

貳、研究方法及材料

一、細胞培養

不同細胞株選擇不同培養基培養，人類肝癌細胞

(Hepatocellular carcinoma, HCC) HepG2 (p53野生型) Huh 7 (p53突變型, Y220C) (Lin *et al.*, 1995) 分別培養於Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (Biosera, L0103/500) 培養液中，在HepG2細胞株中添加10%去活化的胎牛血清(fetal bovine serum, Nalgene)、1%非必須胺基酸(nonessential amino acid, Hyclone, SH30238.01)、100 units/ml青黴素(Penicillin)及100 µg/ml 鏈黴素 (Streptomycin, Invitrogen, 15140-122)、在Huh 7細胞株中較上述培養液多添加1%麩胺酸 (L-glutamine 100, Invitrogen, 25030) 後，以37°C恆溫培養箱含95%空氣/5%二氧化碳及飽和濕度培養之。

二、Total RNA 萃取

將100-mm培養盤上的細胞，以PBS (phosphate buffered saline; 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄) 漂洗2次，加入1ml Trypsin-EDTA (T4174, Sigma) 於室溫下靜置5分鐘。收取細胞後，加入0.5 ml TRIzol (Invitrogen,

15596018) 裝於1.5ml微量離心管混合均勻使之均質化後，加入0.5 ml氯仿，混合均勻，並靜置冰上10分鐘，在4°C下，以10,000 rpm離心15分鐘後，取上層水液層至新的離心管，加入0.5 ml異丙醇混合均勻後，於-20°C靜置4小時後。再於4°C，以10,000 rpm離心15分鐘，將RNA離心至管底，此時為白色膠狀物，移除上層液後加入300µl diethylpyrocarbonate-treated water(DEPC-H₂O) (AMRESCO ; Solon , OH)、30 µl 3M醋酸鈉(pH 4.6)及750µl 95%酒精，混合後置於-80°C冰箱中沉澱至少30分鐘。取出後，在4°C，以10,000 rpm離心15分鐘，後用100µl 70 %酒精(溶於DEPC-H₂O)洗去鹽類，在4°C下，以10,000 rpm離心15分鐘後，吸淨上層液，置於抽風櫥中乾燥20分鐘後，溶於100 µl DEPC- H₂O中。以10 µl 10 × DNase buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂)、5 U DNase (Promega Madison,WI) 及1 µl 10U RNase inhibitor (Invitrogen; Gaithersburg, MD)，於37°C水浴作用約2小時，加入等體積phenol/chloroform(1:1)混合，冰上靜置10分鐘，在4°C下，離心15分鐘後，取上清液加入0.1倍體積之3 M醋酸鈉 (pH 5.2) 及2.5倍體積之95%酒精，在4°C下，以10,000 rpm離心15分鐘後，吸淨上層液，加入100µl 70%酒精(溶於DEPC- H₂O)，混合後置於-80°C中沉澱至少30分鐘，取出，在4°C

下，以10,000 rpm離心15分鐘後，吸淨上層液，置於抽風櫥中乾燥20分鐘，溶於適量(約30 μ l)的DEPC- H₂O中並讀取波長260 nm吸光值定量，最後取1 μ g RNA於0.6 %瓊脂電泳檢視RNA完整性後，儲存於-20°C。

三、反轉錄聚合酵素鏈反應

將1 μ g total RNA用DEPC-H₂O將體積稀釋至12.5 μ l，加入200 ng random hexamer primer (Promega; Madison, WI)，加熱至70°C，5分鐘後立即放在冰上，並加入4 μ l 5 \times reverse transcriptase buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM DTT)、250 nM dNTP、1 μ l 18 U recombinant RNase inhibitor及1 μ l 100 U MMLV reverse transcriptase (Invitrogen; Gaithersburg, MD)，混合均勻，靜置於37°C作用1小時，以進行cDNA的合成再加熱至95°C，5分鐘以停止cDNA的合成反應，放在冰上冷卻，保存至-20°C。

利用PCR方式放大GAPDH以及MMP-9片段，取2 μ l cDNA加入2.5 μ l 10 \times buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8; 500 mM KCl; 1.2 mM MgCl₂; 1% Triton-100)，14.5 μ l去離子水、2 μ l 5 mM dNTP、2 μ l GAPDH引子 (5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3'；

5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3')，MMP-9引子

(5'-CGGAGCACGGAGACGGGTAT-3'；

5'-TGAAGGGGAAGACGCACAGC-3') (Chung *et al.*, 2004)

利用Taq DNA polymerase進行PCR，大量複製GAPDH與片段。其反應過程簡述如下：反應混合液先至95°C熱浴5分鐘，再於95°C進行第一階段裂解反應（denature）1分鐘，之後進行59°C作用40秒黏合反應（annealing）；第三階段則於72°C進行50秒之延伸反應（extension），如此重覆此3階段反應共35個週期，最後追加72°C延伸反應5分鐘後，於8°C終止反應。GAPDH放大的片段為256 bp，MMP-9放大的片段為537bp，以6% polyacrylamide電泳分析PCR產物。

四、蛋白質之萃取及定量

將 1×10^6 細胞培養於60mm培養皿中。把培養皿中的培養液吸除，以PBS清洗兩次，加入 50 μ l RIPA裂解緩衝液（50 mM，Tris pH 8.0，150 mM NaCl，10 mM EDTA，1 % NP-40，0.1 % SDS，1 mM PMSF，10 μ g/ml aprotinin，0.5% sodium deoxycholate，1% triton X-100，10 μ g/ml leupeptin，20mM sodiumphosphate，pH 7.0），混合均勻後，用刮勺將培養皿內的細胞刮下，在4°C下，離

心12,000轉，1小時後，收取上清液即得細胞蛋白質。

根據Bradford法，以微量讀數儀測定萃取所得細胞蛋白質濃度。先將固定體積不同濃度（62.5，125，175，250及500 $\mu\text{g/ml}$ ）之胎牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）標準樣品置於內含295 μL 蛋白質染劑（PIERCE protein assay dye reagent）的96-well plate中，欲測濃度之細胞蛋白質樣品亦加入同體積於96-well plate中，以微量讀數儀（microplate reader）測量波長590 nm之吸收值，比較其595 nm之蛋白質最大吸光波峰吸光度，由固定體積不同濃度（62.5，125，250，500，1,000及2,000 $\mu\text{g/ml}$ ）之BSA標準樣品，作成一條標準迴歸曲線，求得線性方程式（ $r^2 > 0.95$ 方可採用）。將欲測濃度之細胞蛋白質樣品所測得之吸光值代入公式以內插法換算其實際濃度。

五、西方轉漬法（Western blot）偵測血管新生調節因子

以西方轉漬法鑑定細胞週期調控蛋白表現變化，實驗包括分析MMP-9、 β -catenin及VEGF等相關因子的調控情形。細胞經中藥複方或單方1/100及1/50倍稀釋處理後，分別於24、48及72小時處理後，吸除培養液，再用PBS清洗細胞兩次，以洗除殘餘的培養液。將細胞加入適量 RIPA裂解緩衝液溶解後，使用細胞刮取

器取下所有的溶解液，在4°C下，以12,000 rpm離心30分鐘，上清液即為蛋白質萃取液，先以4 µl進行定量，其餘蛋白質分裝後保存於-20°C。

(1) 膠體製備

10% Separating gel (30% acrylamide (Sigma, A3574-100ML), ddH₂O, 1.5M Tris-HCl, pH8.8 (AMRESCO, J831), 10% SDS, 10% APS (Research Organics, 9530A-1), TEMED (AMRESCO, 0761) 及
5% Stacking gel (30% acrylamide, ddH₂O, 0.5M Tris-HCl, pH6.8 (AMRESCO, J832), 10% SDS, 10% APS (Research Organics, 9530A-1), TEMED)。

(2) 電泳轉漬

取20 µg蛋白質加入樣品緩衝液 (3×sample buffer, 350mM Tris-HCl, pH 8.8; 12% SDS; 0.02% bromophenol blue; 35% glycerol; 30% β-mercaptoethanol) 後以95°C煮沸5分鐘，置入Stacking gel，先以電壓50伏特進行30分鐘後，再將電壓調至120伏特再進行電泳90分鐘。

(3) 免疫呈色

以transfer unit裝置 (HOEFER; Amersham Pharmacia) 於固定電

壓45伏特45分鐘後，將蛋白質由膠體轉移到硝化纖維膜（nitrocellulose blotting membrane，BioScience）後，將膜取出並浸泡於blocking solution（5% skim milk in PBS-T），於室溫下作用1小時後，以PBS-T（PBS -0.5% Tween-20）清洗2次，加入1：3,000稀釋的一級抗體，4°C下作用18小時後，以PBS-T清洗3次，並加入1：2,000稀釋的二級抗體，於室溫下作用1小時後，以PBS-T清洗3次，最後加入Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate（Millipore）試劑組（Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate：Luminol reagent 500 μL + Peroxide solution 500μL）避光作用5分鐘後，以冷光儀（Fuji，LAS-3000）顯影。

六、中草藥複方或單方樣品的來源

由順天堂科學中藥提供，複方內容及單方萃取液詳見附錄一。

七、細胞存活率分析（MTT assay）

將 1×10^6 細胞培養於96-well的孔盤內，隔夜培養待細胞貼附後，加入不同濃度之中草藥萃取液，以完全培養基為溶劑稀釋中草藥為1/1000、1/500、1/100、1/50和1/20倍（濃度經換算後分別為1、2、10、20、50、μg/mL，唯黃連解毒湯分別為：0.5、1.1、

5.4、10.1、25.2；黃連分別為: 0.1、0.3、1.4、2.7、6.8；紫蘇葉分別為:0.3、0.6、2.9、5.7、14.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，培養24、48及72小時後，加入5 μl 3- (4,5-dimethyl thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT : 5mg/mL in PBS , Sigma , M2128) ，在37 $^{\circ}\text{C}$ 反應3小時，將孔盤內培養液吸出，再加入100 μl dimethyl sulfoxide (DMSO , Sigma , D5879) 溶解，利用OD 570測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值。

八、半數抑制濃度 (IC₅₀) 計算

由細胞存活率分析中得到的生長曲線圖，作成條標準迴歸曲線，求得線性方程式 ($r^2 > 0.95$ 方可採用)，同一藥物，不同時間有不同的迴歸曲線分析。將半數細胞存活率數值 (50%) 代入公式，再以內插法換算其藥物半數抑制濃度。算出相同時間內，不同藥物之IC₅₀差異。

九、細胞侵犯能力試驗 (Invasion assay)

取100 μl Matrigel (Becton-Dickinson ; Mountain View , CA , 354234) 置於24-well inserts (BD , 353097) 上，於37 $^{\circ}\text{C}$ 培養30分鐘，使其膠體活化並凝結，次將 5×10^4 細胞接種於Matrigel上，並在insert內外各加入500 μl 完全培養基，置入培養箱，待細胞

穩定後，加入測試藥物，經24小時後收取下層細胞，以trypan blue 計數。並與未加藥的控制組比較。

十、明膠酶譜法 (Gelatinase Zymography)

由於 matrix metalloproteinase (MMP) 具有明膠酶活性的特點，於 SDS-PAGE 中加入明膠作為其基質，利用電泳依分子量大小分離後，並去除 SDS 後，加入酵素反應緩衝液隔夜培養，後經 Coomassie Brilliant Blue R250 染色，最後以退染劑退染，在可見光下顯影。藉以偵測 MMP-9、MMP-2 的活性。

(1) 蛋白質收取與定量

將 1×10^6 細胞培養於60mm培養皿中，隔夜培養後，加入適當濃度之待測藥物，藥物處理一天後，收取培養液，在4°C下以1000轉離心，收取上清液即得所需之蛋白質。

(2) 膠體製備

內含 0.1%明膠 (Sigma,G3144-100G) 的 10% Separating gel (配方如前述)

(3) 電泳

取5 μ l蛋白質加入樣品緩衝液 (4 \times sample buffer, 1 Tris-HCl, pH6.8, 40%SDS, 0.5%Bromophenol blue, 20%Glycerol), 混和

均勻並以55°C活化5分鐘後放在冰上靜置5分鐘，置入Separating gel，以電壓85特進行2小時30分鐘電泳。

(5) 呈色

電泳結束後取出膠片，以 2.5% Triton X-100 在室溫下搖晃清洗 30 分鐘，後加入 100 μ l 反應緩衝液 (0.05 M Tris-HCl, pH 8.8, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃) 在 37°C 恆溫箱作用 16 小時，取出膠片以 Coomassie Brilliant Blue R250 染色 3 小時，後以退染劑 (45% ethanol, 10% cetic acid) 退染，最後用二次水清洗並浸泡，以可見光顯影。

十一、資料分析 (Data analysis)

利用 SigmaPlot 統計軟體 (Ver 8.0) 利用 student *t*-test 分析，當 $p < 0.05$ 表具顯著差異。