

R
008.8
6082

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

原兒茶酸抗 TPA 促癌作用及其機制之研究

Antitumor-promoting activity and mechanism of action of
Hibiscus protocatechuic acid.

指導教授：王朝鐘教授(Chau-Jong Wang)
曾翠華教授(Tsui-Hwa Tseng)

研究生：羅銘香(Ming-Hsiang Lo)



中華民國八十六年六月

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C046154

~W2Z2;授權書~W1Z1;
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 原兒茶酸抗TPA促癌作用及其機制之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 王朝鐘

研究生簽名: 羅銘香 學號: R8302115
(親筆正楷)

日期: 民國 86 年 07 月 01 日

備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。

2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。

3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

~W2Z2;簽署人須知~W1Z1;

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尙可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞
地址: 台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名: 羅銘香 聯絡電話: (04) 2015790

地址: 台中市日進街11號

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考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員：

臺灣大學醫學院
生物化學研究所教授

林仁滉

中山醫學院
生物化學研究所教授
(本論文指導教授)

王朝鏡

中山醫學院
生物化學研究所教授
(本論文指導教授)

曾翠華

中華民國八十六年六月

學生羅銘香論文題目為原兒茶酸抗 TPA 促癌作用及其機制之研究，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：王朝鐘教授

簽名：王朝鐘

曾翠華教授

簽名：曾翠華

中華民國八十六年六月三十日

誌 謝

研究一門學問的主題，其所涉及的專業知識是廣泛且多元化的，正因如此我要特別感謝王朝鐘所長的指導，使我對癌生物之認識從不知如何掌握方向而能更進一步探討。另外曾翠華老師在實驗及課業的輔導，也深深的誌謝；同時感謝周芬碧、朱嘉一、胡超群老師悉心指導以及許振東醫師於病理切片的幫忙。在整個實驗過程中要感謝的人太多了，諸如林世傑、黃俊銘、高而仕、李妙真學長姊的協助，使我儘快進入狀況，此外張明誠、高達偉、蔡育英、林吳宣煒、陳滄澤、黃朝祿、邱思綺學弟妹的實驗參加及加油打氣。如果沒有您們，我將不知如何面對實驗的挑戰。另外是實驗室裡的每個人，由於你們的參與，使我們的實驗室更溫馨，更有朝氣。

人生之路，千變萬化，人們有時是很難想到往後將走的路，由於在職進修，工作的調整，生活節奏變調是必然的。對醫院提供的機會及一些曾幫過我、體諒我的藥局藥師們，本人在此表達由衷的謝意。

此外也非常感謝口試委員林仁混教授，在繁忙之餘能夠抽空為我口試及提供寶貴的意見。

最後感謝家人及親戚朋友在生活上所給予最大的精神支持及諒解。

縮寫表

PCA:	Protocatechuic acid
XO:	Xanthine Oxidase
LO :	Lipoxygenase
B[a]P :	Benzo[a]pyrene
TPA :	12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate
ODC :	Onithine decarboxylase
H ₂ O ₂ :	Hydrogen peroxide
MPO :	Myeloperoxidase
PKC :	Protein Kinase C
ROS :	Reative oxygen species
·O ₂ ⁻ :	Superoxide anion radicals

目 錄

	頁數
中文摘要-----	04
英文摘要-----	06
緒論-----	07
材料與方法-----	11
一、由洛神花製備原兒茶酸-----	11
(一)試劑與儀器-----	11
(二)萃取與單離-----	12
二、原兒茶酸抑制氧化酶活性之體外試驗-----	13
(一)試劑與儀器-----	13
(二)嘌呤氧化酶活性之分析-----	13
(三)脂質氧化酶活性之分析-----	15
三、原兒茶酸抗 TPA 促癌作用之動物研究-----	17
(一)材料與試劑-----	17
(二)老鼠皮膚之腫瘤研究-----	17
(三)老鼠耳朵水腫之測試-----	18
(四)老鼠皮膚型態改變之測試-----	19
(五)鳥氨酸脫羧酶活性之測試-----	20
(六)老鼠上皮中過氧化氫之測試-----	21
(七)老鼠上皮中脊髓過氧化酶之測試-----	22

結果	23
討論	27
圖	30
表	47
參考文獻	54

摘 要

本研究的原兒茶酸是將洛神花先以酒精浸泡，再以乙酸乙酯萃取物進行色層分析而得。在嘌呤氧化酶活性的體外試驗，以 0.01、0.1 mM 原兒茶酸對嘌呤氧化酶活性的抑制分別為 1.3、11.3、48%，在脂質氧化酶活性的體外試驗，以 0.01、0.05 mM 原兒茶酸對脂質氧化酶的抑制作用分別為 6.25、28.12%。

以 20 nmol 的 B[a]P 處理 10 週及 15 nmol TPA 處理 20 週的皮膚腫瘤試驗中發現，以 5 μ mol、10 μ mol、20 μ mol 原兒茶酸處理而產生腫瘤老鼠的比例分別為 82、63、55%，而加 TPA 處理的老鼠則百分之百產生腫瘤。以 0.5 nmol TPA 塗抹老鼠之耳朵，測試其發炎反應，發現加 10 μ mol、20 μ mol 原兒茶酸，各有 65 及 73% 的抑制作用。以 1 nmol TPA 塗抹老鼠皮膚，再取其皮膚作切片觀察，結果發現原兒茶酸對 TPA 引起的增生作用有抑制效果。以 5 nmol TPA 塗抹老鼠皮膚，產生的 ODC 活性測試中，發現 5 μ mol、10 μ mol、20 μ mol 原兒茶酸分別有 46、68、91% 的抑制作用。以 6.5 nmol TPA 塗抹老鼠皮膚產生 H₂O₂ 測試中發現 5 μ mol、10 μ mol、20 μ mol 原兒茶酸分別有 61、84、89% 的抑制作用。以 6.5 nmol TPA 塗抹老鼠皮膚，產生的 MPO 測試中，發現 5 μ mol、10 μ mol、20 μ mol 原兒茶酸分別有 21、36、64% 的抑制作用。由以上可知，原兒茶酸對 TPA 引起的癌促進作用有其抑制的效果。

總之，原兒茶酸可藉由抑制嘌呤氧化酶和脂質氧化酶的活性，來達到抑制活性氧系的形成。進而抑制 TPA 所引起的癌促進作用，故推論原兒茶酸可能具有癌症化學抑制劑的作用和減少活性氧系的形成與堆積，來達到抗癌目的。

關鍵字: TPA, B[a]P, 洛神花, 原兒茶酸, 嘌呤氧化酶, 脂質氧化酶, 鳥氨酸脫羧酶, 脊髓過氧化酶。

Abstract

Protocatechuic acid (PCA), a simple phenolic compound from *Hibiscus sabdriffa L.*, presents antioxidant bioactivity previously. In preliminary experiments, PCA caused 48% inhibitory effect on xanthine oxidase activity at concentration of 1 mM and 28.12% inhibitory effect on lipoxygenase activity at concentration of 0.05 mM.

In animal study, topical application of PCA (5, 10 or 20 μmol) with TPA (15 nmol) twice weekly for 20 weeks to mice previously initiated with benzo [a] pyrene inhibited the fraction of mice with tumor by 82, 63, 55% respectively and the number of TPA-induced tumor per mouse meanwhile each mouse had tumors in TPA treated mice. Preapplication of the same amount of PCA also afforded significant protection against TPA induced hyperplasia in the ear skin. Topical application of PCA inhibited tumor promoter-caused induction of epidermal ODC activity by TPA (5 nmol). The topical application of PCA (10 or 20 μmol) inhibited TPA-induced edema of mouse ears by 65 and 73% respectively. Pretreatment of mouse skin with PCA (5, 10 or 20 μmol) caused inhibition of hydrogen peroxide by 64, 84 and 89% respectively. TPA (6.5 nmol)-mediated production of myeloperoxidase (MPO) was significantly suppressed (21, 36 and 64% ; $P < 0.05$ or 0.005) by pretreatment with 5, 10 or 20 μmol PCA, respectively. These results indicated that PCA inhibited TPA-induced promotion of skin tumors, hyperplasia, hydrogen peroxide, ODC and inflammation. It is suggested that PCA possesses potential as a cancer preventive agent against tumor promotion..

Keywords: 12-0-Tetradecanoylphorbol-13 acetate, Benzo[a]pyrene, Protocatechuic acid, Xanthine oxidase, Lipoxygenase, Hydrogen peroxide, Myeloperoxidase.

緒論

一、洛神葵

學名：*Hibiscus Sabdariffa Linnaeus*，為錦葵科 (Malvaceae) 植物。

別名：Rozella (英)，Tamaica Sorrel (英)，Red sorrel (英)，Asam susur (馬)，Kachieb priew (泰)，紅角葵 (中) [1]。

形態：為一年生之木質草本灌木，株高 1-2 公尺，莖紫紅色。其葉互生，葉片異形，上部掌狀 3-5 裂，下部近卵圓形，先端尖。其花單生脈出，先端刺芒狀，花梗長可達 7 公釐，小苞 8-12 枚，基部合生且長 10 公釐，有毛。花冠黃色，中心部分紫黑色。雌雄蕊合體，雄蕊多數。蒴果卵球形，具 5 室，各生種子 5-7 顆，狀如腎形。花期夏秋間，果期秋冬間。

分佈：原產熱帶地區，分佈於印度、馬來西亞，東南亞地區。

成份與用藥：

(1)花萼：於未成熟時去除子房之萼片，稱洛神花 (Fig.1)，為本實驗主要材料，含一些糖類，如蔗糖還原糖，失水乳糖(glactan)，失水戊糖(pentosan)，粗蛋白質粗脂肪，Carboxylic acid (Malic acid、Citronenic acid、Protocatechuic

acid、Citric acid、Malonic acid、Hibiscusic acid)、Flavonoids (Gossypetin、Hibiscetin、Quercetin、Hibiscitrin)、Pectin [1,2]。具清熱、解渴、止咳、降血壓之效，可治中暑，咳嗽，酒醉，高血壓，今為台灣盛行涼茶之主要原料。

(2)種子：含有一些油酸及一些擬蛋白(albuminoid)，有強壯、利尿、輕瀉之效。

(3)根部：有強壯輕瀉之效。

本研究所用材料為洛神花，即未成熟時去除子房之萼片，先以酒精浸泡，再以乙酸乙酯萃取物進行色層分析而得之原兒茶酸。

二、原兒茶酸

原兒茶酸(Protocatechuic acid；PCA)是一種簡單的酚類化合物，其結構如 Fig.2，由洛神葵的乾燥花分離而來。過去在本實驗室裡已就原兒茶酸對自由基捕捉，肝細胞毒性，脂質過氧化作用，DNA 損傷修補作用及對 glutathion peroxidase 的影響作過測試 [3]。最近曾有報告指出它有強力抗氧化的特性 [4]，也有報告指出 PCA 對 diethylnitrosamine 誘發之肝臟癌，4-nitroquinoline-1-oxide 誘發之口腔癌和 azoxymethane 誘發之直腸癌，N-methyl-N-nitrosourea 誘發之胃癌，N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine 誘發之膀胱癌等，具有

抑制癌化之作用然其機制仍不甚了解 [5]；由於 PCA 為多酚之結構且具抗氧化特性，我們懷疑其具抗發炎及抗癌促進之作用，所以本研究以誘導皮膚癌形成之動物模式，來探討 PCA 之抗 TPA 促癌作用。

三、TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13 acetate)

TPA 是從 *Croton Tiglium* 的種子提煉的巴苳油中萃取的一種 phorbol ester 其結構如 Fig. 8 所示，根據 John J.R. 等人提出 TPA 可促進 Xanthine Dehydrogenase 合成，其為 Xanthine Oxidase 形成之主因，Xanthine Oxidase 更可利用氧分子以形成活性氧系 ROS [6-7]。又 TPA 誘發的 H_2O_2 會刺 PLA_2 活性上升，而使 Arachidonate 產量增加，在 Arachidonate 的代謝過程中，經 LO、COX 作用，伴隨 superoxide anion 和 lipid peroxide 的產生，進而刺激 PKC 的活化，使 c-jun、c-fos 的表現增加，導致癌促進作用 [8-9]。根據 Friedewald 和 Rous 提出二階段致癌作用的觀念 [10]。二階段皮膚致癌作用可用來解釋腫瘤發生的原因；皮膚塗腫瘤起始劑和腫瘤促進劑才可使皮膚產生腫瘤。起始劑和促進劑的使用是不可以顛倒的，若先以促進劑塗在皮膚上，之後再塗以起始劑，如此塗藥是不能讓老鼠產生腫瘤，由此可知，腫瘤產生的次序，先是起始作用，而後促進作用。此外，根據 Miura 等人所提出之皮膚癌形成模式中，TPA 可促使已被 initiation 的皮膚癌化提前，並使腫瘤數目增加 [11-13]。因此，我們可知 TPA 為一種很強的癌促進劑，其可促進化學致癌物

的癌化作用，在促進皮膚癌化的作用，包括有皮膚腫瘤形成，耳朵水腫，上皮型態改變，鳥氨酸脫羧酶活性和脊髓過氧化酶活性的增加，及造成氧化性 DNA base 損傷 [14]。

四、實驗目的

本研究以大陸進口之洛神花所萃取分離出的 PCA，來探討其抑制 LO 及 XO 等氧化酶性之體外試驗，及利用 TPA 引起老鼠皮膚癌的這個模式，藉以探討 PCA 是否能對癌症產生抑制作用。所使用的方法有：觀察 PCA 對老鼠皮膚癌的抑制情形，以及觀察 PCA 對 TPA 引起之發炎反應的抑制情形，包括老鼠耳朵的水腫試驗、上皮的增生肥大及發炎測試、ODC 活性及 H_2O_2 形成與 MPO 活性分析。根據以上之研究，可知 TPA 會造成 ROS 的產生以及具有老鼠皮膚癌的促進作用。



材料與方法

一、由洛神花製備原兒茶酸

(一) 試劑與儀器

1. 試劑：

(1) 管柱層析部份：

吸著劑：矽膠(silica gel 60, #70-230 號篩, Art No:7734)

(E.Merck, German)

矽膠(silica gel 60, #230-400 號篩, Art No:9385)

(E.Merck, German)

沖提劑：(a) CHCl_3 : CH_3OH = 98:2, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3

(b) 最後以 CH_3OH 沖洗 column

(2) 薄層層析部份：

材料：薄層層析片(TLC Plastic sheets silica gel 60

F₂₅₄ pre-coated 25 sheets 20 x 20 cm layer

thickness 0.2 mm, Art No:5554) (E Merck,

German)

展開液：(a) CHCl_3 :MeOH = 95:5

(b) CHCl_3 :MeOH = 9:1

(c) CHCl_3 :MeOH = 8:2

顯色劑：10% 硫酸溶液

2. 儀器：

Spectrophotometer (HITACHI; U2000)

Fluorescence spectrophotometer (HITACHI; F2000)

Scintillation counter (ALOKA; LSC-900)

Refrigerated circulator (HOTECH, 631-D)

Handy aspirator (YAMATO, WP-15)

超導核磁共振儀 (VARION, VXR-300 Mhz)

氣相層析質譜儀 (JEOL JMS-SX/SX 102A)

紅外線光譜儀 (JASCO, J-0087)

熔點測定儀 (ELECTROTHERMAL, CAT NO 1A 8101)

Fraction collector (ADVANTEC, SF-2120)

Evaporator (HETO, CT 110, VR-1)

(二) 洛神花的萃取與原兒茶酸成份的單離

洛神花為錦葵科(Malvaceae)洛神葵之花，於未成熟時去除子房之萼片。在本實驗，將洛神花用乙醇浸泡 24 小時，更換乙醇後，重覆浸泡 24 小時，之後藉由濃縮機濃縮，再用 CHCl_3 和濃縮液等體積方式以分液漏斗加以萃取得 CHCl_3 可溶部份與 CHCl_3 不溶部份重覆二次。接著再將 CHCl_3 不溶部份用 EtOAc 以分液漏斗萃取(V/V=1:1)重覆二次，如此可得 CHCl_3 extract，EtOAc extract，及剩下的 Residual 層 (Fig. 9)。

將洛神花之 EtOAc extract 或 CHCl_3 extract 兩組萃取物先以 CHCl_3 : MeOH = 8 : 2(V/V)溶解，以 extract : silica gel = 1 : 50 比例，先以矽膠管柱層析法， CHCl_3 : MeOH = 98 : 2，95 : 9，9 : 1，8 :

2, 7:3 為沖提液漸次增加極性，再用薄層層析(Thin layer Chromatography)之分析，並以顯色劑或波長 254nm 之紫外光確定，將 Rf 值較近之成分收集，可得較純之萃取物，由以上分離出四種成分 HS-C₁, HS-C₂, HS-E₁, HS-E₂。而 HS-E₂ 經 NMR、Mass、IR 結構鑑定，並與標準品比較確認為 protocatechuic acid。(Fig. 2)。

二、原兒茶酸抑制氧化酶活性之體外試驗

(一)試劑與儀器

1.試劑：

Xanthine, xanthine oxidase, Arachidonic acid, Lipoxygenase 購自美國 Sigma 公司，實驗所需的 Solvent 購自 E Merck 公司。

2.儀器：

Spectrophotometer (HITACHI ; U2000)

(二)嘌呤氧化酶活性之分析

Purine 在體內的代謝因不同的生物，其產物略有不同，在人類、人猿、爬蟲類與鳥類中，其代謝之最終產物為尿酸(uric acid)，並相伴產生超氧化陰離子 O₂⁻，其代謝途徑如 (Fig. 10)。

因 uric acid 之 Pka 為 5.4，必須在較高之 pH 值下才具有較大的溶解度，而一般尿液都屬於酸性，故 uric acid 實不易經尿液而排出體外(在 38 °C 時，uric acid 之溶解度只有 0.1g/l)，故如果可以將 Xanthine oxidase 活性抑制，則 uric acid 將不會生成，而 purine 之最

終產物即變成 xanthine 或 hypoxanthine，而此兩種化合物的溶解度皆較 uric acid 為高，因此容易由尿液中排出而用來治療 uric acid 太多所引起的疾病，如風濕症、腎結石，膀胱結石或痛風等。另一方面，物質如可抑制 Xanthine oxidase，則可減少 superoxide anion 之產生與堆積，減少組織受傷害。

Xanthine oxidase 活性之分析主要是根據 Robak 等人(1988)之方法[15]，藉由測定 xanthine oxidase 之產物， uric acid 的產量來看 enzyme 的活性，其步驟如下：

1. 歸零：

(1) 12 μ l phosphate buffer(內含 0.2M NaH_2PO_4 .

$\text{H}_2\text{O} : 0.2\text{M Na}_2\text{HPO}_4 = 10 : 1$)

(2) 100 μ l DMSO

(3) 888 μ l Xanthine buffer (phosphate buffer 內含 $2 \times 10^{-4}\text{M}$ xanthine)

將以上三物質分別放入 spectrophotometer 之 reference 與 Sample 槽中的二個 cuvettes 加以歸零。

2. 在測試 sample 之前，先做控制組試驗：

(a) Reference cuvette 加入

(1) 12 μ l phosphate buffer

(2) 100 μ l DMSO

(3) 888 μ l xanthine buffer

(b)Sample cuvette 加入

(1)12 μ l xanthine oxidase (1.3units/mg protein)

(2)100 μ l DMSO

(3)888 μ l xanthine buffer

混合均勻後於室溫中靜置 10min ， 295nm 下測 O.D.值。

3.Sample 之測試：

(a)reference cuvette 加入

(1)12ul phosphate buffer

(2)100ul test sample(溶於 DMSO 中)

(3)888ul xanthine buffer

(b)Sample cuvette 加入

(1)12 μ l xanthine oxidase

(2)100 μ l test sample

(3)888 μ l xanthine buffer

混合均勻後於室溫中靜置 10 min ， 295 nm 下測 O.D.值。

(三)脂質氧化酶活性之分析

Lipoxygenase 活性分析主要是根據 Evan 等人(1987)之方法 [16]，藉由測 lipoxygenase 的產物 lipid peroxide 之產量，來看 Enzyme 的活性。其步驟如下：

1.歸零：

(1)2.9 ml borate buffer (0.1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ pH=9)

(2)10 μ l DMSO

(3)100 μ l Arachidonic acid (0.2mM)

將以上三物質分別放入 spectrophotometer 之 reference
與 Sample 槽中的二個 cuvettes 加以歸零。

2. 控制組試驗：

(a)Reference cuvette 加入

(1)2.9 ml borate buffer

(2)10 μ l DMSO

(3)100 μ l Arachidonic acid

(b)Sample cuvette 加入

(1)2.8 ml borate buffer + 0.1 ml Lipoxygenase (500 unit)

(2)10 μ l DMSO

(3)100 μ l Arachidonic acid

將(1)與(2)混合均勻，經過 30 °C 水浴 5 分鐘後，加入(3)在 236nm
time scan 10 分鐘。

3. Sample 組試驗：

(a)Reference cuvette 加入

(1)2.9 ml borate buffer

(2)10 μ l protocatechuic acid

(3)100 μ l Arachidonic acid

(b)Sample cuvette 加入

(1)2.8 ml borate buffer + 0.1 ml Lipoxygenase

(2)10 μ l protocatechuic acid

(3)100 μ l Arachidonic acid

將(1)與(2)混合均勻，經 30 °C 水浴 5 分鐘後，加入(3)在 236 nm time scan 10 分鐘。

三、原兒茶酸抗 TPA 促癌作用之動物研究

(一)動物來源與試劑

1.動物來源：

CD-1 strain 雌性小白鼠（約六週大）購自台大醫院動物中心，藥物處理前二天以電動除毛刀剃除老鼠背部的毛，之後分組加藥。

2.試劑：

DL-[¹⁴C]ornithine (55 mCi/mmol)購自 Amersham 公司(U.K.)，benzo[a]pyrene (B[a]P), dithiothreitol, bovine serum albumin, TPA 購自 Sigma 化學公司(St. Louis, MO, USA)，geniposide 購自 Wako 純化化學公司(Japan)，而蛋白質濃度測定組則購自 Bio-Rad 公司(CA, USA)。

(二)老鼠皮膚腫瘤研究

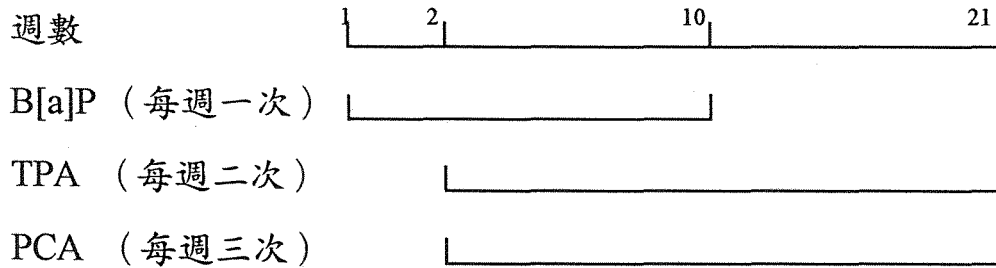
1.老鼠分組給藥 (每組老鼠 16 隻)：

- Group I 只給予 200 μ l acetone 。
- Group II 給予 B[a]P 20 nmol，每週一次，共 10 週。
- Group III 給予 B[a]P 20 nmol，每週一次，共 10 週，另外從第二週始給予 TPA 15 nmol，每週二次，共二十週。
- Group IV 每次給予 B[a]P 和 TPA 前五分鐘，先給予 PCA 5 μ mol 之

後，其餘的步驟和 Group III 一樣。

Group V 只是將 PCA 濃度增為 10 μmol ，接著同 Group IV。

Group VI 只是將 PCA 濃度增為 20 μmol ，接著同 Group IV。



2. 測量方法：

本實驗參照 Huang 等人的方法 [17]，每隔兩週觀察一次老鼠皮膚腫瘤生長情形→取直徑大於 1mm 列入計算共記錄 21 週→結果以產生腫瘤老鼠佔全部老鼠的百分比及每隻老鼠產生腫瘤的粒數表示。

(三) 老鼠耳朵水腫之測試：

1. 分組加藥 (每組老鼠 6 隻)：

	預先處理	5 分鐘後
Group 1	Acetone (20 μl)	Acetone (20 μl)
Group 2	Acetone (20 μl)	TPA (0.5 nmol)
Group 3	PCA (10 μmol)	TPA (0.5 nmol)
Group 4	PCA (20 μmol)	TPA (0.5 nmol)

2.測試方法：

本實驗參照 Huang 等人的方法 [14]，加藥 5 小時→老鼠斷頭犧牲→右耳藥物處理部份以打洞機打出直徑 6 mm 的範圍→稱重→平均結果以 Mean±SE 表示。

(四)老鼠皮膚以 TPA 處理的形態改變之測試：

1.分組加藥 (每組老鼠 6 隻)：

	預先處理	5 分鐘後
Group 1	不加藥	不加藥
Group 2	Acetone (200 μ l)	Acetone (200 μ l)
Group 3	Acetone (200 μ l)	TPA (1 nmol)
Group 4	PCA (10 μ mol)	TPA (1 nmol)
Group 5	PCA (20 μ mol)	TPA (1 nmol)

2.測試方法：

本實驗參照 Huang 等人的方法 [18]，一天加藥兩次連續四天→最後一次給藥後 18 小時老鼠斷頸犧牲→取下 2 cm×2 cm 背部皮膚→浸入 10% neutral buffer formalin 固定→H&E stain (hematoxylin and eosin staining)。方式如下：

1. 脫蠟後，以紫蘇木 (Hematoxylin) 溶液染 2-15 分鐘 (時間可長可短，視紫蘇木溶液之不同而異)
2. 以水浸洗
3. 以 0.5 % 鹽酸溶液行分辨染色色度，約 1-15 秒
4. 浸入氨水 (水 1000ml 中滴入氨水 2 滴) 至組織呈現藍色，

約須數秒

5. 於流水中清洗，至少須 15 分鐘
6. 染以 0.5 % 伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘
7. 依次通過 80 %，90 %，95 % 酒精
8. 移入 100 % 酒精，二甲苯-100 % (1 : 1)，二甲苯-木餚油 (4 : 1)，二甲苯 (I)，二甲苯 (II) 各半分鐘
9. 以二甲苯使之透明

封蓋

(五) 鳥氨酸脫羧酶 (Ornithine decarboxylase ， ODC) 活性之測試：

1. 分組加藥 (每組老鼠 6 隻)：

	預先處理	5 分鐘後
Group 1	不加藥	不加藥
Group 2	Acetone (200 μ l)	Acetone (200 μ l)
Group 3	Acetone (200 μ l)	TPA (5 nmol)
Group 4	PCA (5 μ mol)	TPA (5 nmol)
Group 5	PCA (10 μ mol)	TPA (5 nmol)
Group 6	PCA (20 μ mol)	TPA (5 nmol)

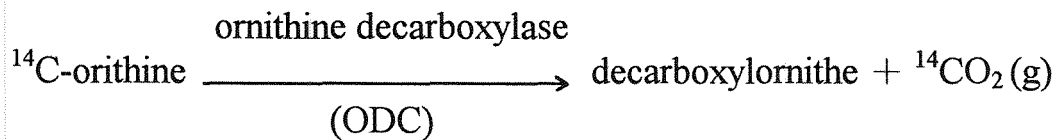
2. 測試方法：

本實驗參照 Carewal 等人的方法 [19]，加藥 5 小時後→老鼠皮 58 °C 水浴 30 秒→冰上刮取 epidermis→加 Solution 1 (25 mM Tris, pH 7.2, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA) 1ml→均質化→4 °C 離心 20 分→取 30 μ l 上清液加 Solution 2 170 μ l→37 °C 5 分鐘→0.25 μ Ci [¹⁴C] ornithine HCl/5 μ l→center well 加 0.2 ml 2 N NaOH→37 °C 1 小時→2 M citric

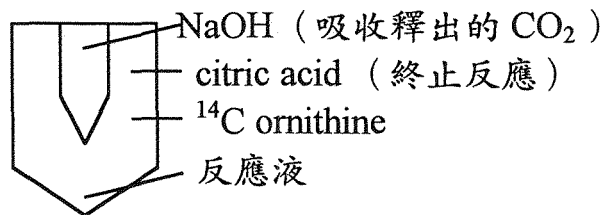
acid 0.5 ml → 溫和 shaking overnight 確定 [^{14}C] 完全捕捉 → 放入閃爍瓶 → 加閃爍液 → 測輻射量。

ODC 乃是皮膚癌早期的一種指標，若 ODC 的濃度升高，則暗示著可能引起皮膚癌。

其測定的原理為：



裝置圖：



(六) 老鼠上皮過氧化氫 (H_2O_2) 活性之測試：

1. 分組加藥 (每組老鼠 6 隻)：

	預先處理	5 分鐘後
Group 1	Acetone (200 μl)	Acetone (200 μl)
Group 2	Acetone (200 μl)	TPA (6.5 nmol)
Group 3	PCA (5 μmol)	TPA (6.5 nmol)
Group 4	PCA (10 μmol)	TPA (6.5 nmol)
Group 5	PCA (20 μmol)	TPA (6.5 nmol)

2. 測試方法：

本實驗參照 Pick 和 Keisari 等人的方法 [20]，加藥 20 小時後 →

重覆給藥一次→1 小時後→老鼠皮膚 58 °C 水浴 30 秒→冰上刮取 epidermis 置於 4 ml buffer (10 mM Sod. azide 溶於 50 mM KH₂PO₄)→均質化→4 °C 離心 20 分鐘→取 0.5 ml 上清液→加 0.5 ml [25 µg phenol red/ml 和 50 µg horseradish peroxidase/ml] →靜置 10 分→加 1N NaOH 10 µl→610 nm 測吸光值。

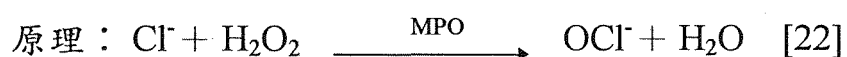
(七)老鼠上皮脊髓過氧化酶 Myeloperoxidase (MPO)活性之測試：

1.分組加藥 (每組老鼠 6 隻)：

	預先處理	5 分鐘後
Group 1	不加藥	不加藥
Group 2	Acetone (200 µl)	Acetone (200 µl)
Group 3	Acetone (200 µl)	TPA (6.5 nmol)
Group 4	PCA (5 µmol)	TPA (6.5 nmol)
Group 5	PCA (10 µmol)	TPA (6.5 nmol)
Group 6	PCA (20 µmol)	TPA (6.5 nmol)

2.測試方法：

本實驗參照 Huachen 和 Krystyna 等人的方法 [21]，加藥 20 小時後→重覆給藥一次→1 小時後→老鼠斷頸犧牲取 2 cm×2 cm 的皮膚用剪刀剪碎→置於 4 ml buffer (0.5% hexaldecyltrimethyl ammomium)→均質化→4 °C 離心→取上清液過濾→取濾液加 25 mM 4-aminoantipyrine-2% phenol soln. 1.3 ml 和 1.7 mM H₂O₂ 1.5 ml 混合均勻→510 nm 測吸光值，記錄 4 分鐘。



結果

一、HS-E2 之純化與確認

HS-E2 係以絕對酒精 (99.8%) 再結晶而得;

顏色為灰白半透明結晶;

熔點為 200 °C;

產率為 0.1%

以下為 HS-E2 知光譜資料:

a. 紅外光譜 $\nu_{\text{max}}^{\text{K Br}} \text{ cm}^{-1}$: (Fig.3)

1625-1575 (Ar-C)

3400 (COOH, broad)

1760 (Ar-COOH)

1900 (Aromatic)

750-790

800-860

860-900

(Aromatic-assym-tri-)

b. 質譜 (m/z): (Fig. 4)

$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$; M.W. = 154.12

EI-MS (m/z) 主要斷裂訊號有;

154、137 (M-OH)、109 (M-COOH)

c. 核磁共振譜 (CDCl_3): (Fig.5)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm)

7.441	}	(2H, Aromatic H-, 2-H, 6-H)
7.416		
7.409		
6.814		
6.811		
6.789		
6.786		(1H, d, d, 5-H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ (ppm) (Fig.6)

DEPT (Fig.7)

170.518 (C=O)

151.532

146.085

123.9301

123.315

117.761

115.794 (Aromatic -C)

由上述之圖譜資料 (IR、MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$) 與 TLC 之 Rf 值及其顏色顯示, 判定 HS-E2 為 protocatechuic acid (3,4-Dihydroxy-benzoic acid)。

二、原兒茶酸對 Xanthine Oxidase 及 Lipoxigenase 活性之抑制效果

由文獻知 TPA 可以活化 Xanthine Oxidase 及 Arachidonate cascade 之酵素造成發炎現象, 因此我們測 PCA 對 XO 及 LO 之作用, PCA

隨著濃度增加，可使 uric acid 之吸光度降低，即表示可以抑制 xanthine oxidase 之活性，使 uric acid 之產量降低所致，由 Table 1 知 PCA 在 1mM 時達 48% 之抑制作用。又 PCA 濃度增加，可使 lipid peroxide 之吸光度降低，即表示可以抑制 lipoxygenase 之活性，使 lipid peroxide 之產量降低，當 PCA 在 0.05 mM 時即有意義減少 LO 之活性 (Table 2)。

三、原兒茶酸對 TPA 引致之癌促進作用的效果

B[a]P 雖為致癌物，但單獨給予 B[a]P 的老鼠卻未發現腫瘤，而單獨給予 TPA 則每隻老鼠皆長腫瘤，以 PCA 5 μmol 、10 μmol 、20 μmol 先處理，老鼠產生腫瘤的百分比分別降為 82、63、55% (Fig. 13(A), Fig. 13(B))。另外，將產生腫瘤的老鼠分別計算其 tumor 之總數，發現單獨處理 TPA 者，每隻老鼠平均有 6.4 個，以 PCA 處理的三組，產生的粒數並無明顯差異。

四、原兒茶酸對 TPA 引起老鼠耳朵水腫之抑制作用

只給予 0.5 nmol TPA 的老鼠，其耳朵平均重量 10.74 mg，而以 PCA 10 μmol 、20 μmol 先處理，耳朵平均重量降低了 65、73%。(Table 3)

五、原兒茶酸對 TPA 引起 hyperplasia 之抑制作用

(1) 上皮細胞數方面無 TPA 及 PCA 處理者只有 1-2 層，塗 TPA 的組則增為 4-7 層，先處理 PCA 10 μmol 組降為 3-5 層，PCA

20 μmol 組降為 2-4 層。

(2) 上皮厚度方面，塗抹 TPA 組較不塗組厚五倍。先塗以 PCA 厚度也分別下降了。

(3) 發炎細胞浸潤的情形：TPA 組較明顯、加 PCA 較改善。

(4) 細胞間水腫情形：TPA 組較明顯、加 PCA 組較改善。(Fig.15)

六、原兒茶酸對 TPA 引起 Ornithine decarboxylase (ODC) 活性的抑制作用

以 TPA 處理的組別每小時每毫克蛋白質產生 240 ± 13.1 pmol CO_2 ，先處理 PCA 5 μmol 、10 μmol 、20 μmol 組，分別降低了 46、68、91%。(Table 5)

七、原兒茶酸對 TPA 引起 H_2O_2 活性的抑制作用：

ODC 乃是皮膚癌早期的一種指標，若 ODC 的濃度升高，則暗示著可能引起皮膚癌。

以 TPA 處理的組別每平方公分皮膚產生 21.7 ± 17.5 nmol H_2O_2 ，先處理 PCA 5 μmol 、10 μmol 、20 μmol 組，分別降低了 61、84、89% (Table 6)。

八、原兒茶酸對 TPA 引起 Myeloperoxidase (MPO) 活性的抑制作用：

以 TPA 處理的組別每平方公分皮膚產生 221.2 ± 10.7 units MPO，先處理 PCA 5 μmol 、10 μmol 、20 μmol 組，分別降低了 21、36、64% (Table 7)。

討 論

在人體健康情形中飲食扮演重要的角色，尤其是對一些特別的疾病，如癌症 [23,24]。多吃新鮮蔬果可降低癌的發生率 [25]，最近幾年，人類對食物中的酚類已引起廣泛的興趣。其生物化學活性包括(1)電子基的捕捉(2)亞硝酸的抑制作用(3)調節花生四烯酸 (arachidonic acid) 的代謝 [26]。食物中的酚類化合物大部份是類黃酮素衍生物 (flavonoid)，另外有一些是非類黃酮素衍生物 (Non-flavonoid)，本實驗所用之 PCA 即屬之。

二階段的致癌作用，最先被 Berenblum [27] 所提出，老鼠皮膚癌的模式，為最早用來探討癌促進作用的機轉。腫瘤產生分為 (1) 起始期 (2) 促進期；起始期需要一個直接或間接低於閾值的單一劑量，為不可逆反應，促進期需重複給藥，初時為可逆性，後來轉為不可逆的 [28]。可由化學物質導致的突變和癌化證實起始期可能與細胞基因物質的修飾有關 [29]。大部份的起始劑是親電子性，或是可轉成化學活性的電子型式，再以共價鍵與 DNA 結合 [30]。給一單一劑量就可導致癌的起始作用，可假設是因為一部份作用在標的細胞即可轉型成癌 [31]。若只有促進劑，不能導致突變也不能與 DNA 結合，許多的促進劑如 Phobol ester 是活化細胞膜，再與細胞膜上具有高度親和性，專一性的 receptor，結合產生作用 [32,33]。有學者更進一步提出擴展作用 (progression)，腫瘤產生之後惡化和轉移至其它的組織和器官 [34]。

在老鼠皮膚上給予 TPA 會快速的引起發炎細胞 (inflammatory

cell)如嗜中性白血球(neutrophils)及巨噬白血球(macrophages)等的大量堆積 [35]，並且會增加活性氧(active oxygen species)的釋出 [36]，其中，由 Xanthine Oxidase 活化會產生 $\cdot O_2^-$ 與 H_2O_2 ，而 arachidonic acid 在經過 Lipoxygenase 或 Cyclooxygenase 作用則會產生脂質過氧化物並伴隨著 ROS 之產生。當 H_2O_2 含量增高時，會刺激 PLA_2 的活性上升，使 arachidonic acid 產量增加，刺激 PKC。本實驗結果顯示，原兒茶酸對於抑制 Xanthine Oxidase 與 Lipoxygenase 的活性有其顯著效果，故可能是阻斷過氧化物與活性氧之產生(Table 1,2)，使得 H_2O_2 的產量減少，c-jun 與 c-fos 的表現可能受到抑制，而導致癌促進作用之下降。

老鼠皮膚上塗抹 B[a]P 當癌起始劑及 TPA 當癌促進劑是一種經常被使用來研究抗研藥物的動物模式。在此模式中常被用來當作癌促進劑的是 Phorbol ester 類的藥物如 TPA [37]，它會在老鼠皮膚上引起組織及生化方面的變化如皮膚水腫、發炎反應、增生、增加 ODC 活性以及 H_2O_2 和 MPO 活性的增加 [48]，而這些組織生化之變化皆有可能是癌促進作用的指標，因為這些指標與腫瘤之形成習習相關。基於上述，我們以這個實驗模式來探討原兒茶酸的抗 TPA 促癌作用。

由實驗結果顯示原兒茶酸可以抑制 B[a]P 及 TPA 引起的 CD-1 female mice 之皮膚癌，在皮膚水腫方面，先前以原兒茶酸處理過的組別，也能有效抑制其增加，另外，在發炎反應、ODC 活性及 H_2O_2 和 MPO 活性方面，也有抑制作用，顯示原兒茶酸在 CD-1 female mice 的皮膚癌中扮演著抗癌的角色。

目前癌症已是國人重要死因之一，一些化學致癌物，如 B[a]P、DMBA、TPA...等，都已被証實不論在體內或體外會有起始作用或

促進作用，因此長期的動物實驗及詳細的致癌機轉探討及其抑制的效果是必需的。

本研究以 TPA 處理老鼠皮膚實驗中，發現 PCA 的抑制效果顯著，另外體外試驗方面發現原兒茶酸對嘌呤氧化酶及脂質氧化酶也有抑制作用，故推論原兒茶酸可能藉由抑制自由基和活性氧的形成，來達到抗 TPA 促癌作用。

由過去的文獻中得知 TPA 促癌機制主要之一為直接活化 PKC，進而使原致癌基因如 c-fos，c-jun 等活化，增加 transcription，以達細胞增生；而 PCA 對 TPA 誘發 PKC 轉位及活性是否有影響，實驗正進行中，相信在不久的時日即可獲得結果。



Fig. 1. 本實驗所使用之大陸進口洛神花

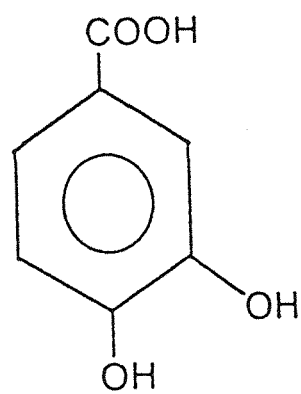
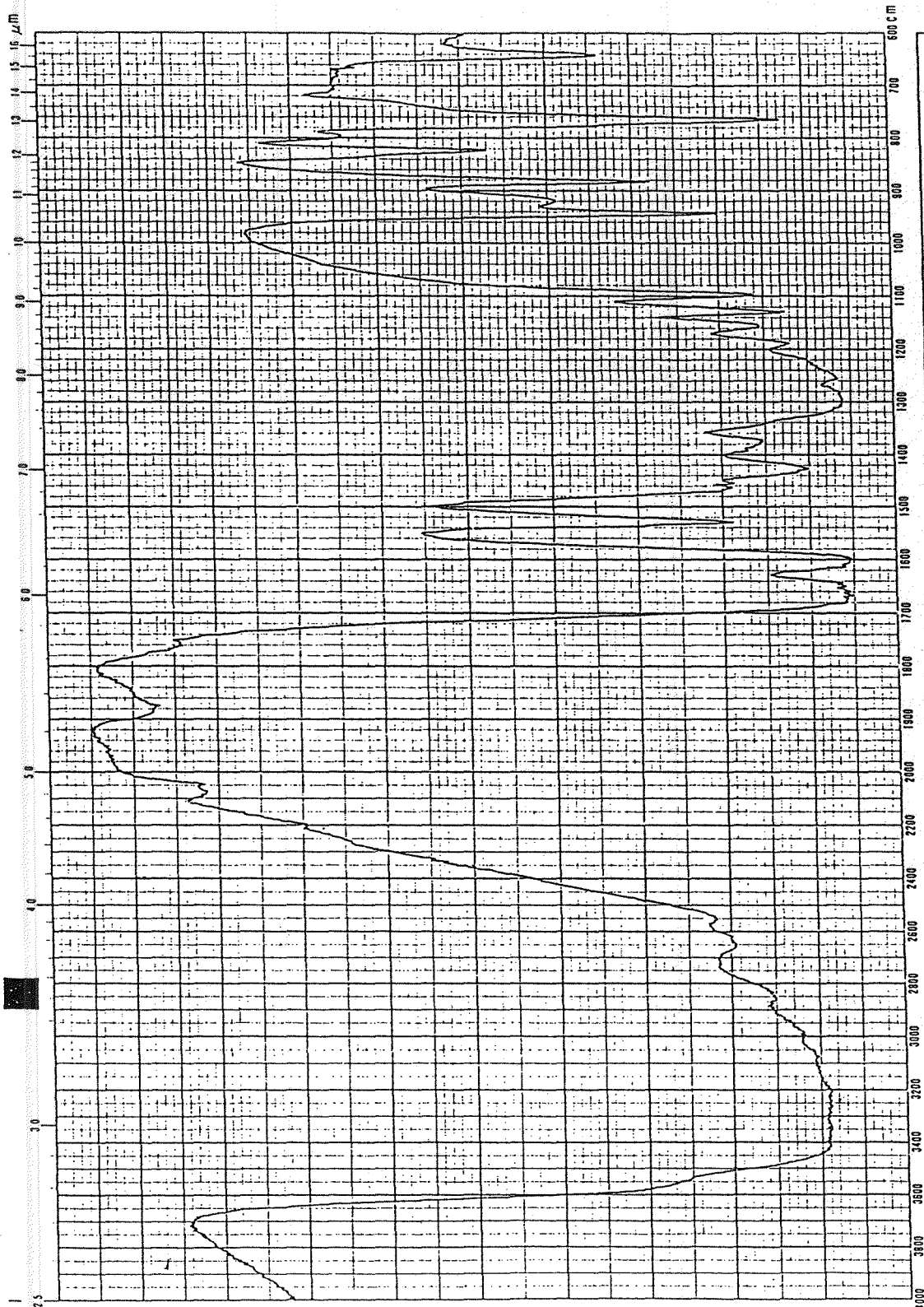


Fig. 2. Protocatechuic acid (PCA)的結構



4.4

14

0.7

Fig. 3

SPECTRUM NO.	SPEED	SAMPLE	SAMPLING METHOD	DATE	OPERATOR	REMARKS
--------------	-------	--------	-----------------	------	----------	---------

JASCO 日本分光工業株式会社 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD. MADE IN JAPAN J-0087

[Mass Spectrum]

Data : L-EI-4717

Date : 15-Mar-95 22:08

Sample: HS-E2

Note : *

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 1.95 min

Scan# : 14

Temp : 13.1 deg.C

BP : m/z 154.0000

Int. : 607.18

Output m/z range : 50.0000 to 800.0000

Cut Level : 0.00 %

Fig. 4

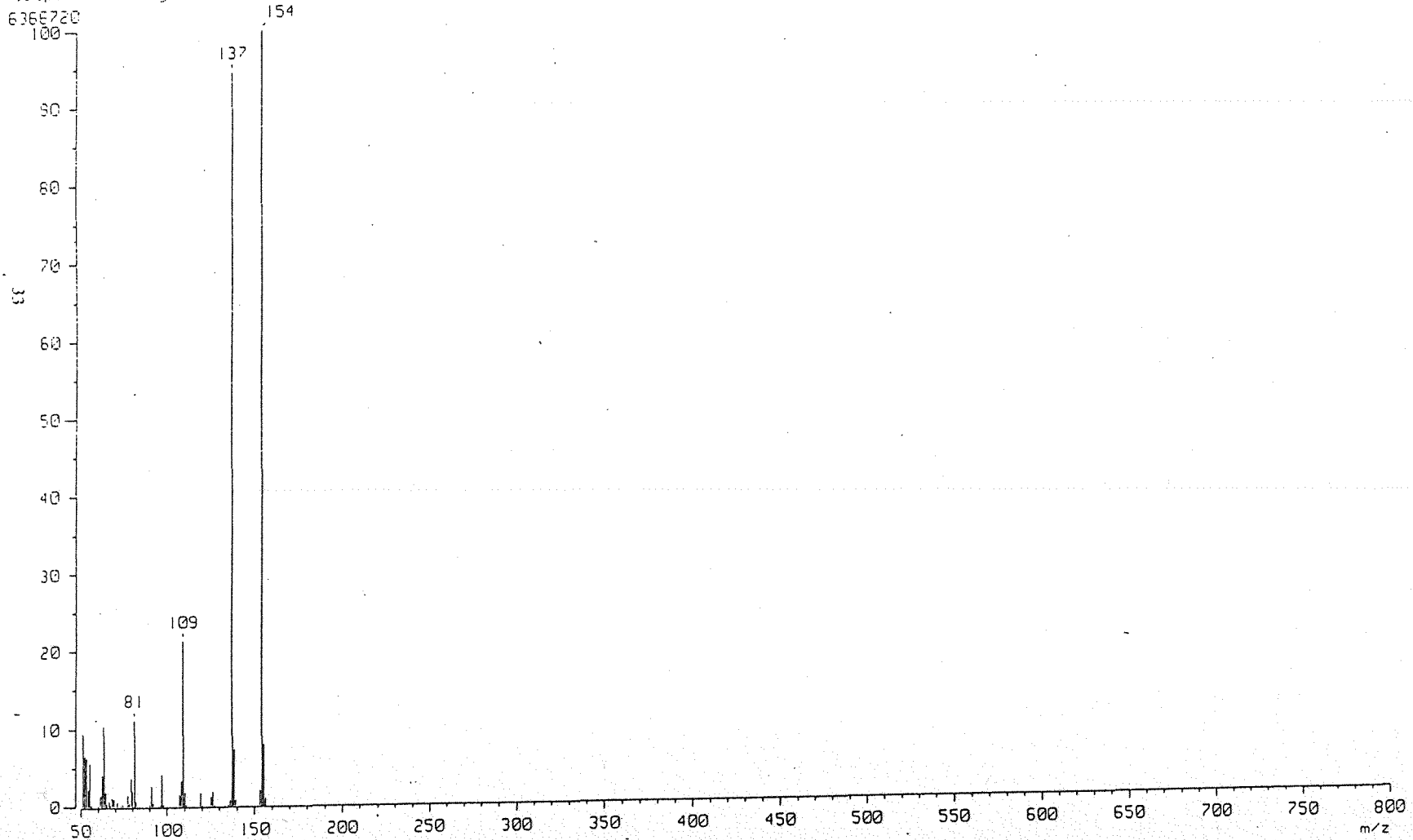
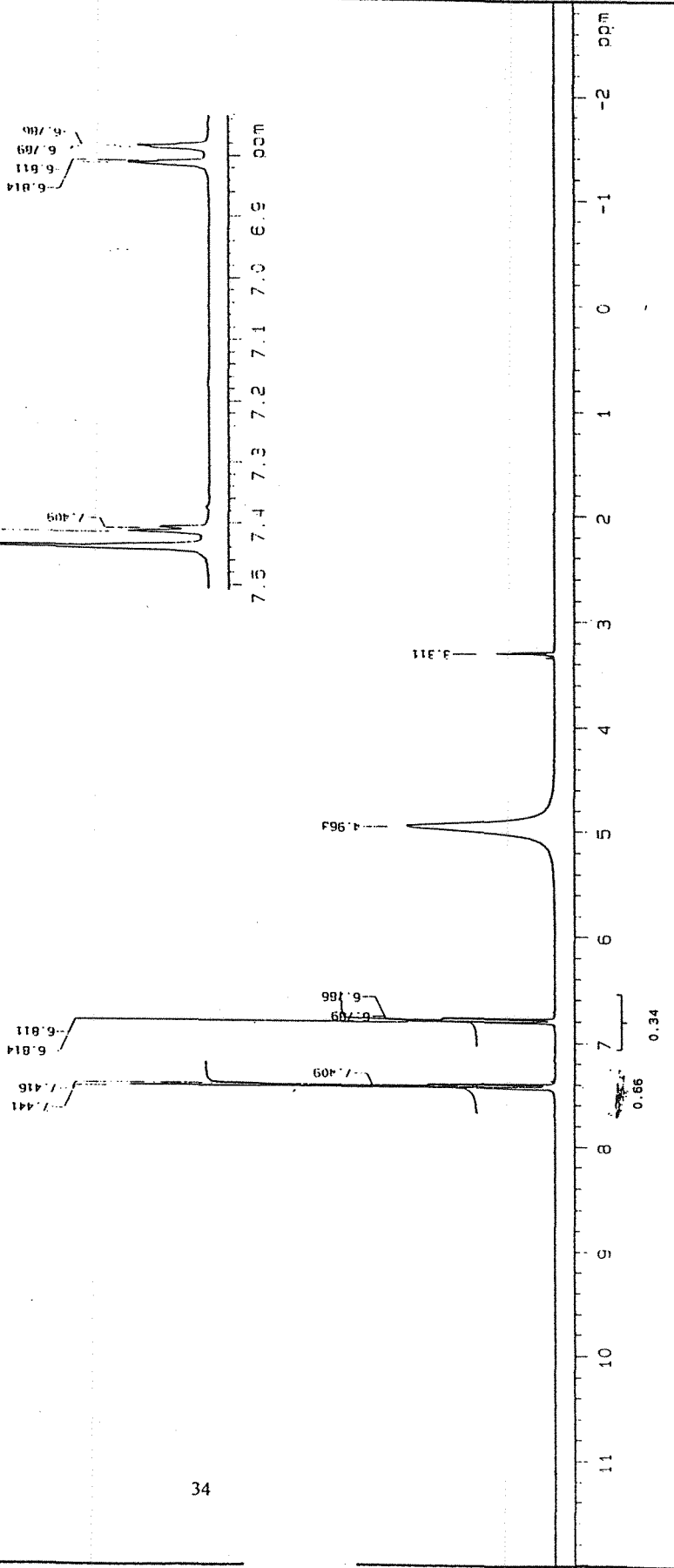


Fig. 5



34

00589E

Nucleus	<u>1H</u>	Freq	<u>250.55</u> MHz	RECORDED	Nucleus	<u>1H</u>	Other	<u>0</u>	Hz
Scan Width	<u>4500.00</u> Hz	Offset	<u>800.00</u> Hz	Mod	<u>000</u>	Power	<u>15.00</u>	dB	
Acq Time	<u>2.01</u> sec	Delay	<u>0</u> sec	Modulation Mod	<u>0</u>	Freq	<u>200.00</u>	Hz	
Pulse Width	<u>5.00</u> μ sec	Transmit	<u>45.00</u>	Pulse Width	<u>1.00</u> μ sec	Power Mod/L	<u>15.00</u>	dB	

PLANT ISSUED: 1 RE: SEC CD: SEC
 LAB: ISSUED RE: AF SEC: 000
 Wavelength: 00 M/psm Start: 567.10 Hz/psm
 Reference: _____

EXPERIMENT

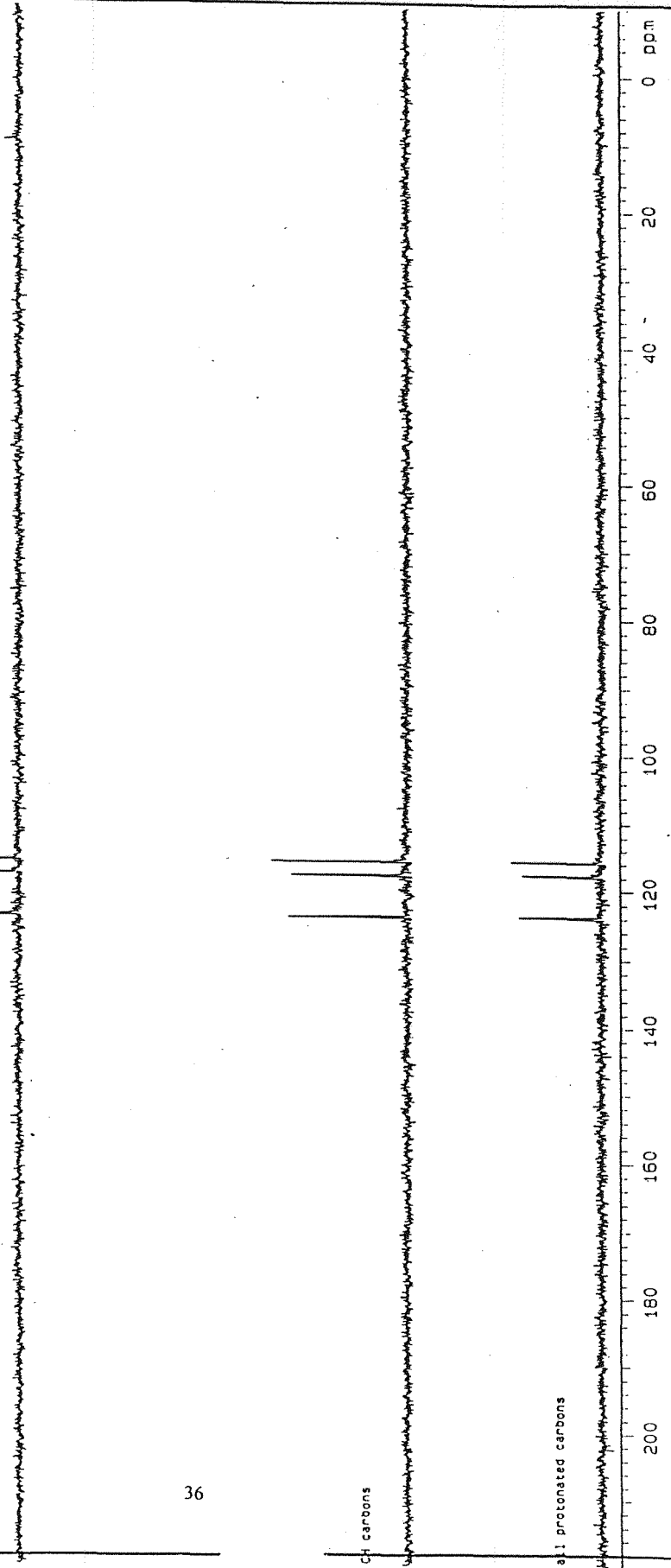
Pulse Sequence	<u>2000</u>	SAMPLE	<u>18-82</u>
Tube O.D.	<u>mm</u>		
Temp.	<u>not used</u> °C		
Solvent	<u>CDCl3</u>		

NATIONAL SCIENCE COUNCIL
 CENTRAL INSTRUMENTATION CENTER
 PM 510
 Date Feb 2 95
 XL 500

Varian Instruments Ltd

Fig. 7

CH2 down, CH/CH3 up



36

NMR PARAMETERS		EXPERIMENT	
Nucleus	¹³ C	Pulse Sequence	zgpg30
Spec Width	15000.00 Hz	Tube ID	
Acq Time	1.00 sec	Temp	300.150 °C
Pulse Width	15.00 µsec	Solvent	CDCl3
Transmit	50.00 MHz	Reference	TMS
Receiver	100.625 MHz	US	3.00 Hz
Mod	0.00	W49341.78	14.00 ppm
Modulation Mode	0.00		
Pulse Width	24.00 µsec		
Power	0.00		
Power Mode	0.00		
Other	1.000.00		
CH2	10.00 sec		
CH	10.00 sec		
CH3	10.00 sec		
CDCl3	10.00 sec		
Sample	100-02		
File	100-02		
Date	5.10.21.95		
Acq	300		

NATIONAL SCIENCE COUNCIL
CENTRAL INSTRUMENTATION CENTER

Varian Instruments Ltd

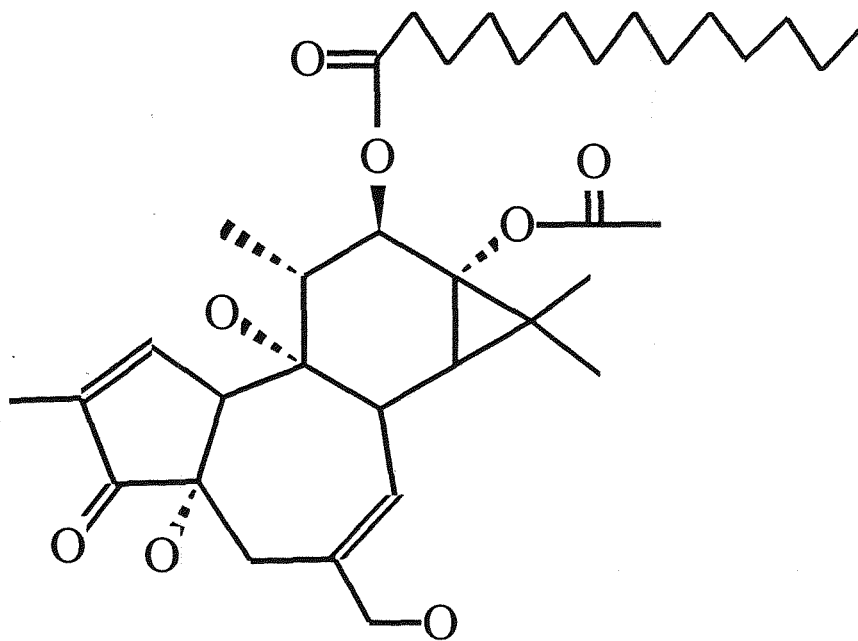


Fig. 8. TPA 的結構

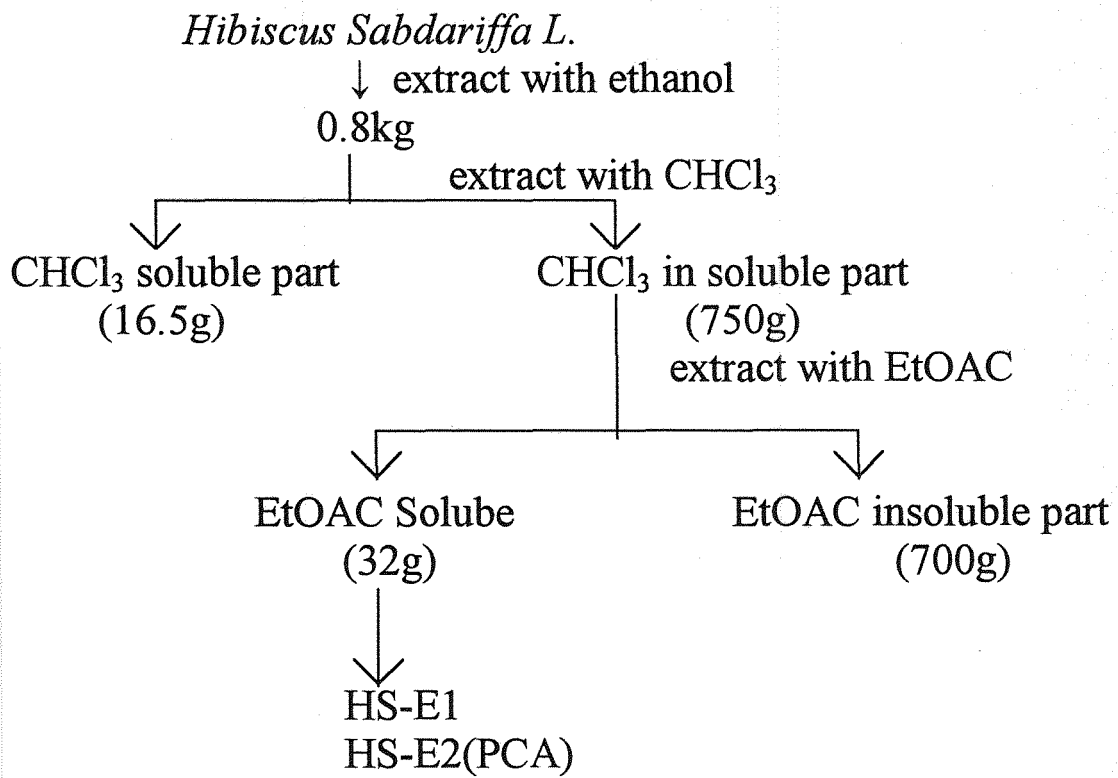


Fig.9 . 洛神花成分萃取之步驟

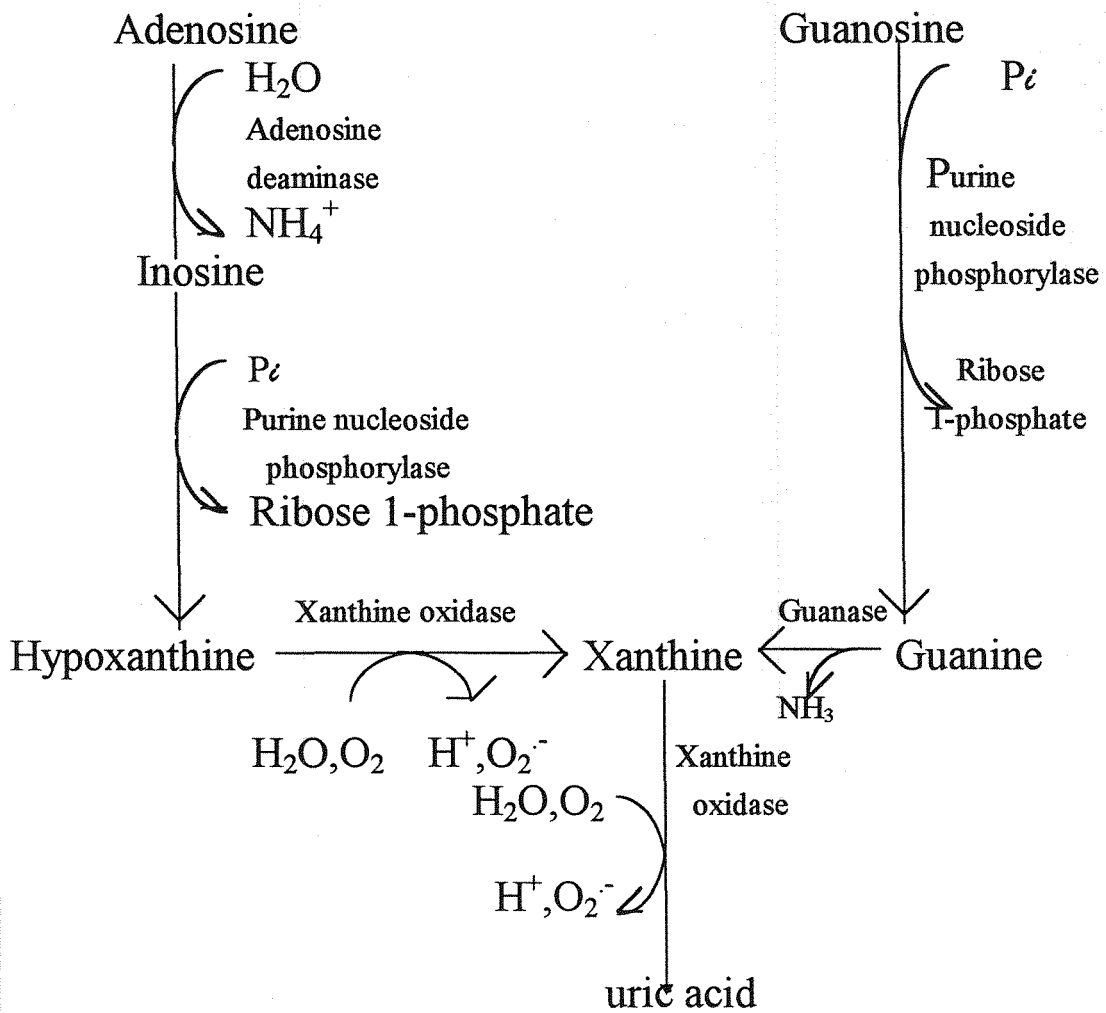


Fig.10. Purine 在人體之代謝過程

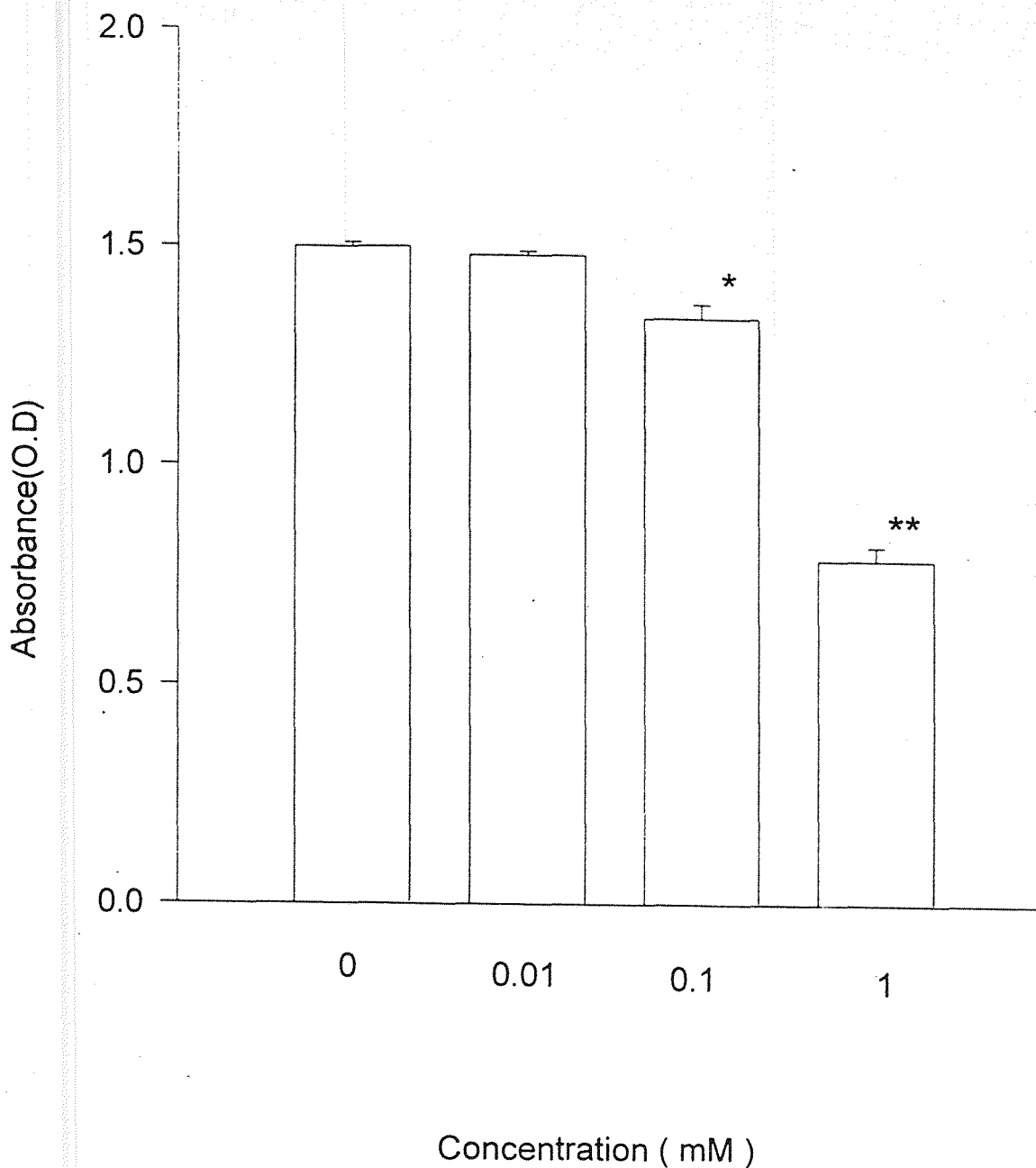


Fig.11. Inhibition of Xanthine Oxidase by protocatechuic acid

The various concentrations of protocatechuic acid were added and effected on xanthine oxidase. The result were assayed by measuring the absorbance of uric acid at 295 nm. Each values were the average of triplicated.

* $P < 0.01$, compared with solvent control.

** $P < 0.001$, compared with solvent control.

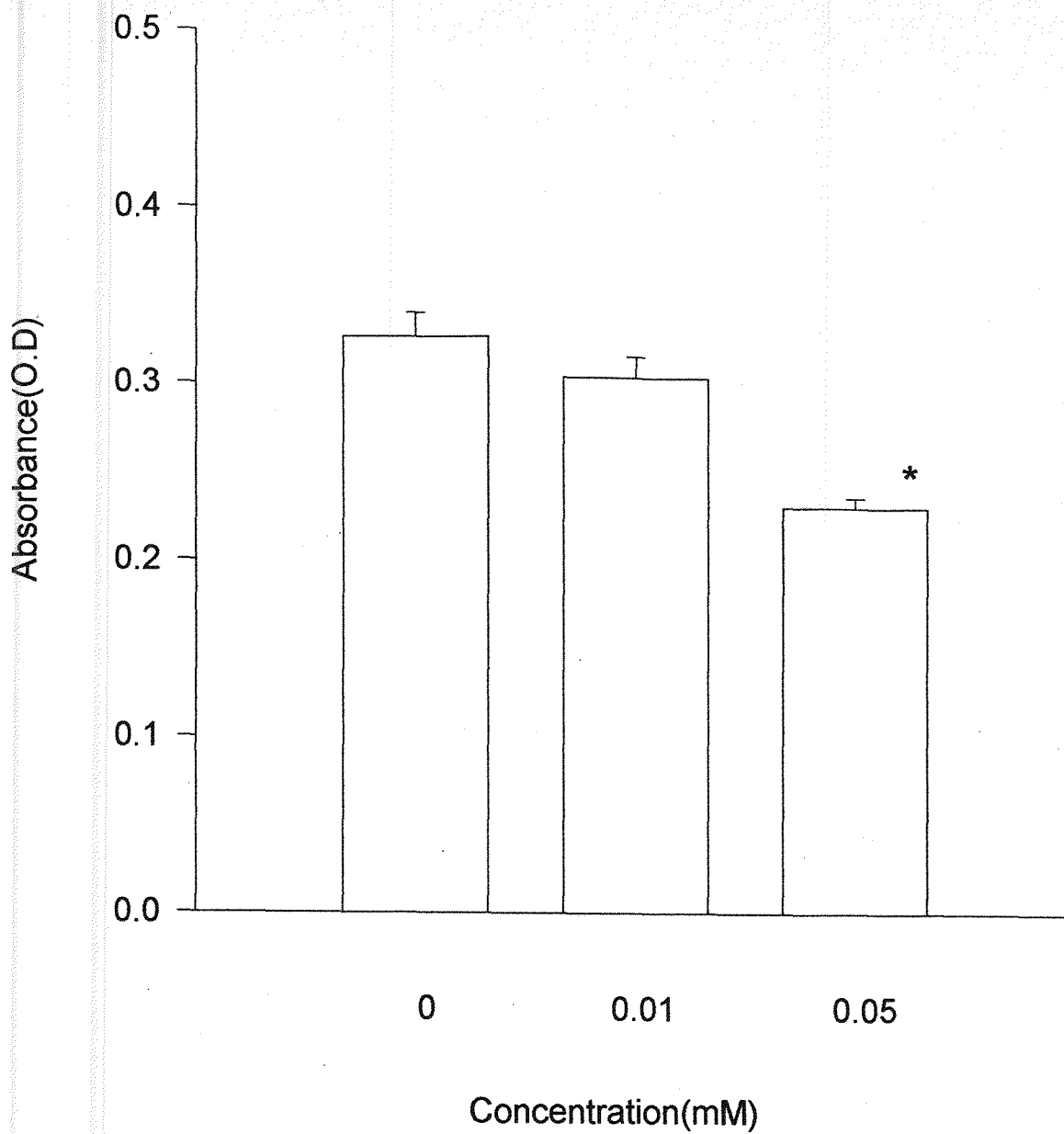


Fig. 12 Inhibition of Lipoxigenase by protocatechuic acid

The various concentrations of protocatechuic acid were added and effected on lipoxigenase. The result were assayed by measuring the absorbance of lipid peroxide at 236 nm. Each values were the average of triplicate.

* $P < 0.05$, compared with solvent control.

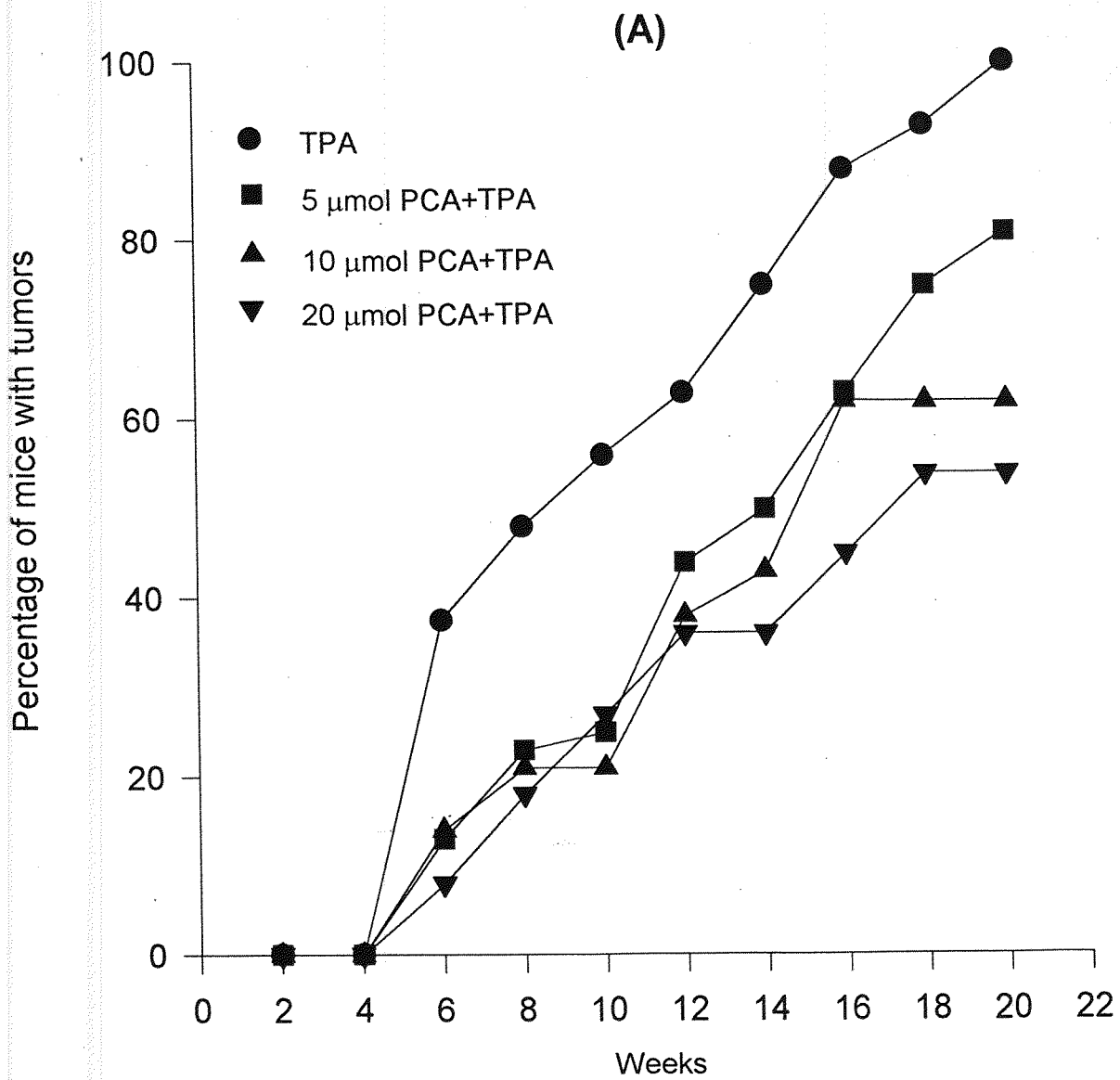


Fig. 13 (A). Inhibitory effect of topical application of PCA on TPA induced tumor promotion in mouse skin. (A) Percentage of mice with skin tumors; Skin tumors diameter > 1 mm were counted and recorded every 2 weeks.

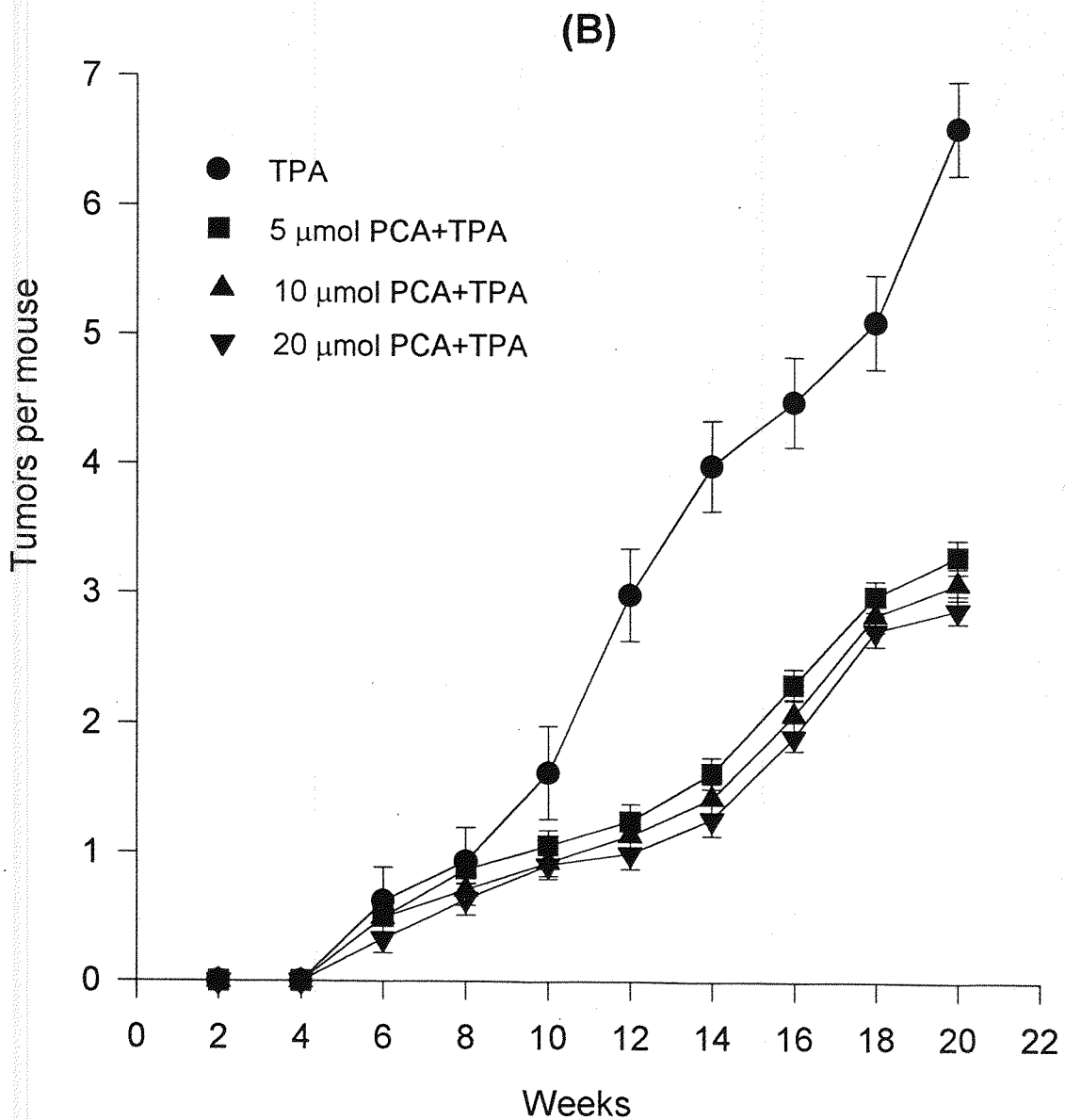


Fig. 13 (B). Inhibitory effect of topical application of PCA on TPA induced tumor promotion in mouse skin. (B) Average numbers of skin tumors per mouse. Skin tumors of diameter > 1 mm were counted and recorded every 2 weeks.

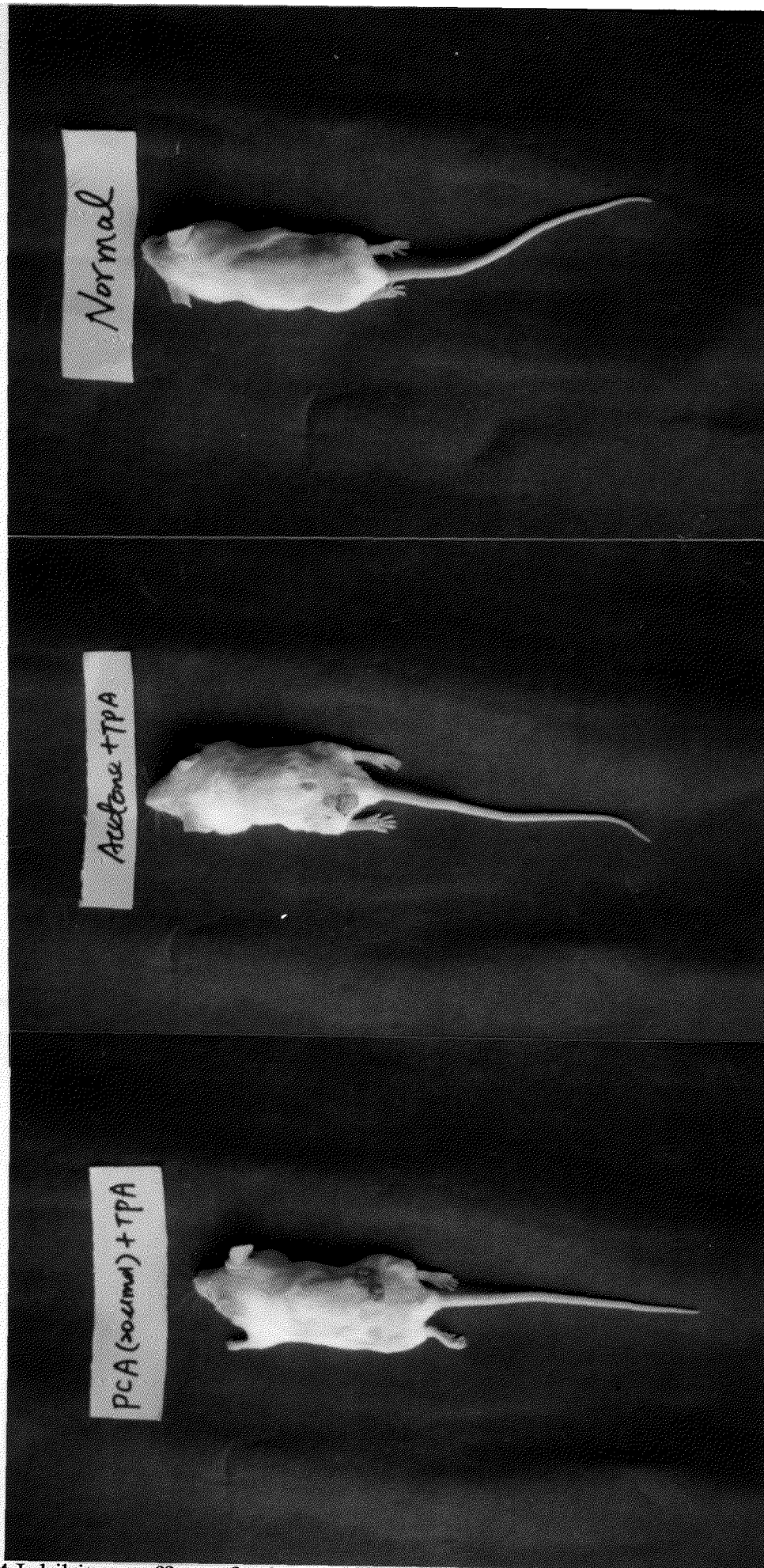


Fig.14 Inhibitory effect of PCA on TPA-induced tumor promotion with B[a]P initiation in mouse skin.

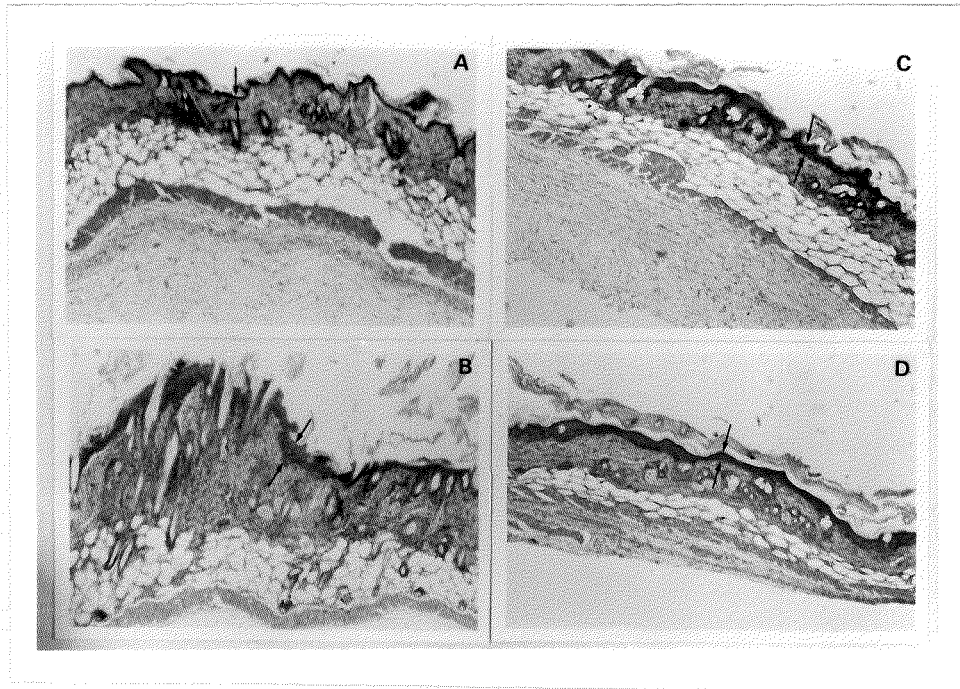


Fig. 15 (A) Normal skin tissue (H & E x 100)

(B) TPA-treated epidermis showed that the epidermal layer is markedly thickened and the upper dermis is infiltrated by prominent leukocytes (H & E x 100)

(C) Mice pretreated with PCA (10 μ mol) before topical application of TPA showed that the epidermal layer is moderately thickened and the upper dermis is moderate inflammation. (H & E x 100)

(D) Mice pretreated with PCA (20 μ mol) before topical application of TPA showed that the epidermal layer is slightly thickened and the upper dermis is slight inflammation. (H & E x 100)

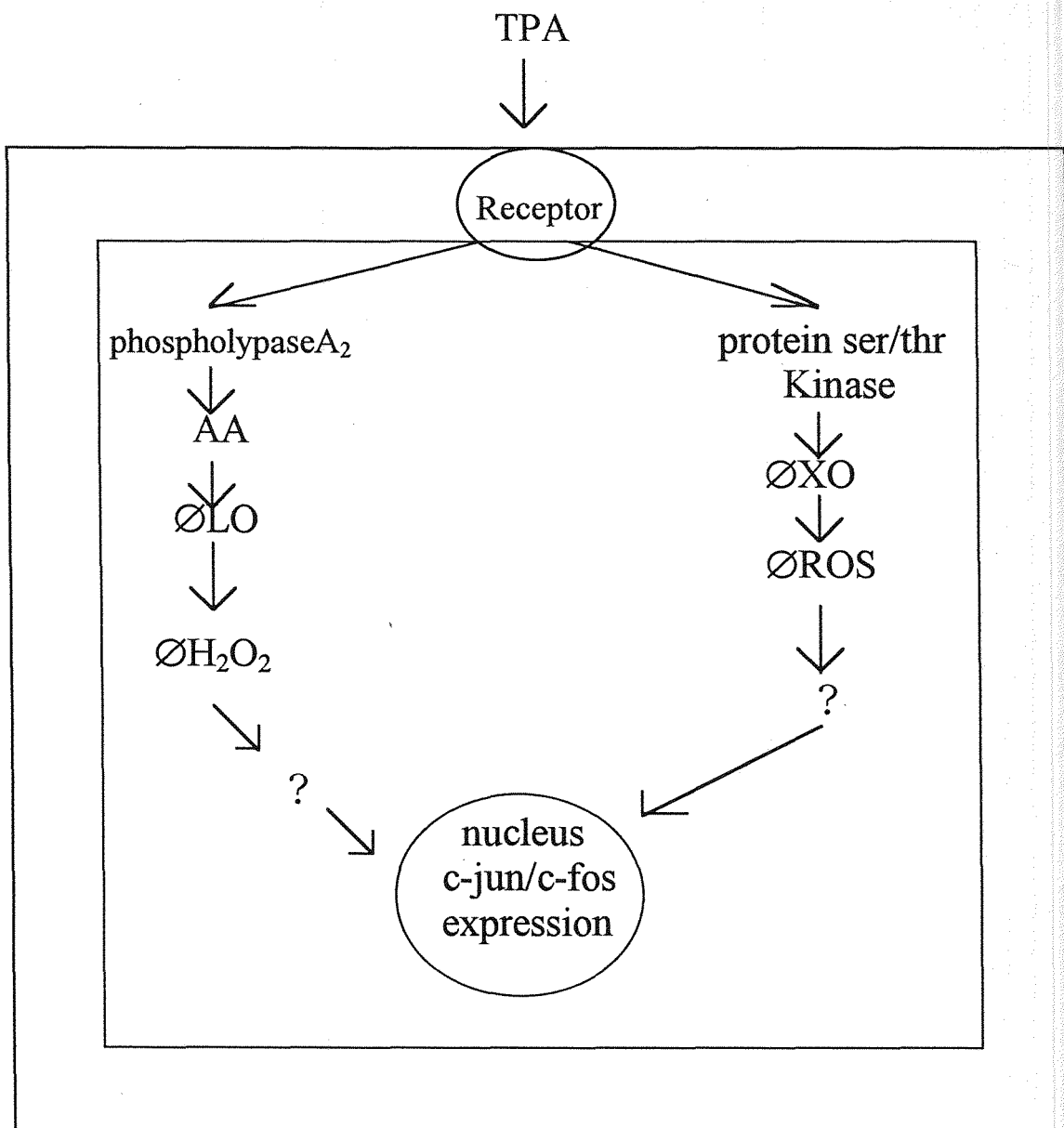


Fig.16 Possible mechanism of protocatechuic acid on the inhibition of the TPA-induced tumor promotion

Table 1. Effect of protocatechuic acid (PCA) on decreasing xanthine oxidase

Reagent absorbance ^a	Concentration mM	% of Decrease in
PCA	0.01	1.3
PCA	0.1	11.3
PCA	1	48

a. % of decrease in absorbance
= $(\text{OD. of control} - \text{OD. of test}) / \text{OD. of control}$

Table 2. Effect of protocatechuic acid (PCA) on decreasing lipoxygenase

Reagent absorbance ^a	Concentration mM	% of Decrease in
PCA	0.01	6.25
PCA	0.05	28.12

a. % of decrease in absorbance
= $\text{OD. of control} - \text{OD. of test} / \text{OD of control}$

Table 3. Inhibitory effect of topical application of PCA on TPA-induced edema of mouse ears

Group	Treatment ^a	weight/punch/mg	inhibition (%) ^b
1	Acetone	6.16±0.52 ^c	—
2	TPA	10.74±0.65	—
3	PCA (10 µmol)+TPA	7.73± 0.39*	65
4	PCA (20 µmol)+TPA	7.38± 0.34*	73

a: Female CD-1 mice were treated with 20 µl acetone. TPA (0.5 nmol) in 20 µl acetone or TPA together with PCA in 20 µl acetone, Five hours later, the animals were killed and ear punches (6 mm diameter) were weighed.

$$b: \% \text{ of inhibition} = \frac{\text{Group 2} - \text{Group 3 or 4}}{\text{Group 2} - \text{Group 1}} \times 100$$

c: Mean ± SE, n = 6

* P<0.05 , compared with TPA-treated group.

Table 4. Inhibitory effect of topical application of PCA on TPA-induced morphological changes in the epidermis.

Treatment ^a	No of epidermal layers	Epidermal thickness (μm)	Leukocyte ^b infiltration	Intercellular ^c edema
Normal	1-2	12.1 \pm 0 ^d	+	+
Acetone	1-2	12.5 \pm 0	+	+
TPA	4-7	53.6 \pm 3.9	+++	++
PCA (10 μmol)+TPA	3-5	41.1 \pm 2.3 *	++	++
PCA (20 μmol)+TPA	2-4	32.1 \pm 2.3 *	+	+

a: Female CD-1 mice were treated with 200 μl acetone . TPA (1 nmol) in 200 μl acetone, or TPA (1 nmol) together with PCA in 200 μl of acetone twice a day for 4 days. The animals were killed 18 h after the last dose and skins were processed for histological tests.

b: Leukocyte infiltration that was slight (+) , moderate (++) or severe (+++) was characterized by diffuse infiltration of mononuclear infiltratory cells in the dermis when compared with the acetone controls.

c: Intercellular edema was scored as present or absent.

d: Mean \pm SE, n = 6, * P<0.01 , compared with TPA-treated group.

Table 5. Inhibitory effect of PCA on TPA-induced epidermal ornithine decarboxylase

Group	Treatment ^a	Ornithine decarboxylase activity (pmol CO ₂ /mg protein/h)	Inhibition (%) ^b
1	Normal	58.1±5.5	—
2	Acetone	70.0±6.5	—
3	TPA	240.3±13.1	—
4	PCA (5 μmol) +TPA	161.0±9.4*	46
5	PCA (10 μmol) +TPA	125.0±11.8**	68
6	PCA (20 μmol) +TPA	84.5±6.6**	91

a: Mice were treated topically with acetone (200 μl), TPA (5 nmol) in acetone (200 μl) or TPA (5 nmol) together with PCA in acetone(200 μl). Mice were killed 5 h later and the epidermis was isolated. Ornithine decarboxylase activity was determined. Data are expressed as mean ± SE from 6 mice/group

$$b: \% \text{ of inhibition} = \left(\frac{\text{Group 3} - \text{Group 4 (or 5, or 6)}}{\text{Group 3} - \text{Group 2}} \right) \times 100$$

* P<0.01 , ** P<0.005 , statistically different from TPA group.

Table 6. Inhibitory effect of PCA on the formation of H₂O₂ in mouse skin treated with TPA.

Group	Treatment ^a	H ₂ O ₂ / nmol/ cm ²	inhibition (%) ^b
1	Acetone	4.46±1.63	—
2	TPA	21.70±1.75	—
3	PCA (5 μmol) +TPA	11.14±1.26*	61
4	PCA (10 μmol) +TPA	7.25±1.60 *	84
5	PCA (20 μmol) +TPA	6.32±0.89 *	89

a: Female CD-1 mice were treated with 200 μl acetone . TPA (6.5 nmol) in 200 μl acetone or TPA together with PCA in 200 μl acetone. The mice were sacrificed 1 h after the second TPA application , and thier skins were removed for H₂O₂ assay. Data are expressed as the mean ± SE from 5 mice/group.

$$b: \% \text{ of inhibition} = \frac{\text{Group 2} - \text{Group 3 (or 4, or 5)}}{\text{Group 2} - \text{Group 1}} \times 100$$

* P<0.005 , compared with TPA-treated group

Table 7. Inhibitory effect of PCA on the formation of MPO activity in mouse skin treated with TPA.

Group	Treatment ^a	MPO/unit/cm ²	inhibition(%) ^b
1	Normal	1.5±0.2	—
2	Acetone	1.6±0.1	—
3	TPA	221.2±10.7	—
4	PCA(5 µmol) +TPA	176.1±7.4 *	21
5	PCA(10 µmol) +TPA	141.4±2.6**	36
6	PCA(20 µmol) +TPA	81.4±3.3**	64

a: Female CD-1 mice were treated with 200 µl acetone. TPA (6.5 nmol) in 200 µl acetone or TPA together with PCA in 200 µl acetone. The mice were sacrificed 1 h after the second TPA application, and their skin were removed for MPO assay. Data are expressed as the mean ± SE from 5 mice/group.

b: % of inhibition = $\left(\frac{\text{Group 3} - \text{Group 4(or 5, or 6)}}{\text{Group 3} - \text{Group 2}}\right) \times 100$

* P<0.05 , ** P<0.005 , compared with TPA-treated group.

參考文獻

1. 賴榮祥(1976)原色生藥學 327-329 。
2. 邱年永，張光雄，原色台灣藥物植物圖鑑，110 。
3. Tseng TH, Wang CJ, Kao ES and Chu HY (1996) *Hibiscus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary Hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 101(2), 137-148.
4. Ohkawa Y, Tanizawa H, Takino Y, Miyase T, Ueno A, Kageyama T and Shikano E (1991) Studies on the Antioxidative Activity in Citrus Fruit. II. Proceedings of 111th Annual Meeting of Japanese Pharmacological Society (Abstract), pp.174.
5. Hirose Y, Tawaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Makita H, Mori H, Satoh K and Hara A (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*, 16, 2337-2342.
6. Reiners JJ, Pence BC, Barcus MCS and Cantu AR (1987) 12-O-tetradecanylphorbol-13-acetate-dependent induction of xanthine dehydrogenase and conversion to xanthine oxidase in murine epidermis. *Cancer Res.*, 47, 1775-1779.

7. Pence BC and Reiners JJ (1987) Murine epidermal xanthine oxidase activity: Correlation with degree of hyperplasia induced by tumor promoters. *Cancer Res.*, 47, 6388-6392.
8. Rao GN, Lassgue B, Griendling KK, Alexander RW and Berk BC (1993) Hydrogen Peroxide-induced c-fos expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C. *Nucleic Acid Res.*, 21, 1259-1263.
9. Goldstein BD, Witz G, Amoruso M and Troll W (1979) Protease inhibitors antagonize the activation of polymorphonuclear leukocyte oxygen consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88, 854-860.
10. Friedewald WF and Rous P (1944) The initiating and promoting elements in tumor production and analysis of the effects of tar, benzpyrene and methylcholanthrene on rabbit skin. I. *Exp. Med.*, 80, 101-107.
11. Miura T, Muraoka S and Ogiso T (1993) Inhibitory effect of urate on oxidative damage induced by adriamycin -Fe⁺³ in the presence of H₂O₂. *Res. Commun. Chem. Patho & Pharmac.*, 79, 75-85.
12. Chakraborti S and Michael JR (1993) Role of protein kinase C in oxidant - mediated activation of phospholipase A2 in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. *Mol. & Cell Biochem.*, 122, 9-15.

13. Taher MM, Carcia JG and Natarajan V (1993) Hydroperoxide -induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch. Biochem. & Biophys.*, 303, 260-266.
14. Hisaaki T, Stephane M, Masami S and Koiti T (1994) Myristoylated alanine - rich C kinase substrate (MARCKS) a major protein kinase C substrate in an in vivo substrate of proline-directed protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 269, 18299-18302.
15. Robak J and Gryglewski RJ (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Pharmacology*, 37(15), 837-841.
16. Evans AT, Formukong EA and Evans FJ (1987) Actions of cannabis constituents on enzymes of arachidonate metabolism : anti-inflammatory potential. *Biochemical pharmacology*, 36(12), 2035-2037.
17. Huang MT, Wang ZT, Georgiadis CA, Laskin TD and Conney AH (1992) Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz [a]anthracene. *Carcinogenesis*, 13, 2183-2186.
18. Huang MT, Smart RC, Wong CQ and Conney AH (1988) Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12- O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, 48, 5941-5946.

19. Carewal HS, Sloan D, Sampliner RE and Fennerty B (1992) Ornithine decarboxylase assay in human colocectal mucosa. Methologic issues of importance to quality control. *Int. J. Cancer*, 52, 355-358.
20. Pick E and Keisari Y (1980) A simple colormetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods*, 38, 161-170.
21. Huachen W and Krystyna F (1992) Suppression of tumor promoter-induced oxidative events and DNA damage in vivo by sarcophytol A : A possible mechanism of antipromotion. *Cancer Res.*, 52, 2298-2303.
22. Kyrstyna F (1992) Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac. Ther.*, 53, 127-166.
23. Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221, 1256-1264.
24. Weisburger JH (1991) Effective human cancer prevention as goal for the regulation of environmental chemicals. *J. Environ. Health*, C8, 339-351.
25. Shibata A, Paganini-Hill A, Ross RK and Henderson BE (1992) Intake of vegetables, fruits, β -carotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: a prospective study. *Br. J. Cancer*, 66, 673-679.

26. Huang MT and Ferrano T (1992) Phenolic compounds in food and cancer Prevention. in: Huang MT, Ho CT and Lee CY (Eds.) Phenolic compounds in Food and Health II: Antioxidants and Cancer Prevention, American Chemical Society Symposium Series 507, American Chemical Society Washington, D.C., pp. 48-52.
27. Berenblum I (1941) THE cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res.*, 1, 44-48.
28. Slaga TJ, Klein-Szanto AJP, Triplett LL, Yotti LP and Trosko JE (1981) Skin tumor promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound. *Science*, 213, 1023-1025.
29. McCann J, Choi E, Yamasaki E and Ames BN (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72, 5135-5139.
30. Miller EC and Miller JA (1976) The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanisms of action in carcinogenesis. In *Chemical Carcinogens*. ed. Searle CE, pp. 7362. Washington, DC: Am. Chem. soc.
31. Hicks RM (1983) Pathological and biochemical aspects of tumor promotion. *Carcinogenesis*, 4, 1209-14.
32. Driedger PE and Blumberg PM (1980) Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 567-71.

33. Shoyab M and Todaro GJ (1980) Specific high affinity cell membrane receptors for biologically active phorbol and ingenol esters. *Nature* 288, 451-455.
34. Boutwell RK (1983) Diet and anti-carcinogenesis in the mouse skin two-stage model. *Cancer Res.* 43, 2465s-68s (suppl.)
35. Lewis JG and Adams DO (1987) Early inflammatory changes in the skin of SENCAR and C57BL/6 mice following exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*, 8, 889-898.
36. Copeland ES (ed) (1993) Anational Institutes of Health Workshop report. Free radicals in promotion-a chemical pathology study section workshop. *Cancer Res.*, 43, 5631-5637.
37. O'Brien TG, Simsiman RC and Boutwell RK (1975) Induction of the polyamine-biosynthetic enzyme in mouse epidermis by tumor-promoting agents. *Cancer Res.*, 35, 1662-1670.
38. Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Finnegan-Olive T, Lou YR, Mitchell JM, Laskin JD, Newmark H, Yang CS and Conney AH (1992) Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis*, 13, 947-954.