

南 華 大 學
自然生物科技學系自然療癒碩士班
碩士論文

遠紅外線對子宮頸癌細胞生長抑制
之效果探討

**Evaluation of Far Infrared Radiation on Growth
Inhibition of Cervical Tumor Cells**

研 究 生：馮明華

指 導 教 授：林群智 博士

中華民國 104 年 6 月 29 日

南 華 大 學

自然生物科技學系自然療癒碩士班

碩 士 學 位 論 文

遠紅外線對子宮頸癌細胞生長抑制之效果探討

Evaluation of Far Infrared Radiation on Growth Inhibition of

Cervical Tumor Cell

研究生：馮明華

經考試合格特此證明

口試委員：林群智
李英瑞
羅俊智

指導教授：林群智

系主任(所長)：李月文

口試日期：中華民國 104 年 6 月 29 日

摘要

背景：波長 4~14 μm 之遠紅外線，已被證實能被生物體有效地吸收，其對人體生理機能有正面影響，被稱之為「生育光線」或「生育之光」(growth ray)，並廣泛應用於自然療法中。然而，目前關於遠紅外線對癌症細胞影響之研究仍非常少見，為一相當有趣且值得加以探討之主題。

目的：本研究旨在藉由體外細胞實驗，探討遠紅外線 (4~14 μm) 照射對人類子宮頸癌細胞 (human cervical carcinoma) 之生長抑制影響。

研究方法：本實驗以遠紅外線設備釋放 4~14 μm 之遠紅外光線，對人類子宮頸癌細胞株 (CC7) 進行體外培養照射，分別以不同照射時間 (30、60、90 min) 及不同照射溫度 (室溫 (RT)、37°C、45°C 與 55°C)，每天照射 2 次，連續處理 3 天。細胞株在接受光照處理後，繼續培養 3 天，而後進行觀察及細胞存活度計數，以評估細胞生長之情形、分析細胞週期之變化以及檢測細胞凋亡現象。

結果：本研究結果顯示，遠紅外線照射對人類子宮頸癌細胞株具顯著的生長抑制效果，且其抑制效果會隨著照射的時間及照射溫度的增加而呈現正相關性，顯示遠紅外線照射確實具有抑制人類子宮頸癌細胞之生長效果。更進一步的研究顯示，遠紅外線照射對人類子宮頸癌細胞株具有停滯細胞週期及細胞死亡的現象，主要是造成 G0/G1 期之

細胞週期的停滯。

結論：本實驗之結果顯示：遠紅外線照射可經由適當的溫度與時間上的調配，對人類子宮頸癌細胞株之生長情形及細胞週期抑制產生不同程度之影響。此現象可推論遠紅外線照射有應用於癌症輔助醫療之潛力。

關鍵字：遠紅外線、子宮頸癌、細胞生長、細胞週期



Abstract

Far-infrared ray (FIR) at 4–14 μm , also called “growth ray”, is widely applied in natural therapies, which has been verified to be effectively absorbed by organisms and exerting positive effects on physical functions in human. However, relative research regarding the effects of FIR on cancer cells is unclear. Accordingly, it is an interesting issue worthy to be investigated.

Purpose: This study aimed to investigate the effects of irradiation by FIR (4–14 μm) on cell growth of human cervical carcinoma in vitro.

Methods: Human cervical carcinoma (CC7) was irradiated by far-infrared rays emitted from an FIR emission facility set at various temperatures (room temperature (RT), 37°C, 45°C and 55°C) for various time periods (30, 60, 90 min). The cancer cells were treated twice a day for 3 days consecutively. Photo images and cell counting were taken to evaluate the variation of growth and the cell cycles of the cancer cells was also determined.

Results : The results indicate that FIR irradiation is significantly effective in growth inhibition of human cervical carcinoma. Additionally, the inhibitive effect is positively correlated to the increase of irradiation time and temperatures, indicating that FIR irradiation is able to suppress the growth of human cervical carcinoma. Further, the phenomena of cell cycle progression arrest and cell death of human cervical carcinoma was

discovered after FIR irradiation.

Conclusion: The results indicate that FIR irradiation is able to inhibit the growth and the cell cycle of human cervical carcinoma to different extent.

According to the results, FIR irradiation has potential to be a complimentary method in cancer therapy.

Keywords: far-infrared ray, cervical cancer, cell growth, cell cycle



目錄

摘要.....	I
Abstract	III
目錄.....	V
第一章、 前言	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究動機與目的	2
第二章、 文獻回顧	4
2.1 子宮頸癌流行病學	4
2.1.1 簡介.....	4
2.1.2 子宮頸癌可能的危險因子.....	4
2.1.3 目前治療方法與困境.....	5
2.2 遠紅外線	6
2.2.1 簡介.....	6
2.2.2 遠紅外線對生物之影響.....	6
2.2.3 遠紅外線相關研究	7

第三章、	材料與方法	12
3.1	研究材料	12
3.1.1	實驗細胞株	12
3.1.2	遠紅外線照射設備	13
3.2	藥品與試劑	16
3.2.1	細胞培養	16
3.2.2	細胞存活率分析	17
3.2.3	細胞週期分析 (Flow cytometry)	17
3.2.4	細胞凋亡檢測	18
3.2.5	萃取蛋白質	18
3.2.6	蛋白質濃度測定 (BCA protein assay kit)	18
3.2.7	西方墨點法檢測 (Western Blotting Analysis)	18
3.3	常用儀器及器材	21
3.4	研究方法與步驟	23
3.4.1	細胞培養	23
3.4.2	細胞存活率分析 (Cell Viability Assay)	23
3.4.3	細胞週期之分析 (Flow cytometry)	23

3.4.4	細胞凋亡檢測	24
3.4.5	萃取蛋白質	25
3.4.6	蛋白質濃度測定 (BCA protein assay kit)	26
3.4.7	西方墨點法檢測 (Western Blotting Analysis)	27
3.5	統計分析	28
第四章、	結果.....	29
4.1	遠紅外線對人類子宮頸癌細胞株(CC7)生長抑制作用之影響 響	30
4.2	遠紅外線對人類子宮頸癌細胞株(CC7)細胞週期之影響	35
4.3	利用西方墨點法探討遠紅外線(IR-C)對人類子宮頸癌細胞株(CC7)細胞週期停滯之相關蛋白質表現.....	39
4.4	遠紅外線對人類子宮頸癌細胞株(CC7)細胞凋亡之影響	41
第五章、	討論.....	45
第六章、	結論.....	50
參考文獻	52

圖目錄

圖 4.1 不同照射時間之遠紅外線照射 (n = 3) 對 CC7 細胞株生長抑制之影響.....	33
圖 4.2 不同照射溫度之遠紅外線照射 (n = 3) 對 CC7 細胞株生長抑制之影響.....	34
圖 4.3 遠紅外線 90 分鐘照射對 CC7 細胞株細胞週期分佈之影響...37	
圖 4.4 遠紅外線 90 分鐘照射 (n = 3) 對 CC7 細胞株細胞週期分佈之影響.....	38
圖 4.5 遠紅外線對 CC7 細胞株細胞週期調控相關因子 p21、p27、CDK 與 Cyclin E 之影響.....	40
圖 4.6 遠紅外線 90 分鐘照射對 CC7 細胞株細胞凋亡之影響.....	43
圖 4.7 遠紅外線 90 分鐘照射 (n = 3) 隨溫度變化對 CC7 細胞株細胞凋亡之影響趨勢.....	44

第一章、前言

1.1 研究背景

社會的快速變遷與科技進步，給人們帶來了生活上諸多便利性與精緻化的轉變，但也導致生活型態的改變，眾多因素所引起的心理壓力、負面情緒、飲食的偏差、不正常的生活作息以及缺乏運動等，讓個人身心健康亮起了紅燈，導致罹病率大增，其中尤以癌症為最。癌症一直是備受關注的全球議題之一，依據衛生福利部（2013 年）公布國人十大死因，惡性腫瘤死因自民國 71 年起已連續 32 年高居國人死因之首位，平均每日有 123 人死於惡性腫瘤。以壯年人（25-44 歲）及中年人（45-64 歲）之年齡層為最多，其致死率（29%）遠高於排名第 2 之心臟疾病（高血壓性疾病除外），平均每 11 分 44 秒就有一人死於癌症，103 年比起上年度的死亡時鐘更快走 18 秒鐘。在 102 年女性十大主要死因中，惡性腫瘤即占 27.7%，較 101 年度增幅 0.7%，其中子宮頸癌為排列於前的主要女性癌症死因之一，近年來發病年齡更呈現低齡化趨勢；《世界癌症報告》亦顯示，子宮頸癌和乳腺癌是發病率高、對婦女危害最大的兩種癌症。癌症的預防與治療儼然已成為一個全球性公共健康問題。

1.2 研究動機與目的

癌症預防是醫學中重要領域。儘管子宮頸癌先進的手術的做法和篩選程序顯著的發展，沒有有效的篩查項目或預防策略在發展中國家，以降低其負擔。在欠發達國家中像是印度，細胞學基礎 cytology-based 的篩檢方案就不如發展中國家成功，因為沒有足夠的醫療基礎。雖然子宮頸癌早期至晚期的進展是生存的關鍵因素，分子知之甚少有助於子宮頸腫瘤的進展和轉移。(Garg et al., 2010)。

已有相關研究顯示出遠紅外線對生物體之效應，不僅可被生物有效吸收進而正面影響其機能，促進組織之生長與再生 (Udagawa, Ishigame, & Nagasawa, 2000) Shiurba et al., 1999; Udagawa, Ishigame, & Nagasawa, 2002，還能有效增加血液循環 (Yu et al., 2006)、使皮下組織增溫，並可調節血管功能、預防動脈硬化 (Toyokawa et al., 2003; Tei et al., 1994)，能促進肝臟對血糖的吸收且間接刺激胰島素分泌 (Moore & Cherrington, 1996) 對糖尿病血糖之控制 (黃柏銘、嚴正傑與李忠仁, 2007)，有效降低第二型糖尿病患者之醣化血色素、空腹血糖等生化生理參數 (李俊福, 2010)，亦可能減輕慢性疼痛 (Masuda et al., 2005) Masuda, Koga, Hattanmaru, Minagoe, & Tei,

2005、提升自律神經系統(謝鸚燁, 2008)、調節生物體免疫能力(黃雅令, 2009)及提升小鼠免疫力(吳本玠, 2001), 還能促進睡眠、調節睡眠品質等。更有研究指出遠紅外線有抑制腫瘤細胞生長之顯著效應, 但對正常細胞不具毒殺作用(Hamada et al., 2003; Peidaee, Shukla, & Pirogova, 2013), 這些現象說明了遠紅外線並不會對正常組織造成傷害, 卻能夠有效抑制癌細胞之存活生長, 如此研究發現著實令人雀躍, 未來若能將其廣泛應用於癌症輔助之治療上, 實為癌症患者一大福音。

以上研究皆指出了遠紅外線應用於生物體之正面效應, 且其可抑制腫瘤細胞生長之顯著效果已相繼被發表證實, 然而, 遠紅外線是否具有抑制人類子宮頸癌細胞之效果仍未有文獻探討, 基於癌細胞不同部位之特性, 本研究旨在探討遠紅外線於不同照射溫度與照射時間作用下, 對人類子宮頸癌細胞的影響。

第二章、 文獻回顧

2.1 子宮頸癌流行病學

2.1.1 簡介

子宮頸癌的發生率在民國 89 年以前一直高居台灣婦女癌症首位，近幾年來雖然位居乳癌之下，但根據衛生署國民健康局的統計說明，96 年仍約有 1,800 人罹患子宮頸癌，逾 700 人因子宮頸癌死亡（衛生福利部國民健康署，2014）；因此，子宮頸癌依舊是台灣婦女們不可輕忽的婦科疾病。子宮頸癌是全世界女性死亡的主要原因，並且大多數情況下，報告中的欠發達國家，因為認識有限以及缺乏醫療保障。（Garg et al., 2010；Waggoner, 2003）此外，已經有據可查的，如果它們的早期診斷，子宮頸癌患者有可用較好的治療方法和較高的存活率（Garg et al., 2010；Mandić, 2005），而被診斷患有晚期疾病的患者具有不良的存活率（Garg et al., 2010；Landoni, 1997）。

2.1.2 子宮頸癌可能的危險因子

癌症是人體內一些不正常的細胞，因為生長速度快，而影響及侵犯到正常的組織器官，造成壓迫、潰爛、感染或其他等原因，導致出血、疼痛或器官功能喪失等症狀。二十一世紀，防治癌症

已是全民最重要的任務！癌症的真正原因，目前還無法完全確定，大約 70%的癌病是跟與我們的飲食習慣與抽菸相關，環境和遺傳因素亦被證實與癌症的發生有關。

人類乳頭瘤病毒 (Human papillomavirus; 簡稱 HPV) 已被認為是子宮頸癌形成的最重要病因，研究顯示口服避孕藥會增加 HPV 陽性婦女子宮頸癌的風險 (Jennifer et al., 2003)，超過 100 種不同類型的 HPV 中，至少有 40 種通過性接觸來傳遞，其中至少 15 種類型的 HPV 被認為是子宮頸癌的高風險因子，包括 16 和 18 型約占子宮頸癌 70%。除了 HPV，相關危險因子如抽菸、免疫系統降低、暴露化學物質皆可增加罹患子宮頸癌之風險，在英國每 100 名婦女即有 1 名是因接觸化學物質四氯乙烯 (tetrachloroethylene) 而導致子宮頸癌的發生 (Cancer Research UK, n.d.)，另外性生活氾濫、低社會經濟地位亦顯示與子宮頸癌之發生有密切關聯 (Cora et al., 1998)。

2.1.3 目前治療方法與困境

目前應用於癌症的治療方式有外科手術、放射線療法、化學治療或是標靶治療。雖然，這些治療方法各有其優缺點，但卻蘊藏許多潛在風險，不僅僅是因侵入性方式所需承受的痛苦，亦可能有感染及併發症之危險，進而傷害周邊正常細胞組織運作。

2.2 遠紅外線

2.2.1 簡介

遠紅外線 (far infrared ray; 以下簡稱 FIR) 屬波長 5.6 到 1000 μm 的紅外線，其中可被生物有效吸收之波長介於 4~14 μm ；此波段又可稱為生長光線 (growth ray; Hamada et al., 2003)。

2.2.2 遠紅外線對生物之影響

人體在吸收生長光線波段之光波可產生熱效應與非熱效應 (Hamada et al., 2003)，能增加血液微循環、抑制疼痛、促進傷口癒合、調節血管功能、預防動脈硬化 (Toyokawa et al., 2003; Tei et al., 1994)、促使皮下組織溫度上升、微血管擴張及加速血液流量，幫助血液循環，並使附著於細胞表面的分子活性增強，加速鈣離子流動，促進新陳代謝及細胞活化 (Yu et al., 2006)。另外還可以刺激人體副交感神經系統之提升，且可直接刺激肝臟對血糖的吸收並間接刺激分泌胰島素 (Moore & Cherrington, 1996)。文獻指出遠紅外線可促使組織生長與再生 (Udagawa, Ishigame, & Nagasawa, 2002)、調節血管功能、預防動脈硬化、增加皮膚生長因子活性 (Toyokawa et al., 2003)、糖尿病症狀地控制、減緩運動傷害引起的疼痛感、抑制腫瘤細胞的生長 (Hamada

et al., 2003)、促進微循環 (Yu et al., 2006)等。

2.2.3 遠紅外線相關研究

於波長 4-14 μm 之遠紅外線輻射波段，有「生育之光」(growth ray) 之稱，已被顯示出對生物體有益的相關生理機能影響，在醫療上的效果也受到肯定，近年來逐漸應用於醫療輔助與復健上，亦廣泛運用於自然療法中。其遠紅外線相關研究包括：

促進血液循環、增進免疫機能

遠紅外線可促進血液循環、改善微血管循環不良(Ise et al., 1987; Inoue & Kabaya, 1989)，可促進小鼠皮膚之微循環(Yu et al., 2006)與新陳代謝。以遠紅外線治療儀之動物實驗研究發現通過大鼠血液流變學和小鼠免疫功能的研究，證明能改善血液流變特性，有利於微循環，並提升免疫功能(吳本玠，2001)。

放鬆血管、預防動脈硬化

經照射產生之溫熱效應，可使飽和脂肪酸不容易再被氧化成血脂(過氧化脂質)，能減少血管內脂質的沉積，降低動脈硬化現象之發生(Tei et al., 1994)。遠紅外線三溫暖治療可對抗氧化壓力，預防動脈硬化使心跳顯著升高、舒張壓顯著降低(Toyokawa et al. 2003; Tei, et

al., 1994)；遠紅外線之熱效應可刺激皮膚內熱感受器，使血管平滑肌鬆弛，促進血液循環，進而消炎退腫，並減緩肌肉的緊張和痙攣（荊蕊平等，2000），可提高血管內皮一氧化氮合成酵素(endothelial nitric oxide synthase；eNOS)濃度，故可放鬆血管、抑制血管平滑肌的增生、抑制血小板聚集和白血球黏附於血管內皮（Ikeda, et al., 2001； Masuda, Miyata, Kihara, Minagoe, & Tei, 2004）。

傷口止痛癒合、活血化癥

遠紅外線不僅可以促進生物體的生長發育，在醫療上亦可用為輔助治療之工具。遠紅外線可促進生物體組織的生長與再生(Shiurba et al., 1999； Udagawa, Ishigame, & Nagasawa, 2002)，對生物體有「正常化效應」(normalization effects)(Udagawa & Nagasawa, 2000)；增進皮膚生長因子活性及膠原纖維的形成，加速傷口癒合(Toyokawa et al., 2003)；臨床上也可用於治療兒童與成人的孢子絲菌病(sporotrichosis)，每日 15 分鐘的治療足以產生令人滿意的結果(Hiruma, Kawada, Noguchi, Ishibashi, & Conti Diaz, 1992)及壓瘡的治

療(Maria, Francisco, Gordillo & Francisco, 2003; Nagasawa et al., 1999); 照射受損脂血管內皮細胞有助於其恢復(Imamura et al., 2001)。

抑制疼痛

遠紅外線可抑制疼痛(何勇等, 2001), 日本研究發現可促進食慾並降低憂鬱情緒(Gutierrez, 2001; Masuda, 2005), 可減少神經傳導興奮, 提高人體對疼痛的忍受度, 減輕類風溼性關節炎、關節炎或運動傷害引起的疼痛(Masuda, Koga, Hattanmaru, Minagoe, & Tei, 2005), 降低神經傳導之興奮程度, 提高對於疼痛的忍受度, 此外, 對於疲勞之消除亦有其療效(Masuda, Kihara et al., 2005)。遠紅外(FIR)療法也可用於緩解疼痛患者的肌肉疾病(Lin et al., 2007、Masuda et al., 2005)。

提升睡眠品質

以老鼠實驗探究遠紅外線對於睡眠調節的影響之研究發現, 老鼠在光量環境下連續曝射遠紅外線後, 其慢波睡眠 slow wave sleep; SWS 顯著地增加, 可得知遠紅外線可調節睡眠進而提升睡眠品質(Honda & Inoue, 1988)。

改善血糖、緩解症狀

Moore 與 Cherrington (1996)研究發現遠紅外線可刺激人體之副交感神經系統，可直接刺激肝臟對血糖的吸收並間接刺激胰島素的分泌；程紹鈞、王蕩與張廣運(2000)研究糖尿病兔指出，遠紅外線對具有高血糖症狀之糖尿病兔具有明顯的緩解作用，可降低血糖而減輕症狀；Vinck 等(2003)的研究指出，波長 710 至 800 nm 之遠紅外線能使 cAMP 含量增加，此外光的量、質也與調控 cAMP 的含量相關；黃柏銘、嚴正傑與李忠仁(2007) 在人體研究指出遠紅外線可改善控制糖尿病患者之血糖。

抑制腫瘤增生

遠紅外線在常溫 25.5°C 情況下，可抑制小鼠體內腫瘤生長因子之製造(Nagasawa et al., 1999)；37°C 竹炭所釋出之遠紅外線被發現可有效抑制 Hela cells (表皮癌細胞) 的生長(Hamada et al., 2003)。由於腫瘤細胞對熱的耐受溫度比正常組織低(Song, 1984)，將溫度提高至 40-42°C 並控制在正常組織耐受範圍之內，可以導致腫瘤細胞凋亡，抑制腫瘤細胞增生，此外，動物實驗也證實，利用遠紅外線照射小鼠可以抑制其體內腫瘤的生長(Hamada et al., 2003; Nagasawa, Udagawa, & Kiyokawa,

1999; Udagawa et al., 2002), 以及抑制癌細胞生長之能力(Hamada et al., 2003; Ishibashi et al., 2008)。

據報導，當接近體溫(37°C)，從陶瓷遠紅外線輻射是有效的補救用於增強泌乳(哺乳期)(Ogita et al., 1990)和對人體皮膚的生物效應(Yoo et al., 2002)



第三章、 材料與方法

3.1 研究材料

3.1.1 實驗細胞株

使用人類子宮頸癌細胞株 (human cervical epithelial carcinoma) CC7 進行體外培養試驗。

Tissue: Cervix; carcinoma, stage IV

Description: The cells contain human papillomavirus (HPV) genome

培養基

以 90% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; GIBCO, Lot 1643781, USA) +10% Fetal Bovine Serum (FBS ; GIBCO, Lot 1566368, United States) 進行細胞繼代培養。

3.1.2 遠紅外線照射設備

本研究使用具溫度控制系統之遠紅外線發熱元件，係使用索拉諾半導體科技股份有限公司所製造之遠紅外線晶片器材（圖 3.1）。實驗操作照射時，遠紅外線晶片板置於欲施行照射孔盤上方，距盤面固定高度約為 3 公分之處，並經由溫度感應控制系統對遠紅外線晶片加熱控制之照射操作（圖 3.2）。



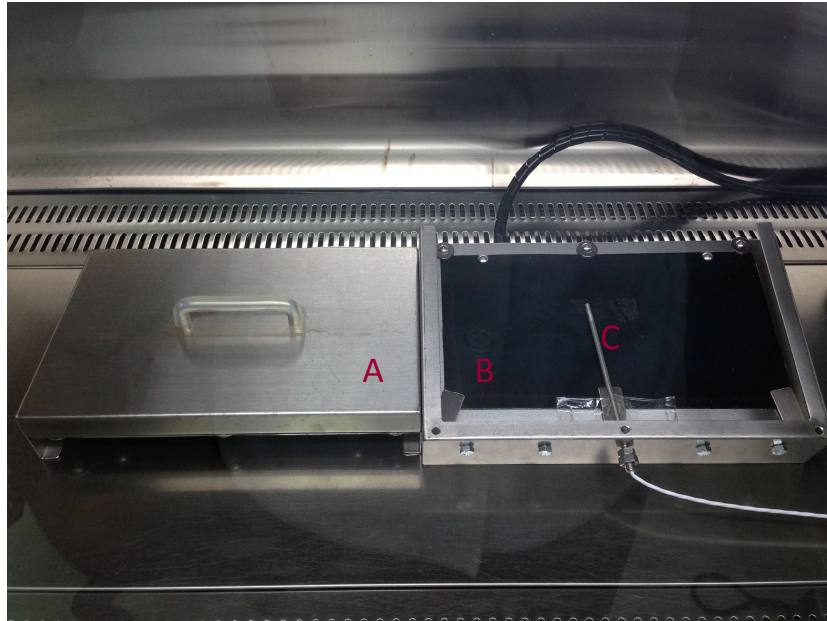


圖3.1 遠紅外線照射設備；A 為加熱元件，B 為遠紅外線材料晶片，C 為感溫元件

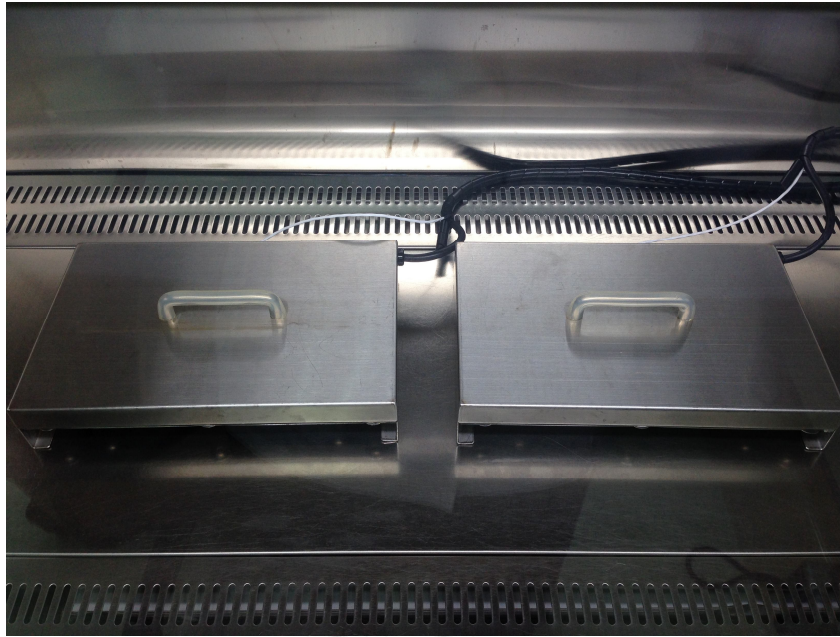


圖3.2 遠紅外線照射設備操作情形



3.2 藥品與試劑

本研究所需藥品與試劑（均為試藥等級）如下：

3.2.1 細胞培養

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Cat. No.

12800-017, GIBCO, Life technologies™, USA)

Sodium bicarbonate (NaHCO₃, 13433, Sigma, Sigma-Aldrich, Poland)

Fetal Bovine Serum, Qualified (FBS, REF 26140-079, GIBCO, Life technologies™, USA)

Penicillin Streptomycin Glutamine 100X (PSG, REF 10378-016, GIBCO, USA)

0.5% Trypsin-EDTA (10X) (REF 15400-054, GIBCO, USA)

Trypsin-EDTA (Concentrate x10) (REF 03-051-5B, Biological Industries, USA)

Sodium chloride (NaCl, 31434, Sigma, Sigma-Aldrich, Denmark)

Potassium Phosphate, Monobasic, Crystal (KH₂PO₄, 3246-01, J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, USA)

Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4 , 30427, Sigma,
Sigma-Aldrich, Germany)

PBS (Phosphate-Buffered Saline) , pH7.4

Trypan Blue Solution 0.5% (Cat. 03-102-1B, Biological
Industries, USA)

3. 2. 2 細胞存活率分析

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, Cat. No.
12800-017, USA)

PBS (Phosphate-Buffered Saline) , pH7.4

Cell Counting Kit - 8 (Cat. No. 96992-3000TEST-F, Sigma,
Sigma-Aldrich, USA)

3. 2. 3 細胞週期分析 (Flow cytometry)

PBS (Phosphate-Buffered Saline) , pH7.4

0.5% Trypsin-EDTA (10X) (REF 15400-054, GIBCO, USA)

Methyl Alcohol, Anhydrous (Cat. No. 3041-68, MACRON,

Avantor Performance Materials, USA)

RNase

Propidium iodine (PI)

3.2.4 細胞凋亡檢測

PBS (Phosphate-Buffered Saline) , pH7.4

0.5X Trypsin-EDTA (10X, GIBCO, REF 15400-054, USA)

3.7% Paraformadehydel

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC,

Propidium iodine and Annexin V Binding Buffer, Cat. No.

AVK250, Strong Biotech Corp.)

3.2.5 萃取蛋白質

PBS (Phosphate-Buffered Saline) , pH7.4

M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent(Prod # 78501,

Thermo, Pierce Biotechnology, Taiwan)

Protease Inhibitor Cocktail (Cat. No. P8340, Sigma,

Sigma-Aldrich, USA)

3.2.6 蛋白質濃度測定 (BCA protein assay kit)

Standard 2 mg/mL(2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0)

Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Prod # 23225, Thermo, Pierce

Biotechnology, USA)

3.2.7 西方墨點法檢測 (Western Blotting Analysis)

Tris ($C_4H_{11}NO_3$, Cat. No. 0826, amresco, Bio-Protech)

Tris(Base) ($NH_2C(CH_2OH)_3$, 4109-02, J.T.Baker, Avantor Performance Materials, USA)

Tris Hydrochloride ($NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$, 4103-01, J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, USA)

10% SDS Buffer (IB3701, Omics Bio)

30% Acrylamide/Bis Solution 29:1, 3.3% Crosslinker (Cat # 161-0156, BIO-RAD, Bio-Rad Laboratories, China)

Ammonium Peroxodisulfate Analytical (APS, 31117, Riedel-deHaën[®], Sigma-Aldrich)

TEMED (4098-01, J.T. Baker)

Bromophenol Blue (0449, amresco; B-0126, Sigma, Sigma-Aldrich, USA)

Polyoxyethylene 20 Sorbitan Monolaurate (Tween 20, X251-07, J.T.Baker, Avantor Performance Materials, USA)

Glycine (JT-4059-02, J.T.Baker, Avantor Performance Materials, USA)

Glycerol (G5516, Sigma, Sigma-Aldrich, Germany)

Marker: Protein Standards for Electrophoresis (BlueRAY, Cat.

No. PM006-0500, GeneDireX)

1.5M Tris, pH8.8

1.0M Tris, pH6.8

10% Ammonium Persulfate

5X loading dye

Lysis buffer

Transfer buffer

1X TBS

1X TBST

脫脂奶粉

Primary antibody (1° 抗體) :

Anti-p21 antibody [EPR362] (21kDa, Cat. No. ab109520,
Abcam)

P21 Kip1 antibody [N2C3] (21kDa, Cat. No. 3733-1,
Epitomics)

Anti-p27 (27kDa, Cat. No. GTX100446, GeneTex)

cyclin E1 antibody (47kDa, Cat. No. GTX103045, GeneTex)

Cdk2 Phospho (pT14) antibody (33kDa, Cat. No. 2351-1,
Epitomics)

Secondary antibody (2° 抗體) :

GAPDH antibody (Cat. No. GTX100118, GeneTex)

Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Cat.

No. WKBL50500, Millipore, Millipore Corporation, USA)

3.3 常用儀器及器材

本研究所使用之設備器材如下：

倒立式顯微鏡 inverted microscope

高壓滅菌鍋 (TM-328 快速高壓消毒器)

離心機 CENTRIFUGE (Model 5922, KUBOTA, Japan)

二氧化碳培養箱 CO₂ Incubator (MCO-20AIC, SANYO, SANYO Electric Biomedical, Japan)

電磁加熱攪拌器 Laboratory Stirrer/Hot Plates (PC-420, Corning, Corning Incorporated Life Sciences, U.S.A.)

可調速震盪器 Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc.)

溫度探測儀

Microcomputer pH/mV/TEMP Meter (No. 6171)

電子天秤 Scout II (ITEM No. SD2020, P/N 80'250'831, OHAUS, Ohaus Corporation, Pine Brook, N.I. USA)

微量電子天秤 (AG104, Mettler Toledo, Mettler-Toledo Poc Rim AG Taiwan Branch, Switzerland)

Microplate Reader (Model No. 680, BIO-RAD, Japan)

吸管輔助器 Pipet-Aid

2 L、20 L、100 L、200 L、1000 L micropipette

15 mL、50 mL 離心管

3.5 cm dish

6 well plate

96 well immunoplate

2 mL、5 mL、10mL、25mL 無菌吸管

Dry Bath Incubator (Model DB-130-2-110, FIRSTEK)

電泳槽 (Model No. Mini PROTEAN[®] 3 Cell, BIO-RAD, USA)

電源供應器 (Model No. PowerPac[™] HC, P/N 4206397 Rev D,
BIO-RAD, Singapore)

轉漬槽 (OWL HEP-1, Thermo)

迴轉式震盪器 ORBITAL SHAKER (Model S-101, FIRSTEK)

BioSpectrum[®] 800 Imaging System (P/N 97-0490-01, UVP, USA)

Synergy 超純水系統/ Synergy[®] UV (Cat. No. SYNSV0000, Millipore,
France)

Automatic Sanitization Module (Cat. No. TANKPE030, Millipore,
France)

3.4 研究方法與步驟

3.4.1 細胞培養

CC7 細胞株培養於 DMEM 中，內含 10% 胎牛血清、1X PSG 的培養液，其培養條件為 37°C、5% CO₂ 及含飽和水蒸氣之恆溫培養箱。

3.4.2 細胞存活率分析 (Cell Viability Assay)

Cell Counting Kit - 8

CC7 細胞株以細胞密度 (1×10^5 cells/well) 培養於 96 well plate 24 小時後，以遠紅外線晶片儀器給予控制組與實驗組之分組照射處理，溫度設定分別為 RT、37°C、45°C 與 55°C，各組溫度對應於時間之控制為 30 min、60 min 及 90 min，細胞給予早晚間隔 8 小時各進行照射一次，連續 3 天，於 18 小時後拍照觀察，並使用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 以 O.D. 450 nm 量測吸光值，進行細胞存活度計數，評估細胞生長之情形。

3.4.3 細胞週期之分析 (Flow cytometry)

完整的細胞週期包含了 G₀ 期、G₁ 期、S 期、G₂ 期及

M 期，利用螢光流速細胞儀加以分析可以瞭解不同處理對細胞週期的影響。PI (Propidium iodide) 是一種核酸染劑，藉由螢光染劑 PI 會嵌入雙股 DNA 的特性，以偵測 PI 螢光強度的改變來觀察評估細胞週期停滯的情形。接種細胞 (2×10^5 cells/well) 於 3.5 cm 培養盤，待細胞貼附後，以遠紅外線晶片儀器分別給予不同溫度 (RT、37°C、45°C 與 55°C)、時間 (30 min、60 min、90 min) 之分組照射處理。細胞給予早晚間隔 8 小時之照射連續 3 天，置放 37°C、5% CO₂ 及含飽和水蒸氣之培養箱中培養 24 小時後收取細胞。收取細胞懸浮液於微量離心管，以 2500 rpm 離心 5~10 min，隨後去除上清液，加入 200 μ L PBS 彈散細胞，以 99.8% 酒精進行固定，冰存 -20°C 備用。分析時以 50 μ L RNase (1 mg/mL) 及 50 μ L PI (400 μ g/ml) 混合均勻於 37°C 水浴槽中避光培養 30 min，使用流式細胞儀偵測細胞週期進行分析。

3.4.4 細胞凋亡檢測

細胞 (4×10^5 cells/well) 種植於 3.5 cm 培養盤中，待細胞貼附後，以遠紅外線晶片儀器分別給予不同溫度 (RT、37°C、45°C 與 55°C)、時間 (30 min、60 min、90

min) 之分組照射處理；細胞給予早晚間隔 8 小時各進行照射一次，連續 3 天，置放 37°C、5% CO₂ 及含飽和水蒸氣之培養箱中培養 24 小時後收取細胞。細胞以冰冷 1X PBS 沖洗後，加入 1X Trypsin 收集細胞懸浮液於 15 ml 離心管，以 2000 rpm 離心 5 min，隨後去除上清液，再以冰冷 1X PBS 沖洗並離心，加入預配置之 Propidium iodine (PI) 與 Annexin V-FITC 混合均勻後，置冰上避光 15 分鐘，以 400 μ L Binding buffer 於上樣管均勻混合，以流式細胞儀偵測細胞凋亡比例進行分析，須於 1 小時內上樣分析完畢。

3.4.5 萃取蛋白質

將細胞 (8×10^5 cells/well) 培養於 6 cm dish 待其貼附後，以遠紅外線晶片儀器給予溫度 RT 且時間 90 分鐘之分組照射處理。細胞給予早晚間隔 8 小時各進行照射一次，置放 37 °C、5 % CO₂ 及含飽和水蒸氣之恆溫培養箱中培養 24 小時後收取細胞。去除培養液，以冰冷磷酸緩衝溶液洗滌細胞一次，加入 modified RIPA 緩衝液 500 μ L 於冰上靜置作用 5 分鐘後，以刮刀將細胞刮下並吸取至 1.5 ml 微量離心管中，於 4 °C、15000 rpm 離心 10 min，

得到上清液即為細胞溶解液，測定蛋白質濃度後，將細胞溶解液保存於 -80°C 。

3.4.6 蛋白質濃度測定 (BCA protein assay kit)

以 Bradford 定量法檢測，使用胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin; BSA) 當作蛋白質標準品，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 0. D. 595 nm 來測量蛋白質標準品吸光值來做檢量線 (standard curve)，以蛋白質標準品吸光值畫出標準品檢量線，並求出趨勢線方程式及相關係數 (r^2)。

先取 Bradford 染劑 2 mL 加 8 mL 二次水 (5 \times 稀釋) 混合均勻備用，取 15 μL 配製好蛋白質標準品 (BSA) 加 735 μL Bradford 染劑混合均勻，置於 96 well plate 中，每 well 加入 200 μL (三重複)，靜置 5 min 後以 0. D. 595 nm 測量吸光值，測得標準品之吸光平均值，以 0. D. value (Y) 對蛋白濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (X)，求出趨勢線方程式 $y=ax+b$ ， r^2 值要趨近於 0.99。另取 15 μL sample protein 與 735 μL 的 Bradford 染劑 (5 倍稀釋) 混合，反應 5 分鐘後，同蛋白質標準品一起測定吸光值，所得之吸光值平均，帶入 y 值 ($y=ax+b$)，求出該 sample 的蛋白質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)。

3.4.7 西方墨點法檢測 (Western Blotting Analysis)

藉由抗體的專一性結合來辨認目標蛋白質；利用不同濃度之 SDS 電泳膠，將蛋白質分離轉漬至膜上，加入一級抗體與抗原專一性結合，再以酵素 HRP 二級抗體接合 ECL 試劑呈色反應，使用冷光螢光數位分析系統將膜曝光，觀察其蛋白質表現。

依照實驗所需要的濃度先行製備 SDS-PAGE 之下層膠 (Separating gel) 與上層膠 (Stacking gel) 膠體，將萃取的蛋白質溶液 25 μ L 注入 Stacking gel 的孔洞中，續進行蛋白質電泳轉漬，先以較低伏特讓 band 的形狀趨於完整 (50 V、30 min)，而後調轉至高伏特 (100 V、90 min)，電泳完成利用蛋白質轉漬槽將已完成的 SDS-PAGE 凝膠置於 PVDF membrane 上方進行轉漬，經由 Blocking 以阻斷非特異性結合，再分別加入一級抗體與二級抗體反應去除非特異性結合，利用 ECL Plus Western Blotting Detection Reagents 呈現螢光物質來進行訊號偵測。

3.5 統計分析

本研究的各項數據資料分析以 Microsoft Office Excel 2013 軟體進行統計分析，使用 Student's T-test 比較各組間之差異，實驗結果數值以平均值±標準差 (mean ± SD) 表示，*代表 P value < 0.05，**代表 P value < 0.01 以及***代表 P value < 0.001 被視為有統計上意義。



第四章、 結果

本研究欲探討遠紅外線對人類子宮頸癌細胞 CC7 生長抑制效果之影響，先以 CCK-8 評估遠紅外線對 CC7 細胞株生長抑制及細胞存活率之影響，藉由觀察細胞型態 (morphology) 之變化，進一步利用細胞週期分析觀察細胞分佈之情形，推測並探討細胞週期阻滯 (cell cycle arrest) 與細胞凋亡 (apoptosis) 現象，再經由西方墨點法檢測細胞週期阻滯之蛋白質表現，以驗證遠紅外線對 CC7 細胞週期阻滯之變化情勢。



4.1 遠紅外線對人類子宮頸癌細胞株(CC7)生長抑制作用之影響

細胞依照 1×10^5 cells/well 培養於 96 孔盤中，於 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 及含飽和水蒸氣之恆溫培養箱中經 24 小時靜置培養，待細胞貼附後，以遠紅外線設備給予控制組與實驗組之分組照射處理，溫度設定分別為 RT 、 37°C 、 45°C 與 55°C ，各組溫度對應於時間之控制為 30 min、60 min 及 90 min，細胞給予早晚間隔 8 小時各進行照射一次，連續 3 天，於處理後 18 小時觀察，並使用 Cell Counting Kit - 8 (CCK-8) 以 O.D. 540 量測吸光值，進行細胞存活度計數及評估遠紅外線對人類子宮頸癌細胞生長情形之影響。

經由 CCK-8 量測分析細胞後可得知細胞存活率之變化，CC7 細胞株經遠紅外線照射後，其生長抑制存活情形隨著照射溫度與時間具有顯著性差異 ($p < 0.05$; 圖 4.1)。CC7 細胞隨著照射溫度增加與照射時間加長之交互作用下，遠紅外線對人類子宮頸癌細胞株 (CC7) 抑制生長效果越明顯，並呈現劑量時間依賴效應 (dose- and time-dependent response)。在同一溫度、不同時間之變化下，於 Room Temperature (RT)、 37°C 、 45°C 、 55°C 遠紅外線照射各組別中，經照射 60 分鐘後，相較於照射

30 分鐘之各組別，RT 與 37°C 兩組別其細胞存活率並未達顯著性差異，僅 45°C 與 55°C 兩組別其細胞存活率具有顯著性差異，其中又以 55°C 組別之細胞受抑制情形 ($p < 0.001$) 較 45°C 組別顯著 ($p < 0.01$)，而經照射 90 分鐘後，相較於照射 30 分鐘之各組別，其細胞存活率皆呈現顯著性差異 ($p < 0.001$)，且細胞經照射 90 分鐘後的抑制情形亦比照射 60 分鐘後之抑制情形顯著；細胞經照射 90 分鐘後，相較於照射 60 分鐘之各組別，其細胞存活率亦呈現有顯著性差異 ($p < 0.05$)，且 45°C 與 55°C 兩組別之細胞受抑制情形 ($p < 0.01$) 又比 RT、37°C 組別顯著 ($p < 0.05$)。

相對於同一時間、不同溫度之變化下，細胞隨著照設溫度的增加，其細胞存活率均較控制組呈現顯著性差異 ($p < 0.05$ ；圖 4.2)，在 30 分鐘遠紅外線照射組別中，RT 與 55°C 兩組別之細胞受抑制情形 ($p < 0.001$) 比 37°C、45°C 組別顯著 ($p < 0.01$)，但隨著溫度變化不同之相互比較下，細胞受抑制情形彼此間則無顯著性差異；於 60 分鐘遠紅外線照射組別中，以 45°C 與 55°C 兩組別之細胞受抑制情形 ($p < 0.001$) 比 RT、37°C 組別顯著 ($p < 0.05$)，且 45°C 組別相較於 37°C 組別，其細胞存活率具有顯著性差異 ($p < 0.05$)，另外，55°C 組別相較於

RT 組別，其細胞存活率具有顯著性差異 ($p < 0.05$)，相較於 37°C 組別亦呈現有顯著性差異 ($p < 0.01$)；於 90 分鐘遠紅外線照射組別中，以 45°C 與 55°C 兩組別之細胞受抑制情形 ($p < 0.001$) 比 RT 組別 ($p < 0.01$) 及 37°C 組別 ($p < 0.05$) 顯著，且 45°C 組別相較於 37°C 組別，其細胞存活率具有顯著性差異 ($p < 0.05$)，另外，55°C 組別相較於 RT 組別，其細胞存活率具有顯著性差異 ($p < 0.05$)，相較於 37°C 組別亦呈現有顯著性差異 ($p < 0.01$)。



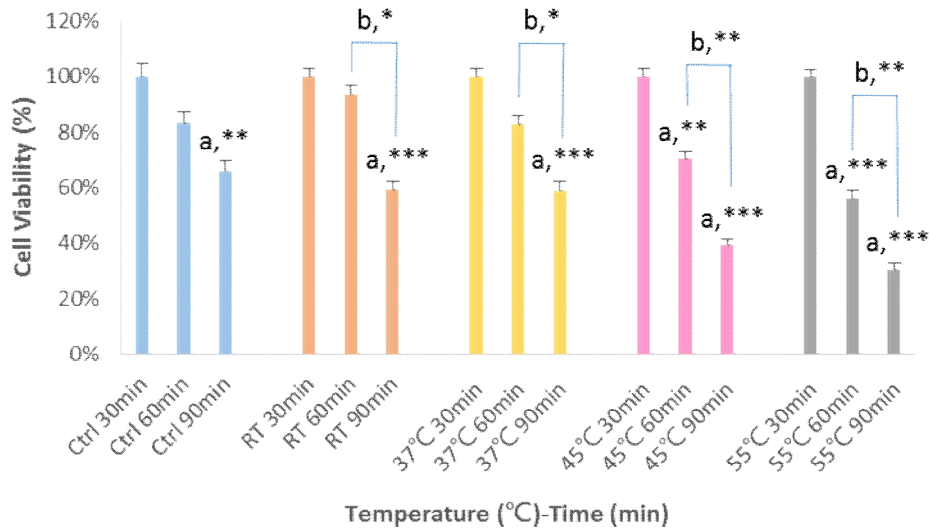


圖4.1 不同照射時間之遠紅外線照射 (n = 3) 對 CC7 細胞株生長抑制之影響。細胞以照射溫度為 RT、37、45 或 55°C 進行體外培養照射，其照射劑量為 30、60 或 90 分鐘，間隔 8 小時，每天照射 2 次，連續處理 3 天。於 18 小時後使用 CCK-8 處理，再以 ELISA 量測 540 nm 處之吸光值。結果數值以平均值±標準差 (mean ± SD) 表示。a、b 分別代表各照射溫度組別與 30 分鐘及 60 分鐘照射時間之組內比較。統計顯著性差異以*表示 P value < 0.05，**表示 P value < 0.01，而***表示 P value < 0.001。

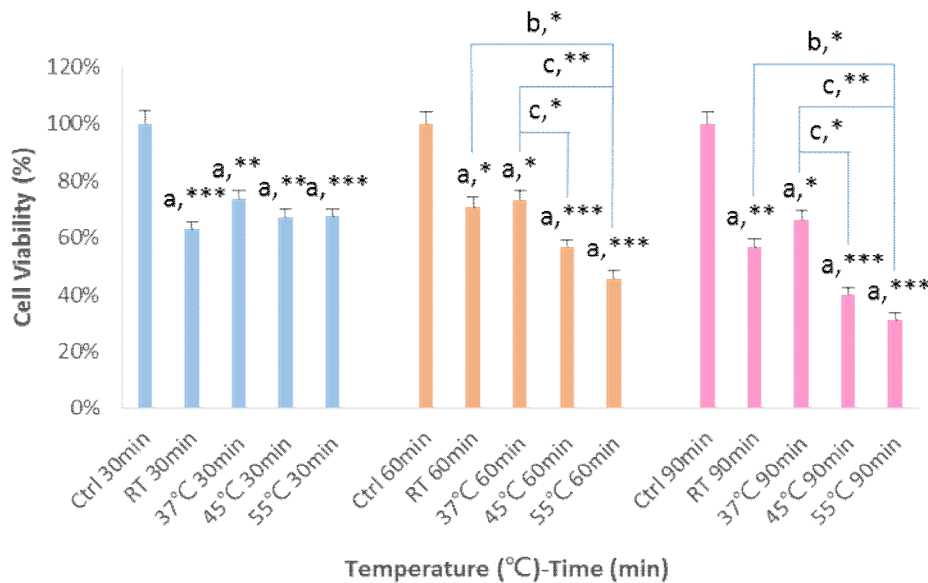


圖4.2 不同照射溫度之遠紅外線照射 (n = 3) 對 CC7 細胞株生長抑制之影響。細胞以照射溫度為 RT、37、45 或 55°C 進行體外培養照射，其照射劑量為 30、60 或 90 分鐘，間隔 8 小時，每天照射 2 次，連續處理 3 天。於 18 小時後使用 CCK-8 處理，再以 ELISA 量測 540 nm 處之吸光值。結果數值以平均值±標準差 (mean ± SD) 表示。a、b、c 分別代表各照射時間組別與不同照射溫度之組間比較；a 為與控制組之對照，b 為與 RT 組之對照，c 為與 37°C 組之對照。統計顯著性差異以 * 表示 P value < 0.05，** 表示 P value < 0.01，而 *** 表示 P value < 0.001。

4.2 遠紅外線對人類子宮頸癌細胞株(CC7)細胞週期之影響

由上述實驗得知遠紅外線具有抑制子宮頸癌細胞(CC7)生長之能力，且遠紅外線會影響細胞存活率的降低，可發現在照射溫度與時間之交互作用下，照射 90 分鐘之各溫度組別，均具有較佳之顯著性差異，觀察此現象有可能是透過細胞週期阻滯的運行而導致細胞存活率之顯著差異，因此將利用 PI 核酸染劑使細胞 DNA 染色，以流式細胞儀(flow cytometry)分析不同照射溫度(RT、37°C、45°C與 55°C)之遠紅外線對 CC7 細胞株細胞週期進行之影響。經由 DNA 含量分佈可得知細胞所在週期之分佈情形。G0/G1 期細胞之染色體數目為 2N，S 期為細胞 DNA 合成與複製時期，至 G2/M 期細胞已複製完成含有 4 套的染色體(4N)數目。此外，在 G0/G1 期前有不成套(Aneuploid)之染色體出現則為 sub-G1 peak，可觀察包含有細胞凋亡之細胞死亡分佈比例。

接種細胞(4×10^5 cells/well)於 3.5 cm 培養盤，待細胞貼附後，以遠紅外線設備給予不同溫度(RT、37°C、45°C、55°C)及時間 90 分鐘之控制組與實驗組分組照射處理。細胞給予早晚間隔 8 小時之照射連續 3 天，置放 37°C、5% CO₂ 及含飽

和水蒸氣之培養箱中培養 24 小時後收取細胞，並以 flow cytometry 分析觀察人類子宮頸癌細胞週期之分佈影響。

給予不同溫度之遠紅外線 (IR-C) 照射 90 分鐘於 24 小時後，經由流式細胞儀分析觀察人類子宮頸癌細胞週期之分佈情形，由圖 4.3 可觀察到細胞經照射 90 分鐘時，G0/G1 期細胞隨著照射的溫度增加 (RT→37°C→45°C→55°C) 其細胞分佈有不同結果。由圖 4.4 發現，其 G0/G1 期細胞於 RT (60.34±2.34%)、37°C (60.43±0.74%) 及 55°C (57.45±0.71%) 時均較控制組 (52.40±2.95%) 有顯著性增加 ($p < 0.05$)，以及於 S 期細胞分佈上亦較控制組有顯著下降 ($p < 0.05$)，其中以 RT 組別最為明顯，顯示出經由遠紅外線之照射，可以有效引發細胞週期停滯於 G0/G1 期。此外，遠紅外線照射之溫度增加，並無法增加細胞週期停滯於 G0/G1 期之效果。而在 G2/M 期細胞之分佈情形，遠紅外線並未對 CC7 細胞週期 G2/M 期細胞有明顯影響。

然而，隨著照射的溫度上升，Sub-G1 的細胞比率也有些幅度的增加，暗示著在這樣的照射條件中，會引發人類子宮頸癌細胞死亡的現象發生，非常值得更進一步的探討。

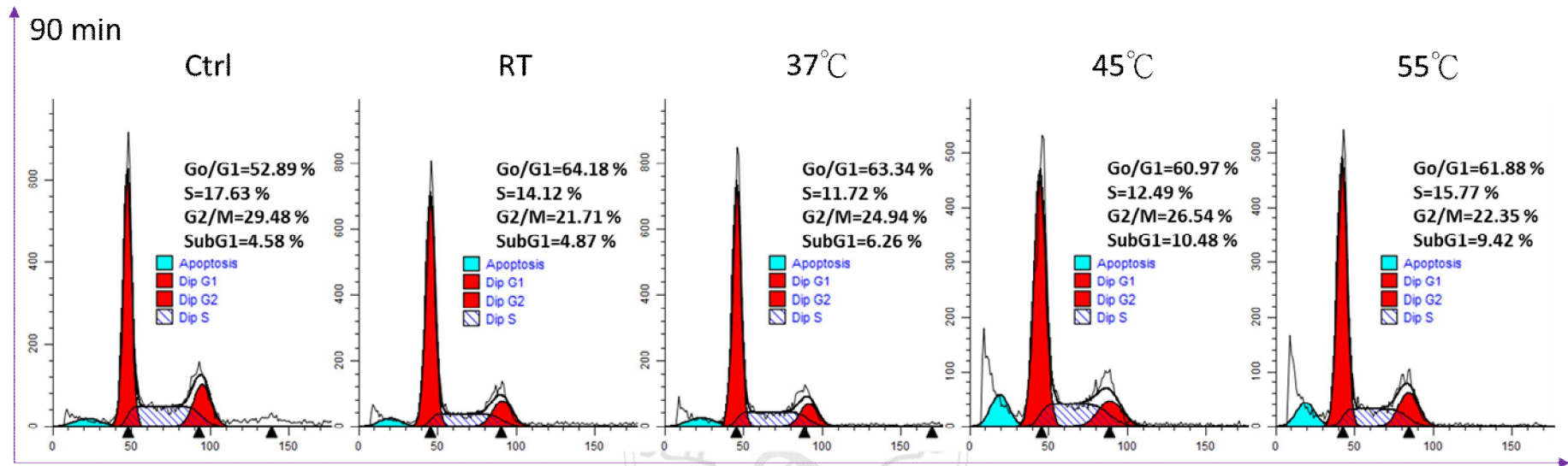


圖4.3 遠紅外線 90 分鐘照射對 CC7 細胞株細胞週期分佈之影響。給予細胞進行 90 分鐘遠紅外光線照射（照射溫度為 RT、37、45 或 55°C，間隔 8 小時，每天 2 次，連續 3 天），於培養 24 小時後收取細胞，利用螢光流速細胞儀進行分析測量細胞週期之變化。

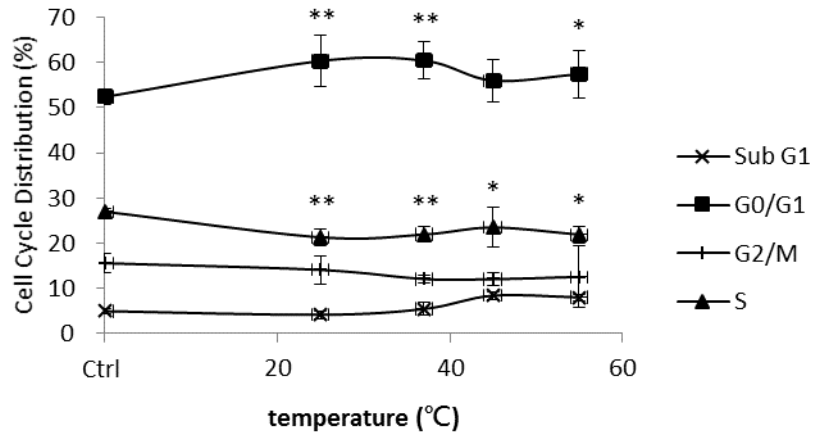


圖4.4 遠紅外線 90 分鐘照射 (n = 3) 對 CC7 細胞株細胞週期分佈

之影響。給予細胞進行 90 分鐘遠紅外光線照射(照射溫度為 RT、37、45 或 55°C，間隔 8 小時，每天 2 次，連續 3 天)，於培養 24 小時後收取細胞，利用流速細胞儀進行分析測量細胞週期之變化。結果數值以平均值±標準差 (mean ± SD) 表示。

4.3 利用西方墨點法探討遠紅外線(IR-C)對人類子宮頸癌細胞株(CC7)細胞週期停滯之相關蛋白質表現

經由細胞週期分佈比例之分析，可明顯觀察到遠紅外線照射 CC7 細胞後，使細胞週期停滯於 G0/G1 期，尤以 RT 為顯要，推測其可能是遠紅外線調控了與 G1 期相關分子之表現，因此本實驗利用西方點墨法探討 G1 期相關蛋白質表現，包含 p21、p27、Cyclin E 與 CDK2。實驗以細胞 (8×10^5 cells/well) 培養於 6 cm 培養盤中，待細胞貼附後，以遠紅外線設備給予照射溫度 RT 及時間 90 分鐘之控制組與實驗組分組照射處理；細胞給予早晚間隔 8 小時各進行照射一次，連續 3 天，置放 37°C、5% CO₂ 及含飽和水蒸氣之培養箱中培養 24 小時後收集細胞，萃取其總蛋白質，利用西方墨點法 (Western blotting) 檢測細胞週期 G0/G1 期相關蛋白質 Cyclin E/Cdk2、p21 及 p27 蛋白質表現量之變化。

在遠紅外線調控之 CC7 細胞的細胞週期 G0/G1 時期停滯現象中，以西方墨點法 (圖 4.5) 觀察到 p21 和 p27 的蛋白質表現增加，CDK2 的蛋白質表現減少，使得 cyclinE-CDK2 複合物的活性受抑制，從而導致細胞週期停滯於 G0/G1 時期。

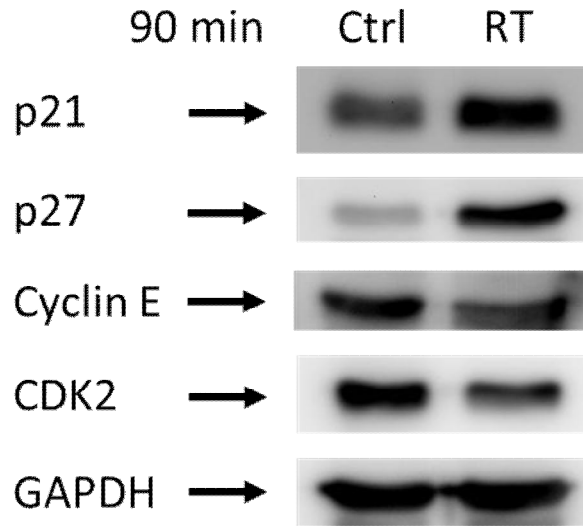


圖4.5 遠紅外線對 CC7 細胞株細胞週期調控相關因子 p21、p27、CDK 與 Cyclin E 之影響。施予細胞照射溫度 RT 與時間 90 分鐘之遠紅外光照處理（間隔 8 小時，每天 2 次，連續 3 天），於培養 24 小時後收集細胞，以西方墨點法分析細胞中蛋白之相對表現量。

4.4 遠紅外線對人類子宮頸癌細胞株(CC7)細胞凋亡之影響

於細胞存活實驗(圖 4.1、4.2)及細胞週期分析(圖 4.3、4.4)可觀察到遠紅外線可誘導 CC7 細胞之細胞週期停滯或發生細胞死亡現象，且細胞死亡方式中，細胞凋亡為一種導致細胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)的基本調節機制，為確認遠紅外線照射對 CC7 細胞引發細胞死亡現象為細胞凋亡之產生，本實驗欲利用 Annexin V-FITC/PI 雙染法來檢測細胞凋亡現象之發生。

細胞 (4×10^5 cells/well) 種植於 3.5 cm 培養盤中，待細胞貼附後，以遠紅外線設備給予不同溫度 (RT、37°C、45°C、55°C) 及時間 90 分鐘之控制組與實驗組分組照射處理；細胞給予早晚間隔 8 小時各進行照射一次，連續 3 天，置放 37°C、5% CO₂ 及含飽和水蒸氣之培養箱中培養 24 小時後收取細胞，以 flow cytometry 分析檢測遠紅外線對人類子宮頸癌細胞凋亡之影響。

給予不同溫度之遠紅外線 (IR-C) 照射 90 分鐘於 24 小時後，經由流式細胞儀分析檢測人類子宮頸癌細胞凋亡之情形，由圖 4.6 可觀察到細胞經照射 90 分鐘時，細胞凋亡分佈情形隨

溫度增加 (RT→37°C→45°C→55°C) 無明顯差異，於 37°C 時，細胞凋亡有較明顯上升之現象，但尚未達到顯著上的差異 (圖 4.7)。



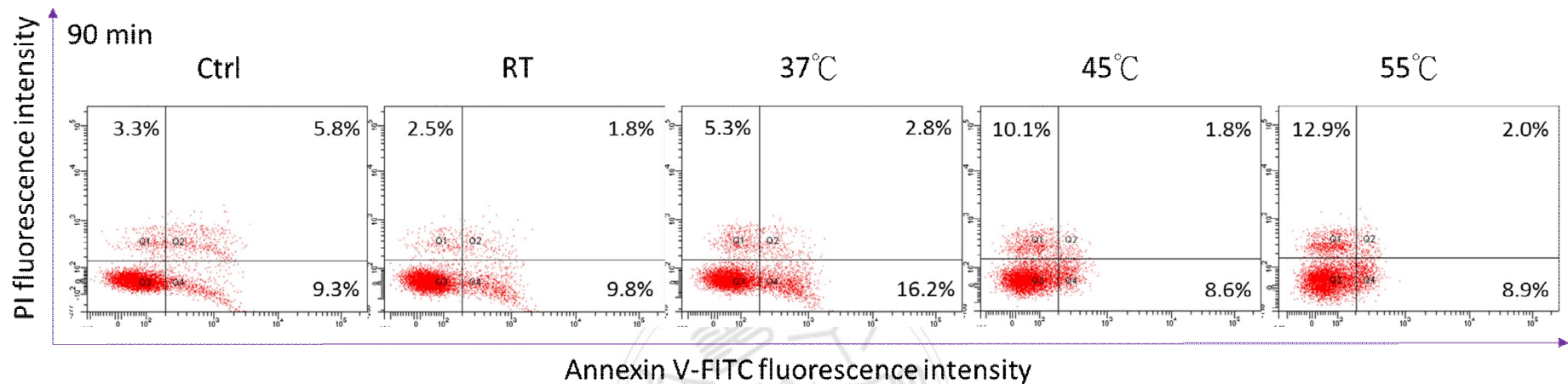


圖4.6 遠紅外線 90 分鐘照射對 CC7 細胞株細胞凋亡之影響。施予細胞 90 分鐘之遠紅外光照處理(照射溫度為 RT、37、45 或 55°C，間隔 8 小時，每天 2 次，連續 3 天)，於培養 24 小時後收取細胞，利用螢光流速細胞儀進行分析測量細胞凋亡之變化。

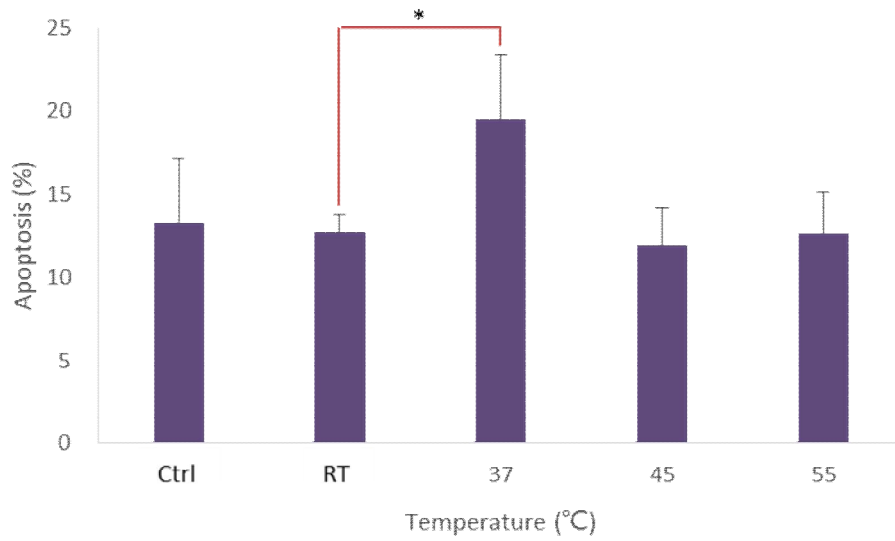


圖4.7 遠紅外線 90 分鐘照射 (n = 3) 隨溫度變化對 CC7 細胞株細胞凋亡之影響趨勢。施予細胞 90 分鐘之遠紅外光照處理 (照射溫度為 RT、37、45 或 55°C，間隔 8 小時，每天 2 次，連續 3 天)，於培養 24 小時後收取細胞，利用螢光流速細胞儀進行分析測量細胞凋亡之變化。結果數值以平均值±標準差 (mean ± SD) 表示。

第五章、 討論

癌症為常見的惡性腫瘤，由於細胞失去應有的生長調控，過度增殖而引起的疾病。癌細胞除了生長失控，常可侵犯周圍組織，並藉由體內循環或淋巴系統遠端轉移至身體其他部位。近年來已有相關研究證實遠紅外線之生物效應特性，其電磁輻射於波長 4~14 μm 被稱之為「生育光線」或「生育之光」之波段，能被生物體有效吸收，正面影響人體生理機能，廣為大眾接受與醫療輔助之用。本研究欲探討經由遠紅外線照射人類子宮頸癌 CC7 細胞株，觀察其生長存活抑制及細胞週期運行之影響情勢。

研究結果顯示使用 Cell Counting Kit-8 Assay 觀察與計數細胞存活抑制情形，發現遠紅外線照射對人類子宮頸癌細胞有抑制作用（圖 4.1、4.2），且隨著照射時間與溫度變化的不同，其抑制生長效果越明顯，並呈現劑量時間依賴效應（dose- and time-dependent response）。根據圖 4.1 進行組內比較觀察可見，在同一溫度、不同時間之變化下，於 RT、37°C、45°C、55°C 遠紅外線照射各組別中，經照射 60 分鐘與 90 分鐘後，相較於照射 30 分鐘之各組別，其細胞存活抑制作用即見下降顯著效果（ $p < 0.01$ ），尤以 90 分鐘於各溫度照射組別中之抑制效果最為顯著（ $p < 0.001$ ），另外，CC7 細胞經 60 分鐘照射後，相較於 30 分鐘照射之各組別，RT 與 37°C 兩組別之細胞存活率雖有下

降受抑制但統計上並未達顯著性差異，僅 45°C 與 55°C 兩組別之細胞存活率具有顯著性差異，其中又以 55°C 組別之細胞受抑制情形 ($p < 0.001$) 較 45°C 組別為顯著 ($p < 0.01$)，再者，細胞經 90 分鐘照射後，相較於 60 分鐘照射之各組別，其細胞存活抑制作用亦有不同程度之影響，統計上均達顯著性差異 ($p < 0.05$)，且 45°C 與 55°C 兩組別之細胞受抑制情形 ($p < 0.01$ 、 $p < 0.001$) 又比 RT、37°C 組別較為顯著 ($p < 0.05$)，而在 60 分鐘與 90 分鐘照射時間處理下，隨著照射溫度變化所影響細胞生長存活之抑制效果亦呈現出明顯的劑量效應，相較於其他遠紅外線對腫瘤細胞之相關研究上，多為探討單一溫度照射對腫瘤細胞的存活抑制效應，本研究之結果可呈現不同照射溫度（遠紅外線放射率及最大放射率波長）對腫瘤細胞生長抑制作用的影響程度差異，相信其後於臨床輔助治療使用上將更添具應用價值與意義。

由圖 4.2 進行組間比較觀察發現，相對於同一時間、不同溫度之變化下，細胞隨著照射溫度的增加，其細胞存活抑制作用下降程度明顯，統計上均較控制組達顯著性差異 ($p < 0.05$)，在 30 分鐘遠紅外線照射組別中，以 RT 與 55°C 兩組別之細胞受抑制情形最為顯著 ($p < 0.001$)，而在 60 分鐘照射與 90 分鐘照射組別中，則以 45°C 與 55°C 兩組別之細胞受抑制情形最為顯著 ($p < 0.001$)，且於 30 分鐘、60

分鐘與 90 分鐘之照射組別中，可發現 RT 組別之細胞存活受抑制作用顯著 ($p < 0.05$)，當中又以 30 分鐘照射組別 ($p < 0.001$) 較 60 分鐘 ($p < 0.05$) 與 90 分鐘 ($p < 0.01$) 照射組別更為顯著，而不論是經由 30 分鐘、60 分鐘或 90 分鐘之照射，其 RT 組別下降程度皆比 37°C 組別明顯，此現象顯示了遠紅外線照射於環境溫度下即對腫瘤細胞有抑制效果，其效應與 Nagasawa 等 (1999) 之研究相符合，認為在環境溫度下的全身 FIR 照射可以是溫熱療法對腫瘤的一個可行方式，且亦證實遠紅外線非熱效應之顯著作用，但隨著溫度變化不同之相互比較下，細胞受抑制情形彼此間則無顯著性差異。

在觀察遠紅外線對腫瘤細胞之相關研究中，Hamada 等 (2003) 發現由 37°C 竹炭所釋放之遠紅外線可有效抑制人類子宮頸癌 Hela 細胞 (表皮癌細胞) 的生長，但不影響正常人類胎兒肺成纖維細胞 (human fetal lung fibroblast cell line) WI-38 之生長，對照說明了遠紅外線對生物體無損害之效應，且 Peidaee 等 (2013) 之研究亦顯示遠紅外線對人類乳癌細胞株 MCF-7 有抑制存活作用，對正常人類表皮黑素細胞 (Human Epidermal Melanocytes cell line) HEM 之存活率則不受影響，觀察以上研究所擇取正常細胞株之部位似乎皆與實驗癌細胞株之部位相差甚遠，然而正常細胞株取得不易，且所費不貲，未來先進若進一步能有與實驗癌細胞株相接近之正常細胞部位做對照，相

信則能更加證實遠紅外線對該部位正常細胞是否造成損傷的可能性，另外，本研究照射子宮頸癌細胞 CC7 之效果較 Teraoka 等 (2004) 的研究觀察，可發現其時間效應為之明顯，本研究於時間最長 90 分鐘，早晚一次，連續 3 天之處理下，其細胞存活率相較對照組即已達非常顯著之效應，較 Teraoka 等 (2004) 於培養箱中連續照射 6 天之研究結果更能凸顯出遠紅外線對腫瘤細胞之存活抑制作用，推測其差異可能原因為照射方向或與細胞照射距離形成的能量強度不同，甚或細胞特性相異所致，且本研究設計不同溫度條件之處理方式亦可顯示出遠紅外線於不同波段下對腫瘤細胞造成影響程度的不同。

Hamada 等 (2003) 之研究認為遠紅外線非熱條件下對癌細胞的作用可能是透過生物生理活動、分子結構的改變，或影響次級活動所引起，但並沒有明確的數據能顯示其具體原因。據上述研究觀察結果可對應出遠紅外線能藉由溫度與時間的交互調控，對不同癌細胞株之生長抑制具有不同程度之影響效應，亦顯示出不同癌細胞株對遠紅外線具生物效應之適應性與敏感程度差異，往後並可從中設定適當條件能針對癌細胞特性來輔助治療上的成果。或許後人可以透過不同的照射強度與條件的改良，來增進遠紅外線對癌細胞移行作用之抑制效果。

經由細胞存活率之評估與分析，可得知遠紅外線於照射溫度（RT、37°C、45°C、55°C）變化下，經 90 分鐘之照射相較於 30 分鐘均呈現較佳的顯著性差異（ $p < 0.001$ ），推測於時間 90 分鐘的照射條件下，可能有細胞週期阻滯或細胞死亡現象之發生，因此，進一步以 PI 染色利用流式細胞儀（Flow cytometer）分析遠紅外線對人類子宮頸癌 CC7 經 90 分鐘照射後細胞 DNA 含量之分佈比例，觀察細胞週期分佈情形。結果發現，細胞在照射 90 分鐘後，其 G0/G1 期細胞於 RT（ $60.34 \pm 2.34\%$ ）時，相較於控制組（ $52.40 \pm 2.95\%$ ）即具有明顯增加之差異（圖 4.3、4.4），且於 S 期細胞分佈上亦較控制組有顯著下降（ $p < 0.05$ ），顯示出遠紅外線照射人類子宮頸癌細胞能有效引發細胞週期停滯於 G0/G1 期而使細胞無法進入 S 期。但伴隨著照射溫度增加，G0/G1 期細胞並無相對增加之趨勢，說明了遠紅外線對子宮頸癌細胞於 RT 時即較其他溫度增加組別能有效引發細胞週期停滯於 G0/G1 期之明顯作用，其效應相似於 Ishikawa et al. (2008) 之研究，顯示遠紅外線非熱效應對肝癌細胞 HepG2 產生抑制作用與凋亡現象之發生。

第六章、 結論

本研究針對人類子宮頸癌細胞 CC7 以遠紅外線照射進行體外培養實驗，使用 Cell Counting Kit - 8 (CCK-8) 以 O.D. 540 量測吸光值，進行細胞存活度計數及評估，並觀察其細胞存活抑制情形，結果證實遠紅外線對 CC7 細胞隨著照射時間 (30、60 或 90 min) 與照射溫度 (RT、37、45 或 55°C) 變化的不同皆呈現明顯生長抑制之劑量-反應效應 (dose-response effect)。其中，尤以 90 分鐘之照射組別伴隨照射溫度 (RT、37°C、45°C、55°C) 之增加，其細胞存活率相較於 30 分鐘均呈現較佳的顯著性差異 ($p < 0.001$)，進而推測遠紅外線可能調控了細胞週期阻滯的運行，導致細胞存活率之顯著差異。

在同一溫度、不同時間變化下之遠紅外線照射組別中，照射 90 分鐘相較於照射 30 分鐘及 60 分鐘組別，其細胞存活率均達統計上顯著性差異。而照射 60 分鐘相較於照射 30 分鐘之各組別，僅 45°C 與 55°C 兩組別之細胞存活率具有顯著性差異，又以 55°C ($p < 0.001$) 較 45°C 顯著 ($p < 0.01$)。經由相同照射時間之照射溫度變化下，細胞隨著照射溫度的增加，其細胞存活率均較控制組達統計顯著性差異，其中於照射溫度 45°C 與 55°C 組別有明顯效果呈現；且於照射 60 分鐘與 90 分鐘兩組別中，其細胞存活率隨著溫度變化不同的相互比

較下，具有不同程度的顯著性差異，而在 30 分鐘組別中，隨溫度變化之細胞存活率彼此間則無顯著性差異。

由上述結果推論得知，遠紅外線可經由適當的溫度與時間上的調配，對不同的人類子宮頸癌細胞株之細胞生長與生長週期有不同程度之影響。此現象顯示遠紅外線對於不同細胞株影響程度上有其重要的扮演角色，在溫度與時間上的調控可作為往後臨床應用之參考，並可推論遠紅外線照射有應用於癌症輔助性醫療之潛力，但其相關機制仍不明確，尚待釐清，未來研究方向需更進一步分析探討加以驗證。



參考文獻

中文文獻

衛生福利部 (2014 年, 4 月 26 日)。102 年度死因統計。2014 年 8 月 26 日, 取自:

http://www.mohw.gov.tw/cht/DOS/Statistic.aspx?f_list_no=312&fod_list_no=5150

衛生福利部國民健康署 (2014 年, 1 月 28 日)。子宮頸癌篩檢簡介。2014 年 6 月 26 日, 取自:

<http://www.hpa.gov.tw/BHPNet/Web/HealthTopic/TopicArticle.aspx?No=201007190002&parentid=201007190004>

香港特別行政區政府衛生署 (2015 年, 5 月 18 日)。子宮頸癌的統計資料。2015 年 5 月 28 日, 取自:

http://www.cervicalscreening.gov.hk/tc_chi/sr/sr_statistics_cc.html

李全祿(1995)。遠紅外輻射材料的研究及應用。壓電與聲光。17(1), 47-52。

王陽、水珊珊、王霞(2014)。遠紅外在生物醫學臨床上的應用及其作用機制。科技導報, 32(30), 80-84。

謝明祥、黃文濤、施科念 (2010)。薑黃素結合遠紅外線可降低在 THP-1

細胞經 PMA 誘導的 MMP-2 和 MMP-9 活性。加馬，(41)，1-9。

黃雅令(2009)。遠紅外線照射對細胞激素 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 及 $IL-8$ 之調節。未出版之碩士論文，南華大學自然醫學研究所，嘉義縣。

敖曼智(2009，4月)。遠紅外線負離子甕對運動後血乳酸移除效果之研究。中華民國能量醫學學會第四屆第十三次學術研討會。台灣。

陳婧婧、李興玉、李文信、吳勝偉、李靜(2009)。遠紅外線對造血幹/祖細胞生物學特性的影響。現代生物醫學進展。9(3)，455-459。

謝鸚燁、林招澎、劉威忠、林群智(2007)。遠紅外線在醫學上之應用及其作用機制。台灣應用輻射與同位素雜誌，3(3)，333-340。

梅聖忠(2006)。遠紅外線腧穴治療對於血液透析患者血壓控制之成效探討。未出版之碩士論文，國立臺北護理健康大學中西醫結合護理研究所，台北縣。

遠紅外線醫療網(無日期)。2015年5月8日，取自：http://www.far-infrared.info/whats_far_infra-ray.htm

英文文獻

Cancer Research UK. (n.d.). Cervical cancer risks and causes. Retrieved May 10, 2015, from <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/cervical-cancer/about/cervical-cancer-risks-and-causes>.

Fukao, H., Ikeda, M., Ichikawa, T., Inufusa, H., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O. (2000). Effects of hyperthermia on the viability and the fibrinolytic potential of human cancer cell lines. *Clin Chim Acta*; 296(1-2): 17-33.

Garg M, Kanojia D, Saini S, Suri S, Gupta A, Surolia A, Suri A. (2010). Germ Cell-Specific Heat Shock Protein 70-2 Is Expressed in Cervical Carcinoma and Is Involved in the Growth, Migration, and Invasion of Cervical Cells. *Cancer*, 116(16): 3785-3796.

ICNIRP (2006). ICNIRP statement on far infrared radiation exposure. *Health Phys*, 91(6): 630-645.

Ishibashi, J., Yamashita, K., Ishikawa, T., Hosokawa, H., Sumida, K., Nagayama, M., Kitamura, S. (2008). The effects inhibiting the proliferation of cancer cells by far-infrared radiation (FIR) are controlled by the basal expression level of heat shock protein (HSP)

70A. *Medical Oncology*, 25(2): 229-237.

Ishikawa, T., Ishibashi, J., Yamashita, K., Dalkhsuren, S. O., Sumida, K., Masui, T., Kitamura, S. (2009). Non-Thermal Effects of Far-Infrared Ray (FIR) on Human Hepatocellular Carcinoma Cells HepG2 and their Tumors. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2): 78-82

Hamada, Y., Teraoka, F., Matsumoto, T., Madachi, A., Toki, F., Uda, E., Hase, R., Takahashi, J., Matsuura, N. (2003). Effects of far infrared ray on Hela cells and WI-38 cells. *International Congress Series*, 1255: 339-341.

Hiruma, M., Kawada, A., Noguchi, H., Ishibashi, A., Conti Diaz, I. A. (1992). Hyperthermic treatment of sporotrichosis: experimental use of infrared and far infrared rays. *Mycoses*, 35(11-12): 293-299.

Ikeda, Y., Biro, S., Kamogawa, Y., Yoshifuku, S., Eto, H., Orihara, K., Kihara, T., Tei, C. (2001). Repeated thermal therapy upregulates arterial endothelial nitric oxide synthase expression in Syrian golden hamsters. *Jpn Circ J*, 65(5): 434-438.

Jennifer S. S., Jane G., Amy B. de G., Paul A., Julian P., Martyn P. et al. (2003). Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *The Lancet*, 361(9364): 1159-1167.

Lin CC, Liu XM, Peyton K, Wang H, Yang WC, et al. (2008) Far Infrared Therapy Inhibits Vascular Endothelial Inflammation via the Induction of Heme Oxygenase-1. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 28: 739-745.

Nagasawa, H., Inada, K. (2001). The Effects of Different Schedules of Far-infrared Rays (FIR) on Uterine Adenomyosis in SHN Mice. *Japanese Journal of Hyperthermic Oncology*, 17(3): 133-139

Nagasawa, H., S. Honma and Y. Udagawa. (2000). Inhibition of spontaneous mammary tumourigenesis in mice by irradiation with far-infrared rays and the effects of bamboo grass leaf extract on tumour growth. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.* 16: 27-36.

Nagasawa, H., Udagawa, Y., Kiyokawa, S. (1999). Evidence that irradiation of far-infrared rays inhibits mammary tumor growth in SHN mice. *Anticancer Res*, 19(3A): 1797-1800.

Ngelangel, C., Muñoz, N., Bosch, F. X., Limson, G. M., Festin, M. R., Deacon, J., Jacobs, M. V., Santamaria, M., Meijer, C. J., Walboomers, J. M. (1998). Causes of Cervical Cancer in the Philippines: a Case-Control Study. *J Natl Cancer Inst*, 90(1): 43-49.

Ogita S, Imanaka M, Matsuo S, Takebayashi T, Nakai Y, Fukumasu H,

- Matsumoto M, Iwanaga K. Effects of far-infrared radiation on a lactation. *Ann Physiol Anthropol* 1990, 9: 83-91.
- Peidaee, P., Shukla, R., & Pirogova, E. (2013). Influence of Far Infrared Radiation on cytotoxicity of Human Breast Cancer (MCF7) cells: experimental evaluation. *IWBBIO 2013. Proceedings*, 501-507.
- Peidaee, P., Almansour, N., Shukla, R., & Pirogova, E. (2013). The Cytotoxic Effects of Low Intensity Visible and Infrared Light on Human Breast Cancer (MCF7) cells. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 6(7).
- Rohde, M., Daugaard, M., Jensen, M. H., Helin, K., Nylandsted, J., Jäättelä, M. (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *GENES & DEVELOPMENT*, 19(5): 570-582.
- Shannon, J., Thomas, D. B., Ray, R. M., Kestin, M., Koetsawang, A., Koetsawang, S., Chitnarong, K., Kiviat, N., Kuypers, J. (2002). Dietary risk factors for invasive and in-situ cervical carcinomas in Bangkok, Thailand. *Cancer Causes and Control*, 13(8): 691-699.
- Shi-Yau, Y. Jen-Hwey, C. Shiaw-Der, Y. Yu-Chen, H. Wing-Yiu, L. Chew-Wun Wu. (2006). Biological effect of far-infrared therapy on

- increasing skin microcirculation in rats. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 22(2): 78-86.
- Soojin, H. Dong-Hoon, L. In-Kyu, L. Young Mi, P. Inho, Jo. (2014). Far-infrared radiation inhibits proliferation, migration, and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by suppressing secretory clusterin levels. *Cancer Letters*, 346(1): 74-83.
- Teraoka, F., Hamada, Y., & Takahashi, J. (2004). Bamboo Charcoal Inhibits Growth of HeLa Cells In Vitro. *Dental Materials Journal*, 23(4): 633-637.
- Timothy J. K., Pia K. V., Emily B. (2001). Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*, 2(3): 133-140.
- Udagawa, Y., Ishigame, H., Nagasawa, H. (2002). Effects of hydroxyapatite in combination with far-infrared rays on spontaneous mammary tumorigenesis in SHN mice. *The American journal of Chinese Medicine*, 30(4): 495-505.
- Udagawa Y, Nagasawa H. (2000a). Effects of combined treatment with coffee cherry and whole-body hyperthermia on the growth of spontaneous mammary tumors in SHN mice. *In Vivo*, 14: 431-435.
- Udagawa, Y., Nagasawa, H. (2000b). Effects of far-infrared ray on

reproduction, growth, behaviour and some physiological parameters in mice. *In Vivo*, 14(2): 321-326.

Udagawa, Y., Nagasawa, H., Kiyokawa, S. (1999). Inhibition by whole-body hyperthermia with far-infrared rays of the growth of spontaneous mammary tumours in mice. *Anticancer Res*, 19(5B): 4125-4130.

Yamashita, K., Dalkhsuren, S., Ishikawa, T., Sumida, K., Ishibashi, J., Hosokawa, H., Ueno, A., Nasu, F., & Kitamura, S. (2010). Far Infrared Ray Radiation Inhibits the Proliferation of A549, HSC3 and Sa3 Cancer Cells through Enhancing the Expression of ATF3 Gene. *J. Electromagnetic Analysis & Applications*, 2: 382-394.

Yoo, B. H., Park, C. M., Oh, T. J., Han, S. H., Kang, H. H., Chang, I. S. (2002). Investigation of jewelry powder radiating farinfrared rays and the biological effects on human skin. *J Cosmet Sci*, 53: 175-184.

Yung-Che, C. Liang-Chuan, L. Yuan-Po, T. Shang-Duen, W. Chau-Fong, Chen. Bin, L. (2012). Far infrared ray irradiation attenuates apoptosis and cell death of cultured keratinocytes stressed by dehydration. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 106(5): 61-68.

Waggoner, S. E. (2003). Cervical cancer. *Lancet*, 361(9376): 2217-2225.

