

第一章 前言

現代工業快速的發展，人類生活水準的提昇，許多有害的化學物質，漸漸地出現於人類的生活環境中，包括廢氣物和廢水的排放、核輻射污染、以及防腐劑和農藥的使用等等，不但污染了人類賴以生存的環境，更造成臭氧層的破洞，使紫外光直接曝曬，而增加罹患皮膚癌的機會。而人類賴以生存的食物，也存在許多對人類有害的化學物質，包括食物的添加物和防腐劑（醃漬食品的亞硝基化合物nitroso compound）、以及發霉的食物（發霉的花生、稻米和玉米所產生的黃麴毒素alfa-toxin）和碳烤食物等，更造成人類罹患癌症的機會，不斷提高。其他環境中的許多化學物質，也直接或間接危害到人類。

癌症就是惡性腫瘤，自古以來一直威脅著人類，尤其是近數十年來工業快速的發展，造成生活環境的嚴重污染，有害物質的增多，導致整個世界和台灣，癌症都一直是十大死亡原因的前一、二名。雖然最近十年來科技的發展迅速，對癌症的治療卻仍未找出理想的方法。癌症雖然從各種不同的器官產生，但是各種不同的癌細胞均有它們共同的特徵，就是失去正常細胞的功能，以不正常的比例快速增殖，卻失去了細胞分化的能力。癌細胞更會分泌一種酵素，破壞鄰近正常組織之基底膜層構造（破壞第四型膠原纖維），而突破限制，造成聚集，最後形成轉移。所以，如果能先了解癌細胞的一般共同特性，也許能發展出對抗癌細胞的方法或發現有效的藥物，為癌症找到治療的契機。

癌症的發生可分為三種階段，第一為起始期（initiation）：導致DNA產生突變；第二為促癌期（promotion）：造成細胞加速分裂；及第三為進行期（progression）：腫瘤的形成¹⁻³。而癌症的發病，與人類的遺傳、微生物的感染、及生活環境中之危險因素，均具有密切的相關性。癌症只有少數得以早期發現，靠手術完全切除或加上化學療法，得以倖存。因此開發對正常細胞較無毒性的抗癌藥物（包括天然物、天然提取物），單純或輔助根除癌細胞，仍是現代醫療中相當重要的任務，例如：太平洋紫杉醇：汰癌勝paclitaxel (taxol[®]) 就是其中的一例。

早在 1970 年代之前，肢體骨癌的治療只有截肢且預後悲慘；一半的病人死於診斷後一年之內，2 年的存活率也只有 25% 左右，活超過 5 年的更少於 20%⁴；這是由於治療時多已有顯微轉移（micrometastasis），所以腫瘤很快再復發造成病人死亡；近 20 年來，幸運地有效的輔助化學療法，使骨癌的預後顯著改善；如今 2/3 的骨癌病人，可以預期達到長期的存活（long-term survival）^{5,6}，但仍舊無法完全控制。又血癌自從 1960 年代化學療法大進步之後，很多致

命的都可被治癒；不幸地仍然有很高的比例治療無效而死亡，許多要如何適當去治療的方法尚待解決^{7,8}。

當人類暴露到化學致癌物中的芳香胺類化合物 2-aminofluorene (AF) 時，此化合物先由乙醯轉移酶 (*N*-acetyltransferase, NAT) 的乙醯化^{9,10}，再由其他的酵素(如: cytochrome P450 和 sulfotransferase) 進一步的代謝，形成活性強的致癌物質，最後會與細胞內的大分子 DNA 結合，形成 DNA 鍵結衍生物 (DNA adduct)，當細胞複製 DNA 時，即可能導致基因突變，最後引發癌症¹¹⁻¹⁴；而個體可依乙醯化的快慢，而將人類區分為快的乙醯轉移者 (rapid acetylator) 和慢的乙醯轉移者 (slow acetylator)^{15,16}。在人類流行病學研究依據統計顯示：人經由職業暴露到化學致癌物 (AF) 後，快乙醯轉移的個體則易得大腸直腸癌¹⁷⁻¹⁹，而慢乙醯轉移的個體較易得膀胱癌²⁰⁻²⁵，而文獻也報導改變肝中 NAT 的活性與其他器官的病變有直接相關連¹⁵，例如乳癌和膀胱癌^{26,27}；也有文獻報導當肝中 NAT 的活性上升時，將令暴露到芳香胺類化學致癌物的個體，更容易引發癌症²⁸。因此降低此酵素的活性，也就是減少芳香胺類化學致癌物的乙醯化，是否可相對地減少癌症的發生是目前許多學者有興趣的探討方向²⁹。目前已發表很多篇有關這方面的研究^{13,25,30-39}，也有一些 paclitaxel 引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞週期停止和細胞凋亡的研究⁴⁰⁻⁴³。但是有關 paclitaxel 對人類的骨癌細胞和血癌細胞之 NAT 的影響及生長的抑制和調節細胞週期相關基因的表現，目前很少有文獻報導。

paclitaxel (taxol[®]) 是一種紫杉 (taxane) 的成分，它可穩定細胞內的微小管 (microtubules)，造成分裂停止；因此目前被廣泛使用於卵巢癌、子宮癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、膀胱癌、黑色瘤、Kaposi 氏肉瘤及愛滋病；但是卻有脊髓抑制作用，造成粒性細胞過少症 (granulocytopenia)、血小板減少症 (thrombocytopenia) 及貧血⁴⁴⁻⁴⁸ 因此，本一系列的研究將探討 paclitaxel 引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的 NAT 體外和體內活性影響及生長抑制和調節細胞週期相關基因表現。

第二章 總論

第一節 化學致癌物 (chemical carcinogen) 致癌過程

一、引起癌症的因子

癌症就是惡性腫瘤，雖起源於各種不同的組織或器官，但有其共同的特徵：(1).失去正常細胞的功能；(2).異常增殖；(3).侵犯局部周圍組織；(4).轉移。而癌細胞在體內的產生，乃因正常細胞的 DNA 構造受寄生蟲、微生物、細菌、致癌病毒 (oncogenic virus)、毒素、輻射線 (radiation) 或化學致癌物 (chemical carcinogen) 等的影響而發生變化或受到損傷所引起的。致癌病毒方面，如 B 型肝炎病毒 (HBV) 與肝癌有關。又如人類乳突狀病毒 (HPV) 會引起女性子宮頸癌，增加 pseudo-oncogenes 轉變成致癌基因 (oncogenes) 的機會。輻射線方面，如廣島、長崎的核爆倖存者，其白血病等癌症的發生率甚高，可知輻射線會增加癌症的發生率。至於化學致癌物方面，有(1).芳香胺類 (aromatic amines)；(2).煤煙中含多環芳香族碳氫化物 (polycyclic aromatic hydrocarbons)；(3).染料中的胺基偶氮類 (aminoazo dyes) 及亞硝基化合物 (nitroso compounds)；(4).精煉石油過程產生之烷基化劑 (alkylating agents)；(5).有機化合物 (organic compounds)；(6).無機化合物 (inorganic compounds)；(7).自然產物 (natural products)。

二、化學致癌物

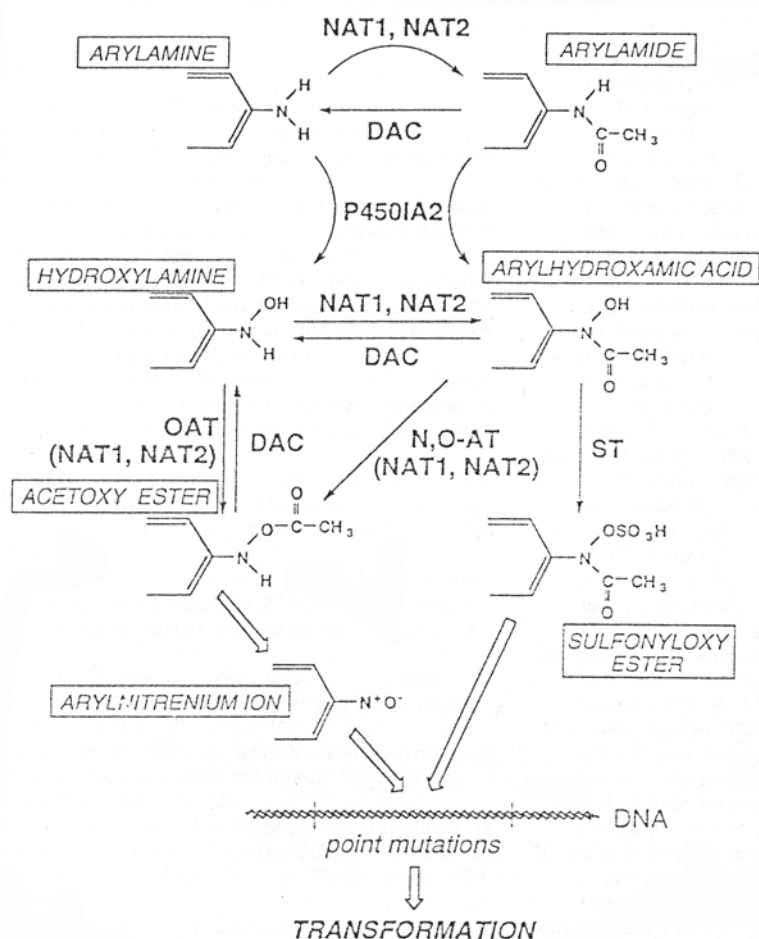
大部分會致癌的化學物質都具有親電性，很容易與細胞內富含電子的 DNA 結合，造成 DNA 扭曲變形，甚至形成 DNA 鍵結衍生物 (DNA adduct)，DNA 損傷不斷地增加，無法修復成正常而累積時，就會產生 DNA 突變，引起癌症的產生⁹，最後使正常細胞成為癌細胞。所以會引起癌症的化學物，就稱為化學致癌物。

三、*N*-乙醯轉移酶 (*N*-acetyltransferase, NAT)

N-乙醯轉移酶 (*N*-acetyltransferase, NAT) 廣泛地存在於平常食用的蔬菜和水果⁴⁹、微生物中的黴菌 (白色念珠菌)⁵⁰、沙門氏菌⁵¹、寄生蟲⁵²、兩棲類的青蛙及魚類的吳郭魚^{53,54}，也存在於許多不同種哺乳類動物的各種組織：包括豬、兔子、天竺鼠、小鼠、大鼠、人類的各種組織中^{30,55-59}；人類消化系統中的大腸桿菌和幽門螺旋桿菌⁵⁶⁻⁵⁸；以及人類膀胱癌細胞株和大腸癌細胞株中⁶³。

在人類體內的 NAT 之分子量為 34KDa，基本作用是代謝乙醯化外

來的藥物及化合物，以及內生性的生化合成和去活性的功能⁶⁴，也使化學致癌物質代謝的第一道關卡。接著再由體內其他酵素（如：cytochrome P450、glutathione S-transferase）進一步代謝成具有活性之致癌物而導致標的器官組織癌症的產生⁶⁵⁻⁶⁷。而且目前已有許多研究報告指出，NAT和芳香胺類化合物的致癌性有極大相關性。如果NAT活性提高，同時又接觸芳香胺類化合物及抽煙，則會大大增加罹患癌症產生的機率^{10,25,66-70}。

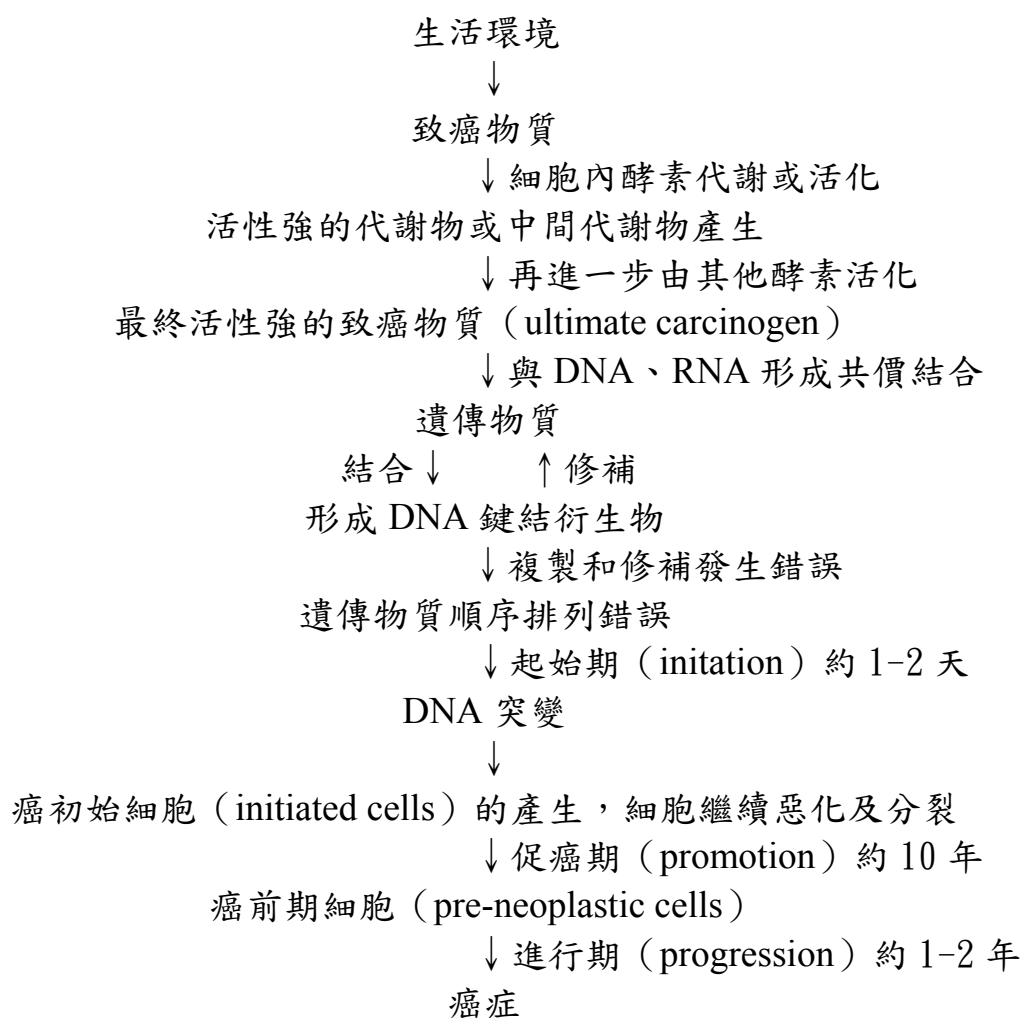


控制人類NAT的基因位在第8對染色體的8p22上，包含NAT1、NAT2和假基因NATP Locus的genotypes^{10,71}。此外，依NAT對藥物（dapsone、isoniazid、sulfamethazine）和caffeine乙醃化的速度又可分為快速乙醃者及慢速乙醃者¹⁵。而其活性快慢分別⁷²，主要取決於NAT2對受質的催化速率⁷³⁻⁷⁵，AF是NAT1和NAT2的共同受質；而PABA則是的NAT1受質。NAT1在許多組織中均有，包括肝臟、膀胱及大腸，主要功能是參與NAT和O-acetylyransferase的活性，與快速乙醃化有關。NAT2的活性在肝臟及小腸組織中，與慢速乙醃化有關。另外，因為AF才是致癌物受質，而PABA為非致癌物。因而本論文研究大部份採用AF作為受質。同時也進一步了解致癌物AF和非致癌物PABA被NAT乙醃化的量是否不同。結果顯示芳香胺類致癌物AF和非致癌物

PABA被NAT乙醯化的量並沒有明顯的不同，因NAT對含有amino、hydroxyl及sulhydroxyl group化合物的作用為非選擇性的乙醯化，將這些外來物質代謝以去活性。

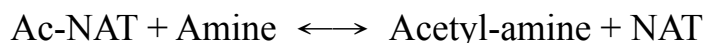
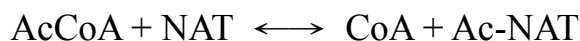
四、 NAT 與癌症的關係

動物所接觸的化學致癌物，大部分本身活性低，不易與細胞內的DNA 結合，需經酵素代謝後，才變成親電性強的活性化學致癌物，再與DNA 結合，形成DNA 鍵結衍生物。當DNA 複製時，導致基因突變，再經過癌症發生的三個時期，第一為起始期：導致DNA 產生突變，癌初始細胞（initiated cells）的產生；第二為促癌期：造成細胞加速分裂，形成癌前期細胞；及第三為進行期：腫瘤的形成，引發癌症的產生⁹。其過程如下：

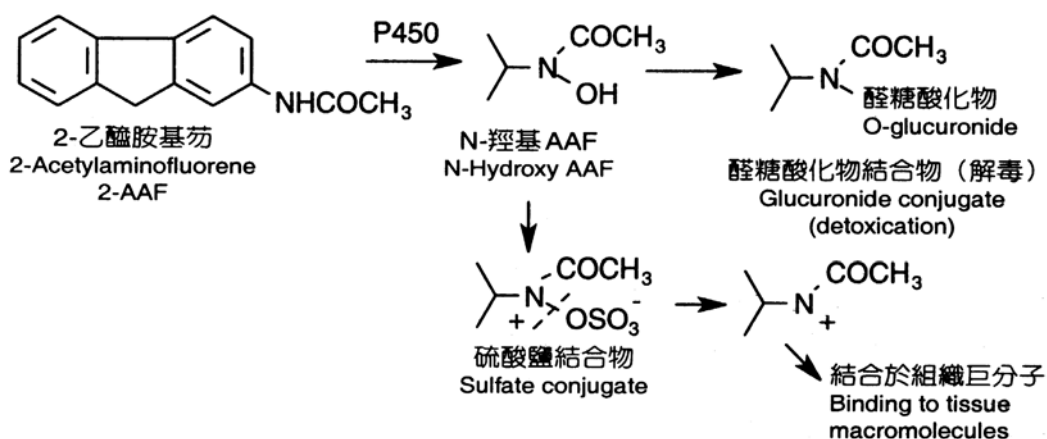


化學致癌物的致癌過程^{1-3,76}

NAT 在體內的的主要作用，除了能代謝外來的藥物及化合物外，另有內生性的生化合成及去活性作用，NAT 是利用乙醯輔酶(Aacetyl CoA) 上的乙醯基，將乙醯基轉移至受質 (AF) 的 NH₂ (amino)、hydroxyl、sulhydroxyl 基上：



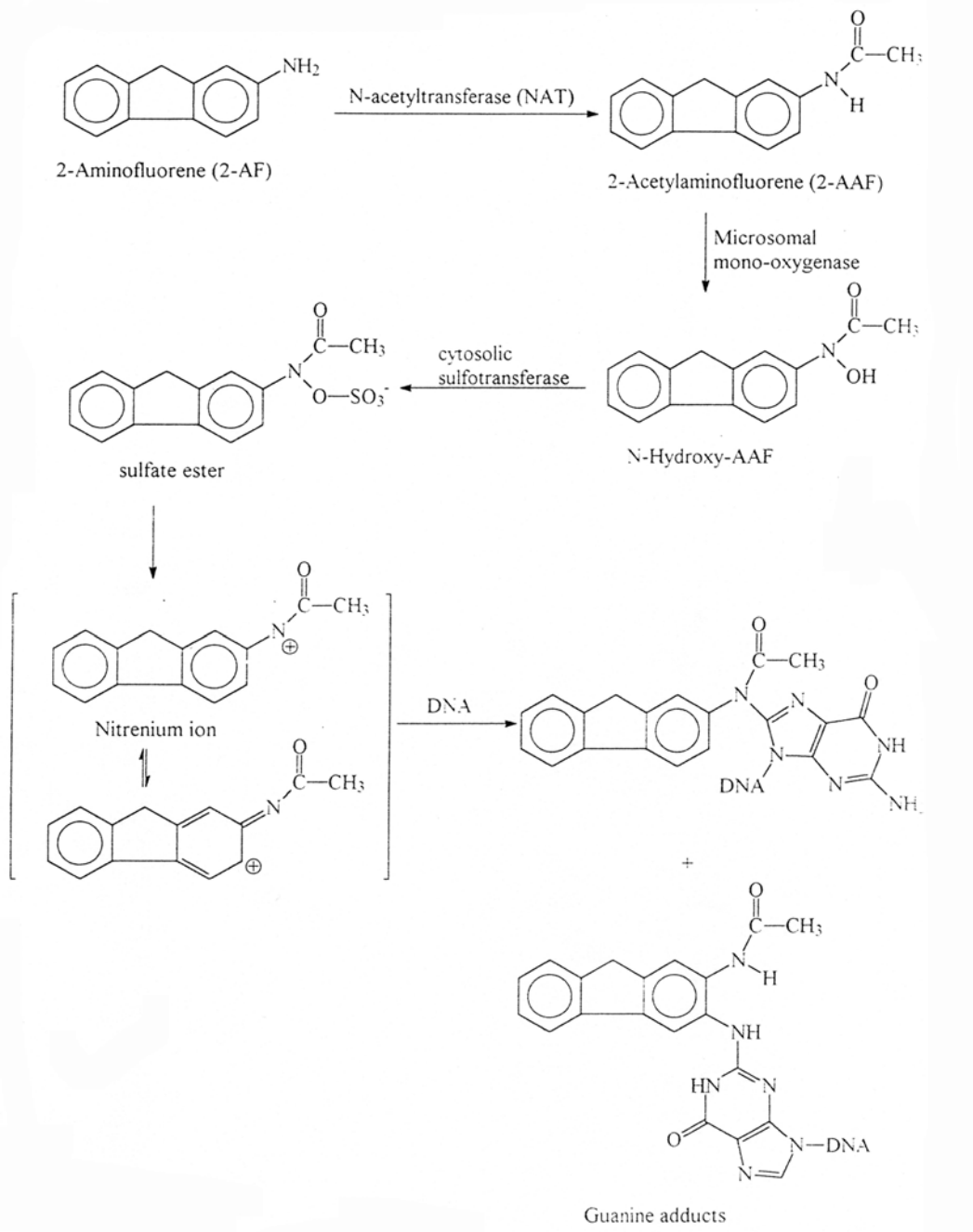
即 AF 必須先在動物體內受 NAT 的乙醯化後，接著再由細胞內的其他酵素的如 cytochrome P450、sulfotransferase 等進一步的代謝，變成最終活性強的代謝產物—終極致癌物，與標的器官細胞內的 DNA 之 guanine 結合，形成 DNA 鍵結衍生物，最後造成標的器官的致癌化¹¹⁻¹³。其過程如下：



2-乙醯胺基芴之生物活性

化學致癌物質中的 AF 常在肝臟、乳房上皮細胞、膀胱、胎盤和白血球中被發現¹¹，其代謝產物 (metabolite) 已知有：2-acetylaminofluorene (AAF)、2-formylaminofluorene (FAF)、N-hydroxy-2-aminofluorene⁷⁷、Nitroso-2-aminofluorene、2-nitrofluorene⁷⁸ 等，其乙醯化代謝物 AAF 之產生是藉胞質液(cytosol) 所含之 NAT⁷⁹ 把由乙醯輔酶 A 之乙醯基轉移到 AF 之 N-基上，而形成 AAF⁸⁰，再進一步與細胞內 DNA 相結合而形成 DNA 鍵結衍生物⁸¹，導致細胞複製 DNA 時引起錯誤而致細胞突變，進而引起癌症。AAF 與 DNA 鍵結衍生物誘導突變，其部位在哺乳動物細胞主要在 N-(deoxyguanosine-C8-yl)-2-AAF(dG-C8-AAF) 和 N-(deoxyguanosin-C8-yl)-2AAF(dG-C8-AAF)⁸²。研究証實，AAF 誘導肝細胞突變⁸³ 再致癌作用 (Hepatocarcinogenesis) 能被 NaNO₂ 增強⁸⁴；又如餵 AAF 予大鼠，其肝細胞中 apoptosis 現象增加⁸⁵。另外，

當 AF 給予兔子口服，*N*-formyl 鍵結衍生物從尿中可被分離出和被鑑定。由此可知在哺乳動物中，芳香胺（如 AF）之 *in vivo* 代謝作用。有 *N*-acetylation 和 *N*-formylation 兩種反應，即 AF 利用肝之 formamidase 把 *N*-formyl-L-Kynaurenine 之 formyl 基經 *N*-formylated 轉移予 AF 而形成 2-formylaminofluorene (FAF) ⁸⁶。



化學致癌物的致癌過程中 AF 被 NAT 的 *N*-乙醯化後再藉由其他酵素的活化

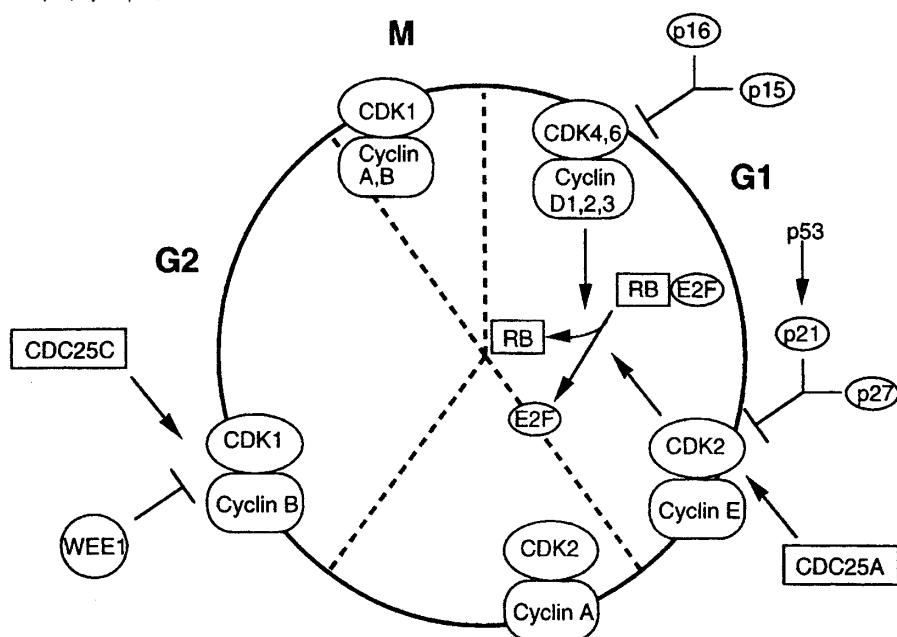
前已述及 AF 轉變成 AAF，需靠 NAT。在人類，依 NAT 之乙醯化活性的速度，可將個體分為快的乙醯轉移者 (NAT2) 和慢的乙醯轉移者 (NAT1)^{15,16}，由流行病學統計顯示，人經暴露到化學致癌物 (AF) 後，快乙醯轉移的個體，則易得大腸直腸癌¹⁷⁻¹⁹，但最近資料示出結腸癌和 NAT1、NAT2 均有關⁸⁷。另外 NAT2 和膀胱癌有關，而最近又証實，NAT1 和膀胱癌形成也有關係²⁰⁻²⁵。又人類乳癌，也和快或慢乙醯轉移者均有關²⁶，故 NAT 在人類各種癌症之形成佔有很重要之地位。有文獻報導，如提高肝中 NAT 的活性，將令暴露到芳香胺類化學致癌物質的個體，更易引發癌症²⁸，因此 NAT 受到外來藥物之抑制，將使此些致癌物質轉變為代謝物 (如 AAF) 減少，是否可相對地減少癌症的生成，為今日研究者追求之目標；降低此酵素的活性，也就是減少芳香胺類化學致癌物的乙醯化，是否可相對地減少癌症的發生，也是目前許多學者有興趣的探討方向；其中包括一些研究發現 paclitaxel 影響人類肺癌細胞的 NAT 基因表現⁸⁸，造成人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞週期停止和細胞凋亡的研究⁴⁰⁻⁴³，而 paclitaxel 也被發現對人類乳癌、胃癌、肝癌細胞株抗化學致癌的特性，這些都只侷限在體外試驗 (*in vitro*)。目前並沒有明確報告有關 paclitaxel 能否影響人類的骨癌細胞和血癌細胞之 NAT 的影響及生長的抑制和調節細胞週期相關基因的表現。換句話說，paclitaxel 對大自鼠 *in vivo* 對 AF 的乙醯化、形成 DNA 鍵結衍生物及代謝的影響，更未有文獻報導。

第二節 細胞週期 (cell cycle)

細胞生長至特定階段時，就開始細胞分裂。細胞分裂後產生的新細胞，持續生長增大至該特定階段後，又平均地分裂成兩個遺傳性狀相同之子細胞。此種生長分裂週期，稱為細胞週期。細胞週期為細胞增殖的一種極為複雜之生物學現象，主要包括細胞生長、DNA 複製與細胞分裂三個組成部分。細胞週期可分為四個時期，各時期依其生化代謝特徵的不同，而共同組成一個細胞週期。在 G1 期中發生之生化反應，包括在早期合成所有種類之 RNA、結構蛋白質與酵素蛋白質等，在 G1 後期，則為合成與 DNA 複製有關之酵素。在 S 期時，主要進行 DNA 及相關組蛋白 (histone) 之合成。而 G2 期時，則主要為有絲分裂做準備，此時停止合成 DNA，繼續進行 RNA 及非組蛋白之合成，組成紡錘體之微管蛋白質及細胞膜結構之蛋白質。在 M 期時，細胞內染色體凝聚後分開，移向細胞兩端，形成兩個完整之細胞核，最後進行細胞分裂，結束 M 期。

然而，在 G1 期，哺乳動物除了進入 S 期外，部分細胞可能離開

細胞週期，進入靜止期，稱為 G0 期。另外，還有一些細胞朝向細胞分化之方向發展，使細胞之功能愈趨專一。真核細胞有一定的細胞週期，而該細胞的週期變化，將會影響細胞 DNA 之生成，細胞增生與生長滯留 (growth arrest) 或細胞凋亡等現象。當此等調控機制失去控制，細胞可能發生不正常之生長調節，未成熟就分裂與生理代謝，而導致癌症之發生⁸⁹。在正常情況下哺乳動物體內大部分之細胞處於非增殖狀態之休止期 (G0 期)，而只有在特定之生長因子之刺激下才進入 G1 期，因此細胞週期之長短乃決定於 G0 期之長短。此等生長因子透過與細胞表面特定之受體 (receptor) 結合後，引發細胞內特定之訊息傳遞路徑，而開始激活細胞週期素 (cyclin) 與細胞週期素依賴激酶 (cyclin dependent kinase, Cdk) 基因之表現而形成具有激酶活性之複合物，進而活化 S 期基因之表現，使細胞進入增殖週期。所有真核細胞之細胞週期調控乃包括一連串 Cdk 之活化—去活化作用，其中需要多種蛋白質進行磷酸化—去磷酸化之調節作用⁹⁰。在 Cdk 之活化過程中，Cdk 需先與週期素結合形成無活性之成熟促進因子 (maturation promotion factor, MPF) 複合體再經特定之 Cdk 進行磷酸化—去磷酸化作用使 MPF 複合體活化或去活化作用以決定細胞是否進入下一個週期。因此，正常細胞週期之進行與週期素之累積與分解，Cdk 之活化與否及 Cdk 抑制物 (Cdk inhibitor) 之存在與否有密切之關係。目前已發現哺乳動物細胞中之週期素包括週期素 A、B、C、D、E、F 及 H 等，而依據它們在細胞週期中調控階段之不同分別歸入 G1 與 M 期週期素；已發現之 Cdk 包括 Cdc2 (Cdk1)、Cdk2、Cdk3、Cdk4、Cdk5、Cdk6 與 Cdk7 (Cdk activating kinase, CAK)，而它們分別對哺乳動物細胞 G1/S 期和 G2/M 期的過渡進行調控如下圖所示⁹¹⁻⁹³：



Basic principle of the cell cycle. In different cell cycle phases various CDK/cyclin complexes exist and phosphorylate cellular substrates. The phosphorylation of RB by G1 CDK/cyclin complexes leads to the inactivation of RB with subsequent release of E2F family transcription factors required for transactivation of S phase genes. The activity of the CDK/cyclin complexes depends on several activating and inhibitory phosphorylations regulated by several associated phosphatases (such as CDC25A/C) and kinases (such as WEE1). The two CDK inhibitor families, which bind to several CDK/cyclin complexes with different affinities, are potent negative regulators, particularly in G1/S.

第三節 細胞死亡

外來化學致癌物質在細胞中代謝成活性更強的致癌物後，會與DNA結合而可能造成細胞死亡。細胞死亡過程可分為兩種形式：

一、細胞壞死 (necrosis)

又稱為意外性死亡 (accidental cell death)。因為細胞受到某些外界因素，如局部缺血、物理、化學或生物性因素等干擾或損傷，中斷了細胞正常代謝活動，而透過細胞內粒線體的感應器執行細胞死亡現象，使細胞急速性死亡。細胞壞死多因中毒、缺氧使粒線體功能低下，造成細胞膜上的鈉鉀幫浦功能障礙，導致膜通透性升高，細胞水腫，外形變得不規則。內質網高度擴張及染色質不規則移位現象，粒線體持續膨脹後破裂，接著細胞核腫脹，溶酶體膜崩解破裂，釋出酶類使細胞溶解，細胞內容物流出而細胞死亡。細胞壞死，通常會伴隨發炎反應的發生。

二、細胞凋亡 (apoptosis)

又稱為程式性細胞死亡 (programmed cell death)。根據Kerr、Wyllie及Currie所描述：為一種由基因控制，維持細胞內環境穩定的自主而有序的死亡。它與細胞壞死不同，細胞凋亡不是一種被動的過程，而是一種主動的過程；它涉及一系列基因的啟動、表達以及調控等作用，並非病理條件下自體損傷的現象，而是為了更好適應生存環境而主動採取的一種死亡過程。細胞凋亡的突出變化是內源性核酸內切酶 (endogenous endonuclease) 催化的細胞染色體DNA在核小體間的斷裂，形成大約180-200 bp整數倍的染色體DNA片段，即染色體DNA的片斷化 (DNA fragmentation)。發生細胞凋亡的細胞，細胞

膜發生皺縮 (shrinkage)、凹陷，染色質變得緻密 (condensation)，最後斷裂成碎片；繼而細胞膜將細胞質分割包圍，並包圍了細胞質的斷片，形成了多個膜結構完整的泡狀小體，就稱為凋亡小體 (apoptotic body)。細胞在發生凋亡過程中細胞質濃縮，細胞骨架蛋白被蛋白酶破壞。但粒線體、溶酶體等主要胞器的結構和功能則常維持到凋亡的晚期，內質網在早期還有合成蛋白質的功能，後來擴張成泡狀，與細胞膜接觸融合，形成胞質氣泡。細胞膜則始終保持完整，細胞內容物無溢出，因此不引起發炎反應。

所以，細胞凋亡是一種極特殊的、自然的細胞製造過程，主要由多種遺傳基因在導控，如 pro-apoptotic gene：p53、Bax、Bad、Bak，anti-apoptotic gene：Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w 等，細胞會按照自身設定的程序進行，直到細胞被吞噬，目的在保持細胞和組織的恆定。細胞凋亡具有4個重要外在特徵：(1) 細胞質皺縮，(2) 染色體濃縮，(3) DNA片斷化，(4) 凋亡小體的產生。它的特性是細胞膜不會破裂，細胞內容物不會流出，因此不會有發炎反應的產生。在細胞凋亡過程中，細胞內雙股DNA會內切酶 (caspase) 切斷，先形成約300 bp大小，再進一步裂解為約185 bp的核小體，最後形成凋亡小體，被吞噬細胞吞噬清除。而細胞凋亡在動物發育上有許多重要的功能，如形態改變、去掉不需要構造、控制細胞數目、去除不正常或失去功能或是有害的細胞以及產生分化細胞等。在偵測細胞死亡的實驗分析方法，包括：(1) 電泳分離技術：對凋亡細胞DNA的提取後，利用電泳分離技術，可以觀察到DNA ladders梯狀圖譜，可了解DNA裂解程度。(2) Annexin V：細胞凋亡過程中，細胞膜內的phosphatidylserine (PS) 會移位到細胞膜外，Annexin V是一種Ca⁺² dependent phospholipid-binding protein，對PS有高度親和力。因此，可利用接有螢光的Annexin V偵測細胞凋亡存在與否。

三、細胞凋亡與腫瘤的發生及生長

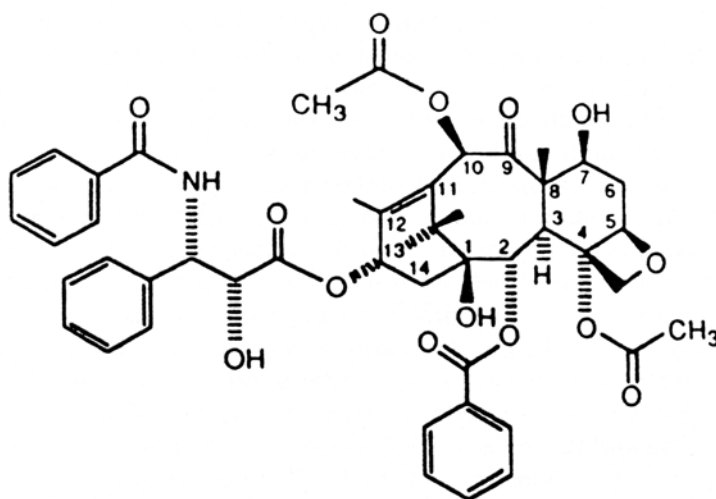
細胞有增殖、分化及凋亡三方面的特性。在維持正常組織的生長平衡過程中，細胞增殖、分化與凋亡三者相互協調，共同調節，而其中細胞凋亡對細胞衰亡與更新、保持細胞數目的恆定方面起著重要的作用。長期以來學者著重於腫瘤增殖活性和分化特徵方面的研究，並由於實驗方法和手段限制，腫瘤細胞死亡方面的研究則相對薄弱。然而越來越多的資料顯示，細胞凋亡與腫瘤有著密切關係。應該說，腫瘤不僅是增殖和分化異常的疾病，同時也是凋亡異常的疾病。目前腫瘤細胞凋亡研究已成為大家普遍關注在生命科學領域中的焦點。

細胞凋亡特性的改變影響腫瘤的發生，同樣也影響腫瘤的生長；

腫瘤組織除了具有增殖活性之外，還同時存在細胞凋亡。因此細胞凋亡同樣是腫瘤生長的重要影響因素。對於具有同等增殖能力的腫瘤而言，細胞凋亡率減少，將使腫瘤細胞淨生長率提高，預後更差。

第四節 太平洋紫杉醇：汰癌勝 (paclitaxel: taxol[®])

太平洋紫杉醇：汰癌勝 (paclitaxel: taxol[®]) 是一種紫杉 (taxane) 的成分，它可穩定細胞內的微小管 (microtubules)，造成分裂停止；因此目前被廣泛使用於卵巢癌、子宮癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、膀胱癌、黑色素瘤、Kaposi 氏肉瘤及愛滋病；但是卻有脊髓抑制作用，造成粒性細胞過少症 (granulocytopenia)、血小板減少症 (thrombocytopenia) 及貧血⁴⁴⁻⁴⁸。目前已發表很多篇有關癌細胞中 NAT 活性及一些藥物的研究^{13,25,30-39}和 paclitaxel 對人類肝癌細胞株的作用，初步結果顯示 paclitaxel 對人類肝癌細胞有影響，而且在動物模式研究上抗化學致癌的特性。另外，也有一些 paclitaxel 引起人類血癌細胞株的細胞週期停止和細胞凋亡的研究。



Paclitaxel 的構造

綜合上面其他學者的研究，可以看出目前並沒有明確報告有關 paclitaxel 能否影響人類的骨癌細胞和血癌細胞 NAT 的基因表現和活性以及 DNA-AF 鍵結衍生物的形成所造成的影響。除了一些 paclitaxel 引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞週期停止和細胞凋亡的研究之外，也很少 paclitaxel 對人類的骨癌細胞和血癌細胞的生長抑制和調節細胞週期相關基因的表現。因此，我們提出此一系列的研究，擬探討 paclitaxel 對以 AF 為受質之 NAT 活性和 NAT 的基因表現以及 DNA-AF 鍵結衍生物的形成所造成的之影響，進行生物體外 *in vitro* 試驗，進一步了解其作用機轉。並了解 paclitaxel

對人類的骨癌細胞株（U-2 OS）和血癌細胞株（HL-60）生長的抑制和調節細胞週期相關基因的表現。也探討 paclitaxel 在 Sprague-Dawley 大白鼠對 AF 的 N-基乙醯化及形成 DNA 鍵結衍生物的體內 *in vivo* 試驗，是否影響 AF 代謝，並進一步了解其作用機轉。

Brief History of Paclitaxel Development

YEAR	DEVELOPMENT
Early 1960s	Samples of <i>Taxus brevifolia</i> were collected from old growth forests in the Pacific Northwest. Preliminary screening of extract demonstrated activity.
1969-1971	The active component, paclitaxel, was isolated and the structure described.
1977	Accepted for clinical development by the NCI Division of Cancer Treatment.
1979	Unique mechanism of cytotoxicity was described.
1983	Phase I clinical trials began.
1985	Trials were suspended due to high incidence of hypersensitivity. They were resumed with infusional schedules and premedications.
1988-1989	Activity in refractory ovarian cancer demonstrated.
1991	Activity in metastatic breast cancer demonstrated.
1992	New Drug Application (NDA) filed with Food and Drug Administration. Paclitaxel approved for refractory ovarian cancer.
1993	Additional indication for refractory breast cancer approved. 3-hour infusion approved by PDA.
1994	Broad Phase II and III trials continue.

第三章 材料與方法

第一節 實驗儀器和試劑材料

一、實驗儀器

1. 高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) [Beckman] Bischoff C18 reversed phase column (Spherisorb 4.6 × 250 mm) (pump 168 and detector 126)

測定NAT活性的條件：

- A. 均以 1.2 ml/min 之流速，檢測 NAT 活性。
 - B. 以 2-AF 為受質之 solvent system 為 20 mM KH_2PO_4 (pH 4.5)/ CH_3CN (53 : 47)，其 wave length 用 280 nm，其 retention time : AAF 為 6.5 min ; AF 為 9.0 min 。
 - C. 以 PABA 為受質 solvent system 為 50 mM acetic acid/ CH_3CN (86 : 14)，其 wave length 用 266 nm，其 retention time : PABA 為 8.0 min ; N-Ac-PABA 為 11.0 min 。
 - D. 各產物之定量法，以其 elution peak 之區域積分與標準的 AF 和 AAF 及 PABA 和 N-Ac-PABA 量之比較。
2. 流式細胞計數儀 (flow cytometry : FACS) [Becton Dickinson]
 3. Gene Amp PCR 2400 [Perkin Elmer]
 4. RP 18 column [Bischoff]
 5. 高速離心機 [Hettich EBA 12R]
 6. 冷凍乾燥離心機 [Labconco]
 7. 倒立式位像差顯微鏡 [Nikon Ellipse TE300]
 8. 無菌操作台
 9. DNA 電泳槽 [Mupid-2]
 10. 直立式 DNA 電泳槽 [Gibco/BRL]
 11. Water bath (恆溫槽)
 12. 細胞培養箱 (CO_2 incubator) (Revco 3000 TVBA)
 13. Polytrone (PT 3000) : 組織勻質機

二、試劑材料

1. 化學試劑 (Chemicals and Reagents) :
 - A. Paclitaxel : Taxol[®] [Bristol Caribbean, Inc NJ, USA]
 - B. Acetonitrile, dimethyl sulfoxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA), ethanol, methanol, urea, ethylacetate, KH_2PO_4 , KCl, NaCl, Na_2HPO_4
[Merck Co, Darmstadt, Germany]

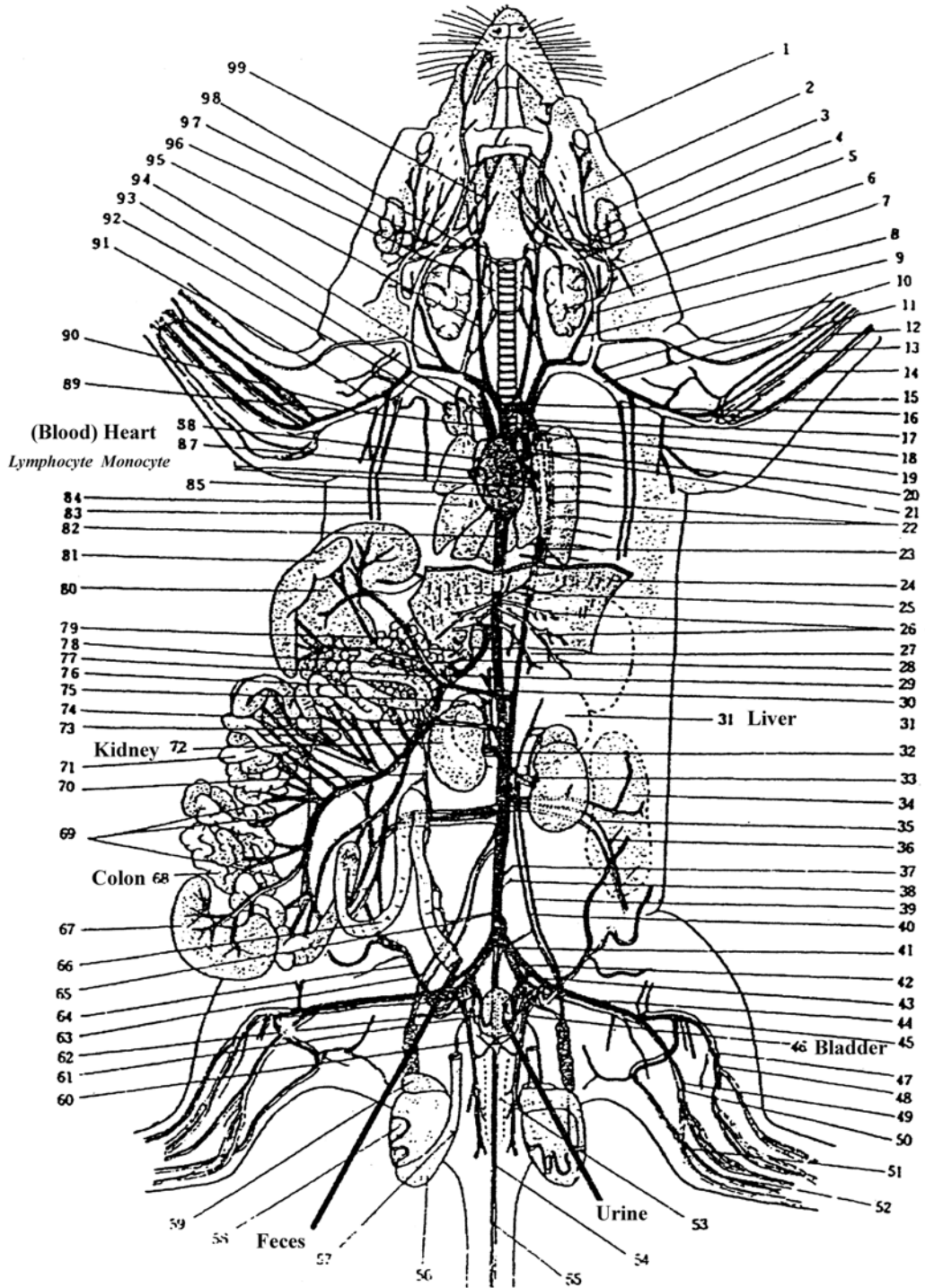
- C. 2-Aminofluorene (AF), *N*-acetyl-2-aminofluorene (AAF), *p*-aminobenzoic acid (PABA), *N*-acetyl-*p*-aminobenzoic acid (N-Ac-PABA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), flavone, apigenin, propidium iodide (PI), ethidium bromide, sodium azide, trypan blue, Triton-X 100, mineral oil, TEMED, Sigmacoat, ammonium persulfate, ileupeptin, Tris, acetylcarnitine, dithiothreitol (DTT), fetal bovine serum (FBS), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), micrococcal endonuclease, spleen exonuclease, acetyl-coenzyme A, carnitine acetyltransferase
[Sigma Chemical Co., St. Louis, MO]
- D. RPMI 1640 tissue culture medium and penicillin-streptomycin [Gibco BRL, Grand Island, NY]
- E. RNase A [CLONTECH]
- F. Rneasy Mini Kit [Qiagen]
- G. G-NOME DNA Kit [Bio101, Inc]
- H. Complete Freund's adjuvant and incomplete Freund's adjuvant PCR Kit, trypsin [Gibco Laboratories]
- I. 1-OH-AAF, 3-OH-AAH, 5-OH-AAF, 7-OH-AAF, 8-OH-AAF, 9-OH-AAF
[NCI Chemical Carcinogen Repository, USA]
2. Working Lysing Buffer Solution (冰上操作)
Working solution [pH 7.5, 4°C, Tris HCl 20 mM, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)]
20 ml; 加 50 μM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 20 μl; 加 10 μM leupeptin 20 μl。後兩者可維持酵素的活性。
3. Acetyl CoA recycling mixture
A. RCM: 50 mM Tris HCl (pH 7.5); 0.2 mM EDTA; 2 mM DTT; 15 mM acetylcarnitine。
B. Acetyl CoA recycling mixture: RCM + 2U/ml carnitine acetyltransferase, 加預定濃度之 AF 或 PABA。
4. 培養基: RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin 及 streptomycin), amino acid (L-glutamine) (購自 Gibco Laboratories, Grand Island, NY)。
5. 人類骨癌細胞株 (osteogenic sarcoma cell line, U-2 OS) 及血癌細胞株 (human leukemia cell line, HL-60), 皆為貼附性之細胞株, 由台灣新竹食品工業研究所提供。這些細胞培養於 75 cm² 的 tissue culture flask, 內含 RPMI 1640 培養基, 10% 胎牛血清及 2% penicillin (10,000 U/ml) 及 streptomycin (10

mg/ml)。

三、實驗動物

約180-200 gm重之Sprague-Dawley大白鼠，由國科會提供。
實驗期間SD大白鼠置於12小時亮、12小時暗的動物室籠中。

四、本實驗所用的SD大白鼠特殊器官或標本及其數目標示



如圖所示，將特殊器官如：肝臟（31）、腎臟（72）、胃、大腸（68）、膀胱（46）和自心臟（85、86、87、88）取得之血液及白血球（淋巴球、單核球）等標本，作有關NAT活性在生物體外及動物體內試驗。上述的器官及標本，又加上自代謝籠中取得之尿和糞便等標本，再做進一步分析AF在這些器官或標本之分佈情形。

第二節 實驗方法

本研究將實驗分為三大部分，第一部分是分別檢測 paclitaxel 抑制人類骨癌細胞株（U-2 OS）和血癌細胞株（HL-60）之 NAT 的活性和基因的表現以及 DNA-AF 鍵結衍生物的形成所造成的影響。第二部分是利用流式細胞計數儀分別分析 paclitaxel 引起人類骨癌細胞株（U-2 OS）和血癌細胞株（HL-60）的細胞凋亡是經由 caspase-3 的活化。第三部分則是 paclitaxel 在 Sprague-Dawley 大白鼠中影響 AF N-乙醯化和 DNA-AF 鍵結衍生物形成的量以及各個組織中影響化學致癌物 AF 的分佈和代謝。

人類骨癌細胞株（U-2 OS）、血癌細胞株（HL-60）分別放入 75cm² 培養瓶，5% CO₂，內含 PRMI 1640 培養基 + 10% 胎牛血清 + 2% penicillin-streptomycin (10,000U/ml penicillin & 10mg/ml streptomycin)

一、分別檢測 paclitaxel 抑制人類骨癌細胞株（U-2 OS）和血癌細胞株（HL-60）之 NAT 的活性和基因的表現以及 DNA-AF 鍵結衍生物的 formation 所造成的影響。

1、分別檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株（U-2 OS）和血癌細胞株（HL-60）中 NAT 活性及蛋白質和 DNA 鍵結衍生物的影響

分別各取 5×10⁷ cells 放入 24 well plate 中，再置於 37°C、5%CO₂ 培養箱 24 小時



分別加入不同濃度的 paclitaxel (以不加者為對照組)
同時也分別加入不同濃度的 AF 或 PABA



經過不同時間的培養後，再離心收集上層液



利用 ethylacetate/methanol(95:5) 萃取



放入冷凍乾燥機約一小時

乾燥後再加入 200 μ l methanol 混和均勻



取 20 μ l 打入高效液相層析儀 HPLC

分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質 AF 的量

分析乙醯化的 *N*-Ac-PABA 及未乙醯化的受質 PABA 的量

利用 Bradford (1976) 方法或利用抗體抗原以流式細胞計數儀分析

測出其蛋白質，並與對照組作比較



決定 NAT 酵素活性的影響

測出 DNA 鍵結衍生物



預期可得兩種實驗結果：

a. 不同濃度的 paclitaxel 對 NAT 活性及蛋白質和 DNA 鍵結衍生物的影響

→ Dose dependent effects

b. 不同培養時間的 paclitaxel 對 NAT 活性及蛋白質和 DNA 鍵結衍生物的影響

→ Time course effects

2、分別檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 中 NAT1 mRNA 表現的影響

分別各取 5×10^7 cells 放入 24 well plate 中，再置於 37°C、5%CO₂ 培養箱 24 小時



分別加入不同濃度的 paclitaxel (以不加者為對照組) 培養 24 小時



利用 Qiagen RNeasy Mini Kit 萃取全部的 RNA



反轉錄酶聚合酶連鎖反應

primers: B-MDIEA-NAT1,

5'-CACCCGGATCCGGGATCATGGACATTGAAGC-3'

nt 435-454, GenBank accession number X17059

VPKHGD-X-NAT1

5'-GGTCCTCGAGTCAATCACCATGTTTGGGCAC-3'

nt 1295-1278, GenBank accession number X17059

FP1-NAT2, 5'-CTAGTTCCTGGTTGCTGGCC-3'

nt 79-98, GenBank accession number NM-000015

RP1-NAT2, 5'-TAACGTGAGGGTAGAGAGGA-3'

nt 1073-1054, GenBank accession number NM-000015
Act b1, 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'
nt 94-114, GenBank accession number NM-001101
Act2 b2, 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'
nt 446-422, GenBank accession number NM-001101



NAT1 mRNA 的表現



預期可得實驗結果：

不同濃度的 paclitaxel 對 NAT1 mRNA 表現的影響

→ Dose dependent effects

二、利用流式細胞計數儀分別分析 paclitaxel 引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞凋亡是經由 caspase-3 的活化。

1、檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 是否有細胞毒性 (cytotoxicity) 的作用

分別各取 5×10^7 cells 放入 24 well plate 中
於 37°C、5% CO₂ 培養箱 24 小時



分別加入不同濃度的 paclitaxel (以不加者為對照組)



經過不同時間培養後，離心收集癌細胞



利用 trypan blue 染色，以顯微鏡檢測活的和死的癌細胞
(活細胞透明無色，死細胞呈淡藍色
因 trypan blue 會進入死細胞)



分別在顯微鏡下，以 400 倍放大
利用細胞計數皿計算死及活的細胞數目
以不加藥者為實驗對照組



最後利用 “活的細胞 / 原有的細胞數 = % viable cell”
計算 % viable cell



然後再利用不同濃度及不同培養時間的數據
統計計算及分析



預期的結果將可得到：

- a. 不同濃度的 paclitaxel 所引起的細胞毒性
→ Dose dependent effects
- b. 不同培養時間的 paclitaxel 所引起的細胞毒性
→ Time course effects

2、檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株(U-2 OS)和血癌細胞株(HL-60)細胞核破壞(chromosomal damage)和細胞形態(morphology)的影響

分別各取 5×10^7 cells 放入 24 well plate 中
再置於 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培養箱 24 小時



分別加入不同濃度的 paclitaxel (以不加者為對照組)



經過不同時間的培養後，收集癌細胞(離心)



利用 Gimesa stain 染色細胞核
直接由顯微鏡檢查照相細胞形態



經由顯微鏡鏡檢照相，檢查癌細胞染色體破壞
和細胞形態影響的情形



與對照組作比較



預期可得兩種實驗結果：

- a. 不同濃度的 paclitaxel 對染色體和形態的破壞
→ Dose dependent effects
- b. 不同培養時間的 paclitaxel 對染色體和形態的破壞
→ Time course effects

3、檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株(U-2 OS)和血癌細胞株(HL-60)細胞週期(cell cycle)的影響

分別各取 5×10^7 cells 放入 24 well plate 中
再移入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培養箱 24 小時



分別加入不同濃度的 paclitaxel(以不加藥者為對照組)

↓
經過不同時間的培養後，收集癌細胞(離心)

↓
利用 propidium iodide 染色 30 分鐘

↓
放入流式細胞計數儀分析細胞週期 DNA 的變化
可得 G0/G1, G2, S & M phase DNA 含量的變化

↓
以電腦分析 DNA S phase 的百分比

↓
可得知 paclitaxel 是否會影響細胞週期及 DNA 含量的變化
並與對照組作比較

↓
預期可得兩種實驗結果：

- a. 不同濃度的 paclitaxel 對細胞週期 DNA 量的影響
→ Dose dependent effects
- b. 不同培養時間的 paclitaxel 對細胞週期 DNA 量的影響
→ Time course effects

4、檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株(U-2 OS)和血癌細胞株(HL-60) caspase-3 影響的情形

分別各取 5×10^7 cells 放入 6 well plate 中
再移入 37°C、5%CO₂ 培養箱 24 小時

↓
分別加入不同濃度的 paclitaxel (以不加者為對照組)

↓
加入與不加入 caspase-3 的抑制劑 z-VAD-FMK
經過不同時間的培養後，離心收集癌細胞

↓
利用西方點墨試驗檢測 caspase-3 的活性
利用流式細胞計數儀檢測細胞凋亡的百分比

↓
預期兩種實驗結果可得：

- a. 不同濃度的 paclitaxel 所引起的 caspase-3 活性和細胞凋亡
→ Dose dependent effects
- b. 不同培養時間的 paclitaxel 所引起的 caspase-3 活性和細胞凋亡
→ Time course effects

三、 Paclitaxel 在 Sprague-Dawley 大白鼠中影響 AF N-乙醯化和 DNA-AF 鍵結衍生物形成的量以及各個組織中影響化學致癌物 AF 的分佈和代謝。

約 12 周大、180-200 g 的 SD 大白鼠 12 隻，分為二組，每組 6 隻



第一組灌以 DMSO/1cc/隻，第二組灌以 paclitaxel (50 mg/ml) /1cc/隻，經 48 hrs 全部再給予 AF



rat 放回代謝籠，收集 52 hrs urine and stool；同時收集每隻大白鼠 5、10、15、30、60、90、120、150 和 300 分鐘的鎖骨下靜脈血



再殺死大白鼠且分別取 Blood, Bladder, Liver, Lung, Colon

1、檢測 paclitaxel 在 *in vivo* 對 AF 的 N-基乙醯化之影響

(1)Urine:

urine 2 ml + 4 ml 萃取液(ethylacetate : methanol = 95 : 5)



vortex 1-2 min，靜置 20 分後，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 eppendorf，乾燥



加 50 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作測定

分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質的量

利用 Bradford (1976) 方法測出其蛋白質，並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響

(2)Stool:

取 1 gm 搗碎 + 4 ml 萃取液



vortex 1-2 min，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 eppendorf，乾燥



加 100 μ l methanol
↓
取 20 μ l 打入 HPLC 作測定
分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質的量
利用 Bradford (1976) 方法測出其蛋白質，並與對照組比較
↓
決定 NAT 酵素活性的影響

(3)Blood(鎖骨下靜脈血):

取 1 ml Blood + 2 ml 萃取液
↓
vortex 1-2 min，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min
↓
取上清液放入 eppendorf，乾燥
↓
加 100 μ l methanol
↓
取 20 μ l 打入 HPLC 作測定
分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質的量
利用 Bradford (1976) 方法測出其蛋白質，並與對照組比較
↓
決定 NAT 酵素活性的影響

(4)Liver:

取 2 gm Liver + 4 ml 萃取液 + 2 ml Lysing buffer
↓
polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min
↓
取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥
↓
加 75 μ l methanol
↓
取 20 μ l 打入 HPLC 作測定
分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質的量
利用 Bradford (1976) 方法測出其蛋白質，並與對照組比較
↓
決定 NAT 酵素活性的影響

(5)Lung:

取 2 gm Lung + 4 ml 萃取液 + 2 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 75 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作測定

分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質的量

利用 Bradford (1976) 方法測出其蛋白質，並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響

(6)Colon:

取一段 Colon + 4 ml 萃取液 + 2 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 75 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作測定

分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質的量

利用 Bradford (1976) 方法測出其蛋白質，並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響

(7)Bladder:

取 1 個 Bladder + 2 ml 萃取液 + 1 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 50 μ l methanol

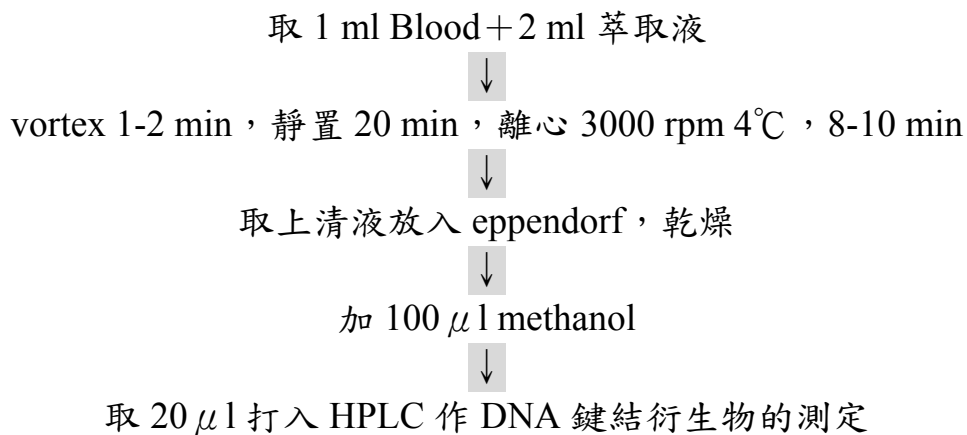


預期可得實驗結果：

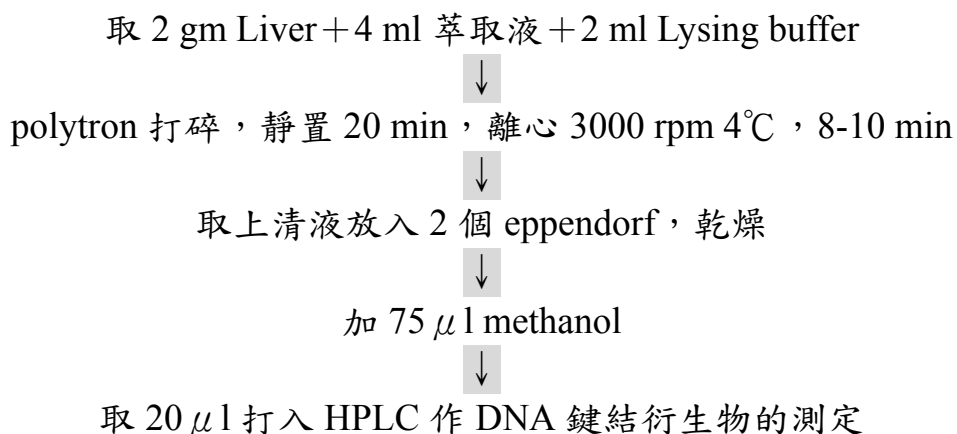
- a. 不同器官和代謝物及血中的 paclitaxel 對 NAT 活性的影響
→ Organ dependent effects
- b. 不同時間血中的 paclitaxel 對 NAT 活性的影響
→ Time course effects

2、檢測 paclitaxel 在 *in vivo* 對 AF 形成的 DNA 鍵結衍生物之影響

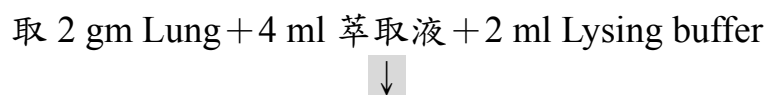
(1) Blood:



(2) Liver:



(3) Lung:



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 75 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作 DNA 鍵結衍生物的測定

(4)Bladder:

取 1 個 Bladder + 2 ml 萃取液 + 1 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 50 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作 DNA 鍵結衍生物的測定

(5)Colon:

取一段 Colon + 4 ml 萃取液 + 2 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 75 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作 DNA 鍵結衍生物的測定



預期可得實驗結果：

不同器官的 paclitaxel 在 *in vivo* 形成 AF 的 DNA 鍵結衍生物之影響

→ Organ dependent effects

3、檢測 paclitaxel 對人類血癌細胞 *in vitro* intact cell 中 NAT 對 AF 代謝影響

人類血癌細胞株(Human leukemia cell HL-60)放入 75cm² 培養瓶
內含 RPMI1640 培養基 + 15%胎牛血清(Fetal bovine serum) +

2%penicillin-streptomycin(10,000U/ml penicillin, 10mg/ml streptomycin)



培養於 37°C 5% CO₂ 培養箱
血癌細胞大量增生



各取 5×10⁵ cells 放入 24 well plate 中，37°C 5% CO₂ 培養箱 24 hrs



各加入不同濃度的 2-AF



分別加入不同濃度(3.2M, 0.32M, 0.032mM 3.2mM, 0.32mM, 0.032mM)的 paclitaxel(以不加者為對照組)



經過不同時間(6hrs, 12hrs, 18hrs, 24hrs)的培養



吸取培養液，ethylacetate/methanol(95:5)萃取



混合均勻，待分層，吸取上清液至 eppendorf tube



放入冷凍濃縮離心機、離心、乾燥



各 eppendorf tube 加入 50 μl methanol



取 20 μl 溶液注入高效液相層析儀(HPLC)

分析乙醯化的 AAF 及未乙醯化的受質的量，並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響



預期可得實驗結果：

- a. 不同濃度的 paclitaxel 對 NAT 活性的影響
→ Dose dependent effects
- b. 不同培養時間的 paclitaxel 對 NAT 活性的影響
→ Time course effects

4、檢測 paclitaxel 在 *in vivo* 對 AF 代謝及其代謝物之影響

約 180 g 的 SD 大白鼠 24 隻，分為四組·每組 6 隻



第一組灌以 DMSO/1cc · 第二組灌以 AF 60 mM/kg/1cc/隻 · 第三組灌以 paclitaxel+AF 60 mM/1cc/隻 · 第四組於 24 hrs 前先灌 paclitaxel，經 24 hrs 全部再給予 AF 60 mM



rat 放回代謝籠，收集 2 hrs urine and stool
取 Blood, Bladder, Liver, Colon, Kidneys, Stomach

(1)Urine:

urine 2 ml + 4 ml 萃取液(Ethylacetate : methanol = 95 : 5)



vortex 1-2 min，靜置 20 分後，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 eppendorf，乾燥



加 50 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作測定
分析乙醯化的 AAF 和它的代謝產物及未乙醯化的受質的量
並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響

(2)Stool:

取 1 gm 搗碎 + 4 ml 萃取液



vortex 1-2 min，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 eppendorf，乾燥



加 100 μ l methanol



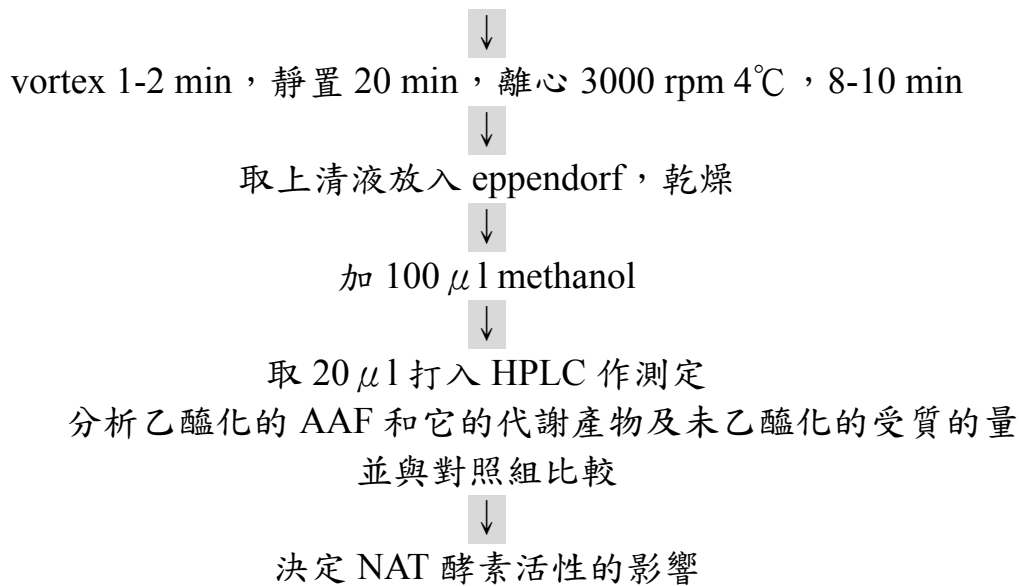
取 20 μ l 打入 HPLC 作測定
分析乙醯化的 AAF 和它的代謝產物及未乙醯化的受質的量
並與對照組比較



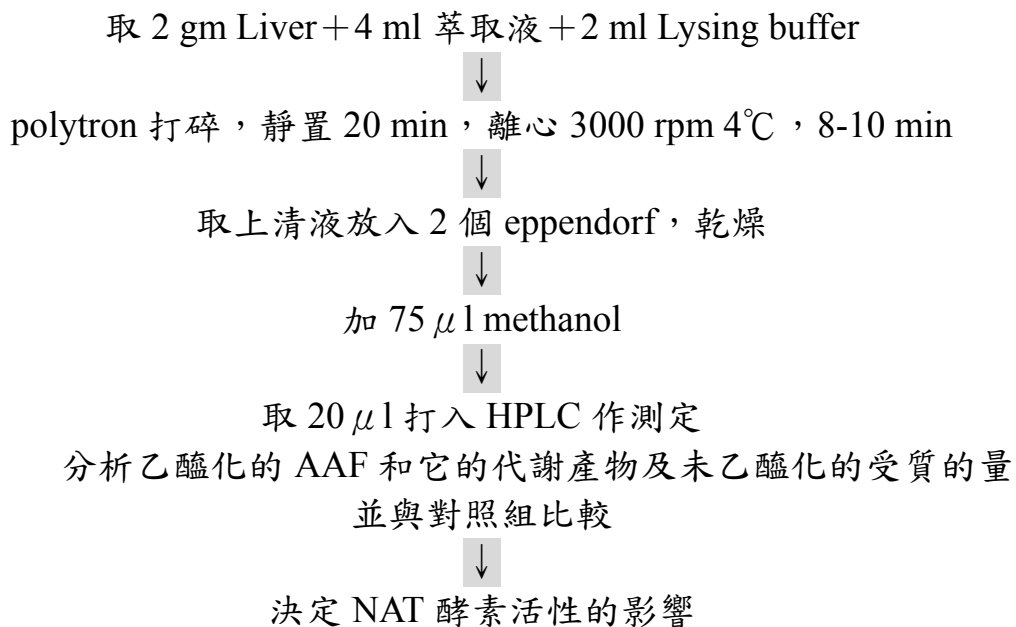
決定 NAT 酵素活性的影響

(3)Blood:

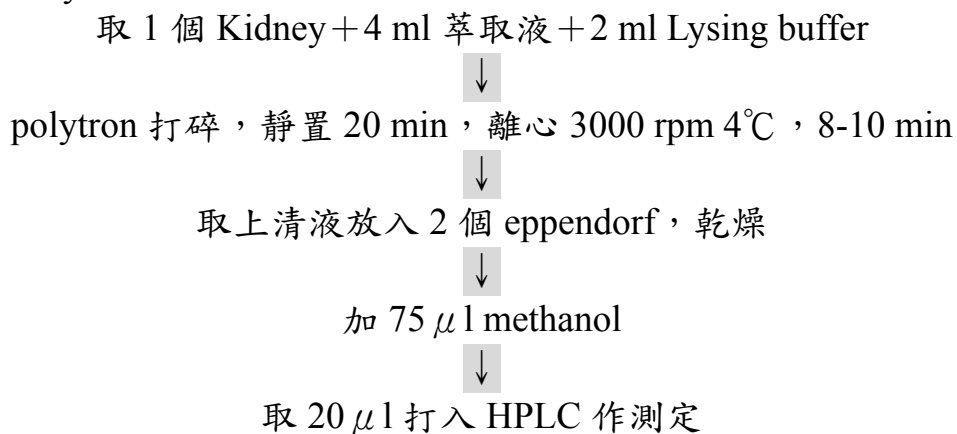
取 1 ml Blood + 2 ml 萃取液



(4)Liver:



(5)Kidney:



分析乙醯化的 AAF 和它的代謝產物及未乙醯化的受質的量
並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響

(6)Bladder:

取 1 個 Bladder + 2 ml 萃取液 + 1 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 50 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作測定

分析乙醯化的 AAF 和它的代謝產物及未乙醯化的受質的量
並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響

(7)Colon:

取一段 Colon + 4 ml 萃取液 + 2 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 75 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作測定

分析乙醯化的 AAF 和它的代謝產物及未乙醯化的受質的量
並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響

(8)Stomach:

取 1 個 Stomach(約 1.5 gm) + 4 ml 萃取液 + 2 ml Lysing buffer



polytron 打碎，靜置 20 min，離心 3000 rpm 4°C，8-10 min



取上清液放入 2 個 eppendorf，乾燥



加 75 μ l methanol



取 20 μ l 打入 HPLC 作測定

分析乙醯化的 AAF 和它的代謝產物及未乙醯化的受質的量
並與對照組比較



決定 NAT 酵素活性的影響



預期可得實驗結果：

不同器官的 paclitaxel 在 *in vivo* 對 AF 代謝及其代謝物之影響

→ Organ dependent effects

第四章 結果

第一節 以反轉錄酶聚合酶連鎖反應及流式細胞計數儀分析 paclitaxel 抑制人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 之 NAT 的活性和打因的表現

一、不同濃度的 paclitaxel 對 U-2 OS 細胞株的細胞液中 NAT 的活性之影響結果

表 1 顯示細胞液中的 NAT 活性隨著 paclitaxel 濃度的增加而降低。

二、50 μ M paclitaxel 對 U-2 OS 細胞株中不同濃度的 AF 和 PABA 的乙醯化之影響結果

NAT 的活性是將 AF 和 PABA (15, 30, 60, 100 μ M) 乙醯化，其偵測結果在圖 1A。在 50 μ M paclitaxel 時，乙醯化的 AF 和 PABA 被降低。

三、Paclitaxel 對完整 U-2 OS 細胞株中 AAF 和 N-Ac-PABA 的產生之影響結果

圖 1B 顯示 paclitaxel 確實降低 AAF 和 N-Ac-PABA 的產生。

四、在 U-2 OS 細胞株中 paclitaxel 對 NAT 的動力常數之影響結果

在有或無 50 μ M paclitaxel，特別濃度的 AF 和 PABA (0.373, 0.435, 0.543, 0.745, 1.102, 2.205 mM) 被用來決定和計算 U-2 OS 細胞的 NAT 動力常數。paclitaxel 對 U-2 OS 細胞中 Km 和 Vmax 值的影響結果，在表 2 和圖 2。明顯的，在檢測的完整 U-2 OS 細胞中 NAT 的 Km 和 Vmax 值皆被 paclitaxel 所降低。

五、在 U-2 OS 細胞株中 paclitaxel 對 NAT 蛋白的影響結果

NAT 蛋白是以 NAT 的抗體，來形成抗原-抗體複合物來偵測。而這 NAT-抗體複合物的百分比，是以流式細胞計數儀來計測。數據顯示 U-2 OS 細胞中 paclitaxel 則明顯降低 NAT-抗體複合物的百分比 (圖 3)。

六、在 U-2 OS 細胞株中 paclitaxel 對 NAT mRNA 的表現之影響結果

NAT1 mRNA 的表現受 paclitaxel 的影響，而且呈現跟劑量相關。圖 4 顯示 NAT1 mRNA 的表現，隨著 paclitaxel 的增加（低劑量 0.01-5 μ M 時，例外）而降低，但在這個實驗中偵測不到 NAT2。結果顯示 paclitaxel 能降低 U-2 OS 細胞株中 NAT1 mRNA 的表現，而且呈現跟劑量相關。

第二節 Paclitaxel 對人類血癌細胞株 (HL-60) 之 NAT 的基因表現和活性以及 DNA-AF 鍵結衍生物的形成所造成的影響

一、不同濃度的 paclitaxel 對 HL-60 細胞株的完整細胞之影響結果

在完整 HL-60 細胞的實驗中，AF 和 PABA 被加到細胞培養中而被吸收進入細胞。AF 和 PABA 在細胞內被乙醯化為 AAF 和 N-Ac-PABA，而被排出細胞外。而這些在細胞培養液中，未被乙醯化的 AF 和 PABA 以及乙醯化的 AAF 和 N-Ac-PABA，可以 HPLC 來偵測。表 3 顯示完整 HL-60 細胞中的 AAF 和 N-Ac-PABA 隨著 paclitaxel 濃度的增加而降低。

二、paclitaxel 對在 HL-60 細胞株的完整細胞中 paclitaxel 對 NAT 的時間過程之影響結果

圖 5 顯示培養時間越長，AAF 的產生越多。對 HL-60 細胞株而言，5 μ M paclitaxel 的存在，大約降低 AAF 34-52% 的量

三、在 HL-60 細胞株中 5 μ M paclitaxel 對 NAT 的動力常數之影響結果

在有或無 paclitaxel，特別濃度的 AF (0.087, 0.174, 0.348, 0.696, 1.392 mM) 被用來決定和計算 HL-60 細胞液中的 NAT 動力常數。明顯的，在檢測的 HL-60 細胞液中 NAT 的 Km 和 Vmax 值，都被 paclitaxel 所降低 (表 4 和圖 6)。

四、Pclitaxel 在 HL-60 細胞株中對 DNA-AF 鍵結衍生物之影響結果

研究顯示在所有檢測 AF 的劑量中 (30 和 90 μ M)，

paclitaxel 降低 DNA-AF 鍵結衍生物的產生 (圖 7)。

五、在 HL-60 細胞株中 paclitaxel 對 NAT mRNA 表現的劑量相關之影響結果

NAT1 mRNA 的表現，受不同濃度 paclitaxel 的影響，似乎呈現跟劑量相關 (圖 8)。圖 8 顯示 NAT1 mRNA 的表現，隨著 paclitaxel 的降低而增加，但在這個實驗中偵測不到 NAT2。然而，反轉錄酶聚合酶連鎖反應並非是一種定量的分析。所以，確實增加的量無法確定。結果只能說，paclitaxel 能影響 HL-60 細胞株中 NAT1 mRNA 的表現。

Table 1. Effects of paclitaxel on N-acetylation of AF in cytosols of human U-2 OS cells.

Paclitaxel treatment (μM)	Acetylated substrates (nmol/min/mg protein)	
	AAF	N-Ac-PABA
Control	3.01 \pm 0.22	2.20 \pm 0.18
0.01	3.06 \pm 0.19	2.22 \pm 0.16
0.1	3.14 \pm 0.24	2.26 \pm 0.17
1	2.80 \pm 0.18	2.01 \pm 0.14
5	2.56 \pm 0.12	1.70 \pm 0.12 ^{a,b,c}
10	2.19 \pm 0.15 ^{a,b,c,d}	1.51 \pm 0.11 ^{a,b,c,d}
25	1.87 \pm 0.10 ^{a,b,c,d,e}	1.32 \pm 0.09 ^{a,b,c,d}
50	1.04 \pm 0.09 ^{a,b,c,d,e,f,g}	0.87 \pm 0.06 ^{a,b,c,d,e,f}
F value	55.094*	41.927*

Note. Values are mean \pm SD of AF N-acetylation (nmol/min/mg protein); $n = 6$.

Anova analysis with Scheffe posteriori comparison was used. * $p < 0.001$.

^a Significantly different, $p < 0.05$, when compared to control.

^b Significantly different, $p < 0.05$, when compared to 0.01 μM .

^c Significantly different, $p < 0.05$, when compared to 0.1 μM .

^d Significantly different, $p < 0.05$, when compared to 1 μM .

^e Significantly different, $p < 0.05$, when compared to 5 μM .

^f Significantly different, $p < 0.05$, when compared to 10 μM .

^g Significantly different, $p < 0.05$, when compared to 25 μM .

Table 2. Kinetic data for acetylation of AF and PABA in human U-2 OS cells.

	AF		PABA	
	Km (mM)	Vmax (nmol/min/mg protein)	Km (mM)	Vmax (nmol/min/mg protein)
Control	2.50 ± 0.71	14.08 ± 2.25	4.54 ± 0.62	3.84 ± 0.62
Paclitaxel	^a 1.78 ± 0.43	^a 10.12 ± 1.04	^b 2.71 ± 0.46	^b 1.88 ± 0.24

Values are mean ± SD. *n* = 3.

The acetyl CoA and paclitaxel concentrations were 0.5 mM and 50 μM, and the kinetic constants were calculated from the modified HYPER program of Cleland (1967).

^a 50 μM paclitaxel and control differ with *p* < 0.05.

^b 50 μM paclitaxel and control differ with *p* < 0.01.

Table 3. Effects of paclitaxel on N-acetyltransferase activity in human HL-60 intact cells.

Paclitaxel	AAF	N-Ac-PABA
Control	6.09±0.67	5.87±0.60
0.01 μ M	4.87±0.54	4.56±0.46 ^a
0.1 μ M	3.35±0.42 ^{a,b}	3.04±0.31 ^{a,b}
1 μ M	2.89±0.35 ^{a,b}	2.16±0.19 ^{a,b}
5 μ M	2.28±0.27 ^{a,b}	1.74±0.15 ^{a,b,c}
10 μ M	1.83±0.16 ^{a,b,c}	1.40±0.12 ^{a,b,c}
25 μ M	1.37±0.12 ^{a,b,c,d}	0.90±0.09 ^{a,b,c,d}
50 μ M	0.38±0.06 ^{a,b,c,d,e,f}	0.24±0.06 ^{a,b,c,d,e,f}
F value	72.605*	116.026*

Note. Values are mean±SD of activity (nmol/10⁶ cells); *n* = 6.

Anova analysis with Scheffe posteriori comparison was used. **p* < 0.001.

^a Significantly different, at *p* level of 0.05, when compared to control.

^b Significantly different, at *p* level of 0.05, when compared to 0.01 μ M.

^c Significantly different, at *p* level of 0.05, when compared to 0.1 μ M.

^d Significantly different, at *p* level of 0.05, when compared to 1 μ M.

^e Significantly different, at *p* level of 0.05, when compared to 5 μ M.

^f Significantly different, at *p* level of 0.05, when compared to 10 μ M.

Table 4. Kinetic data for acetylation of substrates with or without paclitaxel cotreatment in human leukemia HL-60 cells.

	AF		PABA	
	Km (mM)	Vmax (nmol/min/mg protein)	Km (mM)	Vmax (nmol/min/mg protein)
Control	5.26±0.42	33.38±5.29	2.70±0.32	16.17±2.89
Paclitaxel	2.70±0.18 ^a	16.67±3.12 ^b	2.22±0.21	12.50±1.06 ^b

Note. Values are mean±S.D. $n = 3$. The Acetyl CoA and paclitaxel concentrations were 0.1 mM and 5 μ M, and the kinetic constants were calculated from the modified HYPER Program of Cleland (1967).

^a differs between 50 μ M paclitaxel and control. $P < 0.05$

^b differs between 50 μ M paclitaxel and control. $P < 0.05$

Fig. 1A

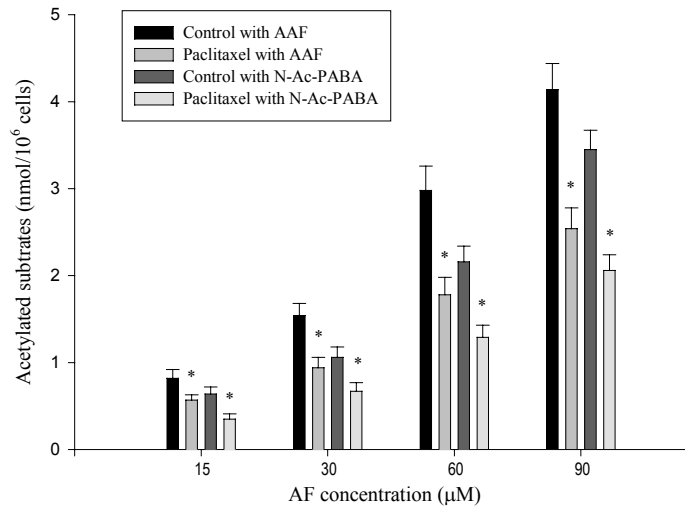


Fig. 1B

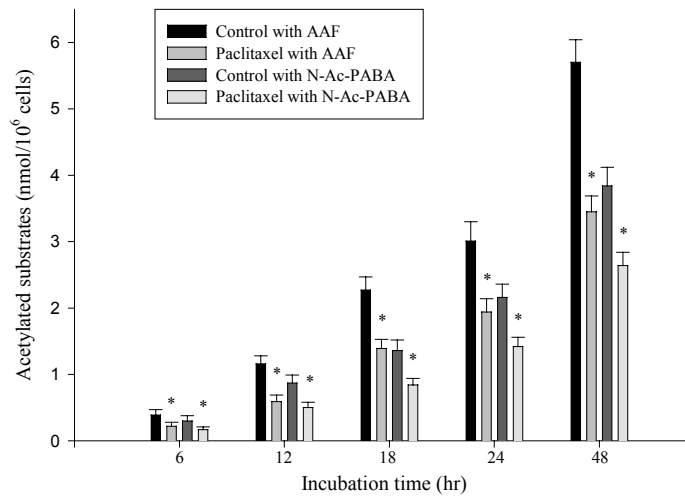


Figure 1. Effects of paclitaxel and incubation time on AAF and N-Ac-PABA production from various concentrations of AF and PABA by human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS). U-2 OS cells were incubated with AF and PABA at various concentrations (panel A) with 50 μM paclitaxel co-treatment for the 6, 12, 18, 24, and 48 hrs (panel B). AAF and N-Ac-PABA were measured by HPLC assay as described in "Materials and Methods". Each point represents the mean of triplicate assays of three incubations of cells. * mean differs between paclitaxel and control. $p < 0.05$.

Fig. 2A

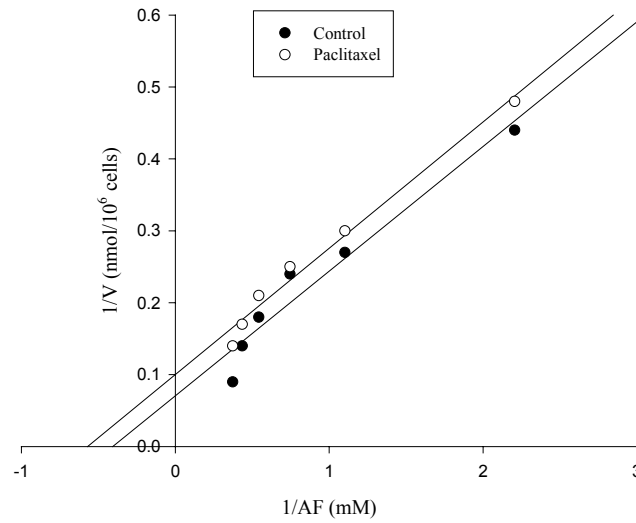


Fig. 2B

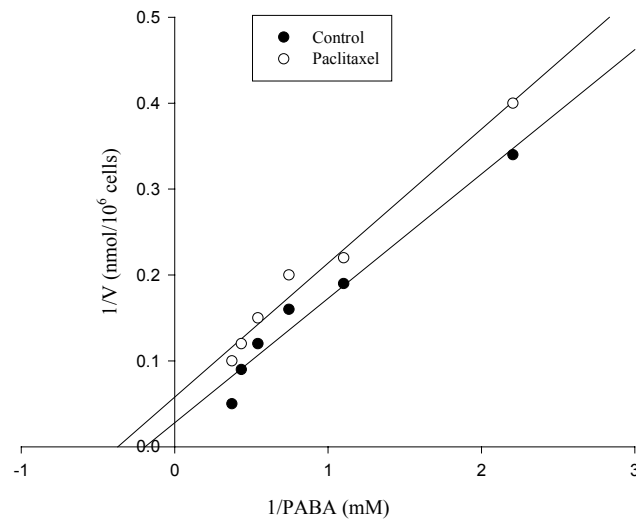


Figure 2. Lineweaver-Burk double reciprocal plot of the NAT activity in human osteogenic sarcoma cells cotreated with paclitaxel. U-2 OS cells mixtures containing 0.087, 0.174, 0.384, 0.696. and 1.392 mM AF (panel A) and PABA (panel B) with or without paclitaxel cotreatment were used for NAT activity determination. NAT activities were determined as described in "Materials and Methods". Lineweaver-Burk double reciprocal plots were measured by using linear regression analysis of reciprocal substrate concentrations plotted against reciprocal initial velocities.

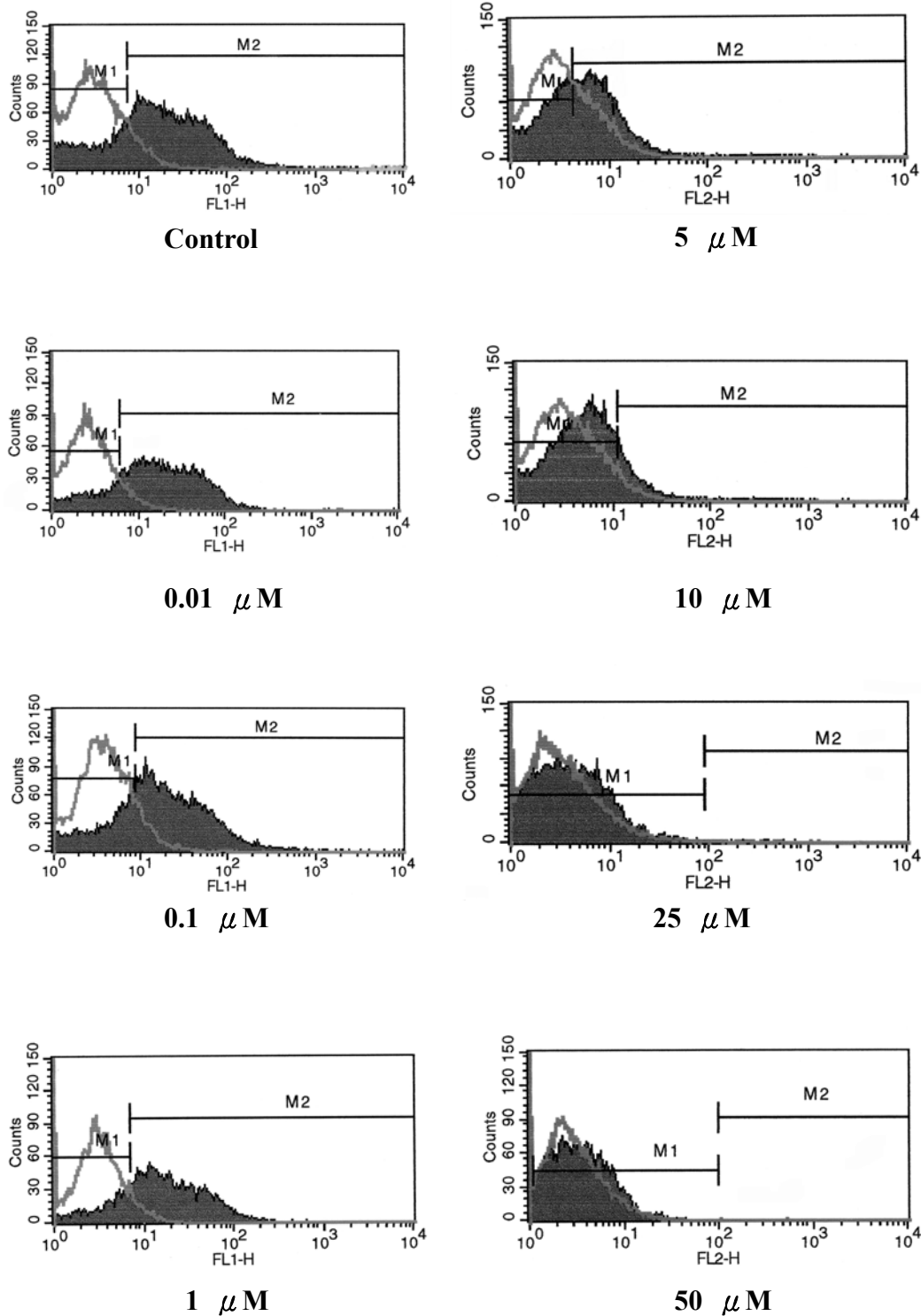


Figure 3. Effects of paclitaxel treatment on NAT expression in human osteogenic sarcoma cancer cell lines (U-2 OS). U-2 OS cancer cells (1×10^6 /ml) were treated with 25 μ M paclitaxel for 24 hours followed by evaluation of NAT expression. NAT expression is estimated by flow cytometry. Data were acquired and analyzed using flow cytometry. A detailed description is in Materials and Methods. A: colo 205; B: colo 320 DM; C: colo 320 HSR.

Fig. 4A

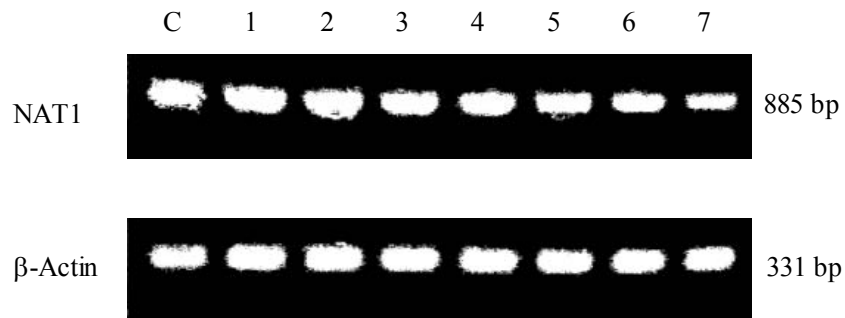


Fig. 4B

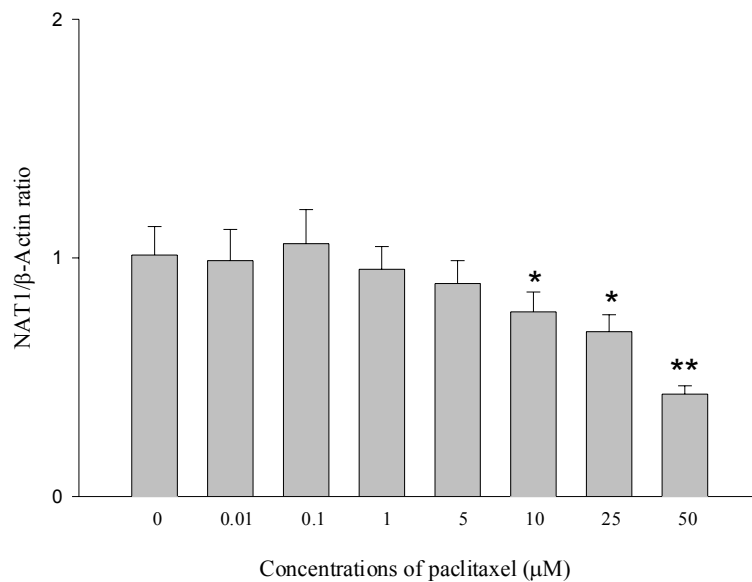


Figure 4. Dose-dependent effect of paclitaxel on expression of NAT mRNA in human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS). The cells were incubated with various concentrations of paclitaxel for 24 hrs. The cells were collected to extract total RNA. The extracted RNA was subjected to RT-PCR analysis using specific primers for NAT and β -actin, and then PCR-amplified cDNA derived from mRNA were applied to agarose gel-electrophoresis (panel A). The mRNA levels of NAT and β -actin on the gel-electrophoresis were quantified by densitometric analysis of Gel-photograph and expressed as NAT/ β -actin ratio (panel B).

Fig. 5A

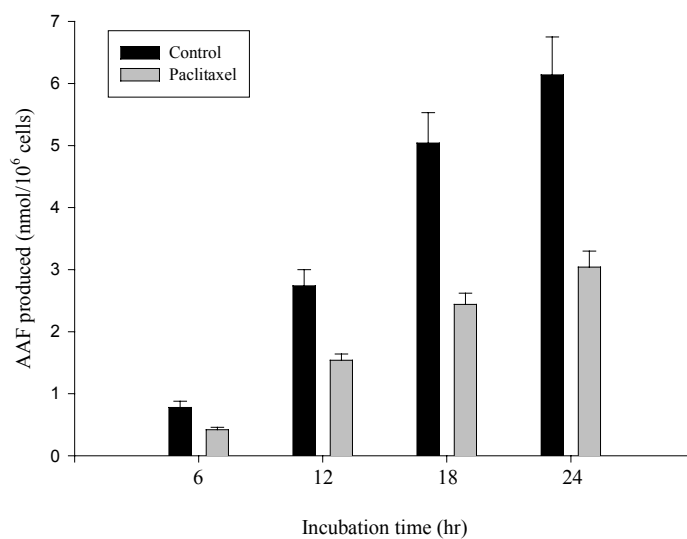


Fig. 5B

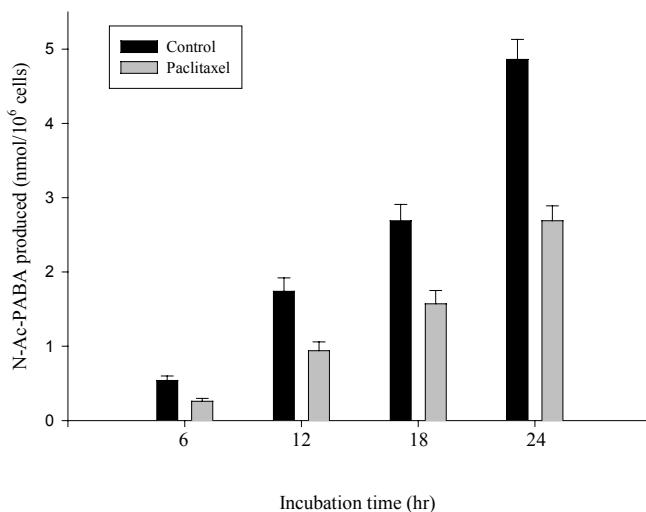


Figure 5. Effects of paclitaxel and incubation time on N-acetyl-2-aminofluorene (AAF) production in intact human leukemia HL-60 intact cells. Human leukemia HL-60 cells were incubated with 2-aminofluorene (AF) or *p*-aminobenzoic acid (PABA) at 22.5 μ M with or without paclitaxel (5 μ M) co-treatment for the times shown (6, 12, 18 and 24 h). AF and AAF (Panel 5A), PABA and N-Ac-PABA (Panel 5B) were measured by HPLC assay. Each point represents the mean of triplicate assays. Values are mean \pm S.D. (n=3). *Differ between 5 μ M paclitaxel and control, $p < 0.05$.

Fig. 6A

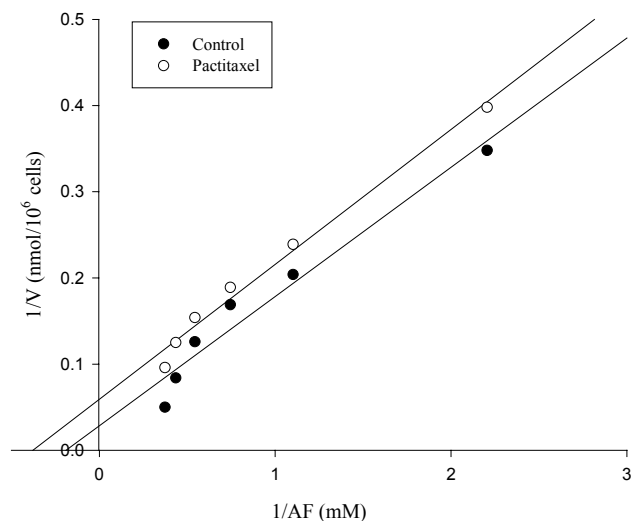


Fig. 6B

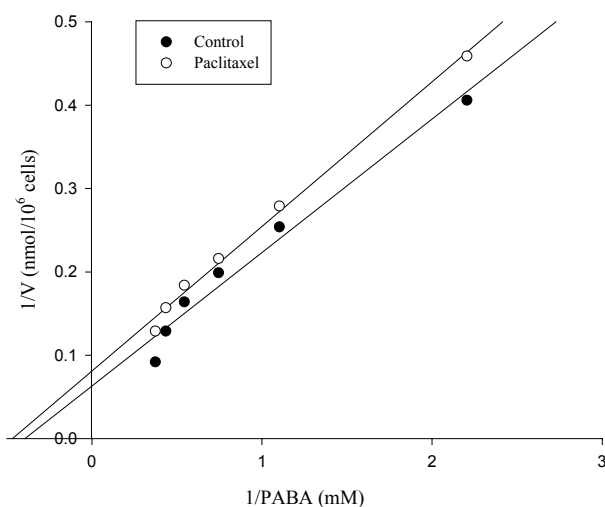


Figure 6. Lineweaver-Burk double reciprocal plot of NAT in human leukemia HL-60 cells co-treatment with or without 5 μ M paclitaxel. About 5×10^5 cells/ml containing 0.044, 0.088, 0.163, 0.303 and 0.709 mM AF were incubated for 18 h incubation. Then the amounts of AF and AAF (Panel 6A), PABA and N-Ac-PABA (Panel 6B) were determined as described in Materials and methods. Lineweaver-Burk double reciprocal plots were measured by using linear regression analysis of reciprocal substrate concentrations plotted against reciprocal initial velocities.

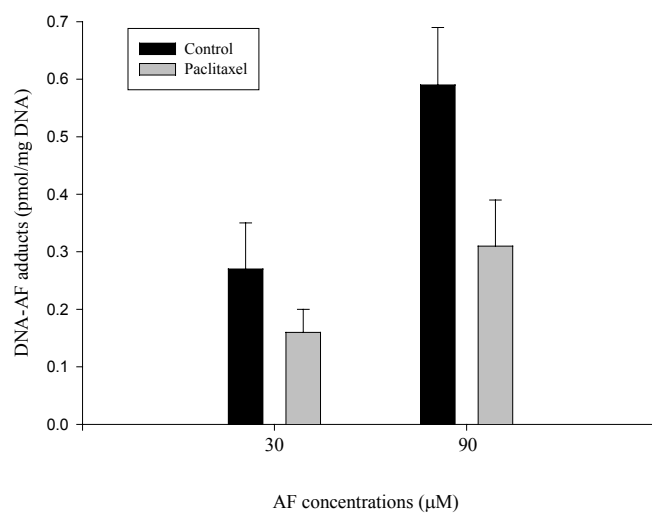


Figure 7. Effects of paclitaxel on DNA-AF adduct formation by intact human leukemia HL-60 cells. Following the 18 h incubation of human leukemia HL-60 cells with AF (30 and 90 μM) in the presence of paclitaxel (5 μM), cells were harvested and DNA was prepared, hydrolyzed to nucleotides, adducted nucleotides were extracted into butanol and analyzed by HPLC. Values are means \pm SD of six separate preparations. *Differ between 5 μM paclitaxel and control, $p < 0.05$.

Fig. 8A

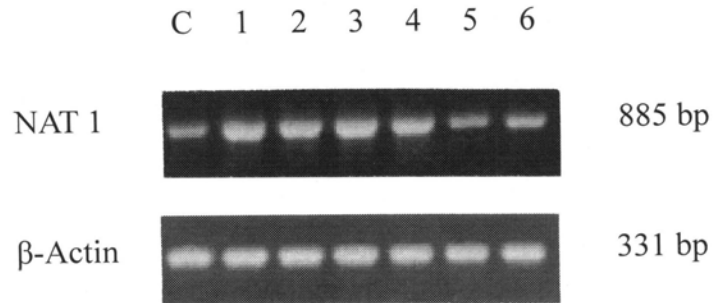


Fig. 8B

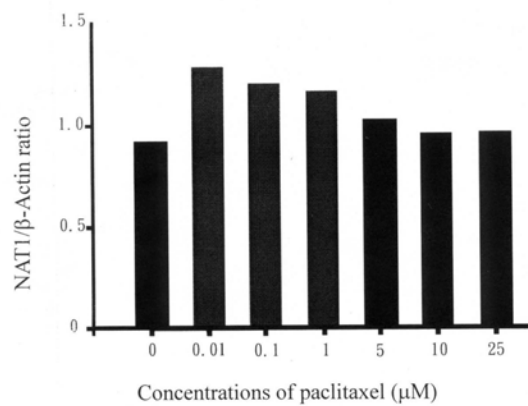


Figure 8. Dose-dependent effect of paclitaxel on the expression of NAT mRNA in human leukemia HL-60 cells. The cells were incubated with various concentrations of paclitaxel for 18 h. The cells were collected to extract RNA. The extracted RNA was subjected to RT-PCR analysis using specific primers for NAT and β -actin, and then PCR-amplified cDNA derived from mRNA were applied to agarose gel-electrophoresis (A). The mRNA levels of NAT and β -actin on the gel-electrophoresis were quantified by densitometric analysis of gel-photograph and expressed as NAT/ β -actin ratio (B). *Differ between 0.01 μ M paclitaxel and control, $p < 0.05$. *Differ between 0.1 μ M paclitaxel and control, $p < 0.05$. *Differ between 1 μ M paclitaxel and control, $p < 0.05$.

第三節 利用流式細胞計數儀分析paclitaxel引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 的細胞凋亡是經由caspase-3的活化。

一、檢測paclitaxel對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 細胞增生及細胞形態的影響

我們發現給于paclitaxel不同濃度培養之後，隨著藥物濃度的增加，U-2 OS細胞增生的抑制越明顯（如圖9）。因此，paclitaxel確實對人類骨癌細胞的增生方面有很明顯的抑制。而且當paclitaxel（5、25、50 μM ）濃度增加，U-2 OS細胞的細胞膜漸漸的脹大，而且懸浮在細胞培養液的細胞也增加，同時可清楚看見細胞碎片，細胞膜不像控制組的細胞膜平滑有立體感。

二、檢測paclitaxel對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 細胞週期的影響

培養至12-24小時，paclitaxel明顯使U-2 OS細胞週期停止在G2/M期，隨著時間的增加，停止於G2/M期細胞漸增，G0/G1和S期的細胞漸漸減少（如圖10）。

三、檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 細胞凋亡的影響

由圖 11 發現 25 μM paclitaxel 處理過的 U-2 OS 細胞，明顯比對照組發生細胞凋亡。而且 paclitaxel 的濃度越高，發生的凋亡的百分比越高。處理的時間越久，發生凋亡的百分比也越高（如圖 12 和圖 13）。

四、檢測 paclitaxel 對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) caspase-3 的影響

由西方點墨試驗發現在 U-2 OS 細胞中，caspase-3 隨著 paclitaxel 的濃度增加而增加（如圖 14）。

五、檢測加入 z-VAD-FMK 與否，paclitaxel 對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 細胞凋亡的影響

我們知道 z-VAD-FMK 是 caspase-3 的抑制劑，加入 z-VAD-FMK 比不加入 z-VAD-FMK 明顯減低 caspase-3 的活性（如圖 15），也看到降低 paclitaxel 引起 U-2 OS 的細胞凋亡（如圖 16）。

第四節 利用流式細胞計數儀分析 paclitaxel 引起人類血癌細胞株 (HL-60) 的細胞凋亡是經由 caspase-3 的活化。

一、檢測 paclitaxel 對人類血癌細胞株 (HL-60) 細胞增生及細胞形態的影響

我們發現給于 paclitaxel 不同濃度培養之後，隨著藥物濃度的增加，而 HL-60 細胞增生的抑制越明顯 (如圖 17)。因此，paclitaxel 確實對 HL-60 細胞的增生方面有很明顯的抑制。而且當 paclitaxel (5、25、50 μM) 濃度增加，HL-60 細胞的細胞膜漸漸的脹大而且懸浮在細胞培養液的細胞也增加，同時可清楚看見細胞碎片，細胞膜不像控制組的細胞膜平滑有立體感。

二、檢測 paclitaxel 對人類血癌細胞株 (HL-60) 細胞週期的影響

培養至 12-24 小時，paclitaxel 明顯使 HL-60 細胞週期停止在 G2/M 期，隨著時間的增加，停止於 G2/M 期細胞漸增，G0/G1 和 S 期的細胞漸漸減少 (如圖 18)。

三、檢測 paclitaxel 對人類血癌細胞株 (HL-60) 細胞凋亡的影響

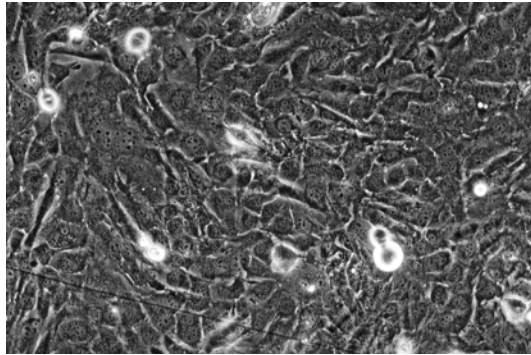
由圖 19 發現 25 μM paclitaxel 處理過的 HL-60 細胞，明顯比對照組發生細胞凋亡。而且 paclitaxel 的濃度越高，發生的凋亡的百分比越高。處理的時間越久，發生凋亡的百分比也越高 (如圖 20 和圖 21)。

四、檢測 paclitaxel 對人類血癌細胞株 (HL-60) caspase-3 的影響

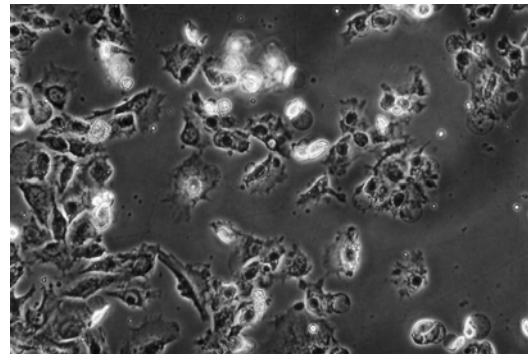
由西方點墨試驗發現在 HL-60 細胞中，caspase-3 隨著 paclitaxel 的濃度增加而增加 (如圖 22)。

五、檢測加入 z-VAD-FMK 與否，paclitaxel 對人類血癌細胞株 (HL-60) 細胞凋亡的影響

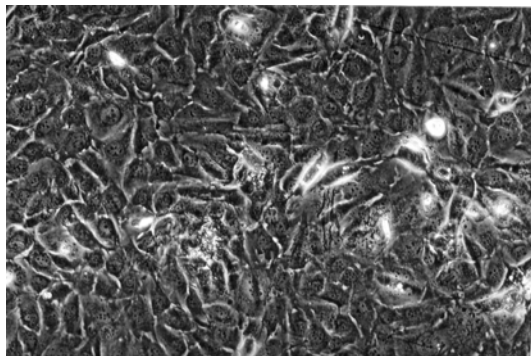
我們知道 z-VAD-FMK 是 caspase-3 的抑制劑，加入 z-VAD-FMK 比不加入 z-VAD-FMK 明顯減低 caspase-3 的活性 (如圖 23)，也看到降低 paclitaxel 引起的 HL-60 細胞凋亡 (如圖 24)。



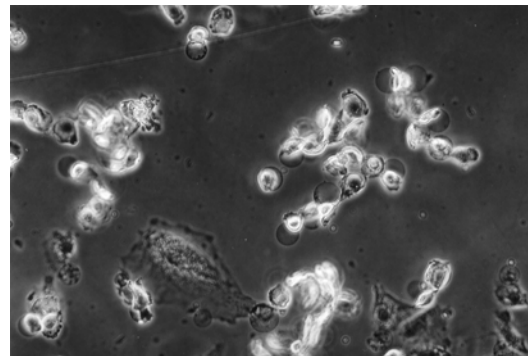
Control



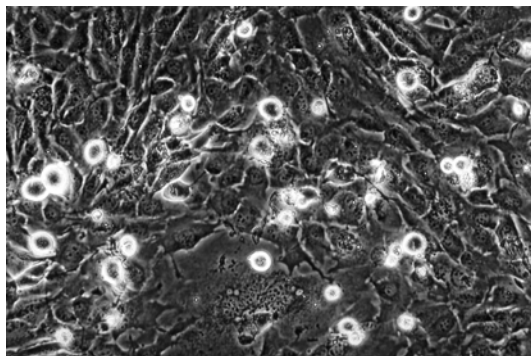
5 μ M



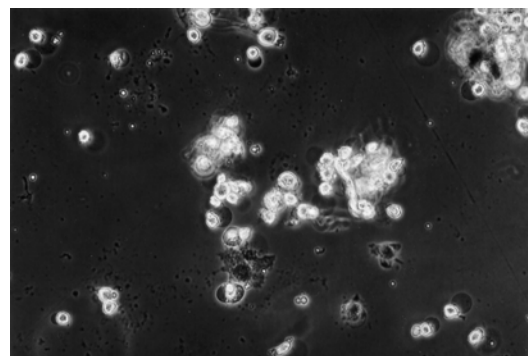
0.5 μ M



25 μ M



1 μ M



50 μ M

Figure 9. The morphology of human osteogenic sarcoma (U-2 OS) cells after exposure to the different doses of paclitaxel for 48 hrs then were examined and photographed by phase microscope (200×). Control, 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 25 μ M, and 50 μ M.

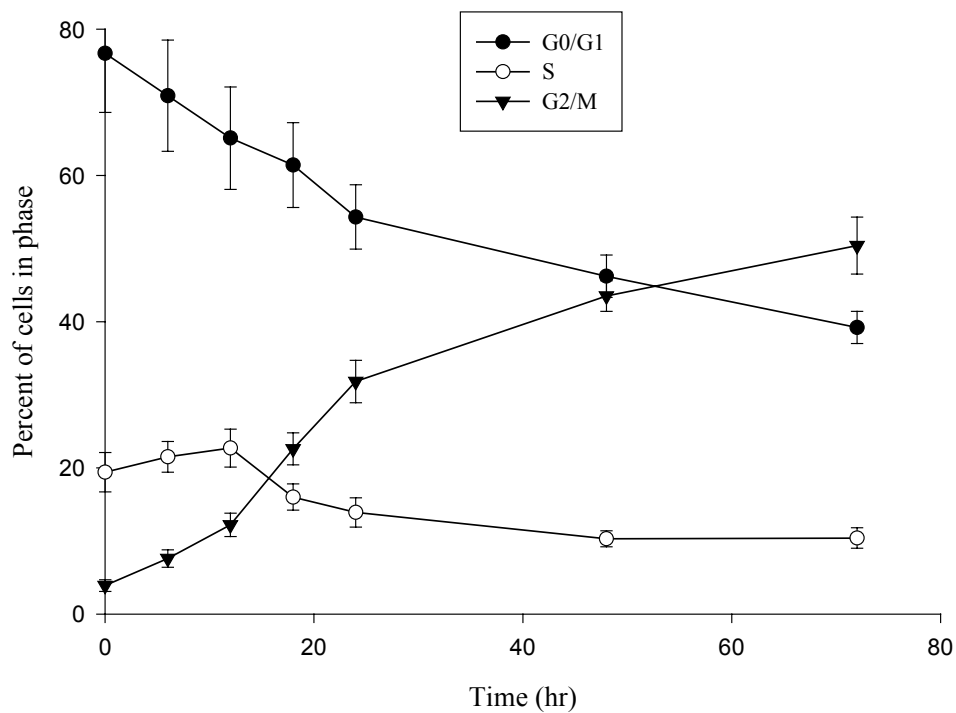
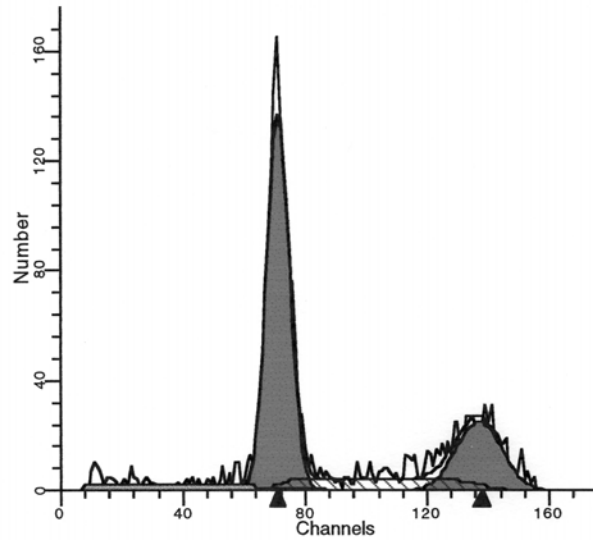


Figure 10. Effect of paclitaxel on the DNA content of U-2 OS cells. Cells were exposure to 25 μ M paclitaxel for the indicated time, washed and then harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide and the DNA content was analyzed by flow cytometry (FACS). The cell number percentage in each phase (G0/G1, S, and G2/M) of the cell cycle was calculated and expressed.

A: Control



B: 25 μ M paclitaxel

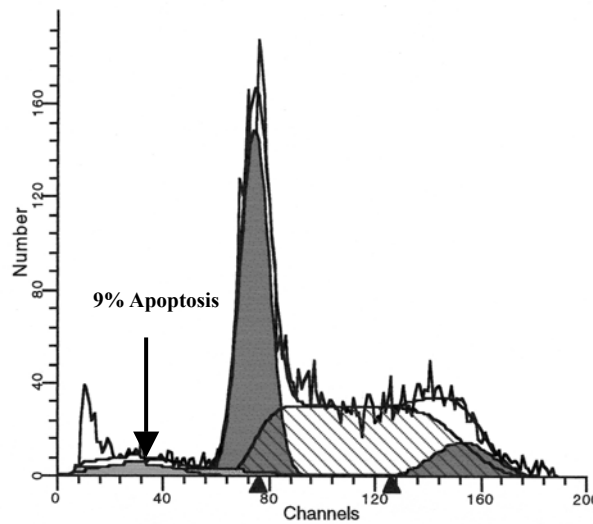


Figure 11. The U-2 OS cells (panel A) were treated with 25 μ M paclitaxel (panel B) for 48 hrs, washed and then harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide and the DNA content was analyzed by flow cytometry (FACS).

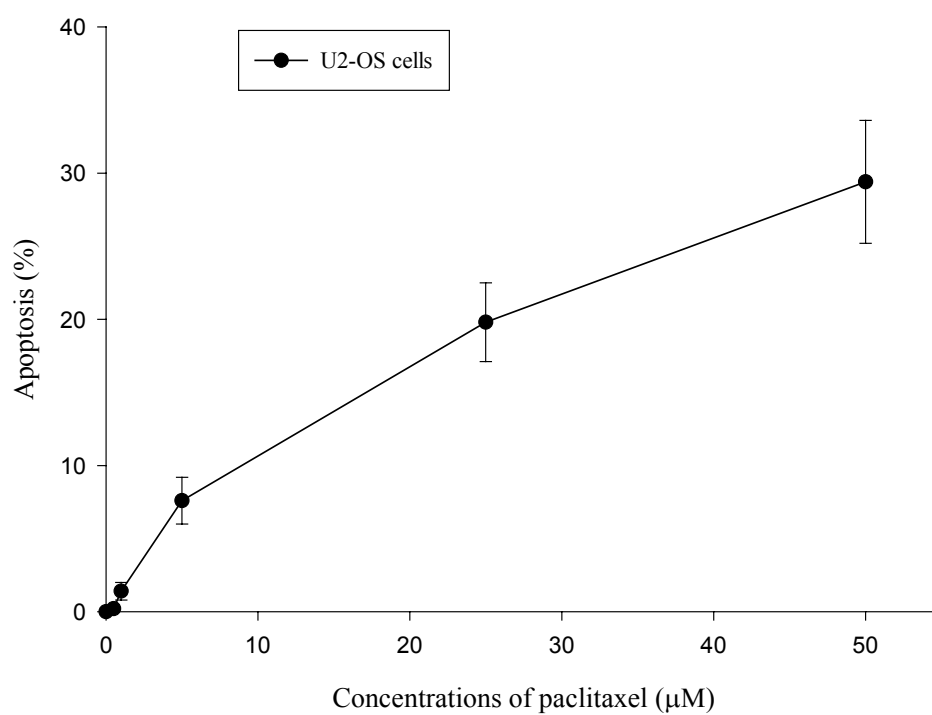


Figure 12. Dose-dependent cell death of U-2 OS cells induced by paclitaxel. The cells were treated with 0.5, 1, 5, 25, and 50 μ M paclitaxel. The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.

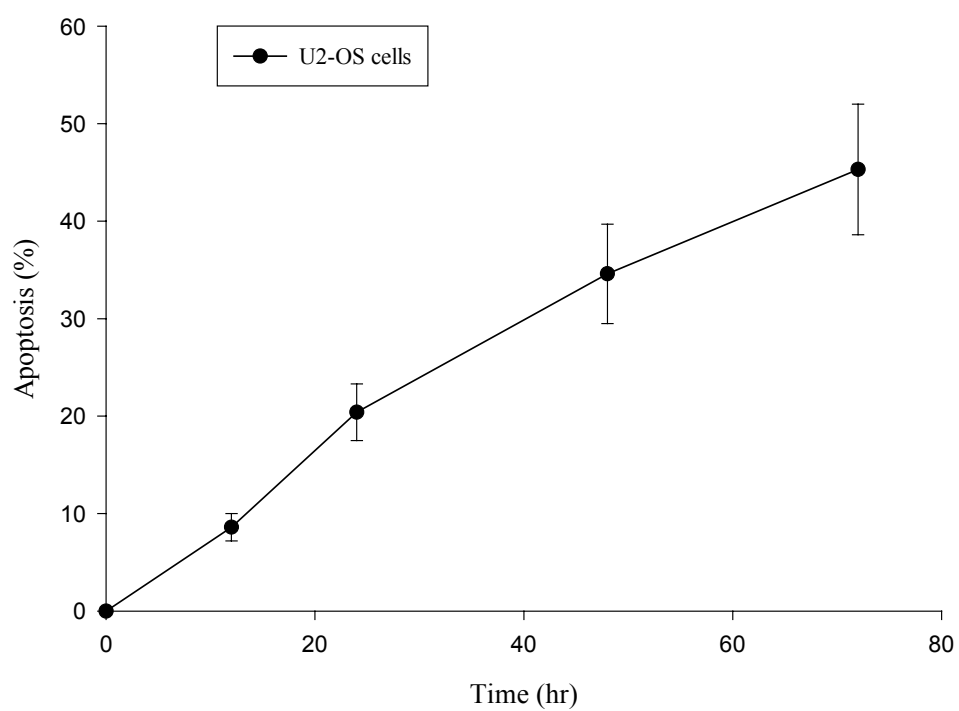


Figure 13. Time-dependent cell death of U-2 OS cells induced by paclitaxel. The cells were treated with 25 μ M paclitaxel then were examined at different time (12, 24, 48, and 72 hrs). The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.

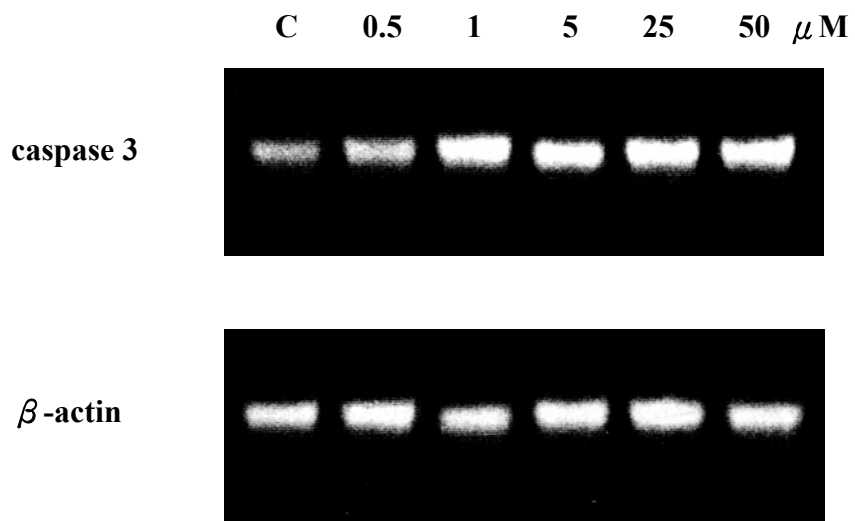


Figure 14. Western blot analysis of caspase-3 in 0.5, 1, 5, 25, and 50 μ M paclitaxel treated U-2 OS cells for 48 hrs. Dose-dependent increase of caspase-3 activation is evident.

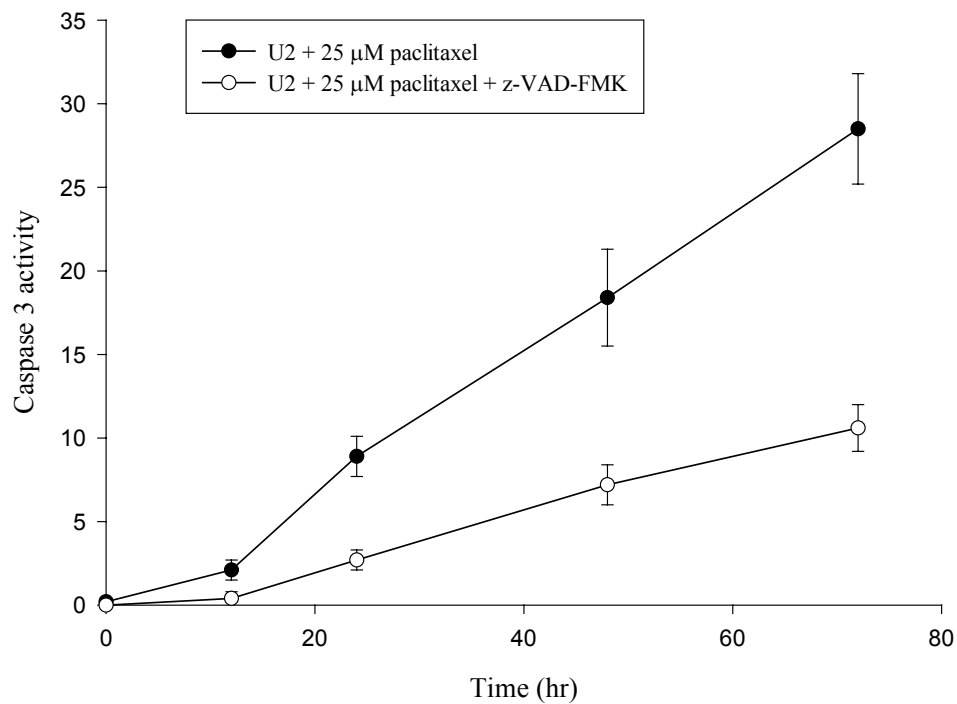


Figure 15. Time-dependent inhibition of paclitaxel induced caspase-3 activation by z-VAD-FMK. The U-2 OS cells were treated with 25 μ M paclitaxel and 25 μ M paclitaxel with z-VAD-FMK then were examined at different time (12, 24, 48, and 72 hrs). The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.

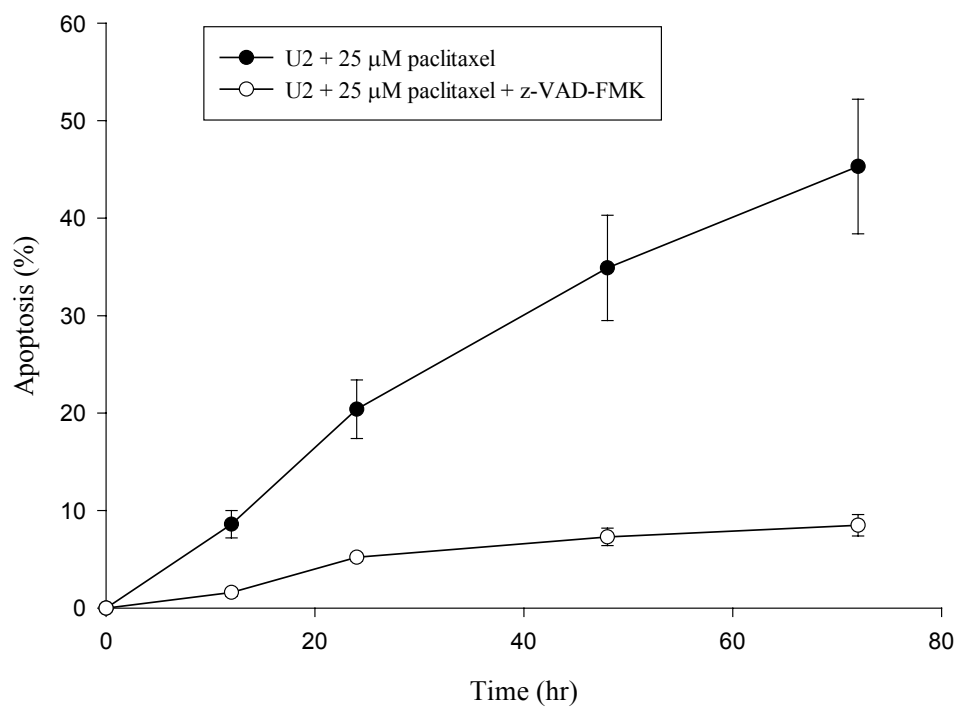
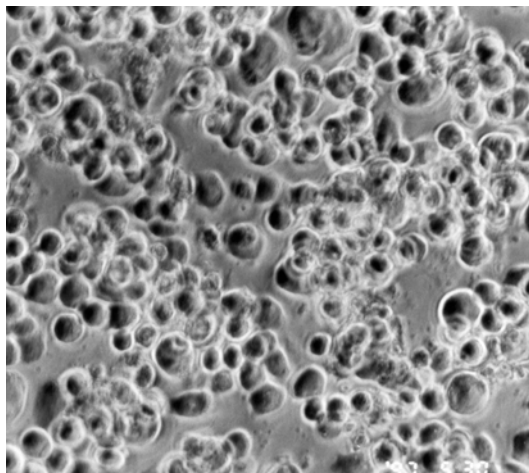
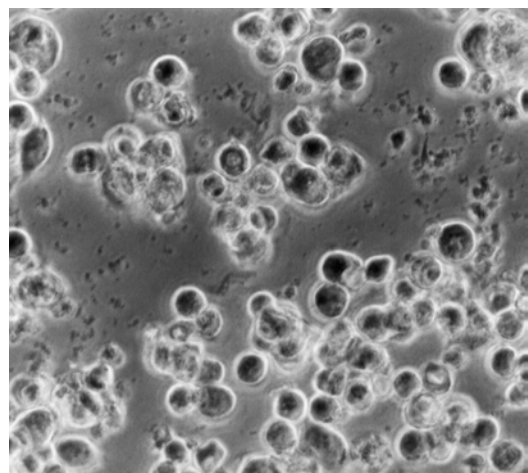


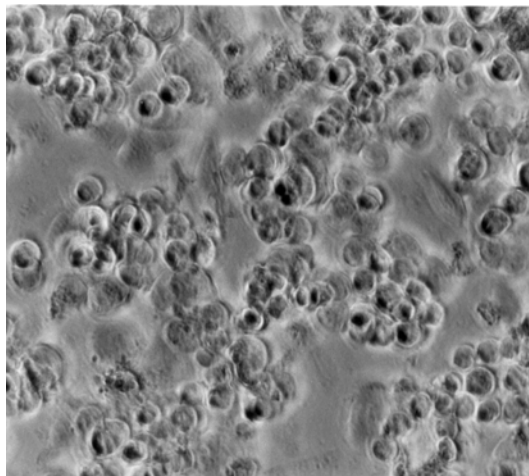
Figure 16. Time-dependent inhibition of paclitaxel induced apoptosis by z-VAD-FMK. The U-2 OS cells were treated with 25 μ M paclitaxel and 25 μ M paclitaxel with z-VAD-FMK then were examined at different time (12, 24, 48, and 72 hrs). The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.



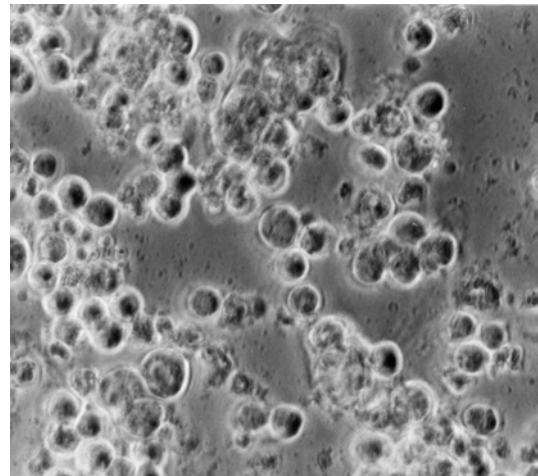
Control



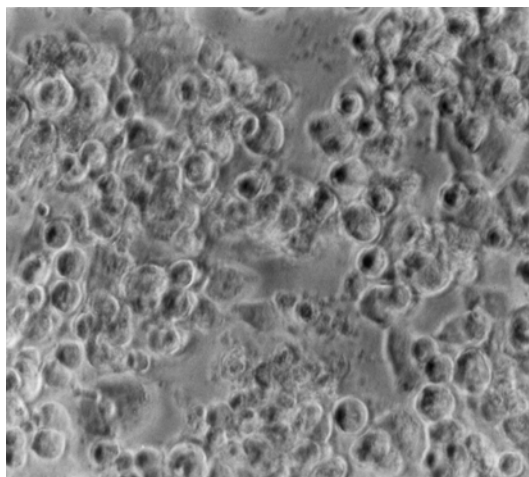
5 μ M



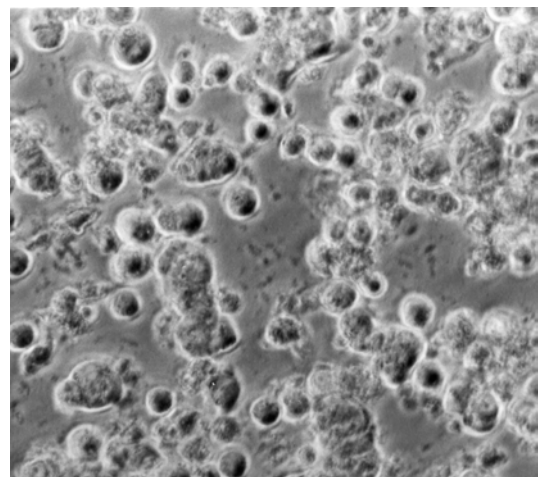
0.5 μ M



25 μ M



1 μ M



50 μ M

Figure 17. The morphology of human leukemia (HL-60) cells after exposure to the different doses of paclitaxel for 48 hrs then were examined and photographed by phase microscope (200×). Control, 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 25 μ M, and 50 μ M.

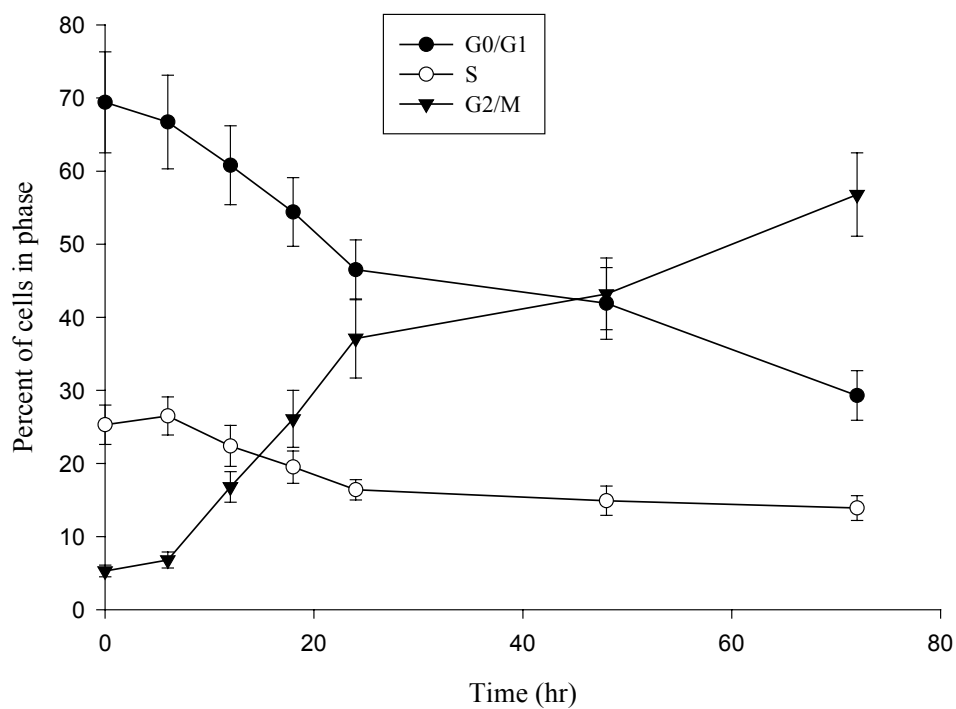
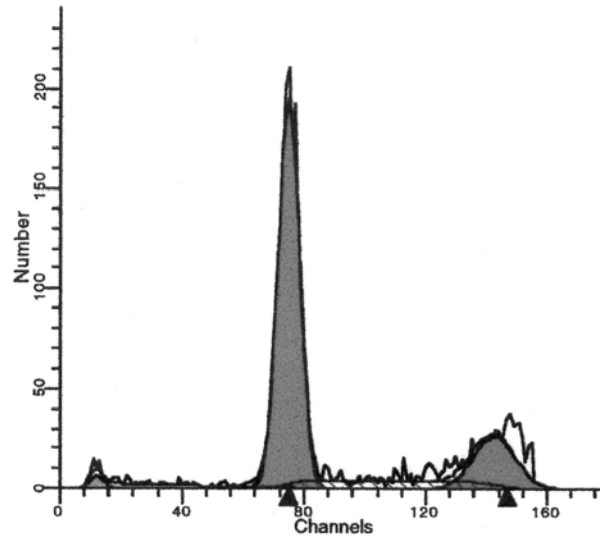


Figure 18. Effect of paclitaxel on the DNA content of HL-60 cells. Cells were exposure to 25 μ M paclitaxel for the indicated time, washed and then harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide and the DNA content was analyzed by flow cytometry (FACS). The cell number percentage in each phase (G0/G1, S, and G2/M) of the cell cycle was calculated and expressed.

A: Control



B: 25 μ M Paclitaxel

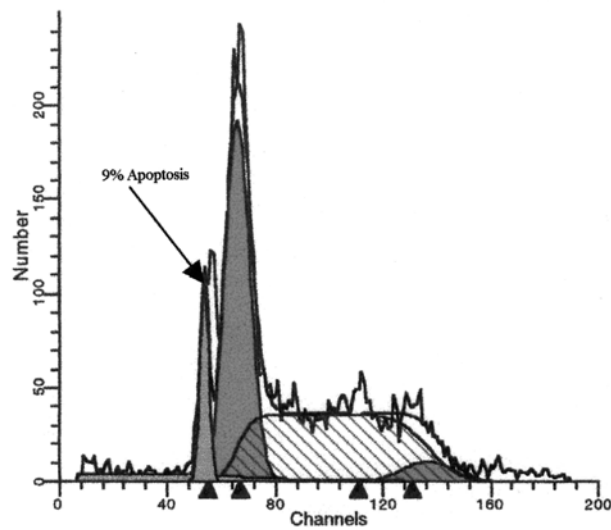


Figure 19. The HL-60 cells (panel A) were treated with 25 μ M paclitaxel (panel B) for 48 hrs, washed and then harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide and the DNA content was analyzed by flow cytometry (FACS).

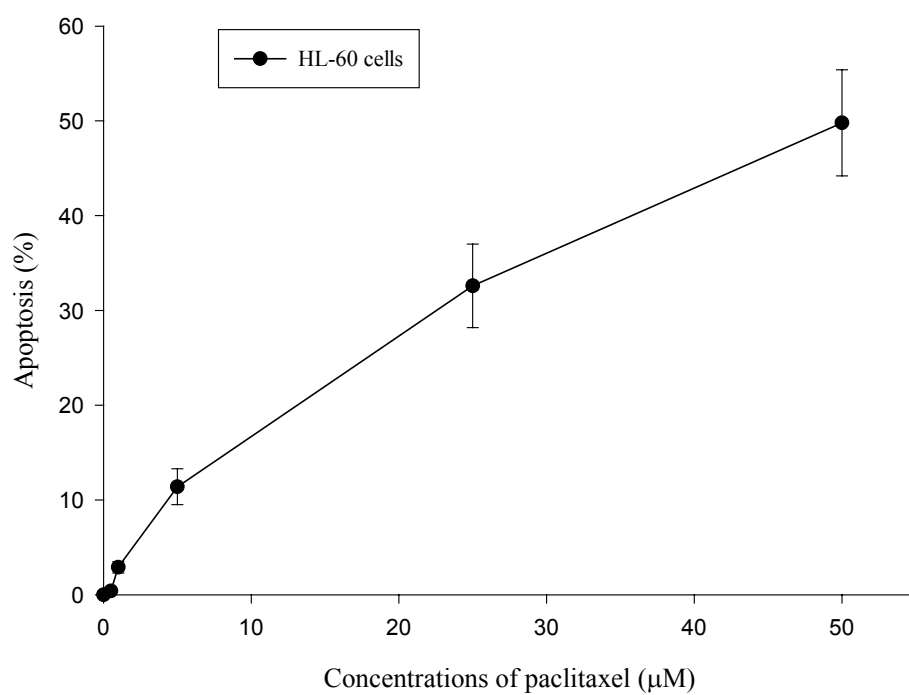


Figure 20. Dose-dependent cell death of HL-60 cells induced by paclitaxel. The cells were treated with 0.5, 1, 5, 25, and 50 μ M paclitaxel. The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.

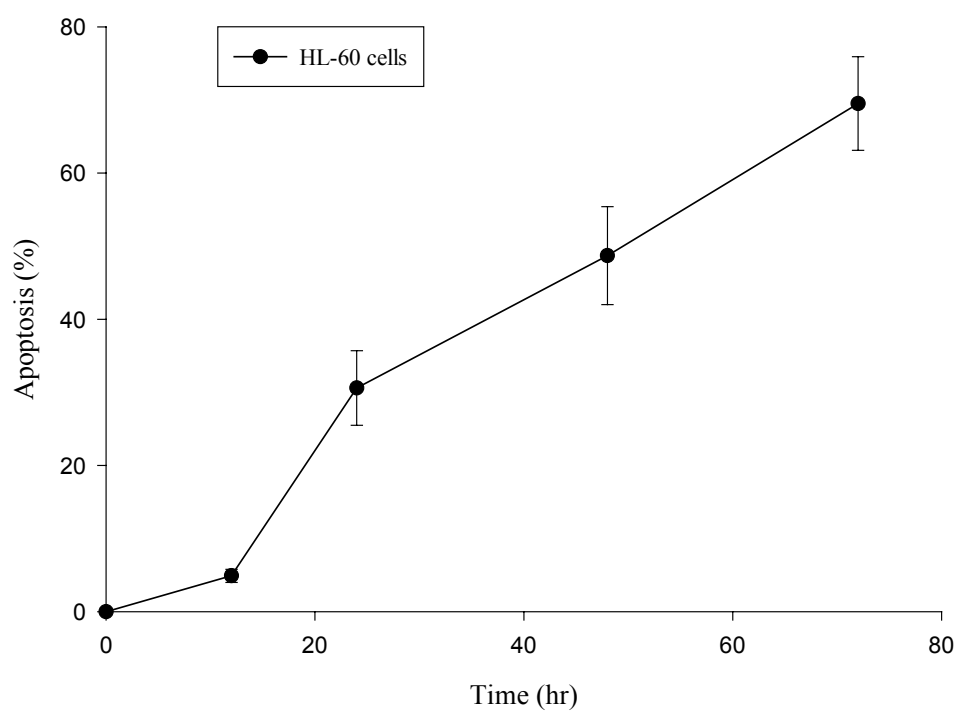


Figure 21. Time-dependent cell death of HL-60 cells induced by paclitaxel. The cells were treated with 25 μ M paclitaxel then were examined at different time (12, 24, 48, and 72 hrs). The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.

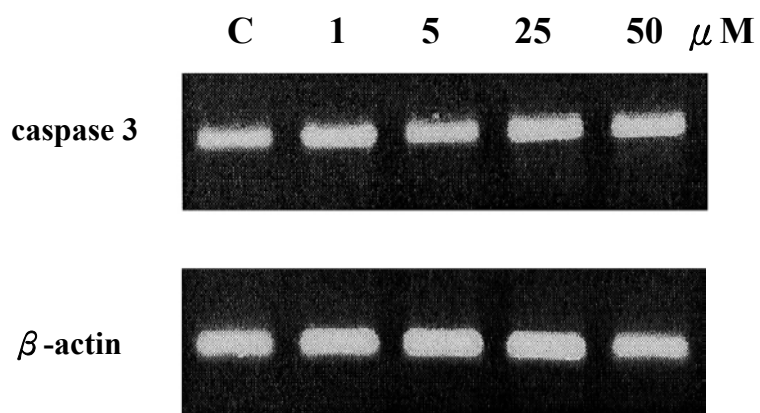


Figure 22. Western blot analysis of caspase-3 in 1, 5, 25, and 50 μ M paclitaxel treated HL-60 cells for 48 hrs. Dose-dependent increase of caspase-3 activation is evident.

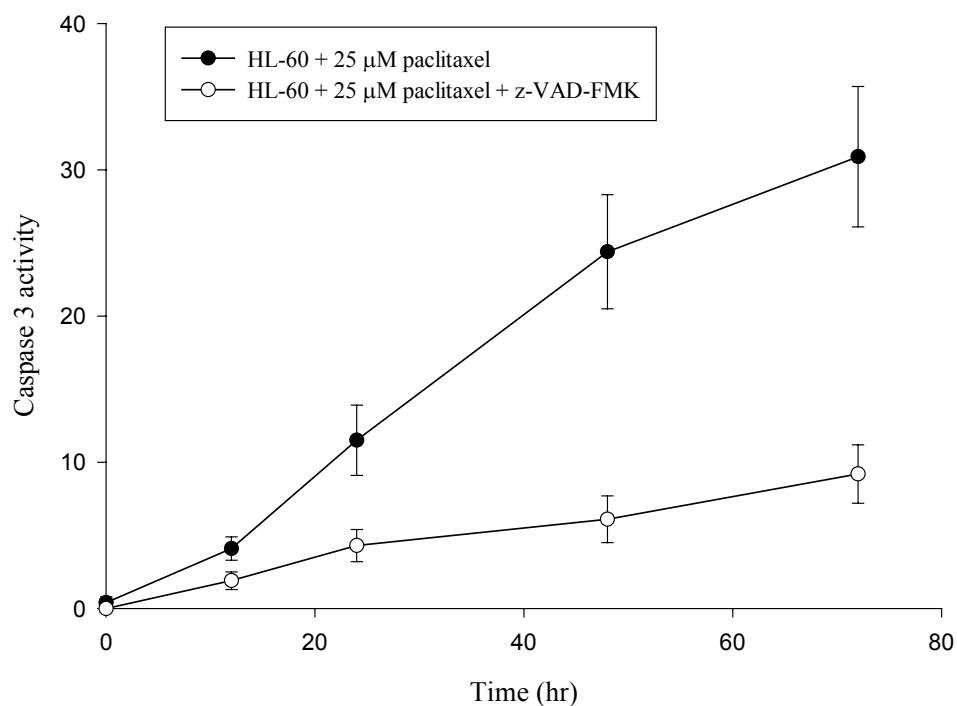


Figure 23. Time-dependent inhibition of paclitaxel induced caspase-3 activation by z-VAD-FMK. The HL-60 cells were treated with 25 μ M paclitaxel and 25 μ M paclitaxel with z-VAD-FMK then were examined at different time (12, 24, 48, and 72 hrs). The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.

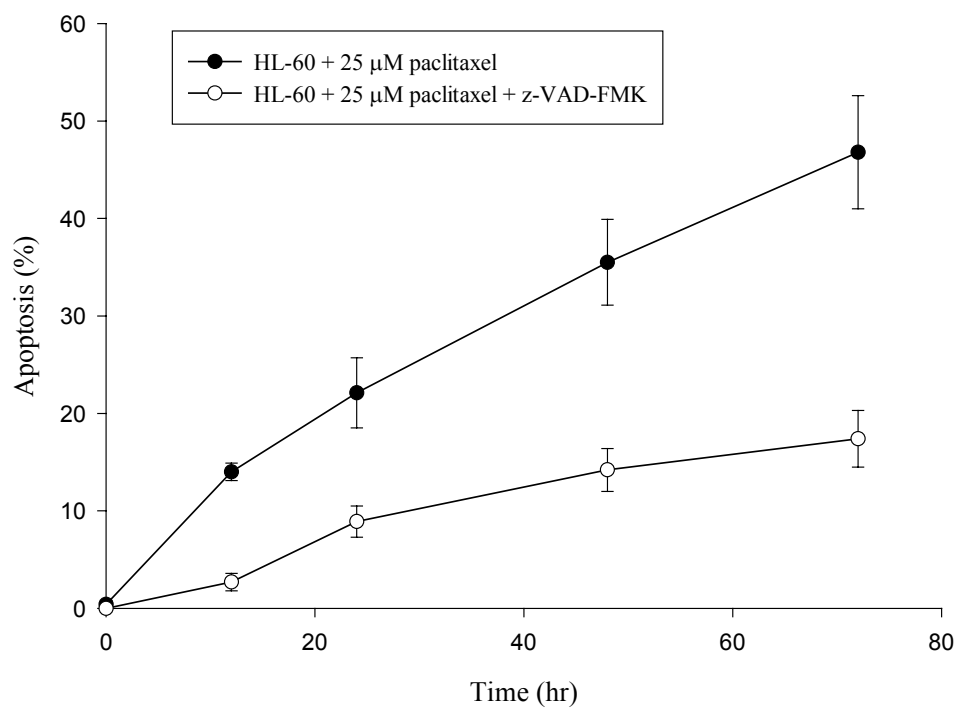


Figure 24. Time-dependent inhibition of paclitaxel induced apoptosis by z-VAD-FMK. The HL-60 cells were treated with 25 μ M paclitaxel and 25 μ M paclitaxel with z-VAD-FMK then were examined at different time (12, 24, 48, and 72 hrs). The results are expressed as mean \pm SD of 6 determinations.

第五節 Paclitaxel 在 Sprague-Dawley 大白鼠中對 AF N-乙醯化和 DNA-AF 鍵結衍生物形成的量所造成的影響

<體外試驗>

一、 Paclitaxel對SD大白鼠血液、肝臟、肺臟、膀胱和大腸之NAT活性的影響結果

以HPLC來偵測paclitaxel對SD大白鼠血液、肝臟、肺臟、膀胱和大腸體外試驗之AAF產生（NAT活性）的可能影響結果（表5）。實驗數據顯示在所有檢測的組織細胞液中，增加paclitaxel伴隨著NAT的降低。

二、 Paclitaxel對SD大白鼠血液、肝臟、肺臟、膀胱和大腸之Michaelis-Menten參數值的影響結果

SD大白鼠的血液、肝臟、肺臟、膀胱和大腸之NAT的Michaelis-Menten參數值，在有或無paclitaxel的處理，其影響結果在表6。肝臟顯示最大的活性，而血液則顯示最小活性。Vmax的值是肝臟>大腸>肺臟>膀胱>血液。Km的值在肝臟和其他檢測組織顯示不同。paclitaxel明顯降低五個檢測組織的Vmax值，但除了血液，它則不會影響Km值（表6）。

三、 Paclitaxel對SD大白鼠白血球之AAF製造的影響結果

以HPLC來偵測正常SD大白鼠的白血球，在不同濃度的AF和有或無250 μ M paclitaxel共同處理24小時後的AF和AAF，結果在圖25。在所有檢測的AF濃度，AAF的產生被paclitaxel所降低。

四、 Paclitaxel對SD大白鼠白血球之AF-DNA鍵結衍生物的影響結果

SD大白鼠白血球經過24小時的培養，其AF-DNA鍵結衍生物，有被paclitaxel所降低（表7）。

<體內試驗>

五、 Paclitaxel在SD大白鼠體內經由乙醯化對AF清除的影響結果

圖26顯示被paclitaxel處理過的，降低AF乙醯化之情形和paclitaxel的劑量有關。Paclitaxel在1 mg/kg時，不會影響AF的乙醯化速率，但10 mg/kg則明顯降低41%，而且濃度持續增加，仍

然產生相似的效果。因此，10 mg/kg被用來作為下面實驗的依據。

六、 SD大白鼠經由paclitaxel前處理之血中AF濃度的探討

在有或無50 mg/kg paclitaxel的前處理，經由靜脈給于50 mg/kg AF 48小時後，其血漿中AF的濃度在圖27。AF和paclitaxel處理的實驗組中，時間越長，血漿中AF的濃度越低。而血漿中AAF的濃度在圖28。paclitaxel前處理的實驗組中，AAF的濃度明顯的比對照組的低。數據顯示AF和paclitaxel處理的時間越久，血漿中AAF的濃度的越低。

七、 SD大白鼠經由paclitaxel前處理之AF乙醯化的情形

對照組和paclitaxel前處理的實驗組之AF的藥理動力學的參數值在表8。尿中AAF的復原，在paclitaxel前處理的實驗組中降低44.9% ($p < 0.05$)。相反的，尿中AF的復原卻沒有明顯的差異。而大便中AAF的復原，在paclitaxel前處理的是實驗組中降低36.5% ($p < 0.05$)。相反的，大便中AF的復原卻沒有明顯的差異。AF和AAF在對照組及paclitaxel前處理的實驗組中，腎清除率並沒有顯示明顯差異。但是AF變AAF的代謝清除率，在paclitaxel前處理的實驗組比對照組降低36% ($p < 0.05$)。

八、 體內AF-DNA鍵結衍生物經由paclitaxel處理之影響結果

給于50 mg/kg AF 24小時後，不論有或無paclitaxel的處理，在SD大白鼠的白血球、肝臟、肺臟、膀胱和大腸組織中，測得的AF-DNA鍵結衍生物在圖29。數據顯示AF-DNA鍵結衍生物的量，在肝臟比在肺臟高，在肺臟比在膀胱高，在膀胱比在大腸高，在大腸比在白血球高。隨著時間增加，AF-DNA鍵結衍生物在白血球和肝臟降低；但是在肺臟，膀胱和大腸則表現相反。paclitaxel處理的實驗組比對照組，則明顯降低AF-DNA鍵結衍生物。

第六節 口服給予 Paclitaxel 在 Sprague-Dawley 大白鼠的各個組織中影響化學致癌物 AF 的分佈和代謝

一、 在 SD 大白鼠中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

在只給于AF(對照組)、AF和paclitaxel同時給于、paclitaxel前處理24小時後再給于AF三組中，各個AF和它的代謝物的濃

度，分別在表 9-16。其個別 HPLC 的圖，在圖 30。三組中不同組織的 AF 和它的代謝物全部濃度，在圖 31。

二、在 SD 大白鼠的膀胱中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

表 9 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的膀胱中三組的 AF 代謝物。

三、在 SD 大白鼠的血液中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

表 10 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的血液中三組的 AF 代謝物。

四、在 SD 大白鼠的大腸中對 AF 代謝的可能影響

表 11 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的大腸中三組的 AF 代謝物。

五、在 SD 大白鼠的腎臟中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

表 12 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的腎臟中三組的 AF 代謝物。

六、在 SD 大白鼠的肝臟中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

表 13 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的肝臟中三組的 AF 代謝物。

七、在 SD 大白鼠的胃中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

表 14 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的胃中三組的 AF 代謝物。

八、在 SD 大白鼠的尿中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

表 15 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的尿中三組的 AF 代謝物。

九、在 SD 大白鼠的大便中 paclitaxel 對 AF 代謝的可能影響

表 16 和圖 30 顯示 SD 大白鼠的大便中三組的 AF 代謝物。

十、在 SD 大白鼠中 paclitaxel 對整個 AF 代謝物的影響

圖 31 顯示在 SD 大白鼠所有檢測組織中，AF 和它的代謝物之總量。

Table 5. Effects of paclitaxel on *N*-acetyltransferase activity *In Vitro*.

Paclitaxel treatment	AAF				
	Blood	Liver	Lung	Bladder	Colon
Control	0.34 ± 0.08	1.52 ± 0.34	0.79 ± 0.24	0.54 ± 0.11	0.86 ± 0.28
001 µM	0.30 ± 0.08	1.49 ± 0.36	0.75 ± 0.26	0.51 ± 0.12	0.82 ± 0.29
010 µM	0.26 ± 0.09	1.40 ± 0.31	0.64 ± 0.20	0.45 ± 0.09	0.74 ± 0.22
050 µM	0.20 ± 0.06	1.26 ± 0.24	0.50 ± 0.16	0.36 ± 0.08	0.60 ± 0.14
100 µM	0.15 ± 0.07	1.02 ± 0.16	0.34 ± 0.10	0.21 ± 0.06 ^{a,b}	0.47 ± 0.10
250 µM	0.09 ± 0.06 ^a	0.40 ± 0.09 ^{a,b,c,d}	0.16 ± 0.06 ^{a,b}	0.11 ± 0.04 ^{a,b,c}	0.29 ± 0.08
500 µM	0.04 ± 0.04 ^{a,b}	0.12 ± 0.06 ^{a,b,c,d,e}	0.07 ± 0.04 ^{a,b}	0.06 ± 0.04 ^{a,b,c,d}	0.10 ± 0.04 ^{a,b,c}
F value	7.419*	14.977**	8.213*	16.607**	6.816*

Note. Value are mean ± SD of activity (nmol/min/mg protein); $n = 6$.

Anova analysis with Scheffe posteriori comparison was used.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

^a Significantly different, at $p < 0.05$, when compared to control.

^b Significantly different, at $p < 0.05$, when compared to 1 µM.

^c Significantly different, at $p < 0.05$, when compared to 10 µM.

^d Significantly different, at $p < 0.05$, when compared to 50 µM.

^e Significantly different, at $p < 0.05$, when compared to 100 µM.

Table 6. Michaelis-Menten parameters for NAT activity in various organs from control and paclitaxel treated rats.

Organ	Treatment	K _m (μM)	V _{max} (nmol/min/mg protein)
Blood	Saline	425 ± 51	0.94 ± 0.18
	paclitaxel	404 ± 46	0.86 ± 0.14
Liver	Saline	184 ± 30	14.76 ± 2.10
	paclitaxel	189 ± 32	6.47 ± 1.24*
Lung	Saline	274 ± 44	2.52 ± 0.48
	paclitaxel	279 ± 46	1.61 ± 0.27*
Bladder	Saline	395 ± 48	1.30 ± 0.21
	paclitaxel	399 ± 51	0.64 ± 0.14*
Colon	Saline	345 ± 29	4.56 ± 0.57
	paclitaxel	326 ± 34	2.18 ± 0.24*

Note. Values are mean ± SD; n = 6. The kinetic constants were calculated from the modified HYPER program of Cleland (1976). Student's test was used.

* Significantly different, at $p < 0.05$, when compared to control.

Table 7. Effects of paclitaxel on DNA adduct levels in rat leukocytes.

Treatment	DNA adduct formation (pmol adduct/mg DNA)	
	30 μ M AF	60 μ M AF
Control	1.26 \pm 0.31	2.09 \pm 0.41
Paclitaxel	0.39 \pm 0.09*	0.71 \pm 0.14*

Note. Values are mean \pm SD of 6 separate preparations (isolation of leukocytes, incubation with 30–60 μ M AF, cotreatment (or not) with 100 μ M paclitaxel, DNA preparation, post-labeling, and HPLC analysis).

* Significantly different, at $p < 0.05$, when compared to control.

Table 8. Effects of paclitaxel pretreatment on the disposition of 2-aminofluorene in rats.

Pharmacokinetic parameter	Control (n = 6)	Paclitaxel (n = 6)
CL _s (ml/min/kg)	115 ± 32	108 ± 24
t _{1/2} (min)	52.6 ± 7.7	46.4 ± 6.9
V _{ss} (liters/kg)	4.94 ± 2.6	4.86 ± 2.8
Urinary recovery (% of dose)		
2-aminofluorene	33.4 ± 7.5	34.8 ± 8.1
N-acetyl-2-aminofluorene	12.9 ± 2.6	7.1 ± 1.6 ^a
Fecal recovery (% of dose)		
2-aminofluorene	45.2 ± 8.1	44.8 ± 7.6
N-acetyl-2-aminofluorene	18.9 ± 3.4	11.4 ± 1.4 ^b
CL _r (AF) (ml/min/kg)	82.6 ± 25.3	85.4 ± 17.4
CL _r (AAF) (ml/min/kg)	30.4 ± 8.6	27.5 ± 4.9
CL _m (ml/min/kg)	15.9 ± 3.2	10.1 ± 2.2 ^c

Note. Paclitaxel (25 mg/kg) was administered as a single dose 24 h prior to 2-aminofluorene (50 mg/kg) administration. Data are expressed as mean ± SD. CL_s: systemic clearance; t_{1/2}: half-life; V_{ss}: steady-state volume of distribution; CL_r (AF): renal clearance of 2-aminofluorene; CL_r (AAF): renal clearance of N-acetyl-aminofluorene; CL_m: metabolic clearance of 2-aminofluorene to N-acetyl-2-aminofluorene. (Stevenson and Knowlton, 1989).

^{a,b,c} Differs significantly between 25 mM paclitaxel and control; at $p < 0.05$.

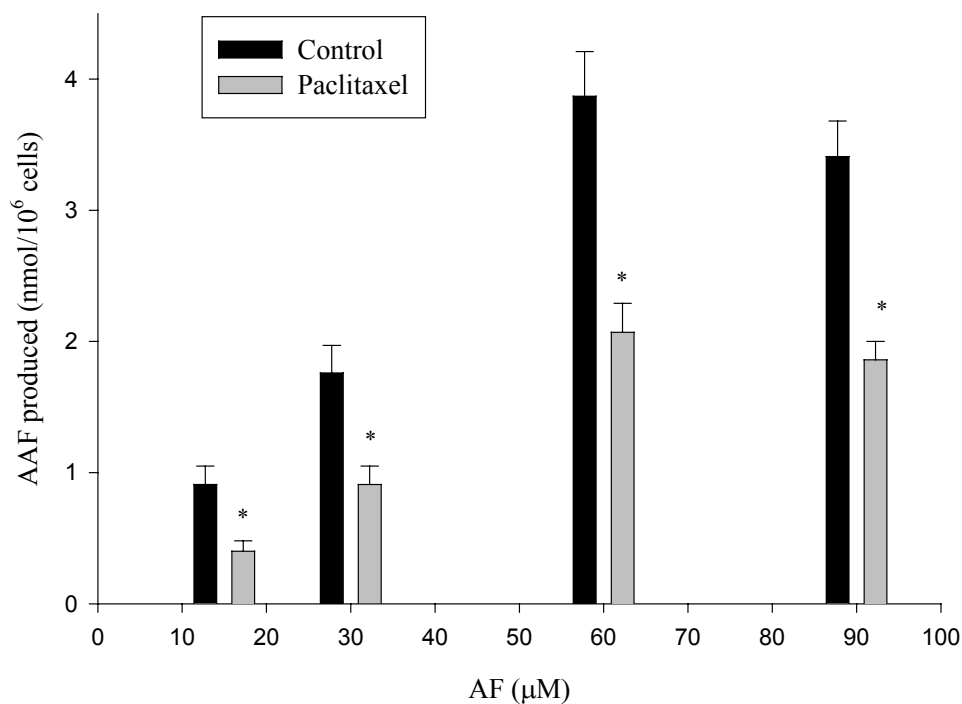


Figure 25. Effects of paclitaxel on the clearance of N-acetylate-2-aminofluorene from rats' leukocytes. Leukocytes were incubated as described for 24 h at the concentrations of AF co-treatment with and without 100 μM paclitaxel. AAF was measured by HPLC assay. Each time point represents the mean of triplicate assays of 3 incubations of cells. Data are expressed as mean ± SD, $n = 6$.

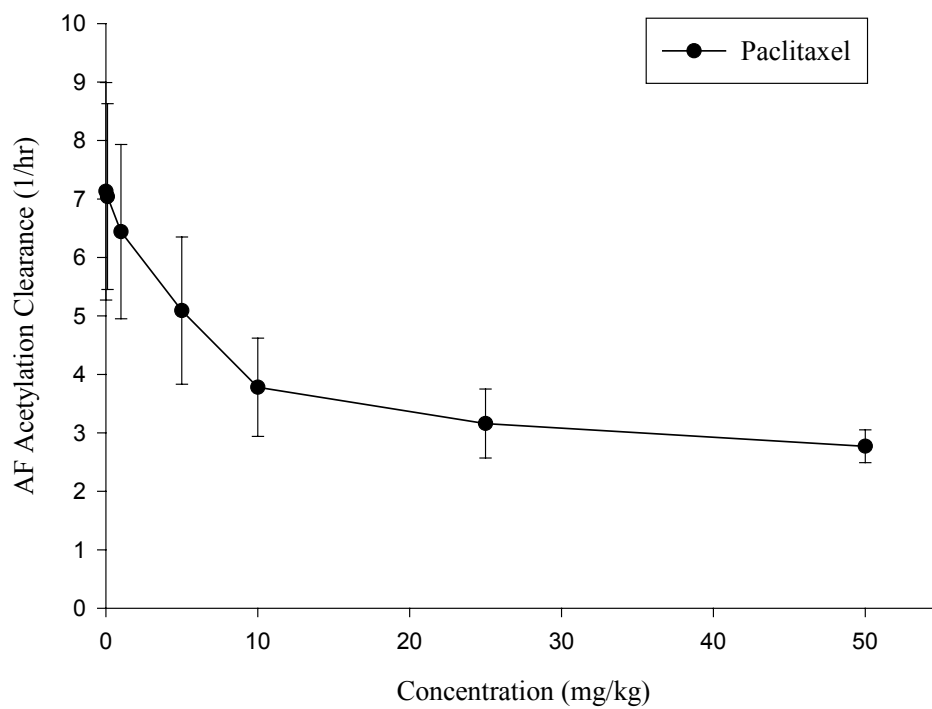


Figure 26. Effects of paclitaxel on the clearance of 2-aminofluorene via acetylation in rats. Animals were treated with 0-100 mg/kg paclitaxel for 48 hrs then sacrificed for experiments as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 6$.

3

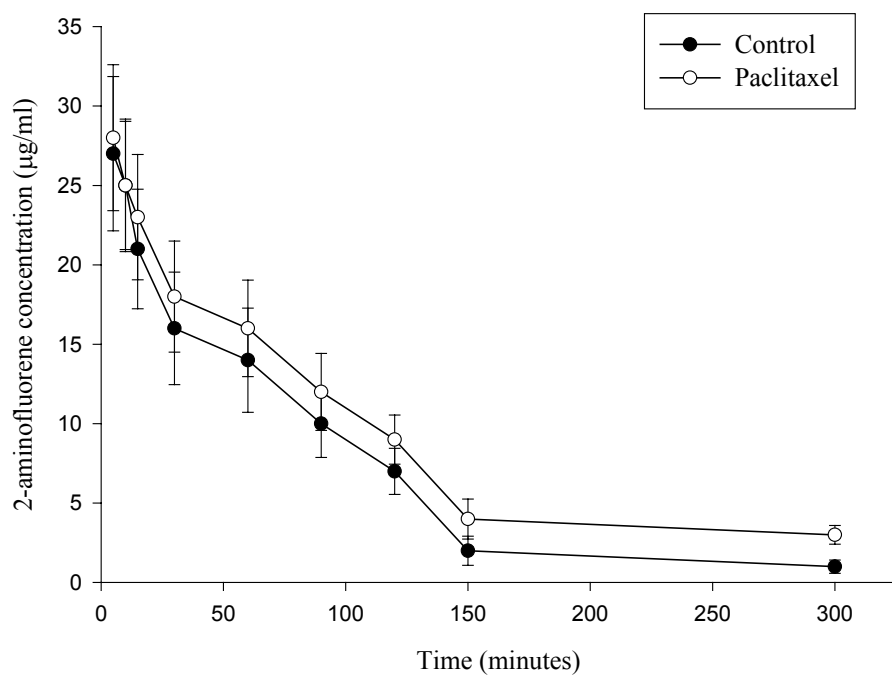


Figure 27. Mean plasma 2-aminofluorene concentration versus time profile in paclitaxel pretreated ($n = 6$) and control ($n = 6$) animals. The data were obtained as described in Materials and Methods. Values are mean \pm SD.

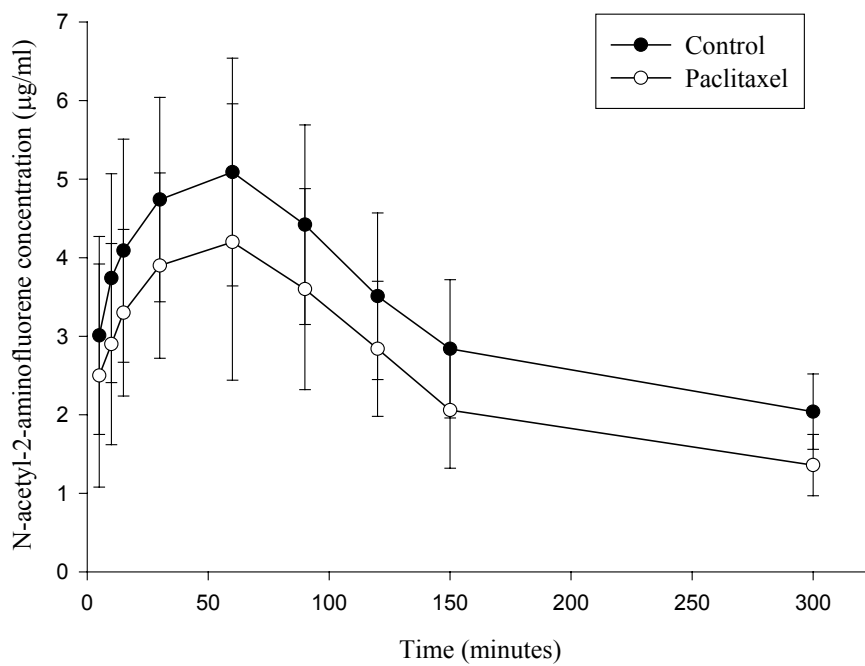


Figure 28. Mean plasma N-acetyl-2-aminofluorene concentration versus time profile in paclitaxel pretreated ($n = 6$) and control ($n = 6$) animals. The data were obtained as described in Materials and Methods. Values are mean \pm SD.

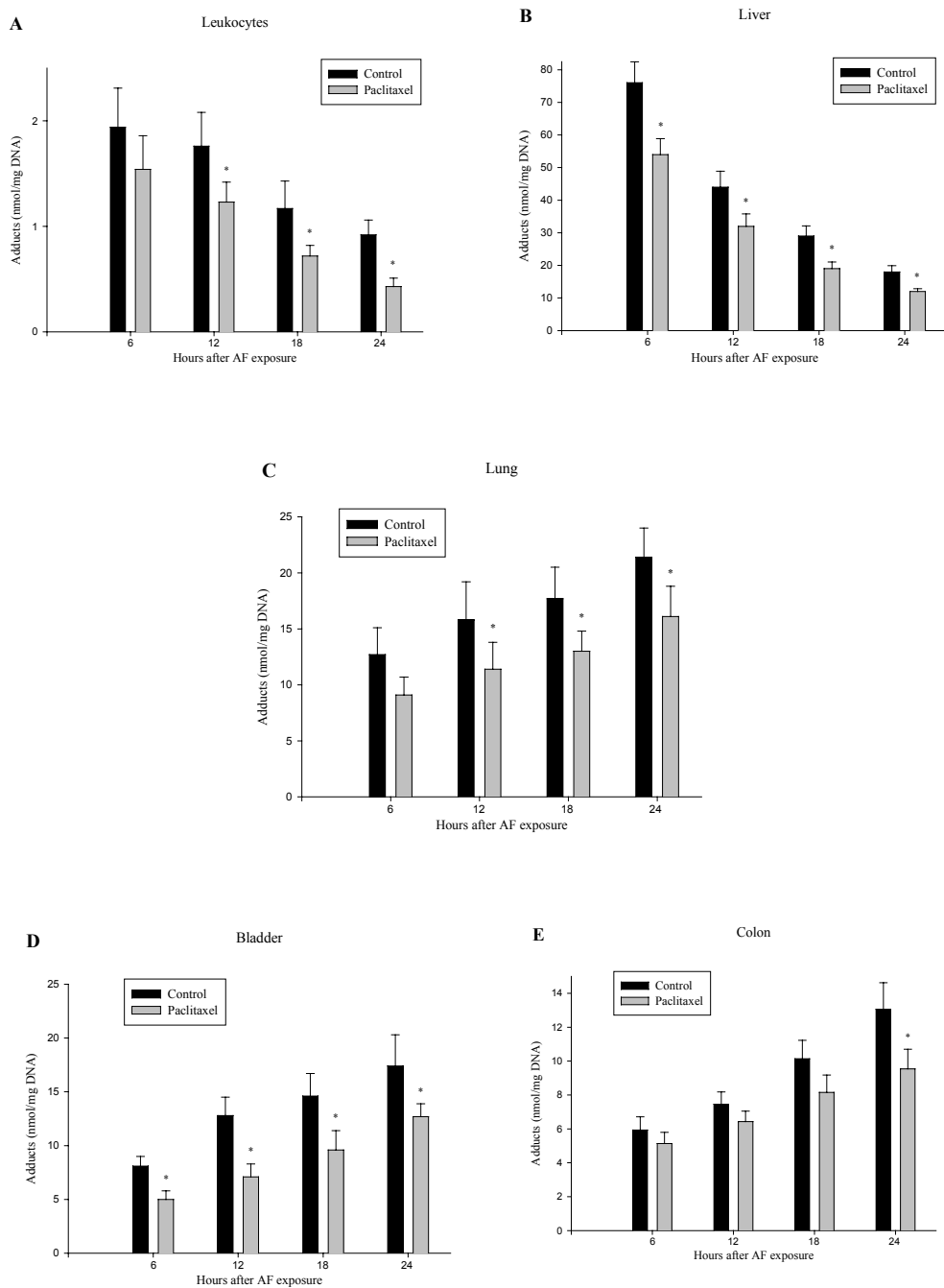


Figure 29. DNA adduct levels in leukocytes, liver, lung, colon, and bladder of SD rats 3 to 24 hr after i.p. dose of AF (50 mg/kg). Six rats were used for each time point experiments. Panel A represents leukocytes, panel B represents liver, panel C represents lung, panel D represents bladder, and panel E represents colon. Values are mean \pm SD. * $p < 0.01$.

Table 9. Distribution of AF metabolites in bladder from male SD rats (μ M/ml).

metabolites Treatments	AF	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)		0.019 \pm 0.012	0.026 \pm 0.010	0.036 \pm 0.012	0.138 \pm 0.026	0.076 \pm 0.018	0.200 \pm 0.042	0.039 \pm 0.010	0.042 \pm 0.012
Paclitaxel 24 hr + AF		*0.010 \pm 0.004	0.032 \pm 0.010	0.050 \pm 0.011	0.142 \pm 0.030	0.070 \pm 0.020	N.D.	0.012 \pm 0.006	0.026 \pm 0.011
Paclitaxel + AF		*0.008 \pm 0.001	*0.039 \pm 0.010	*0.057 \pm 0.010	*0.259 \pm 0.019	0.069 \pm 0.014	N.D.	*0.008 \pm 0.001	*0.020 \pm 0.010

Values are mean \pm SE. $n = 6$. N.D.: not detectable. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs. Then the bladder tissues were determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.

Table 10. Distribution of AF metabolites in blood from male SD rats (μ M/ml).

Treatments \ AF metabolites	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)	0.09 \pm 0.04	0.29 \pm 0.06	0.20 \pm 0.036	1.69 \pm 0.17	0.21 \pm 0.046	1.049 \pm 0.074	0.189 \pm 0.010	0.050 \pm 0.011
Paclitaxel 24 hr + AF	*0.16 \pm 0.03	0.20 \pm 0.05	*0.12 \pm 0.020	1.74 \pm 0.14	0.17 \pm 0.032	*0.54 \pm 0.042	*0.310 \pm 0.090	*0.022 \pm 0.008
Paclitaxel + AF	0.10 \pm 0.04	0.19 \pm 0.044	0.14 \pm 0.004	*2.45 \pm 0.20	*0.34 \pm 0.052	0.72 \pm 0.060	0.260 \pm 0.094	0.038 \pm 0.010

Values are mean \pm SE. $n = 6$. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs.

Then the blood was determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.

Table 11. Distribution of AF metabolites in colon from male SD rats (μ M/ml).

Treatments	AF metabolites							
	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)	N.D.	0.028 \pm 0.01	0.037 \pm 0.01	0.54 \pm 0.09	0.069 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.043 \pm 0.01
Paclitaxel 24 hr + AF	N.D.	0.037 \pm 0.01	0.046 \pm 0.02	*0.30 \pm 0.10	0.094 \pm 0.03	*0.36 \pm 0.06	*0.020 \pm 0.01	0.032 \pm 0.06
Paclitaxel + AF	N.D.	*0.074 \pm 0.02	0.075 \pm 0.09	0.49 \pm 0.06	0.096 \pm 0.04	*0.52 \pm 0.07	*0.018 \pm 0.01	0.057 \pm 0.04

Values are mean \pm SE. $n = 6$. N.D.: not detectable. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs. Then the colon tissues were determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.

Table 12. Distribution of AF metabolites in kidney from male SD rats (μ M/ml).

Treatments	AF metabolites							
	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)	0.014 \pm 0.006	0.044 \pm 0.020	3.49 \pm 0.98	0.81 \pm 0.16	0.049 \pm 0.016	0.89 \pm 0.12	0.32 \pm 0.09	0.070 \pm 0.020
Paclitaxel 24 hr + AF	0.012 \pm 0.007	*0.006 \pm 0.000	*0.69 \pm 0.17	*0.40 \pm 0.14	0.044 \pm 0.014	0.80 \pm 0.11	*0.46 \pm 0.08	0.067 \pm 0.024
Paclitaxel + AF	0.012 \pm 0.005	0.054 \pm 0.022	*0.54 \pm 0.10	0.86 \pm 0.19	*0.071 \pm 0.016	1.06 \pm 0.20	0.37 \pm 0.06	0.049 \pm 0.022

Values are mean \pm SE. $n = 6$. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs.

Then the kidney tissues were determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.

Table 13. Distribution of AF metabolites in liver from male SD rats (μ M/ml).

Treatments \ AF metabolites	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)	N.D.	3.46 \pm 0.36	8.14 \pm 0.96	19.54 \pm 2.79	3.96 \pm 0.87	24.57 \pm 3.46	0.51 \pm 0.09	1.07 \pm 0.28
Paclitaxel 24 hr + AF	N.D.	4.58 \pm 0.29	*6.02 \pm 0.49	*26.44 \pm 1.09	*1.42 \pm 0.56	21.53 \pm 2.07	1.07 \pm 0.19	1.94 \pm 0.30
Paclitaxel + AF	N.D.	*5.94 \pm 0.47	*14.8 \pm 1.67	**46.32 \pm 5.17	*8.14 \pm 1.04	*48.93 \pm 5.76	1.20 \pm 0.27	1.64 \pm 0.22

Values are mean \pm SE. $n = 6$. N.D.: not detectable. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs. Then the liver tissues were determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.

Table 14. Distribution of AF metabolites in stomach from male SD rats (μ M/ml).

Treatments	AF metabolites							
	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)	N.D.	N.D.	0.048 \pm 0.02	0.19 \pm 0.06	0.044 \pm 0.02	0.78 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01	0.034 \pm 0.011
Paclitaxel 24 hr + AF	N.D.	N.D.	*0.011 \pm 0.01	*0.04 \pm 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	0.020 \pm 0.009
Paclitaxel + AF	N.D.	N.D.	0.020 \pm 0.01	0.21 \pm 0.07	*0.071 \pm 0.016	0.12 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01	0.020 \pm 0.010

Values are mean \pm SE. $n = 6$. N.D.: not detectable. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs. Then the stomach tissues were determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.

Table 15. Distribution of AF metabolites in urine from male SD rats (μ M/ml).

Treatments	AF metabolites							
	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)	0.04 \pm 0.028	1.04 \pm 0.21	2.94 \pm 0.49	12.44 \pm 1.84	15.04 \pm 1.09	34.76 \pm 3.12	1.48 \pm 0.27	0.24 \pm 0.04
Paclitaxel 24 hr + AF	N.D.	*1.57 \pm 0.18	*8.09 \pm 1.67	13.97 \pm 1.40	*10.43 \pm 0.48	*41.20 \pm 2.79	*3.69 \pm 0.37	*0.54 \pm 0.05
Paclitaxel + AF	0.08 \pm 0.04	0.64 \pm 0.19	2.57 \pm 0.54	11.45 \pm 1.07	14.94 \pm 2.07	26.54 \pm 3.01	2.06 \pm 0.27	0.27 \pm 0.04

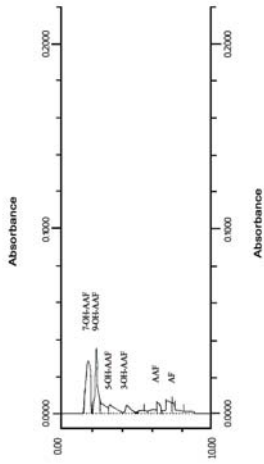
Values are mean \pm SE. $n = 6$. N.D.: not detectable. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs. Then the urine was determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.

Table 16. Distribution of AF metabolites in stool from male SD rats (μ M/ml).

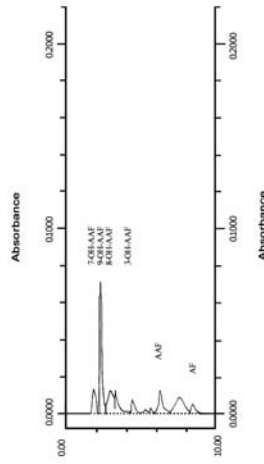
Treatments \ AF metabolites	1-OH-AAF	3-OH-AAF	5-OH-AAF	7-OH-AAF	8-OH-AAF	9-OH-AAF	AAF	AF
Control (AF only)	2.40 \pm 0.66	13.54 \pm 4.04	30.64 \pm 4.44	42.84 \pm 7.27	80.09 \pm 8.74	96.57 \pm 11.04	1.29 \pm 0.44	57.45 \pm 5.94
Paclitaxel 24 hr + AF	*3.94 \pm 0.40	15.12 \pm 2.76	*44.57 \pm 2.92	*79.69 \pm 10.43	*142.57 \pm 9.44	*171.79 \pm 16.44	1.84 \pm 0.53	*84.54 \pm 4.07
Paclitaxel + AF	3.04 \pm 0.51	18.54 \pm 2.49	36.54 \pm 3.41	39.41 \pm 5.17	84.00 \pm 7.44	90.09 \pm 8.94	1.40 \pm 0.09	63.64 \pm 7.44

Values are mean \pm SE. $n = 6$. Rats were administered with AF similarly with or without paclitaxel or after treated with paclitaxel for 24 hrs then treated AF for 24 hrs.

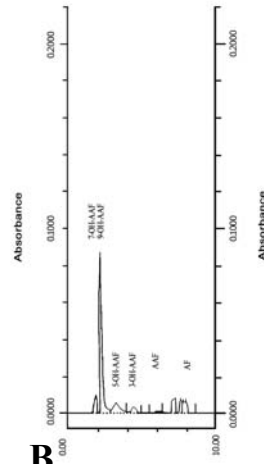
Then the stool was determined for AF and AF metabolites. Data were analyzed by an unpaired student's t-test. *Difference between AF treated (control) and paclitaxel treated for 24 hrs then AF treated group or paclitaxel and AF treated at the same time. $p < 0.05$.



A

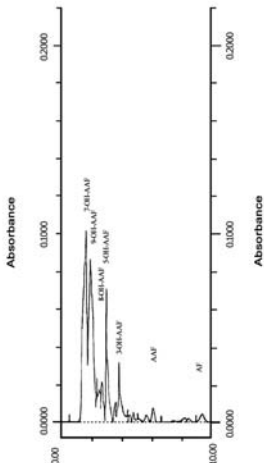


B

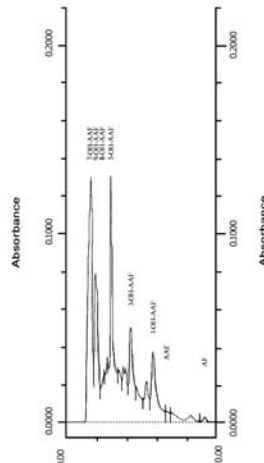


C

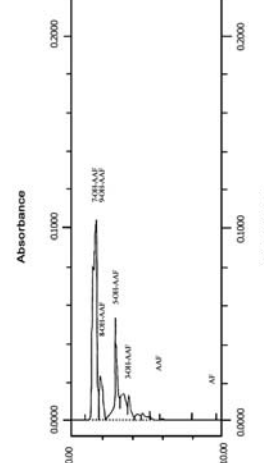
Bladder



A

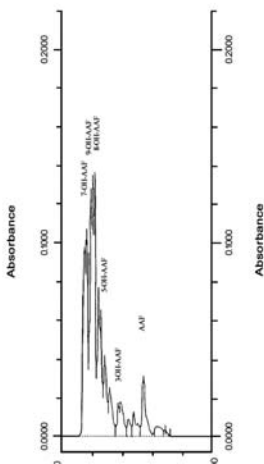


B

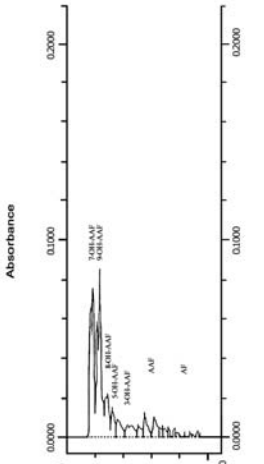


C

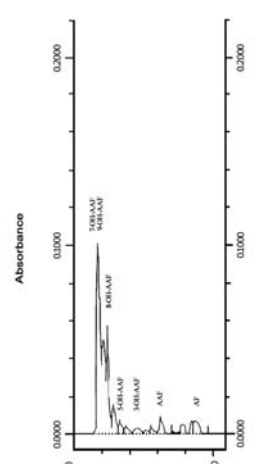
Blood



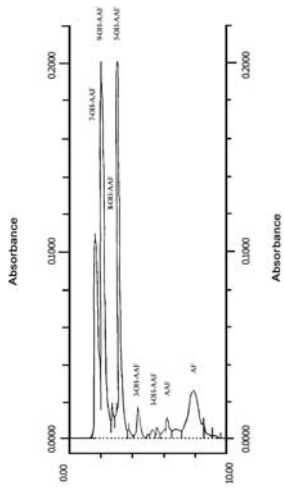
A



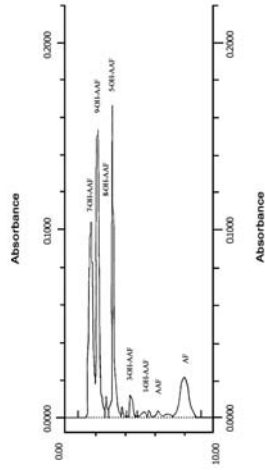
B



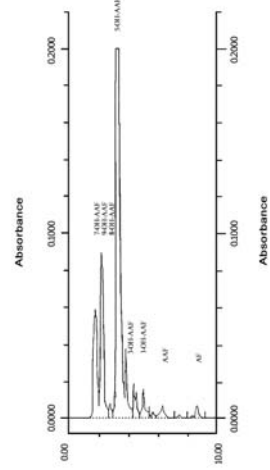
C



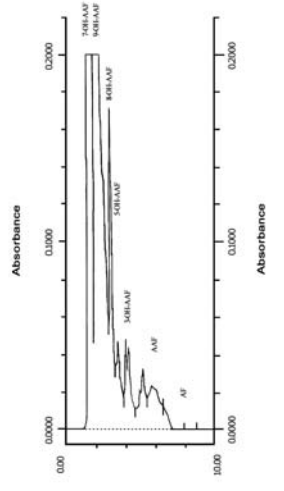
A



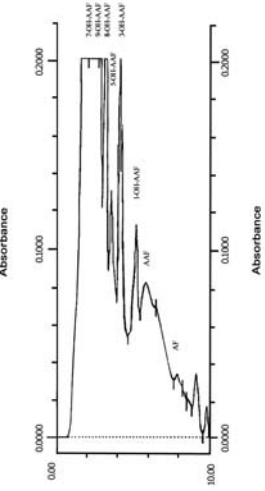
C



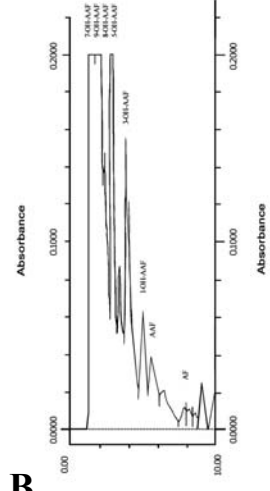
B



A

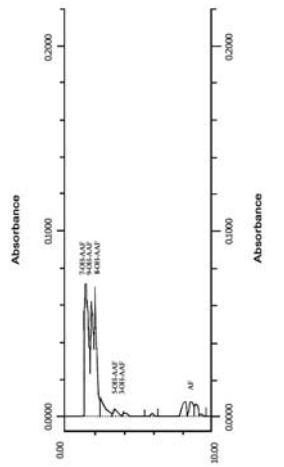


C

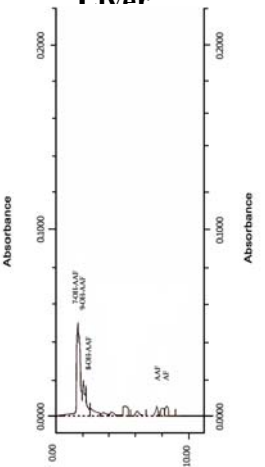


B

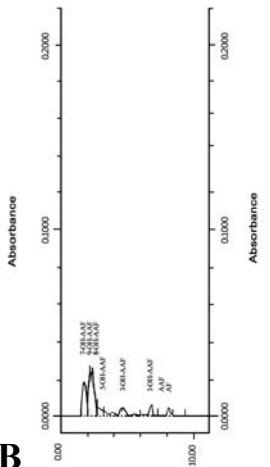
Liver



A



C



B

Stomach

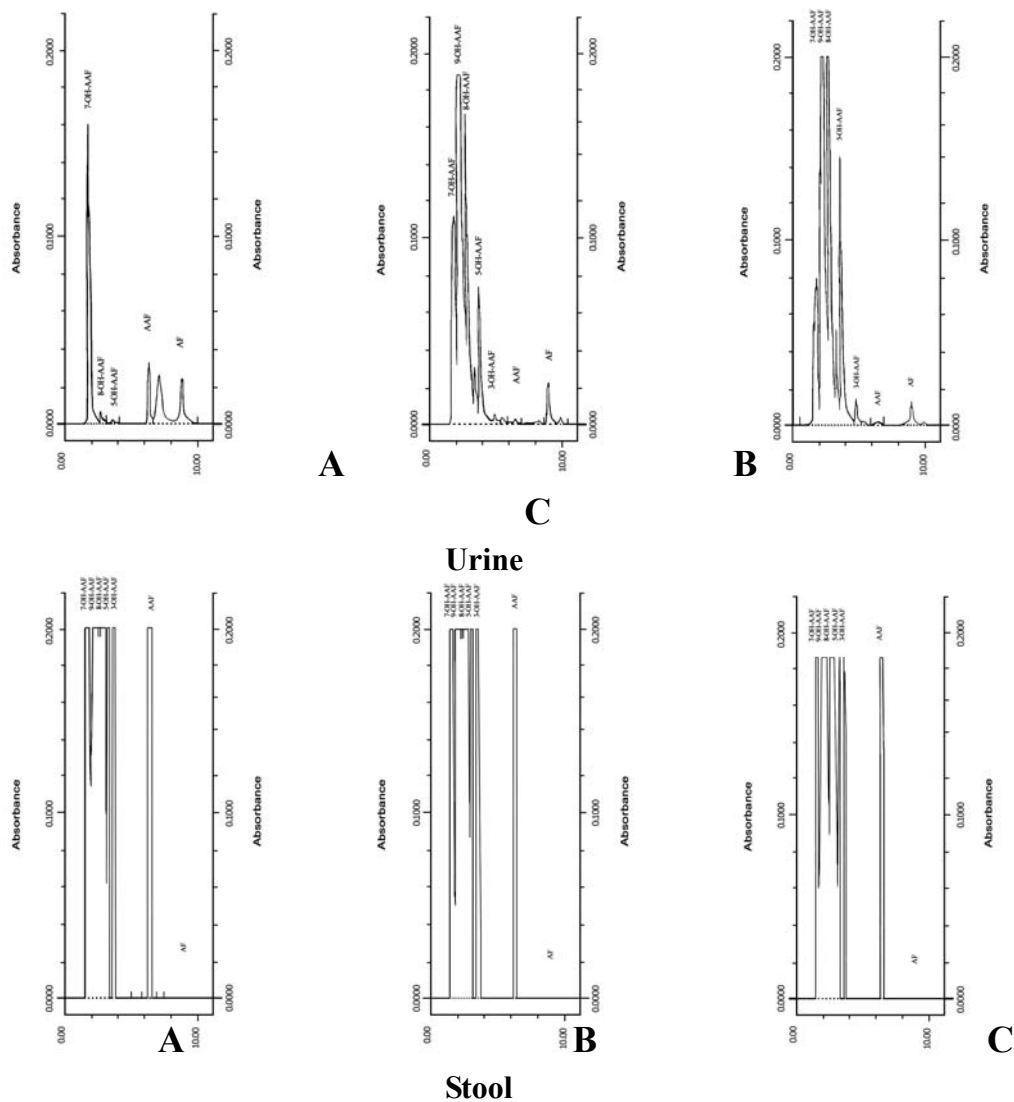


Figure 30. Effects of paclitaxel on AF and its metabolites in rat urine, stomach, colon, stool, blood, liver, kidneys and bladder. Rats received AF only, paclitaxel pretreated for 24 hour then treated with AF for 24 hour later, and paclitaxel and AF at the same time, the samples (urine, stomach, colon, stool, blood, liver, kidneys and bladder) from rats were collected. After extract and centrifugal procedure, AF and its metabolites were measured by HPLC assay as described in "Materials and Methods". All specimens were run in triplicate. The entire peak of AF and its metabolites of each profile were shown.

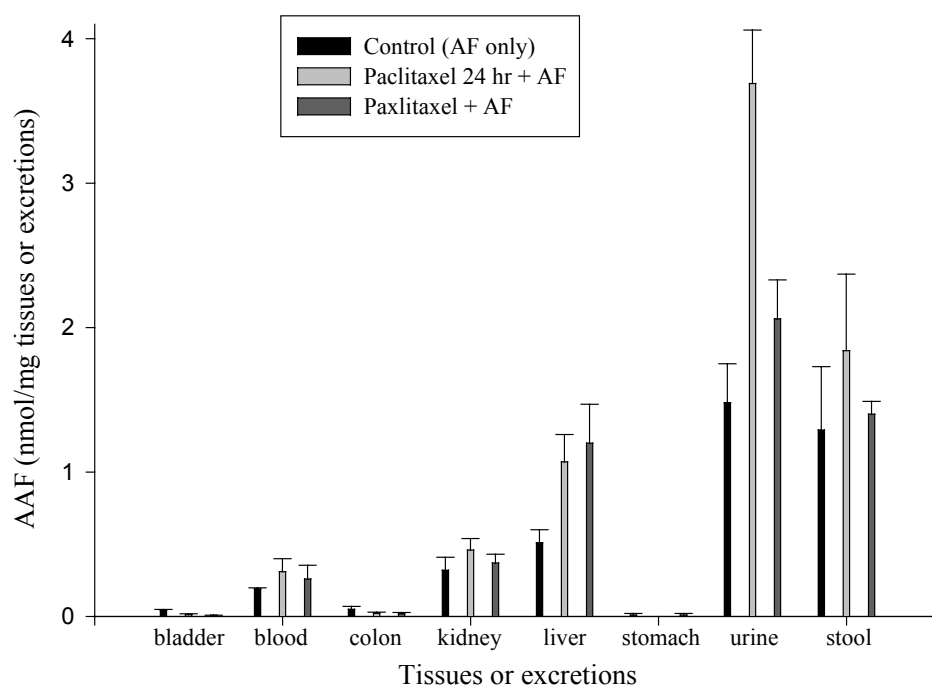


Figure 31. Effects of paclitaxel on N-acetylation of AF by different tissues of SD rats. Oral treatment of AF with or without 60 mM paclitaxel for 24 hour. Collected samples, extracted with ethyl acetate with methanol (95:5%), centrifugated, and dried vacuum down under speed. Then dissolved in methanol and assayed by HPLC. Different between AF treated and AF with paclitaxel pretreated/AF and paclitaxel cotreated in the same group. * $p < 0.05$.

第五章 討論

本論文除了研究paclitaxel對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的活性、基因表現和AF-DNA鍵結衍生物的形成，所造成之影響。也利用流式細胞計數儀分別分析paclitaxel引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞凋亡，是否經由caspase-3的活化。再探討paclitaxel在SD大白鼠中，影響AF的N-乙醯化和DNA-AF鍵結衍生物形成的量，以及各個組織中影響化學致癌物AF的分佈和代謝。

NAT已正式與芳香胺類化合物的致癌作用有相關性¹¹⁻¹⁴，當個體暴露到含化學致癌物，如芳香胺類化合物的環境下，若個體NAT的活性升高，則個體罹患癌症的機會也會增加²⁸。而當個體肝內NAT活性改變，與個體中不同癌症的發生率亦有直接關聯¹⁵，目前已報告的有乳癌⁹⁴和膀胱癌等⁵⁹。我們知道NAT之活性被抑制，即可減少芳香胺類的乙醯化，也就是減少DNA鍵結衍生物之形成，因而相對的突變的機率也減少。因此，化學致癌物和DNA鍵結衍生物是決定該化學致癌物能否引起癌症重要因素之一。目前，對於降低NAT能否降低癌症產生，也是許多學者研究的主要課題之一，而paclitaxel則顯示具有減少芳香胺類的乙醯化和DNA鍵結衍生物的藥效。

藥物或化學物質抑制酵素的功能效應有三種情形：(1) 改變Km而不改變Vmax，稱為競爭性抑制劑 (competitive inhibitor)；(2) 改變Vmax而不改變Km，稱為非競爭性抑制劑 (noncompetitive inhibitor)；(3) 同時改變Km和Vmax，稱為無競爭性抑制劑 (uncompetitive inhibitor)。本研究結果顯示，人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 及正常SD大白鼠之血液、肝臟、肺臟、膀胱及大腸之細胞質液之NAT的Km和Vmax值，均被paclitaxel最終濃度50 μ M有意義地抑制，此抑制屬非競爭性之抑制。也可說是paclitaxel可改變NAT的Km和Vmax值。

大部分的抗癌藥通常是抑制細胞週期中的S期，因S期是DNA的複製期 (合成期)；而降低S期的比率，就能抑制癌細胞株複製的能力。本研究paclitaxel對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞週期之抑制結果顯示：paclitaxel引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞週期都停止在G2/M期，這和其他學者的研究報告一致³⁶⁻³⁹。又我們也發現，paclitaxel皆引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞凋亡，且和時間與劑量呈現相關；同時進一步發現，加入caspase-3的抑制劑z-VAD-FMK，paclitaxel引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 和血癌細胞株 (HL-60) 的細胞凋亡和caspase-3的活性，比不加入的顯著降低。

由此可知，paclitaxel會引起人類骨癌細胞株（U-2 OS）和血癌細胞株（HL-60）的細胞週期停止在G2/M期以及細胞凋亡，而這其中經過caspase-3的活化。至於這其中整個過程的因果關係和詳細機轉，則需要更進一步的研究與探討。是否仍有其它的內切酶及酵素涉入其中，仍是一大課題。多少基因和蛋白參與其中的訊息傳導。更是未來努力的方向。

觀察餵食paclitaxel有或無的SD大白鼠體，對於餵食AF，經SD大白鼠體內NAT作用後，檢測尿中、糞中及體內各個特定組織中之AAF量。以及paclitaxel對SD大白鼠NAT之乙醯化及AF和其代謝物在體內特定組織之分佈情形。結果顯示paclitaxel對正常SD大白鼠之血液、肝臟、肺臟、膀胱、大腸及單核白血球NAT之活性皆會降低，而且也會影響SD大白鼠的血液、肝臟、肺臟、膀胱、大腸等各個組織中及排泄物之化學致癌物AF的分佈和其代謝物。數據也顯示，paclitaxel降低AF-DNA鍵結衍生物的形成；AF-DNA鍵結衍生物的量，在肝臟比在肺臟高，在肺臟比在膀胱高，在膀胱比在大腸高，在大腸比在白血球高。隨著時間增加，AF-DNA鍵結衍生物在白血球和肝臟降低；但是在肺臟，膀胱和大腸則表現相反。paclitaxel處理的實驗組比對照組，則明顯降低AF-DNA鍵結衍生物。

SD大白鼠的血液、肺臟、膀胱、大腸和肝臟含有NAT⁹⁵，肝臟更是主要解毒和代謝中心，所以一般討論芳香胺類化合物代謝情形，主要著重於肝臟。而血液能運送已被肝臟代謝的致癌物到其他的標的和非標的器官⁹⁶，使該乙醯化的AF易與標的器官內的DNA結合而形成DNA鍵結衍生物，進而使器官產生病變。另一方面，血液也能將致癌物質的代謝物經由人體的循環系統而轉移到排泄系統，最後再將特定的代謝物質帶出體外。

關於生物體外試驗，肝臟所含的NAT活性較強，較容易檢測，是最早被研究的器官，其次為尿液和糞便代謝物¹³。但其他研究報告指出，在小老鼠肝臟以外的組織有著比肝臟更高的乙醯化能力，尤其是淋巴結，主要是因為淋巴結的組織內部含有大量的白血球細胞，相對的含有較多量的NAT。所以，在生物體外的檢測人類骨癌細胞株（U-2 OS）、血癌細胞株（HL-60）及正常SD大白鼠的肝臟、肺臟、膀胱、大腸和白血球的NAT，證明paclitaxel確實能抑制這些組織中的NAT活性。而NAT含量減少時，AAF的含量也減少，相對的形成DNA鍵結衍生物的機會也減少，因而形成癌症的機率也減少。使個體暴露於化學致癌物的環境時，不能減少NAT的量，但減少NAT的活性，就能降低產生最終致癌物的危險。但是，paclitaxel是否有防癌的功效、劑量要用多少、多久及要怎麼用等等，都需要進一步的實驗和探討。

關於生物體內試驗，當化學致癌物經由灌食進入SD大白鼠的消

化系統到達體內後，會經體內循環系統（血液），將其未代謝及已代謝的致癌物質帶到排泄和泌尿系統，攜出體外和帶入特定的標的器官，進而使特定器官產生病變。當藥物進入人體內時，會干擾化學致癌物在體內的代謝分佈⁵⁴。目前已證實有些藥物可影響NAT的活性，因此本一系列實驗最後即是研究，paclitaxel對生物體內AF的代謝影響。此實驗的實驗動物為SD大白鼠，由胃直接灌食致癌物及paclitaxel觀測結果。

動物的排泄物及臟器中存在著許多已代謝及未代謝的產物⁹⁷，若這些產物本身為有害物質或經體內的化學反應而成為有害物質，若沒有隨著人體排泄系統排出體外，或本身器官的代謝功能不好，導致此器官累積有害的代謝或未代謝產物因而產生癌症⁹⁸。目前已知藥物或致癌物進入生物體內可能經由以下幾點因素來影響及在動物體內所引起的病變：（1）該藥物或致癌物如何被代謝及如何分佈和排出體外等之動力學。（2）排出的路線和殘留在體內的數量。（3）與DNA的結合能力及DNA修補能力之大小。（4）與目標致癌基因結合的能力。（5）影響細胞內特定的酵素活性。

芳香胺類化合物AF的代謝產物首先為乙酰化的AAF，早期的報告指出兔子的肺及肝中堆積太多的AF和AAF，會使這兩種器官上的DNA產生改變⁹⁹。若就複雜的生物體內系統而言，將AF的代謝產物AAF去乙酰化（deacetylation）後，對人體產生的傷害，小於其它的代謝產物^{15,100-102}。AF的代謝產物除了AAF外，其他代謝產物被証實的尚有、1-OH-AAF、1-OH-AAF、3-OH-AAF、5-OH-AAF、7-OH-AAF、8-OH-AAF、9-OH-AAF，這些代謝物並非需要全部累積才會使某些器官產生病變，單獨的AF代謝產物經人體代謝後的7-OH-AAF，被証實會導致神經病變¹⁰³，而人體肝細胞中AF與其他代謝產物代謝後的產量與大鼠非常相似¹⁰⁴。所以，本研究採取SD大白鼠為實驗動物，進一步來對照生物體外試驗人類骨癌細胞株（U-2 OS）和血癌細胞株（HL-60）的實驗。實驗的結果顯示paclitaxel有抑制及減少AF在SD大白鼠體內代謝的情形，當然是否能抑制該特定器官癌症的產生，仍需進一步做體內試驗的探討。

本研究結果顯示，如果paclitaxel給藥24小時後再灌食AF，再經24小時後後，則膀胱、血液、腎臟、胃、大腸、肝臟等組織之AAF及其總代謝產物顯示有意義地減少；若paclitaxel與AF同時灌食24小時後，其尿液及糞便的AAF及其代謝產物，也皆有意義地減少；其機轉為paclitaxel抑制了NAT活性，故代謝產物的產生有意義地減少。同時，paclitaxel增加尿和大便中AF代謝物的排泄；而尿和大便中最主要的排泄代謝物是9-OH-AAF。肝臟是最主要的代謝中心，而在肝臟中最主要的殘留代謝物也是9-OH-AAF。從實驗的HPLC的結果得知，在SD

大白鼠的尿液、糞便排泄物中所含的代謝產物為最多，其次為具解毒、代謝功能的肝臟，再其次為具排泄功能的腎臟，然後才是具流動性的血液，最後是胃、大腸及膀胱中所含的代謝產物之分佈。由於許多致癌物的致癌或病變的原因是代謝產物造成的，故代謝產物由大小便排出越多越好，在器官和組織蓄積含量越少越好。

第六章 結論

N-乙醯化被認為是芳香胺類 (arylamine) 代謝的第一步，而這是被一種所謂的芳香胺類 NAT 所完成。NAT 是利用乙醯輔酶 A，來當乙醯基的供應者。人類流行病學的研究顯示，NAT 的活性和膀胱癌及大腸直腸癌的發生率有相關性。而 paclitaxel 曾經被研究顯示具有抗腫瘤和抗癌的活性。利用高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 來檢測乙醯化的 AF 和 PABA 以及未乙醯化的 AF 和 PABA，反轉錄酶聚合酶連鎖反應及流式細胞計數儀分析，結果發現 paclitaxel 在人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 中，抑制 NAT 的活性、基因的表現和 AF-DNA 鍵結衍生物的形成，而且呈現跟劑量相關。同時也顯示 paclitaxel，明顯降低人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 中的 K_m 和 V_{max} 值，是故 paclitaxel 對 NAT 是一種無競爭性的抑制者。另外，我們也發現 paclitaxel 在人類血癌細胞株 (HL-60) 中，抑制 NAT 的活性、基因的表現和 AF-DNA 鍵結衍生物的形成，而且呈現跟劑量相關。同時，paclitaxel 明顯降低人類血癌細胞株 (HL-60) 中的 K_m 和 V_{max} 值。所以，paclitaxel 對 NAT 是一種無競爭性的抑制者。本篇報告是第一個描述 paclitaxel 影響人類血癌細胞株 (HL-60) 中 NAT 的活性、基因的表現和 AF-DNA 鍵結衍生物的形成。

Paclitaxel 是一種從太平洋紫杉樹皮分離出來的成分，被我們發現在人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 具有抑制 NAT 活性和基因表現及鍵結衍生物的合成。目前為止，只有一篇文獻告有關 paclitaxel 對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 具有抑制細胞生長和細胞週期停止在 G2/M 期。我們知道細胞凋亡的起始，牽涉很多重要的調節蛋白。為了更進一步了解 paclitaxel 對人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 之細胞週期的影響及細胞凋亡，我們利用西方點墨試驗和流式細胞計數儀來分析。我們發現：(1) paclitaxel 引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 的細胞週期停止在 G2/M 期；(2) paclitaxel 引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 的細胞凋亡，且和時間與劑量呈現相關；(3) 加入 caspase-3 的抑制劑 z-VAD-FMK，paclitaxel 引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 的細胞凋亡和 caspase-3 的活性，比不加入的顯著降低。由此可知，paclitaxel 會引起人類骨癌細胞株 (U-2 OS) 的細胞週期停止在 G2/M 期以及細胞凋亡，而這其中經過 caspase-3 的活化。又 Paclitaxel 也被發現在人類血癌細胞株 (HL-60) 具有抑制細胞生長和細胞週期停止在 G2/M 期。我們也利用流式細胞計數儀來分析發現：(1) paclitaxel 確實引起人類血癌細胞株 (HL-60) 的細胞週期停止在 G2/M 期；(2) paclitaxel 確實引起人類血癌細胞株 (HL-60) 的細胞凋亡，且和時間與劑量呈現相關；(3) 加入 caspase-3 的抑制劑 z-VAD-FMK，paclitaxel 引起人類

血癌細胞株 (HL-60) 的細胞凋亡和 caspase-3 的活性，比不加入的顯著降低。由此可知，paclitaxel 也會引起人類血癌細胞株 (HL-60) 的細胞週期停止在 G2/M 期以及細胞凋亡，而這其中也經過 caspase-3 的活化。

另外，為了探討 paclitaxel 在 SD 大白鼠體內 AF 的 *N*-乙醯化情形和 AF-DNA 鍵結衍生物的分佈狀況。利用體內實驗，SD 大白鼠先給于 paclitaxel (50 mg/kg) 處理 48 小時後，再給于 AF (50 mg/kg)，發現在尿及大便中分別減少 28% 和 43% 的 AAF 復原，也就是減少 22% 從 AF 到 AAF 的代謝清除率。paclitaxel 不會影響 NAT 在血液，肝臟，肺臟，大腸和膀胱活性的 Michaelis-Menten 參數值。同樣的，AF 在各個測試組織中的 *K_m* 值不被 paclitaxel 所影響。然而，肝臟之 NAT 活性，在被 paclitaxel 處理過後的 *V_{max}* 值有明顯降低。接受 AF 的 SD 大白鼠，不管有沒有 paclitaxel 之前處理，檢測標的組織中 (如：肝臟、大腸和膀胱)，以及非標的組織中 (如：肝臟和循環中的白血球) 之 AF-DNA 鍵結衍生物，發現被 paclitaxel 前處理過的，在各個組織中的 AF-DNA 鍵結衍生物都被降低。這是我們首先發現 paclitaxel 在 SD 大白鼠，會影響 AF 的分佈和 *N*-乙醯化以及 DNA 鍵結衍生物的體內試驗。

同時我們也在 SD 大白鼠體內檢測 paclitaxel 是否會影響化學致癌物 AF 的分佈和代謝。以高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 偵測 AF、乙醯化的 AF 和 AF 代謝物。只給于 AF (對照組)、AF 和 paclitaxel 同時給于、paclitaxel 前處理 24 小時後再給于與 AF 三組，經過 24 小時，尿、大便和組織，如：肝臟、腎臟、胃、大腸、膀胱和血液，被收集來分析 AF 和它的代謝物。比較對照組，paclitaxel 增加尿和大便中 AF 代謝物的排泄。而尿和大便中最主要的排泄代謝物是 9-OH-AAF。肝臟是最主要的代謝中心，而在肝臟中最主要的殘留代謝物也是 9-OH-AAF。

參考文獻：

1. Freeman CS, Kimes BW, Martin MR, Marks CL. An overview of tumor biology. *Cancer Invest* 1989;7:247-65.
2. Quintanilla M, Brown K, Fee F, Young S, Balmain A. Growth factors, tumor promoters, and cancer genes: oncogene mutation and amplification during initiation and progression stages of mouse skin carcinogenesis. 1998;257-66.
3. Lin JK, Liang YC, Lin-Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 1999;58:911-5.
4. Friedman MA, Carter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. *J Surg Oncol* 1972;4:482-510.
5. Benjamin RS, Chawla SP, Carrasco CH, et al. Primary chemotherapy of sarcomas. *Semin Orthoped* 1991;6:233.
6. Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, Applewhite A, Vlamis V, Rosen G. Chemotherapy for non-metastatic osteogenic sarcoma: the memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* 1992;10:5-15.
7. Appelbaum FR, Gilliland DG, Tallman MS. The biology and treatment of acute myeloid leukemia. In McArthur JR, Schechter GP, Schrier SL (eds.), *Hematology 1998: The American Society of Hematology education program book*. Washington DC: The American Society of Hematology 1988:63-88.
8. Larson RA, Stock W, Hoelzer DF, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia in adults. *Hematology 1998: The American Society of Hematology education program book*. Washington DC: The American Society of Hematology 1988:44-62.
9. Adamson R, Gustafsson JA, Ito N, Nagao M, Sugimura T, Wakabayashi K, Yamazoe Y. Heterocyclic amines in cooked foods. *Pro. 23rd Int. Princess Takamatsu Cancer Research Fund*. Princeton Scientific, Princeton, NJ 1995;1-360.
10. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000;464:65-76.
11. Levy GN., Chung., Weber WW. 2-aminofluorene metabolism and DNA adduct formation by mononuclear leukocytes from rapid and

- slow acetylator mouse strains. *Carcinogenesis*. 1994;15:353-7.
12. Lower GM Jr. Concepts in causality: chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer* 1982;49:1056-66.
 13. Weber WW. The acetylator genes and drug response. Oxford University Press New York, 1987;21-55.
 14. Levy GN, Chung JG, Weber WW. 2-aminofluorene metabolism and DNA adduct formation by mononuclear leukocytes from rapid and slow acetylator mouse strains. *Carcinogenesis* 1994;15:353-7.
 15. Weber WW, Hein DW. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev* 1985;37:25-79.
 16. Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Hein DW. Cloning, expression, and functional characterization of rapid and slow acetylator polymorphic N-acetyltransferase encoding genes of the Syrian hamster. *Pharmacogenetics* 1996;6:55-66.
 17. Lang NP, Chu DZ, Hunter CF, Kendall DC, Flammang TJ, Kadlubar FF. Role of aromatic amine acetyltransferase in human colorectal cancer. *Arch Surg* 1987;121:1259-61.
 18. Ilett KF, David BM, Detchon P, Castleden WM, Kwa R. Acetylator phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1987;47:1466-9.
 19. Minchin RF, Kadlubar FF, Ilett KF. Role of acetylation in colorectal cancer. *Mutat Res* 1993;290:35-42.
 20. Miller EC, Miller JA. Search for the ultimate chemical carcinogens and their reaction with cellular macromolecules. *Cancer* 1981;47:2327-45.
 21. Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Kahn MA. The role of N-acetyltransferase phenotype in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 1982;2:842-5.
 22. Hein DW. Acetylator genotype and arylamine induced carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1988;948:37-66.
 23. Kadlubar FF, Badawi AF. Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Lett* 1995;82-83:627-32.
 24. Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP, Kadlubar FF. Role of aromatic amine acetyltransferase, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder. *Cancer Res* 1995;55:5230-7.
 25. Risch A, Bathers S, Sim E. N-acetylation genotype is a susceptibility

- factor in occupation and smoking related bladder cancer. *Human Molecular Gene* 1995;4:231-6.
26. Lee JH, Chung JG, Lai JM, Levy GN, Weber WW. Kinetics of arylamine N-acetyltransferase in tissue from human breast cancer. *Cancer Lett* 1997;111:39-50.
 27. Weber WW, Levy GN, Hein DW. Acetylation. In *Conjugation reactions in drug metabolism*. Taylor and Francis, London, 1990;161-3.
 28. Einisto P, Watanabe M, Ishidate M Jr, Nohmi T. Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutat Res* 1991;259:95-102.
 29. Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl* 1995;22:169-80.
 30. Chung JG, Levy GN, Weber WW. Distribution of 2-aminofluorene and p-aminobenzoic acid N-acetyltransferase activity in tissues of C57BL/6J rapid and B6.A-NatS slow acetylator congenic mice. *Drug Metab Dispos* 1993;21:1057-63.
 31. Chung JG, Lee JH, Lai YS, Liu YH, Ho CC, Hung CF. Kinetics of acetyl CoA: arylamine N-acetyltransferase from human hepatocellular carcinoma. *Res Commun Pharmacol Toxicol* 1997;2:105-19.
 32. Chen GW, Chung JG, Hsieh CL, Lin JG. Effects of garlic component diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity in human colon tumor cells. *Food Chem Toxicol* 1998;36:761-70
 33. Wu LT, Chung JG. Effects of Vitamin C on arylamine N-acetyltransferase activity in human liver tumors cells. *Anticancer Res* 1998;18:3481-6.
 34. Chung JG, Chang HL, Lin WC, Yeh FT, Hung CF. Effects of ibuprofen on arylamine N-acetyltransferase activity in human colon tumor cells. *J Appl Toxicol* 1999;19:1-6.
 35. Chung JG. Effects of garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumor cells. *Drug Chem Toxicol* 1999;22:343-58.
 36. Chung JG. Paeonol promotion of DNA adduct formation and arylamines N-acetyltransferase activity in human colon tumour cells. *Food Chem Toxicol* 1999;37:327-34

37. Chung JG, Wu LT, Chu CB, Jan JY, Ho CC, Tsou MF, Lu HF, Chen GW, Lin JG, Wang TF. Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumor cells. *Food Chem Toxicol* 1999;37:319-26.
38. Yeh CC, Chung JG, Wu HC, Chang HL, Yeh FT, Hung CF. Effects of aspirin on arylamine N-acetyltransferase activity and DNA adducts in human bladder tumour cells. *J Appl Toxicol* 1999;19:389-94.
39. Chung JG, Chang HL, Lin WC, Wang HH, Yeh CC, Hung CF, Li YC. Inhibition of N-acetyltransferase activity and DNA-2-aminofluorene adducts by glycyrrhizic acid in human colon tumor cells. *Food Chem Toxicol* 2000;38:163-72.
40. Guo W, Zeng C, Dong F, Lei W. Paclitaxel-induced apoptosis in osteosarcoma cell line U-2 OS. *Chin Med J* 2002;115:1796-801.
41. Lieu CH, Chang YN, Lai YK. Dual cytotoxic mechanisms of submicromolar taxol on human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1587-96.
42. Pae HO, Yoo JC, Choi BM, Kang CL, Kim JD, Chung HT. Apoptotic cell death induced by taxol is inhibited by nitric oxide in human leukemia HL-60 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999;21:667-82.
43. Tseng CJ, Wang YJ, Liang YC, Jeng JH, Lee WS, Lin JK, Chen CH, Liu IC, Ho YS. Microtubule damaging agents induce apoptosis in HL 60 cells and G2/M cell cycle arrest in HT 29 cells. *Toxicology* 2002;175:123-42.
44. Chabner BA, Collins JM. *Cancer chemotherapy: principles and practice*. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1990;545.
45. Dorr RT, van Hoff J, eds. *Cancer chemotherapy handbook*. Norwalk CT: Appleton & Lange, 1994;1020.
46. Perry MC, ed. *The chemotherapy source book*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996;1518.
47. Tannock IF, Hill RP, eds. *The basic science of oncology*. New York: McGraw-Hill, 1998;539.
48. USP DI oncology drug information. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Distributed by Association of Community Cancer Centers, Rockville, MD 1998;517.
49. Chung JG, Lee JH, Ho CC, Lai JM, Hung CF, Huan SC. A survey of arylamine N-acetyltransferase in common fruits and vegetables. *J Food Biochemistry* 1997;20:4.

50. Fang SH, Chung JG, Chang WC, Chang SS. *Candida albicans* arylamine N-acetyltransferase and characterization. *Toxicol Lett* 1997;92:109-16.
51. Watanabe M, Sofuni T, Nohmi T. Involvement of Cys69 residue in the catalytic mechanism of N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium*. Sequence similarity at the amino acid level suggests a common catalytic mechanism of acetyltransferase for *S. typhimurium* and higher organisms. *J Biol Chem* 1992;267:8429-36.
52. Chung JG, Kuo HM, Lin TH, Ho CC, Lee JH, Lai JM, Levy GN, Weber WW. Evidence for arylamine N-acetyltransferase in the nematode *Anisakis simplex*. *Cancer Lett* 1996;106:1-8.
53. Ho CC, Lin TH, Lai YS, Chung JG, Levy GN, Weber WW. Kinetics of acetyl coenzyme A: arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylators of frog tissues. *Drug Metab Dispos* 1996;24:137-41.
54. Ho CC, Chung JG, Lee JH, Lai CM, Shih MC, Lai YS, Hung CF. Kinetics of acetyl coenzyme A: arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylators of fish tissues. *Toxicol Environ Chem* 1999;69:469-79.
55. Hearse DJ, Weber WW. Multiple N-acetyltransferase and drug metabolism, tissue distribution, characterization and significance of mammalian N-acetyltransferase. *Biochem J* 1973;132:519-26.
56. Hein DW, Omichinski JG, Brewer JA, Weber WW, Rustan JD, Furman EJ, Martin WJ. Extrahepatic expression of the N-acetylation polymorphism toward arylamine carcinogens in tumor target organ of an inbred model. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;258:232-6.
57. Hein DW, Omichinski JG, Brewer JA, Weber WW. A unique pharmacogenetic expression of the N-acetylation polymorphism in the inbred hamster. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;220:8-15.
58. Hammons GJ, Guengerich FP, Weis CC, Beland FA, Kadlubar FF. Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog, and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Res* 1985;45:3578-85.
59. Glowinski IB, Weber WW. Biochemical characterization of genetically variant aromatic amine N-acetyltransferase in A/J mice. *J Biol Chem* 1982;257:1431-7.
60. Chang FC, Chung JG. Evidence for arylamine N-acetyltransferase activity in the *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 1998;36:125-30.

61. Chung JG, Wang HH, Wu LT, Chang SS, Chang WC. Inhibitory actions of emodin on arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Food Chem Toxicol* 1997;35:1001-7.
62. Chung JG, Wang HH, Tsou MF, Hsieh SE, Lo HH, Yen YS, Chang SS, Wu LT, Lee JH, Hung CF. Evidence for arylamine N-acetyltransferase activity in the bacterium *Helicobacter pylori*. *Toxicol Lett* 1997;91:63-71.
63. Ho CC, Lai YS, Tsai HY, Chung JG. Effects of ellagic acid on arylamine N-acetyltransferase activity in human colon tumor cells. *Toxicol Environ Chem* 1999;69:509-19.
64. De Melo MP, Curi TC, Curi R, Di Mascio P, Cilento G. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. *Photochem Photobiol* 1997;65:338-41.
65. Schoket B, Papp G, Levay K, Mrackova G, Kadlubar FF, Vincze I. Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutat Res* 2001;482:57-69.
66. Thompson PA, Seyedi F, Lang NP, MacLeod SL, Wogan GN, Anderson KE, Tang YM, Coles B, Kadlubar FF. Comparison of DNA adduct levels associated with exogenous and endogenous exposures in human pancreases in relation to metabolic genotype. *Mutat Res* 1999;424:263-74.
67. Culp SJ, Roberts DW, Talaska G, Lang NP, Fu PP, Lay JO Jr, Teitel CH, Snawder JE, Von Tungeln LS, Kadlubar FF. Immunochemical, ³²P-postlabeling, and GC/MS detection of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human peripheral lung in relation to metabolic activation pathways involving pulmonary N-oxidation, conjugation, and peroxidation. *Mutat Res* 1997;378:97-112.
68. Vineis P, Schulte PA. Schulte. Scientific and ethical aspects of genetic screening of workers for cancer risk: the case of the N-acetyltransferase phenotype. *J Clin Epidemiol* 1995;48:189-97.
69. Ishizu S, Hashida C, Hanaoka T, Maeda K, Ohishi Y. N-acetyltransferase activity in the urine in Japanese subjects: comparison in healthy persons and bladder cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:1179-81.
70. Fukutome K, Watanabe M, Shiraishi T, Murata M, Uemura H, Kubota Y, Kawamura J, Ito H, Yatani R. N-acetyltransferase 1 genetic polymorphism influences the risk of prostate cancer development.

- Cancer Lett 1999;136:83-7.
71. Hickman D, Risch A, Buckle V, Spurr NK, Jeremiah SJ, McCarthy A, Sim E. Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochem J* 1994;297:441-5.
 72. Grant DM, Blum M, Beer M, Meyer UA. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferase: a comparison of liver isozymes and expressed product of two cloned genes. *Mol Pharmacol* 1991;39:184-91.
 73. Grant DM, Blum M, Demierre A, Meyer UA. Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleic Acids Res* 1989;17:3978.
 74. Coroneos E, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase activity in human cultured cell lines. *Biochem J* 1993;294:481-6.
 75. Smith G, Stanley LA, Sim E, Strange RC, Wolf CR. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer Surv* 1995;25:27-65.
 76. Iain FT, Richard PH. *The basic science of oncology*. 2nd ed. McGraw-Hill, Inc. 1992;102-18.
 77. Duverger-van Bogaert M, Crutzen-Fayt MC, Stecca C. Activation of some aromatic amines to mutagenic products by human red blood cell cytosol. *Mutat Res* 1991;263:249-55.
 78. Schlenk D, Buhler DR. The in vitro biotransformation of 2-aminofluorene in the visceral mass of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Xenobiotica* 1990;20:563-72.
 79. Lenk W, Rosenbauer-Thilmann R. Metabolism of 2-acetyl-aminofluorene. I. Metabolism in vitro of 2-acetylaminofluorene and 2-acetylaminofluorene-9-one by hepatic enzymes. *Xenobiotica* 1993;23:241-57.
 80. Derewlany LO, Koren G. Biotransformation of carcinogenic arylamines and arylamides by human placenta. *J Lab Clin Med* 1994;124:134-41.
 81. Widlak P, Rzeszowska-Wolny J. Formation and removal of DNA adducts in liver of rats treated with hepatocarcinogens 2-aminofluorene or 2-acetylaminofluorene. *Acta Biochim Pol* 1991;38:145-50.
 82. Shibutani S, Grollman AP. Molecular mechanisms of mutagenesis by aromatic amines and amides. *Mutat Res* 1997;376:71-8.
 83. Ross JA, Leavitt SA. Induction of mutations by

- 2-acetylaminofluorene in lacI transgenic B6C3F1 mouse liver. *Mutagenesis* 1998;13:173-9.
84. Hsu JD, Hsu CL, Chou FP, Wen PH, Wang CJ. Potential effect of sodium nitrite on the expression of nuclear proto-oncogenes during 2-acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in rats [published erratum appears in *Chem Biol Interact*]. 1998;114:143.
 85. Bitsch A, Klohn PC, Hadjiolov N, Bergmann O, Neumann HG. New insights into carcinogenesis of the classical model arylamine 2-acetylaminofluorene. *Cancer Lett* 1999;143:223-7.
 86. Osamu U, Shigeyuki K, Kiyoshi T. Further metabolism of 2-formylaminofluorene, a metabolite of 2-aminofluorene, in rats. *Biol Pharm Bull* 1996;19:330-3.
 87. Chen J, Stampfer MJ, Hough HL, Garcia-Closas M, Willett WC, Hennekens CH, Kelsey KT, Hunter DJ. A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:3307-11.
 88. Hsia TC, Hung CF, Lu HF, Ho HC, Lu KH, Chung JG. Paclitaxel inhibited the 2-aminofluorene-DNA adducts formation and arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in human lung tumor cells. *Food Chem Toxicol* 2002;40:697-703.
 89. Funk JO. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 1999;19:4772-80.
 90. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-4.
 91. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Sci* 1994;266:1821-8.
 92. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycle and their control. *Annu Rev Biochem* 1992;61:441-70.
 93. Pines J. Arresting developments in cell-cycle control. *Trends Biochem Sci* 1994;19:143-5.
 94. Agundez JA, Ladero JM, Olivera M, Abildua R, Roman JM, Benitez J. Genetic analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in breast cancer patients. *Oncology* 1995;52:7-11.
 95. Siglin JC, Barch DH, Stoner GD. Effects of dietary phenethyl isothiocyanate, ellagic acid, sulindac and calcium on the induction and progression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 1995;16:1101-6.
 96. Alldrick AJ, Flynn J, Rowland IR. Effects of plant-derived flavonoids and polyphenolic acids on the activity of mutagens from cooked food. *Mutat Res* 1986 Dec;163(3):225-32

97. Robertson IG. The importance of 2-aminofluorene in the mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene. *Mutat Res* 1986;175:153-7.
98. Vanderslice RR, Boyd JA, Eling TE, Philpot RM. The cytochrome P-450 monooxygenase system of rabbit bladder mucosa: enzyme components and isozyme 5-dependent metabolism of 2-aminofluorene. *Cancer Res* 1985;45:5851-8.
99. Boyd JA, Eling TE. Evidence for a one-electron mechanism of 2-aminofluorene oxidation by prostaglandin H synthase and horseradish peroxidase. *J Biol Chem* 1984;259:13885-96.
100. Monteith DK, Strom SC. A comparison of the inhibition of deacetylase in primary cultures of rat and human hepatocytes effecting metabolism and DNA-binding of 2-acetylaminofluorene. *Cell Biol Toxicol* 1990;6:269-84.
101. Miller JA, Miller EC. Some historical aspects of N-aryl carcinogens and their metabolic activation. *Environ Health Perspect* 1983;49:3-12.
102. Razzouk C, Roberfroid M. Rabbit liver microsomal 2-acetylaminofluorene N-hydroxylase. *Toxicol Lett* 1983;18:115-20.
103. Stark KL, Harris C, Juchau MR. Modulation of the embryotoxicity and cytotoxicity elicited by 7-hydroxy-2-acetylaminofluorene and acetaminophen via deacetylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;97:548-60.
104. Rudo K, Meyers WC, Dauterman W, Langenbach R. Comparison of human and rat hepatocyte metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res* 1987;47:5861-7.

作者簡歷

姓名：呂克修

民國50年6月8日生

出生於台灣省南投縣

學歷：南投縣立雲林國民小學畢業

南投縣立竹山國民中學畢業

台灣省立台中第一高級中學畢業

中國醫藥學院醫學系畢業

中山醫學院醫學研究所碩士班畢業

經歷：中山醫學院附設醫院骨科主治醫師

日本帝京大學整形外科（骨科）研究員

日本岡山大學整形外科（骨科）研究員

現任：中山醫學大學醫學系專任講師

中山醫學大學附設醫院骨科部運動醫學科主任

地址：台中市西區西屯路一段72號3B

電話：04-22010453

中華民國九十二年六月

作者的論文研究：

A. 已接受和刊登的期刊論文 (*通訊作者)：

1. Hsieh YS, Yang SF, Chu SC, Chen PN, Chou MC, Hsu MC, **Lu KH***. Expression changes of gelatinases in osteoarthritic knee and the arthroscopic débridement. *Arthroscopy* (2003) **(SCI)** (accepted).
2. **Lu KH**, Yang SF, Chu SC, Chen PN, Chou MC, Hsiao TY, Hsieh YS*. The significance of altered expressions of gelatinases in the synovium of patient with arthritic effusions. *Clin Rheumatol* (2003) **(SCI)** (accepted).
3. **Lu KH***. Arthroscopically assisted replacement of the dynamic hip screw for unrecognized joint penetration of lag screw through a new portal. *Arthroscopy* (2003) **(SCI)** (accepted).
4. **Lu KH**, Cheng KC, Hsia TC, Lin KL, Wu CL, Chou MC, Chung JG*. Paclitaxel affects the amounts of the N-acetylation of 2-aminofluorene and DNA-2-aminofluorene adduct formation in Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 2003;17:137-44. **(SCI)**
5. **Lu KH***. Unusual solitary ganglion cysts of the anterior segment of the lateral meniscus. *Arthroscopy* 2003;19:E16. **(SCI)**
6. **Lu KH***. Unusual solid ganglia of the anterior cruciate ligament mimicking lateral meniscal tears. *Arthroscopy* 2003;19:E14. **(SCI)**
7. **Lu KH**, Lin KL, Yang CC, Hsia TC, Hsiao YM, Chou MC, Ho HC, Chung JG*. Paclitaxel affects gene expression and activity of arylamine N-acetyltransferase and DNA-2-aminofluorene adduct formation in human leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol* 2002;40:705-13. **(SCI)**
8. **Lu KH***. An unusual case of meniscal hematoma mimicking a medial meniscal cyst. *Arthroscopy* 2002;18:E22. **(SCI)**
9. Hsia TC, Hung CF, Lu HF, Ho HC, **Lu KH**, Chung JG*. Paclitaxel inhibited the 2-aminofluorene-DNA adducts formation and arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in human lung tumor cells. *Food Chem Toxicol* 2002;40:697-703. **(SCI)**
10. Hung CF, **Lu KH**. Vitamin C inhibited DNA adduct formation and arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in rat glial tumor cells. *Neurochem Res* 2001;26:1107-12. **(SCI)**

11. Chang IC*, Lin ZI, Hsiao YM, Hsiao TY, **Lu KH**, Wu CL. The difference management principles for extremity fractures between handgun, shotgun and rifle. *J Orthop Surg ROC* 2001;17:153-9.
12. **Lu KH***, Hsiao YM, Lin ZI. Arthroscopy for acute knee haemarthrosis in road traffic accident victims. *Injury* 1996;27:341-3. (SCI)
13. **Lu KH***, Hsiao YM, Lin ZI. Detection and surgical decompression for acute compartment syndromes in the extremities. *J Orthop Surg ROC* 1996;13:163-9.

B. 投稿文章 (*通訊作者) :

1. **Lu KH**, Lue KH, Hsia TC, Chou MC, Lin KL, Chung JG*. Oral administration of paclitaxel affects the distribution and metabolism of 2-aminofluorene in various tissues of Sprague-Dawley rats. *Phytomedicine* (2003) (SCI).
2. **Lu KH**, Yang SF, Lue KH, Chu SC, Chou MC, Hsiao TY, Hsieh YS*. The clinical significance of gelatinase B in gouty arthritis of the knee. *Clin Chim Acta* (2003) (SCI).
3. Chu SC, Yang SF, Lue KH, Chou MC, Hsu MC, **Lu KH***. The significance of gelatinase B in infectious arthritis of the native and replaced knee. *Clin Orthop* (2003) (SCI).
4. **Lu KH**, Wang DY, Hsiao YM, Chou MC, Lin KL, Chen YS, Chung JG*. Paclitaxel inhibited the arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS) were examined by PCR and flow cytometric analysis. *Anticancer Research* (2003) (SCI).
5. **Lu KH**, Lin KL, Hsia TC, Hung CF, Chou MC, Hsiao YM, Chung JG*. Tamoxifen affects gene expression and activity of arylamine N-acetyltransferase and DNA-2-aminofluorene adduct formation in human leukemia HL-60 cells. *Iran J Sci Technol* (2003) (SCI).
6. **Lu KH***. Subcutaneous pigmented villonodular synovitis due to portal contamination during knee arthroscopy. *Arthroscopy* (2003) (SCI).
7. **Lu KH***. Arthroscopic excision for large juxta-articular giant-cell tumor arising from the patellar tendon sheath of the knee. *Arthroscopy* (2003) (SCI).

8. Hsu MC, Lue KH, Lin ZI, **Lu KH***. Stress fracture at the junction of the middle and distal third of the ulnar diaphysis in a spinner bowler. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2003) **(SCI)**.
9. Hsu MC, Lue KH, Lin ZI, **Lu KH***. Juxta-articular osteoid osteoma mimicking internal derangement of the joint. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2003) **(SCI)**.

C. 尚未投稿文章 (*通訊作者) :

1. Paclitaxel induces G2/M arrest and apoptosis via caspase-3 activation in osteogenic sarcoma (U-2 OS) cells.
2. Induction of apoptosis by paclitaxel through caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells.

D. 目前的研究計畫 :

1. Regulation of matrix metalloproteinase-2 & 9 production by cytokines and pharmacological agents in human osteoarthritic meniscal, chondral and synovial cultures.
2. Effects of sodium hyaluronate on the gelatinases expression in human osteoarthritic cartilage, meniscus, and synovium.
3. Effects of steroids and NSAIDs on the gelatinases expression in human osteoarthritic cartilage, meniscus, and synovium.