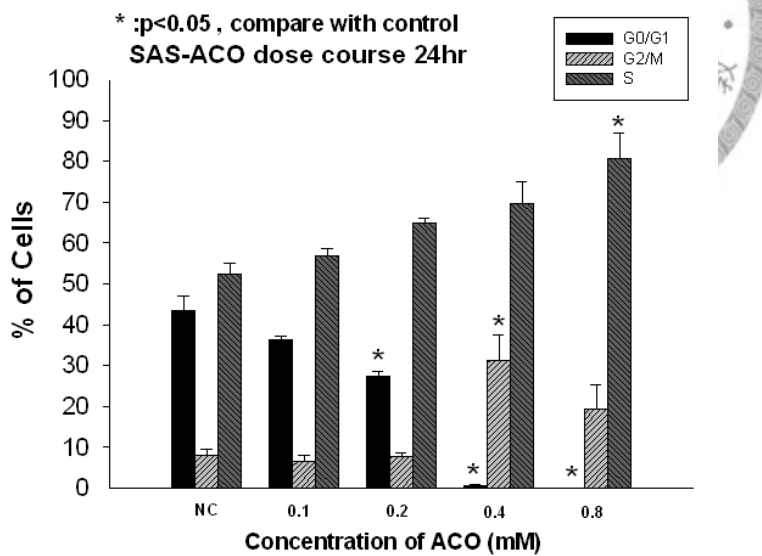


Figure 5 : Dose-dependent effects of ACO on SAS cells. (a) sub-G₀/G₁ population in SAS cells and (b) cell cycle distribution in SAS cells. 5×10^5 Cells were exposed to ACO (0.1-0.8 mM) for 24 hours. The results were expressed as the mean percentage of total cells (mean \pm S.E.) . * P<0.05: Compared with negative control

Figure 6

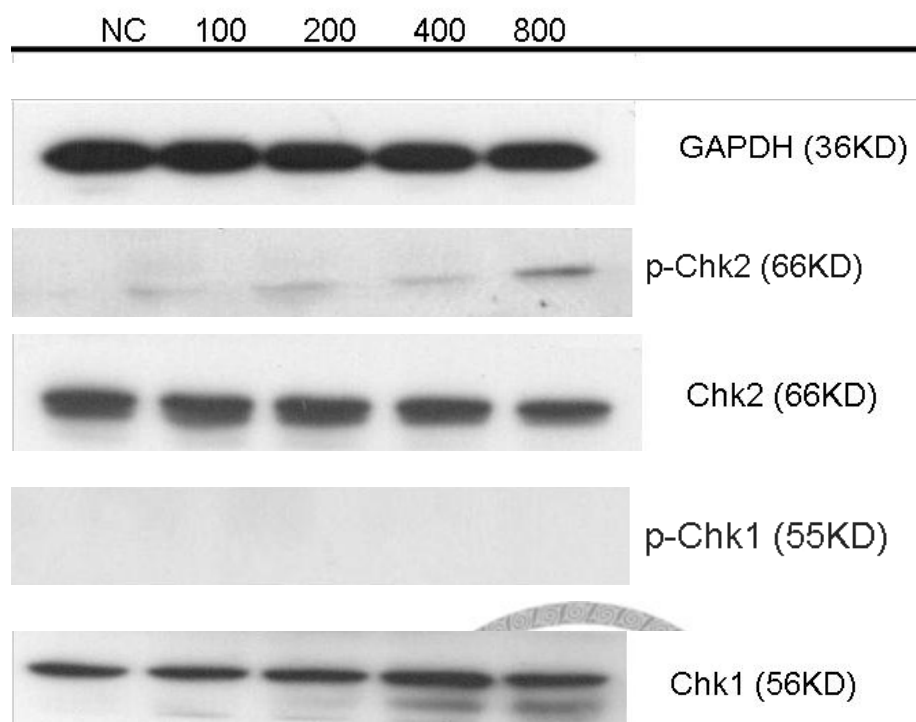


Figure 6 : Effect of ANE on the expression of p-Chk2、Chk2、p-Chk1 and Chk1 in SAS cells. Cells were exposed to ANE (100-800 μg/ml) for 24 hours.

Figure 7

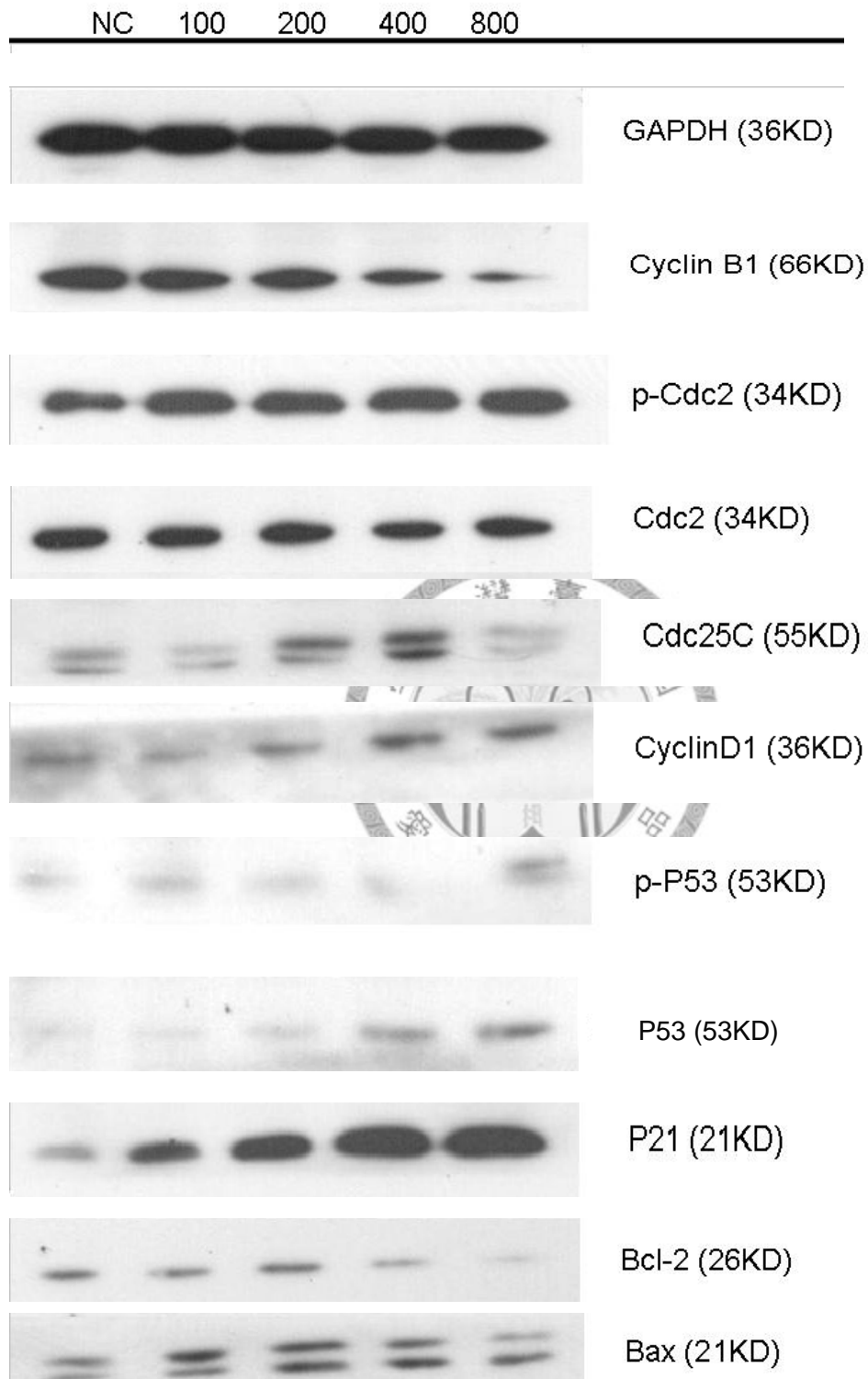


Figure 7 : Effect of ANE to expression of cell cycle regulatory proteins in SAS cells.

Cells were exposed to ANE (100-800 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours.

Figure 8

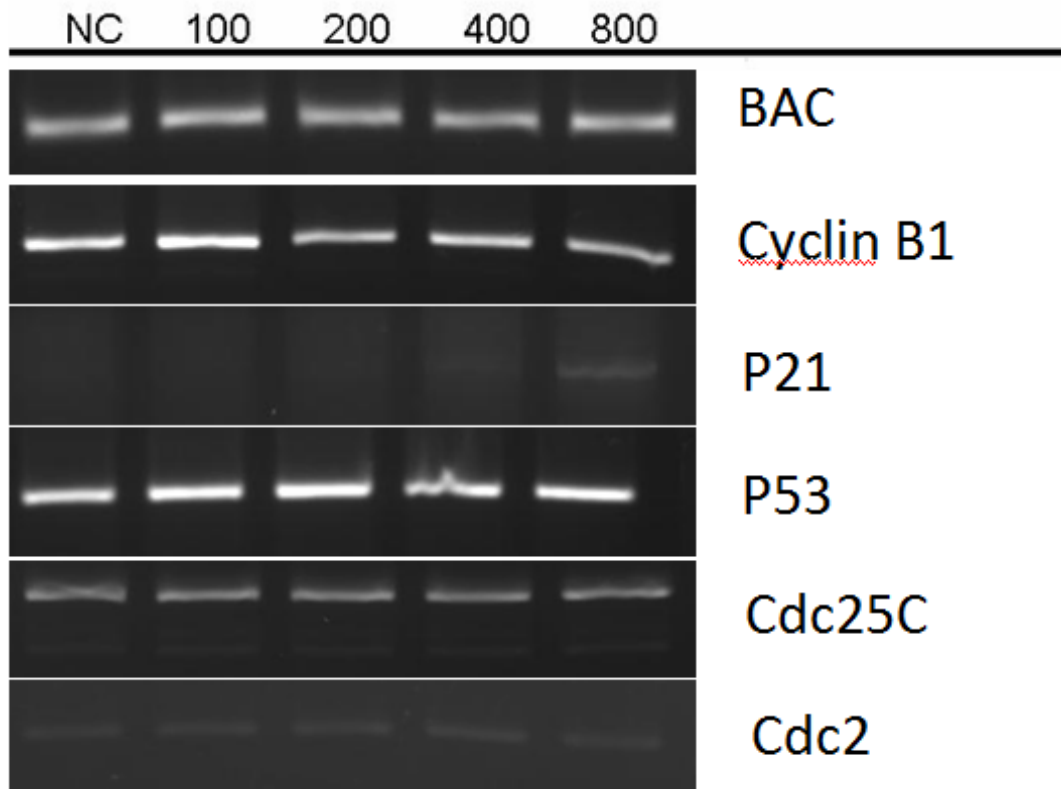


Figure 8 : Effect of ANE to mRNA expression of cell cycle regulatory proteins in SAS cells. Cells were exposed to ANE (100-800 µg/ml) for 24 hours.

Figure 9

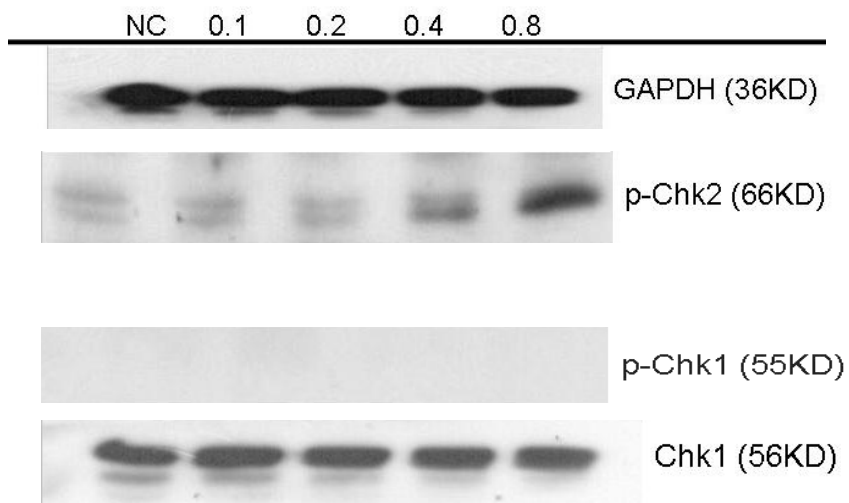


Figure 9 : Effect of ACO on the expression of p-Chk2、Chk2、p-Chk1 and Chk1 in SAS cells. Cells were exposed to ACO (0.1-0.8 mM) for 24 hours.

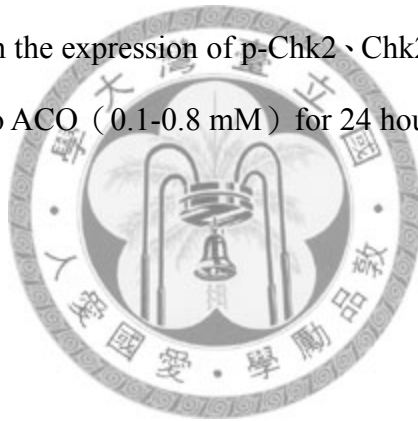


Figure 10

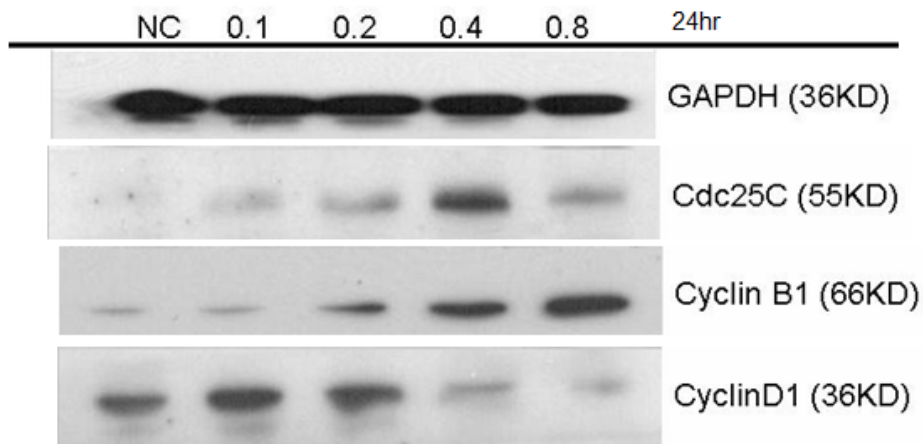


Figure 10 : Effect of ACO to expression of cell cycle regulatory proteins in SAS cells.

Cells were exposed to ACO (0.1-0.8 mM) for 24 hours.

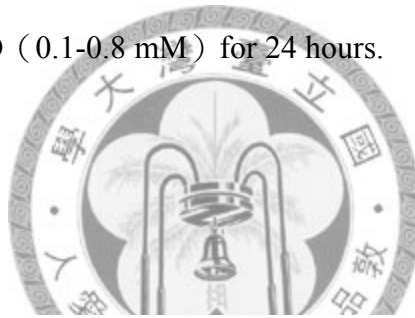


Figure 11

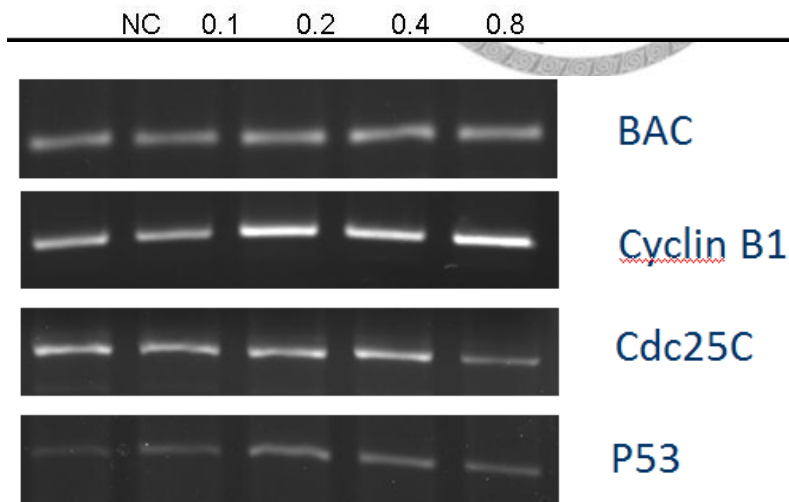


Figure 11 : Effect of ACO to mRNA expression of cell cycle regulatory proteins in SAS

cells. Cells were exposed to ACO (0.1-0.8 mM) for 24 hours.

Figure 12a

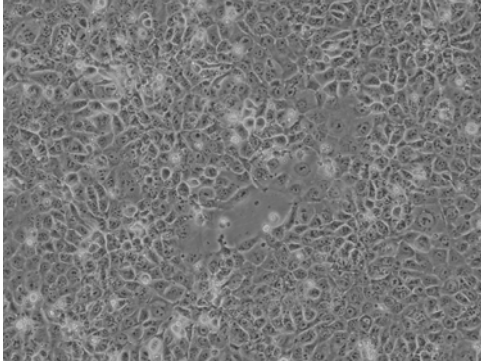


Figure 12b

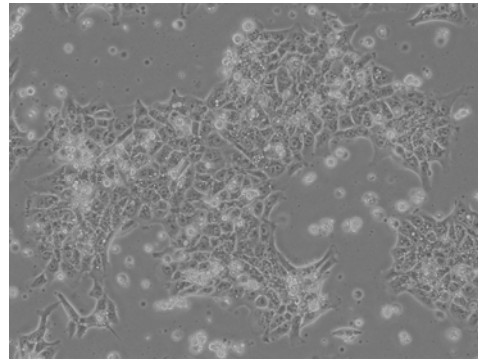


Figure 12c

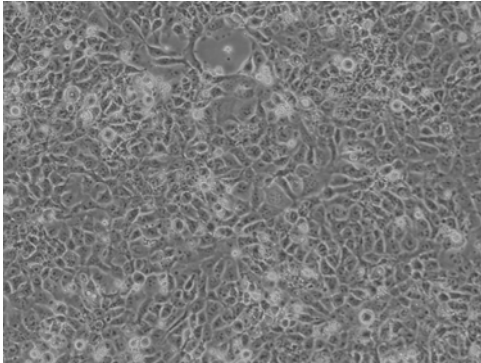


Figure 12d

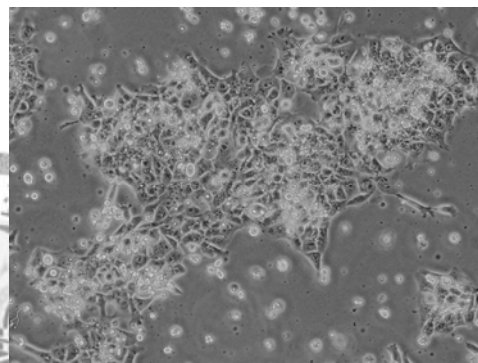


Figure 12e

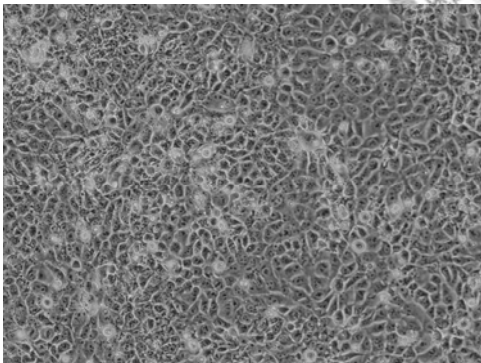


Figure 12f

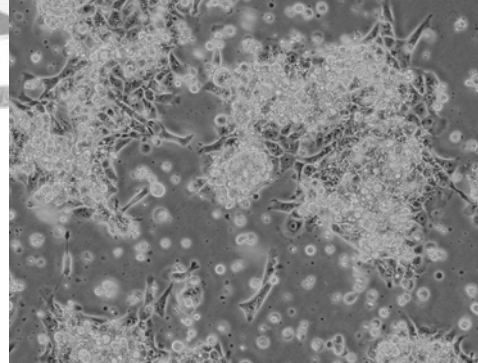


Figure 12g

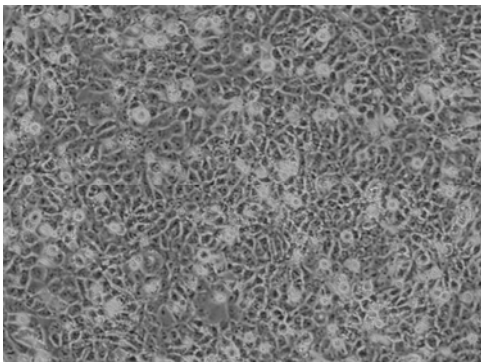


Figure 12h

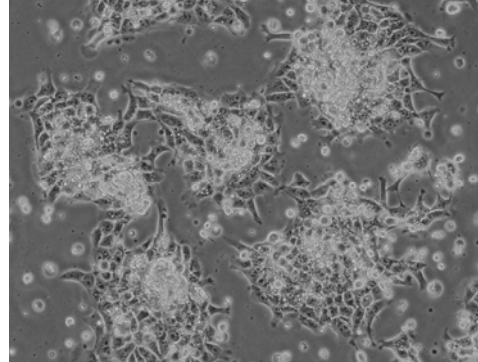


Figure 12 : Effect of caffeine on ANE-induced morphological changes in SAS cells. (a) untreated SAS cells; (b) SAS cells treated with ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hours; (c) SAS cells treated with caffeine 0.5 mM for 24 hours; (d) SAS cells treated with ANE 800 μM + caffeine 0.5 mM for 24 hours; (e) SAS cells treated with caffeine 1 mM for 24 hours; (f) SAS cells treated with ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ + caffeine 1 mM for 24 hours; (g) SAS cells treated with caffeine 2 mM for 24 hours; (h) SAS cells treated with ANE 800 $\mu\text{g/ml}$ + caffeine 2 mM for 24 hours.



Figure 13

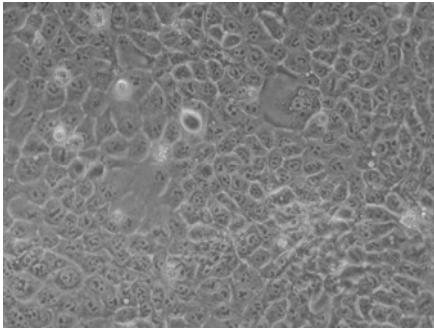


Figure 13b

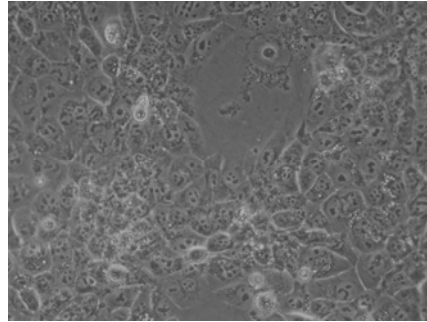


Figure 13c

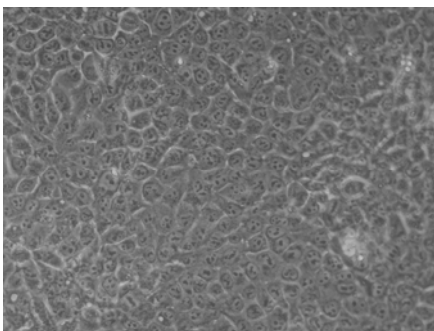


Figure 13d

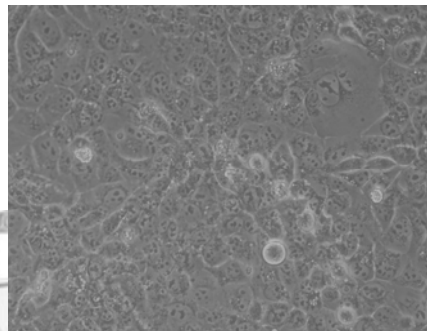


Figure 13e

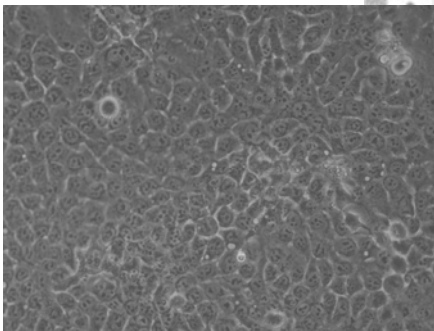


Figure 13f

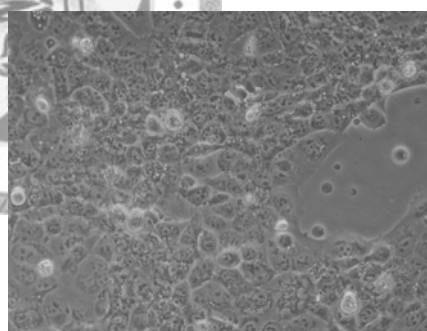


Figure 13 : Effect of Chk2 inhibitor on ANE-induced morphological changes in SAS cells. (a) untreated SAS cells; (b) SAS cells treated with ANE 800 µg/ml for 24 hours; (c) SAS cells treated with Chk2 inhibitor 50 nM for 24 hours; (d) SAS cells treated with ANE 800 µg/ml + Chk2 inhibitor 50 nM for 24 hours; (e) SAS cells treated with Chk2 inhibitor 100 nM for 24 hours; (f) SAS cells treated with ANE 800 µg/ml + Chk2 inhibitor 100 nM for 24 hours.

Figure 14

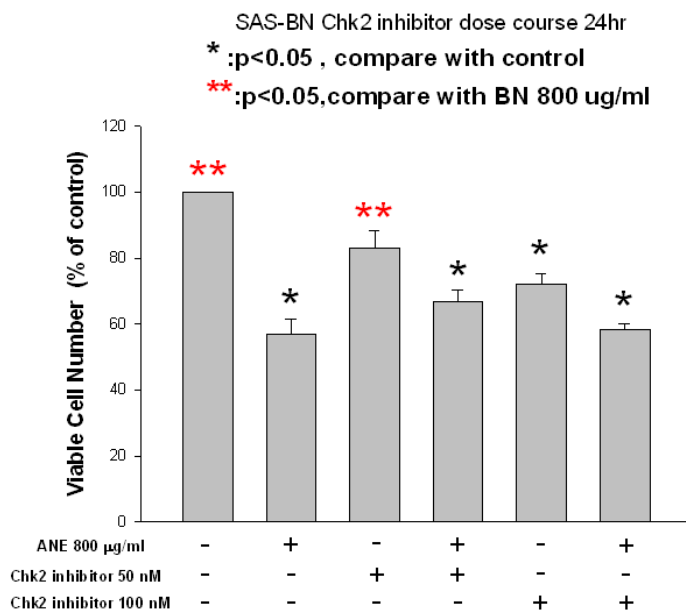


Figure 14 : Dose-dependent effects of ANE - Chk2 inhibitor on cells proliferation in SAS cells. 5×10^5 Cells were exposed to (a) ANE(800 µg/ml)and Chk2 inhibitor(50 nM -100 nM) for 24 hours. Cell viability was measured by the trypan blue assay.

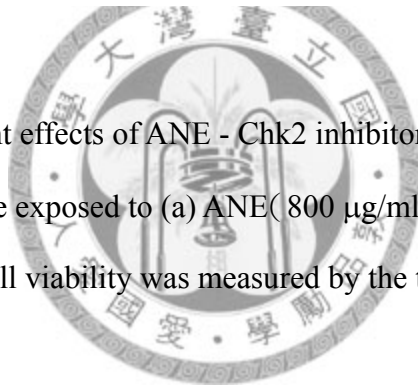


Figure 15a

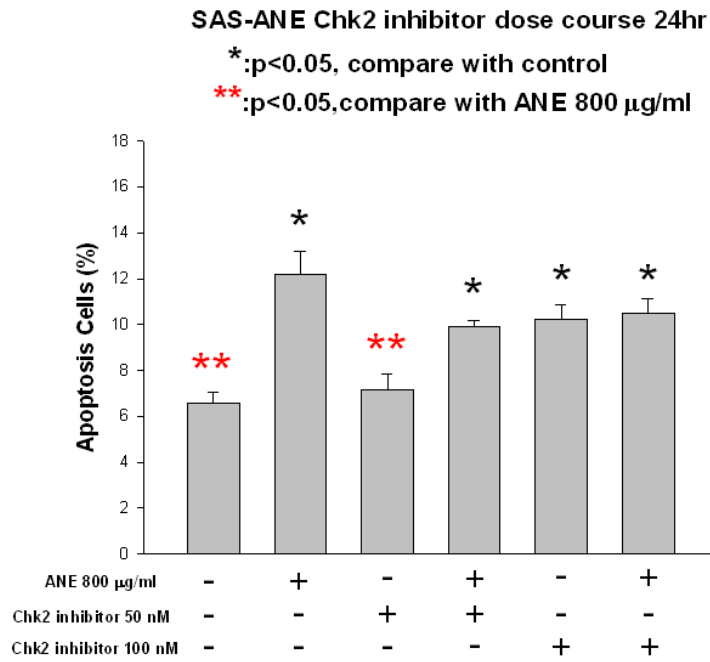


Figure 15b

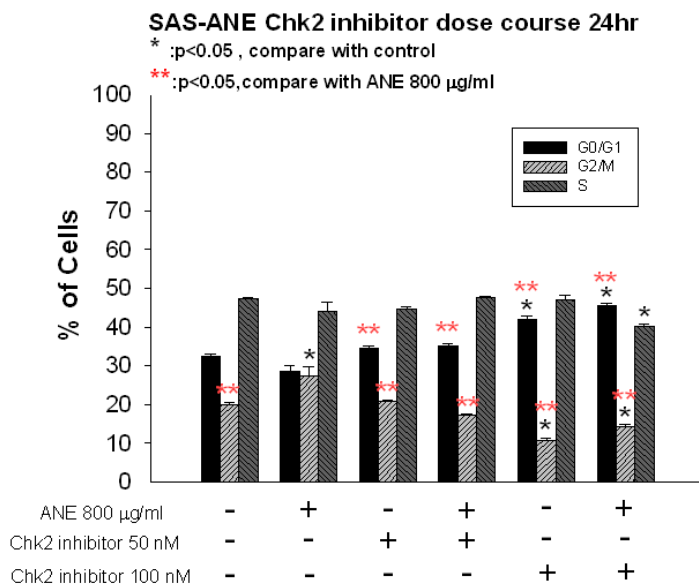


Figure 15 : Dose-dependent effects of ANE - Chk2 inhibitor on SAS cells. (a) sub-G₀/G₁ in SAS cells and (b) cell cycle distribution in SAS cells. 5×10⁵ Cells were exposed to ANE (800 µg/ml) and Chk2 inhibitor (50-100 nM) for 24 hours. The results were expressed as the mean percentage of total cells (mean ± S.E.) . * P<0.05: Compared with negative control

Figure 16

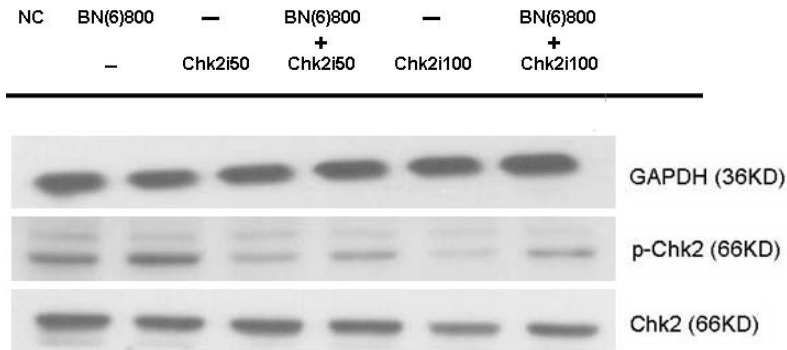


Figure 16 : Effect of ANE-Chk2 inhibitor to expression of p-Chk2 and Chk2. Cells were exposed to ANE (800 $\mu\text{g/ml}$) and Chk2 inhibitor (50-100 nM) for 24 hours.



Figure 17

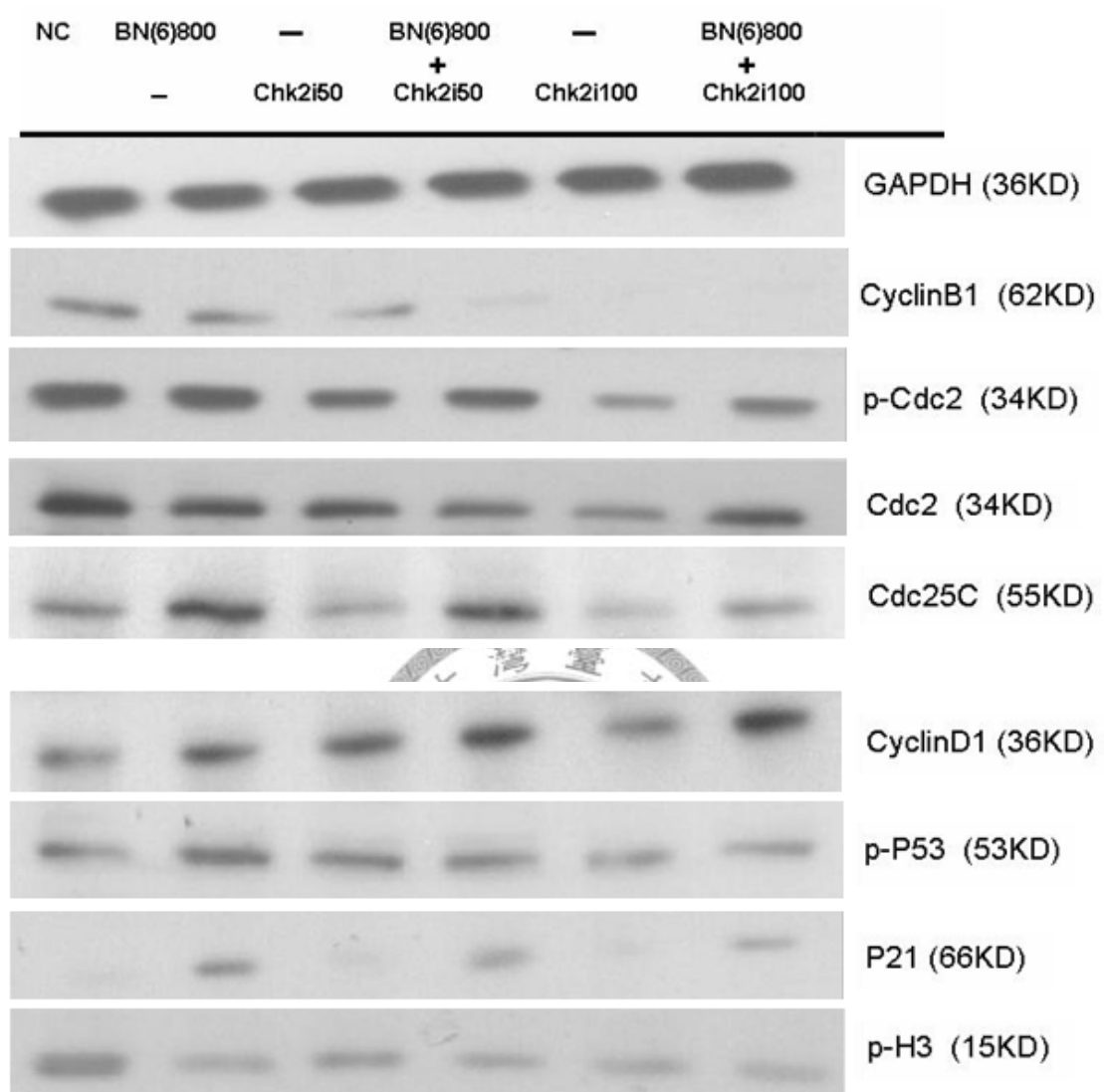


Figure 17 : Effect of Chk2 inhibitor on ANE-induced changes of cell cycle-related proteins. Cells were exposed to ANE (800 $\mu\text{g/ml}$) and Chk2 inhibitor (50-100 nM) for 24 hours.

Figure 18

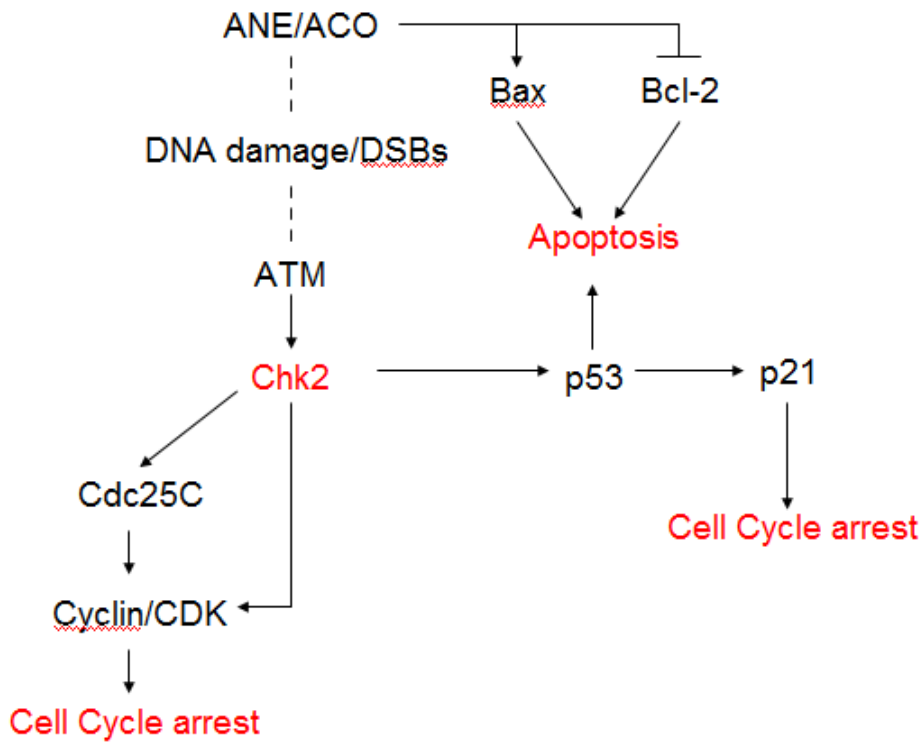


Figure 18 : Schematic diagram illustrating possible molecular mechanism of areca nuts components-induced Chk2 activation. ANE and ACO maybe cause the DNA damage and activate the Chk2 through the ATM pathway (dotted lines). The activated Chk2 regulates the activation of Cdc25C, Cyclin/CDK complex, p53 and p21, resulting in cell cycle arrest. Chk2 also regulates the Cyclin/CDK complex directly. While the damage extend, ANE/ACO also induces the cell apoptosis through the p53, Bax and Bcl-2.

附錄：

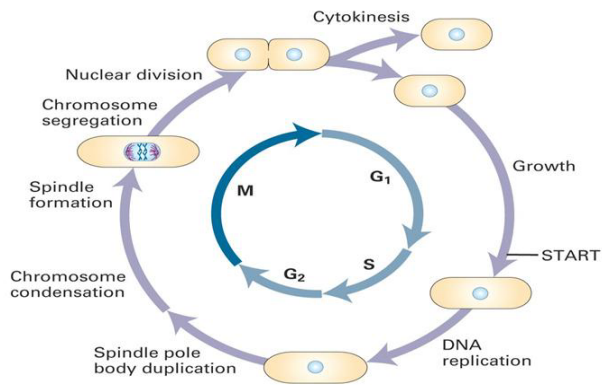
附錄一 中華民國 96 年度十大癌症死因

順位	96年度十大癌症死亡原因	死亡人數	百分比%
	所有癌症死亡原因	40,306	100.0
1	肺癌	7,993	19.8
2	肝癌	7,809	19.4
3	結腸直腸癌	4,470	11.1
4	女性乳癌	1,552	3.9
5	胃癌	2,474	6.1
6	口腔癌	2,312	5.7
7	攝護腺癌	1,003	2.5
8	子宮頸癌	833	2.1
9	食道癌	1,438	3.6
10	胰臟癌	1,354	3.4

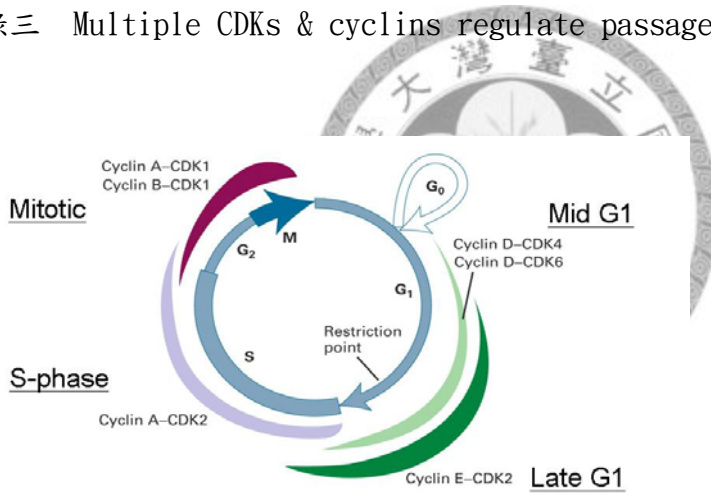
順位	癌症死亡原因	性		
		死亡人數	每十萬男性人口死亡率	死亡百分比%
	所有癌症死亡原因	25,819	222.6	100.00
1	肝癌	5,560	48.7	21.9
2	肺癌	5,458	47.1	21.1
3	結腸直腸癌	2,558	22.1	9.9
4	口腔癌(含口咽、下咽)	2,152	18.6	8.3
5	胃癌	1,631	14.1	6.3
6	食道癌	1,343	11.6	5.2
7	攝護腺癌	1,003	8.6	3.9
8	非何杰金淋巴瘤	801	6.9	3.1
9	胰臟癌	776	6.7	3.0
10	膽囊癌	604	5.2	2.3
11	鼻咽癌	599	5.2	2.3
12	白血病	545	4.7	2.1
13	膀胱癌	542	4.7	2.1
14	腎臟癌	314	2.7	1.2
15	腦癌	256	2.2	1.0
	其他	1,587	13.7	6.2



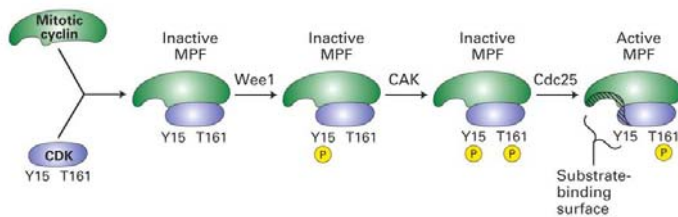
附錄二 The cell cycle



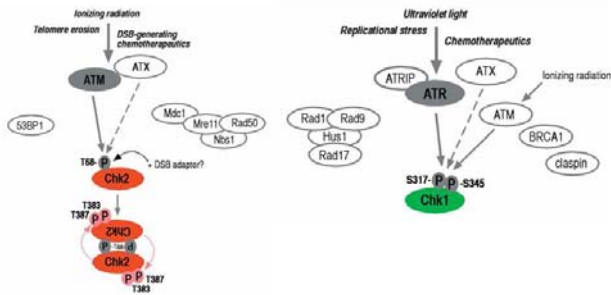
附錄三 Multiple CDKs & cyclins regulate passage of the cell cycle



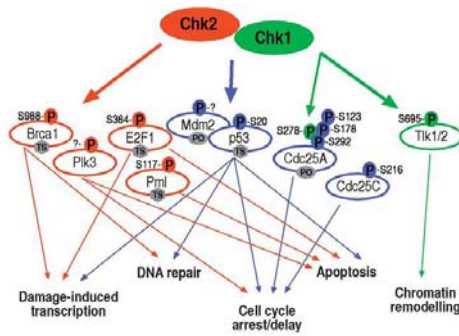
附錄四 The effect of Cdc25 on cyclin/CDK



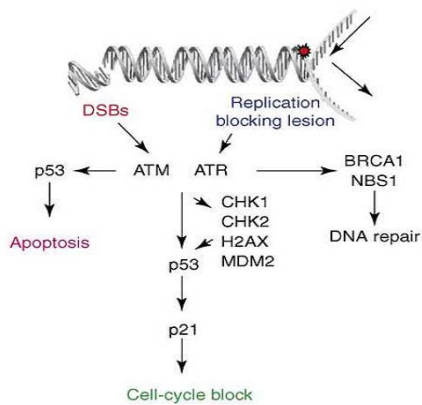
附錄五 The check point signaling



2003 *Cancer Cell*



2003 *Cancer Cell*



2006 *TRENDS in molecular medicine*

附錄六 The mechanism of apoptosis

