

R  
008.8  
44>8

# 私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

## 第一部份

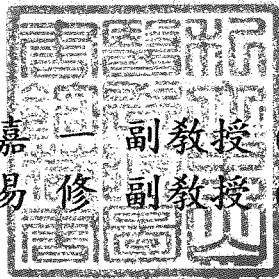
甘露醇對於巴拉刈及蒼朮酮對於Tert-Butyl  
Hydroperoxide 誘發大白鼠肝細胞DNA損傷保護作  
用之研究

**Inhibitory Effects of Mannitol on Paraquat and Atractylon on  
tert-butyl hydroperoxide Induced DNA Damage  
and Hepatic Toxicity in Rat Hepatocytes**

## 第二部份

食用紅色七號著色料對於巴拉刈誘發大白鼠肝細  
DNA損傷促進作用之研究  
**Promotion Effects of Erythrosine B on Paraquat Induced  
DNA damage and Hepatic Toxicity in Rat Hepatocytes**

指導教授： 朱嘉 副教授 (Chia-Yih Chu)  
謝易修 副教授 (Yih-Shou Hsieh)



研究生：黃俊銘 (Jin-Ming Hwang)

參考書恕不外借

中華民國八十五年一月



本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論文口試委員審核合格，並口試通過。

口試委員

私立高雄醫學院  
生化研究所教授

林信仁 教授

林信仁

私立中山醫學院  
生化研究所副教授  
(本論文指導教授)

朱嘉一 副教授

朱嘉一

私立中山醫學院  
生化研究所副教授  
(本論文指導教授)

謝易修 副教授

謝易修

中華民國八十五年一月三十日

# 誌謝

感謝天感謝地，我終於畢業了！除了無限的喜悅，還要感謝這兩年半來一路伴我學習成長的家人及良師益友，讓我從剛開始對實驗不甚熟悉以至於能以論文發表拿到學位的歡喜，實在不是筆墨所能形容，若不是有太多人的協助與幫忙，實在無法造就現今的我。謝謝您們，我只能以一顆感恩的心來表達對各位謝意，讓我能以穩健踏實的心前進，完成研究所的課業及碩士論文，並且更有自信在科學研究領域裏繼續探索。

在實驗過程中尤其要感謝我的指導教授朱嘉一老師、謝易修老師及時時關心照顧我的曾翠華老師，謝謝您們對我研究的啓發及實驗方法、技巧上及論文上的耐心指導，使我在實驗學習上獲益良多。在我一生中有許多人對我適時的幫助是我一生永遠無法忘懷的，在此我要感謝生化所所長王朝鐘老師及周芬碧老師，因您們在論文寫作文稿悉心指正，使我能勇敢踏出那艱巨的第一步，讓我能順利完成投稿之論文。而且能刊登在國外雜誌，這對我是種夢寐以求的理想，謝謝你們幫我達成這個夢想。

研究期間，感謝胡超群老師對論文的關心及林偉隆醫師在實驗病理切片部份的操作及判讀，而高而任同學在實驗過程中鼎力相助使我的實驗能順利完成。除此之外，我還必須再度感謝從旁支持我的最佳拍檔李妙真同學與不計辛勞為我跨刀相助林玉玲學姐、周秀琴小姐及高達偉學弟對實驗的關心與協助，我會永遠銘記在心。

文稿初成，特別感謝高雄醫學院生化研究所林信仁教授對本論文撥冗審查和口試論文並詳加斧正，在此謹申由衷致謝。

最後，謹以此論文獻給我敬愛的伯母淑媛女士、親愛的老婆文宏、我的寶貝瀚樞、吾友志尚、學妹秋慧與關愛我的家人及我最為懷念的伯父。

# 目 錄

	頁數
第一部份 (A)	
甘露醇對於巴拉刈誘發大白鼠肝細胞DNA損傷 保護作用之研究 -----	1
縮寫表 -----	2
中文摘要 -----	3
英文摘要 -----	4
一、緒論	
(一.) 研究背景 -----	5
(二.) 研究目的 -----	8
二、材料與方法	
(一). 化學試劑與儀器 -----	9
(二). 實驗動物 -----	10
(三). Mannitol對Paraquat急性毒性試驗之影響 --	10
(四). 初代肝細胞之培養 -----	10
(五). MTT法細胞活性分析 -----	11
(六). 肝細胞毒性分析 -----	11
(七). MDA生成濃度之分析 -----	13
(八). DNA損傷修補作用之測定 -----	15
三、結果 -----	18
四、討論 -----	20
五、參考文獻 -----	35

## 第一部份 (B)

蒼朮酮對於t-BHP誘發大白鼠肝細胞DNA損傷 保護作用之研究 -----	38
縮寫表 -----	39
中文摘要 -----	40
英文摘要 -----	41
一、緒論	
(一). 研究背景 -----	42
(二). 研究目的 -----	43
二、材料與方法	
(一). 化學試劑與儀器 -----	44
(二). 初代肝細胞之培養 -----	45
(三). MTT法細胞活性分析 -----	45
(四). 自由基捕捉測定 -----	46
(五). 肝細胞毒性分析 -----	47
(六). MDA生成濃度之分析 -----	47
(七). DNA損傷修補作用之測定 -----	48
三、結果 -----	49
四、討論 -----	51
五、參考文獻 -----	60

## 第二部份

紅色七號對於巴拉刈誘發大白鼠肝細胞DNA損傷 保護作用之研究 -----	63
縮寫表 -----	64
中文摘要 -----	65
英文摘要 -----	66
一、緒論	
(一.) 研究背景 -----	67
(二.) 研究目的 -----	69
二、材料與方法	
(一). 化學試劑與儀器 -----	70
(二). 實驗動物 -----	71
(三). Erythrosine對Paraquat急性毒性試驗之影響	71
(四). 初代肝細胞之培養 -----	71
(五). MTT法細胞活性分析 -----	72
(六). 肝細胞毒性分析 -----	72
(七). MDA生成濃度之分析 -----	73
(八). 蛋白質合成抑制試驗 -----	73
(九). 毛細電泳分析 -----	74
三、結果 -----	76
四、討論 -----	79
五、參考文獻 -----	95

# 第一部份 (A)

甘露醇對於巴拉刈誘發大白鼠肝細胞

**DNA**損傷保護作用之研究

## 縮寫表

**MT: Mannitol**

**PQ: Paraquat**

**LDH: Lactate dehydrogenase**

**ALT: Alanine aminotransferase**

**AST: Aspartate aminotransferase**

**MDA: Malondialdehyde**

**UDS: Unscheduled DNA synthesis**



## 中文摘要

甘露醇是茜草科植物“梔子”中主要成分之一，具有抗氧化作用。本研究採用能對初代培養肝細胞產生過氧化作用的化學除草劑巴拉刈(Paraquat; PQ)當作誘導劑，以誘發鼠肝細胞損傷，並分別在肝細胞加入巴拉刈之前、後或同時加入甘露醇處理，然後測定肝細胞培養基中LDH、AST、ALT等酵素含量及肝細胞分解物MDA濃度作為分析指標；進一步再利用非程序上DNA修補(UDS)的方法探討甘露醇對抗肝細胞DNA損傷的作用機制。由實驗結果顯示甘露醇具有抗肝細胞毒性的活性及抗脂質過氧化的作用；因此推論甘露醇對抗肝細胞DNA損傷的作用機制是經由甘露醇抑制肝細胞膜的脂質過氧化作用，另外亦可能是由於甘露醇捕捉了巴拉刈誘發肝細胞損傷所產生的氫氧自由基(Hydroxy radical)之去毒作用機制所致。

## Abstract

Mannitol, one of the main constituents of *Gardeniae fructus*, has an antioxidant effect. The purpose of the present study is to investigate the effects of mannitol on paraquat-induced lipid peroxidation and DNA damage in rat hepatocyte. The primary hepatocyte culture was pretreated with mannitol prior to the administration of paraquat, or vice versa, or simultaneously treated with mannitol and paraquat separately. The activities of LDH, AST and ALT were used as hepatic function markers and the activity of MDA as the index of lipid peroxidation. To further elucidate the inhibitory effect of mannitol on paraquat-induced DNA damage, the paraquat-induced DNA repair synthesis (UDS) in rat hepatocyte was studied. It was found that mannitol possessed both antihepatotoxic and antilipoperoxidant activities. The results suggested that the inhibitory mechanism of mannitol on paraquat-induced DNA damage was caused by the antilipoperoxidation effect of mannitol on the lipid of cell membrane, and the antitoxic effect in which mannitol scavenges the hydroxyl free radical produced by paraquat-induced hepatic cell damage.

# 一、緒論

## (一)、研究背景

近年來隨著醫學的進步，許多傳染病已經能夠防治，但肝炎至今仍是危害性最大的一種疾病，在台灣慢性肝炎及肝硬化佔台灣地區十大死亡原因之第六位(1)而B型肝炎帶原率佔世界第一位(2)。今日醫學研究指出肝炎是由病毒、酒精、脂肪過氧化物、食物中毒、肝毒性藥物所引起(3)，然而環顧目前醫學界，治療肝炎仍缺乏適當藥物的治療，一般除臨床休息和補充營養的食物控制外，雖有免疫抑制法及抗病毒藥物如 Interferon (4) 的使用，然而此等療法均尚在試驗階段，可是天然物中則有不少對肝炎有效的藥物(5)，所以由天然物中尋求一有效治療肝炎的藥物，實為當前刻不容緩的事。

氧是細胞生存不可或缺的物质，但是當細胞發生不正常的代謝過程中，卻是造成細胞死亡之殺手，而許多毒性物質 (Toxic agent) 在進入細胞中往往會造成過量的活性氧系 (Reactive oxygen species; ROS) 的產生，如超氧陰離子 (Superoxide anion;  $O_2^{\cdot-}$ )，單氧 (Singlet oxygen;  $^1O$ )，氫氧自由基 (Hydroxyl radical;  $OH^{\cdot}$ )，過氧化氫 (Hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) 等，而 ROS 的產生量如果超過細胞本身抗氧化能力 (Cellular antioxidant capacity) 的時候則會導致細胞脂質的過氧化 (Lipid peroxidation)，以及蛋白質、RNA、DNA 的損傷、突變 (6、7)，而這些傷害則可能是造成癌化、心血管疾病，甚至老化都有一定的相關性。

甘露醇 (Mannitol; Fig 1) 是梔子中主要化學成分之一，分子結構上屬於糖醇類 (Sugar alcohol)，是一種抗氧化劑，具有抗氧化

的作用(8)。梔子 ( *Gardeniae Fructus*; Fig 2 ) 係茜草科 ( *Rubiaceae* ) 植物梔子樹 ( *Gardenia Jasminoides* Ellis ) 的乾燥成熟果實及其它同屬植物多分布於印度支那、大陸、日本西南部、琉球、菲律賓、台灣等地，海拔大約1600公尺左右之闊葉林區。在不同年代及地區有其不同之異名：

[別名]：木舟(本經)、越桃(別錄)、梔子(綱目)、鮮支(綱目)、山去氫梔子、山黃梔、枝子、色枝、Shan-jee-chee (香港)、*Gardenia* (英)、*Fructus Gardeniae* (9)。

梔子始載於我國第一部本草典籍—神農本草經之木部中品，在天然藥物方面應用甚多，尤其在中藥方劑上如黃蓮解毒湯、茵陳蒿湯、梔子乾姜湯等，被收載的方劑多達47個。其性寒、味苦、入心、肺、三焦三經，其功能為清熱瀉火、利尿、止血，效用方面民間多以治熱病，心煩懊惱、黃疸、淋病、消渴、目赤熱痛、吐血等症(10)。

巴拉刈 (Paraquat，學名 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridylium ) 是一種極有效而廣泛被使用之除草劑，常因使用不當，或誤食而造成許多全身性毒性病例，此因巴拉刈的氧化作用可造成肝、腎、肺等器官的破壞(11)。巴拉刈的除草機制乃藉著干擾細胞內電子傳遞系統，抑制植物葉子光合作用使 NADP 不能還原成 NADPH，而此時氧變成超氧陰離子 ( Superoxide )，經由非飽和性脂肪酸的聚合作用破壞含脂細胞膜，而使樹葉枯死(12,13)。在動物方面，其致病機制類似植物，因刺激細胞內 NADPH 的氧化，並當作電子接受者，而取得電子，在有氧狀況下，將電子傳遞給氧形成超氧陰離子 (  $O_2^-$  )，巴拉刈復原後再繼續搶奪電子而成為製造超氧陰離子

的催化劑；最近研究指出巴拉刈致病機制與經由其加速脂質過氧化作用 ( Lipid peroxidation ) 有關( 14,15 )。其可能之反應機制如 Fig. 3。

## (二)、研究目的

本研究以甘露醇為實驗材料加入培養之肝細胞中，採用對肝細胞能誘發脂質過氧化作用之化學除草劑巴拉刈為誘導劑，誘發鼠初代培養肝細胞的損傷後，以測定肝細胞培養基中多種生化值如 Lactate dehydrogenase (LDH)，Aspartate aminotransferase (AST) 及 Alanine aminotransferase (ALT) 之酵素含量做為肝細胞毒性的分析指標 (16)，並分析肝細胞脂質過氧化物之分解物 Malondialdehyde (MDA) 的濃度 (17)，探討甘露醇對肝細胞之抑制作用。進一步利用初代培養之肝細胞，觀察甘露醇對巴拉刈所誘發 DNA 損傷修補之調節作用，利用 Unscheduled DNA synthesis (USD) 的方法觀察 DNA 損傷之修補作用 (18)。

由於甘露醇在許多研究中證實有多種的藥理藥效，對於降低肝損傷及促進解毒能力也被發現，因此本實驗的目的在研究甘露醇對於巴拉刈所造成肝細胞毒性有無保護或抑制的作用，並探討其作用機制。

## 二、材料與方法

### (一)、化學試劑與儀器

#### (A) 化學試劑：

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride)、MTT、TBA (Thiobarbituric acid)、Collagenase、Mannitol、[methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine 及肝功能生化值 AST、ALT、LDH 測定試劑均購自美國 Sigma 公司；Williams E 培養基、PSN 抗生素購自美國 Gibco 公司；Proteinase K 為德國 Merck 公司產品；Aquasol-2 閃爍液為美國 New England Nuclear 出品；Protein 測定試劑為英國 Bio-Rad 產品。細胞培養所需的培養基 (Medium；Williams E)，PBS (Phosphate buffer saline)，Calf bovine serum，PSN antibiotic mixture，Glutamine，HBSS (Hanks' balanced salt solution) 等購自美國 GIBCO/BRL 公司，其他試劑與實驗所需之 Dish 則購自 Nunc 公司。

#### (B) 儀器：

UV and Visible Spectrophotometer (Hitachi；U2000)

Fluorescence spectrophotometer (Hitachi；F2000)

Scintillation counter (Aloka；LSC-900)

## (二)、實驗動物

本研究使用購自台大動物研究中心之 Wistar 品系，體重為 220-280 公克之雄性大白鼠及體重為 18-25 公克之雄性 ICR 品系小白鼠為實驗動物。

## (三)、Mannitol 對 Paraquat 急性毒性試驗之影響

使用體重 18-25 公克之雄性 ICR 品系小白鼠每組 10 隻，觀察由腹腔注射單獨注射給予 Paraquat 劑量 50 mg/kg 後 72 小時內小白鼠中毒死亡情形；以及口服給予不同劑量 Mannitol ( 0.5 g/kg, 2.5g/kg, 10 g/kg ) 2 小時後，再由腹腔注射相同劑量 Paraquat ( i.p. 50 mg/kg ) 後，72 小時內實驗動物存活情形。

## (四)、肝細胞之初代培養

### *(Primary culture of hepatocyte)*

初代肝細胞之培養係根據 Bonney 氏等之方法 ( 19 ) 以肝臟灌流方式取得 ( Two stage liver perfusion method )。以購自台大動物研究中心之 Wistar 系大白鼠 ( 體重約 220-280 公克 ) 給予腹腔注射 Pentobarbital ( 50 mg/ml ) 麻醉，劑量為大白鼠體重每 100 公克給予 0.2ml，麻醉後，打開腹腔以 20G 血管導管穿刺肝門靜脈，固定之後以加有 EDTA 而不含鈣、鎂離子之 HBSS ( Hanks' balanced salt solution ) 緩衝液灌流，同時剪斷下腔靜脈放血，再以含膠原酵素 ( Collagenase ) 之 HBSS 緩衝液灌流後，取下肝臟，分離肝細胞，依實驗需要之細胞數目培養於含有 10% 胎牛血清 ( Calf bovine



serum), 1% PSN antibiotic mixture, 1% Glutamine 之Williams E 培養基中。置於37°C, 5% CO<sub>2</sub>培養箱中培養。於4小時之後更換培養基, 除去未貼壁之細胞, 當作以下各種實驗之細胞材料。

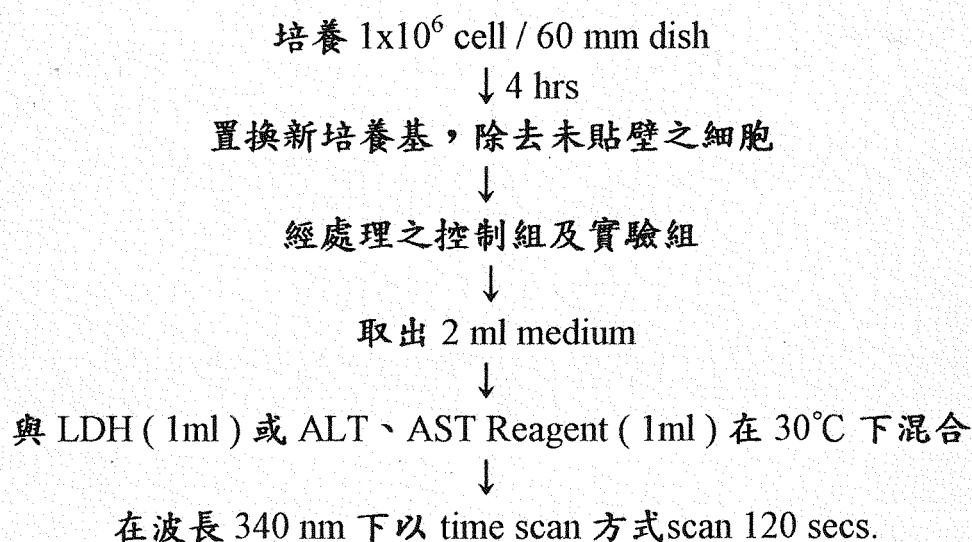
### (五)、MTT法之細胞活性分析 (Cytotoxicity)

Paraquat 或 Mannitol 對細胞活性的影響係根據 MTT (Microculture tetrazolium assay) 比色法分析之(20)。在培養皿中培養一定量肝細胞 ( $5.0 \times 10^4$  cells/dish) 再加入各種不同濃度 (2.5mM - 10mM) 的 Paraquat 或不同濃度 (2.5mM - 25mM) 的 Mannitol, 於37°C下分別培養4小時或5小時後, 移走培養基, 肝細胞以 PBS 洗滌, 換新培養基後, 加入 20  $\mu$ l MTT 試液 (5.0mg/ml), 培養4小時, 因活細胞會將 MTT 還原成 Formazan 結晶, 再以 Isopropanol 溶解之, 於光波長 563nm 下測定吸光度, 由吸光度大小測定出活細胞的多寡比較之。

### (六)、肝細胞毒性分析 (Hepatotoxicity assay)

以肝功能診斷酵素包括 Lactate dehydrogenase (LDH)、Alanine aminotransferase (ALT) 及 Aspartate aminotransferase (AST) 作為肝細胞毒性的分析指標。LDH 去氫酵素的測定係根據 Amador 氏等記述的方法(21), 將 Paraquat (2.5 mM) 單獨加入培養基中處理肝細胞當作控制組, 實驗組則分為三組: 第一組為將 Mannitol (5 mM) 和 Paraquat (2.5 mM) 同時加入處理; 第二組則先加入 Paraquat (2.5 mM) 處理肝細胞1小時後才加入 Mannitol (5 mM);

第三組則在加入 Paraquat (2.5 mM) 前1小時先以 Mannitol (5 mM) 加入培養基中處理肝細胞，以上各組均於 Paraquat 加入後培養4小時，再分取上層培養基2 ml，於光波長340 nm下測定LDH之活性。轉胺酵素 AST及ALT的測定則根據 Bergmeyer 氏等的方法 (22)，按上述同樣方法分組處理之，並與 Paraquat (2.5 mM) 單獨處理肝細胞控制組作比較，於光波長340 nm下測定吸光度，分別比較各組AST和ALT的活性，最後單位以  $m\mu/10^6$  cell來表示。其流程與計算方法如下：



Determine LDH and ALT activity as follows :

$$\text{Enzyme activity (m}\mu/10^6 \text{ cell)} = \frac{A \times TV \times 1000 \times 5}{6.22 \times SV \times LP}$$

where :

A = per min change in absorbance at 340 nm

TV = Total reaction mixture volume

SV = Sample volume

LP = Light path

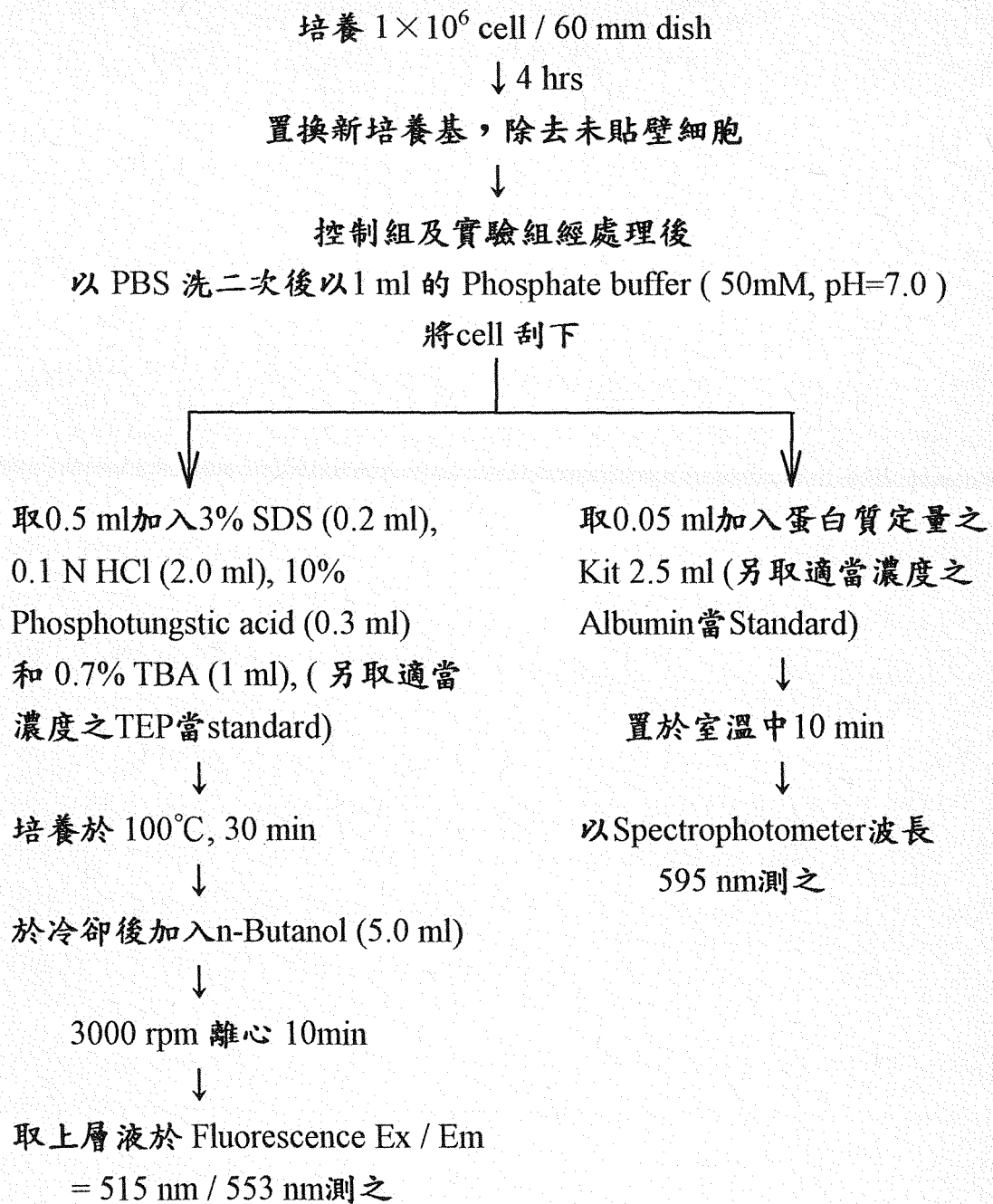
## (七)、MDA生成濃度之分析

### *(Lipid peroxidation assay)*

由於Paraquat系統會產生ROS，ROS在最近的研究中發現會造成脂質過氧化，而位於細胞膜之脂質一旦被ROS攻擊而造成過氧化時，輕則改變細胞膜的流動性與通透性，重則造成細胞膜的破壞導致細胞的死亡。

脂質過氧化的測定方法主要是根據 Yagi氏 (1987) (23) 所使用的螢光測定法 (Fluorometric method)，本研究在肝細胞培養基中單獨加入 Paraquat (2.5mM) 當作控制組，實驗組則如同第六項所述分為三組，以同樣方法處理肝細胞。以上各組均於加入Paraquat後培養4小時，更換培養基，刮下肝細胞，加入2ml 10% Trichloroacetic acid 去蛋白後，離心之。再精確量取上清液2ml 加入等量之1% TBA 試劑後，利用Thiobarbituric acid (TBA) 與脂質過氧化之後的產物Malondialdehyde (MDA) 在高溫下反應產生一穩定之結構，再置於沸水浴中加熱10分鐘，冷卻後按Stacey氏等修飾的方法 (24)，以n-Butanol 萃取出來，並在螢光光度計Ex / Em = 515 nm / 553 nm下測定螢光強度。將各組分別與Paraquat 控制組比較其MDA含量。

而本實驗所使用之Standard 則是根據Bradford (1976) (25) 中使用的 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TEP)。另外蛋白質的定量則是使用Rio-Rad 公司所生產之Kit 以Albumin 當 Standard 測定之。最後單位以 nmol MDA/mg protein 來表示。其詳細的流程如下：



#### (八)、DNA損傷修補作用之測定：

##### *( Measurement of DNA repair synthesis )*

Mannitol對Paraquat誘發DNA損傷之修補作用係藉著氚(<sup>3</sup>H)標記的胸腺嘧啶 ( Tritium labeled thymidine , H<sup>3</sup>-thymidine ) 在Hydroxyurea存在下，併入DNA中的量測定之(18)。將培養之肝細胞先以15 mM Hydroxyurea處理，同時加入各種不同濃度之Mannitol ( 2.5 mM , 5.0 mM , 10 mM ) 處理1小時後，加入Paraquat 0.25 mM 培養4小時，再移走培養基後加入H<sup>3</sup>-thymidine ( 1mci/ml ) 繼續培養18小時，將細胞收集下來，置於25 mm , 2 μm 孔徑的PC濾紙上，以10ml Lysing buffer ( 2% SDS , 0.025 M EDTA , 0.5 mg/ml thymidine , 0.1M glycine , pH10.0 ) 及0.15 mg/ml proteinase K 緩衝液沖洗。將濾紙置入含1ml 0.5N HClO<sub>4</sub>之試管中，於60°C加熱90分鐘後，取懸浮液加入閃爍液Aquasol-2，以Aloka LSC-900 閃爍計數儀測其放射強度以cpm/mgDNA表示。DNA含量之測定係根據Vytasek之方法定量之。

其詳細流程如下：



DABA method :

1. DABA ( 3, 5-Diaminobenzoic acid ) 之配製:  
在1 ml H<sub>2</sub>O 中加入300 mg DABA與50 mg charcoal , 充分混合之後以 3000 rpm 離心 10 min. , 並通過0.45  $\mu$ m 之filter即成。
2. 步驟:
  - a. 取100  $\mu$ l DNA, 在避光下加入100  $\mu$ l DABA
  - b. 置於Water bath 中加熱至60  $^{\circ}$ C , 30 min.
  - c. 立即置入水中冷卻
  - d. 加入 1.6 ml, 1N HCl
  - e. 10000 rpm 離心 5 min.
  - f. 於1 hr內以Fluorescence spectrophotometer Ex / Em = 408 nm / 508nm 測之

### 三、結果

#### 一、Mannitol對Paraquat急性毒性試驗之影響

如表一.所示，不給Paraquat亦不給Mannitol正常組之10隻小白鼠，經觀察三天結果均正常存活，而單獨給予Paraquat (i.p.50 mg/kg)之控制組，三天內有5隻小白鼠死亡。實驗組中給予Mannitol (0.5 g/Kg)後再給Paraquat (50 mg/kg)者三天內共死亡2隻；給予Mannitol (2.5 g/kg)後再給Paraquat (50 mg/kg)者僅於第二天有1隻死亡；至於實驗組中給予較大劑量Mannitol (10 g/kg)再給予Paraquat (50 mg/kg)者，則與正常組相同，10隻小白鼠均正常存活下來。由此顯示Mannitol對於腹腔注射適當劑量的Paraquat所誘導的毒性具有抗毒性作用 (Antitoxic effect)，並且呈現劑量依存性關係。

#### 二、MTT法之細胞活性分析

如表二.所示，利用MTT法測定細胞活性時，當加入Paraquat濃度為2.5 mM時，吸光度與控制組比較為89%，顯示該濃度適合作為細胞毒性誘導劑的濃度；當Paraquat濃度增為5.0 mM或10 mM時分別降低為86%或71%，表示對細胞毒性略增。至於Mannitol則如表三.所示，當濃度為2.5 mM、5.0 mM或10 mM時與控制組比較，吸光度沒有明顯下降，因此本研究中採用5.0 mM濃度作為非毒性劑量。



### 三、肝細胞毒性分析

如圖四. 所示，單獨加入Paraquat 控制組之LDH值明顯的升高，三個實驗組經5.0 mM Mannitol 培養1小時後再加入Paraquat 的實驗組有顯著的降低作用 ( $P < 0.05$ )。如圖五. 所示Paraquat 控制組能使AST值顯著升高，實驗組中Mannitol 和Paraquat 同時處理者或先加Mannitol 才給Paraquat 兩組 AST 值均呈現顯著的降低 ( $P < 0.05$ )。ALT值則如圖六所示，Paraquat 控制組明顯升高的作用，在同時加入Mannitol 與Paraquat 處理者或先加入Mannitol 處理1小時後再加入 Paraquat 處理肝細胞的實驗組則均有顯著的降低作用 ( $P < 0.05$ )。

### 四、MDA生成濃度之分析

如圖七所示，單獨以Paraquat 處理之控制組，其肝細胞中MDA 生成濃度急速升高，但經以同時加入Mannitol 與 Paraquat 處理者或先加入Mannitol 再加入Paraquat 處理，兩組實驗組肝細胞中MDA濃度呈現顯著的降低作用 ( $P < 0.05$ )。

### 五、DNA損傷修補作用之影響

Mannitol 對Paraquat 誘發肝細胞DNA損傷之修補作用係藉著UDS 方法 ( Unscheduled DNA synthesis ) 來測定。結果如表四所示，Mannitol 對Paraquat ( 0.25mM ) 誘發DNA損傷之修補作用在濃度2.5mM和5.0mM ( $P < 0.05$ )，以及10mM ( $P < 0.02$ ) 下均有顯著的抑制Paraquat 所誘發的肝細胞損傷作用。

## 四、討論

本實驗採用對肝細胞能誘導脂質過氧化反應的除草劑巴拉刈 (Paraquat) 當作誘導劑，以誘發鼠肝細胞受損，然後區分為加入 Paraquat 之前，之後或其同時加入 Mannitol 等三種情況來比較 Mannitol 是否具有抗肝毒活性 (Antihepatotoxic activity) 與抗脂質過氧化作用 (Anti-lipoperoxidation)，同時比較其活性的大小；進一步再探討 Mannitol 對抗肝細胞受損害的作用機制。

首先由動物實驗觀察經口服給予 ICR 品系小白鼠 Mannitol 後再給一半致死量 (LD<sub>50</sub>) 的 Paraquat (I.P. 50 mg/kg)，結果顯示，Mannitol 具有抗急性毒性作用，且其保護作用呈現劑量依存性的關係。接著由初代培養的肝細胞測定 Mannitol 與 Paraquat 對肝細胞毒性分析指標，即 LDH、AST、ALT 等酵素含量生化值的影響，結果顯示 Mannitol 亦能顯著的降低肝細胞受 Paraquat 損傷時肝細胞滲漏的酵素含量，證明 Mannitol 具有抗肝細胞毒性的作用，而且以預先經 Mannitol 處理肝細胞後，再加入 Paraquat 的實驗組效果最顯著，其次則為同時加入 Mannitol 和 Paraquat 處理的實驗組，由此表示 Mannitol 對抗肝細胞脂質傷害具有保護性的作用。至於 Mannitol 對肝細胞膜脂質的過氧化作用則從分析 MDA 生成物濃度的結果知道，同樣是先加 Mannitol 後加 Paraquat 以及同時加 Mannitol 和 Paraquat 兩個實驗組的效果較明顯，具有統計上的意義，因此也證明了 Mannitol 對 Paraquat 所引起的過氧化作用具有極顯著的對抗脂質過氧化作用。

因 Paraquat 的氧化作用，產生了許多超氧陰離子 (Superoxide anion)，此等超氧陰離子再去攻擊肝細胞膜上的脂質而啟動了過氧化作用，當細胞膜上脂質發生了過氧化作用可令其構造發生改

變，細胞膜硬化，而使細胞膜上重要的ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) 酵素活性發生改變(26)；進一步細胞膜脂質過氧化作用產物MDA (Malondi-aldehyde) 又與細胞中的核酸反應而形成加成物，常常導致細胞的突變作用 (Mutagenesis) 與致癌作用 (Carcinogenesis) 等嚴重的後果(27)。利用UDS的方法，顯示Mannitol 能抑制Paraquat 所誘發之肝細胞損傷作用，因此可以解釋Mannitol 之所以能抑制Paraquat 所誘發肝細胞DNA損傷的作用機制是經由Mannitol 抑制了肝細胞膜脂質發生過氧化作用的結果，以減低Paraquat 傷害細胞的作用。

目前已知生物性含氧自由基 (Oxygen free radical) 主要有參種，即超氧陰離子 (Superoxide ion;  $\text{O}_2^{\cdot-}$ )，過氧化氫 (Hydrogen peroxide;  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 與氫氧自由基 (Hydroxy radical;  $\text{OH}^{\cdot}$ )，當中過氧根離子與核酸分子反應可造成多種傷痕，如DNA分子單股或雙股之切斷及鹼基之修改；而氫氧自由基與DNA反應可產生斷股 (Strand cleavage) 的現象；而此等切斷的DNA則可受到細胞中酵素群之修補，或以抗氧化劑來捕捉含氧自由基，以防止細胞免於氧化之傷害(23)。對於超氧陰離子，在氧化攻擊的特異性上言，必須有一個要件，即結合的金屬離子如Fe(III)必先還原成Fe(II)的形態，才能與超氧陰離子因受超氧陰離子歧化酵素 (Superoxide dismutase) 作用的去毒途徑所生成的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反應，而形成另一種含氧自由基 ( $\text{OH}^{\cdot}$ )，根據報告指出Paraquat 可將結合的Fe(III)還原成Fe(II)(24)，因而能與 $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用生成有害的氫氧自由基。從目前的研究文獻可以確定Mannitol 屬於一種氫氧自由基的捕捉劑 (Scavenger) (25)，而已知Paraquat 的致毒機制除能產生超氧陰離子外，亦可能經組織或細胞中Fe(II)的還原作用而產生氫氧自由基。因此Mannitol 抑制Paraquat 誘發肝細胞DNA損傷的另一途

徑，可能是經由 Mannitol 捕捉了 Paraquat 所產生的氫氧自由基之故；關於後者的去毒作用機制，正有待更進一步的探討加以證實。

**Table 1. Antitoxic effect of MT on PQ induced acute toxicity.**

Treatment <sup>a</sup>	No. of mice treated	No. of mice which died after drug administration (days)			Survival rate(%)
		1	2	3	
Control	10	0	0	0	100 %
PQ	10	1	2	2	50 %
PQ+MT(0.5g/kg)	10	0	1	1	80 %
PQ+MT(2.5g/kg)	10	0	1	0	90 %
PQ+MT(10 g/kg)	10	0	0	0	100 %

a. All animals received an equal dose of paraquat (PQ) (I.P. 50 mg/kg) except control group; and mannitol (MT) were given at various doses prior to the administration of PQ (2 hr).

**Table 2. The cytotoxicity of paraquat with tetrazolium assay.**

Treatment <sup>a</sup>	% of control absorbance
Control	100
PQ(2.5mM)	89 <sup>b</sup>
PQ(5.0mM)	86
PQ(10 mM)	71

a. The hepatocyte culture was treated with various doses of paraquat (PQ) for 4 hrs.

b. % of control absorbance.

**Table 3. The cytotoxicity of mannitol with tetrazolium assay.**

Treatment <sup>a</sup>	% of control absorbance
Control	100
MT(2.5mM)	98 <sup>b</sup>
MT(5.0mM)	97
MT(10 mM)	95
MT(25 mM)	91

a. The hepatocyte culture was treated with various doses of mannitol (MT) for 5 hrs.

b. % of control absorbance.

**Table 4. Effect of mannitol on paraquat-induced DNA damage in cultured hepatocytes.**

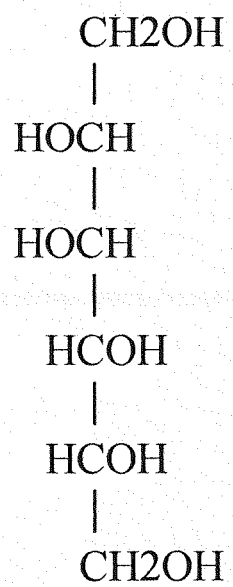
Treatment <sup>a</sup>	cpm/ $\mu$ g DNA	% of PQ control
Control	34 $\pm$ 3	-
PQ(0.25mM)	96 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	100
PQ(0.25mM) plus:		
MT(2.5mM)	65 $\pm$ 10 <sup>*c</sup>	68
MT(5.0mM)	61 $\pm$ 8 <sup>*</sup>	63
MT(10 mM)	55 $\pm$ 7 <sup>**</sup>	57

a. Primary hepatocyte cultures were pretreated with hydroxyurea and various concentration of mannitol (MT) for 1 hr then paraquat (PQ) and [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (1  $\mu$  Ci/mi) was added for 18 hrs. The cells were harvested and lysed for radioactivity counting and DNA quantitation. DNA damage was determined by UDS and expressed as cpm/  $\mu$ g/DNA.

b. Mean  $\pm$  SD, values are the average of triplicate determinations.

c. \*P<0.05, \*\*P<0.01, compared with PQ treated group.

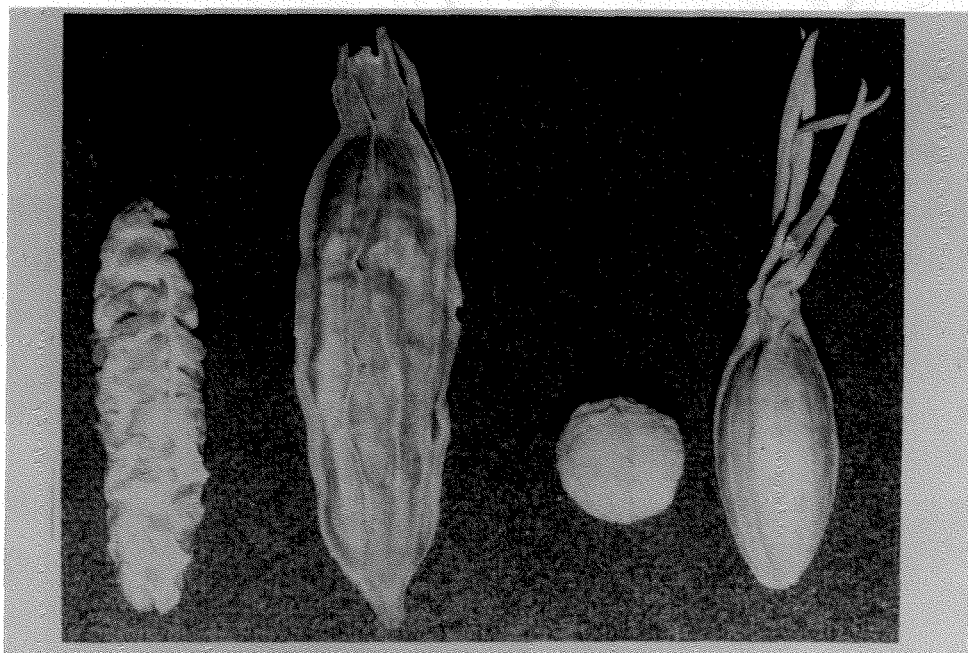




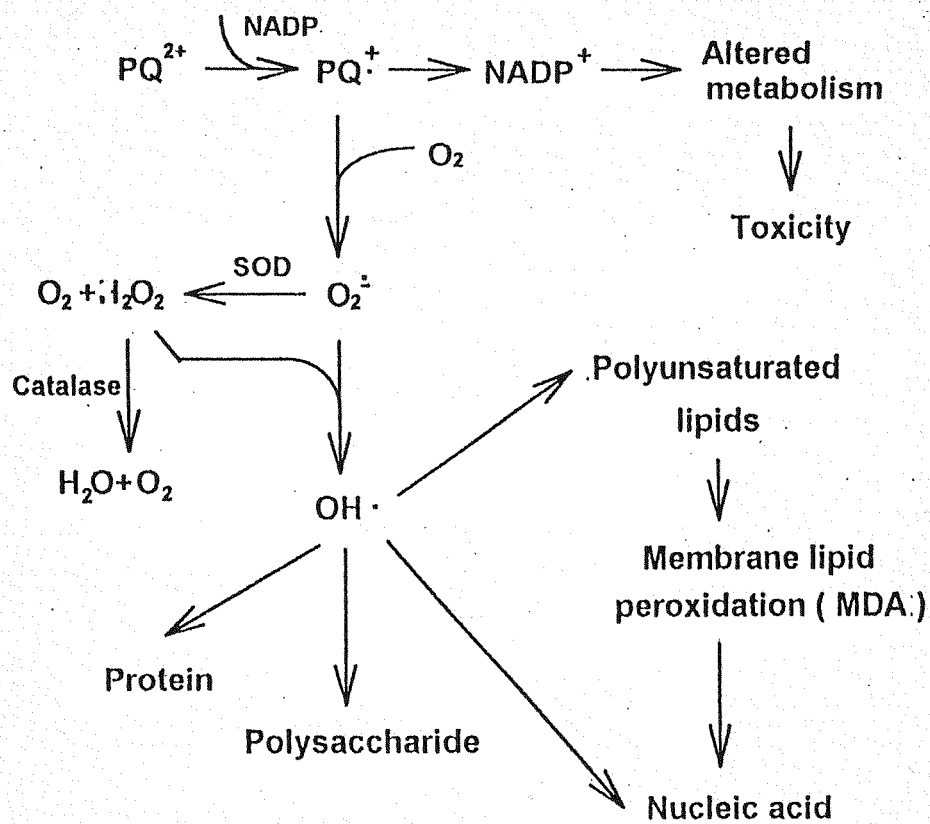
**Figure 1 Structure of mannitol**



Figure 2A 梔子之台灣市場品 (原圖)



**Figure 2B** 梔子之台灣市場品X 1.5左起 山梔子，  
梔子仁 (以上為野生品) 水梔子，梔子  
仁 (以上為栽培品)



**Figure 3 Proposed mechanism of paraquat toxicity.**

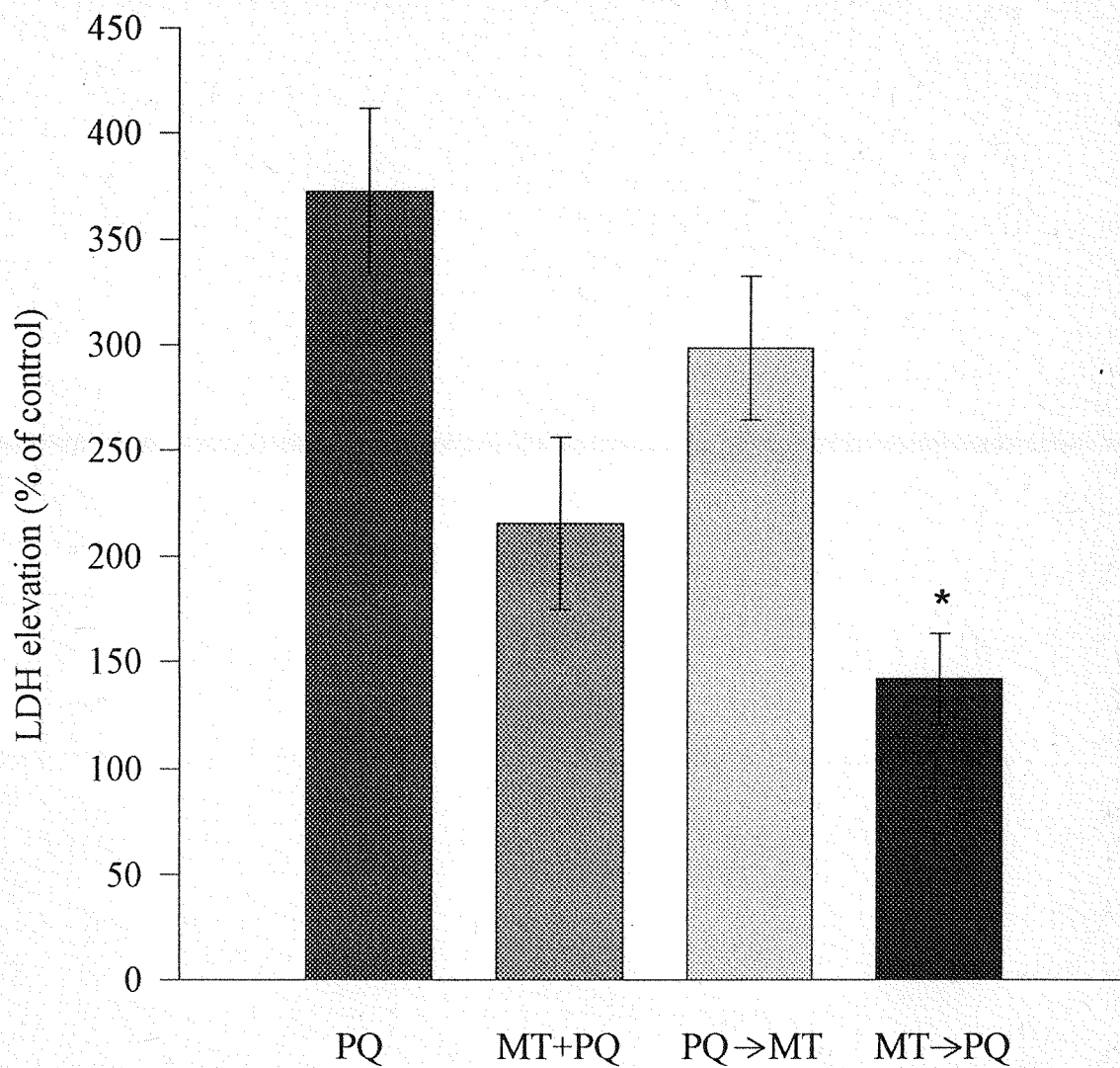


Figure 4 Decrease in cytotoxicity (LDH release) of paraquat PQ (2.5 mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1 hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) for 5 hr. \*P<0.05 VS PQ treated group. t-test (mean±SD; n=3)

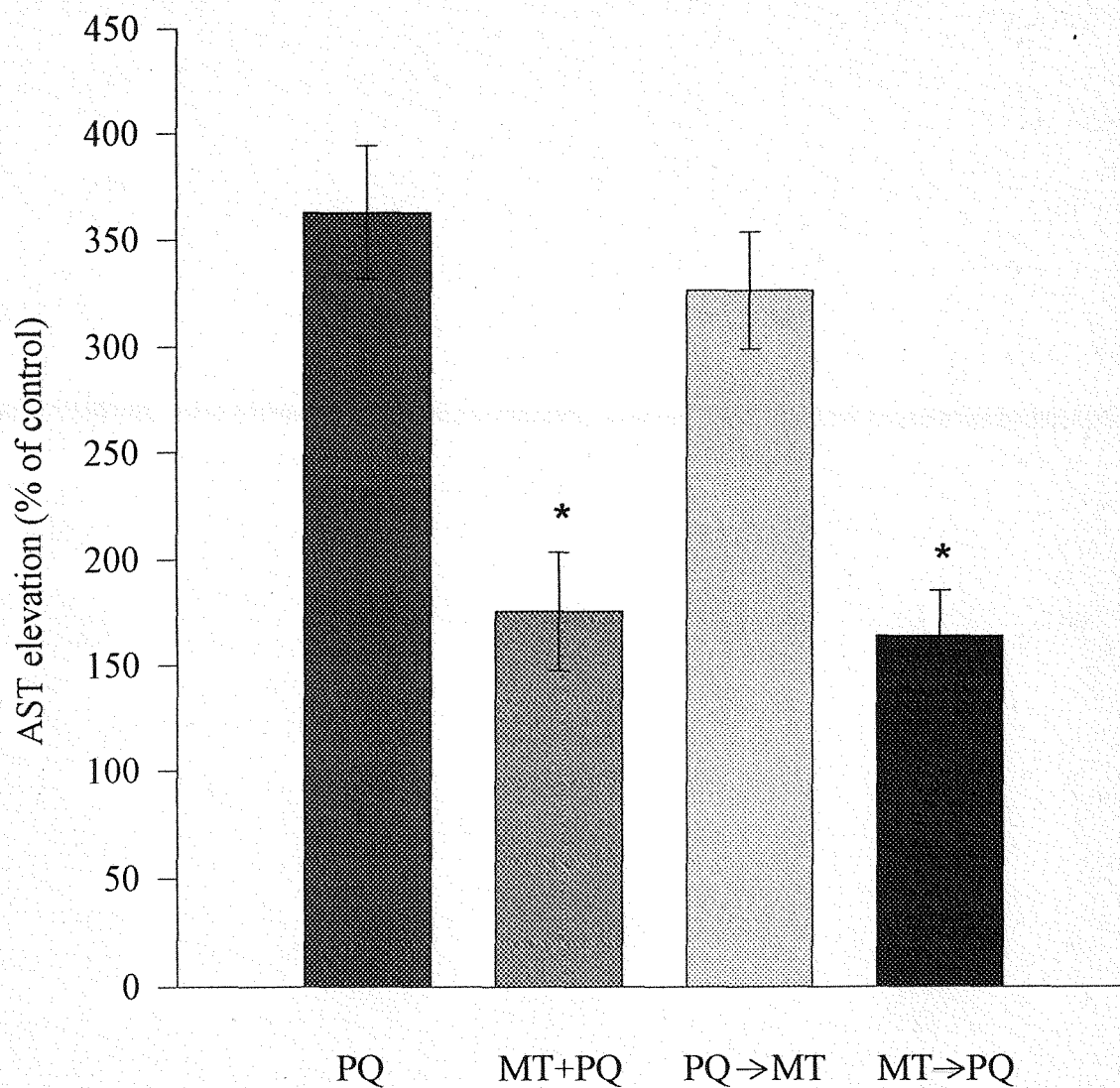


Figure 5 Decrease in cytotoxicity (AST release) of paraquat PQ (2.5 mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1 hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) for 5 hr. \*P<0.05 VS PQ treated group. t-test (mean ± SD; n=3)

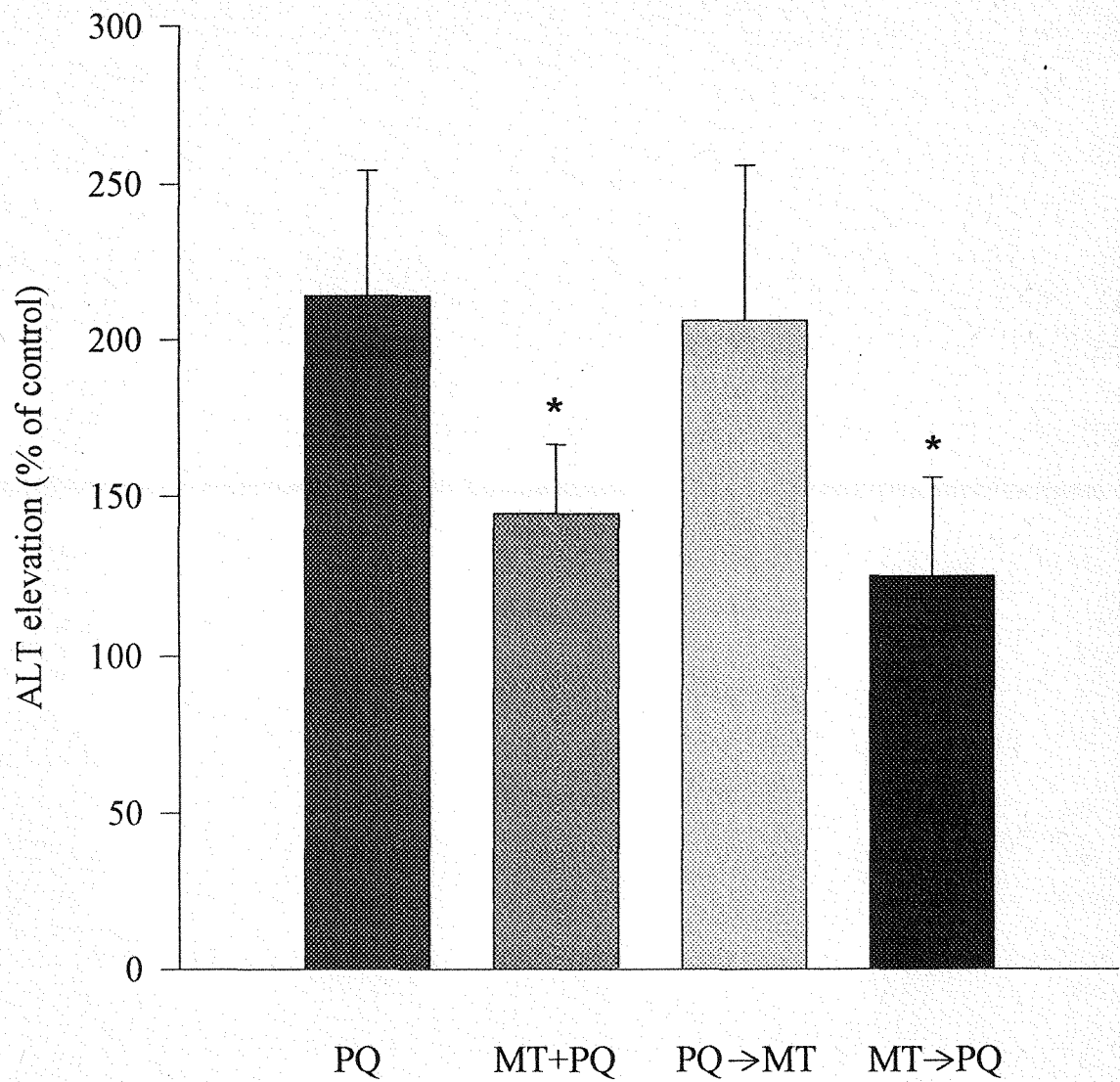


Figure 6 Decrease in cytotoxicity (ALT release) of paraquat PQ (2.5 mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1 hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) for 5 hr. \*P<0.05 VS PQ treated group. t-test (mean ± SD; n=3)

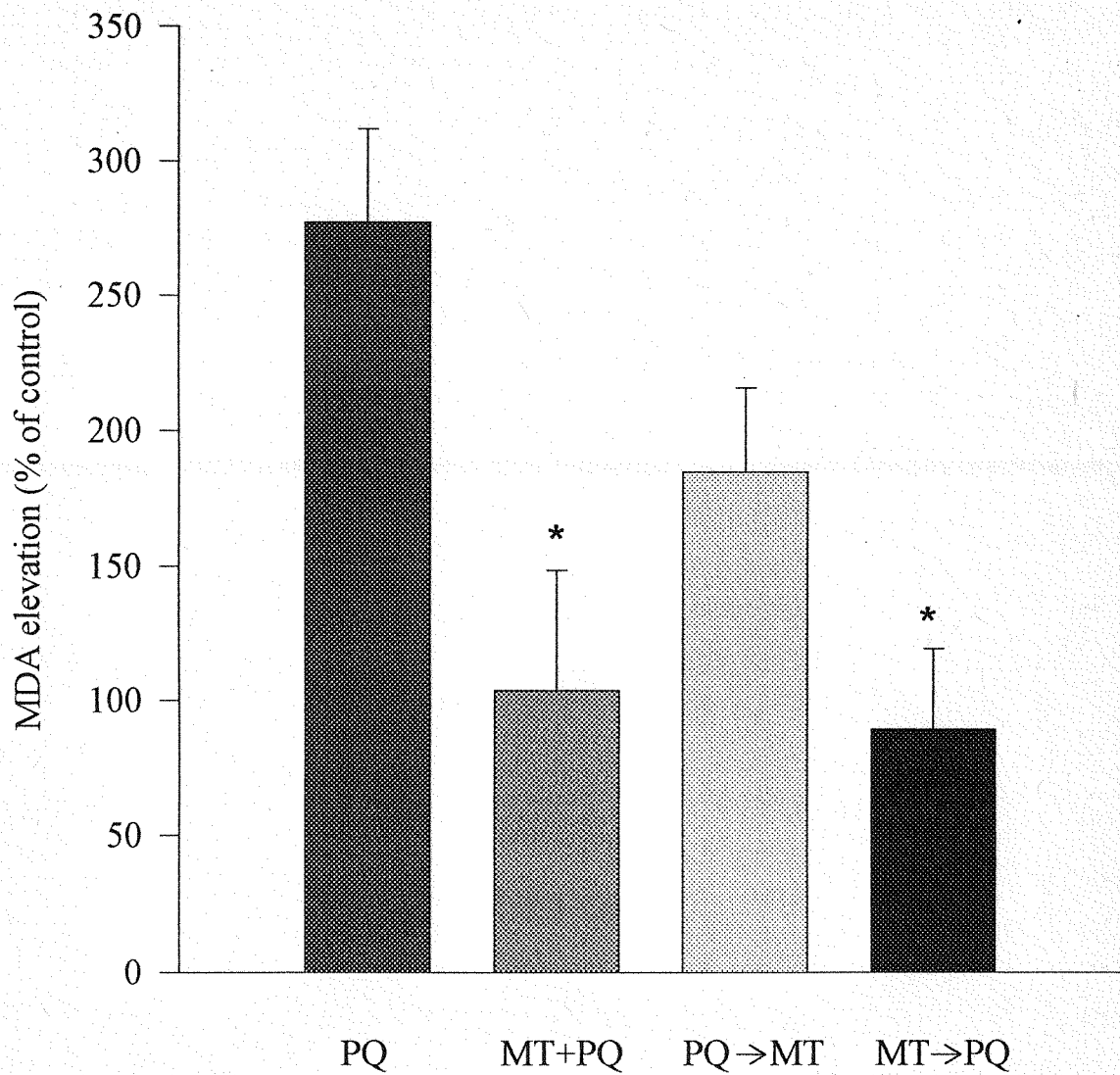


Figure 7 Decrease in cytotoxicity (MDA release) of paraquat PQ (2.5 mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1 hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) for 5 hr. \*P<0.05 VS PQ treated group. t-test (mean ± SD; n=3)



## 五、參考文獻

1. 行政院衛生署：中華民國八十年台灣地區衛生資料。行政院衛生署出版，1992：114-116。
2. 吳昭新、陳定和、江易雄等：A型及B型肝炎病毒在台灣感染之研究。台灣醫學雜誌1980；79：694-699。
3. 陳定信；病毒性肝毒討論會。當代醫學，1982；9；81-108。
4. Laurence, D.R., Bennet, P.N.: Clinical Pharmacology Ed.7.Churchill Livingstone, 1992: 215-218.
5. Yang, L.L., Yen, K.Y., Kiso, Y. *et al.* : Antihepatotoxic actions of formasan plant drugs. J. Ethnopharmacol. 1987 ; 19 : 103-110.
6. Cerutti, P.A.: Prooxidant states and tumor promotion. Science, 1985 ; 227, 375-380.
7. Breimer, L.H.Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis:The role of DNA damage.Molecular carcinogenesis, 1990; 3, 188-197.
8. England, M.D., Cavarochi, N.C., O'Brasen, J.F., *et al.*: Influence of antioxidants on oxygen free radical generation during and after cardiopulmonary bypass. Circulation 1986; 74 III: 134 - 137  
Molecular Carcinogenesis., 3, 188-197.
9. Lai, J.H.: Pharmacognosy, 1976 ; 378-3817.
10. 顏焜熒：原色常用中藥圖鑑。南天書局，1989: 149。
11. Grant, H.C., Lantos, P.L., Parkinson, C.: Cerebral damage in paraquat poisoning. Histopathology 1980; 4: 185-195.
12. Dasta, J.F.: Paraquat poisoning: A review. Am. J. Hsop. Pharm. 1978; 35: 1368-1372.

13. Kuo, C.H., Sheen, I.S., Huang, C.C., *et al.*: Liver biochemical tests in paraquat intoxication. *Chang Guang Med. J.* 1988; 11: 160-166.
14. Burk, R.F., Lawrence, R.A., Lane, J.M.: Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diguato administration. *J. Clin. Invest.* 1980; 65: 1024-1031.
15. Yasaka, T., Okudaira, K., Fujito, H.: Further study of lipid peroxidation in human paraquat poisoning. *Arch. Intern. Med.* 1986; 146: 681-685.
16. Randall, J.R., James, E.K.: Inhibition of mouse hepatocyte inter-cellular communication by paraquat-generated oxygen free radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1988; 94: 427-436.
17. Bernheim, G., Bernheim, M.L.C., Wilbur, K.M.: The reaction between thiobarbituric acid and oxidative products of certain lipids. *J. Biol. Chem.* 1948; 174: 257-264.
18. Felix, R.A., Susan, D.L., Gerald, L.S. *et al.*: Chemical quantification of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogenes. *Cancer Letter.* 1982; 42: 3010-3015.
19. Bonney, V.R., Becker, J.E., Walker, P.R. *et al.*: Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis *in vitro*. *Rochille* 1974; 9: 399-413.
20. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro culture tetrazolium assay. *Cancer Research* 1988; 48: 589-601.
21. Amador, E., Dorfman, L.E., Wacker, W.E.C.: Serum lactic dehydrogenase: An analytical assessment of current assays. *Clin.*

- Chem. 1963; 9: 391.
22. Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., Wahlefeld, A.W.: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin. Chem. 1978; 24: 58.
  23. Yagi, K.: Lipid peroxide and human disease . Chem. Phys. Lipids., 1987 ; 45, 337-351.
  24. Stacey, N.H., Cantilena, L.R., Klassen, C.D.: Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1980; 53: 470-480.
  25. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976 ; 72, 248-254.
  26. Liaw, K.Y., Kuo, L.L., Chen, C.C. and Lin-Shiau, S.Y.: Alterations of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activities in erythrocyte, muscle, and liver of traumatic and septic patients. Circulatory shock. 1987; 22: 195-203.
  27. Breimer, L.H.: Molecular Mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. ol. Carcinog. 1990; 3: 188-197.
  28. Aruoma, O.I.: Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Fd. Chem. Toxic. 1994; 32: 671-683.
  29. Niwa, Y., Ishimoto, K., Kanoh, T.: Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. Blood 1990; 76: 835-841.
  30. Korbashi, P., Kohen, R., Katzhendler, J. *et al.*: Iron mediates paraquat toxicity in Escherichia coli. 1986; 261: 12472-12476.

## 第一部份 (B)

蒼朮酮對於Tert-Butyl Hydroperoxide誘

發大白鼠肝細胞DNA損傷

保護作用之研究

## 縮寫表

**Atr :** Atractylon

**t-BHP :** tert-butyl hydroperoxide

**MTT :** Microculture Tetrazolium

**LDH :** Lactate dehydrogenase

**ALT :** Alanine aminotransferase

**MDA :** Malondialdehyde

**UDS :** Unscheduled DNA synthesis

**DPPH :** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

## 中文摘要

蒼朮酮 ( Atractylon; Atr ) 是菊科 ( Compositae ) 植物 “白朮” 中主要成分之一，本研究探討蒼朮酮對於有機過氧化劑 tert-butyl hydroperoxide ( t-BHP ) 誘發初代培養肝細胞之毒性是否具有抑制作用及其作用之機制，並探討其對脂質過氧化作用之影響。於實驗中發現，由於蒼朮酮可以捕捉 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ( DPPH ) 而顯示其具有抗氧化的效果；更進一步的驗顯示以 t-BHP ( 1.5mM ) 處理初代培養肝細胞 30 分鐘後所誘發而形成的 Malondialdehyde ( MDA ) 及培養基中 Lactate dehydrogenase ( LDH )， Alanine aminotransferase ( ALT ) 等酵素釋放量的增加能被蒼朮酮 ( 0.01，0.1，1.0 mg/ml ) 所抑制。而以 Unscheduled DNA synthesis ( UDS ) 的方法測知蒼朮酮也可以減低由 t-BHP 所誘發的基因毒性。綜合以上實驗結果顯示，蒼朮酮可能經由捕捉自由基的能力來保護由 t-BHP 所引起之氧化壓力 ( Oxidative stress ) 而造成的傷害。

## Abstract

Atractylon, a main sesquiterpenic constituent of *Atractylodes* rhizomes, was studied for the mechanism of its inhibitory effects on the tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in primary culture of rat hepatocytes. In the preliminary study, atractylon showed an effective antioxidant property tested by its capacity of quenching 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH). Further investigations showed that atractylon at the concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0 mg/ml decreased the formation of malondialdehyde (MDA), leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and alanine aminotransferase (ALT) and repair synthesis of DNA induced by 30-min treatment of t-BHP (1.5 mM) in primary cultured rat hepatocytes. Addition of atractylon also attenuated the genotoxicity of t-BHP evaluated by unscheduled DNA synthesis.

The sum of the results suggested that the protective effect of atractylon against oxidative stress induced by t-BHP is via its ability of quenching free radicals.

## 一、緒論

### (一) 研究背景

白朮 (*Atractylodes Japonica*) 係菊科 (Compositae) 植物的乾燥根莖，其性溫味甘苦入脾胃經，其功效能補氣健脾，燥濕利水，具補益強壯作用。效用方面民間多用以治肝病，肝硬化、腹水及利尿降血糖等病狀。1983年 Kiso 等人研究指出白朮的抽出物由體外實驗顯示具有明顯的保護肝臟功能 (1)；而白朮中所含之主要成份，蒼朮酮 (Atractylon) (圖一)，Yamshara 等人以實驗證明能夠抑制老鼠由 Carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) 所引起的肝損傷 (2)；近年來亦有實驗以初代培養肝細胞證明蒼朮酮能夠抑制由  $\text{CCl}_4$  及 Galactosamine 所誘發的細胞毒性 (1)。

目前已證實  $\text{CCl}_4$  引起肝臟損傷的作用機制，是經由肝臟內質網中代謝酵素 Cytochrome p450s 將  $\text{CCl}_4$  代謝為較高反應性的  $\text{CCl}_3$  radical，而更進一步誘發內質網中多價不飽和脂肪酸的過氧化作用，導致肝臟因而受損 (3)。由於 Atractylon 結構中含有一 Furan 環的構造，因此可能會捕捉自由基而具有抗肝毒性的能力。但是在以  $\text{CCl}_4$  作為造成肝臟傷害的實驗模式中，造成脂質過氧化作用有許多爭議性的結論 (4)，而且可能與其為溶劑所造成的溶劑效應有關 (5)。因此本研究採用另一種引起肝毒性的誘導劑: tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) 來探討 Atractylon 對初代培養肝細胞的抗肝毒性作用。



## (二) 研究目的

1982年 Bellomo 等人及 1984 年 Hill 等人的研究指出，將有機過氧化物給予肝細胞將使細胞內的 Reduced glutathione (GSH) 快速氧化，細胞脂質發生過氧化及細胞生存能力急速下降等現象 (6, 7)。因此，本實驗採用類似的模式，以 t-BHP 作為 Inducer，來探討蒼朮酮對於 t-BHP 所誘發的 Malondialdehyde (MDA) 形成的活性、Lactate dehydrogenase (LDH)，Alanine aminotransferase (ALT) 等酵素的釋放量以及 DNA 修復合成 (8) 等現象之影響，俾探討蒼朮酮抑制鼠肝細胞 DNA 損傷之保護作用機制。

## 二、材料與方法

### (一)、化學試劑與儀器

#### (A) 化學試劑:

Atractylon、MTT、TBA ( Thiobarbituric acid )、Collagenase、t-BHP ( tert-butyl hydroperoxide )、[methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidine、SDS、EDTA、Thymide、DPPH ( 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ) Glycine 及肝功能生化值 Alanine transaminase ( ALT )、Lacate dehydrogenase ( LDH ) 測定試劑均購自美國 Sigma 公司；Williams E 培養基、PSN 抗生素購自美國 Gibco 公司；Proteinase K 為德國 Merck 公司產品；Aquasol-2 閃爍液為美國 New England Nuclear 出品；Protein 測定試劑為英國 Bio-Rad 產品。細胞培養所需的培養基 ( Medium；Williams E )，PBS ( Phosphate buffer saline )，Calf bovine serum，PSN antibiotic mixture，Glutamine，HBSS ( Hanks' balanced salt solution ) 等購自美國 GIBCO BRL 公司，其他試劑與實驗所需之 Dish 則購自 Nunc 公司。

#### (B) 儀器:

UV and Visible Spectrophotometer ( Hitachi ; U2000 )

Fluorescence spectrophotometer ( Hitachi ; F2000 )

Scintillation counter ( Aloka ; LSC-900 )

## (二)、初代肝細胞之培養

### ( *Primary culture of hepatocyte* )

初代培養之肝細胞係根據 Bonney 氏等之方法 (9)，以肝臟灌流 (Perfusion) 方式取得。本研究使用自台大動物研究中心之 Wistar 品系，體重為 220-280 公克之雄性大白鼠為實驗動物。在大白鼠腹腔注射戊基巴比妥 (Pentobarbital, 50 mg/ml) 麻醉，劑量為大白鼠體重每 100 公克給予 0.2 ml，麻醉後，打開腹腔以 20G 血管導管穿刺肝門脈，固定後以加有 EDTA 而不含鈣、鎂離子之 HBSS 緩衝液灌流，同時剪斷下腔靜脈放血，再以含膠原酵素 (Collagenase) 及鈣離子之緩衝液灌流後，取下肝臟，分離肝細胞，以每毫升  $1.5 \times 10^6$  之細胞密度培養於 4ml Williams E 培養基中含 10% 胎牛血清及 1% PSN 抗生素，置於  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養。於最初三小時更換培養基，除去未貼壁之細胞，當作以下細胞分析使用。

## (三)、MTT 法之細胞活性分析

### ( *Cytotoxicity* )

蒼朮酮或 t-BHP 對細胞活性的影響係根據 MTT 比色法測定之 (8,10)。在培養皿中培養一定量肝細胞 ( $5.0 \times 10^4$  cells/dish) 再加入不同濃度的 t-BHP (0.5 mM - 2.0 mM) 或不同濃度的蒼朮酮 (0.01 ; 0.1 ; 1.0 mg/ml)，於  $37^\circ\text{C}$  下分別培養半小時或 1 小時後，移走培養基，肝細胞以 PBS 液洗滌，換新培養基後，加入  $20 \mu\text{l}$  MTT 試液 (5.0mg/ml)，培養 4 小時，因活細胞會將 MTT 還原成 Formazan 結晶，再以 Isopropanol 溶解之，於光波長 563nm 下測定吸光度，由吸光度大小測定出活細胞的多寡比較之。

#### (四)、自由基捕捉量之測定

##### *(Determination of free radical-quenching capacity)*

本研究使用之自由基DPPH ( 1,1-diphenyl-1-2-picryl-hydrazyl-radical ) 在結構上有穩定的共振，所以可以在適當的儲存下長時間的保存下來 ( 11 )。DPPH在517 nm 的波長下有獨特的吸光，隨著DPPH濃度減少時，其O.D.值亦隨之降低。故本研究將蒼朮酮分別以三種不同濃度 ( 0.01; 0.1; 1.0 mg/ml ) 加入，以觀察蒼朮酮 ( Atractylon ) 捕捉自由基之情形。其流程如下：

取 2.87 ml Methanol 加入30  $\mu$ l 的 10 mM DPPH



加入100  $\mu$ l DMSO 或不同濃度

( 0.01, 0.1, 1.0 mg / ml ) 之Atractylon in DMSO



置於室溫中 30 mins



加入 1 ml Redistilled water與3 ml Toluene 並充分混合



3000 rpm離心10 mins



取Upper phase,

置於Spectrophotometer 在波長 517 nm 下測最大吸光度

## (五)、肝細胞毒性分析

### *(Hepatotoxicity assay)*

以肝功能診斷酵素包括 Lactate dehydrogenase (LDH)、Alanine aminotranferase (ALT) 作為肝細胞毒性的分析指標。LDH 去氫酵素的測定係根據 Amador 氏等記述的方法 (12)，將 t-BHP (1.5mM) 單獨加入培養基中處理肝細胞當作控制組，實驗組則分為三組：在加入 t-BHP 1.5 mM 前 1 小時分別以蒼朮酮 (0.01 ; 0.1 ; 1.0 mg / ml) 加入培養基中處理肝細胞，以上各組均於 t-BHP 加入後培養半小時，再分取上層培養基 2ml，於光波長 340nm 下測定 LDH 之活性。而 ALT 的測定則根據 Bergmeyer 氏等的方法 (13)，按上述同樣方法分組處理之，並與 t-BHP 1.5 mM 單獨處理肝細胞控制組作比較，於光波長 340nm 下測定吸光度，分別比較各組 ALT 的活性。最後單位以  $m\mu/10^6$  cell 來表示，其流程與計算方法如同第一部份(A)實驗方法第六項。

## (六)、MDA 生成濃度之分析

### *(Lipid peroxidation assay)*

脂質過氧化的方法主要是根據 Yagi 氏 (1987) (14) 所使用的螢光測定法 (Fluorometric method)，肝細胞中脂質過氧化係藉著其分解產物 Malondialdehyde (MDA) 的濃度為指標來測定。在肝細胞培養基中單獨加入 t-BHP 1.5 mM 當作控制組，實驗組則如同第五項所述，以同樣方法處理肝細胞。以上各組均於加入 t-BHP 後培養半小時，更換培養基，刮下肝細胞，加入 2ml 10% Trichloroacetic acid 去蛋白後，離心之。再精確量取上清液 2ml 加入等量之 1% TBA 試劑後，置沸水浴中加熱 10 分鐘，冷卻後按

Stacey 氏等修飾的方法 (15)，以 n-Butanol 萃取出來，並在螢光光度計 Ex / Em = 515 nm / 553 nm 下測定螢光強度，分別與 t-BHP 控制組比較其 MDA 含量。其詳細流程如同第一部份(A)，實驗方法第七項。

### (七)、DNA 損傷修補作用之測定：

#### ( *Measurement of DNA repair synthesis* )

蒼朮酮對 t-BHP 誘發 DNA 損傷之修補作用係藉著氚標記的胸腺嘧啶 ( Tritium labeled thymidine, H<sup>3</sup>-thymidine ) 在 15 mM Hydroxyurea 存在下，併入 DNA 中的量測定之 (16)。將培養之肝細胞先以 15mM Hydroxyurea 處理，同時加入各種不同濃度之 Atractylon ( 0.01; 0.1; 1.0 mg/ml ) 處理 1 小時後，加入 t-BHP 1.5 mM 及 H<sup>3</sup>-thymidine ( 1  $\mu$  Ci/ml ) 繼續培養 18 小時，將細胞收集下來，置於 25 mm, 2  $\mu$  m 孔徑的 PC 濾紙上，以 10ml Lysing buffer ( 2% SDS, 0.025M EDTA, 0.5mg/ml thymidine, 0.1M glycine, pH10.0 ) 及 0.15mg/ml proteinase K 緩衝液沖洗。將濾紙置入含 1ml 0.5N HClO<sub>4</sub> 之試管中，於 60°C 加熱 90 分鐘後，取懸浮液加入閃爍液 Aquasol-2，以 Aloka LSC-900 閃爍計數儀測其放射強度以 dpm/  $\mu$  g DNA 表示。DNA 含量之測定係根據 Vytasek ( 1982 ) 之方法 (11)，取懸浮液與 DABA 試劑反應呈色，以 Fluorescence Spectrophotometer 於激發波長  $\lambda$  Ex 408 nm, 放射波長  $\lambda$  Em 508 nm 下測定其吸螢光強度。

### 三、結果

#### 一、t-BHP及 Atractylon 對細胞毒性之測定

利用MTT法測定肝細胞活性時，結果如表一所示，當加入t-BHP濃度為1.5 mM時，吸光度與控制組比較為91%，顯示該濃度適合作為細胞毒性誘導劑的濃度。當t-BHP的濃度增至2.0 mM時，吸光度降低為83%，表示對細胞毒性略增。而Atractylon所使用的三種濃度(0.01, 0.1, 1.0 mg/kg)，與控制組比較吸光度沒有顯著差異，因此本研究中採用1.5 mM t-BHP及0.01, 0.1, 1.0 mg/ml濃度的Atractylon作為實驗上之非毒性劑量。

#### 二、Atractylon自由基的捕捉能力測定

由於DPPH在結構上的穩定性，故可當作指標來檢測蒼朮酮(Atractylon)對自由基捕捉之影響。如表二所示，Atractylon的濃度與捕捉自由基的能力呈現劑量依存性關係，Atractylon在濃度0.01, 0.1及1.0 mg/ml時，對DPPH自由基的捕捉百分比分別為33% ( $P < 0.01$ )，37% ( $P < 0.01$ )及88% ( $P < 0.001$ )。

#### 三、Atractylon對t-BHP誘發肝細胞毒性之影響

如圖三所示，單獨加入1.5 mM t-BHP控制組之LDH、ALT值明顯增高。三個實驗組經Atractylon(0.01, 0.1, 1.0 mg/ml)前處理1小時後，再加入1.5 mM t-BHP半小時處理，結果顯示可以明顯的抑制由t-BHP所誘發的細胞毒性如LDH(圖三)、ALT等酵素的釋放量。Atractylon的濃度與其抑制LDH及ALT的濃度呈現劑量

依存性關係，而 Atractylon 於 1 mg/ml 濃度下具有最大抑制效果 ( LDH 58%,  $P < 0.001$ ; ALT 40%,  $P < 0.05$  )。

#### 四、Atractylon 對 t-BHP 誘發脂質過氧化的影響

本實驗以 Malondialdehyde ( MDA ) 濃度作為脂質過氧化之指標，結果如圖四所示單獨給予 1.5 mM t-BHP 時 MDA 濃度顯著地升高，當以 Atractylon 0.01, 0.1 及 1.0 mg/ml 分別前處理一小時後，再加入 t-BHP，結果 MDA 的生成活性明顯地分別降低為 85 %，70 % ( $P < 0.05$ ) 及 44 % ( $P < 0.01$ )。

#### 五、Atractylon 對 DNA 修補合成的影響

以 Unscheduled DNA synthesis ( UDS ) 的方法來探討 Atractylon 對 DNA 修補合成的影響，同時也可作為基因毒性的指標。本實驗以 t-BHP 添加於大白鼠肝細胞處理三十分鐘後，再給予 Atractylon，結果由表三顯示，1.0 mg/ml Atractylon 能夠顯著抑制 t-BHP 所引起 DNA 的傷害達 38 % ( $P < 0.001$ ) 程度；至於另外二種濃度之 Atractylon ( 0.01 及 0.1 mg/ml ) 也同樣具有抑制效果。



## 四、討論

蒼朮酮 (Atractylon) 為白朮中之主要成份，白朮在中醫臨床上常被用來作為保肝及治療肝病使用，而且在動物實驗及大白鼠初代培養肝細胞中對 CCl<sub>4</sub> 所引起的肝毒性具有抑制性的效果。可是由於西元 1982 年 Poli 及 Gravella 等人研究結果指出以 CCl<sub>4</sub> 作為誘導劑時所產生的脂質過氧化作用有許多差異性的結果 (4)；並且在西元 1986 年 Berger 等人的研究指出可能由於 Haloalkanes 所具有之溶劑效應改變了細胞的完整性 (5,11)，因此顯示以 CCl<sub>4</sub> 作為肝損傷研究的實驗模式並不適宜，所以本研究以探討蒼朮酮 (Atractylon) 是否作為自由基捕捉者之模式來研究蒼朮酮 (Atractylon) 的抗肝毒性活性。而西元 1985 年 Rush 等人 (17) 以研究抗肝毒性藥物的實驗指出以 t-BHP 當誘導劑所誘發肝毒性為一較好的研究模式。

本實驗利用 DPPH test 來檢驗蒼朮酮捕捉自由基的能力，結果顯示 1.0 mg/ml 蒼朮酮 (Atractylon) 可以捕捉 85 % 的 DPPH radicals，表示其具有很好的抗氧化性的能力。

t-BHP 對細胞具有毒性的主要機制之一，可能是經由產生自由基的中間產物，進而使脂質產生過氧化作用而影響細胞的完整性 (18,19)；另外也可能與細胞分子形成一些共價鍵結而使 DNA 受損 (20)。本實驗在肝細胞毒性及脂質過氧化作用方面的測定顯示，預先以蒼朮酮處理的肝細胞對於 t-BHP 所造成的肝細胞損傷具有保護作用，包括可以降低 LDH 及 ALT 酵素釋放量及減少 MDA 的形成。另外，以 UDS 的方法分析結果也顯示蒼朮酮能夠非常有效地抑制 t-BHP 所造成的 DNA 損傷，因而表示蒼朮酮具有抗基因毒性的能力。因此本實驗結果不僅證實蒼朮酮具有抗肝毒

性及抗脂質過氧化的能力，而且也支持了蒼朮酮可作為自由基捕捉者的理論，是經由抑制了肝細胞發生過氧化作用，因而減低了 t-BHP 所造成的細胞毒性及基因毒性。

除此，有關 t-BHP 造成細胞毒性的機制是被認為與細胞解毒過程中 Glutathione ( GSH ) 的消耗及 Pyridine nucleotide 氧化程度有關。因此，也可能改變了  $Ca^{++}$  homeostasis。本實驗也發現預先處理蒼朮酮並不會增加 GSH 的含量(數據未標示)，表示蒼朮酮的抗肝細胞毒性可能與 Glutathione systems 無關。

綜合以上結論，本研究證實蒼朮酮可以對抗 t-BHP 所引起的肝毒性損傷及基因傷害，其機制可能是因蒼朮酮可以捕捉自由基而具有抗氧化劑的能力所產生。雖然之前的研究曾指出 (21) 蒼朮酮可能經由本身的酵素代謝系統而產生自由基，但其去毒作用之機制，仍有待更進一步的探討加以證實。

**Table 1 The cytotoxicity of t-BHP and atractylon analyzed by MTT assay.**

Treatment <sup>a</sup>	OD <sub>563nm</sub> <sup>b</sup>	% of control absorbance
control	0.82 ± 0.03	100
t-BHP (0.5 mM)	0.80 ± 0.01	98
t-BHP (1.0 mM)	0.76 ± 0.02	93
t-BHP (1.5 mM)	0.75 ± 0.01	91
t-BHP (2.0 mM)	0.68 ± 0.03	83
atractylon (0.01 mg/ml)	0.81 ± 0.01	99
atractylon (0.1 mg/ml)	0.80 ± 0.02	98
atractylon (1.0 mg/ml)	0.79 ± 0.02	96

<sup>a</sup>. Hepatocyte culture were treated with various doses of tert-butyl hydroperoxide or atractylon for 30 min or 1 hr separately.

<sup>b</sup>. Mean ± SD, n=3.

**Table 2 Free radical-quenching ability of atractylon determined by DPPH test.**

Concentration <sup>a</sup>	OD <sub>517nm</sub> <sup>b</sup>	% of control absorbance
0	1.67 ± 0.07	100
0.01 mg/ml	1.12 ± 0.14 <sup>**c</sup>	67
0.1 mg/ml	1.06 ± 0.13 <sup>**</sup>	63
1.0 mg/ml	0.20 ± 0.03 <sup>***</sup>	12

a. Various doses of atractylon were mixed with DPPH (10mM, 30  $\mu$ l) in methanol. The reaction mixtures were then colored by the addition of toluene, and read at 517 nm against a black without atractylon. The fraction of DPPH bleaching was calculated by comparing with the absorbance of the DPPH solution containing only DMSO (100  $\mu$ l) as 0%.

b. Mean  $\pm$  SD, n=3

c. <sup>\*\*</sup>P<0.01, <sup>\*\*\*</sup> P<0.001, compared with the DMSO treated group, t-test .

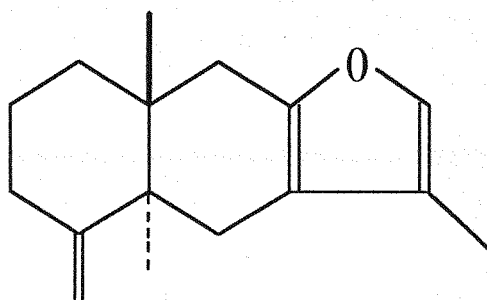
**Table 3 Effect of atractylon on t-BHP-induced DNA damage in primary cultured rat hepatocytes.**

Treatment <sup>a</sup>	dpm/ $\mu$ g DNA	% of t-BHP control
t-BHP (1.0 mM)	670 $\pm$ 50 <sup>b</sup>	100
t-BHP (1.0 mM) plus:		
atractylon (0.01 mg/ml)	543 $\pm$ 40 <sup>*c</sup>	81
atractylon (0.1 mg/ml)	376 $\pm$ 39 <sup>*</sup>	56
atractylon (1.0 mg/ml)	255 $\pm$ 15 <sup>***</sup>	38

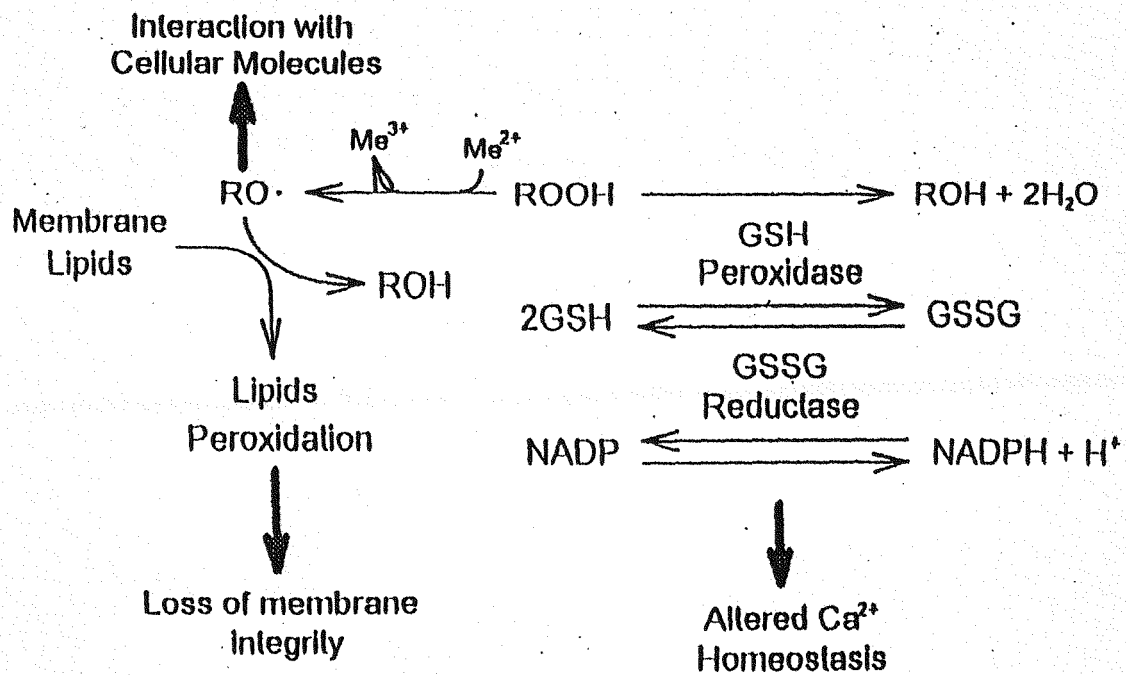
a. Primary cultured rat hepatocytes were pretreated with hydroxyurea and various concentrations of atractylon for an hour, and then exposed to t-BHP for 30 minutes. Unscheduled DNA synthesis was analyzed by incubating the cells in [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine (1  $\mu$  Ci/ml) containing medium for 18 hours. Cells were harvested and lysed for radioactivity counting. DNA repair synthesis was expressed as dpm/  $\mu$  g DNA.

b. Mean  $\pm$  SD, n=3.

c. \* P<0.05, \*\*\*P<0.001, compared with the 1.5 mM t-BHP-treated group, t-test .



**Figure 1 Structure of Atractylon.**



**Figure 2 Proposed mechanisms of cell death induced by tert-Butyl Hydroperoxide.**

Me = metal.

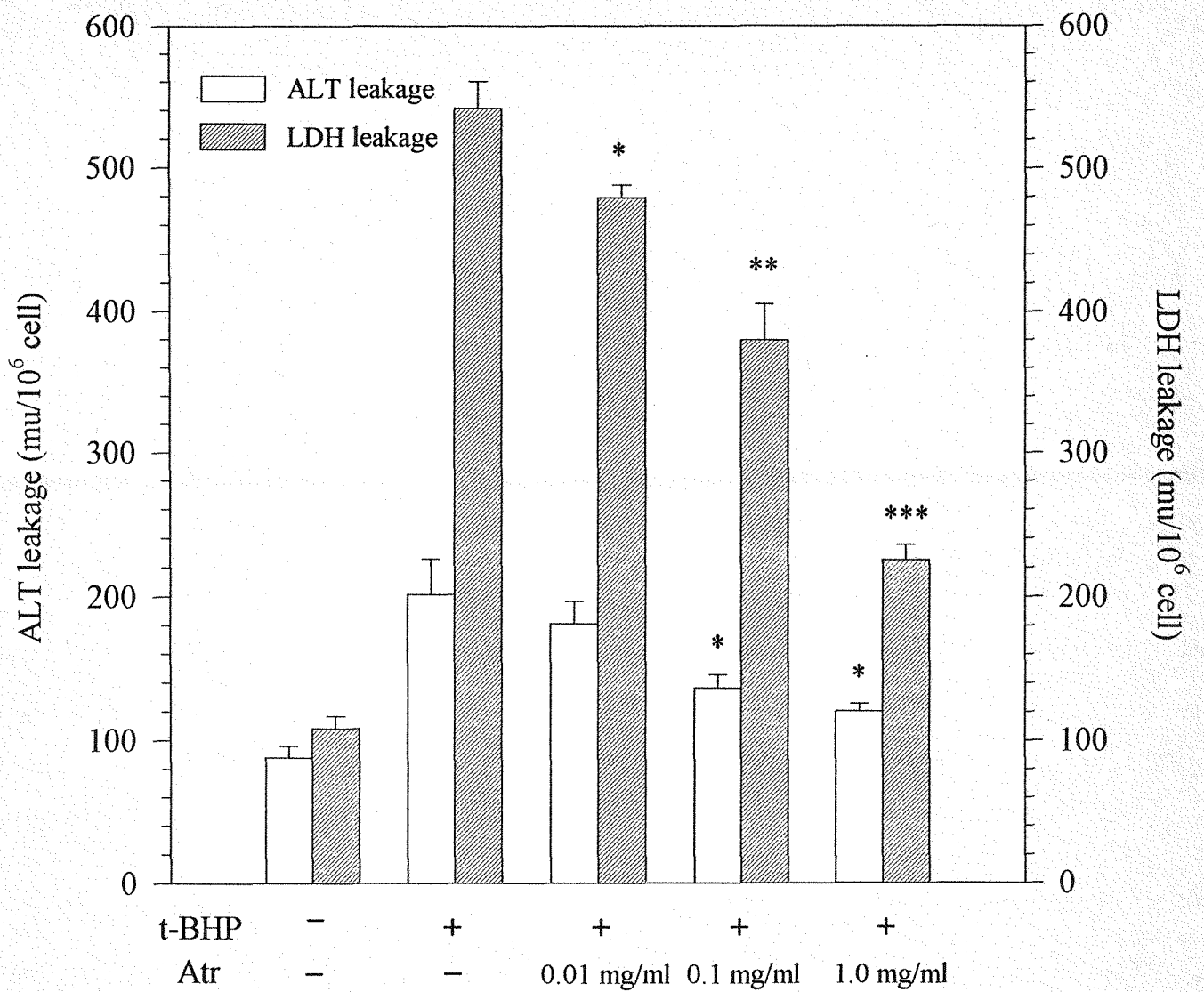


Figure 3 Influence of atractylon (Atr) on the leakages of lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase in isolated rat hepatocytes induced by 30 min-treatment of t-BHP.  
 \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; compared with 1.5 mM t-BHP-treated. t-test .



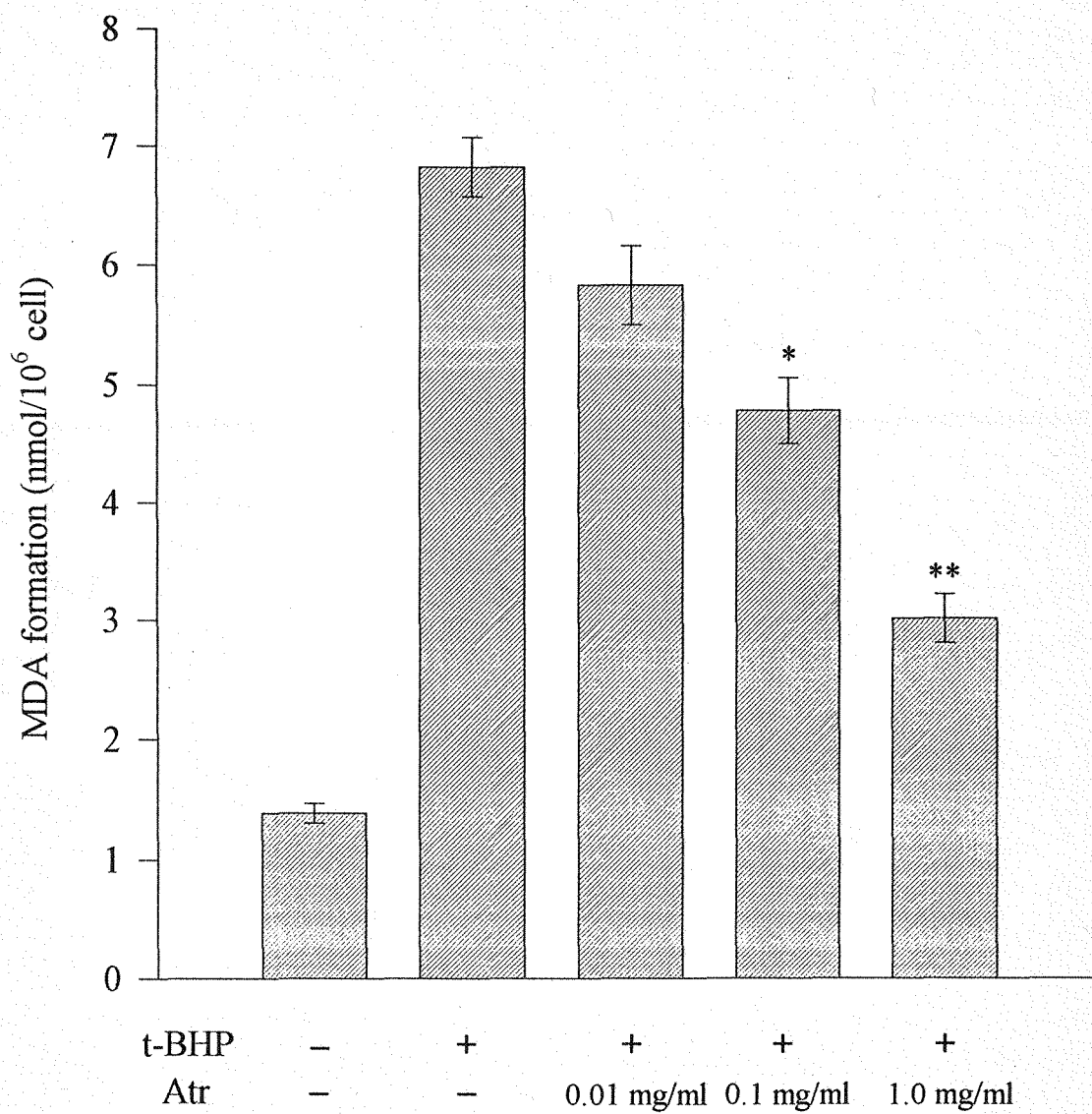


Figure 4 Influence of atractylon (Atr) on malondialdehyde formation in isolated rat hepatocytes induced by 30 min-treatment of t-BHP. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; compared with 1.5 mM t-BHP-treated. t-test.

## 五、参考文献

1. Kiso, Y., Tohkin, M. and Hiniko, H. Antihepatotoxic principles of *Atractylodes rhizomes*. J. Nat. Prod. 1983; 46: 651-654.
2. Yamshara, J., Matsuda, H., Sawada, T., Kimura, H. and Fujimura, H. Abstract of papers, The 101s Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Kumamoto, 1981; P.470.
3. Recknagel, R. O., Glende, E. A. and Hruszkewycz, A. M. In: Pryor, W. A. (ed), Biology, Vol. III, Academic Press, New York. 1976; PP. 97-132.
4. Poli, G., Gravella, E. In: McBrien, D. C. H., Slater, T. F. (eds). Free radicals, Lipid Peroxidation and Cancer, Academic Press, London, New York. 1982; PP. 215-241.
5. Berger, M.L., Bhatt, H., Combes, B., Esterbrook R. W. CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. Hepatology 1986; 6: 36-45.
6. Bellomee, G., Jeweell, S. A., Thor, H. and Orreniuss, S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79: 6842-6846.
7. Hill, K. E. and Buck, R. F. Toxicity studies in isolated hepatocytes from selenium-deficient and vitamin E-deficient rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1984; 72: 32-39.
8. Alley, M. C., Pacula-Cox C.M., Hursey, M. L., Rubinstein, R. and Boyd, M.R. Morphometric and colorimetric analysis of human

- tumor cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. *Cancer Research* 1991; 51: 1247-1250.
9. Bonney, V.R., Becker, J.E., Walker, P. R. and Potter, V.R Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of regulation of enzyme synthesis. *In Vitro*, 1974; 9: 399-413.
  10. Alley, M.C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mauo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 1988; 48: 589-592.
  11. Berger, M.L., Sozeri, T. Rapid halogenated hydrocarbon toxicity in isolated hepatocytes is mediated by direct solvent effects. *Toxicology*, 1987; 45: 319-330.
  12. Peter, B., Wartena, M., Kamping, H.H. and Konings, A. W. T. Role of lipid peroxidation and DNA damage in paracetamol with ionizing radiation. *Biochemistry Pharmacology*, 1992; 43: 705-715.
  13. Yagi, K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem. Phys. Lipids*, 1987; 45: 337-351.
  14. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254.
  15. Hsia, M.T.S., Kremerand, B.L. and Dolara, P. A rapid and simple method to quantitate chemically induced unscheduled DNA synthesis in freshly isolated rat hepatocytes facilitated by DNA retention of membrane filters. *Mutat. Res.*, 1983; 122: 177-185.

16. Vytask, R. A sensitive fluorometric assay for the determination of DNA. *Anal. Biochem.*, 1982; 120: 243-248.
17. Rush, G., Gorski, J. R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P. and Hewitt, W.R. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985; 78: 473-483.
18. Thornalley, P., Trotta, R.J. and Stern, A. Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by tert-butyl hydroperoxide in erythrocytes. *Biophys. Acta*, 1983; 759: 16-22.
19. Hogberg, J., Orrenius, S. and O'Brien, P. Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 1975; 59: 449-455.
20. Orrenius, S., Ormstad, K., Thor, H. and Jewell, S. A. Turnover and functions of glutathione studies with isolated hepatic and renal cells. *Fed. Proc.* 1983; 42: 3177-3188.
21. Kiso, Y., Tohkin M., Hikino H., Harori M., Sakamoto, T. and Namba, T. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Medica*, 1984; 50: 298-302.

## 第二部份

食用紅色七號著色料Erythrosine B對於  
巴拉刈誘發大白鼠肝細胞DNA損傷  
促進作用之研究

## 縮寫表

**ER: Erythrosine B**

**PQ: Paraquat**

**LDH: Lactate Dehydrogenase**

**ALT: Alanine Aminotransferase**

**MDA: Malondialdehyde**

## 中文摘要

食用紅色七號著色料 ( Erythrosine B; ER ) 常廣泛當作食物、藥物、化粧品之添加物。本研究採用能對初代培養肝細胞產生過氧化作用的化學除草劑巴拉刈 ( Paraquat; PQ ) 當作誘導劑，以誘發鼠肝細胞損傷，並分別在肝細胞加入巴拉刈之前或同時加入食用紅色七號著色料處理，然後測定肝細胞培養基中LDH、ALT等酵素含量及肝細胞分解物MDA濃度作為分析指標；進一步利用蛋白質合成抑制作用試驗的方法探討食用紅色七號著色料對肝細胞損傷後對細胞質中蛋白質合成抑制的影響。另外在*In Vitro*實驗中利用毛細電泳分析發現食用紅色七號著色料與巴拉刈之間有鍵結可能產生新化合物。由實驗結果顯示食用紅色七號著色料具有增強巴拉刈對肝細胞毒性的活性及脂質過氧化的作用；另外食用紅色七號著色料同時也具有加強肝細胞損傷後蛋白質合成抑制作用。綜合以上實驗結果，推測食用紅色七號著色料結合巴拉刈的化學作用可能是增強肝細胞膜的脂質過氧化作用，另外亦可能是由於食用紅色七號著色料強化了巴拉刈誘發肝細胞損傷所產生的氫氧自由基 ( Hydroxyl radical ) 之致毒作用機制所致。

## Abstract

Erythrosine B (2',4',5',7'-tetraiodofluorescein disodium salt; FD and C Red No. 3), is used widely as a color additive in foods, drugs and cosmetics. The purpose of the present study is to investigate the effects of erythrosine B on paraquat-induced lipid peroxidation and the inhibition of protein synthesis in rat hepatocyte. The primary hepatocyte culture was pretreated with erythrosine B prior to the administration of paraquat, or treated simultaneously with both substances. The activities of LDH and ALT were used as hepatic function markers and the activity of MDA as the index of lipid peroxidation. The promotion effect of erythrosine B on paraquat-suppressed protein synthesis in rat hepatocyte was also elucidated. Furthermore, we use capillary electrophoresis to analysis the chemical bonding relation of erythrosine B and paraquat that may result new compound. It was concluded that erythrosine B possesses the ability to enhance, the paraquat-induced hepatotoxic and lipoperoxidant activities. The results suggested that the promotion mechanism of erythrosine B on paraquat-suppressed protein synthesis was caused by the lipoperoxidation effect of erythrosine B on the lipid of cell membrane. On the other hand, erythrosine B may also strengthen the toxic effect of the free radical product induced by paraquat that, ultimately , caused hepatic cell damage.



## 一、緒論

### (一)、研究背景

食用紅色七號著色料 (Erythrosine B) 通常廣泛當作食物、藥物、化粧品之添加物，在美國、英國、歐洲各國被允許使用，而WHO/FAD對每日攝取建議量為100 ppm。由於缺乏具有基因毒性 (Genotoxicity)，因此Erythrosine 仍被認為可安全使用。

以往研究已指出紅色七號著色料在體外試驗做基因毒性的評估時，對*S. typhimurium* 並無致突變性 (1, 2)，對*E. coli* 也不會造成DNA的修補現象 (3)。而Roger等人 (4) 實驗中以300 mg/ml medium Erythrosine B 添加於V79 Chinese hamster lung cells 中會增加micronucleus frequency，但是V79 cell 與Primary hepatocyte 同時培養之下則會降低細胞Mitotic frequency，Hepatocytes 對V79細胞中Erythrosine B 的調節作用可能經由許多生化調節，包括Hepatocyte 對Erythrosine B 染料的去毒作用 (5) 而造成的。

氧是細胞生存不可或缺的物質，但是當細胞發生不正常的代謝過程中，卻是造成細胞死亡之殺手，而許多毒性物質 (Toxic agent) 在進入細胞中往往會造成過量的活性氧系 (Reactive oxygen species; ROS) 的產生，如超氧陰離子 (Superoxide anion;  $O_2^{\cdot -}$ )，單氧 (Singlet oxygen;  $^1O$ )，氫氧自由基 (Hydroxyl radical;  $OH^{\cdot}$ )，過氧化氫 (Hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) 等，而ROS的產生量如果超過細胞本身抗氧化能力 (Cellular antioxidant capacity) 的時候則會導致細胞脂質的過氧化 (Lipid peroxidation)，以及蛋白質、RNA、DNA的損傷、突變 (6、7)，而這些傷害則可能是造成癌化、心血管疾病，甚至老化都有一定的相關性。

巴拉刈 ( Paraquat, 學名 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridylium ) 是一種極有效而廣泛被使用之除草劑，常因使用不當，或誤食而造成許多全身性毒性病例，此因巴拉刈的氧化作用可造成肝、腎、肺等器官的破壞 ( 8 )。巴拉刈的除草機制乃藉著干擾細胞內電子傳遞系統，抑制植物葉子光合作用使 NADP 不能還原成 NADPH，而此時氧變成超氧陰離子 ( Superoxide )，經由非飽和性脂肪酸的聚合作用破壞含脂細胞膜，而使樹葉枯死 ( 9, 10 )。在動物方面，其致病機制類似植物，因刺激細胞內 NADPH 的氧化，並當作電子接受者，而取得電子，在有氧狀況下，將電子傳遞給氧形成超氧陰離子 (  $O_2^{\cdot -}$  )，巴拉刈復原後再繼續搶奪電子而成為製造超氧陰根離子的催化劑；最近研究指出巴拉刈致病機制與經由其加速脂質過氧化作用 ( Lipid peroxidation ) 有關 ( 11, 12 )。其可能反應機制如 Fig. 2。

## (二)、研究目的

本研究以食用紅色色素七號著色料為實驗材料加入培養之肝細胞中，採用對肝細胞能誘發脂質過氧化作用之化學除草劑巴拉刈為誘導劑，誘發鼠初代培養肝細胞的損傷後，以測定肝細胞培養基中多種生化值如 Lactate dehydrogenase ( LDH ) 及 Alanine aminotransferase ( ALT ) 之酵素含量作為肝細胞毒性的分析指標 ( 13 )，並分析肝細胞脂質過氧化物之分解物 Malondialdehyde ( MDA ) 的濃度 ( 14 )，探討食用紅色色素七號著色料對肝細胞之抑制作用。進一步利用初代培養之肝細胞，觀察食用紅色色素七號著色料對巴拉刈所誘發蛋白質合成抑制之調節作用，俾探討食用紅色色素七號著色料對巴拉刈之作用機制。

## 二、材料與方法

### (一)、化學試劑與儀器

#### (A) 化學試劑：

Erythrosine B (2',4',5',7'-tetraiodofluorescein disodium salt; FD and C Red No. 3)、MTT、TBA (Thiobarbituric acid)、Collagenase、T-BHP (tert-butyl hydroperoxide)、[methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidine、SDS、EDTA、Thymidine、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)、Glycine 及 肝 功 能 生 化 值 Alanine aminotransferase(ALT)、Lacate dehydrogenase (LDH) 測定試劑均購自美國Sigma公司；Williams E 培養基、PSN 抗生素購自美國Gibco公司；Proteinase K 為德國Merck公司產品；Aquasol-2 閃爍液為美國New England Nuclear 出品；Protein 測定試劑為英國 Bio-Rad 產品。細胞培養所需的培養基 (medium；Williams E)，PBS (Phosphate buffer saline)，Calf bovine serum，PSN antibiotic mixture，Glutamine，HBSS (Hanks' balanced salt solution) 等購自美國GIBCO BRL公司，其他試劑與實驗所需之Dish則購自Nunc公司。

#### (B) 儀器：

UV and Visible Spectrophotometer (Hitachi; U2000)

Fluorescence spectrophotometer (Hitachi; F2000)

Scintillation counter (Aloka; LSC-900)

Capillary electrophoresis analyzer (Beckman P/ACE system)

## (二)、實驗動物

本研究使用購自台大動物研究中心之Wistar品系，體重為220-280公克之雄性大白鼠及體重為18-25公克之雄性ICR品系小白鼠為實驗動物。

## (三)、Erythrosine B對Paraquat急性毒性試驗之影響

使用體重18-25公克之雄性ICR品系小白鼠每組10隻，觀察由腹腔注射Paraquat ( I.P. 50 mg/kg ) 或Erythrosine B ( I.P. 50 mg/kg ) 後72小時內白鼠中毒死亡情形，以及注射劑量Erythrosine B ( 50 mg/kg ) 1小時後，再注射相同劑量Paraquat ( 50 mg/kg ) 後，及同時注射Erythrosine B 與 Paraquat 最後於72小時內觀察實驗動物存活情形。

## (四)、肝細胞之初代培養

### *(Primary hepatocyte culture)*

初代培養之肝細胞係根據 Bonney 氏等之方法 ( 15 )，以肝臟灌流方式取得。本研究使用購自台大動物研究中心之 Wistar 品系，體重為220-280公克之雄性大白鼠為實驗動物。在大白鼠腹腔注射戊基巴比妥 ( Pentobarbital, 50 mg/ml ) 麻醉，劑量為大白鼠體重每100公克給予0.2ml，麻醉後，打開腹腔以 20G 血管導管穿刺肝門脈，固定後以加有EDTA 而不含鈣、鎂離子之 HBSS 緩衝液灌流，同時剪斷下腔靜脈放血，再以含膠原酵素 ( Collagenase ) 及鈣離子之緩衝液灌流後，取下肝臟，分離肝細胞，以每毫升  $1.5 \times 10^6$  之細胞密度培養於 4ml Williams E 培養基中含 10% 胎牛血清及 1% PSN 抗生素，置於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。於最初三

小時更換培養基，除去未貼壁之細胞，當作以下細胞分析使用。

### (五)、MTT法之細胞活性分析

#### *(Cytotoxicity)*

食用紅色七號著色料或巴拉刈對細胞活性的影響係根據 MTT 比色法分析之(16)。在培養皿中培養一定量肝細胞 ( $5.0 \times 10^4$  cells/dish) 再加入各種不同濃度 (2.5mM; 5.0mM; 10.0mM) 的巴拉刈或不同濃度(0.1; 1.0; 5 mM) 的食用紅色七號著色料，於 37 °C 下分別培養 4 小時後，移走培養基，肝細胞以 PBS 液洗滌，換新培養基後，加入 20  $\mu$ l MTT 試液 (5.0 mg/ml)，培養 4 小時，因活細胞會將 MTT 還原成 Formazan 結晶，再以 Isopropanol 溶解之，於光波長 563nm 下測定吸光度，由吸光度大小測定出活細胞的多寡比較之。

### (六)、肝細胞毒性分析

#### *(Hepatotoxicity assay)*

以肝功能診斷酵素包括 Lactate dehydrogenase (LDH)、Alanine aminotranferase (ALT) 作為肝細胞毒性的分析指標。LDH 去氫酵素的測定係根據 Amador 氏等記述的方法 (17)，將巴拉刈 (5 mM) 單獨加入培養基中處理肝細胞當作控制組，實驗組則分為四組：在加入巴拉刈 5 mM 前 1 小時及同一時間兩種方式分別以食用紅色七號著色料 (0.1; 1.0; 5.0 mM) 加入培養基中處理肝細胞，以上各組均於巴拉刈加入後培養五小時，再分取上層培養基 2 ml，於光波長 340 nm 下測定 LDH 之活性。而 ALT 的測定則根據 Bergmeyer 氏等的方法 (13)，按上述同樣方法分組處理之，並與巴

拉刈 5 mM 單獨處理肝細胞控制組作比較，於光波長 340 nm 下測定吸光度，分別比較各組 ALT 的活性。

### (七)、MDA 生成濃度之分析

#### (Lipid peroxidation assay)

脂質過氧化的方法主要是根據 Yagi 氏 (1987) (19) 所使用的螢光測定法 (fluorometric method), 肝細胞中脂質過氧化係藉著其分解產物 Malondialdehyde (MDA) 的濃度為指標來測定。在肝細胞培養基中單獨加入巴拉刈 5 mM 當作控制組，實驗組則如同第五項所述，以同樣方法處理肝細胞。以上各組均於加入巴拉刈後培養五小時，更換培養基，刮下肝細胞，加入 2 ml 10% Trichloroacetic acid 去蛋白後，離心之。再精確量取上清液 2 ml 加入等量之 1% TBA 試劑後，置沸水浴中加熱 10 分鐘，冷卻後按 Stacey 氏等修飾的方法 (20)，於光波長 Ex/Em=515/535 nm 下測定螢光強度，各組分別與巴拉刈控制組比較其 MDA 含量。

### (八)、蛋白質合成抑制試驗：

長滿之細胞以 0.25% 胰蛋白酶處理下來，取少量計數其細胞數目，以 DMEM 將細胞稀釋成每毫升  $2 \times 10^5$  個細胞。將 0.5 毫升細胞懸浮液加入 24 孔細胞培養皿孔內，在 37°C，10% 二氧化碳培養器內培養 24 小時。俟後，在各樣品內加入 0.5 mCi 之  $^3\text{H}\text{-Leu}$ 。在 37°C，10% 二氧化碳培養器內繼續培養 1 小時，取出培養皿，吸去培養基，以生理食鹽水清洗一次，加上 4°C 之 10% TCA，置於冰箱中 15 分鐘，取出，吸去 TCA，繼以 5% TCA 洗一次，加上

100微升 0.2 N 氫氧化鉀，將不溶於酸之大分子溶解，溶液取出置於 20 毫升 Kimble 閃爍計數瓶中，加上 2 毫升之閃爍計數液(含 4 公克 PPO 及 0.1 公克 POPO/升於 甲苯：Triton X-100 = 2:1 之中)，以 b 閃爍計數器計數其放射量。以對照組(不含蛋白質者)當作 100%，實驗組與之相除，即可得抑制之百分比。

### (九)、毛細電泳分析：

#### (*Capillary electrophoresis analysis*)

使用 Beckman P/ACE system 5500 毛細電泳分析儀，以直徑 75 mm，57 cm 長的毛細管做分析。操作前，先以 0.2N NaOH 沖洗毛細管約兩分鐘，其次以去離子水 (Milli-Q 水) 洗淨管中之 NaOH，時間設定五分鐘，之後進行樣本的電泳分析。

步驟一) 以 0.02 M pH8.0 Phosphate buffer 預洗 (pre-rinse) 毛細管，時間為兩分鐘。

步驟二) 採 pressure 方式來 Inject 受測樣本，時間為十秒。試驗樣本則依實驗設計區分為兩組：

A. 對照組：巴拉刈 (5 mM) 單獨加入培養基中處理肝細胞  
當作對照組

B. 實驗組：分為四組，在加入巴拉刈 5 mM 前 1 小時及同一時間兩種方式分別以食用紅色七號著色料 (0.1; 1.0 mM) 加入培養基中處理肝細胞

步驟三) 以 0.02 M pH8.0 Phosphate buffer 為導電媒介，Separation 時間為 0 到 10 分鐘，採 Voltage 方式，電壓設定為 20 KV，溫度定為 25°C，於最適波長偵測樣本在特定波長下的吸收峰。



步驟四)以 0.2 N NaOH沖洗毛細管約一分鐘，去離子水 (Milli-Q水) 洗淨管中之 NaOH，時間設定兩分鐘，之後進行下一個樣本的分析。最後依光譜分析所得的圖譜計算分子間交互作用程度的百分比，即  $\text{Interaction (\%)} = (\text{Erythrosine B shift peak 積分面積} / \text{單獨 Erythrosine origin peak 積分總面積}) \times 100\%$ 。

### 三、結果

#### 一、Erythrosine B對Paraquat急性毒性試驗之影響

如表一所示，不給Paraquat亦不給Erythrosine B正常組之10隻小白鼠，經觀察三天結果均正常存活，而單獨給予Paraquat (50 mg/kg) 之控制組，三天內有5隻小白鼠死亡

。實驗組中給予Erythrosine B (I.P. 50 mg/kg) 1小時後再給Paraquat (I.P. 50 mg/kg) 者三天內共死亡3隻；同時給予Erythrosine B (50 mg/kg) 及Paraquat (50 mg/kg) 者有7隻死亡；至於實驗組中給予Erythrosine B (50 mg/kg) 則與正常組相同，10隻小白鼠均正常存活下來。由此顯示Erythrosine B對於腹腔注射適當劑量的Paraquat所誘導的毒性具有加強毒性作用 (toxic effect)，並且呈現劑量依存性關係。

#### 二、MTT法之細胞活性分析

如表二所示，利用MTT法測定細胞活性時，當加入Paraquat濃度為5.0 mM時，吸光度與控制組比較為86%，顯示該濃度適合作為細胞毒性誘導劑的濃度；當Paraquat濃度增為10 mM時分別降低為71%，表示對細胞毒性略增。至於Erythrosine B則如表二所示，當濃度為0.1 mM、1.0 mM或5 mM時與控制組比較，吸光度沒有明顯下降，因此本研究中採用0.1 mM、1.0 mM濃度作為給藥之非毒性劑量。

#### 三、肝細胞毒性分析

如表三所示，單獨加入Paraquat 5 mM控制組之LDH值明顯的升高，4個實驗組中經1.0 mM Erythrosine B培養1小時後再加

入Paraquat的實驗組有明顯的升高 ( $P < 0.05$ ) 尤其以1.0 mM Erythrosine B 和 Paraquat 同時處理的實驗組LDH值升高最為明顯 ( $P < 0.01$ )。另外 Paraquat 控制組亦能使ALT值升高，而實驗組中以1.0 mM Erythrosine B和Paraquat 同時處理的實驗組ALT值升高最為顯著 ( $P < 0.01$ )。

#### 四、MDA生成濃度之分析

如表四所示，單獨以Paraquat (5 mM)處理之控制組，其肝細胞中MDA生成濃度急速升高，但經以同時加入0.1 mM、1.0 mM Erythrosine B與 Paraquat 同時處理者或先加入0.1 mM、1.0 mM Erythrosine B再加入Paraquat處理，兩個實驗組肝細胞中MDA濃度呈現顯著的升高作用。尤其以同時加入1.0 mM Erythrosine B與 Paraquat 處理者其肝細胞中MDA濃度呈現顯著的升高作用 ( $P < 0.001$ )。

#### 五、蛋白質合成抑制作用之影響

Erythrosine B 對Paraquat 誘發肝細胞損傷毒性之作用可係藉著蛋白質合成抑制方法來測定。結果如表五所示，Erythrosine B 對Paraquat (0.5 mM) 誘發蛋白質合成抑制作用在濃度0.1mM和1.0mM ( $P < 0.001$ ) 下均有顯著的加強Paraquat 所誘發的肝細胞損傷作用。

#### 六、毛細電泳分析之影響

比較Erythrosine B 單一存在 (Fig. 3)，Paraquat 單一存在 (Fig. 4)及兩者反應後之毛細電泳分析圖譜顯示此色素可能與

Paraquat 形成一種新的加成物 ( Fig. 5 )。由此,推測此兩種物質混合具有相加成之現象。以上推論可進一步由質譜儀所呈現於  $m/e = 1020$  ( Fig. 6 ) 所證明。

## 四、討論

本實驗採用對肝細胞能誘導脂質過氧化反應的除草劑巴拉刈 (Paraquat) 當作誘導劑，以誘發鼠肝細胞受損，然後區分為加入 Erythrosine B 之後或同時加入 Paraquat 等二種情況來比較 Erythrosine B 在 Paraquat 誘發下對肝毒性活性 (Hepatotoxic activity) 與脂質過氧化作用 (Lipoperoxidation) 下是加強或抑制作用，同時比較其活性的大小；進一步再探討 Paraquat 在 Erythrosine B 存在下對肝細胞受損害的情形 (Fig. 7, Fig. 8)。

首先由動物實驗觀察經腹腔給予 ICR 品系小白鼠 Erythrosine B (I.P. 50 mg/kg) 後再給一半致死量 (LD<sub>50</sub>) 的 Paraquat (I.P. 50 mg/kg)，結果顯示，Erythrosine B 具有加強 Acute toxicity 作用，且其加強作用呈現劑量依存性的關係。接著由初代培養的肝細胞測定 Erythrosine B 與 Paraquat 對肝細胞毒性分析指標，即 LDH、ALT 等酵素含量生化值的影響，結果顯示 Erythrosine B 亦能顯著的提高肝細胞受 Paraquat 損傷時肝細胞滲漏的酵素含量，證明 Erythrosine B 具有加強 Paraquat 對肝細胞毒性的作用，而且以同時加入 Erythrosine B 及 Paraquat 處理肝細胞後的實驗組效果最顯著，其次則為先加入 Erythrosine B 再加入 Paraquat 處理的實驗組，由此表示 Erythrosine B 對肝細胞脂質傷害具有促進的作用。至於 Erythrosine B 對肝細胞膜脂質的過氧化作用則從分析 MDA 生成物濃度的結果知道，同樣是同時加 Erythrosine B 和 Paraquat 的實驗組的效果較明顯，具有統計上的意義，因此也證明了 Erythrosine B 對 Paraquat 所引起的過氧化作用具有顯著 ( $P < 0.001$ ) 的加強脂質過氧化作用。

因 Paraquat 的氧化作用，產生了許多超氧陰離子 (superoxide anion)，此等超氧陰離子再去攻擊肝細胞膜上的脂質

而啟動了過氧化作用，當細胞膜上脂質發生了過氧化作用可令其構造發生改變，細胞膜硬化，而使細胞膜上重要的ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) 酵素活性發生改變(21)；進一步細胞膜脂質過氧化作用產物MDA (Malondialdehyde) 又與細胞中的核酸反應而形成加合物，常常導致細胞的突變作用 (Mutagenesis) 與致癌作用 (Carcinogenesis) 等嚴重的後果(22)。利用蛋白質合成抑制的方法，顯示Erythrosine B能強化Paraquat所誘發之肝細胞損傷作用，因此可以解釋之Erythrosine B所以能促進Paraquat所誘發肝細胞損傷的作用機制是經由Erythrosine B加強了肝細胞膜脂質發生過氧化作用的結果，以提高Paraquat傷害細胞的作用。

目前已知生物性含氧自由基 (Oxygen free radical) 主要有參種，即超氧陰離子 (Superoxide anion;  $\text{O}_2^-$ )，過氧化氫 (Hydrogen peroxide;  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 與氫氧自由基 (Hydroxyl radical;  $\text{OH}^\cdot$ )，當中超氧陰離子與核酸分子反應可造成多種傷痕，如DNA分子單股或雙股之切斷及鹼基之修改；而氫氧自由基與DNA反應可產生斷股 (Strand cleavage) 的現象；而此等切斷的DNA則可受到細胞中酵素群之修補，或以抗氧化劑來捕捉含氧自由基，以防止細胞免於氧化之傷害(23)。對於超氧陰離子，在氧化攻擊的特異性上言，必須有一個要件，即結合的金屬離子如Fe(III)必先還原成Fe(II)的形態，才能與超氧陰離子因受超氧陰離子歧化 (Superoxide dismutase) 作用的去毒途徑所生成的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反應，而形成另一種含氧自由基 ( $\text{OH}^\cdot$ )，根據報告指出Paraquat可將結合的Fe(III)還原成Fe(II)(24)，因而能與 $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用生成有害的氫氧自由基。從目前的研究文獻可以確定Paraquat的致毒機制除能產生超氧陰離子外，亦可能經組織或細胞中Fe(II)的還原作用而產生氫氧自由基。另外亦可能是由於食用紅色七號著色料強化了巴拉刈誘發肝

細胞損傷所產生的氫氧自由基 (Hydroxyl radical) 之致毒作用機制所致。

**Table 1. Enhance effects of Erythrosine B (ER) on Paraquat (PQ)-induced acute toxicity.**

Treatment <sup>a</sup>	No. of mice treated	No. of mice which died after drug administration (days)			Survival rate(%)
		1	2	3	
Control	10	0	0	0	100 %
ER	10	0	0	0	100 %
PQ	10	2	1	2	50 %
ER PQ	10	0	0	3	70 %
ER+PQ	10	1	3	3	30 %

a. All animals received an equal dose of paraquat (PQ) (I.P. 50 mg/kg) except control group and erythrosine B (i.p. 50 mg/Kg) were pretreated with ER for 1 hr prior to the addition of PQ (ER PQ) or simultaneous treatment with ER (ER + PQ).



**Table 2 The cytotoxicities of Erythrosine B (ER) and Paraquat (PQ) analyzed by MTT assay.**

Treatment	OD <sub>563nm</sub> <sup>c</sup>	% of control absorbance
control	0.87 ± 0.02	100
PQ (2.5 mM) <sup>a</sup>	0.77 ± 0.03	89 <sup>d</sup>
PQ (5.0 mM)	0.75 ± 0.02	86
PQ (10.0 mM)	0.62 ± 0.01	71
ER (0.1 mM) <sup>b</sup>	0.86 ± 0.02	99
ER (1.0 mM)	0.85 ± 0.01	98
ER (5.0 mM)	0.84 ± 0.03	97

a. The hepatocyte cultures were treated with various doses of paraquat (PQ) for 4 hr.

b. The hepatocyte cultures were treated with various doses of erythrosine B(ER) for 1 hr.

c. Mean ± SD, n=3.

d. % of control absorbance.

**Table 3 Enhance effects of Erythrosine B (ER) on the leakages of lactate dehydrogenase (LDH) and alanine dehydrogenase (ALT) in the rat primary hepatocyte cultures treated with Paraquat (PQ).**

Treatment <sup>a</sup>	LDH (m $\mu$ /10 <sup>6</sup> cells)	ALT (m $\mu$ /10 <sup>6</sup> cells)
control	69.5 $\pm$ 0.8	87.6 $\pm$ 0.8
PQ (5.0 mM) <sup>a</sup>	83.3 $\pm$ 3.3	98.9 $\pm$ 1.1
ER (1.0 mM)	49.1 $\pm$ 2.5	83.4 $\pm$ 6.5
ER (0.1 mM)	43.9 $\pm$ 1.9	88.7 $\pm$ 3.1
ER (1.0 mM) PQ (5 mM)	97.8 $\pm$ 3.2*	126.7 $\pm$ 6.5*
ER (0.1 mM) PQ (5 mM)	81.3 $\pm$ 0.9	102.8 $\pm$ 13.7
ER (1.0 mM)+PQ (5 mM)	133.5 $\pm$ 3.9**	152.9 $\pm$ 13.7**
ER (0.1 mM)+PQ (5 mM)	84.4 $\pm$ 0.9	125.2 $\pm$ 5.6*

<sup>a</sup>. Primary hepatocyte cultures were pretreated with ER at 1 mM or 0.1 mM concentrations for 1 hr prior to the addition of PQ (ER PQ) or were pretreated simultaneously with PQ and ER (ER + PQ) for 5 hr.

<sup>b</sup>. Mean  $\pm$  SD, values are the average of triplicate determinations.

\* P<0.05, \*\*P<0.01, compared with the PQ-treated group, t-test .

**Table 4 Enhance effects of Erythrosine B (ER) on lipid peroxidation in the rat primary hepatocyte cultures induced by Paraquat (PQ).**

Treatment <sup>a</sup>	MDA formation <sup>b</sup> (n mole/10 <sup>6</sup> cells)
control	0.63 ± 0.06
PQ (5.0 mM) <sup>a</sup>	2.04 ± 0.12
ER (1.0 mM)	2.71 ± 0.25
ER (0.1 mM)	2.14 ± 0.37
ER (1.0 mM) PQ (5 mM)	10.34 ± 0.64**
ER (0.1 mM) PQ (5 mM)	2.36 ± 0.18*
ER (1.0 mM) + PQ (5 mM)	16.18 ± 0.43***
ER (0.1 mM) + PQ (5 mM)	3.18 ± 0.22*

a. Primary hepatocyte cultures were pretreated with ER at 1 mM or 0.1 mM concentrations for 1 hr prior to the addition of PQ (ER PQ) or were pretreated simultaneously with PQ and ER (ER + PQ) for 5 hr.

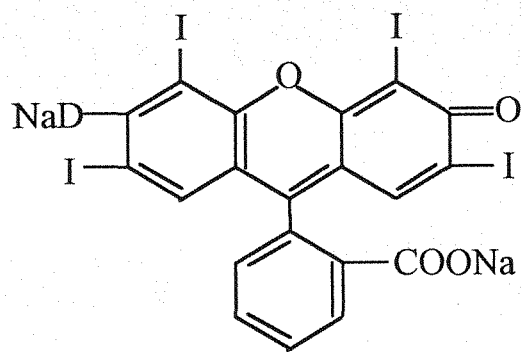
b. Mean ± SD, values are the average of triplicate determinations.  
\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, compared with the PQ-treated group, t-test .

**Table 5 Enhance effects of Erythrosine B (ER) on protein synthesis in the rat primary hepatocyte cultures induced by Paraquat (PQ).**

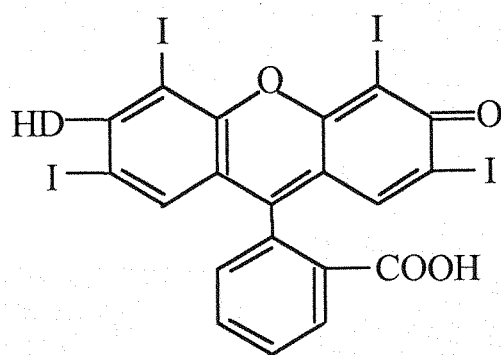
Treatment <sup>a</sup>	protein synthesis <sup>b</sup> (n mole/10 <sup>6</sup> cells)
control	3251.3 ± 52.3
PQ (5.0 mM) <sup>a</sup>	2792.4 ± 60.9
ER (1.0 mM)	2903.5 ± 61.1
ER (0.1 mM)	2912.1 ± 142.2
ER (1.0 mM) PQ (5 mM)	1357.3 ± 64.5***
ER (0.1 mM) PQ (5 mM)	1807.6 ± 54.7***
ER (1.0 mM)+PQ (5 mM)	1792.9 ± 45.9***
ER (0.1 mM)+PQ (5 mM)	1868.4 ± 51.3***

<sup>a</sup>. Primary hepatocyte cultures were pretreated with ER at 1 mM or 0.1 mM concentrations for 1 hr prior to the addition of PQ (ER PQ ) or were pretreated simultaneously with PQ and ER (ER + PQ) for 5 hr.

<sup>b</sup>. Mean ± SD, values are the average of triplicate determinations.  
\*\*\*P<0.001, compared with the PQ-treated group, t-test .

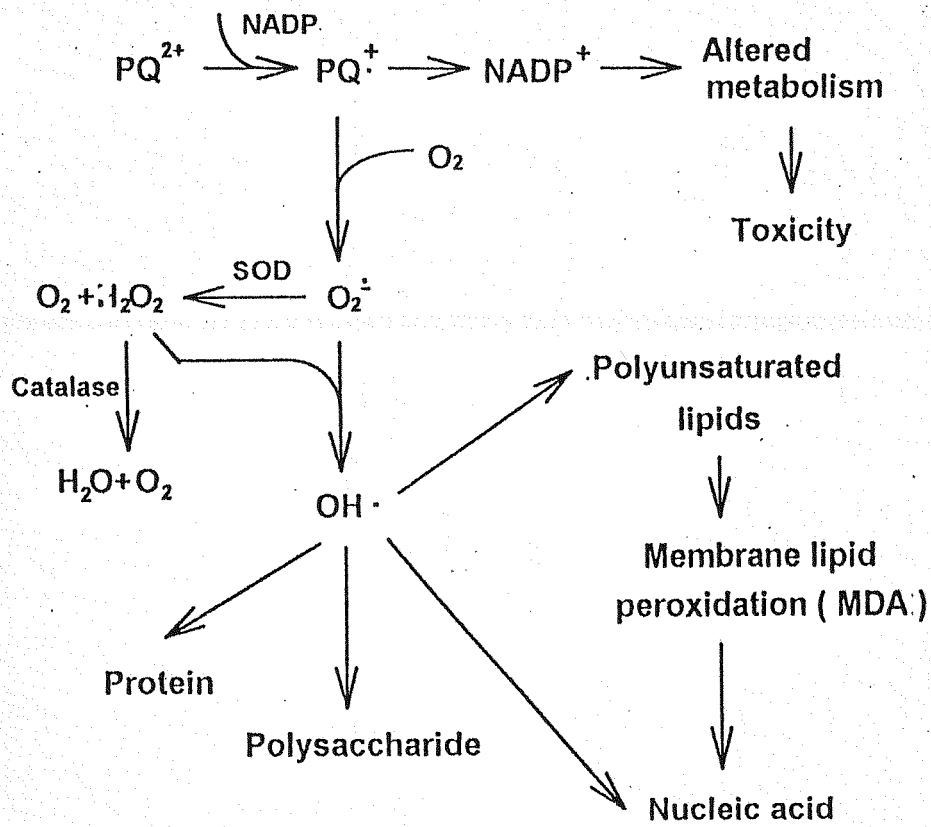


分子 及分子量:  $C_{20}H_6O_5I_4Na_2$ , 880  
(Sodium salt)



分子 及分子量:  $C_{20}H_8O_5I_4$ , 836  
(Free acid)

**Figure 1. Erythrosine B**



**Figure 2 Proposed mechanisms of paraquat toxicity.**

Figure 3 Paraquat 之毛細電泳分析圖

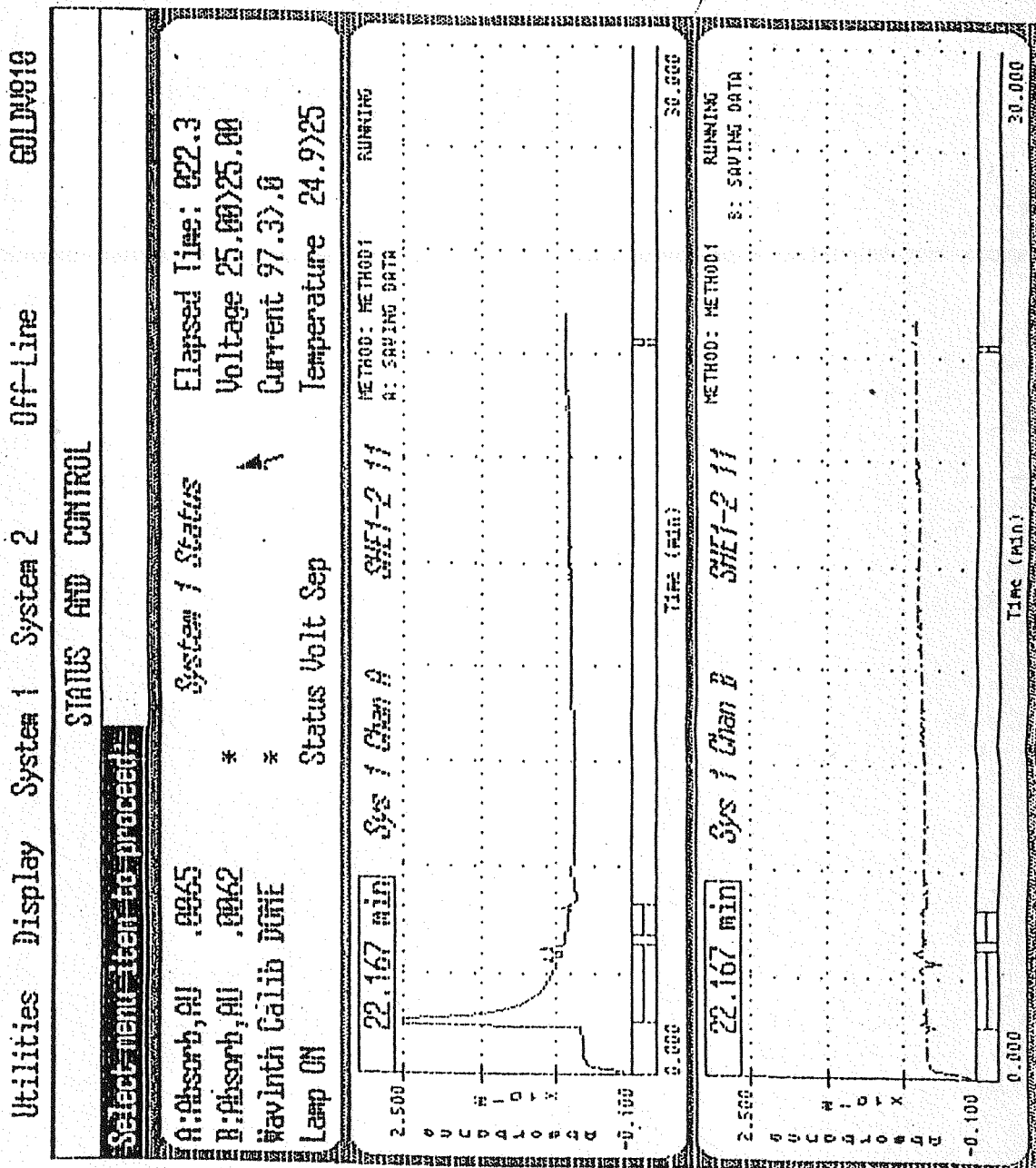


Figure 4 Erythrosine B 之毛細電泳分析圖

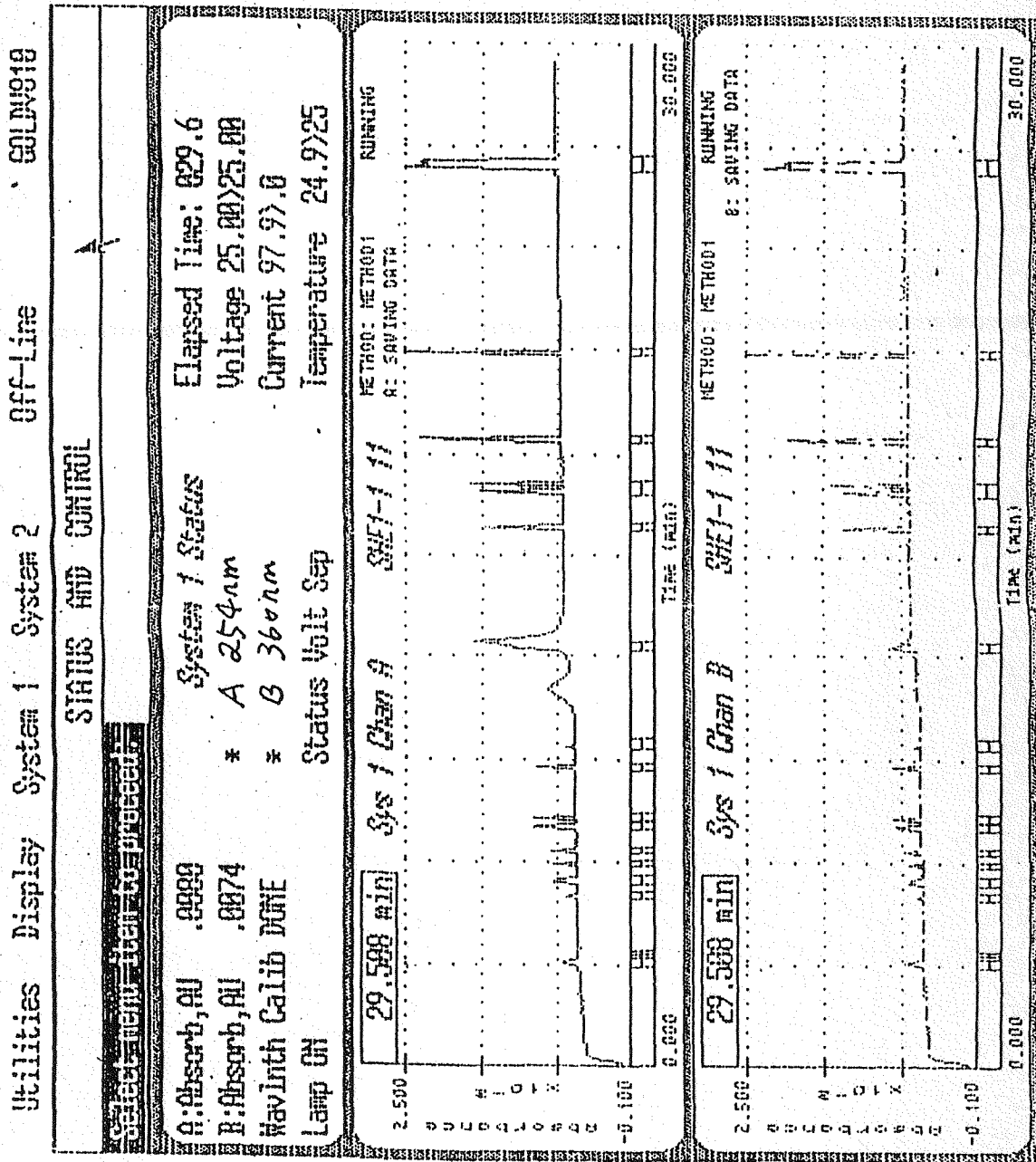
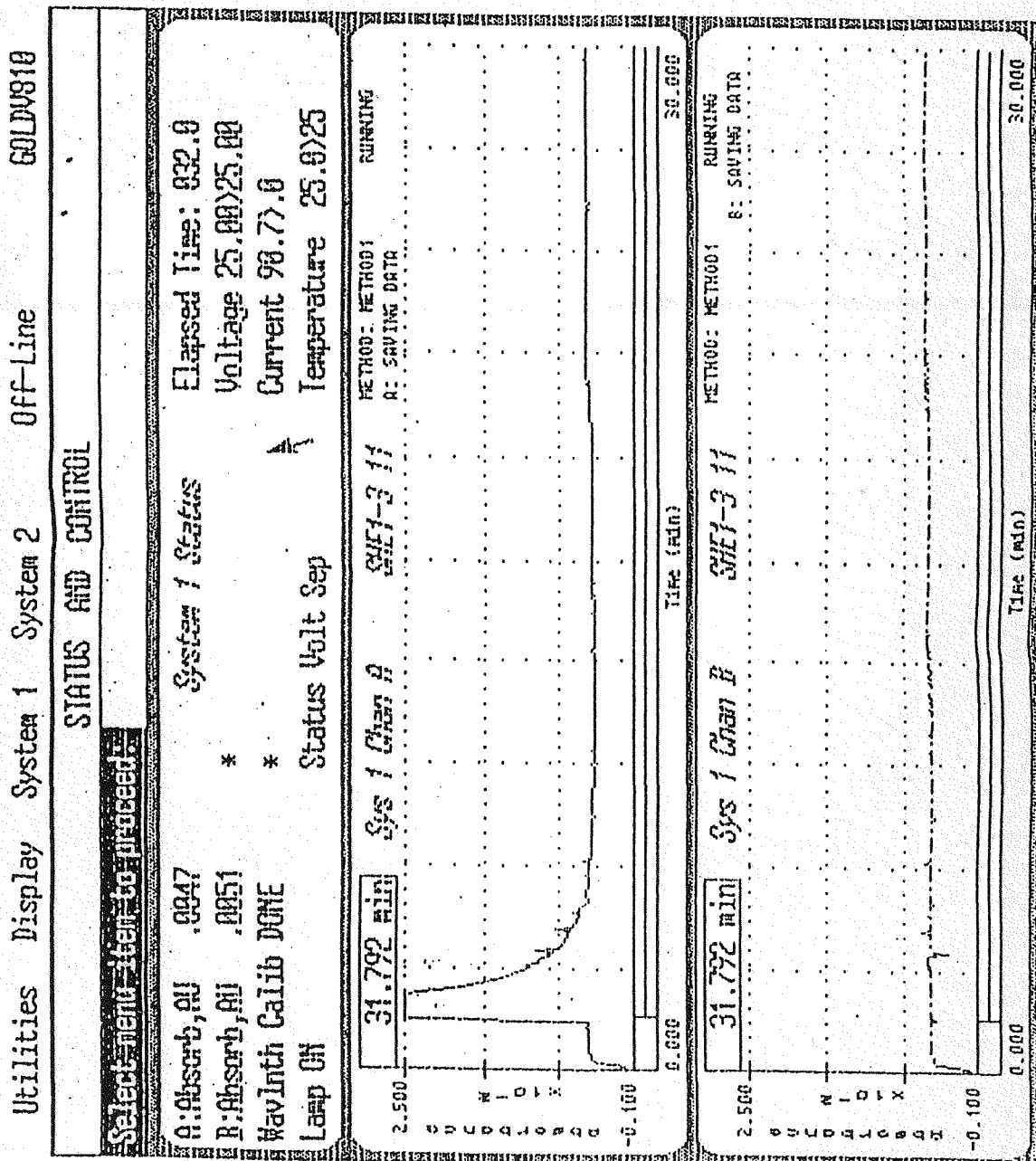




Figure 5 Erythrosine B 與 Paraquat 混合物之  
毛細電泳分析圖



[ Mass Spectrum J  
 Date : 31-May-95 14:55  
 Data : FAB-2431  
 Sample: MD-ETB(NBA)  
 Note : \*  
 Inlet : Direct  
 Ion Mode : FAB+  
 Spectrum Type : Regular [MF-Linear]  
 RT : 2.51 min  
 Scan# : (2,14)  
 BP : m/z 186.0000  
 Int. : 1454.64  
 Temp : 15.8 deg.C  
 Output m/z range : 50.0000 to 1800.0000  
 Cut Level : 0.00 %

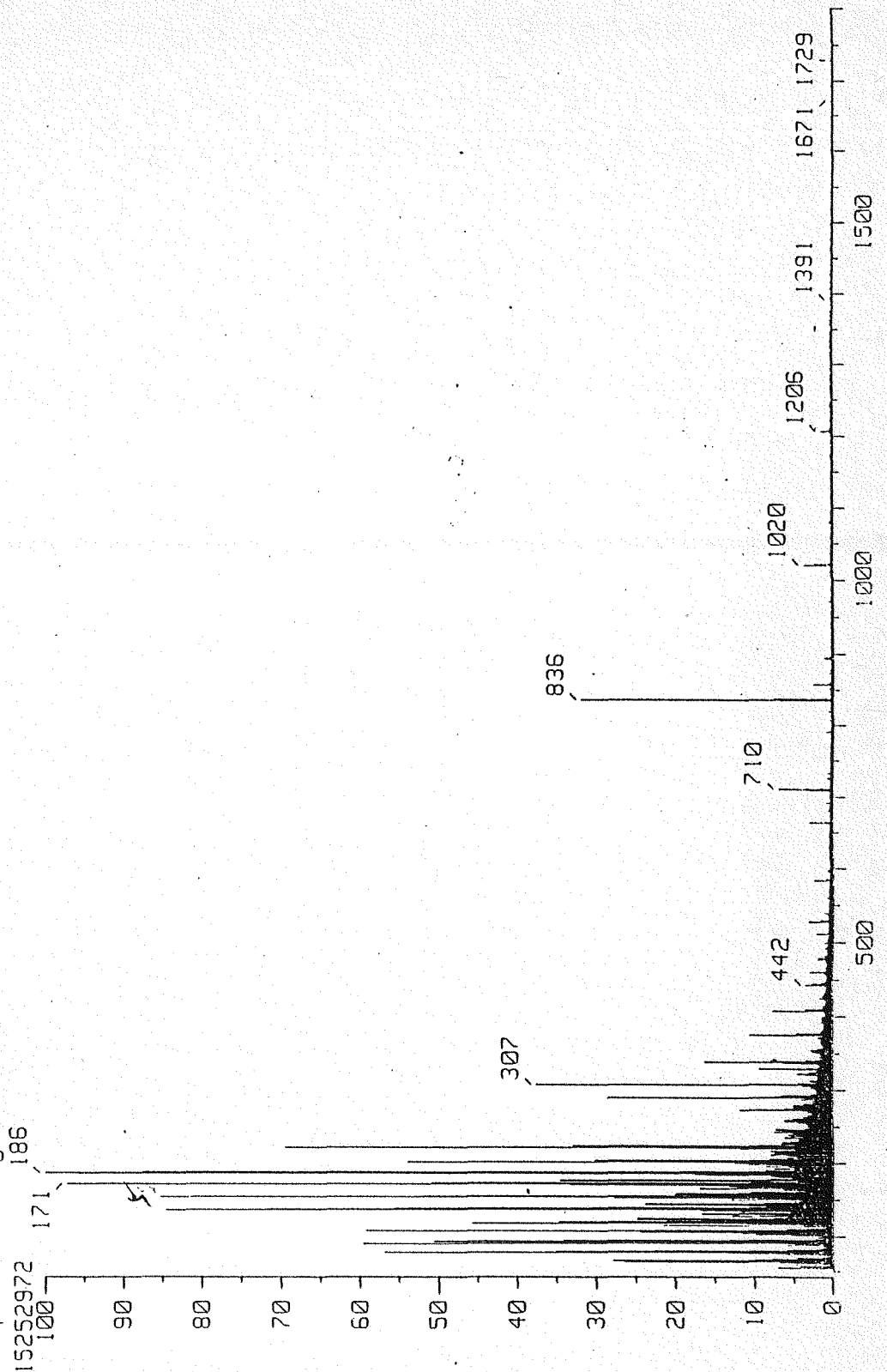
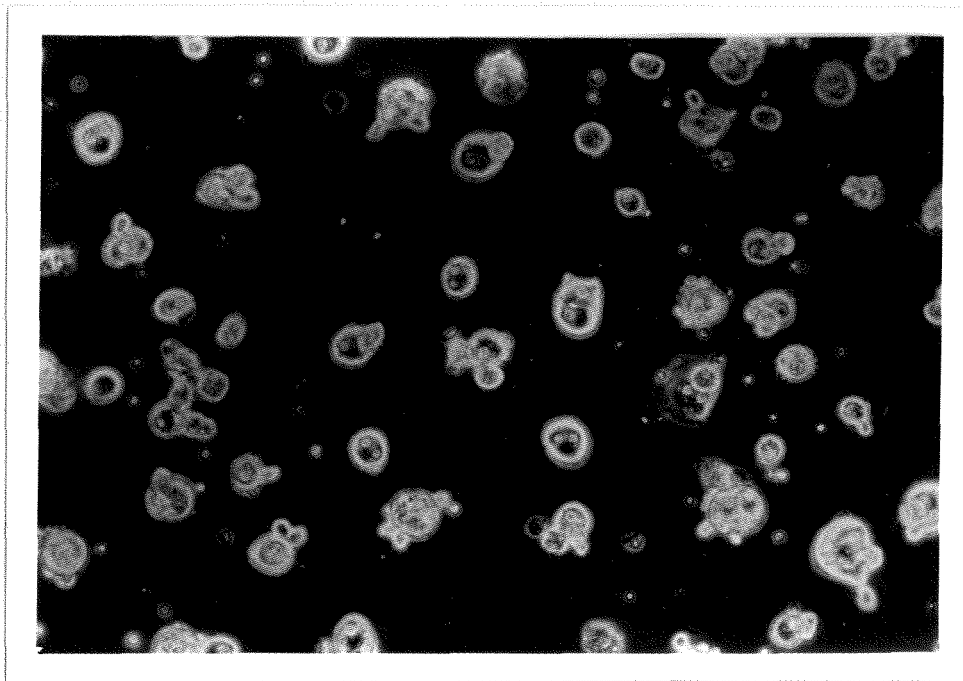
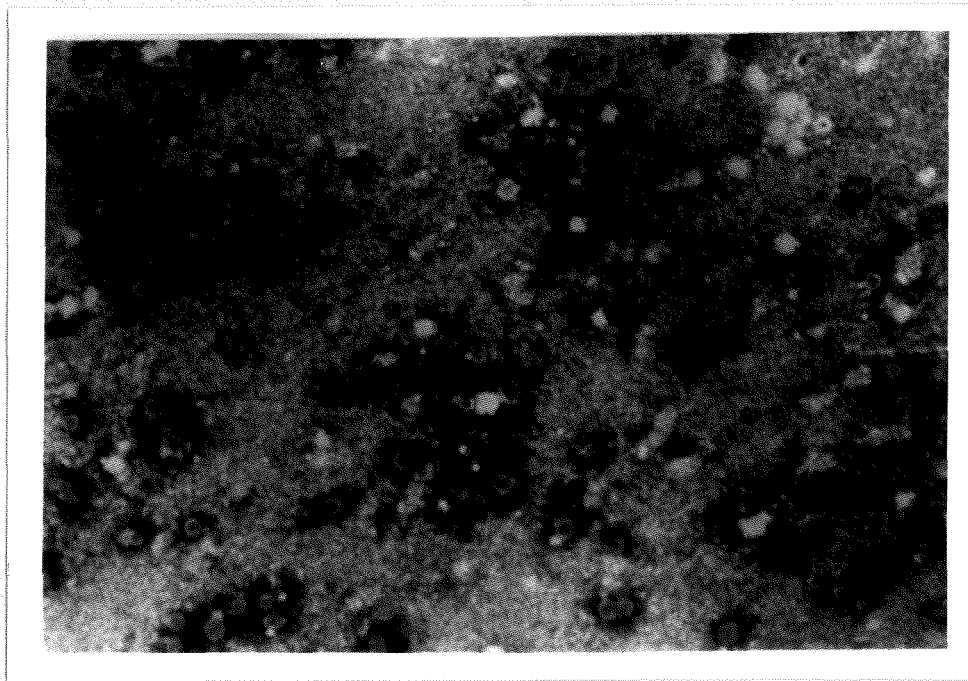


Figure 6 Erythrosine B 與 Paraquat 混合物之質譜儀分析圖



**Figure 7A** Microphotography of normal hepatocyte.



**Figure 7B** Microphotography of normal hepatocyte treated with ER and PQ.

## 五、參考文獻

1. Haveland-Smith, R.B., and R.D. Combes: Screening of food dyes for genotoxic activity. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1980 ;18: 215-221 .
2. Lin, G.H.Y., and D.J. Brusick: Mutagenicity studies on FD&C Red NO. 3. *Mutagenesis*, 1986; 1: 253-259.
3. Haveland - Smith, R.B., Combes, R.D. and B.A. Bridges: Studies on the genotoxicity of some fluorescein dyes. *Mutation Res.*, 1981; 88: 1-15.
4. C.G. Rogers, Boyes, B.G., Matula T.I., Heroux-Metcalf, C., and D.B. Clayson: A multiple end-point approach to evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of erythrosine (FD and C RED NO.3) in a V79 hepatocyte-mediated mutation assay. *Toxicology Research*, 1988; 415-423.
5. Sirica, A.E., and H.C. pitot: Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cells. *Pharmacol. Rev.*, 31: 205-228.
6. Cerutti, P.A.: Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 1985; 227: 375-380.
7. Breimer, L.H. Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA damage. *Molecular Carcinogenesis*, 1990; 3, 188-197.
8. Grant, H.C., Lantos, P.L. and C. Parkinson: Cerebral damage in paraquat poisoning. *Histopathology*, 1980; 4: 185-195.
9. Dasta J.F.: Paraquat poisoning: A review. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 1978; 35: 1368-1372.
10. Kuo, C.H., Sheen, I.S., Huang, C.C. *et al.*: Liver biochemical tests in

- paraquat intoxication. *Chang Guang Med. J.*, 1988; 11: 160-166.
11. Burk, R.F., Lawrence, R.A., Lane, J.M.: Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diguac administration. *J. Clin. Invest.*, 1980; 65: 1024-1031.
  12. Yasaka, T., Okudaira, K., and H. Fujito: Further study of lipid peroxidation in human paraquat poisoning. *Arch. Intern. Med.*, 1986; 146: 681-685.
  13. Randall, J.R., and E.K. James: Inhibition of mouse hepatocyte inter-cellular communication by paraquat-generated oxygen free radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1988; 94: 427-436.
  14. Bernheim, G., Bernheim, M.L.C., and K.M. Wilbur: The reaction between thiobarbituric acid and oxidative products of certain lipids. *J. Biol. Chem.*, 1948; 174: 257-264.
  15. Bonney, V.R., Becker, J.E., Walker, P.R. *et al.*: Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis in vitro. *Rochille*, 1974; 9: 399-413.
  16. Alley, M.C., Scudiero, D.A., and A. Monks: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro culture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 1988; 48: 589-601.
  17. Amador, E., Dorfman, L.E., Wacker, W.E.C.: Serum lactic dehydrogenase: An analytical assessment of current assays. *Clin. Chem.*, 1963; 9: 391.
  18. Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., and A.W. Wahlefeld: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.*, 1978; 24: 58.

19. Yagi, K. Lipid peroxide and human disease. *Chem. Phys. Lipids*, 1987; 45: 337-351.
20. Stacey, N.H., Cantilena, L.R., and C.D. Klassen: Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1980; 53: 470-480.
21. Liaw, K.Y., Kuo, L.L., Chen, C.C. and S.Y. Lin-Shiau: Alterations of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activities in erythrocyte, muscle, and liver of traumatic and septic patients. *Circulatory shock*, 1987; 22: 195-203.
22. Breimer, L.H.: Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.*, 1990; 3: 188-197.
23. Aruoma, O.I.: Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.*, 1994; 32: 671-683.
24. Niwa, Y., Ishimoto, K., and T. Kanoh: Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood*, 1990; 76: 835-841.

學生黃俊銘論文題目為蒼朮酮對於 Tert-Butyl Hydroperoxide 誘發大白鼠肝細胞 DNA 損傷保護作用之研究，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：朱嘉一 老師 簽名：朱嘉一

謝易修 老師 簽名：謝易修

中華民國八十五年二月十七日



授 權 書

本人所撰(著)八十四 學年度第一 學期 中山醫

大學 學院

生物化學研究所 碩

士學位論文(論文名稱)

蒼朮酮對於Test-Buty Hydroperoxid  
誘發大白鼠肝細胞DNA損傷保護作用

之提要  同意  不同意  
開放供學術利用。

姓名：黃俊銘

立書人：地址：台中市福田二街90號4F

身分證統一編號：D120957693

聯絡電話：(04)2635722

中華民國 八十五年 一月 三十 日