

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫名稱：漢黃芩素對 TEGDMA 引發巨噬細胞細胞毒性及基因毒性
* 保護作用之研究
* *****

執行計畫學生：林宗信
學生計畫編號：NSC 101-2815-C-040-022-B
研究期間：101 年 07 月 01 日至 102 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授：關宇翔

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系藥理學科

中華民國 102 年 03 月 29 日

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 *

* : 漢黃芩素對 TEGDMA 引發巨噬細胞細胞毒性及基因毒性保護作用之研究 *

* 名稱 *

執行計畫學生：林宗信

學生計畫編號：101-2815-C-040 -022-B

研究期間： 年7月1日至 年2月底止，計8個月

指導教授：關宇翔

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學藥理科關宇翔實驗室

中華民國 102 年 3 月 29 日

漢黃芩素對 TEGDMA 引發巨噬細胞細胞毒性及基因 毒性保護作用之研究

(一) 摘要

聚合性樹脂材料是大多牙醫師臨床上會使用的填補材料，其中在牙本質黏著劑中的使用量占有所有樹脂中的 30%-50%。大量研究顯示，牙科複合材料在人類口腔中呈非化學惰性。聚合不完整的有機牙科基質複合材料會導致未反應殘餘單體的暴露。並且這些物質部分透過生成活性氧及其相關代謝物 (Reactive oxygen species; ROS) 擾亂細胞恒定狀態進而誘導凋亡發生。本研究利用小鼠巨噬細胞株 (RAW264.7 cells) 先行加入 Wogonin 後再加入 TEGDMA，來觀測 (1) Wogonin 是否降低由 TEGDMA 引發的細胞死亡。(2) Wogonin 是否降低由 TEGDMA 引發的何種細胞死亡型態 (3) Wogonin 是否降低由 TEGDMA 引發的基因毒性。本計畫將進行完整的研究，以釐清 Wogonin 是否降低由 TEGDMA 引發細胞死亡的型態是否經由基因毒性。

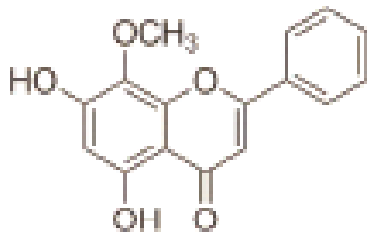
(二) 文獻回顧與探討

3.1 TEGDMA:

在修復蛀牙的牙科材料中，複合樹脂與玻璃離子樹脂粘固劑，已經取代汞合金 (Geurtsen and Schoeler, 1997)。樹脂複合材料由於其快速聚合以及美觀等優點被廣泛應用於牙科修復 (Geurtsen et al., 2000)，且他們的硬度大於牙齒法琅質，和牙本質附著力也夠強。因此，這些樹脂被用作填充材料、牙本質粘著劑、膠結物或粘著劑的嵌體，及矯正支架。最常見的使用為 triethyleneglycoldi-methacrylate (TEGDMA)，2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)，urethandi-methacrylate (UDMA) 和 bisglycidylmethacrylate (BisGMA) (Ferracane et al., 1995) 但這些樹脂大多含高 diluent 單體。其中 TEGDMA 為目前牙科所使用之主要牙本質粘著劑 (30%-50%)，因為乙二醇的加入可以讓樹脂聚合物達到防水的作用，這也是 TEGDMA 為什麼成為牙科常用樹脂的原因 (Kanerva et al., 1997) 不過隨之而來的就可能導致直接或間接的生物效應 (Geurtsen, 1998; Hansel et al., 1998; Spahl et al., 1998)。在少數的聚合樹脂中，TEGDMA 被認為是容易釋出單體之樹脂之一 (Geurtsen W, 2001)。過去文獻指出，由於 TEGDMA 具有親水和親脂雙極性使其可在例如口腔這種高度含水的環境中大量釋出 (也可能因為口中酵素影響導致生物性降解) 之後迅速地進入細胞反應 (Engelmann J et al., 2001; Gerzina et al., 1991)，因此也被認為可能影響口腔或全身組織，而 TEGDMA 在各種細胞的加藥培養中都造成了一定的細胞毒性，研究也顯示 TEGDMA 可輕易的滲透細胞膜並

與細胞內分子起反應，同時也引起大量的 DNA Damage 導致 high mutation frequency，在臨床上也證實TEGDMA可能對局部組織或全身造成影響 (W. Geurtsen and G. Leyhausen 2001)。也有文獻指出，過去十年來的研究顯示甲基丙烯酸酯會造成一些細胞毒性和遺傳毒性，TEGDMA也被證實在體外實驗會造成 gene mutation、formation of micronuclei，而微核的形成也證實了DNA damage。

3.2 Wogonin:



(圖 1.)



(圖 2.)

黃芩是一種傳統的中國藥用藥草，主要來自中國北部 (Lim et al., 2003) 其中一種在植物的 active components 為 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone, 漢黃芩素(wogonin)。漢黃芩素是由黃芩中所萃取之類黃酮。其已廣泛應用於治療各種炎症性疾病，由於能夠抑制一氧化氮 (Nitric Oxide; NO)，前列腺素 E2 促炎性細胞因子的產生，以及減少環氧合酶 (cyclooxygenase-2 COX-2)。在體外研究表明漢黃芩素具有抑制腫瘤細胞生長和對幾種人類腫瘤細胞的殺傷活性 (Baumann S et al., 2008；Yu JQ, Liu HB et al., 2007；Himeji M et al., 2007；Lee D-H, et al., 2008；Yang L, et al., 2009)。漢黃芩素也被證明在體外以及體內發揮抗氧化，抗病毒，抗血栓和抗發炎 (Zhao Y, et al., 2006；Ma SC et al., 2002；Kimura Y, et al., 1997；Chi YS, et al., 2003)。另據報導，漢黃芩素也能夠抑制體外體內各種腫瘤細胞生長和誘導細胞凋亡。更為重要的是，漢黃芩素對正常細胞沒有明顯的毒性，這使得它成為良好防癌劑的選擇。(Lee DH et al., 2008；Baumann S et al., 2008；Chung Het al., 2008)最近的幾項研究發現，漢黃芩素透過 ROS Pathway 殺死癌細胞和 malignant 的細胞 (Fas SC et al., 2006；Lee WR et al., 2002)。漢黃芩素的抗炎和抗病毒的活動也可能有助於預防腫 (Li-Weber M 2009)。漢黃芩素是一個很好的抗癌藥物，由於其廣泛對各種類型的腫瘤細胞株產生細胞毒性和對正常組織的低毒性，以及協同作用。而文獻中也指出漢黃芩素的分子機制和抗癌活性，並建議這個共同的黃酮類化合物可作為改進腫瘤壞死因子在腫瘤治療中的的輔助 (Lan Yang et al., 2011)。

3.3 RAW264.7 macrophages:

在免疫反應中，巨噬細胞扮演一個相當重要的角色，巨噬細胞在免疫反應過程中，

在不同的階段都有份參與，首先它先吞噬抗原，被刺激放 Tumor necrosis factor (TNF)、Interleukin 1 (IL-1)、Interleukin 6 (IL-6) 等細胞激素，它可以呈獻抗原給 T 細胞。在免疫作用階段，經由 T 細胞釋放出的細胞激素很容易活化巨噬細胞，參與發炎反應。簡單的來說，巨噬細胞可將身體的非特異性免疫反應，轉換成特異性免疫反應，巨噬細胞是聯結第一道天然免疫防線和第二道特異性免疫防線的主角，也可以說巨噬細胞是開啟人類自體免疫反應的鑰匙。如能深入瞭解巨噬細胞的活化機制，將讓我們在免疫學的應用上，有更好的突破。巨噬細胞的角色可分為：發炎反應及發燒，釋放熱源 (pyrogen, IL-1)；釋放不同的細胞激素影響 T 細胞的分化；影響淋巴細胞的活化；影響組織的再生與重整；有抗細菌的作用；有抗腫瘤的作用；造成組織傷害。巨噬細胞也是一群組成複雜 (heterogeneous) 的細胞，它的活化牽涉到複雜的步驟，它的作用與活化程度、本身的狀態和活化的細胞激素種類及刺激本身都有關。當細胞被藥物誘導而導致死亡時可能影響上述之功能。而口腔中的黏膜極有可能接觸到牙科材料所釋出之樹脂單體，而進一步導致巨噬細胞的免疫反應，故本實驗以小鼠的巨噬細胞進行研究(Murakami et al., 2007)。

3.4 DNA 損傷反應的相關介紹:

生物體的生存取決於細胞是否可將正確完整的遺傳物質傳給下一代，為了達到這個目的，細胞發展出監控機制，來檢查染色體結構的完整性，並調節細胞修復及細胞週期的進行。這個 DNA damage response pathway 是由 sensors、transducers 及 effectors 所組成的一個 signal transduction。目前 sensors 為何仍不清楚。當細胞受到外來物質損害，細胞會停滯在 cell cycle checkpoint 暫時允許細胞作下列的工作：(I) 修補細胞損傷；(II) 解除細胞外壓迫訊號；(III) 有效利用必需的生長因子、荷爾蒙、或營養物質。假如細胞損傷無法修補時，checkpoint 的訊號也可能活化特定的訊息路徑，而使得細胞則會走向死亡。Cell cycle checkpoint 有缺陷時會造成基因突變 (gene mutation)、染色體損 (chromosome damage) 及非倍數染色體 (aneuploidy)，這些都會造成腫瘤的發生(tumorigenesis)。許多文獻中已清楚指出 TEGDMA 具有細胞毒性並可以造成 gene mutations、formation of micronuclei，所以本實驗將藉由下列實驗方法來分析。

3.4.1 微核試驗 (MN assay):

微核 MN (micronucleus) 可用於化合物對染色體的誘變與致癌性的評估和預測。微核是人類遺傳毒性暴露的良好標記，目前已被廣泛用於識別潛在遺傳毒性的 genotoxic agents。微核是染色體不穩定的指標，可用來檢查腫瘤細胞和 defective DNA damage repair system 或細胞週期異常的細胞。儘管這種生物指標的廣泛使用，微核是否影響細胞的資料卻還是相對且具爭議。諸如，微核被認為是遺傳物質的丟失。相對地，也有研究指出微核中的基因也能夠完全表現。最近，有證據表明微核中夾帶損壞的 DNA 的積累導致有缺陷的細胞週期的 checkpoint arrest 和 DNA 修復反應，以及微核可在沒

有立即引發細胞週期阻滯或導致細胞進入細胞凋亡的情況下降解。總而言之，這些發現強調微核的形成，對於在一般和 gene loss 的細胞中之染色體不穩定有重要影響 (Mariona Terradas et al 2010)。

3.4.2 鹼性彗星電泳法 (Comet assay):

彗星實驗 (單細胞凝膠電泳) 是一個簡單測量在真核細胞中 DNA 的鏈斷裂的方法 (Andrew R. Collins 2004)，DNA 受到的損壞愈大，DNA 碎段就愈多，愈小的 DNA 碎段游離的速度就愈快，也游離愈遠，因而形成了彗星的尾部，而較大的一些碎段位置則靠近細胞核，因而形成彗星的頭部。DNA 碎段的游動的程度不同使它呈現出彗星狀。如環境和職業暴露，或不同的基因毒性藥物，包括輻射，化學和 oxidative stress。靈敏度和可靠性高，能夠提供寶貴的信息。但在環境和職業暴露的危險源辨識和風險評估等領域，疾病 (如糖尿病和心血管疾病) 與 oxidative stress、營養、醫療監測的有效性和調查在 DNA 損傷反應的個體差異，可能反映了遺傳或環境的影響。簡言之，它是一種簡便、快速且靈敏測量細胞 DNA 斷裂的方法。

3.4.3 ROS (reactive oxygen species) 介紹：

自然界物質必須含有成對的電子才能維持性質的穩定，而自由基 (free radicals) 則是含一個或多個不成對電子的原子或分子，其性質活潑並具有高自由能，因此會任意的攻擊並破壞細胞結構並造成 DNA、蛋白質損傷，引起細胞質的氧化作用和脂質的過氧化，導致生物體產生衰老現象及一些疾病的引發。目前已知自由基對生物體造成的危害有發炎、老化、癌症、神經性疾病及其它相關的疾病等 ROS 的來源有許多可能性，其中可能是人體在氧化磷酸化過程中，因電子傳遞異常導致少量的氧氣轉換成 ROS (Lasso et al., 1994)，輻射線的暴露也會造成 ROS 的產生 (Paya et al., 1992)，另一方面也有可能是化學物質在體內氧化還原所導致的結果 (Halliwell et al., 1993)，包括超氧陰離子 (superoxide anion; O_2^-)、氫氧自由基 (hydroxyl radical; OH^\cdot)、NO 及一些非自由基的氧化基。而過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、次氯酸 (Hypochlorous acid; HOCl)、臭氧 (Ozone; O_3) 等，均是屬於非自由基的氧化基。ROS 具有高活性會攻擊體內微生物、細菌甚至是 DNA，正常人體內都含有微量的 ROS，適量的 ROS 可以使人體免於受到微生物或細菌的危害，在人體的免疫系統中 ROS 是扮演著重要的角色 (Dinauer et al., 1992; Curnutte et al., 1993)，但相對來說，過量的 ROS 卻也同樣的會對人體組織傷害 (Chakraborti et al., 1998)，ROS 被認為與許多的疾病以及癌症有相關性，已有相關研究指出，ROS 是造成細胞以及 DNA 病變的重要因素之一 (Vallyathan et al., 1998)，因此近年來對於 ROS 研究的重要性也大幅提升。由於自由基的產生通常在粒線體和內質網和細胞膜上的 nicotinamide denine dinucleotide phosphate oxidases (NOX)，所以藉由 ROS 的檢測也可得知細胞的損傷程度 (Zi-yue Li et al., 2011)。

(四) 研究方法及步驟

4.1. 細胞培養:

RAW264.7 巨噬細胞於食品工業研究所購得。細胞培養於含 10%胎牛血清與 1% streptomycin and penicillin 之 DMEM 培養基，於 37°C, 5%二氧化碳之培養箱內培養，待細胞長滿後以 5×10^5 濃度分裝到 24well 中，隔日進行後續的加藥試驗分析。

4.2. 細胞存活分析 (MTT 及)

MTT 為一種黃色染劑，它會被活細胞所吸收，然後經由粒線體中的脫氫酵素 (succinate dehydrogenase) 還原形成藍色的 formazan，藉由吸光值的測量來評估藥物對細胞生長的影響，常用來當作檢測細胞存活與生長的指標。加藥前一天將 5×10^6 的細胞種於 24 well。細胞貼壁後，移除 well 中的 medium，用 PBS 沖洗兩次。加入無色無 FBS 的 medium。

加入 100 μ l MTT，置入培養箱 4 小時後取出，再加入 190 μ l triton X，將藍色結晶溶解，最後利用 microplate reader 以 570nm 測吸光值，以對照組的吸光值為 100%，實驗組與對照組的比值即為相對的細胞存活率。

4.3. 鹼性彗星電泳法 (Comet assay):

第一層將 200 μ l 的 0.5% Normal Melting Agarose (NMA) 覆蓋在玻片上。第二層將 75 μ l 的細胞液加入的 0.7% Low Melting Agarose (LMA)，覆蓋在準備好的玻片。第三層是覆蓋上 75 μ l 的 0.7% 的 LMA。細胞溶解在 Lysing solution 中 (2.5M NaCl、10mM Tris、100mM EDTA、pH10、1% Triton-X 100 和 10% DMSO、34.1mM N-Lauroyl-Sarosine、200mM NaOH)，至少一小時。玻片被安置在一個水平凝膠電泳槽，注入 Electrophoresis Buffer (300mM NaOH、1mM EDTA、pH >13)。經過 20min 等 dsDNA 轉變為 ssDNA，再將玻片放在電泳槽 (25V/cm，300mA，20min)。以 Neutralization Buffer 沖洗並稍微浸泡，細胞用 EtBr 染色。用螢光顯微鏡分析玻片，以 400X 的倍率數 40 個細胞。DNA migration 取決於 strand breaks 和 alkali labile sites，migration 的程度使用 image-analysis system 分析。DNA migration 的程度用 'OTM' 定義: 相對量的 DNA 彗星尾巴乘以遷移距離中位數 (median migration distance) 統計分析是用 80 個細胞的 OTM 的平均每個樣品有兩個玻片，每片 40 個細胞。

4.4. DNA Ladder:

於加藥前一天種植 2×10^6 RAW264.7 小鼠巨噬細胞於 6well dish，隔天加藥前先用 PBS wash two time，之後加入無色含 AA 之 DMEM，之後分別加入 0.1mM、0.3mM、1mM、3mM 的 Wogonin 過半小時之後每 well 再加入 0.3 mM TEGDMA 放入 37°C 培養箱 2 小時，移除上清液，用 PBS 潤洗 2 次，再以 PBS 將細胞沖下來裝入 eppendorf 中加入 150 μ l Lysis buffer，20 μ l Proteinasek，20 μ l 10%SDS，10 μ l RNAase after 1hr 37°C over night。隔天加入 50 μ l 6MNaCl 激烈震盪之後離心取上清液，加入 20 μ l Sodium acetate，600 μ l Isopropanol 移除上清液再加入 75% Ethanol 之後移除酒精，以 TE buffer 回溶，處理完後以電泳方式觀察保護劑的效果和 DNA 的損傷。

4.5. 流式細胞儀:

吸掉舊培養液。加藥前用 PBS 潤洗 2 次，加入 DMEM (含 streptomycin and penicillin)。分別加入 0.1mM、0.3mM、1mM、3mM 的 Wogonin 過半小時之後每 well 再加入 0.3 mM TEGDMA 放入 37°C 培養箱 2 小時。移除上清液，用 PBS 潤洗 2 次，再以 PBS 將細胞沖下來裝入 Tube，離心 500g, 4°C, 5 分鐘。將上清液倒掉，再加入 Binding buffer 1ml 混合均勻，取 100µl 的細胞分裝至 FACscan tube，加入 AN-V 和 PI 染色，在陰暗處放置 30 分鐘。Tube 加入 2ml PBS，離心 500g, 4°C, 5 分鐘，丟掉上清液，重複 2 次。最後加入 500µl PBS 混合均勻，用流式細胞儀分析。

4.6. 微核試驗 (MN assay):

實驗前一天種細胞，培養滿 23hr，第 24hr 換加藥用無血清和 AA 之 medium，之後加入 wogonin 30min 之後加入 TEGDMA、CtochromB 1hr，換回培養用 medium 再加入一次 CytochromB (確保其作用)，過 16 小時後已 PBS wash 2 次，加入 KCL 1min，固定液 30min、5min、5min 並覆蓋於玻片上以 Ginsa 3% 染色 6mins，以一次水 wash。

(五) 結果

5.1 Wogonin 可降低由 TEGDMA 所引發的細胞死亡

Wogonin 以濃度 (0.1-3 µM) 處理 30 分鐘後，再加入 TEGDMA 2 小時後。利用 MTT 的方式分析細胞死亡和損傷的程度。由圖 1 中發現 Wogonin 以濃度依存性的方式抑制 TEGDMA 所造成的細胞死亡。

5.2 DNA Ladder

Wogonin 以濃度 (0.1-3 µM) 處理 30 分鐘後，再加入 TEGDMA 2 小時後。利用 DNA Ladder 的方式分析細胞死亡和損傷的程度。由圖 2. 可看出 TEGDMA 對細胞造成的 DNA damage 隨著 Wogonin 濃度上升而減少。

5.3 Comet assay

Wogonin 以濃度 (0.1-3 µM) 處理 30 分鐘後，再加入 TEGDMA 2 小時後。利用 Comet assay 的方式分析細胞死亡和損傷的程度。由圖 3. 的電泳可看出細胞的完整度隨著 wogonin 的濃度增加有提高的趨勢

5.4 sub G1

Wogonin 以濃度 (0.1-3 µM) 處理 30 分鐘後，再加入 TEGDMA 2 小時後。利用 Comet assay 的方式分析細胞死亡和損傷的程度。由分析圖中可看出 G1 期的波峰隨著 wogonin 的增加而漸漸地降低。

5.5 MN

Wogonin 以濃度 (0.1-3 µM) 處理 30 分鐘後，再加入 TEGDMA 2 小時後。利用 MN 的方式分析細胞死亡和損傷的程度。由圖 5. 中可發現隨著 wogonin 的濃度增加明顯地降低了由 TEGDMA 所引發的微核。

(六) 討論

在本研究過程中，經由 MTT、DNA Ladder、Comet、sub G1 等實驗發現漢黃芩素 (wogonin) 可以抑制 TEGDMA 所造成的細胞損傷，至於詳細的作用途徑尚未進行研究。研究指出 Wogonin 能有效抑制脂多醣 (LPS) 誘導的誘導型一氧化氮合酶 (Inos) 基因表達 (G Polier et al., 2011)、抑制由 IL-6 所引發的 Aldo-keto reductase family 1 member C1 (AKR1C1/1C2) 的發炎反應 (Wang et al., 2007)、抗發炎抗癌等效果 (Yu et al., 2011; Riyo Enomoto et al.)。但又有研究指出 wogonin 促進某些特定細胞粒線體的凋亡途徑 (Libin Wei et al., 2010)。而先前的研究指出 TEGDMA 會經由 Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK)、extracellular-signal-regulated kinases (ERKs)、c-Jun N-terminal kinases (JNKs)、protein 53 (P53) 等 pathway (Eleni Mavrogonatou et al., 2010)。爾後希望再進一步藉由 RAW264.7 這株巨噬細胞來進行 western 等實驗確認 wogonin 對 TEGDMA 所導致的 apoptosis 之抑制途徑和切確的反應機制。

(七)結果

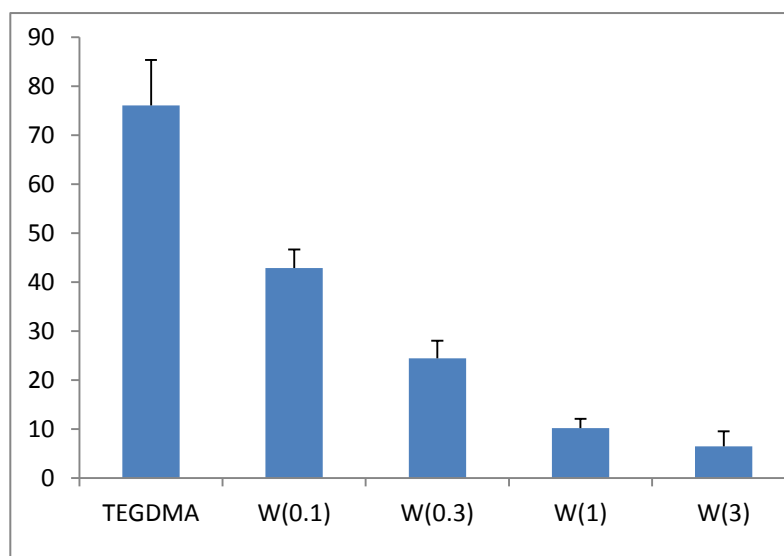


圖1 Wogonin 可降低由TEGDMA 所引發的細胞死亡。 5×10^5 的細胞貼壁後。加入0、0.1、0.3、1、3 μM 不同濃度 wogonin 30 min 後，再加入 0.3 μM TEGDMA，置入培養箱中待 2 小時。加入含有 MTT 的 medium，置入培養箱 2 小時後，收集細胞離心並去除上清液，加入 triton X，將藍色結晶溶解測吸光值，以對照組的吸光值為 100%，實驗組與對照組的比值即為相對的細胞存活率。

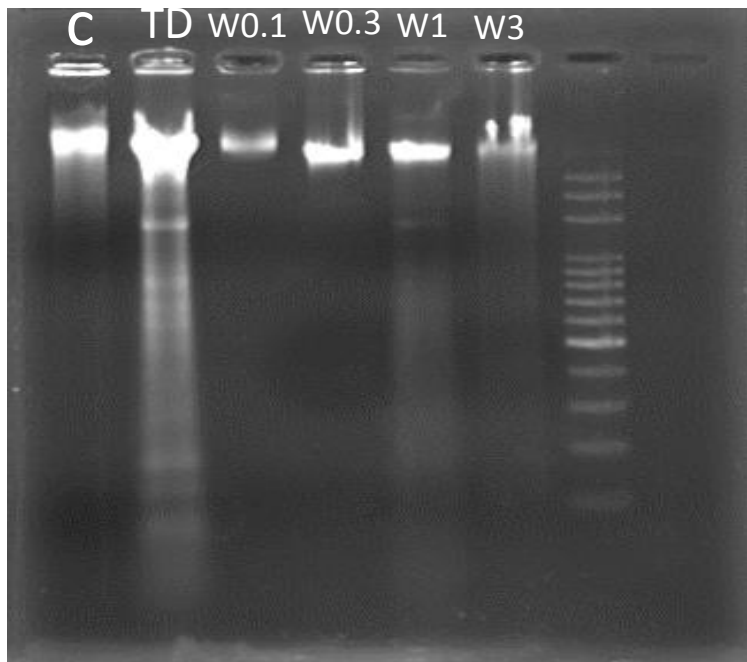


圖 2 2×10^6 的細胞加入 6well 貼壁後。加入 0、0.1、0.3、1、3 μM 不同濃度 wogonin 30 min 後，再加入 0.3 μM TEGDMA，置入培養箱中待 2 小時。之後將細胞處理完後以電泳方式分析，由左到右可發現單純加入 TEGDMA 和有加入 wogonin 的樣品 band 的數量有明顯不同，由此可得知 wogonin 可保護由 TEGDMA 所造成的 DNA damage。

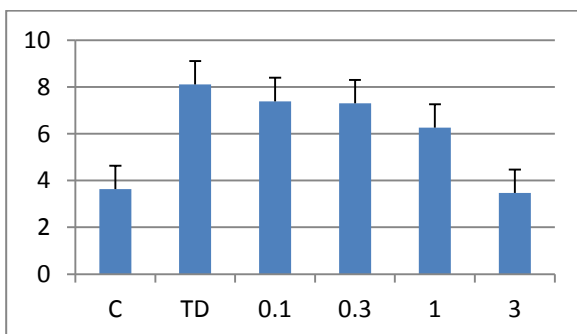
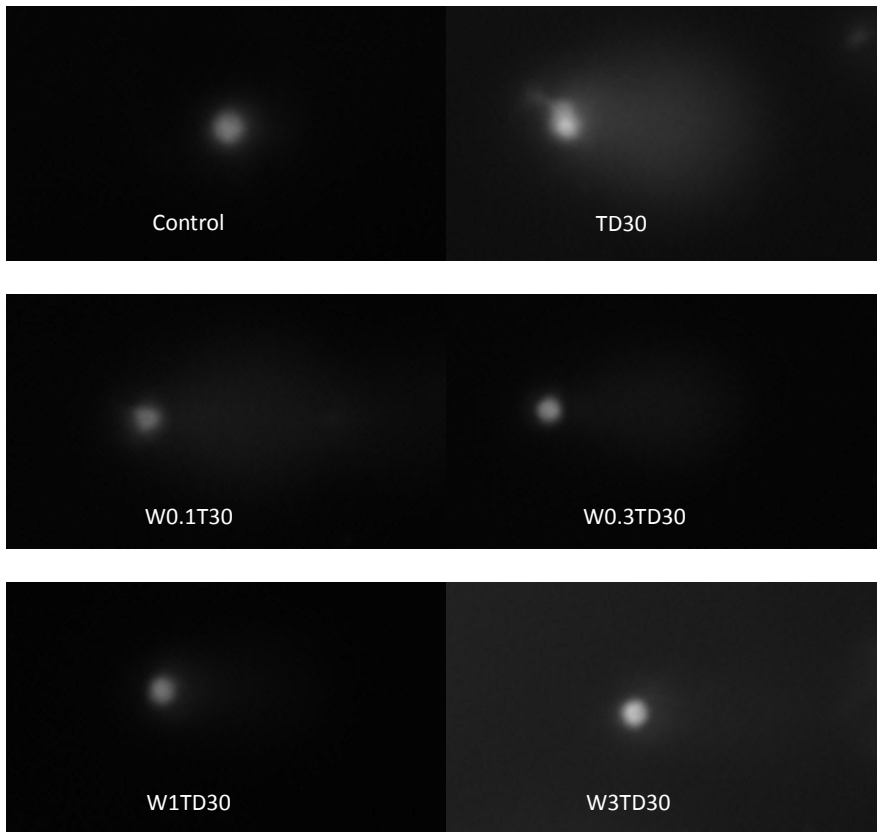


圖 3 5×10^5 的細胞貼壁後。加入 0、0.1、0.3、1、3 μM 不同濃度 wogonin 30 min 後，再加入 0.3 μM TEGDMA，置入培養箱中待 2 小時。第一層將 200 μl 的 0.5% Normal Melting Agarose (NMA) 覆蓋在玻片上。第二層將 75 μl 的細胞液加入的 0.7% Low Melting Agarose (LMA)，覆蓋在準備好的玻片。第三層是覆蓋上 75 μl 的 0.7% 的 LMA。細胞溶解在 Lysing solution 中 (2.5M NaCl、10mM Tris、100mM EDTA、pH10、1% Triton-X 100 和 10% DMSO、34.1mM N-Lauroyl-Sarosine、200mM NaOH)，至少一小時。玻片被安置在一個水平凝膠電泳槽，注入 Electrophoresis Buffer (300mM NaOH、1mM EDTA、pH >13)。經過 20min 等 dsDNA 轉變為 ssDNA，再將玻片放在電泳槽 (25V/cm，300mA，20min)。以 Neutralization Buffer 沖洗並稍微浸泡，細胞用 EtBr 染色。

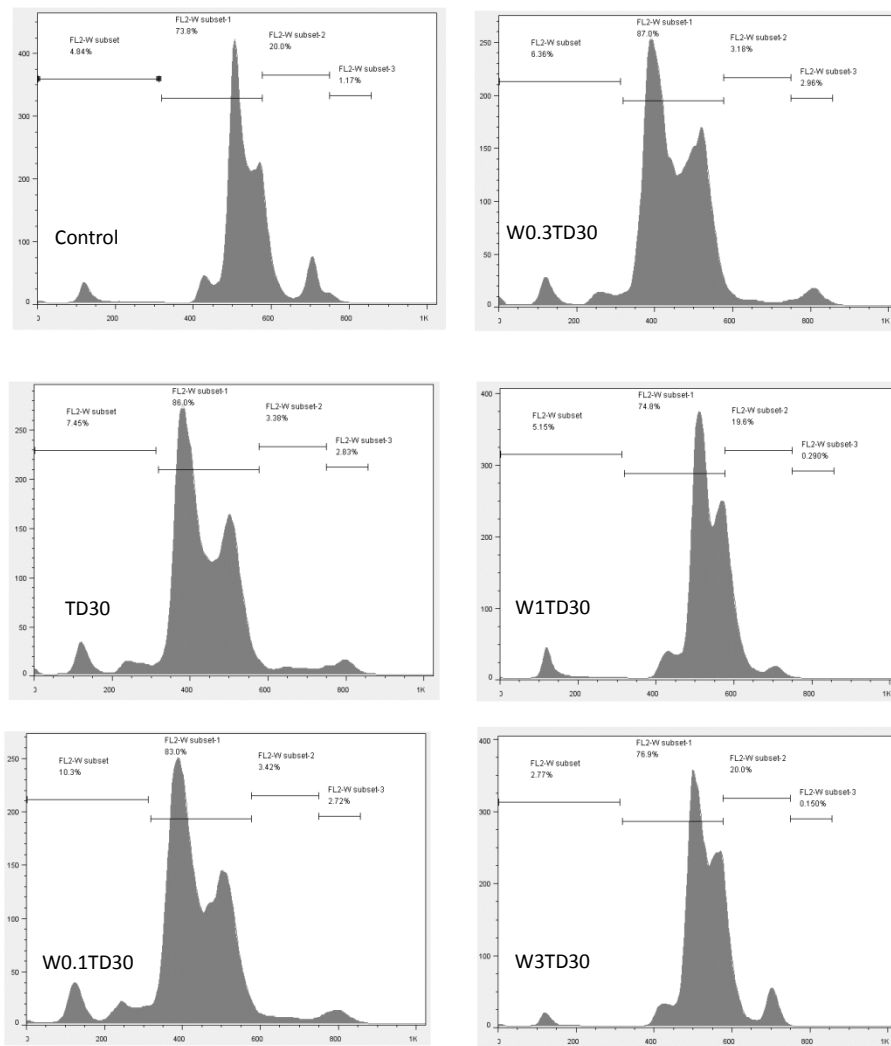


圖 4 5×10^5 的細胞貼壁後。加入 0、0.1、0.3、1、3 μM 不同濃度 wogonin 30 min 後，再加入 0.3 μM TEGDMA，置入培養箱中待 2 小時。之後以 PBS wash 後加入 binding buffer 混和均勻後再加入 Annexin-V 和 PI 染色 30min，移除上清液加入 PBS 混合均勻後上機。

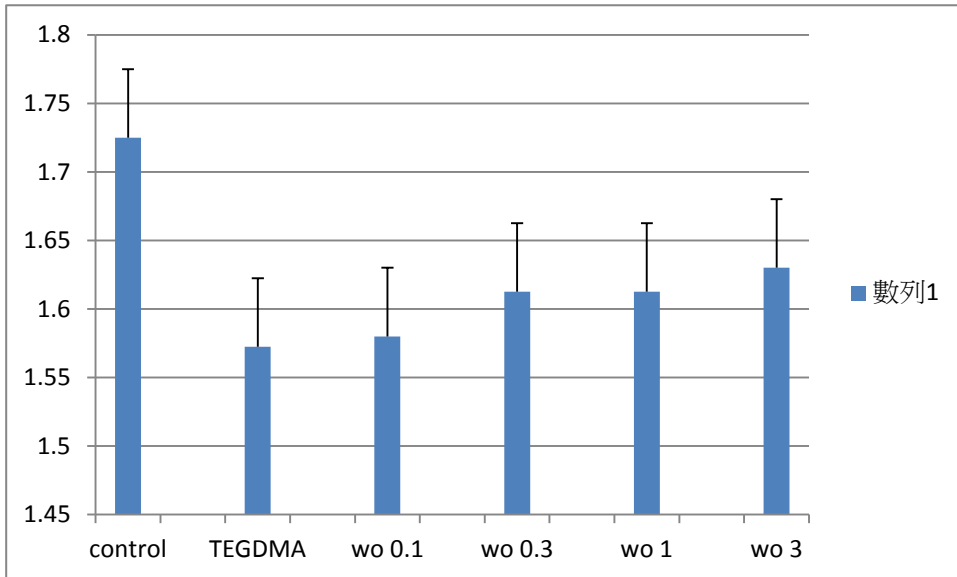


圖5. 10^6 培養滿23hr，第24hr換加藥用無血清和AA之medium，之後加入 wogonin 30min之後加入TEGDMA、CtochromB1hr，換回培養用medium再加入一次 CytochromB (確保其作用)，過16小時候已PBS wash 2次，加入KCL 1min，固定液30min、5min、5min 並覆蓋於玻片上以Ginsa3%染色6mins，以一次水wash之後觀察微核的產生。

(八)參考文獻

- Chow JM, Huang GC, Shen SC, Wu CY, Lin CW, Chen YC. Differentia apoptotic effect of wogonin and nor-wogonin via stimulation of ROS production in human leukemia cells. *J Cell Biochem.* 2008;103.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004 Mar;26.
- Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis.* 2008.
- Eleni Mavrogonatou, Theodore Eliades , George Eliades , Dimitris Kletsas The effect of triethylene glycol dimethacrylate on p53-dependent G2 arrest in human gingival fibroblasts. 2010
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1983;123.
- Ji Sun Yu, and An Keun Kim. Wogonin Induces Apoptosis by Activation of ERK and p38 MAPKs Signaling Pathways and Generation of Reactive Oxygen Species in Human Breast Cancer Cells. 2010
- Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl.* 1994 ;15.
- Libin Wei,1 Na Lu,1 Qinsheng Dai,1 Jingjing Rong,1 Yan Chen,1 Zhiyu Li,2 Qidong You ,1 and Qinglong Guo .Different Apoptotic Effects of Wogonin Via Induction of H₂O₂ Generation and Ca²⁺ Overload in Malignant Hepatoma and Normal Hepatic Cells. 2010
- Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev.* 2009;35.
- Li ZY, Yang Y, Ming M, Liu B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;414.
- Li C, Lin G, Zuo Z. Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of Radix Scutellariae and its bioactive flavones. *Biopharm Drug Dispos.* 2011;32.
- Lu QY, Zhang L, Moro A, Chen MC, Harris DM, Eibl G, Go VL. Detection of Baicalin Metabolites Baicalein and Oroxylin-A in Mouse Pancreas and Pancreatic Xenografts. *Pancreas.* 2011.
- Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer.* 2007;121.
- Riyo Enomoto, Chiyoko Sugahara, Chie Suzuki¹, Ikumi Nagase¹, Yoshimi Takamura, Asa Yoshikawa, Akiko Hosoda, Hiroyuki Hirano, Toshio Yokoi, and Eibai Lee . Wogonin Prevents Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis Without Diminishing Its Anti-inflammatory Action 2007
- Tan W, Lu J, Huang M, Li Y, Chen M, Wu G, Gong J, Zhong Z, Xu Z, Dang Y, Guo J, Chen

X, Wang Y. Anti-cancer natural products isolated from Chinese medicinal herbs. *Chin Med.* 2011;6.

Takahashi H, Chen MC, Pham H, Angst E, King JC, Park J, Brovman EY, Ishiguro H, Harris DM, Reber HA, Hines OJ, Gukovskaya AS, Go VL, Eibl G. Baicalein, a component of *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813.

Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res.* 2010;705.

Wei L, Lu N, Dai Q, Rong J, Chen Y, Li Z, You Q, Guo Q. Different apoptotic effects of wogonin via induction of H₂O₂ generation and Ca²⁺ overload in malignant hepatoma and normal hepatic cells. *J Cell Biochem.* 2010;111.

Hao-Wei Wang, Chin-Ping Lin, Jen-Hwey Chiu, Kuan-Chih Chow, Kuang-Tai Kuo, Chen-Sung Lin and Liang-Shun Wang. Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. *Int. J. Cancer: 120, 2019–2027 (2007)*

Yang L, Zheng XL, Sun H, Zhong YJ, Wang Q, He HN, Shi XW, Zhou B, Li JK, Lin Y, Zhang L, Wang X. Catalase suppression-mediated H₂O₂ accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation and sensitizes apoptosis. *Cancer Sci.* 2011;102.

Zhao L, Chen Z, Zhao Q, Wang D, Hu R, You Q, Guo Q. Developmental toxicity and genotoxicity studies of wogonin. *Regul Toxicol Pharmacol.* ;60.