

第七屆旺宏科學獎

成果說明書

參賽編號：SA7-283

作品名稱：雙面夾攻---紫杉醇與維生素甲
酸混合使用的研究

姓名：陳其寬

關鍵字：紫杉醇、維生素甲酸

壹、研究動機

癌症是現今社會大家聞之色變的疾病，癌細胞與正常細胞最大的差異在於其脫離正常細胞週期而毫無限制的增生。有許多藥物或化學物質都可以控制細胞週期並改變細胞生長狀況，我們得知維生素甲酸與紫杉醇分別作用於細胞週期的不同階段，我們希望藉由混合加藥，類似兩路夾殺的方式，將癌細胞更有效的消滅。紫杉醇是目前著名的抗癌藥物，然而其毒性與成本卻很高，我希望讓其搭配其他較無毒性和便宜的化學物質或藥品，如維生素甲酸(RA)，讓紫杉醇在更低的濃度下，可以發揮更大的效果，提供癌症臨床醫療一個新的治療用藥方法。另外，藉由藥物混合作用後的新現象，增加對於癌細胞在細胞週期多種相關蛋白質之間關聯性的了解，找出治療新契機。

貳、研究目的

紫杉醇通常以 10 μM 使用，不過其已經會對正常細胞產生毒性，而維生素甲酸在 10 μM 仍為安全劑量。因此，我固定維生素甲酸在此濃度，並且將紫杉醇的濃度分別降低成 0.1 μM 、0.01 μM 、0.001 μM 來與維生素甲酸混合作用，驗證癌細胞增生可以被更有效的控制，大幅降低其數量，而且對正常細胞的毒性減低至最小及大幅降低用藥成本。

(一)測定細胞生長

混合使用時，前列腺癌細胞 DU145 是否比單獨加入太平洋紫杉醇或維生素甲酸時生長抑制的較明顯，以證明此兩種藥物有彼此加成之效果。

(二)西方點墨法

此方法可以觀察加藥後，啟動 DU145 凋亡的蛋白質表現或者活性變化，探討紫杉醇和維生素甲酸同時加入有互相加成之效果的原因。

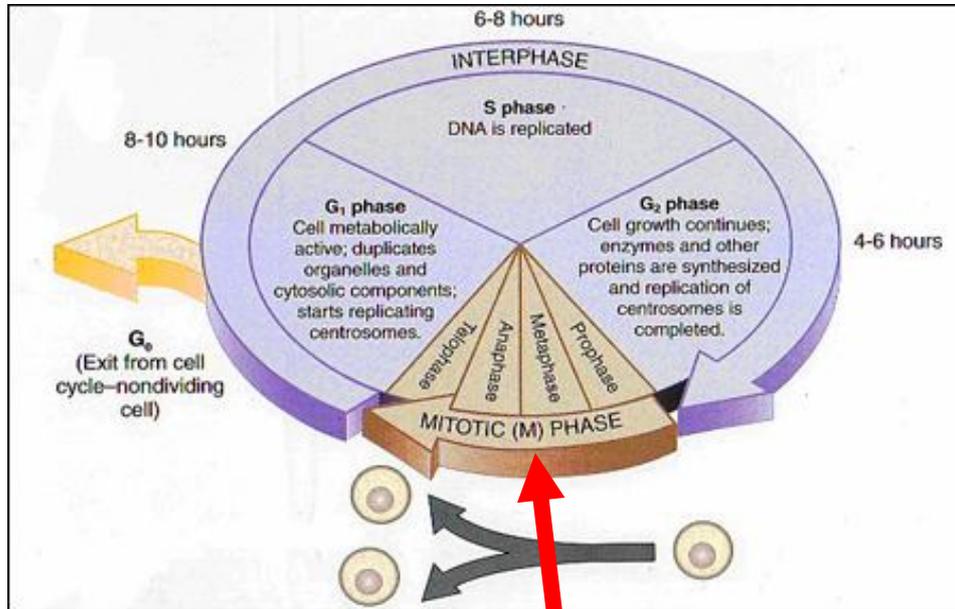
(三)流式細胞儀

此方法可了解在加藥後 DU145 的細胞生長情況，藉由流式細胞儀可以得知細胞各個週期所佔的比例，藉此推斷當太平洋紫杉醇與維生素甲酸混合使用時，DU145 是否比單獨加入太平洋紫杉醇或維生素甲酸時細胞凋亡的更明顯，以證明此兩種物質有彼此加成之效果。

提供癌症臨床醫學新的治療方式，讓太平洋紫杉醇在搭配維生素甲酸下發揮更優秀的藥效。另外，將兩物質混合使用，並且將紫杉醇的劑量減低，除了可以使癌細胞增生被更有效的控制，大幅降低其數量，而且對正常細胞的毒性減低至最小，也降低其成本。

参、研究方法

首先是根據紫杉醇的作用原理，思考出可以輔助紫杉醇的物質，所需具備的條件。



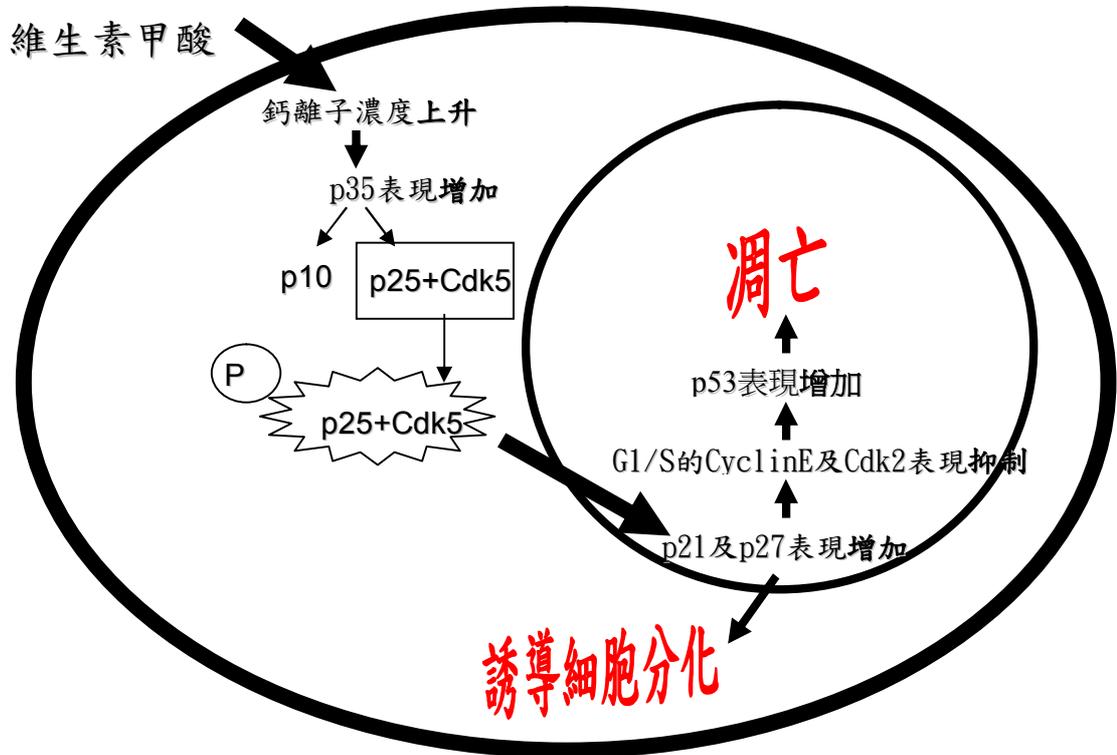
紫杉醇

(圖一)

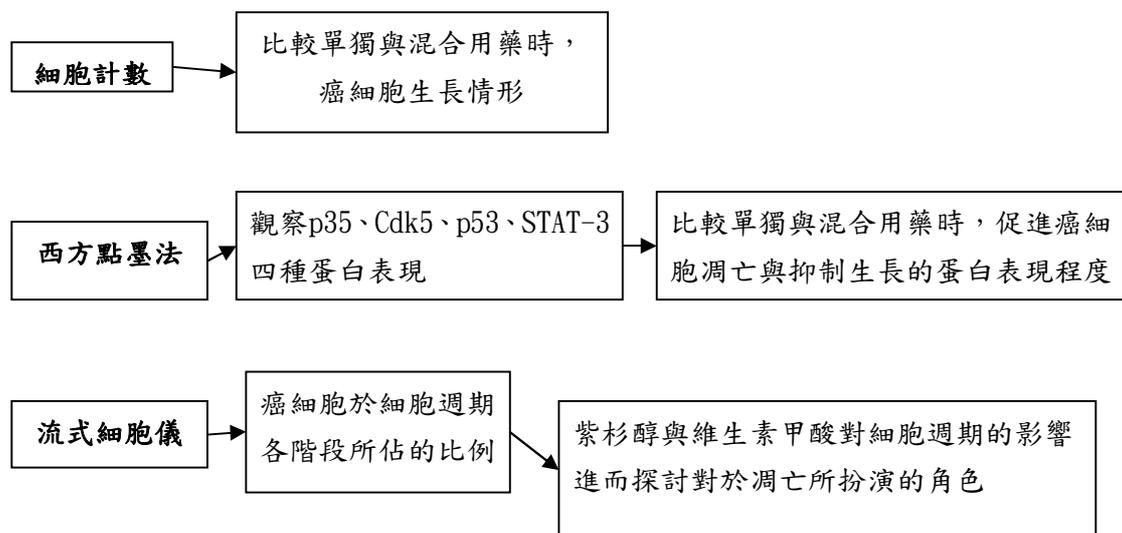
根據(圖一)，紫杉醇影響細胞內的微管系統，此藥的特點就是針對癌細胞與正常細胞在增生程度的差異，癌細胞是快速分裂增生的不正常細胞，分裂時會形成大量管狀構造，也就是有絲分裂時的線狀構造，在染色體分佈至兩個子細胞後微管系統便進行分解，而完成細胞分裂。紫杉醇可抑制微管系統的分解過程，使細胞被"固定"在分裂的過程中而進入 G1 期，當這些「不正常」細胞進入 G1 期時，細胞便會偵測到異常而無法繼續進行，之後走入凋亡的命運。我思考紫杉醇的作用原理之後，我認為輔助紫杉醇的物質必須具備以下特點：

- 一、延長 G1 期：讓受到紫杉醇攻擊的癌細胞更不容易進入下一個階段的 S 期。
- 二、誘導分化：既然紫杉醇是作用於分裂時的細胞骨架，那有助於細胞分裂的物質便可以增加紫杉醇攻擊的機會，但是這與目的矛盾；那麼另一個可以使細胞分裂的便是分化，此物質可以誘導細胞分化。
- 三、對於人體毒性極低。
- 四、價格便宜。

經過長時間埋首有關細胞週期的藥物或化學物質，我決定使用維生素甲酸嘗試。維生素甲酸已經被證實於女性子宮頸癌有誘導分化及抑制生長的功效，以下(圖二)是其作用機制。



這是我所設計的證明方法：



一、 細胞計數

我的癌細胞是用含有胎牛血清的培養液培養，從加入藥物開始計時，觀察天數為三天。實驗組設立如下：

組別	對照組	2	3	4	5	6	7	8
紫杉醇(μ M)	無	無	0.1	0.01	0.001	0.1	0.01	0.001
RA(μ M)	無	10	無	無	無	10	10	10

1. 將在無菌操作台，已處理過的 cell 連同培養液，裝入 1.5 ml eppendorf 後以 3500 rpm 4°C，離心 5 min。
2. 時間到後，將上清培養液抽走，在 eppendorf 內加入 50 μ l PBS，並以 pipet 抽吸 PBS 將 eppendorf 底部的 cell 打散、混和均勻。
3. 將血球計數盤及蓋玻片以拭鏡紙沾 90%酒精擦拭乾淨，後將蓋玻片蓋於二個 chambers 上。
4. 將欲計數的 cell sample 加入 50 μ l trypan blue，後以 pipet 抽吸 cell PBS 及 trypan blue 充分混合均勻。
5. 以 pipet 吸取 30 μ l 的 sample，沿 chambers 與蓋玻片間的凹槽，將 sample 輕注上 chambers，直到 sample 將 chambers 蓋滿。
6. 因為一個血球計數板有 2 個 chambers，另一個 chambers 以同 5 的方法，注入另一樣 sample。
7. 在顯微鏡下的 chambers 有 9 個大格，隨機挑選 3 大格，進行細胞計數，紀錄各格數量。
8. 將 7.的各格數量加總後除以 3 取平均，因為每大格的邊長為 0.01cm 所以必須再乘以 10^4 ，又因為 PBS 和 trypan blue 以 1 比 1 比例混合所以要再乘 2 倍，而原有的 PBS 為 0.05ml 所以再乘以 0.05 所得的數字即為每個 well 所含的細胞。

9. 轉換公式：

第一天及第二天細胞還不多，用 20 μ l PBS 加入 20 μ l trypan blue

$$\begin{aligned}\text{細胞數 (個/ML)} &= (\text{所數一大格細胞數}) \times 10^4 \times 2 \times 2 \times 10^2 \\ &= (\text{所數一大格細胞數}) \times 400\end{aligned}$$

第三天細胞很多，增加為 50 μ l PBS 加入 50 μ l trypan blue

$$\begin{aligned}\text{細胞數 (個/ML)} &= (\text{所數一大格細胞數}) \times 10^4 \times 2 \times 5 \times 10^2 \\ &= (\text{所數一大格細胞數}) \times 1000\end{aligned}$$

10. 每 24 小時就進行細胞計數，共進行 3 天。

二、 做西方點墨法

根據我的研究思考過程的維生素甲酸作用圖(圖二)，我觀察的蛋白就是 p53、p35、Cdk5，另外再觀察一個相關細胞增生的 STAT-3 蛋白。

配製 SDS-PAGE gel

1. 將電泳墊片板及電泳用盤以拭鏡紙沾 90 %酒精擦拭乾淨後將兩片相合，以鑄膠夾夾緊，後固定於鑄膠器上，共做兩組。
2. 取三個 25 ml 燒杯，以拭鏡紙沾 90 %酒精擦拭乾淨。
3. 先備齊 1. ddH₂O 2. 1.5 M Tris (pH=8.8) 及 1.0 M Tris (pH=6.8) 3. 10 %SDS，以配製 9 ml，6 %及 10 % running gel 以及 4 ml，5% stacking gel 為例。
4. 取 4.320 ml ddH₂O 加入步驟 2.已處理好的燒杯中。
5. 再加入 2.250 ml 1.5 M Tris。
6. 再加入 0.090 ml 10 % SDS。
7. 至 4°C 冰箱中拿 1 % ammonium persulfate，取 0.090 ml 加入燒杯中。
8. 最後加入 TEMED 0.004 ml，及原置於 4°C 冰箱中的 acrylamid mix 2.250 ml。
9. 以 pipet 抽吸，將以上 6 種成分混合，此步驟非常重要，若沒有混合均勻會造成 gel 的高度不一，影響電泳。

10. 吸取 4 ml 混合均勻的溶液沿電泳墊片板及電泳用盤邊緣緩緩加入，再吸取 4 ml 加入另一組。
11. 加完 gel buffer 後吸 1 ml propanol，將 gel buffer 上方的氣泡擠壓出，因為 propanol 的密度小於 gel buffer，且兩者不互溶，故兩者會形成一介面，而 propanol 浮於 gel buffer 之上。
12. 待 gel buffer 凝固後將上方 propanol 倒掉後以洗滌瓶沖洗 gel，將殘留 propanol 沖淨。
13. 取 5.220 ml ddH₂O 加入步驟 2.已處理好的燒杯中。
14. 再加入 2.250 ml 1.5M Tris。
15. 再加入 0.090 ml 10 % SDS。
16. 至 4°C 冰箱中拿 10 % ammonium persulfate，取 0.090 ml 加入燒杯中。
17. 最後加入 TEMED 0.007 ml，及原置於 4°C 冰箱中的 acrylamid mix 1.350 ml。
18. 以 pipet 抽吸，將以上 6 種成分混合，此步驟非常重要，若沒有混合均勻會造成 gel 的高度不一，影響電泳。
19. 吸取 4 ml 混合均勻的溶液沿配膠玻璃電泳墊片板及電泳用盤邊緣緩緩加入，再吸取 4 ml 加入另一組，形成雙層膠。
20. 加完 gel buffer 後吸 1ml propanol，將 gel buffer 上方的氣泡擠壓出，因為 propanol 的密度小於 gel buffer，且兩者不互溶，故兩者會形成一介面，而 propanol 浮於 gel buffer 之上。
21. 待凝固後將上方 propanol 倒掉後以洗滌瓶沖洗 gel，將殘留 propanol 沖淨。
22. 取 1.53 ml ddH₂O 加入步驟 2.已處理好的燒杯中。
23. 再加入 0.25 ml 1.0 M Tris。
24. 再加入 0.090 ml 10 % SDS。
25. 至 4 度 C 冰箱中拿 10% ammonium persulfate，取 0.020 ml 加入燒杯中。
26. 最後加入 TEMED 0.002 ml，及原置於 4°C 冰箱中的 acrylamid mix 0.2 ml，完成 stacking gel。

27. 最後在 stacking gel 上方插入電泳梳(comb)，製作 loading well，待其凝固後將電泳梳(comb)拔除，後將 gel 收入裝有 running buffer 的盒子中，放於冰箱中備用或直接進行蛋白質電泳。

點墨法

1. 將 cell (細胞)自培養盤刮下後連同上清液置入 1.5 ml eppendorf，以 3500 rpm，4 °C，離心 5 min 後吸去上清液。
2. 用冷 PBS 1 ml 將細胞打散，以 3500 rpm，4 °C，離心 5 min，後吸去上清液。
3. 將含 1 % Na₃VO₄的冷 PBS 1 ml 加入 eppendorf，以 pipet(微量吸管)將 cell 充分打散後，以 3500 rpm，4°C，離心 5 min 後吸去上清液。
4. 重複步驟 3。
5. 加入 60 μl 含 10 %蛋白抑制酶的 lysis buffer 至每管 eppendorf 裡，並以 pipet 使其與 cell 充分混合反應。
6. 將加入 lysis buffer 的 eppendorf 放入 4 °C 的冰箱 30 min，使 lysis buffer 能與 cell 充分作用。
7. 30 min 後，以 12000 rpm，4 °C，離心 20 min 後將上清液自 eppendorf 取出並置入新的 eppendorf 後，再混入 30 μl 5X sample buffer。
8. 將蓋上防爆蓋的 eppendorf 以 100 °C 加熱 10 min 後，待其冷卻至室溫。
9. 冷卻後，就可將此 sample 注入至 SDS-PAGE gel，注膠的樣本跟體積將隨實驗設計而不同。
10. 以 80 V 的電壓進行 90 min 後，再以 100 V 的電壓進行 60 min。
11. 將膠體上的蛋白轉漬至 PVDF membrane，以利其後實驗進行。
12. 先在一盒子倒入 3 分滿的 methanol，再拿一張 9 cmx6 cm 的 PVDF membrane 放入盒子，使 methanol 將其浸濕，並以手搖晃後將 methanol 倒掉。
13. 將 methanol 倒掉後，在盒子中倒入 ddH₂O，並以手搖晃後將 ddH₂O 倒掉，重複此動作至 PVDF membrane 表面不再有油滴狀液體殘留。

14. 準備膠承受盤 1 個，纖維墊 2 張，並在一長方形盆子內倒入適量的 transferring buffer。
15. 將膠承受盤打開並在正極一邊先放上一張纖維墊，夾 3 張 filter paper 浸濕 transferring buffer 後鋪於纖維墊上，再將步驟 13 已處理完畢的 PVDF membrane 平鋪在 filter paper 上。將 gel 小心自玻璃上取下，除去不要的部分，並在右上角截去一小角作記號後將處理過的 gel 正面朝上平放在 PVDF membrane 上，再夾 3 張 filter paper 平鋪在 gel 上，以圓棍將空氣自其中趕出後鋪上另一張纖維墊，最後將膠承受盤負極一邊闔上後夾緊，置入已加入 transferring buffer 之轉漬器。
16. 以 80 V 的電壓進行 90 min 後，轉漬結束。取出，打開夾子將 PVDF membrane 上的 marker 做記號後，並對照欲觀察蛋白質的分子量，進行適當的切割。
17. 將切割好的 PVDF membrane 放入小盒子中，並將以已泡好的 5 % 牛奶倒入盒中，進行 blocking，將盒子放於 shaker 上搖晃 1 hr。
18. Blocking 完成後將牛奶倒掉，並用 PBS 清洗盒內的 PVDF membrane，重複清洗 3-5 次，直到倒出液體呈透明狀。
19. 將每條 PVDF membrane 各自放入相對應的小盒子中，並加入相對應的一級抗體，後將各小盒子放進 4 °C 冰箱內的 shaker，搖晃 12-18 hr。
20. 時間到後，拿出各個小盒子，並將先前加入的一級抗體小心地回收。
21. 回收完一級抗體後，在各個小盒子中加入 4 °C 的 PBST，後放於 shaker 上搖晃，將 PVDF membrane 清洗乾淨，每 15 min 一個循環，15 min 到時，將 PBST 倒掉，再加入新的 PBST，共重複 4 個循環。
22. 在每個盒子中加入 10 ml PBST 以及相對應的二級抗體 1 μ l (1:10000)，後將每個小盒子，放於 shaker 上搖晃 1hr。
23. 1 hr 後，將 PBST 及二級抗體混合液倒掉，接著以 PBST 將 PVDF membrane 清洗乾淨，每 15min 換一次新的 PBST，共重複 4 次後 PVDF membrane 上殘留的二級抗體已清洗乾淨，將 PBST 倒掉，準備進入暗房進行曝光動作。

24. 將 western lightening 倒入一新的長方形盒子，後將 PVDF membrane 夾入盒子中，以 pipet 吸取螢光劑，滴於 PVDF membrane 上使二抗接上螢光，讓底片曝光。
25. 將各條已上螢光的 PVDF membrane 排列在透明塑膠片上，後再蓋上另一張透明塑膠片，將兩張塑膠片內的空氣用擦手紙擠壓出來，將塑膠片放進片夾後關緊片夾，並將暗房內需要的物品備齊後進暗房。
26. 進暗房後將光線調整至只剩下紅色可見光，並將顯影液(developer)、水、定影液(fixer)倒入不同容器，剪下能蓋住全部 PVDF membrane 大小的底片。
27. 將剪好的底片對準 PVDF membrane 放於其上後立刻關緊片夾並計時。
28. 時間到後，立刻取出底片，將其放進 developer 中，使底片顯影，待有 band 明顯出現時，將底片放入水中洗淨後放入 fixer 中，使底片模糊不清處去除後，再次將底片放入水中洗淨後以夾子將底片夾起、晾乾。
29. 底片曝光時間以 1 min 為基準，若 band 太淺則將曝光時間漸漸增加；若 band 太深則將曝光時間縮短，至 band 深淺適中為止。
30. 將晾乾的底片以吹風機吹乾或自然風乾，絕不可用擦手紙擦拭底片，否則會有水痕留下。
31. 將未用的底片收好，藥品回收，把暗房整理乾淨後，再次確認已將未用的底片收好，後才可開燈，將各器材、藥品及垃圾帶出，離開暗房。
32. 回實驗室，檢視底片上各 band 的深淺情形。

三、 流式細胞儀

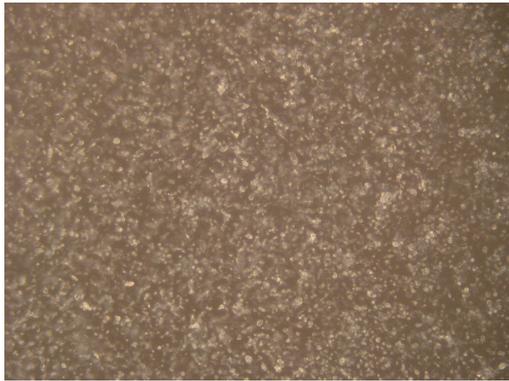
此方法可了解在加藥後 DU145 的細胞生長情況，藉由流式細胞儀可以得知細胞各個週期所佔的比例，藉此推斷當太平洋紫杉醇與維生素甲酸混合加藥時，DU145 是否比單獨加入太平洋紫杉醇或維生素甲酸時細胞凋亡的更明顯，以證明此兩種藥物有彼此加成之效果。

肆、研究結果

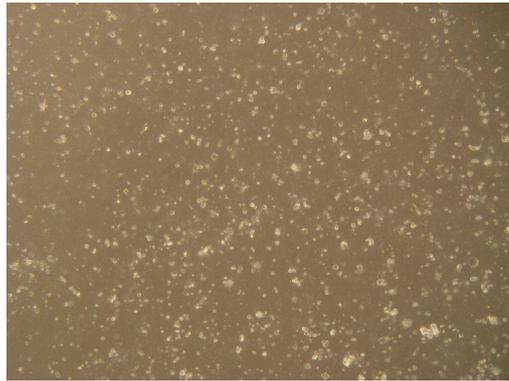
一. DU145 於 100 倍及 400 倍的細胞型態

100 倍:

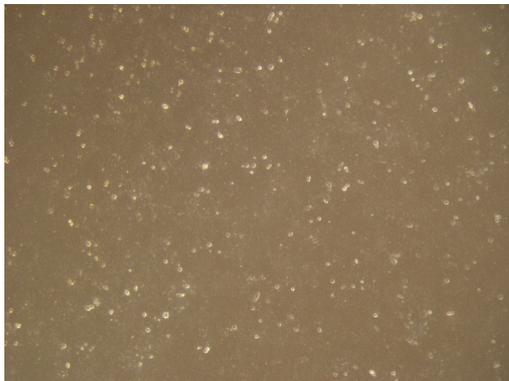
對照組 (圖 1-1)



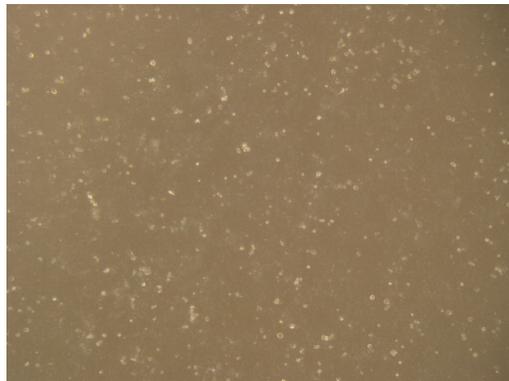
維生素甲酸 10 μM (圖 1-2)



紫杉醇 0.01 μM (圖 1-3)



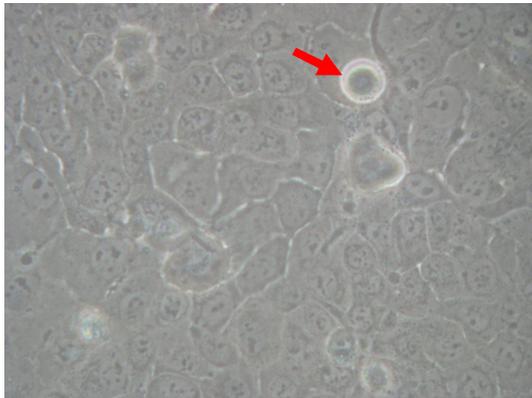
維生素甲酸 10 μM 及紫杉醇 0.01 μM (圖 1-4)



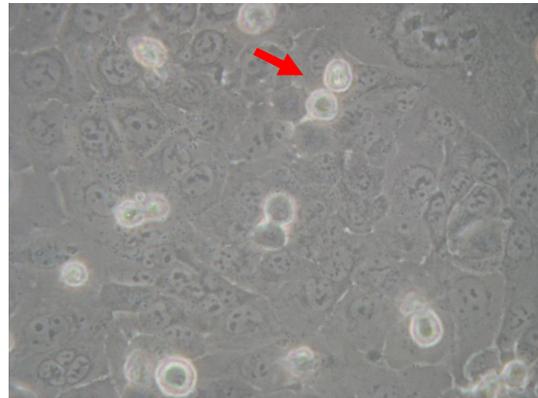
這些是加藥後第一天的癌細胞，在 100 倍的顯微鏡下的圖片，圖 1-3 及圖 1-4 的細胞數目明顯少於圖 1-1 及圖 1-2。

400 倍:

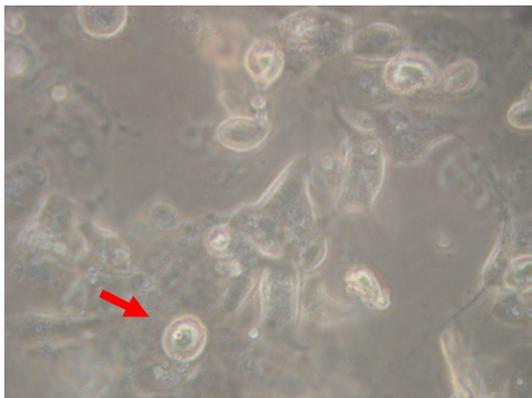
對照組 (圖 1-5)



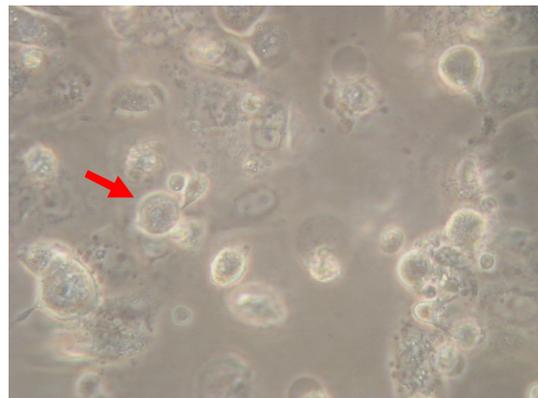
維生素甲酸 10 μM (圖 1-6)



紫杉醇 0.01 μM (圖 1-7)



維生素甲酸 10 μM 及紫杉醇 0.01 μM (圖 1-8)



這些是加藥後第一天的癌細胞，在 400 倍的顯微鏡下的圖片，細胞凋亡時會從 Dish 上浮起（如圖中紅色箭頭所指示的細胞），漂浮於培養液中，圖 1-8 的凋亡細胞明顯較多。

二.細胞計數

我們總共進行四梯次的實驗，分別於每一梯次作連續三天而且相同條件的實驗，然後將四次實驗結果經過統計學處理後，以柱狀圖的方式呈現。

圖例說明:

1:對照組 2:加入 10 μM 的維生素甲酸

3:加入 0.1 μM 的紫杉醇 4:加入 0.01 μM 的紫杉醇

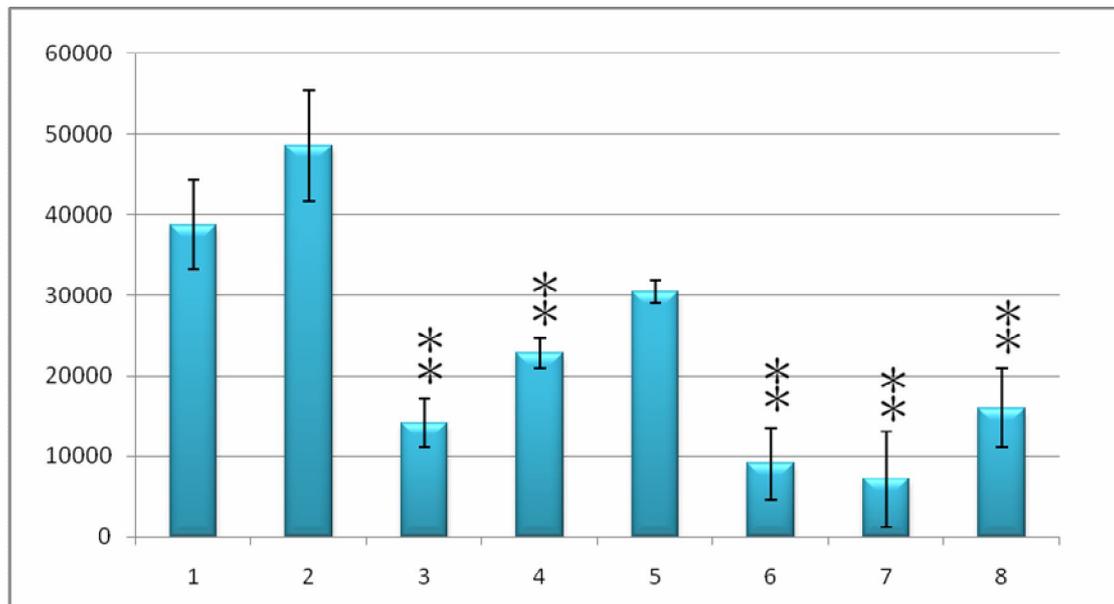
5:加入 0.001 μM 的紫杉醇 6:加入 10 μM 的維生素甲酸及 0.1 μM 的紫杉醇

7:加入 10 μM 的維生素甲酸及 0.01 μM 的紫杉醇

8:加入 10 μM 的維生素甲酸及 0.001 μM 的紫杉醇

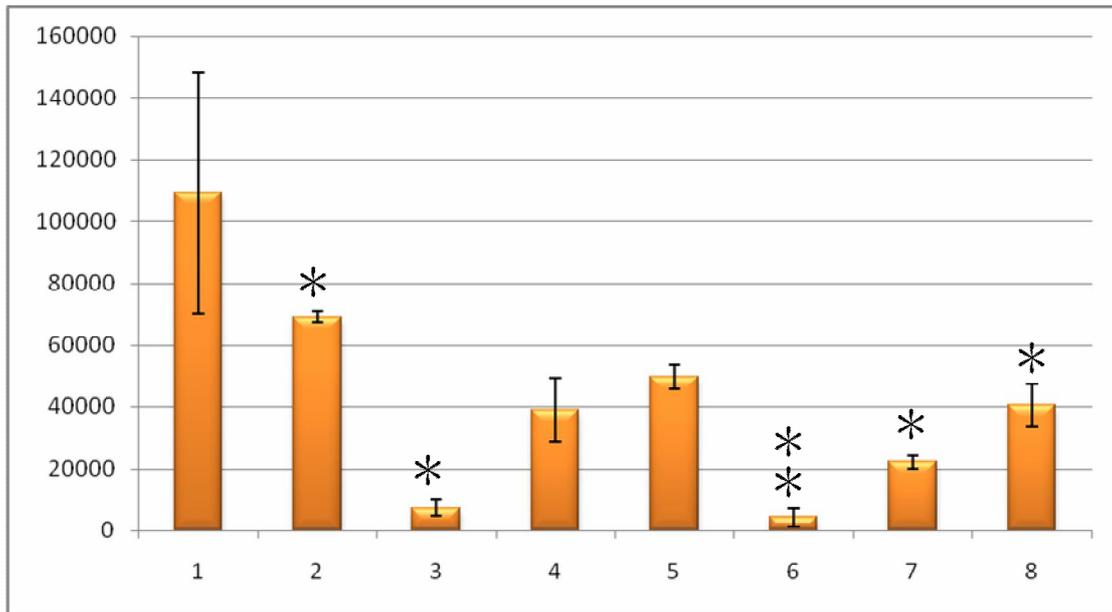
星號*:表示將每一組數據與對照組作 T-test 後, $P < 0.001$ 則表示具極顯著差異, 以三顆星表示; $0.001 \leq P < 0.01$ 則表示具較顯著差異, 以兩顆星表示, $0.01 \leq P < 0.05$ 則表示具顯著差異, 以一顆星表示。

加藥後第一天



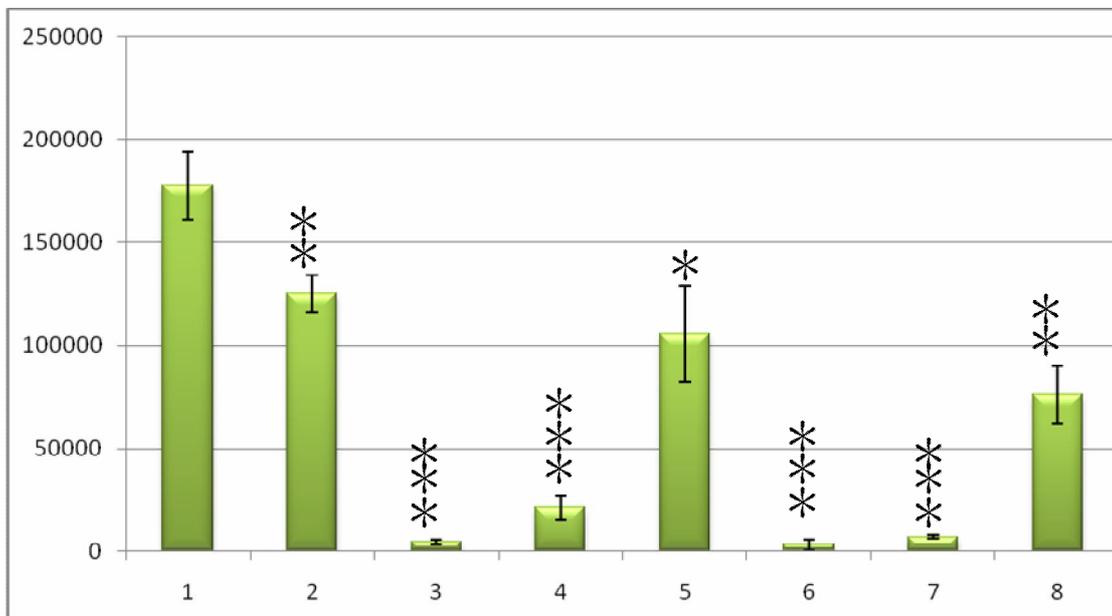
三組不同濃度 (6、7、8) 的混合用藥皆顯著抑制癌細胞的生長, 單獨使用紫杉醇 (0.001 μM) 則對癌細胞的生長無明顯抑制作用(5)。

加藥後第二天



混合用藥於三組不同濃度的條件下皆顯著少於對照組，紫杉醇單獨用藥於 0.01 μ M、0.001 μ M 就失去了效用。

加藥後第三天

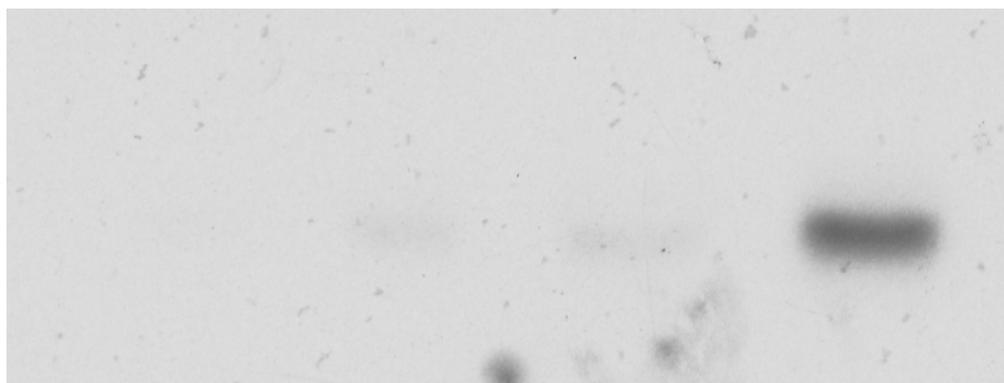


混合用藥於三組不同濃度的條件下皆顯著少於對照組，紫杉醇單獨用藥於 0.001 μ M 藥效低於混合用藥。

三.西方點墨法

p35 蛋白表現 (圖 3-1)

RA	不加藥	10 μ M	不加藥	10 μ M
紫杉醇	不加藥	不加藥	0.01 μ M	0.01 μ M



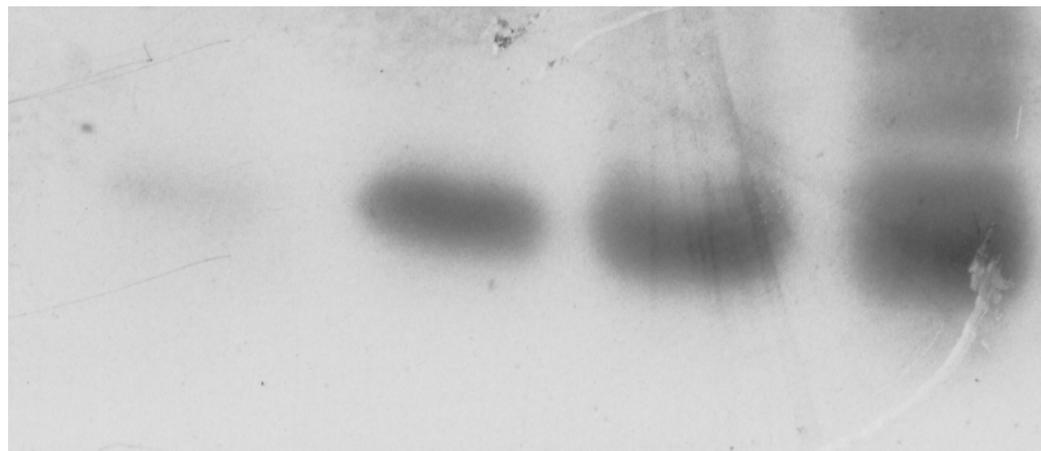
由上圖可以初步得知，混合加藥後的 p35 相較於其他實驗組有明顯的表現。

Cdk5 磷酸化活性及蛋白表現 (圖 3-2)

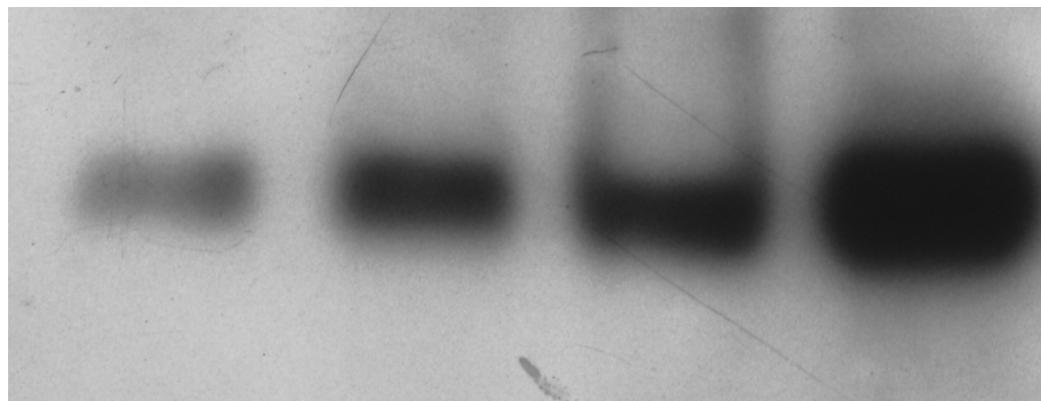
RA	不加藥	10 μ M	不加藥	10 μ M
紫杉醇	不加藥	不加藥	0.01 μ M	0.01 μ M

磷酸化

Cdk5



Cdk5

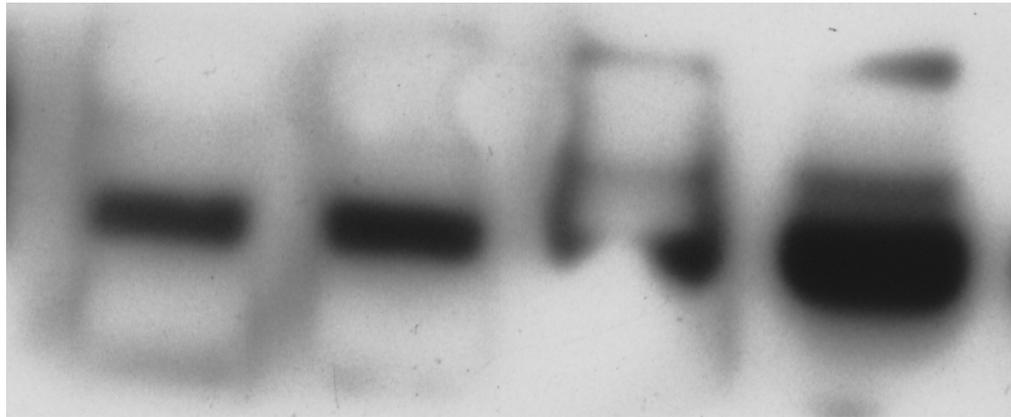


由上圖可以初步得知，混合加藥後，Cdk5 的磷酸化情形較其他組別明顯。

p53 蛋白表現 (圖 3-3)

RA	不加藥	10 μ M	不加藥	10 μ M
紫杉醇	不加藥	不加藥	0.01 μ M	0.01 μ M

p53

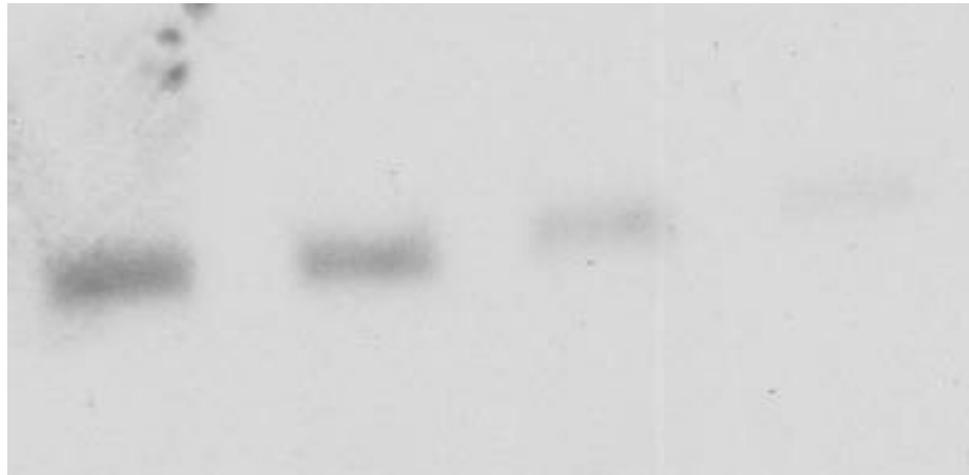


由上圖可以初步得知，混合加藥後的 p53 相較於其他實驗組有明顯的表現。

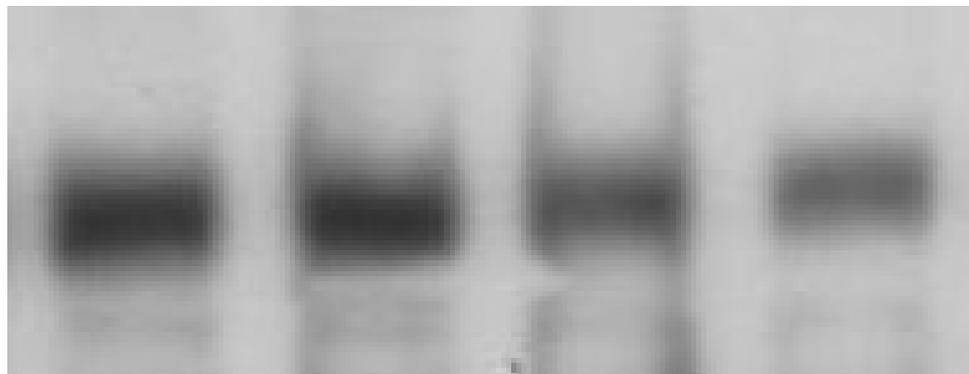
STAT-3 磷酸化活性及蛋白表現 (圖 3-4)

RA	不加藥	10 μ M	不加藥	10 μ M
紫杉醇	不加藥	不加藥	0.01 μ M	0.01 μ M

磷酸化
STAT-3



STAT-3



從西方點墨法中，我們從上圖中初步得知混合加藥後，STAT-3 幾乎不被磷酸化。

Actin

RA	不加藥	10 μ M	不加藥	10 μ M
紫杉醇	不加藥	不加藥	0.01 μ M	0.01 μ M

Actin

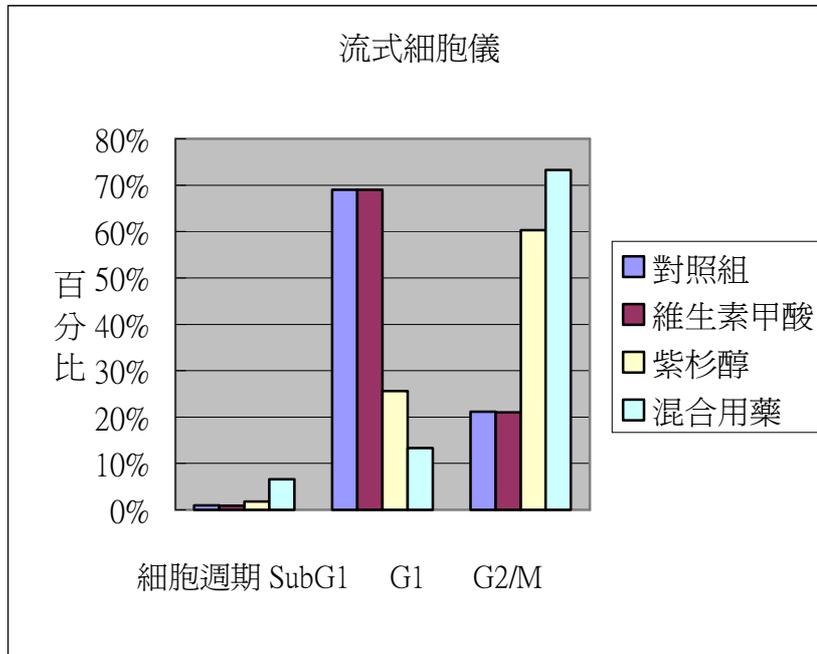


由上圖得知，各個實驗組的 Actin 蛋白的表現相近，表示所注入的蛋白量極為接近。

四.流式細胞儀

加藥 24 小時

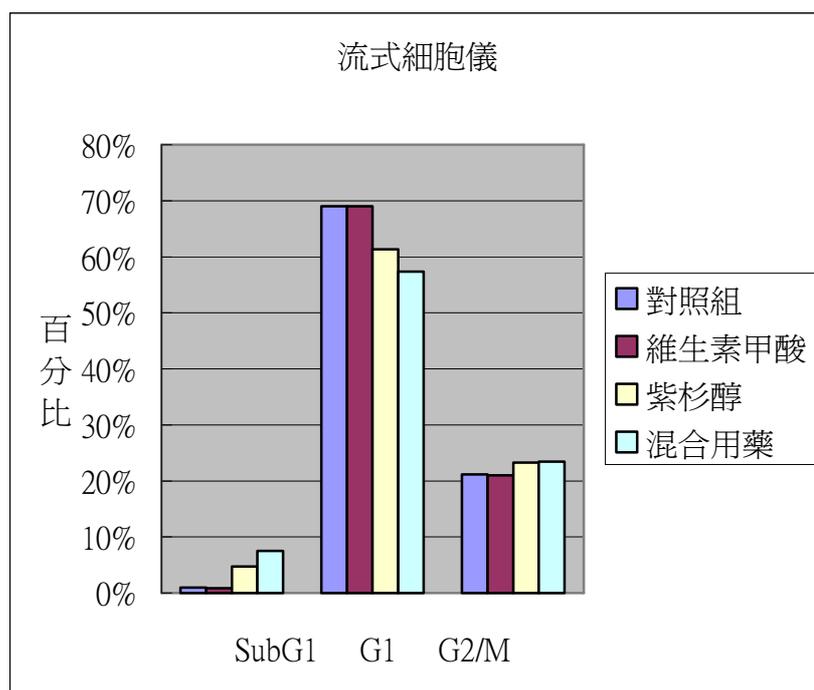
10 μ M RA + 0.1 μ M 紫杉醇



(圖 4-1)

對照組與維生素甲酸的細胞超過 60%於 G1 期，紫杉醇單獨用藥及混合用藥的細胞超過 60%於 G2/M 期。

10 μ M RA + 0.01 μ M 紫杉醇

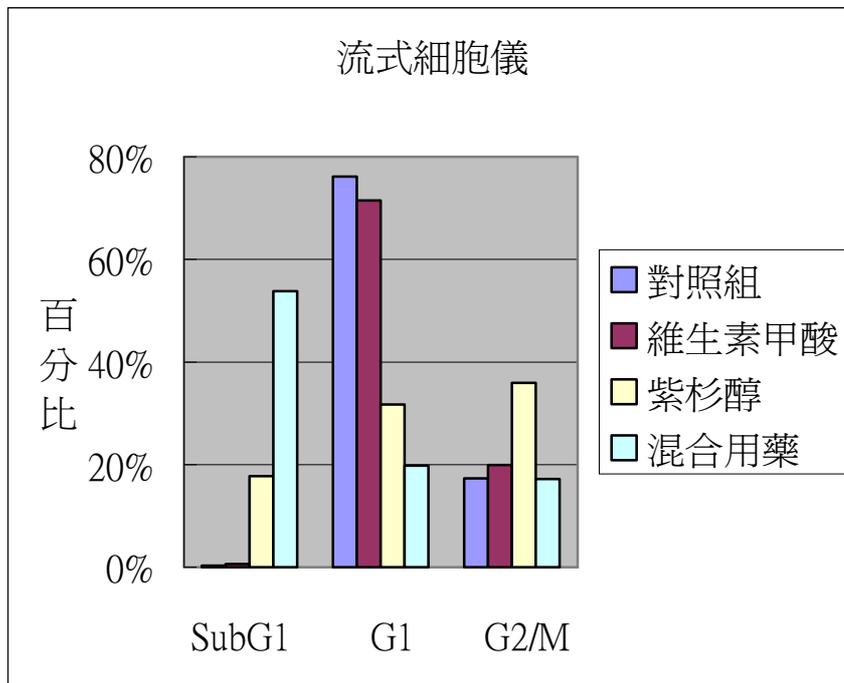


(圖 4-2)

對照組與維生素甲酸的細胞接近 70% 於 G1 期，紫杉醇單獨用藥及混合用藥的細胞大約 60% 於 G1 期。

加藥 48 小時

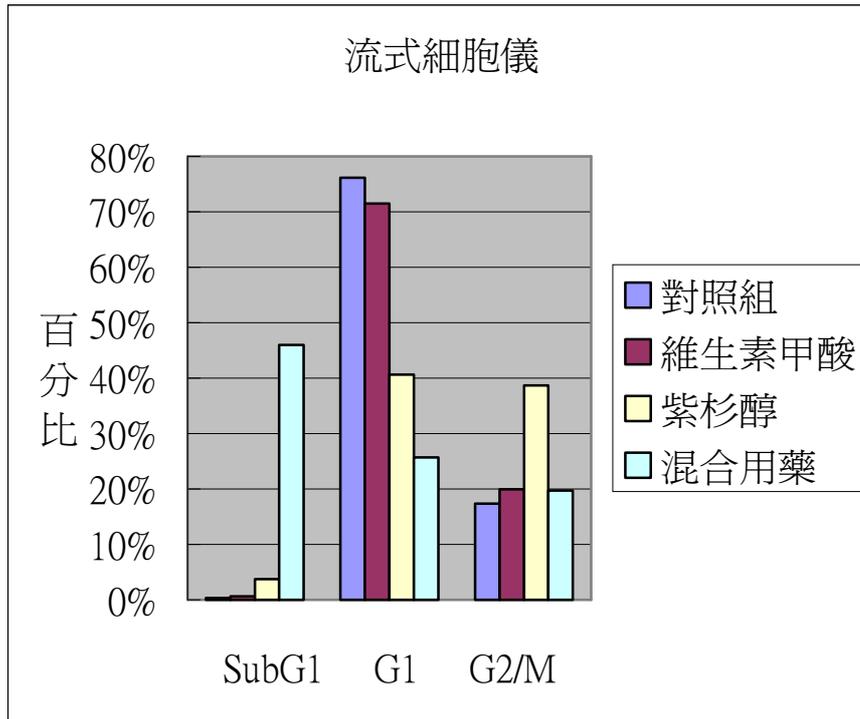
10 μ M RA + 0.1 μ M 紫杉醇



(圖 4-3)

對照組與維生素甲酸的細胞接近 70%於 G1 期，紫杉醇單獨用藥的細胞接近 20%於 SubG1，而混合用藥的細胞接近 60%於 SubG1。

10 μ M RA + 0.01 μ M 紫杉醇



(圖 4-4)

對照組與維生素甲酸的細胞接近 70%於 G1 期，紫杉醇單獨用藥的細胞不到 10%於 SubG1，而混合用藥的細胞超過 40%於 SubG1。

伍、研究討論

一.細胞計數

本實驗旨在藉由癌細胞數目的變化，觀察癌細胞加藥後的生長情形，可以初步判斷加藥效果。

加藥後第一天

我們從三天的觀察發現，加藥後第一天，相較於對照組，就可以知道藥物對 DU145 產生非常不利生長的影響，而維生素甲酸（RA）的數目與對照組相差不大，我們認為是由於 RA 僅導致細胞分化（文獻 6），因此在細胞存活上並還沒有明顯的抑制效果。若我們比較紫杉醇及混合加藥的效果，紫杉醇在 0.001 μM 就無法單獨展現藥效，而混合加藥在三種不同濃度條件下皆有顯著的效果。

加藥後第二天

加藥後第二天，因為細胞可能開始產生抗藥性，並且存活的細胞也經過一次細胞週期，因此抑制效果並未比第一天明顯。紫杉醇於 0.01 μM 就無法單獨展現藥效，而混合加藥在三種不同濃度條件下仍然有顯著的效果。

加藥後第三天

加藥後第三天，藥物都發揮其藥效，在 0.1 μM 及 0.01 μM 的條件下，紫杉醇單獨作用與混合加藥皆有顯著的效果，而在 0.001 μM ，混合加藥的效果是高於紫杉醇單獨作用的，然而在數目上與其他較高濃度組別的差異，我們認為是細胞於此濃度下產生抗藥性。

總而言之，混合加藥的效果是優於紫杉醇單獨作用，再將細胞數目一併考慮，0.01 μM 的紫杉醇與 RA 的混合下，藥效優於 0.1 μM 的紫杉醇單獨作用。本實驗結果證明紫杉醇與 RA 的混合用藥，可以使紫杉醇於更低的濃度下仍然具備效果。

二.西方點墨法

本實驗觀察 p53、p35、Cdk5、STAT-3 四種蛋白質的表現，從各個蛋白質與細胞的關係，比較單獨加藥與混合加藥對於促進細胞凋亡與抑制細胞生長的程度，探討混合加藥的效果機制。

1.Actin 討論

根據圖 3-4 及圖 3-6，Actin 是一種細胞骨架蛋白，可以從其蛋白表現得知我們在做西方點墨法時，有沒有在每條電泳道，置入相同量的蛋白質。從我們的 Actin 可以確認我們有精準的將每個實驗組的蛋白質控制在相同的量。

2.STAT-3 討論

根據圖 3-5，從西方點墨法中，我們從 STAT-3 的表現中初步得知混合加藥後的 STAT-3 磷酸化情形降低，而 STAT-3 蛋白在細胞中活化後，會進入細胞核啟動細胞增生。因此我們可以推得癌細胞在混合加藥下，停止了生長。

3.Cdk5、p35、p53 討論

根據圖 3-1、圖 3-2 及圖 3-3，我們從 Cdk5、p35、p53 的表現中初步得知混合加藥的蛋白表現均大於單獨加藥及對照組。

參考文獻 3-6，紫杉醇影響細胞內的微管系統，細胞分裂時會形成大量管狀構造，也就是有絲分裂時的線狀構造，在染色體分佈至兩個子細胞後微管系統便進行分解，而完成細胞分裂。紫杉醇可抑制微管系統的分解過程，使細胞被"固定"在分裂的過程中而進入 G1 期，當這些「不正常」細胞要進入 S 期時，細胞便會偵測到不正常的細胞骨架，導致細胞無法繼續進行分裂，造成細胞凋亡的命運。

維生素甲酸則是在細胞質中與受體結合，文獻 6 指出 RA 會使鈣離子濃度上升，誘導 Cdk-5 蛋白活化表現，並且 p35 與 Cdk5 結合並磷酸化 Cdk5 後，一起進入細胞核，增加 p21 及 p27 的表現，而使 G1/S 關卡的 CyclinE 及 Cdk2 表現受到抑制，使細胞停滯於 G1 期並造成細胞凋亡。

因此在混合加藥下，紫杉醇作用於細胞的 M 期，並且改變其微管型態，而維生素甲酸可以延長 G1 期讓細胞無法增生並且進入凋亡。

經由實驗，我們得知混合加藥在這三種蛋白表現皆顯著於單獨用藥，證明混合紫杉醇與 RA 可以使藥物在較低濃度仍然有好的效果。

三.流式細胞儀

根據圖 4-1、圖 4-2，從 SubG1 來看，混合加藥於兩種不同紫杉醇濃度時，相較於單獨加藥組均展現較優越的藥效，啟動凋亡的比例較高。再來，從 M 期的比例顯示，單獨紫杉醇的比例約為對照組的兩倍，與之前論述的相同，紫杉醇將癌細胞成功的停滯於 M 期，然而單獨紫杉醇用藥，G1 期的比例卻也高於混合加藥組 1.5 至 2 倍，表示其仍有癌細胞可以成功的穿越分裂期繼續成長。實驗中並發現，再加上維生素甲酸輔助的情況下，癌細胞啟動凋亡的比例可以顯著的超越單獨加入紫杉醇，尤其是在 0.01 μ M 的條件。

根據圖 4-3 及圖 4-4，於加藥 48 小時下，混合加藥組已經呈現其極大的醫療利用價值，我們重新將兩種藥物的作用原理一同思考，我們認為細胞可以在兩種模式下有效啟動凋亡：第一，癌細胞於分裂的過程中，紫杉醇作用在細胞骨架，而使其無法成功拉開，所以在此情況下，細胞將啟動凋亡。第二，當癌細胞成功穿越過分裂期後，維生素甲酸會使細胞停滯於 G1，刺激癌細胞啟動分化，於分化過程中，細胞骨架仍受到紫杉醇的影響，而無法有效完成分化，進而啟動凋亡。

總而言之，混合加藥組在 M 與 G1 期的『雙面夾攻』下，讓癌細胞幾乎失去生長的能力，並且更有效的啟動癌細胞凋亡。

陸、結論

由細胞計數中得知維生素甲酸和紫杉醇的混合加藥下，癌細胞會被抑制生長，其抑制效果明顯優於單獨加藥。從西方點墨法，我們從 STAT-3、Cdk5、p53、p35 的蛋白表現相對混合與單獨用藥比較，得知混合用藥的效果後，生長抑制更為顯著。由流式細胞儀的結果，我們發現混合加藥於凋亡的比例非常明顯的超越單獨加藥及對照組。

我們總共從細胞計數、西方點墨法及流式細胞儀的三項實驗研究方法，成功驗證紫杉醇及維生素甲酸在混合作用下，前列腺癌細胞可以被更有效的抑制生長，並且相較於單獨加入紫杉醇，更有效的使癌細胞啟動凋亡。

再來，從我們實驗所用的濃度來談，0.1 μM 及 0.01 μM 的紫杉醇在搭配 10 μM 維生素甲酸的作用下，癌細胞的數量都有非常顯著的降低並且抑制其生長，然而，我們發現 0.001 μM 的紫杉醇，對於癌細胞的藥效降低許多，我們認為癌細胞在此濃度下具有對於紫杉醇的抗藥性，不過混合加藥卻仍然具備效果。

再考慮紫杉醇濃度過高對人體的毒性後，我們發現在 0.01 μM 的情況下，有最優越的藥效，而紫杉醇的濃度也比危險劑量（10 μM ）低了 1000 倍。

最後，綜合前人對於個別藥物的研究及我們的實驗結果，當紫杉醇與維生素甲酸的一同作用下，使癌細胞從 G1 期及 M 期的分裂過程中，皆被藥物攻擊，在此『雙面夾殺』下失去生長的能力，並且使大部分的癌細胞步入凋亡。抗癌的征途仍是漫漫長路，從基礎醫學研究到臨床人體試驗，每一步都是環環相扣，我們期待此研究的成果可以為醫療界有所貢獻。

柒、參考文獻

1. 高一翰林版基礎生物第二章
2. 高二翰林版生命化學上冊第二章
3. Lin H, Chen MC, Chiu CY, Song YM and Lin SY. Cdk5 regulates STAT3 activation and cell proliferation in medullary thyroid carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2007 Feb 2;282(5):2776-84.
4. Lin H, Lin TY and Juang JL. Abl deregulates Cdk5 kinase activity and subcellular localization in *Drosophila* neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 2007 Mar;14(3):607-15.
5. Lin H, Juang JL and Wang PS. Involvement of Cdk5/p25 in digoxin-triggered prostate cancer cell apoptosis. *J Biol Chem.* 2004 Jul 9;279(28):29302-7.
6. Kuo HS, Hsu FN, Chiang MC, You SC, Chen MC, Lo MJ and Lin H. Retinoic acid causes Cdk5-dependent apoptosis of cervical cancer cell line. (in press)