

臺北醫學大學 醫學院 醫學科學研究所
碩士論文

Taipei Medical University
Graduate Institute of Medical Science
Master Thesis

Baicalein 誘導小鼠黑色素瘤細胞株死亡機轉之探討

Mechanism of the Baicalein - Induced Cell
Death In B16F10 Mouse Melanoma Cells

研究生：蕭 宇 凱 (Yu-Kai Hsiao)

指導教授：許準榕 博士 (Joen-Rong Sheu, Ph. D)

周敦穗 博士 (Duen-Suey Chou, Ph. D)

中華民國九十八年六月

June, 2009

目錄

中文摘要.....	2
英文摘要.....	4
縮寫表.....	6
壹、緒論.....	7
貳、材料與方法.....	
實驗材料.....	14
實驗方法.....	18
參、結果.....	22
肆、討論.....	28
伍、結論與展望.....	32
陸、圖表.....	33
柒、參考文獻.....	46

中文摘要

在之前的研究中我們確定了 baicalein 會刺激 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞株產生 superoxide 及 hydroxyl radical，且此 ROS 的產生路徑與 12-lipoxygenase (12-LOX) 有關。同時也發現 baicalein 會造成細胞存活率的下降和細胞凋亡；然而 baicalein 造成細胞死亡到底是因為產生了 ROS 還是本身抑制 12-LOX 的關係，原因仍是眾說紛紜。所以本次研究我們利用胞外的 ROS 清除劑 mannitol、catalase 及胞內 ROS 清除劑 DMPO、CMH 來清除 baicalein 產生的 ROS，結果發現 ROS 清除劑對於細胞的生長變異影響不大，但在 MTT 觀察細胞生存率的實驗中可以有效回復 baicalein 造成的細胞存活率下降，而在研究蛋白表現的 western blotting 實驗上，ROS 清除劑對於細胞凋亡蛋白 active caspase-3 和內在途徑凋亡蛋白 Bax 的表現又沒有改變。另外在 12-LOX 方面，我們使用了 12-LOX 的下游活性產物 (12-HETE) 來抵消 baicalein 的 12-LOX 抑制作用，結果發現 12-HETE 雖然對於細胞生長變異不產生影響，但是可以回復 baicalein 誘導的 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞存活率下降，其對於 baicalein 產生的 active caspase-3 表現增加也有明顯地抑制作用。最終我們也同時給予 ROS 清除劑和 12-HETE 共同作用，結果發現兩者同時存在下會將 baicalein 對小鼠黑色素瘤細胞的傷害降到最低，如此可以說明，baicalein 造成的 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞死亡，與 ROS 產生和抑制 12-LOX

皆有關係；然而細胞凋亡部分則是因為 baicalein 抑制了 12-LOX 所造成。另外我們也用 siRNA 技術來降低 12-LOX 的表現，結果發現 baicalein 造成控制組細胞生存率的下降遠高於 12-LOX siRNA 的細胞，所以我們推論 baicalein 造成的細胞死亡必會透過 12-LOX，而且 12-LOX siRNA 與 baicalein 抑制 12-LOX 機轉不同，再由之前研究 12-LOX siRNA 會降低 baicalein 在 B16F10 細胞產生的 ROS，推論 baicalein 造成的細胞死亡主因應該是 ROS，而此死亡也應為細胞壞死。為了證實以上論點，我們還另外用了流式細胞儀來分析 baicalein 造成的細胞死亡，結果發現細胞壞死果然是細胞死亡的主要部份，細胞凋亡所佔比率甚小。由以上實驗結果可以推出一個結論，baicalein 造成 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞的死亡，主因為其透過 12-LOX 產生的 ROS，所以大部份的死亡是細胞壞死，其中 baicalein 抑制 12-LOX 造成之細胞凋亡僅佔細胞死亡的一小部份。

英文摘要

In our previous study, we demonstrated that baicalein induces the formation of superoxide and hydroxyl radicals via 12-lipoxygenase (12-LOX) in B16F10 mouse melanoma cell line; simultaneously we also found that baicalein caused a reduction in cellular viability and induce cell apoptosis. At present, whether baicalein-induced cell death involves the 12-lipoxygenase (12-LOX) suppression or ROS generation is still unclear. In the present investigation, we utilized the extracellular ROS scavengers namely mannitol and catalase, and the intracellular ROS scavengers such as DMPO and CMH to assess their scavenging ability on ROS produced by baicalein. In addition, we also found that the ROS scavengers had no effect on cell growth differentiation, but in the cellular viability (MTT) assay they could effectively reverse the cell viability reduction induced by baicalein. Moreover western blot analysis revealed that the ROS scavengers didn't respond the cell apoptosis protein (active caspase-3) and the intrinsic apoptosis pathway protein (BAX). In the 12-LOX aspect, we use the 12-LOX downstream product (12-HETE) to counterbalance the 12-LOX inhibitory action of baicalein. We found that the 12-HETE had no difference in cell growth differentiation, but it could reverse the reduction of cellular viability caused by baicalein in B16F10 mouse melanoma cell line effectively, this results are as similar as in ROS scavengers. The 12-HETE also possesses an inhibitory effect on the increase in expression of active caspase-3 caused by baicalein. Finally we pretreated the ROS scavengers and 12-HETE at the same time, the results

showed that both drugs minimize the damage caused by baicalein. We inferred that the B16F10 mouse melanoma cell death caused by baicalein is related to both of 12-LOX suppression and ROS generation, but the apoptosis is only because of the 12-LOX suppression by baicalein. In addition, we also used siRNA technology to reduce the performance of 12-LOX; we found the cellular viability reduction of Electro control group is more pronounced than the 12-LOX siRNA group. Therefore, we inferred the cell death caused by baicalein through the 12-LOX; the 12-LOX siRNA and 12-LOX inhibition by baicalein are in different mechanisms. According to our previous study, the 12-LOX siRNA group would decrease the ROS generation caused by baicalein, so we assumed that the main reason of cell death caused by baicalein is the ROS generation and could lead to cell necrosis. In order to confirm the above arguments, we also use the cytometric analysis to examine the cell death caused by baicalein in which we found that the cell necrosis is the major part of cell death, and the apoptosis play a minimum role. The data generated from this study, we can conclude that the B16F10 mouse melanoma cell death caused by baicalein is mainly because of the ROS generation through the 12-LOX. Therefore, the majority of cell death may be due to cell necrosis. The cell apoptosis caused by 12-LOX suppression of baicalein is only a small part.

縮寫表

AA	Arachidonic acid
APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dubecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulphoxide
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fetal calf serum
LOX	Lipoxygenase
MTT	Tetrazolium dye 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate-buffered saline
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	Sodium dodecyl sulfate
CP-T	Cytoporation Medium

壹、緒論

1. Baicalein

(5,6,7-trihydroxyl-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)

Scutellaria baicalensis Georgi 是唇形科植物黃芩的塊狀根，為一種常用的中藥，主要功能包括清熱燥濕、瀉火解毒、止血和安胎等。黃芩含有多種類黃酮 (flavonoids) 的衍生物，而 baicalein 就是其中的一種，它的藥物特性包含有抗血栓、抗發炎、抗癌、抗氧化、抗原生物、抗纖維化等作用 (Fujita et al., 2005; Wang J et al., 2004; Hsu et al., 2001; Schuppan et al., 2002)。另外過去已有許多文獻證明，baicalein 具有強烈的選擇性抑制 12-lipoxygenase 地作用 (Sekiya et al., 1982; Natarajan et al., 1988; Okuda et al., 1994)。而在心血管方面發現 baicalein 在主動脈血管平滑肌細胞中具有明顯的抗細胞增生作用 (Nishio and Watanabe., 1997); 在小牛頸動脈中，baicalein 可以抑制 arachidonic acid (AA) 和 platelet derived growth factor (PDGF) 所誘發的細胞遷移 (cell migration) (Kanayasu-Toyoda et al., 1998); 而 Liu et al 的研究認為在人類臍靜脈血管內皮細胞內 baicalein 可以明顯抑制 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的活性，因此認為這物質具有調控血管增生的功能 (Liu et al., 2003)。另外在抗癌方面，baicalein 也被發現具有誘導多種癌細胞 antiproliferation 及 apoptosis 的效果 (Sekiya et al., 1982); 也有研究證實 baicalein 在人類舌癌細胞上可

以促進一些 apoptotic protein 的表現，像是 p53、BAX、cytochrome c、和 caspase-3 等，並減低 antiapoptotic protein 像 BCL-2 的表現 (Lin et al., 2007)；在 Chao Ji et al 的研究中也發現，baicalein 相對於其他的 flavonoids 可以更明顯的抑制人類膀胱癌細胞生長和誘導其凋亡，主要是由於降低其 CDC2-survivin pathway 的關係 (Lin et al., 2007)。

2. lipoxygenase (LOX)

Lipoxygenases 是一種 non-heme iron dioxygenases，它可以將氧分子接合游離，或是與酯化的多元不飽和脂肪酸結合並生成新的代謝物。氧分子接合在脂肪酸的位置不同因而有不同的命名方式，可分為 5-、8-、12- 15-lipoxygenases (5-LOX、8-LOX、12-LOX、15-LOX) (Funk., 2001)。Arachidonic acid (AA)經由 lipoxygenase (LOX) 的代謝可以產生具有生物活性的 eicosanoids，像是 hydroperoxyeicosatetraenoic acids (HPETEs)，而 HPETEs 接著又會馬上被還原成 hydroxyeicosatetraenoic acid (HETEs)，這些產物皆可在許多的癌細胞中表現出來；也因此被證實出具有調節腫瘤細胞生長的能力。另外在其他的研究中發現 arachidonic acid 和 linoleic acid 經由 lipoxygenase 代謝，結果會對癌細胞增生表現誘導的效果 (Pidgeon et al., 2007)。而本次研究的重點酵素為『12-lipoxygenase』；platelet-type 的 12-LOX 會將經由 glycerol-phospholipid pool 將所釋放出來的 AA 代謝為 12(S)-HPETE 和 12(S)-HETE，leucocyte-type 的 12-LOX 則會將 AA 代謝成 15(S)-HETE 和 12(S)-HETE。

3. 12-lipoxygenase (12-LOX) in tumor cell

數種不同的研究指出，5-、12-LOX 所代謝的生成物具有促進血管新生 (angiogenesis)和腫瘤細胞生成 (carcinogenesis)的效果 (Pidgeon GP et al., 2002)，而 15-LOX 可能扮演一個抑制腫瘤細胞血管新生的角色進而去抑制腫瘤細胞的生成(Shureiqi et al., 2001; van Leyen et al., 1998)。另一個研究發現在前列腺腫瘤細胞中，12-LOX mRNA 的表現和癌症的分期有很重要的關係 (Gao et al., 1995)。

在各種腫瘤細胞中，12-LOX 的代謝生成物 12 (S)-HETE 已經被證實和腫瘤細胞的增生有很緊密的關係(Nie D et al., 2002)。近來和 12-HETE 有關的訊息傳遞已經被確認並描述出來，而且 12-HETE 和細胞表面所結合的接受器也逐漸的被發現 (Szekeres et al., 2000a; Szekeres et al., 2000b)。

針對前列腺腫瘤細胞，在近期的研究中發現，腫瘤細胞經過 12-LOX抑制劑baicalein或是BHPP (也稱BMD122)治療後，可以明顯的讓細胞週期維持在G₀/G₁ phase。同樣的在前列腺腫瘤細胞中也發現抑制 12-LOX可以改變Bcl-2 family 蛋白，造成促進細胞凋亡的情形，同時也會活化caspase-3/7 (Pidgeon et al., 2002)。在肺部腫瘤細胞中也進一步的發現抑制 12-LOX可以讓細胞週期維持在S-phase，這是因為減少了CDK-1 和cyclin B1 的表現，這兩種蛋白皆是調節細胞由S-phase進入G₂/M phase所必需的蛋白 (Leung et al., 2007)。

在腫瘤細胞中會觸發細胞凋亡的原因往往是破壞其 pro-和 anti-

apoptotic 間的平衡，使細胞傾向於 pro-apoptotic 之訊息傳遞，包含了從粒線體的釋放的 cytochrome c，和活化一系列的 caspases 等。在人類的乳腺細胞腫瘤中發現，專一性地抑制 5-LOX 和 12-LOX 可以誘導 cytochrome c 的釋放和活化 caspases，最後會促進細胞的凋亡 (Tong et al., 2002)。

而且 12-LOX 的代謝生成物 12-HETE 在微血管內皮細胞中可以扮演一個有絲分裂的因子 (mitogenic factor)(Tang et al., 1995)，進而促進內皮細胞 migration 的作用(Nie et al., 2000)。

4. Reactive Oxygen Species (ROS)

在呼吸的過程中，adenosine-di-phosphate (ADP) 轉變成 adenosine-triphosphate (ATP) 必須依靠電子在粒線體中各種 complexes 之間的傳遞。但是有些電子會從粒線體電子傳遞鏈複合物 (electron transport complexes) 中流失 (Jezek and Hlavata., 2005)。大約 1-5% 的氧分子會接收電子，轉變成超氧自由基 (superoxide O_2^-)，再進而還原成各種不同的氧原子代謝物，我們通稱這類物質叫做 Reactive Oxygen Species (ROS)(Karihtala and Soini., 2007)。過去認為 ROS 是經由白血球釋放後，具有保護細胞的功能並且能破壞外來病原體。但近來研究上發現，ROS 在細胞生長過程所需的訊息傳遞上也扮演著一個重要的角色。變異的 ROS 訊息可能會造成一些生理上或病理上的改變，如細胞週期進行的改變、aging、infarction/reperfusion 的傷害、和一些 complex diabetes 等(Wu., 2006)。

至於 ROS 對細胞的傷害主要是依其是否形成反應性高的 ROS 或其在細胞間擴散的情況，如果造成細胞的傷害過大就會使得細胞趨向死亡。儘管 ROS 和其存在的環境所進行的交互作用看似對細胞沒有好處，但是它們也具有扮演訊息傳遞的功用。在眾多的研究中發現少量的 ROS 具有顯著的調節基因的 transcription, cell proliferation 和 differentiation 的功用 (Finkel., 2001; Fruehauf JP et al., 2007; Liu et al., 2005)。因此在正常情況下，細胞內會存在著製造跟解毒 (detoxification) 的機制去維持 ROS 的恆定。如果這樣的恆定因為 ROS 大量的製造或是解毒的功效喪失而失去平衡，則會使得細胞內的 ROS 含量上升而造成氧化壓力提高，導致細胞走向死亡(Finkel., 2001)。

但是如果細胞只有少量甚至沒有 ROS 的存在，那會使得細胞停留在休止期 (quiescence) 狀態，而過量的 ROS 則會高度地刺激細胞的信號傳遞，最後造成細胞 proliferation 或 apoptosis (Mates and Sanchez-Jimenez., 2000)。

5. Melanoma cell

惡性黑色素瘤是一種高侵入性和高轉移性的癌細胞，而一般的黑色素瘤同樣也可以漸進式的形成惡性腫瘤。它的死亡率和其他癌症相較起來較低，但是近年來有明顯增加的趨勢。現今針對惡性黑色素瘤主要治療方針包含外科切除手術和全身性的化學治療 (Abe et al., 2007)。黑色素瘤主要是在表皮細胞基底層內的色素細胞 (melanocyte) 中生成，色素細胞若是不正常的增生則會增加表皮細胞內形成的黑色素細胞 (melanocytic naevi)，且依不同增生

的情形可分為多種病程。初期異常增生的黑色素細胞在表皮細胞或其附近幾乎是以橫向發展的方式蔓延；我們稱這時期為輻射狀生長期 Radial Growth Phase (RGP)，這時期通常都有良好的預後。然而進入垂直生長期 Vertical Growth Phase (VGP)，代表異常增生的黑色素細胞侵入到皮層 (dermis)內，在臨床上相較於前期危險性高 (Gaggioli and Sahai., 2007)。研究發現在各種人類黑色素瘤細胞株中均有 12-LOX 的表現，認為 12-LOX 和黑色素細胞生長有關甚至於可以做為一個治療指標 (Winer et al., 2002)。

6. Cell apoptosis

細胞凋亡(Cell apoptosis)一詞是最早是由 1972 年 John Kerr 所提出，本意是樹葉從樹上凋落，也被稱為細胞程式性死亡 (programmed cell death)，定義為細胞本身主動產生地一套機制，可以調控細胞死亡；生理功能包括了像是胚胎發育、組織分化、自體免疫等，移除一些變異的細胞，以保全個體的發展(Perl et al., 2005)；而另外一種細胞死亡方式為細胞壞死(Cell necrosis)，當細胞受到外在的傷害，像是自由基、缺氧、高劑量毒性藥物等，迫使細胞被動性的死亡(Lockshin and Zakeri et al., 2002)，相較於細胞凋亡，細胞壞死會導致細胞膜脹大，破壞膜的完整性，且釋出細胞內部物質；而細胞凋亡則是細胞縮小，且維持細胞膜的完整性，並不會釋出內部物質引起發炎(Fadok and Henson et al., 2002)。目前已知的細胞凋亡主要是與蛋白 caspase 的活化有關，caspase 的家族成員包含了十種以上，大致依性質分為兩類，一類是起始因子，主要是活化下游的 caspase 活性，像是 caspase 2、8、9、

10 等，另一類則是直接作用到受質，促使細胞執行死亡過程，主要是以 caspase 3 和 7 為主(Fan et al., 2005)。經由 caspase 活化路徑產生的細胞凋亡也分為兩種，一種是外在路徑(Extrinsic apoptotic pathway)，透過與死亡受體(Death receptor)結合，進一步活化 caspase 8，接著 caspase 8 再活化下游的 caspase 3，導致細胞死亡，像是 FAS-L 與 FAS 受體結合誘導的細胞凋亡(Lee et al., 2003)；另一種內在途徑則主要與粒線體媒介有關，細胞要死亡時，粒線體會釋出細胞色素(cytochrome c)與細胞質的 Apaf-1 結合，再活化 caspase 9，caspase 9 接著活化下游的 caspase 3，細胞接著死亡(Hill et al., 2003)。

貳、材料與方法 (Materials and Methods)

➤ 實驗材料

● 實驗試藥

主要研究藥物 Baicalein，分子量 270.24，購自 Sigma-Aldrich (USA) 實驗所使用之溶劑為 DMSO，加入細胞培養液中之 DMSO 總量以不超過 0.2% (v/v) 為主。

● 實驗細胞

B16F10 黑色素細胞瘤細胞株，構自食品工業發展研究所菌種中心 (台灣新竹)，細胞株來源為 ATCC ARL-6475。細胞培養液為 DMEM，外加 1.5 g/L sodium bicarbonate，20 mM HEPES，2 mM L-glutamine，100 U/ml penicillin，100 µg/ml streptomycin 及 10% 去活性之小牛血清 (heat-inactivated fetal calf serum, FCS)。

● 實驗藥品

1. 下列為 **Alexis** 公司之產品

hydroxy-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine
hydrochloride (CMH)

2. 下列為美國 **Amersham Life Science** 公司之產品：

Glycine

Tris-base

3. 下列為美國 **Bio-Rad** 公司之產品

Ammonium persulfate (APS)

Protein assay dye reagent concentrate

4. 下列為美國 **Dharmacon RNA technologies** 公司的產品

12-lipoxygenase siRNA

Positive control Lamin A/C siRNA

Dharmacon transfect reagent 1

5. 下列為美國 **Gibco BRL (Invitrogen)**公司之產品

Dubecco's modified eagle medium (DMEM)

Fetal calf serum (FCS)

L-glutamine

Penicillin/Streptomycin

Sodium pyruvate

Trypsin-EDTA

6. 下列為美國 **Cyto Pulse Sciences** 公司之產品

Cytoporation Medium

7. 下列為美國 **Pharmacia biotech** 公司之產品

Glycerol

N, N, N, N,-Tetramethylethylenediamine (TEMED)

Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20)

8. 下列為美國 **Sigma** 公司之藥品

Aprotinin

Baicalein

Catalase (CAT)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Dithiothreitol (DTT)

5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO)

Leupeptin

Mannitol

Tetrazolium dye 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,

5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

9. 抗體

12-lipoxygenase primary antibody (Abcam)

Anti-lamin A (C-terminal) antibody (Sigma)

Cleaved Caspase-3 rabbit (ASP175) antibody (Cell signaling)

Bax antibody (Cell signaling)

Anti-mouse Ig, HRP linked whole antibody (Amersham, USA)

Anti-rabbit Ig, HRP linked whole antibody (Amersham, USA)

10. 耗材

Cell culture dish, plate, flask, tube (Corning)

Cassette (Okamoto)

Developer and replenisher (Kodak)

Fix and replenisher (Kodak)

Nitrocellulose membrane (Amersham)

Scientific imaging film (Kodak)

➤ 實驗方法

1. 細胞之培養

B16F10 老鼠黑色素瘤細胞取自 NHRI 細胞庫 (台灣·新竹)，這些細胞利用 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) 培養，其中含有 10% 的小牛血清 (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) 和抗生素。每次培養液約 2-3 天更換一次直到細胞在培養皿上達到適當的滿度。繼代的培養我們會將培養液吸乾，並利用 phosphate-buffered saline 清洗三次後加入 Trypsin-EDTA solution (Gibco)。經過適當的震搖後移至 37°C 培養箱約 40 秒。取出後利用 phase-contrast microscope 去觀察細胞確定其貼附情形喪失後再給予 10 mL DMEM 使 Trypsin 功能喪失以解低其對細胞的傷害。離心 (850 G 七分鐘) 後底部的沉積物再利用 DMEM 將其打散並種植在新的培養皿上。實驗前會先將 medium 改成 DMEM contain 1% serum 進行培養。

2. 細胞存活率測定 (MTT assay)

我們將 B16F10 黑色素瘤細胞經過適當天數的培養後，以 1×10^4 細胞數/well 種植在 96 well 盤上，培養一天待細胞貼附在底層後給予 baicalein 各 10 μ M、25 μ M、50 μ M。給藥 6, 12, 18, 24 小時後，吸乾上面的培養液並將 MTT 以 0.5 mg/ml 的方式泡製在 DMEM 中給予 3 小時避光的 treatment，而後將培養液吸乾後避光給予 DMSO 300 μ L wash。30 分鐘後將每個 well 取出 200 μ L 置於

ELISA盤去測吸光值。在自由基清除劑試驗中，給予baicalein前三個小時會先給予不同濃度的mannitol (25, 50, 90 mM)和catalase (300, 800, 1600 unit/ml)來觀測ROS 是否會影響B16F10 黑色素瘤細胞的存活率。此實驗目的主要是利用活細胞內粒線體中 reductase將黃色的MTT試劑去還原成formazan的紫色結晶並堆積於細胞中，當加入DMSO使其溶解，即可利用測定OD值得知細胞還原MTT的能力，此OD值代表了活細胞內粒線體的reductase活性，即活細胞數目。每次試驗各實驗控制組皆會以triplicate方式種殖，並以平均值去做統計。

$$\text{細胞存活百分比 (\%)} = \frac{\text{加藥 6, 12, 18, 24 小時後的細胞吸光值}}{\text{控制組 6, 12, 18, 24 小時後的細胞吸光值}} \times 100 (\%)$$

3. 西方點墨法

將實驗處理取得之已定量的B16F10 melanoma cell 內蛋白質成份以5：1的體積比例加入6X sample loading dye (350 mM Tris-base、30 % Glycerol、350 mM SDS、175 μ M Bromophenol blue、600 mM DTT，pH 6.8)充分混勻後，100 $^{\circ}$ C加熱10分鐘，使蛋白質denature後，快速置於冰上至少5分鐘，以免回溫過程中酵素影響蛋白質，最後在4 $^{\circ}$ C下以轉速5000 r.p.m.離心5分鐘後備用。再以10 % polyacrylamide gel於running buffer (25 mM Tris-base、192 mM Glycine、0.1 % SDS, pH 8.3)下，每行分析 60~80 μ g之蛋白質，並以80 V / 30 mA進行電泳分離3 ~ 4小時。隨後將膠片置於transfer buffer (1 M Tris-base、20 % methanol、150 mM glycine, pH

8.3)中，以20 V進行電泳轉漬30分鐘，使膠片上之蛋白質轉移至 Polyvinylidene fluoride microporous membrane (PVDF ; Hybond-P) 表面，隨後將轉漬膜浸潤於blocking buffer (5 % non-fat milk、10 mM Tris-base、100 mM NaCl、0.1 % Tween 20, pH 7.5)中，約1小時後，以TBST (10 mM Tris-base、100 mM NaCl、0.1 % Tween 20, pH 7.5)清洗轉漬膜三次，每次10分鐘，之後加入一級抗體 (primary antibody)，如12-lipoxygenase、 α -tubulin、lamin A/C (S1) (Taisuke O *et al.*, 2003)、caspase-3，於室溫中搖晃作用3小時。再用TBST清洗轉漬膜四次，每次7分鐘，之後再加入標記有 horseradish peroxidase (HRP)的二級抗體 (secondary antibody)，於室溫下反應1小時，再以TBST清洗轉漬膜四次，每次7分鐘。最後使用冷光反應劑 Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection reagent使底片感光，以用來偵測蛋白質含量的表現情形。最後將成像後的底片掃描輸入電腦，以影像分析軟體 (Bio-1D version 99)做分析處理。

4. siRNA (Small Interfering RNA)

首先將B16F10 黑色素瘤細胞經過適當天數的培養後，然後將細胞自培養皿用Trypsin-EDTA solution (Gibco)收取下來，並維持約 3×10^6 /ml的細胞濃度，再使用CP-T與PBS比例 1:1 的電轉殖buffer將細胞打散、離心，重複兩次，最後拿存在於CP-T與PBS比例 1:1 的電轉殖 buffer 之 100 μ l細胞懸浮液，加上 1.5 μ M 的 12-lipoxygenase siRNA並用電轉殖細胞儀器給予電轉殖，最後加

入適量的培養液，倒入plate培養，60 小時後即可收取，再做相關後續實驗。E control指的是同樣方法收取的細胞，唯一不同的是並沒有給予12-lipoxygenase siRNA所做的對照組。

5. 流式細胞儀

利用流式細胞儀來偵測藥物是否會造成細胞的凋亡或壞死。首先將正常的細胞取下，將定量的細胞(5×10^4)，種於6 well的培養盤中，以含有10%FCS的DMEM培養液加以培養，接著置入培養箱中，讓細胞生長24小時後，將培養液換成不含FCS的DMEM培養液，再將細胞置入培養箱中24小時後，給予baicalein，再置入培養箱中讓細胞生長24小時，接著收取細胞，首先將培養盤的培養液分別集中於tube中，接著再以PBS沖洗後，同樣將PBS收集到tube中。接著再加入trypsin-EDTA，使細胞從培養盤中脫落，同樣將之收集於tube中，接下來將tube離心，接著在吸取上清液，再加入PBS，使離心下來的細胞再次成為懸浮液，同樣再離心，吸取上清液，以Annexin V-FITC apoptosis detection kit I染色，接下來再用EXPO32 ADC XL4 COLOR軟體進行apoptosis的分析。

6. 統計分析

實驗數據皆以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM)表示，控制組與ATO組之間的比較以One-Way ANOVA做統計分析。若 $p < 0.05$ 則表示有意義的差別。

參、結果

1. 利用胞外自由基清除劑及胞內自由基清除劑觀察其對於 baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞死亡或抑制生長的情況之影響

首先對於 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞，我們 pretreated 胞外的自由基清除劑(mannitol 25 mM 或 catalase 300 unit/ml) 1 小時，接著再加入 baicalein 50 μ M 24 小時，最後觀察 baicalein 造成的黑色素瘤細胞死亡以及生長變異情況是否會被胞外的自由基清除劑給抵消，結果發現胞外的自由基清除劑對於 baicalein 造成細胞地生長變異影響並不大，大部分細胞仍呈現給予 baicalein 後的膨脹、破碎情形(Fig. 2)；然而在種植相同的細胞數量下，卻可發現有 pretreated 自由基清除劑的細胞，其數量明顯地較單純給予 baicalein 的細胞多。而這在之前的研究中已證實胞外自由基清除劑，不管是 mannitol 或 catalase 對於 50 μ M 的 baicalein 造成的 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞生存率下降都有明顯的回復效果(賴彥安碩士論文, 2009)。

另外在胞內自由基清除劑方面，我們也是使用同樣的給藥方法，先 pretreated 胞內自由基清除劑(CMH 1 mM 或 DMPO 10 mM) 1 小時，接著再給予 50 μ M 的 baicalein 24 小時，最後觀察細胞的生長情況，結果發現胞內的自由基清除劑對於 baicalein 造成細胞生長變異影響也是不大，細胞仍然會膨脹、破碎，只是略比單給

baicalein 50 μ M情況輕微而已(Fig. 3)；同樣地，在種植同樣數量的細胞下，有 pretreated 胞內自由基清除劑的細胞數量明顯的比單給 baicalein 的細胞多；於此同時，我們也用了 MTT assay 去了解胞內自由基清除劑對於 baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞生存率下降是否有什麼影響，結果發現，不論是 CMH 或 DMPO 皆會明顯且有意義的改善 baicalein 誘導之小鼠黑色素瘤細胞死亡(Fig. 4)。根據上述實驗結果，我們推論 baicalein 誘導之小鼠黑色素瘤細胞死亡與 ROS 有密切的關係。

2. 利用胞外自由基清除劑及胞內自由基清除劑觀察其對於 baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞中 active caspase-3 蛋白表現增加是否有其它改變

首先我們 pretreated B16F10 小鼠黑色素瘤細胞，胞外自由基清除劑(mannitol 25 mM 或 catalase 300 unit/ml)，又或胞內的自由基清除劑(CMH 1 mM 或 DMPO 10 mM) 1 小時，接著再加入 baicalein 50 μ M 24 小時，最後將細胞按照實驗方法中提到的步驟收取下來，去做 western blotting 實驗，觀察自由基清除劑對於 baicalein 誘導的 caspase-3 表現增加是否有其他影響，結果發現不論是胞內或胞外的自由基清除劑，對於 caspase-3 的表現影響都不大(Fig. 5)；另外我們還看了與內在途徑的細胞凋亡有關之蛋白 Bax，結果也是同樣影響不大(Fig. 6)。根據以上實驗結果，我們推論 ROS 儘管與 baicalein 誘導之小鼠黑色素瘤細胞死亡有關，但其與 baicalein 造成的細胞凋亡應該是沒有關係的。

3. 利用 12-lipoxygenase (12-LOX) 的下游活性產物 12-HETE 觀察其對於 baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞死亡或抑制生長情況之影響

首先我們 pretreated B16F10 小鼠黑色素瘤細胞，12-lipoxygenase 的下游活性產物 12-HETE 500 nM 或 1000 nM 1 小時，接著再給予 baicalein 50 μ M 24 小時，然後觀察 baicalein 造成的黑色素瘤細胞死亡以及生長變異情況是否會受到 12-HETE 的影響，結果發現 baicalein 導致黑色素瘤細胞變的膨脹拉長以及破碎的情況，再加入了 12-HETE 後，不論濃度為何，並不會有明顯的型態回復(Fig. 7)；然而有 pretreated 12-HETE 的細胞數量明顯比單給 baicalein 的細胞來得多。同時我們也利用了 MTT assay 去觀察細胞的存活率是否與顯微鏡下的發現細胞數量差異一致，結果發現 12-HETE 在 1000 nM 時可以有意義的回復 baicalein 導致的細胞死亡，而 500 nM 的 12-HETE 影響不大(Fig. 8)。由以上實驗結果，我們可以推論 baicalein 誘導之小鼠黑色素瘤細胞死亡與其抑制 12-LOX 有著密切的關係。

4. 利用 12-lipoxygenase (12-LOX) 的下游活性產物 12-HETE 觀察其對於 baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞中 active caspase-3 蛋白表現增加的影響

首先我們也是先給予 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞，12-lipoxygenase 的下游活性產物 12-HETE 500 nM 或 1000 nM 1 小時，接著再給

予 baicalein 50 μ M 24小時，然後依實驗方法中提到的步驟將細胞收取下來，再做 western blotting 實驗，最後再以 caspase-3 的專一性抗體去看細胞的 caspase-3 的表現，結果發現在 1000 nM 的 12-HETE 作用下，可以有效且有意義的減少 baicalein 所誘發地 caspase-3 表現，但 500 nM 濃度的 12-HETE 則改變不大(Fig. 9)。如此可以推論，在特定濃度下的 12-HETE 可能抵銷了 baicalein 對於 12-LOX 的抑制作用，進而也減輕了 baicalein 造成的黑色素瘤細胞凋亡情形，所以 baicalein 導致的細胞凋亡應該與其抑制 12-LOX 有關。

5. 利用 ROS 清除劑和 12-lipoxygenase (12-LOX) 的下游活性產物 12-HETE 觀察其對於 baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞死亡或抑制生長情況之影響

首先我們也是先給予 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞，胞外自由基清除劑 mannitol 25 mM 或 catalase 300 unit/ml，又或胞內自由基清除劑 CMH 1 mM 或 DMPO 10 mM，但於此同時我們也加入了 12-HETE 1000 nM，總共兩種藥物 pretreated 1 小時，接著再給予 baicalein 50 μ M 24小時，然後觀察 baicalein 造成的黑色素瘤細胞死亡以及生長變異情況，是否會受到同時加入的 ROS 清除劑和 12-HETE 之影響，結果在顯微鏡下可以明顯發現細胞的生長變異情形明顯減小，雖然無法完全回復到 control 的正常情況，不過相對於 baicalein 50 μ M，細胞的確有更明顯改善(Fig. 10)。另外我們也做了 MTT assay 去觀察細胞的存活率，結果細胞的存活率在

ROS 清除劑和 12-HETE 共同作用下更是非常有意義的回復(Fig. 11)。由以上結果我們幾乎可推論，baicalein 造成的小鼠黑色素瘤細胞死亡就是與其抑制了 12-LOX 和產生自由基兩路徑有關。

6. 利用 12-lipoxygenase (12-LOX) siRNA 觀察其對於 baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞生存率下降情況之影響

此處我們利用實驗方法中提到的 siRNA 技術，有效的將 12-LOX 的表現降低，而 12-LOX 的蛋白表現量也用 western blotting 來呈現，接著觀察細胞在 12-LOX siRNA 後，給予 baicalein 與否，對於細胞的生存率有什麼影響。在細胞生存率上，我們使用 MTT assay 來研究，結果發現，細胞在 12-LOX siRNA 後會有意義的減少 baicalein 所誘導的死亡(Fig. 12)。由以上結果可以推論，baicalein 造成的細胞死亡會透過 12-LOX，當 12-LOX 的蛋白表現被降低後，細胞受到 baicalein 誘導的死亡也會跟著降低。

7. 利用流式細胞儀觀察 baicalein 造成的 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞壞死及凋亡的情形

給予 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞 baicalein 50 μ M 24小時，然後按照實驗方法中提到的流式細胞儀細胞收取法，將細胞收取下來，加入染劑，接著放入流式細胞儀中操作，結果發現死亡的細胞會明顯分佈在代表細胞壞死的第一象限(A1)，而代表細胞凋亡的第二(A2)和第四象限(A4)細胞卻不多。這個結果是有意義的，由此

我們確定了，50 μM baicalein 造成的細胞死亡(41.24%)，大部分都是細胞壞死(約 32.26%)所造成，細胞凋亡(約 8.98%)的部分是較少的(Fig. 13)。



肆、討論

其實很多細胞皆會表現 12-LOX，包含了胰臟細胞、血管平滑肌細胞 (VSMCs) 和血小板等。而且在癌症細胞中也同樣發現會表現出 12-LOX，包括了人類直腸腫瘤細胞、人類肺腫瘤細胞和胃腫瘤細胞 (Jiang et al., 2003; Ohd et al., 2003)。在先前的電子順磁共振儀 (ESR) 研究結果發現，baicalein 在血小板懸浮液 (platelet suspension) 中可以產生 four-line 的 hydroxyl radical 訊號且認為必須透過 12-LOX 而來 (Chou et al., 2007)。而最近的研究也發現 baicalein 可以在 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞透過 12-LOX 產生 hydroxyl radical，進一步抑制黑色素瘤細胞的生長和導致細胞凋亡 (Chou et al., 2009)。但是導致細胞凋亡的主要原因是因為 baicalein 抑制了 12-LOX，還是因為產生了 ROS，仍尚未被確切的探討到，所以我們想知道 baicalein 導致小鼠黑色素瘤細胞凋亡的主要原因為何。

初步的結果發現在 50 μ M 的 baicalein 作用下，細胞就會產生一些生長變異的情況，像是細胞變的膨脹，部分細胞會破碎，細胞數量也會明顯減少，這些都是細胞死亡的證據。在 MTT 實驗中也得到相同的結果，細胞的存活率的确會下降 (Fig. 2)。接著我們使用 ROS 清除劑，來探討 baicalein 導致的小鼠黑色素瘤細胞死亡是否會與 ROS 有關，結果發現，ROS 的清除劑雖然對於細胞的生長變異影響不大 (Fig. 2 and Fig. 3)，但是可以有意義的恢復 baicalein 導致的細胞存活率下降 (Fig. 4)。所以我們推論 baicalein 誘導的細胞死亡，與 baicalein 誘導

ROS 的產生有明顯的關係。而之前也早有研究證實，ROS 的產生會導致細胞的死亡以及細胞壞死(Lockshin and Zakeri et al., 2002)。

另外有研究提到，baicalein 也會誘導 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞的 active caspase-3 蛋白表現增加，最終造成細胞凋亡(賴彥安碩士論文, 2009)。而既然我們發現 ROS 清除劑可以有效地改善 baicalein 造成的細胞死亡；接者下一步則是研究 ROS 清除劑，對於 baicalein 誘導的細胞凋亡是否也有同樣的抑制效果，結果卻發現 ROS 清除劑對於 baicalein 所誘導的 active caspase-3 表現無明顯改變(Fig. 5)；所以推論在 baicalein 作用 B16F10 細胞的實驗中，ROS 可以誘導細胞產生死亡，但是此細胞死亡與細胞凋亡的關係並不大，這種不屬於細胞凋亡的細胞死亡，極有可能是細胞壞死，ROS 造成的細胞壞死在之前的研究中也已被證實過(Finkel., 2001)。

確定 baicalein 導致地 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞凋亡與 ROS 無明顯關係後，我們接著想知道另一種可能性，baicalein 抑制 12-LOX 的活性是否與其導致細胞凋亡有關；之前也有相關研究發現，在人類的乳腺腫瘤細胞中，專一性地抑制 12-LOX 可以誘導 cytochrome c 的釋放和活化 caspases，最後也會促進細胞的凋亡 (Tong et al., 2002)。於是我們使用 12-LOX 下游的活性產物 12-HETE，模擬 12-LOX 的活性並未被 baicalein 抑制時的情況；而會選擇 12-HETE 的原因則是，12-LOX 此酵素會將 arachidonic acid (AA) 代謝成具有生理活性的 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acids (12-HPETEs)，接著再還原為 12-hydroxyleicosatetraenoic acid (12-HETEs)，所以我們可用 12-HETE 的有無來模擬 12-LOX 本身的活性，而之前也已經有過使用 12-HETE

來模擬 12-LOX 的相關研究(Henry et al., 2007)。來而實驗結果發現，12-HETE 雖然對於細胞的生長變異影響不大(Fig. 7)，但是可以有意義的回覆 baicalein 導致的細胞存活率下降(Fig. 8)。由以上結果可以推論，抑制 12-LOX 的確是 baicalein 導致小鼠黑色素瘤細胞死亡的原因之一。

既然抑制 12-LOX 會誘導細胞死亡，接著我們想探討其對於細胞凋亡的影響，同樣也是使用 12-LOX 下游的活性產物 12-HETE，來研究其對於 baicalein 誘導的細胞凋亡改變造成之影響，結果發現 12-HETE 可以有效減少 baicalein 誘導的細胞凋亡蛋白 active caspase-3 表現增加(Fig. 9)。以上結果證實，baicalein 導致的 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞凋亡可能與其抑制了 12-LOX 有關。之前有研究也指出，當人類胃癌細胞的 12-LOX 被抑制後，將會導致細胞產生細胞凋亡(Benjamin Chun et al., 2001)；另外有研究發現 baicalein 會因為抑制 12-LOX，進而誘導人類肺部非小細胞腫瘤的細胞凋亡(Henry et al., 2007)。

確定了在 baicalein 作用 B16F10 細胞的實驗中，ROS 和 12-LOX 皆會導致細胞的死亡，而細胞凋亡主要是因為抑制 12-LOX 後；我們同時 pretreated 自由基清除劑和 12-HETE，來研究如此給藥方式對於細胞是否有所謂加成作用，以了解兩者在 baicalein 誘導小鼠黑色素瘤細胞死亡的實驗中扮演之角色，結果發現同時給予兩種藥物會大幅降低 baicalein 所誘導的細胞死亡，情況比單給予任何一種藥物都好。以上所發現的結果都證實了一件事，baicalein 誘導的小鼠黑色素瘤細胞死亡的主要原因就是 baicalein 會產生 ROS，以及 baicalein 對於 12-LOX 的抑制作用，兩者皆會造成細胞的死亡。

另外我們進一步使用 siRNA 的技術，將 12-LOX 的蛋白表現量降低，結果發現當我們將 12-LOX siRNA 後，接著給予 baicalein，E 控制組的細胞死亡率反而比 12-LOX siRNA 組來得高(Fig. 12)；加上之前的研究發現小鼠黑色素瘤細胞 pretreated 12-LOX siRNA 後，baicalein 就無法使其產生 ROS 了(Chou et al., 2009)，如此或許可以說明一件事，當細胞 pretreated 12-LOX siRNA 後，給予的 baicalein 就無法有效作用到 12-LOX 上，最後細胞無法產生過量的 ROS，所以存活率比較高；換句話說，baicalein 產生的 ROS 必須透過 12-LOX，而 baicalein 本身抑制 12-LOX 的特性可能並不是單純降低 12-LOX 的蛋白表現。而給予 baicalein 的 E 控制組細胞存活率大幅度低於 12-LOX siRNA 後的細胞，這或許更說明另一件事，baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞死亡主要原因可能是 ROS，所以此死亡是以細胞壞死為主，細胞凋亡可能僅佔其中一小部分。

為了證實上述的推論，baicalein 造成的 B16F10 黑色素瘤細胞死亡主要原因是 ROS，且此死亡是以 ROS 導致的細胞壞死為主；我們用了流式細胞儀來分析小鼠黑色素瘤細胞在 baicalein 的作用下，其細胞的死亡種類分佈，結果發現大部分的死亡細胞都是細胞壞死，而細胞凋亡僅佔其中一小部份。但是也有研究提到，baicalein 要與 Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) 共同作用後才會有最佳的誘導癌細胞凋亡效果，因為 baicalein 可以抑制癌細胞中的 TRAIL 阻抗性，造成癌細胞的凋亡大幅增加 (Hiroya et al., 2008)。

伍、結論與展望

本次的實驗結果證實，baicalein 會造成 B16F10 小鼠黑色素瘤細胞死亡，主要原因是因為 baicalein 透過 12-LOX 產生了大量的 ROS，最後導致細胞壞死；但是細胞死亡中也包括了部分的細胞凋亡，則是因為 baicalein 會抑制 12-LOX 的表現。因此在為未來的展望中，baicalein 不只可以用在傳統中草藥醫療上，對於癌症的治療上更有許多發展的潛力，而抑制 12-LOX 可以誘導癌細胞凋亡，也是未來可以研究的癌症治療方向之一。

陸、圖表

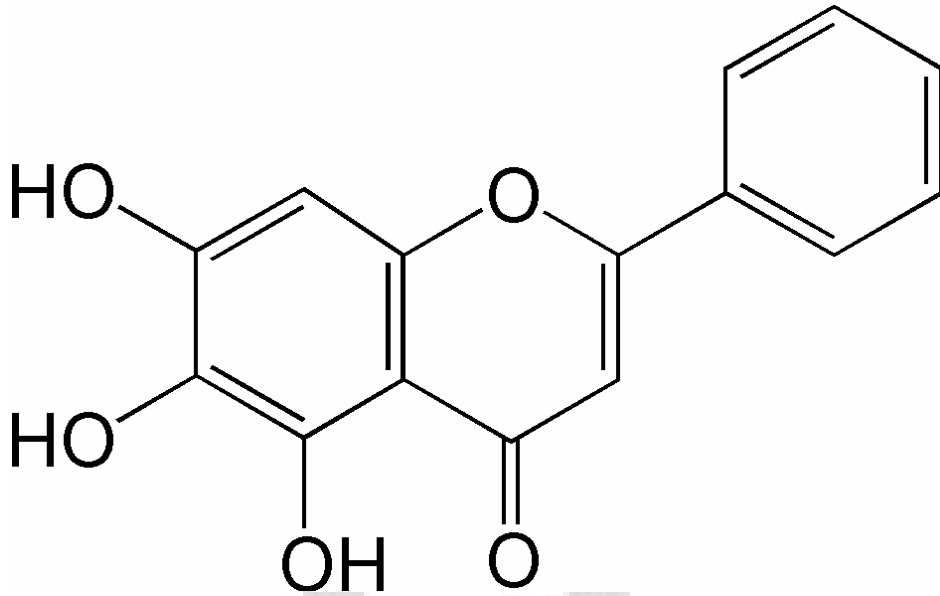


Figure 1.

Chemical structure of baicalein

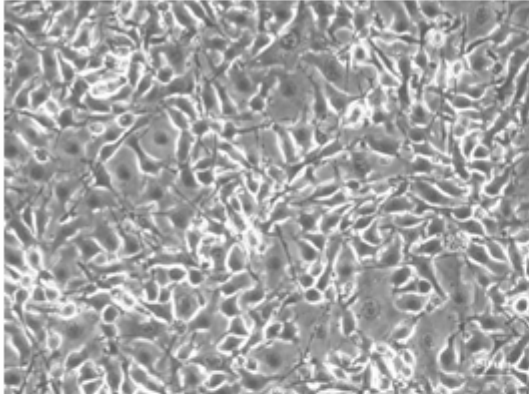
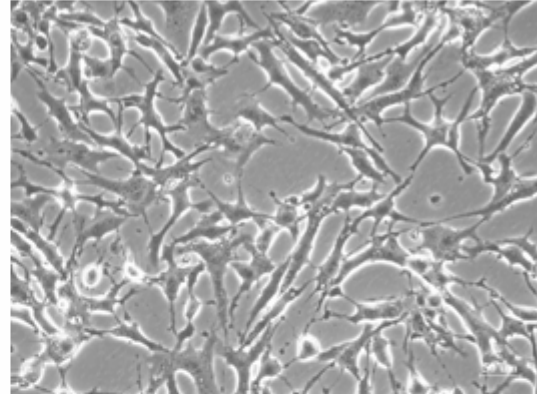
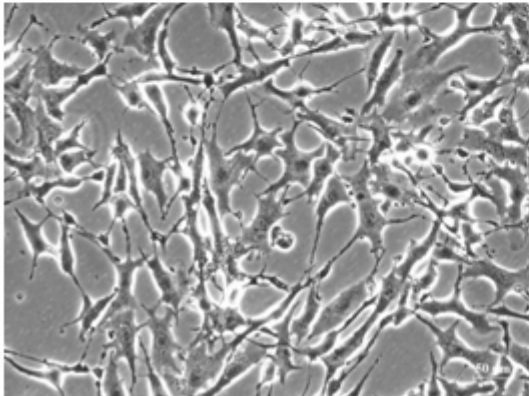
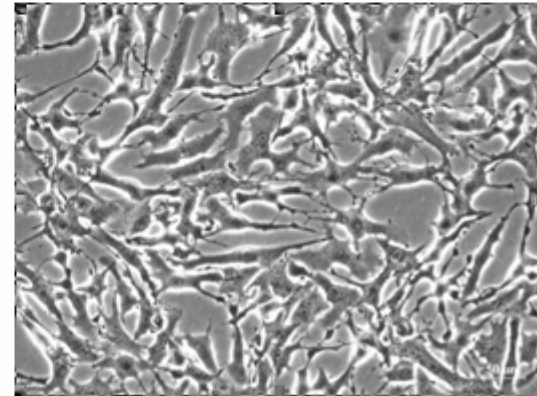
A**B****C****D**

Figure 2.

Effect of mannitol and catalase on baicalein-induced morphological change in B16F10 melanoma cells. B16F10 were treated with 50 μ M of baicalein for 24 hours. ROS scavengers were treated before baicalein for 1 hours. Cell washed with PBS for three times before seeded under the microscopy. (A) resting, (B) 50 μ M baicalein (C) 50 μ M baicalein + 25 mM mannitol (D) 50 μ M baicalein + 300 unit/ml catalase (magnification: x100)

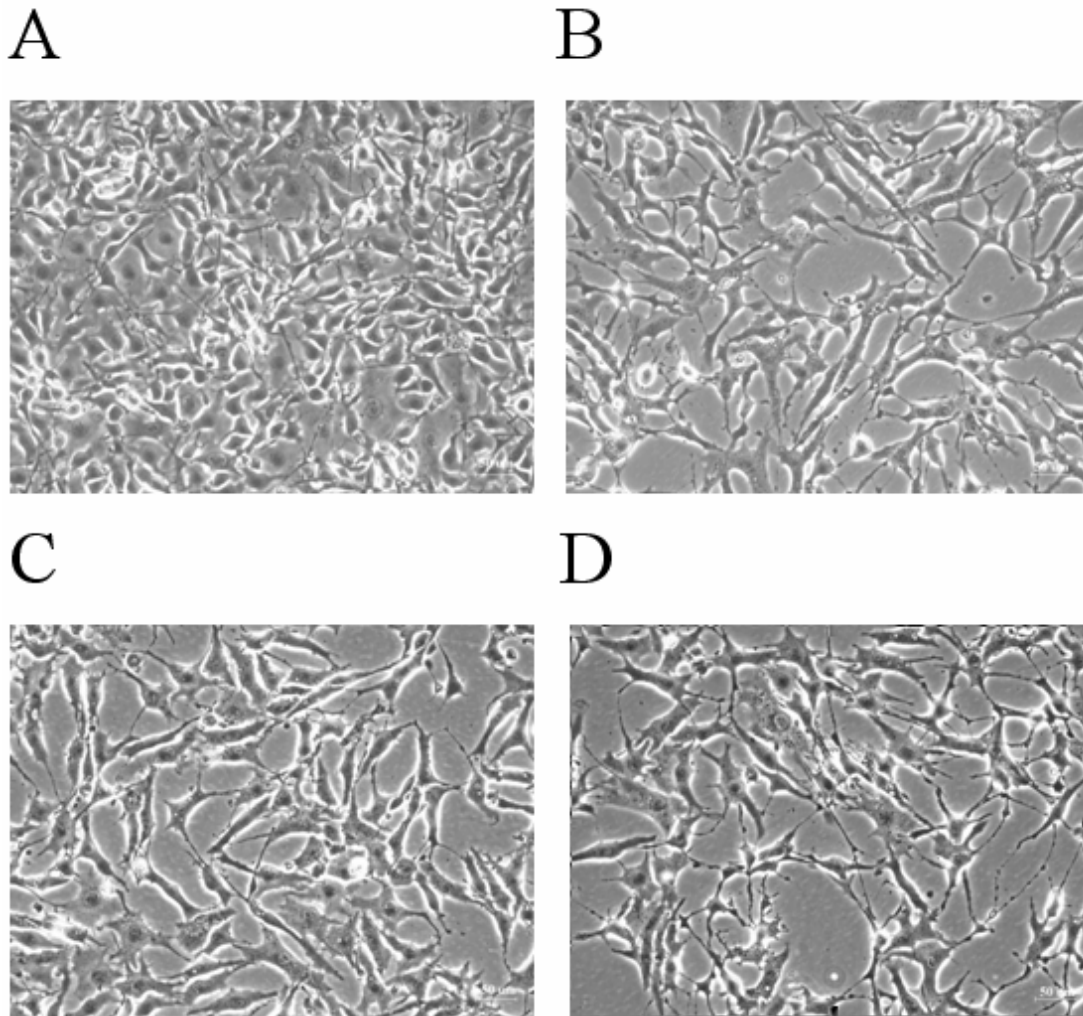


Figure 3.

Effect of DMPO and CMH on baicalein-induced morphological change in B16F10 melanoma cells. B16F10 were treated with 50 μ M of baicalein for 24 hours. ROS scavengers were treated before baicalein for 1 hour. Cell washed with PBS for three times before examination under the microscopy. (A) resting, (B) 50 μ M baicalein (C) 50 μ M baicalein + 1 mM CMH (D) 50 μ M baicalein + 10 mM DMPO (magnification: x100)

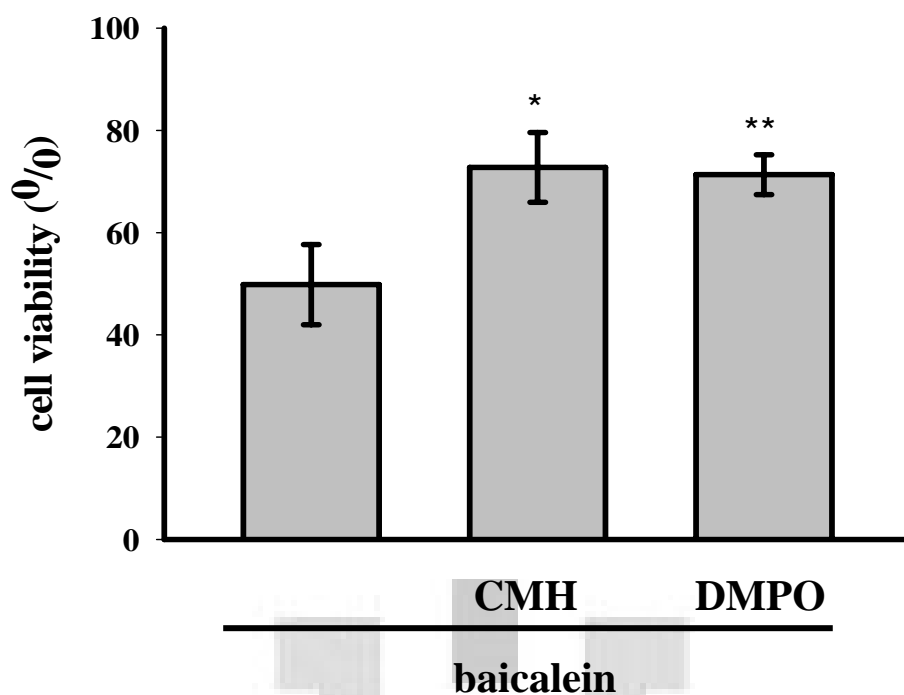


Figure 4.

B16F10 melanoma cells (5×10^4 cells/ml) were dispensed on 96-well plates till 80~90% confluent condition. Cells were treated with indicated concentration of 1 mM CMH or 10 mM DMPO for 1 hour before treatment with baicalein 50 μ M for 24 hours. Percentage of viability is presented as mean \pm SEM of three independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ as compare with the baicalein treatment only.

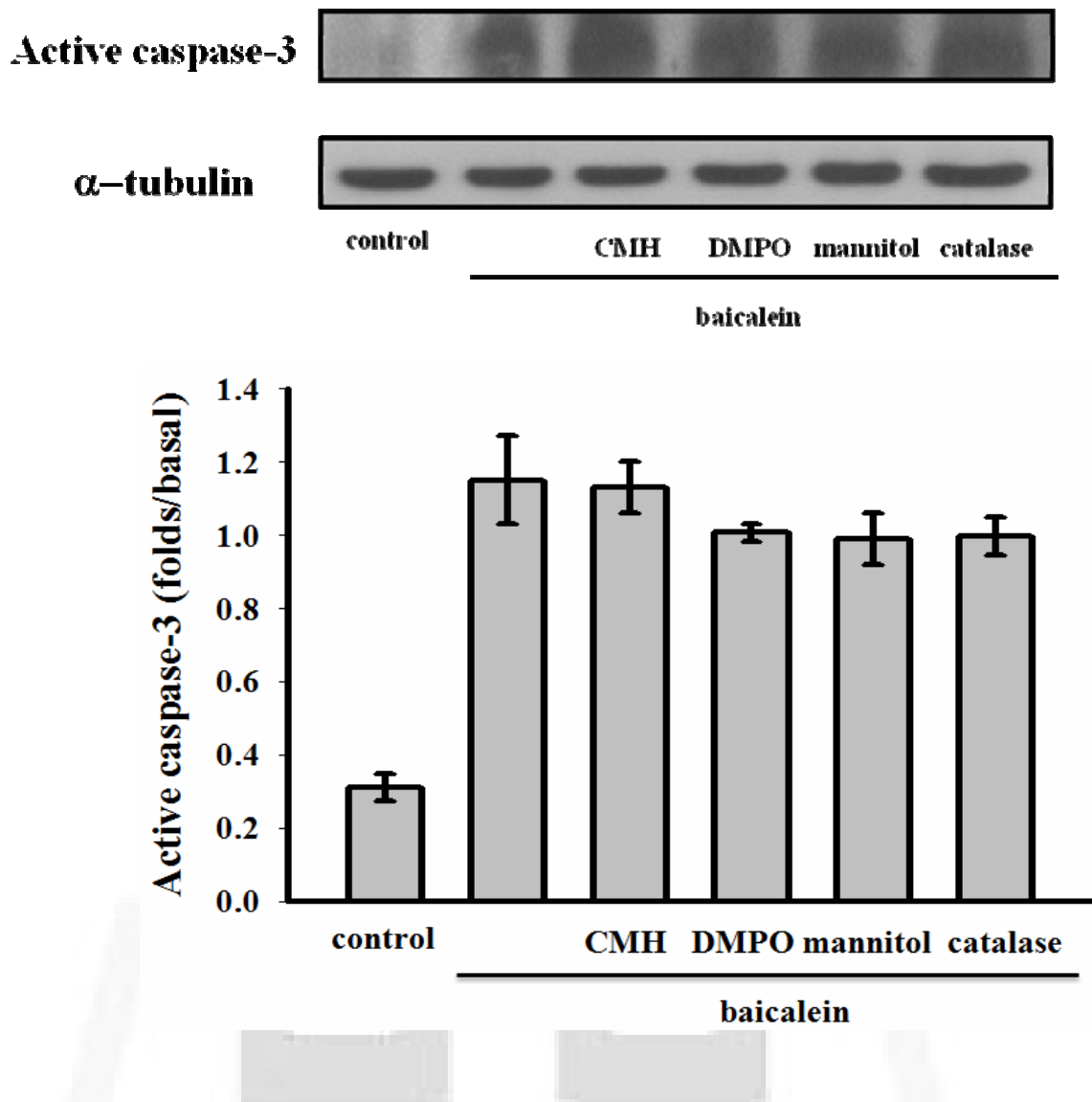


Figure 5.

Effect of ROS scavengers and baicalein on cleaved caspase-3 protein in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with indicated concentration of 1 mM CMH, 10 mM DMPO, 25 mM mannitol, or 300 unit/ml catalase for 1 hour before treatment with 50 μ M baicalein for 24 hours. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtain by scanning the anti-cleaved caspase-3 and anti- α -tubulin reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as mean \pm SEM. (n = 3).

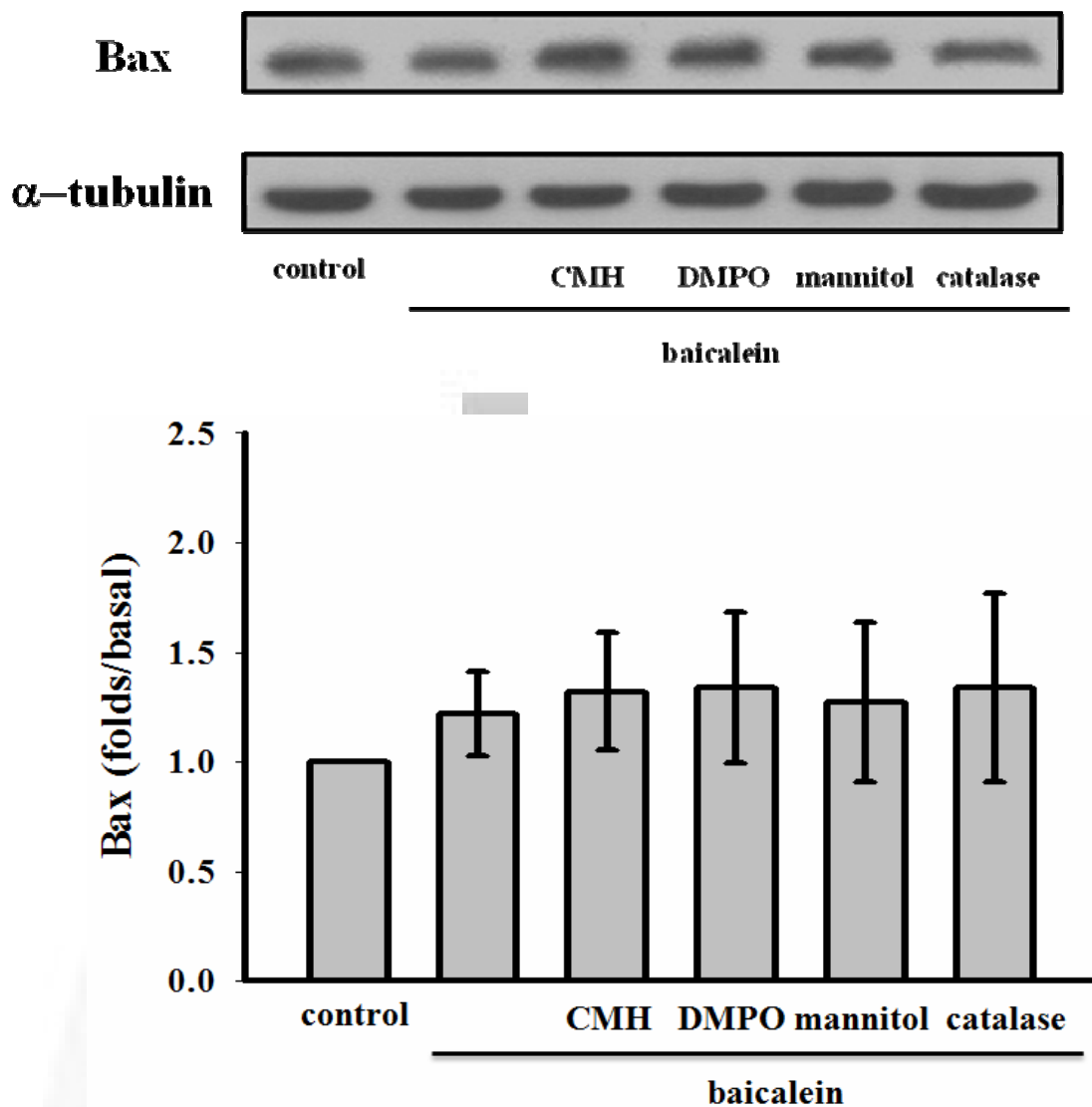


Figure 6.

Effect of ROS scavengers and baicalein on Bax protein in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with indicated concentration of 1 mM CMH, 10 mM DMPO, 25 mM mannitol, or 300 unit/ml catalase for 1 hour before treatment with 50 μ M baicalein for 24 hours. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtain by scanning the anti- Bax and anti- α -tubulin reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as mean \pm SEM. (n = 3).

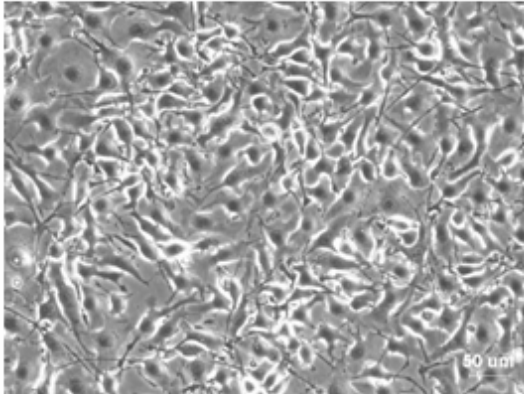
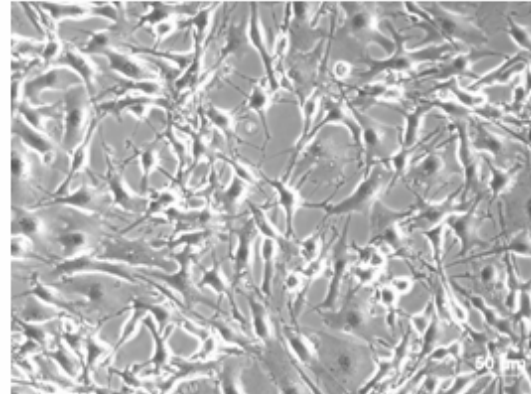
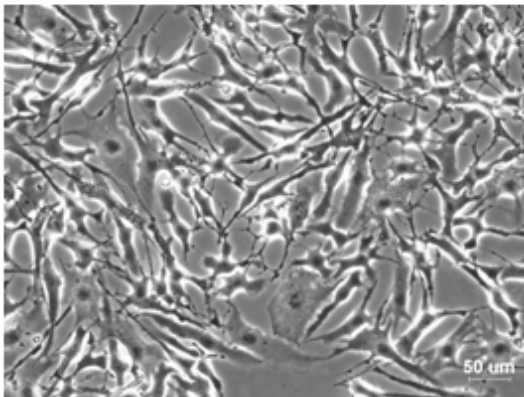
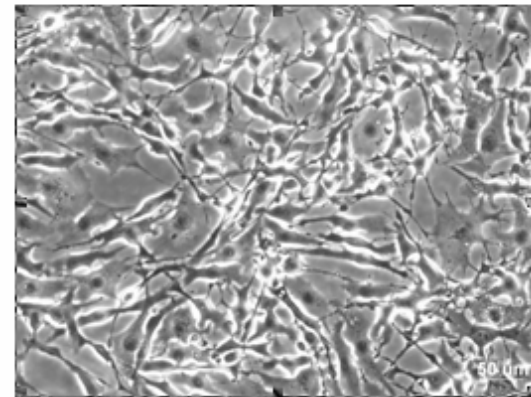
A**B****C****D**

Figure 7.

Effect of 12-HETE on baicalein-induced morphological change in B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with 50 μM of baicalein for 24 hours. 12-HETE was added for 1 hour before treatment with baicalein. Cell washed with PBS for three times before examination under the microscopy. (A) resting, (B) 50 μM baicalein (C) 50 μM baicalein + 500 nM 12-HETE (D) 50 μM baicalein + 1000 nM 12-HETE (magnification: x100)

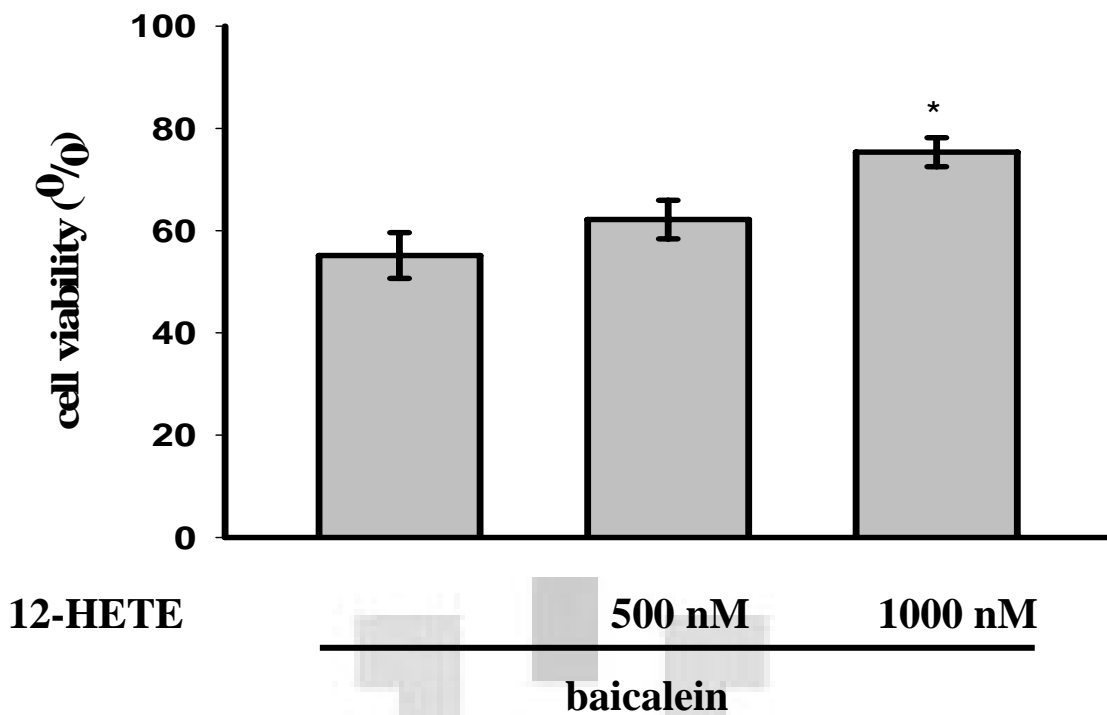


Figure 8.

B16F10 melanoma cells (5×10^4 cells/ml) were dispensed on 96-well plates till 80~90% confluent condition. Cells were treated with indicated concentration of 500 nM 12-HETE or 1000 nM for 1 hour before treatment with 50 μ M baicalein for 24 hours. Percentage of viability is presented as mean \pm SEM of three independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ as compare with the baicalein treatment only.

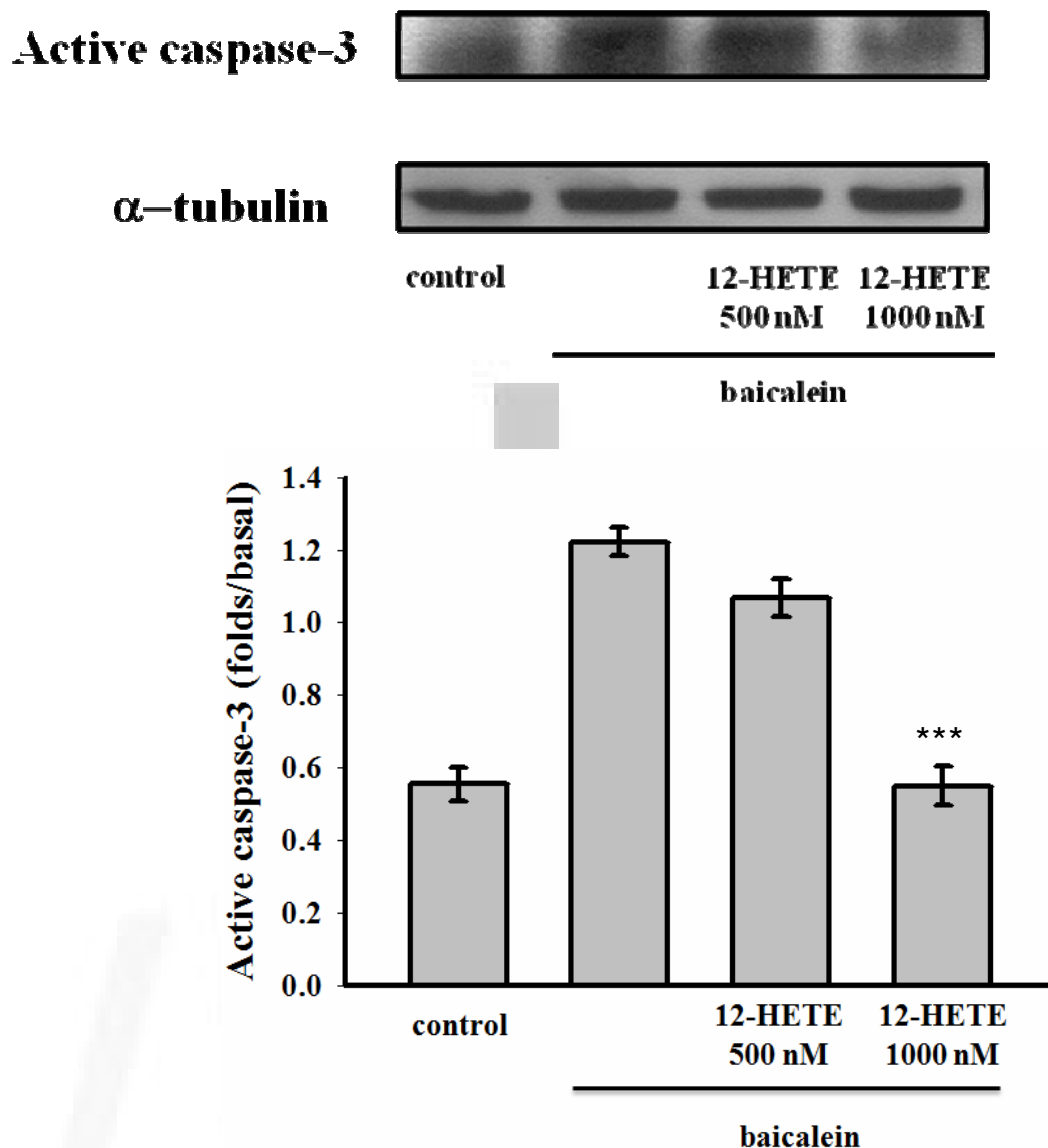


Figure 9.

Effect of 12-HETE on baicalein-induced cleaved caspase-3 protein expression in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with indicated concentration of 500 nM 12-HETE or 1000 nM for 1 hour before treatment with 50 μ M baicalein for 24 hours. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtain by scanning the anti-cleaved caspase-3 and anti- α -tubulin reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as mean \pm SEM. (n = 3). *** p < 0.001 as compare with the baicalein treatment only.

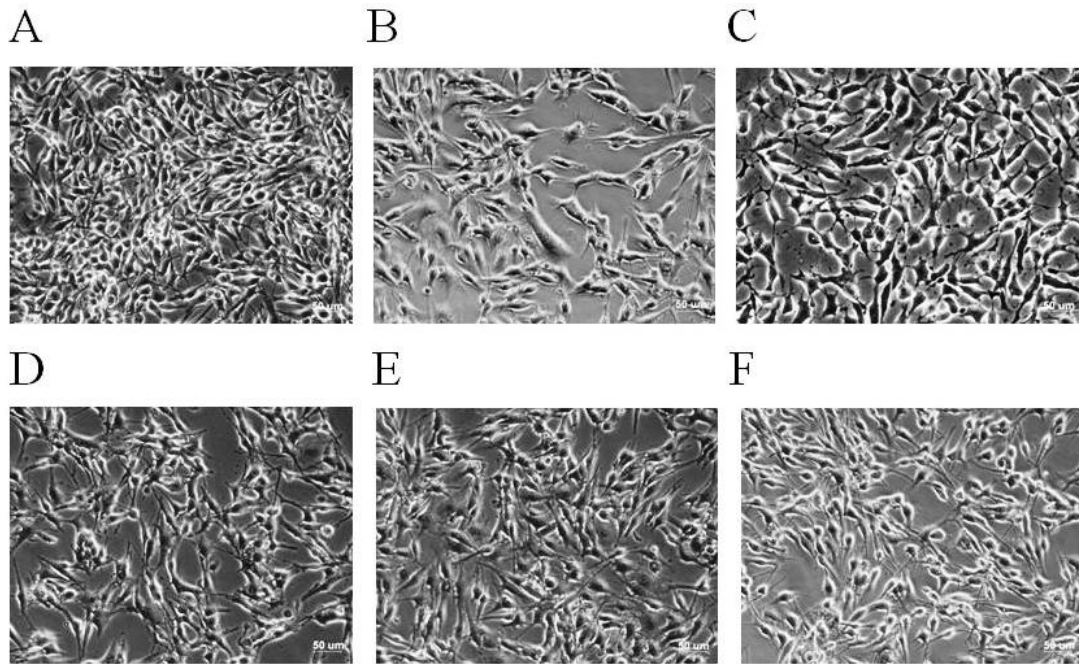


Figure 10.

Effect of ROS scavengers and 12-HETE on baicalein-induced morphological change in B16F10 melanoma cells. B16F10 were treated with 50 μ M of baicalein for 24 hours. ROS scavengers and 12-HETE were added 1 hour before treatment with baicalein. Cells washed with PBS for three times before examination under the microscopy. (A) resting, (B) 50 μ M baicalein (C) 50 μ M baicalein + 1000 nM 12-HETE + 1 mM CMH (D) 50 μ M baicalein + 1000 nM 12-HETE + 10 mM DMPO (E) 50 μ M baicalein + 1000 nM 12-HETE + 25 mM mannitol (F) 50 μ M baicalein + 1000 nM 12-HETE + 300 unit/ml catalase (magnification: x100)

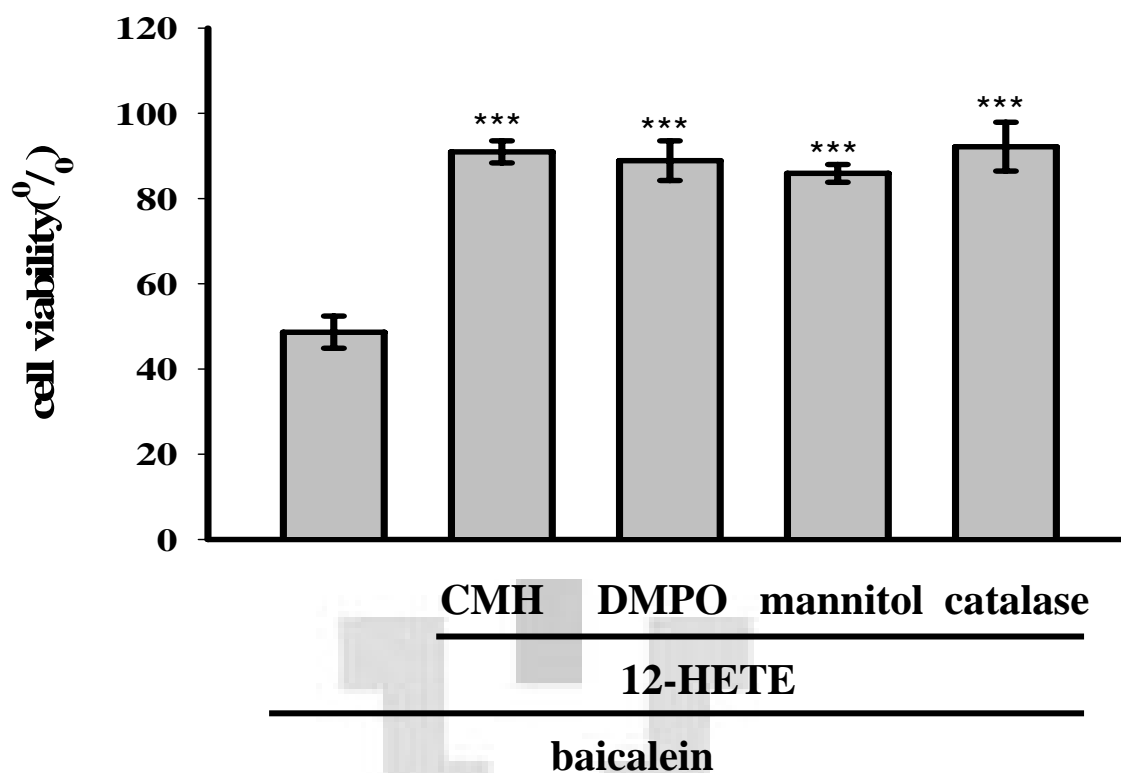


Figure 11.

B16F10 melanoma cells (5×10^4 cells/ml) were dispensed on 96-well plates till 80~90% confluent condition. Cells were treated with indicated concentration 1000 nM 12-HETE and ROS scavengers, 10 mM DMPO or 1 mM CMH or 25 mM mannitol or 300 units/ml catalase for 1 hour before treatment with baicalein 50 μ M for 24 hours. Percentage of viability is presented as mean \pm SEM of three independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ as compare with the baicalein treatment only.

12-Lipoxygenase



α -tubulin



control

12-Lox siRNA

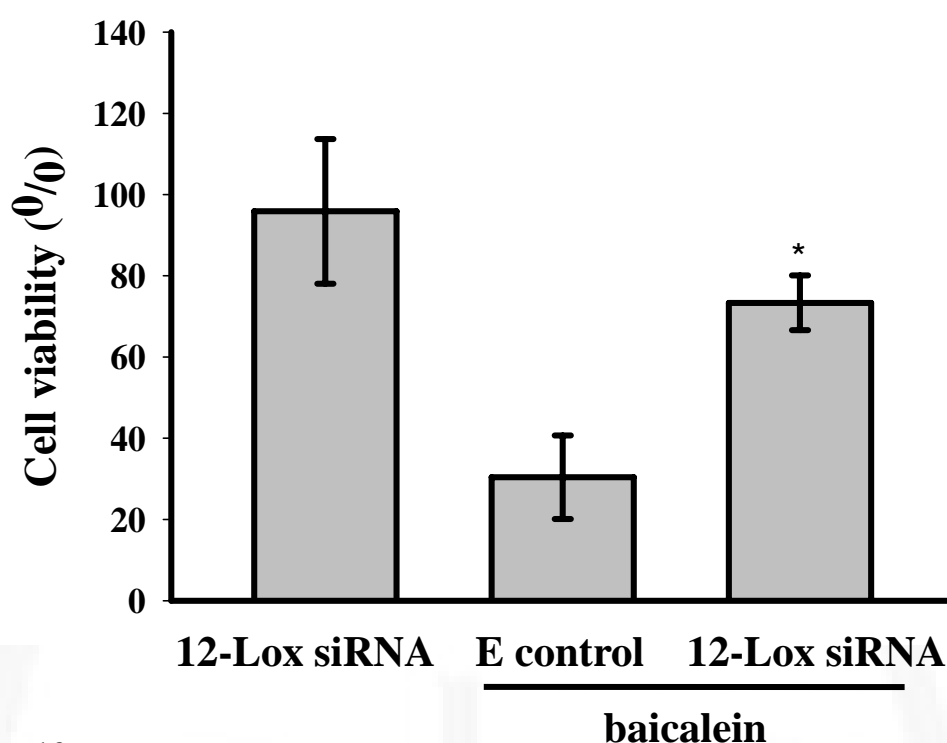


Figure 12.

Effect of 12-Lox siRNA on the cells treated with 50 μ M baicalein for 24 hours. E, electroporation. Percentage of cell viability is presented as the mean \pm SEM of three independent experiments. All values were normalized to the electroporatic control, designated as 100%. ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05 as compare with the E control.

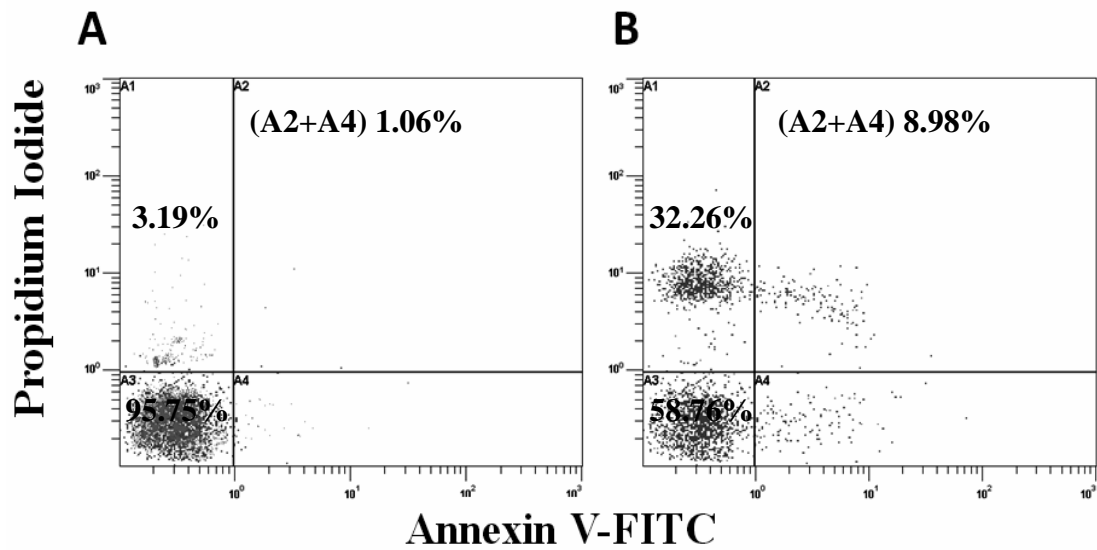


Figure 13.

Flow cytometric analysis for apoptosis in B16F10 melanoma cell following treatment with baicalein: A control cells; B cells treated with 50 μM baicalein. Apoptotic index is the sum of the percentage of cells that are positive for annexin-V-FITC alone (pre-apoptotic) and cells positive for both annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) (late-apoptotic) within a population of cells. Necrosis index is the sum of the percentage of cells that are positive for propidium iodide (PI) within a population of cells. Data are presented as mean ± SEM. (n = 3).

柒、參考文獻

- Abe R, Fujita Y, Yamagishi S. Angiogenesis and metastasis inhibitors for the treatment of malignant melanoma. *Mini Rev Med Chem.* 2007; 7: 649-61.
- Benjamin Chun Yu Wong, Wei Ping Wang, Chi Hin Cho, Xiao Ming Fan, Marie Chia Mi Lin, Hsiang Fu Kung and Shiu Kum Lam. 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis.* 2001; 9: 1349-1354
- Chou DS, Hsiao G, Shen MY, Tsai YJ, Chen TF, Sheu JR. ESR spin trapping of a carbon-centered free radical from agonist-stimulated human platelets. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39: 237-48.
- Chou DS, Lee JJ, Hsiao G, Hsieh CY, Tsai YJ, Chen TF, Sheu JR. Baicalein induction of hydroxyl radical formation via 12-lipoxygenase in human platelets: an ESR study. *Agricultural and Food Chemistry.* 2007 ;55(3):649-55
- Chou DS, Hsiao G, Tsai YJ, Sheu JR. Baicalein induces proliferation inhibition in B16F10 melanoma cells by generating reactive oxygen species via 12-lipoxygenase. *Free Radic Biol Med.* 2009 ; 46(8):1197-203
- Fadok VA, Henson PM. Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist--with a twist. *Curr Biol.* 2003 ;13(16):R655-7.

- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2005; 37(11):719-27
- Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life*. 2001; 52: 3-6.
- Fruehauf JP, Meyskens FL, Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 789-94.
- Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T, et al. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol*. 2005; 49: 391-6.
- Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res*. 2007; 20: 161-72.
- Gao X, Grignon DJ, Chbihi T, Zacharek A, Chen YQ, Sakr W, et al. Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology*. 1995; 46: 227-37.
- Henry W.C. Leung , W.H. Yang , M.Y. Lai , C.J. Lin , H.Z. Lee. Inhibition of 12-lipoxygenase during baicalein-induced human lung nonsmall carcinoma H460 cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2007 ; 45: 403-411
- Hill MM, Adrain C, Martin SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv*. 2003

Feb;3(1):19-26.

- Hiroya Taniguchi, Tatsushi Yoshida, Mano Horinaka, Takashi Yasuda, Ahmed E. Goda, Masako Konishi, et al. Baicalein Overcomes Tumor Necrosis Factor - Related Apoptosis-Inducing Ligand Resistance via Two Different Cell-Specific Pathways in Cancer Cells but not in Normal Cells. *Cancer Res.* 2008 ; 68 ; 21
- Hsu SL, Hsieh YC, Hsieh WC, Chou CJ. Baicalein induces a dual growth arrest by modulating multiple cell cycle regulatory molecules. *Eur J Pharmacol.* 2001; 425: 165-71.
- Jezeq P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 2478-503.
- Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 69: 275-81.
- Kanayasu-Toyoda T, Morita I, Murota S. Arachidonic acid pretreatment enhances smooth muscle cell migration via increased Ca²⁺ influx. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998; 58: 25-31.
- Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS.* 2007; 115: 81-103.
- Lee JK, Sayers TJ, Back TC, Wigginton JM, Wiltrout RH. Lack of FasL-mediated killing leads to in vivo tumor promotion in mouse

- Lewis lung cancer. *Apoptosis*. 2003 ;8(2):151-60
- Leung HW, Yang WH, Lai MY, Lin CJ, Lee HZ. Inhibition of 12-lipoxygenase during baicalein-induced human lung nonsmall carcinoma H460 cell apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45: 403-11.
- Liu H, Colavitti R, Rovira, II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res*. 2005; 97: 967-74.
- Liu JJ, Huang TS, Cheng WF, Lu FJ. Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *Int J Cancer*.2003; 106: 559-65.
- Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32: 157-70.
- Natarajan R, Stern N, Hsueh W, Do Y, Nadler J. Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-mediated aldosterone biosynthesis in human adrenal glomerulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 67: 584-91.
- Nie D, Honn KV. Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59: 799-807.
- Nie D, Tang K, Diglio C, Honn KV. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood*. 2000; 95: 2304-11.

- Nishio E, Watanabe Y. Role of the lipoxygenase pathway in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Eur J Pharmacol.* 1997; 336: 267-73.
- Ohd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Lofberg H, Sjolander A. Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 2003; 124: 57-70.
- Okuda S, Saito H, Katsuki H. Arachidonic acid: toxic and trophic effects on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* 1994; 63: 691-9.
- Perl M, Chung CS, Ayala A. Apoptosis. *Crit Care Med.* 2005 ;S 526-9.
- Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, Honn KV. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 2721-7.
- Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, et al. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 503-24.
- Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: from bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 17 Suppl 3: S300-5.
- Sekiya K, Okuda H. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 105: 1090-5.
- Shureiqi I, Lippman SM. Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 6307-12.

- Suzuki H, Ueda T, Juránek I, Yamamoto S, Katoh T, Node M, Suzuki T. Hinokitiol, a selective inhibitor of the platelet-type isozyme of arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 ;275(3):885-9.
- Szekeres CK, Tang K, Trikha M, Honn KV. Eicosanoid activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human epidermoid carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2000a; 275: 38831-41.
- Szekeres CK, Trikha M, Nie D, Honn KV. Eicosanoid 12(S)-HETE activates phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000b; 275: 690-5.
- Tang DG, Renaud C, Stojakovic S, Diglio CA, Porter A, Honn KV. 12(S)-HETE is a mitogenic factor for microvascular endothelial cells: its potential role in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 211: 462-8.
- Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 296: 942-8.
- van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M. A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature.* 1998; 395: 392-5.
- Wang J, Yu Y, Hashimoto F, Sakata Y, Fujii M, Hou DX. Baicalein induces apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in HL-60 cells. *Int J Mol Med*

2004;14:627–32.

Winer I, Normolle DP, Shureiqi I, Sondak VK, Johnson T, Su L, et al.

Expression of 12-lipoxygenase as a biomarker for melanoma carcinogenesis. *Melanoma Res.* 2002; 12: 429-34

Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 695-705.

Yamamoto S, Katsukawa M, Nakano A, Hiraki E, Nishimura K, Jisaka M, Yokota K, Ueda N. Arachidonate 12-lipoxygenases with reference to their selective inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 ;338(1):122-7.

Yokoyama K, Hashiba K, Wakabayashi H, Hashimoto K, Satoh K, Kurihara T. et al. Inhibition of LPS-stimulated NO production in mouse macrophage-like cells by tropolones. *Anticancer Res* 2004; 24: 3917-22