

R
008.8
44421

私立中山醫學院生化研究所碩士論文

(I) 戊乙醯去羥梔子苷對大白鼠血液細胞及生化成份的影響

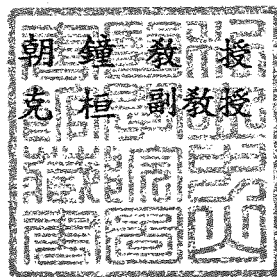
Effects of penta-acetyl geniposide on
blood cell parameters and biochemical analytes in rat.

(II) 戊乙醯去羥梔子苷造成 C-6 神經膠瘤細胞凋謝死亡之機制

Penta-acetyl geniposide-induced apoptosis is accompanied
by altered expression of c-myc and bcl-2 in C-6 glioma cells.

指導教授：

王
呂



(Chau-Jong Wang)

(Ko-Huang Lue)

研究生：林世傑 (Shyh-Jye Lin)

中山醫學院圖書館



C034311

中華民國八十五年元月

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位
之必備條件之一，經中山醫學院生化研究所
碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

臺大醫學院毒理學研究所

郭明良 副教授

郭明良

私立中山醫學院生化研究所
(論文指導教授)

王朝鐘 教授

王朝鐘

私立中山醫學院醫學系
(論文指導教授)

呂克桓 副教授

呂克桓

中華民國八十五年元月

誌 謝

首先要感謝校方給予在職進修的機會，才能攻讀碩士學位。

特別感謝王朝鐘所長和呂克桓副教授細心的指導，使得本論文得以順利完成。

感謝林克亮主任在免疫學方面的指導，附設醫院小兒免疫室曾碧緣小姐在流式細胞儀使用上的協助，林玉玲老師、王建得、黃惠珮、吳珍容、李瑤玲等在實驗上的幫助。

最後，僅以此篇論文獻給關懷我的家人、同事和朋友。

目 錄

第一部分 戊乙醯去羥梔子萸對大白鼠血液 細胞及生化成份的影響

縮寫表	1
中文摘要	2
英文摘要	3
前言	5
材料與方法	7
結果	20
討論	22
圖	24
表	25
參考文獻	32

第二部分 戊乙醯去羥梔子萸造成C-6神經膠 瘤細胞凋謝死亡之機制

縮寫表	40
中文摘要	41
英文摘要	42
前言	43
材料與方法	45
結果	54
討論	58
圖	61
表	72
參考文獻	73

第一部份

戊乙醯去羥梔子苷對

大白鼠血液細胞及生化成份的影響

縮寫表：(第一部份)

AFB1 : Aflatoxin B1
DMSO : Dimethyl sulfoxide
WBC : White blood cell
RBC : Red blood cell
HGB : Hemoglobin
HCT : Hematocrit
MCV : Mean corpuscular volume
MCH : Mean corpuscular hemoglobin
MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration
TP : Total protein
Alb : Albumin
D.Bil : Direct bilirubin
T.Bil : Total bilirubin
ALT : Alanine aminotransferase
AST : Aspartate aminotransferase
ALP : Alkaline phosphatase
LDH : Lactate dehydrogenase
GGT : Gamma-glutamyltransferase
BUN : Blood urea nitrogen
Cre : Creatinine
UA : Uric acid
Na : Sodium
K : Potassium
Cl : Chloride
Ca : Calcium
Phos : Phosphorus
TG : Triglyceride
Cho : Cholesterol
Amy : Amylase
Glu : Glucose

中文摘要

戊乙醯去癭梔子苷〔penta-acetyl geniposide: (AC)₅-GP〕是從梔子 (*Gardenia frutosa*) 萃取出來的一種糖苷，再經乙醯化而得到的一種淺黃色複合物，在以前的實驗已經證實它不論在試管或在動物體內皆有抑制細胞毒性及抑制腫瘤細胞生長的作用，所以想知道在大鼠體內這些作用是否和調節免疫系統有關；且想知道(AC)₅-GP是否有毒性存在。所以使用流式細胞儀、RID法、血球計數儀、生化分析儀來加以評估。結果發現(AC)₅-GP對免疫系統並無影響，可知它能抑制腫瘤的效果並不是調節免疫系統造成的，另外發現(AC)₅-GP會使大鼠 TP、Alb、ALP、BUN稍微降低，可能與抑制肝臟的蛋白合成或加速腎臟的排泄有關；而Na、K、Cl略為增加，應該是由腹腔注射(AC)₅-GP，導致血管內外水分及離子的重新平衡所造成的。總之，以上生化成份的些微變化對體內主要器官、系統並無明顯的毒性存在，所以(AC)₅-GP應可用於人體腫瘤的化學治療。

Abstract

Penta-acetyl geniposide, (AC)₅-GP is a pale yellow compound, which produced by acetylation of a glycoside that isolated from *Gardenia frutis*. In our previously studies, we had demonstrated that (AC)₅-GP would inhibit cytotoxicity and the growth of tumor cells both *in vivo* and *in vitro*. The present studies, we wanted to know if these effects were correlated with the regulation of immune system in rats. Futhermore, whether there is toxicity of (AC)₅-GP *in vivo* or not. We estimated by flowcytometer, radial immunodiffusion method, semiautomated hematology instrument and automated chemistry analyzer. Results obtained in these studies indicated that there were no effect of (AC)₅-GP on immune system. It meanted that the inhibition of tumor growth by (AC)₅-GP was not due to the regulation of immunity. In addition, we found that (AC)₅-GP reduced the concentrations of TP, Alb, BUN and activity of ALP in rats slightly. It might be caused by inhibition of protein synthesis in liver or inhancing

kidney excretion. On the other hand, the concentrations of Na, K and Cl were increased slightly. It might be caused by re-balance of water and ion between intra- and extra-venous fluid. In conclusion, results obtained in these studies indicated that there were no significant toxicity in major organs or systems in rats. Therefore, (AC)₅-GP should be apply to tumor chemotherapy in human.

一、前言

山梔或稱山黃梔 (*Gardenia jasminoides* Ellis) 為茜草科山梔屬常綠灌木(1)，夏季開花，花冠六裂，回旋狀，白色，有香氣；果實呈橢圓形，外有5-8縱稜(2)，熟時呈黃赤色 (Fig.1)；浸入水中，會使水染成鮮黃色，可做染料。

曬乾的果實稱為山梔子、梔子或支子(1)，屬中品藥，中藥方劑中如梔子羌湯(梔子、乾羌)，茵陳蒿湯(梔子、茵陳、大黃)，黃連解毒丸(梔子、黃連、黃芩、黃柏)，梔子柏皮湯(梔子、炙甘草、黃柏)，梔子鼓湯(梔子、豆鼓)，梔連二陳湯(陳皮、半夏、茯苓、甘草、梔子、黃連)(3)等皆含有梔子，臨床上為有名的消炎解熱藥(4)，可治療急性膽道炎，胃及食道炎，下部出血症，外用消炎退腫，治跌打，故廣為民間使用，因此在生藥上佔有重要的地位。

山梔子中主要成份有黃酮類梔子素(Gardenin)，番紅花素(Crocin)，番紅花酸(Crocetin)，梔子苷(Gardenoside)，去羥梔子苷(Geniposide)，右旋-甘露醇(D-Mannitol)等。過去有研究指出番紅花素(Crocin)、番紅花酸(Crocetin)對AFB1及dimethylnitrosamine 誘導之肝損傷具保護作用(5,6)，也會抑制CD-1小白鼠因benzo(a)pyrene引起的皮膚腫瘤促進作用(7)。另一成份去羥梔子苷(Geniposide)為一種iridoid glycoside，具有利

膽作用及保肝作用(8),也有抑制大白鼠因AFB1引起的肝臟毒性及抑制AFB1結合到肝細胞DNA的作用(9),它也會抑制鼠肝細胞因AFB1引起的DNA修補合成(10)。甘露醇對於巴拉刈誘發鼠肝細胞DNA損傷有保護作用(11)。

戊乙醯去羥梔子苷〔penta-acetyl geniposide : (AC)₅-GP〕也是從梔子萃取物中分離出去羥梔子苷(Geniposide),再經乙醯化反應而得到的。從我們先前的研究已知在生體內,(AC)₅-GP會抑制大白鼠身上C-6神經膠瘤細胞的生長及發育(12)。在試管內也發現用AFB1誘導C3H10T1/2細胞產生的基因毒性會被(AC)₅-GP所抑制(13);另外(AC)₅-GP可降低培養的C-6神經膠瘤細胞的種植效率(plating efficiency),也會使其DNA合成受到抑制(14)。

因為(AC)₅-GP不論對大白鼠體內或試管內培養的腫瘤細胞都有抑制作用,且對細胞毒性也有抑制的效果,故而想瞭解(AC)₅-GP是否藉由調節免疫系統,增強免疫能力,而達到抑制腫瘤生長的效果;進而想瞭解(AC)₅-GP是否對體內的主要器官、系統有毒性存在;對血液中其他成分有否影響,以作為人體實驗的參考。於是本實驗將(AC)₅-GP經腹腔注射入大白鼠體內後,採取血液做血球計數分析,白血球分類計數,淋巴球次群分類計數,免疫球蛋白定量及各種血中生化成分的分析。

二、材料與方法

1、(AC)₅-GP 的製備(14)：

將山梔子乾燥果實的殼剝掉，搗碎後，以 500 ml ether 回流沖洗，以除去脂肪；然後以 500 ml 熱甲醇萃取 3 小時後，再重覆前面步驟一次，再收集甲醇層，將體積濃縮至半量，於 0°C 放置兩天，然後過濾，再把濾液蒸發至乾燥後，在 300 ml n-butanol / H₂O (1:1) 中分離，取出水層後，再以 butanol 萃取。再將所有 butanol 全部收集，並蒸發至乾燥，就得到粘稠磚紅色濃縮物。再用 pyridine 及無水醋酸 (2:1) 當溶劑，加入濃縮物進行 24 小時的乙醯化反應 (acetylation)；再將反應物以 n-butanol / H₂O (1:1) 萃取，收集 butanol 層。用水洗兩次之後；加入適量的無水硫酸鈉，將 butanol 萃取物脫水。除去 butanol 後，則呈深黃色的固體，用絕對乙醇再結晶純化，即成淺黃色戊乙醯去羥梔子苷 [(AC)₅-GP] 的複合物。

2、動物來源：

Sprague-Dawley 品系雌性大白鼠，體重約 230-280 g，購自國科會國家實驗動物繁殖及研

究中心，以福壽牌鼠實驗動物配合飼料餵食，蒸餾水不限制飲用，將大白鼠隨機分成四組，其中I,II,III組各6隻，IV組7隻。

3. 動物處理：

戊乙醯去羥梔子苷，先以DMSO溶解後，再加等量生理食鹽水，配製成最終濃度為6mg/ml及12mg/ml溶液。實驗共分四組，I組為正常組：經由腹腔注射給與等量的生理食鹽水。II為溶劑控制組：經由腹腔注射給予1:1的DMSO和生理食鹽水混合液。III為低劑量實驗組：依大白鼠體重從腹腔注射給予5mg/kg的戊乙醯去羥梔子苷。IV組為高劑量實驗組：依大白鼠體重從腹腔注射給予10mg/kg的戊乙醯去羥梔子苷。以上四組皆每天由腹腔注射，連續三天，在第四天予以斷頭取血，其中2ml全血加入Vacutainer® EDTA試管中，其餘的血全部放入Vacutainer® plain試管（購自BECTON DICKINSON, NEW JERSEY, USA)中備用。

4. 試藥與抗體：

自動血球計數儀(SYSMEX K-1000)所需試劑購自TOA, KOBE, JAPAN. 淋巴球分類所需的白血球抗原的單株抗體(CD5-FITC, CD45RA-PE, NKR - P1 - BIOTIN)購自SEROTEC, OXFORD, UK。而STREPTAVIDIN-RED 613

購自 LIFE TECHNOLOGIES, MD, USA。免疫球蛋白 (Ig M, Ig G) 測定套組也是購自 SEROTEC, OXFORD, UK。自動生化分析儀 (SYNCHRON CX-7) 所需試劑則購自 BECKMAN, CA, USA。

5. 項目與分析法：

A. 血球檢查：使用自動血球計數儀
(SYSMEX K-1000, TOA)

1). 白血球、紅血球、血小板(15)：

利用血球細胞通過電極的小孔時，會產生電壓脈衝的變化，再依此就可換算出細胞的數量和大小。

2). 血色素(HGB)(16)：

首先用溶血劑將紅血球內的血色素釋出，再用氰化高鐵血色素法，以光譜光度計在 540 nm 比色。

3). 血球容積比(HCT)(17)：

利用累積電壓高度測定法。

4). 平均紅血球容積(MCV)：

$$MCV = HCT(\%) / RBC(10^6) \times 10(fl)$$

5). 平均紅血球血色素(MCH):

$$MCH = HGB(g/dl) / RBC(10^6) \times 10(pg)$$

6). 平均紅血球血色素濃度(MCHC):

$$MCHC = MCH / MCV \times 100\% \quad \text{or} \\ HGB(g/dl) / HCT(\%) \times 100\%$$

B. 白血球分類計數:

將血液做成抹片，以劉氏染色法染色後，用光學顯微鏡在1000倍觀察，計算100個白血球中 NEUTROPHIL, LYMPHOCYTE, MONOCYTE EOSINOPHIL, BASOPHIL 所佔的百分比。

C. 淋巴球次群分類:

利用免疫螢光三色分析法，將淋巴球分成 B 細胞，T 細胞，NK 細胞三個次群。首先將含有 EDTA 的全血 100 μ l 加入 CD5-FITC, CD45RA-PE, NK1.1-BIOTIN 作用 20 分鐘，再用溶解液將紅血球溶血；再加入 STREPTAVIDIN-RED 613 作用 30 分鐘後，直接上 FACScan (BECTON DICKINSON, NEW JERSEY, USA) 的 Lysis II 軟體分析。詳細步驟如下:

LABELLING LYSED WHOLE BLOOD
METHOD(18,19,20,21) :

1. 將含有EDTA的全血100 μ l加入4ml的空試管中。
2. 加入 15 μ l CD5-FITC
10 μ l CD45RA-PE
5 μ l NKR-P1-BIOTIN
3. 混合後，在室溫孵育20分鐘。
4. 加 2ml溶解液，混合均勻，於室溫放置5分鐘。
5. 用1600 RPM 離心5 分鐘後，除去上清液。
6. 加1 ml 冷的PGB (PBS + glucose + BSA)，振盪混合
7. 用1600 RPM 離心5 分鐘後，除去上清液，再重覆一次。
8. 加4 μ l STREPTAVIDIN-RED 613 ，於4 $^{\circ}$ C作用30分鐘。
9. 如步驟6，7重覆洗滌兩次。
10. 沉澱物加0.25 ml PGB，混合均勻。
11. 上FACScan分析。

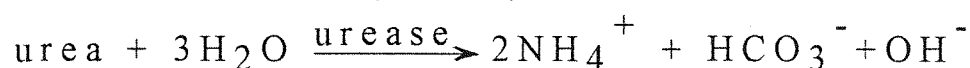
D. 免疫球蛋白IgM,IgG的測定(22,23,24) :

使用RID(Radial immunodiffusion)法，將大白鼠血清或 calibrator加入含免疫球蛋白抗血清平板的小洞中；測 IgM的平板於室溫放

置4天，測 IgG 的平板於室溫放置3天後，以米達尺量取各洞沉澱圈的直徑，對照 calibration curve，即可知道 Ig M, Ig G 的濃度。

E. 血液中生化成分的分析：

1. BUN: Conductivity electrode (urease) method (25,26).



非離子狀態的尿素在 urease 的催化下，形成離子狀態的產物，再用導電度電極偵測導電率增加的量，即可知 BUN 含量。

2. Na: ISE (Ion selective electrode), Potentiometric method (27,28,29).

利用選擇性的玻璃膜電極測定鈉離子。本法屬於間接法，即檢體先與大量的高張離子溶液稀釋混合後，再與電極接觸而被測定出來。

3. K: ISE/valinomycin, potentiometric method (27,28,29).

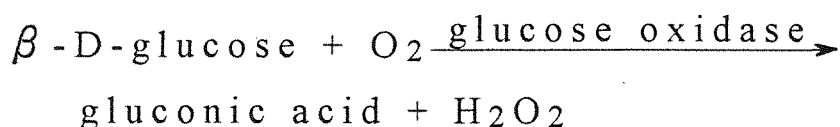
利用含有 valinomycin 的多孔性電極來測定。這種電極對鉀離子的選擇性感應超過

鈉離子4000倍。

4. Cl:ISE potentiometric method
(27,28,29).

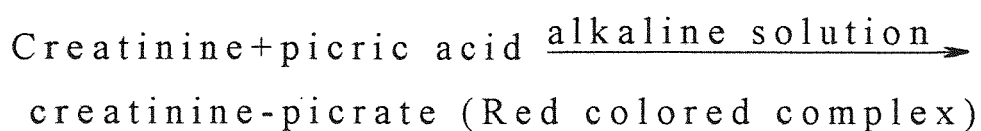
以 Ag/AgCl電極法測定，因為固態的 AgCl電極會部份溶解，使溶液中的 Ag^+ 和 Cl^- 達到平衡狀態；當檢體的 Cl^- 加入時，電極再次釋出 Ag^+ ，使溶液重新回到平衡狀態，此時電位的變化與 Cl^- 的濃度成正比。

5. Glucose: O_2 depletion, glucose oxidase
, oxygen electrode method
(30,31).



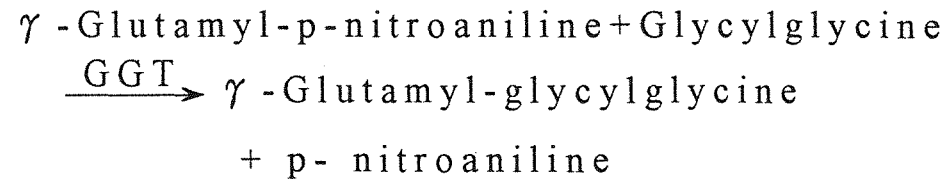
利用 oxygen electrode 來測 O_2 消耗的速率，即可知 glucose 的濃度。

6. Creatinine: Alkaline picrate method
(32,33).



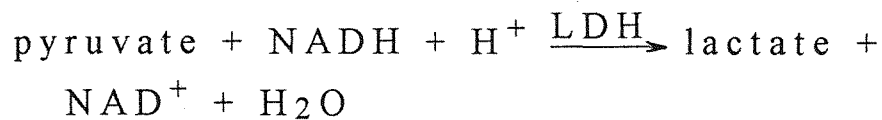
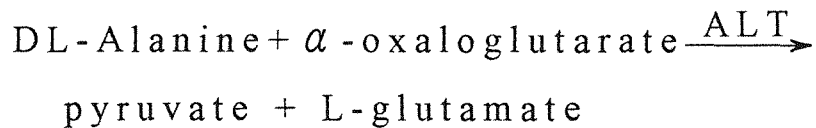
在波長520 nm 比色，即可測出 creatinine 的濃度。

7. GGT: Szasz method(34).



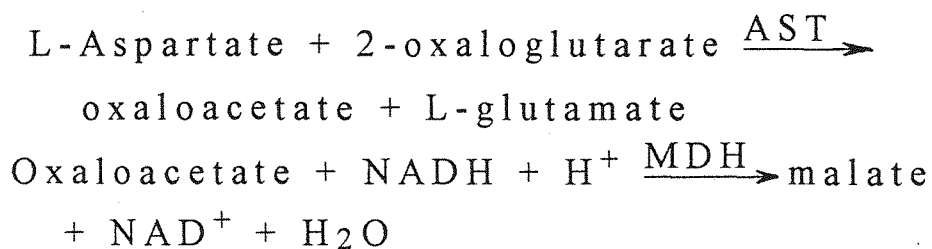
在波長410 nm 比色，即可測出GGT 的活性。

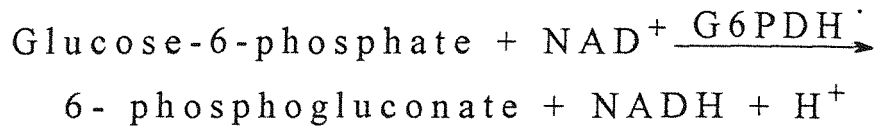
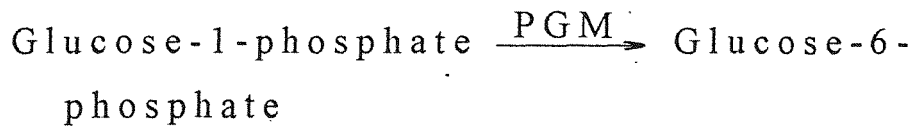
8. ALT: Henry method(35,36).



在340 nm 測定 NADH 減少的量，即可知 ALT 的活性。

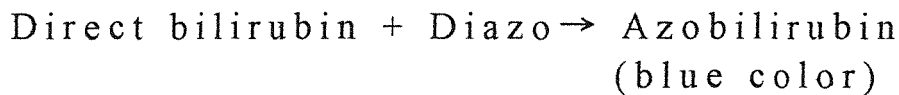
9. AST: Henry method(36,37).





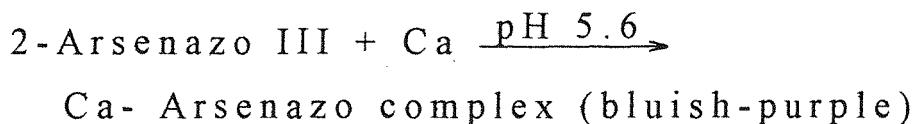
在340 nm 測定 NADH 增加的量，
即可知 Amylase 的活性。

13. Direct bilirubin: Jendrassik-Grof method
(43,44).



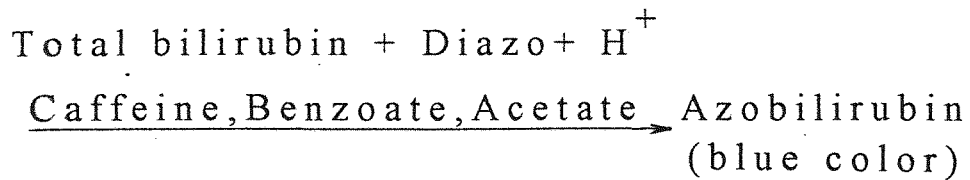
在560 nm 比色，即可知道 Direct
bilirubin 的濃度。

14. Ca: Colorimetric Arsenazo III method
(45).



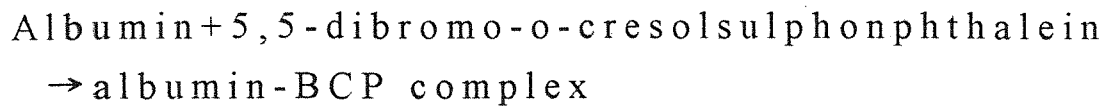
在 650 nm 比色，即可知道 Ca 的濃度。

15. Total bilirubin: Jendrassik-Grof method.
(43,46)



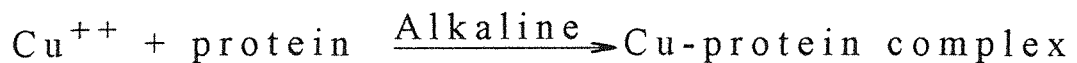
在 560 nm 比色，即可知道 total bilirubin 的濃度。

16. Albumin: BCP method (47, 48).



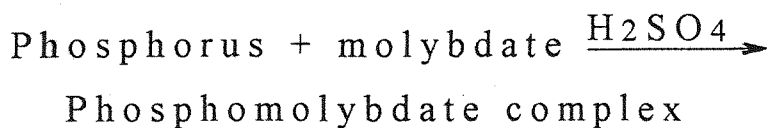
在 600 nm 比色，即可知 Albumin 之濃度。

17. Total protein: Biuret method (49, 50).



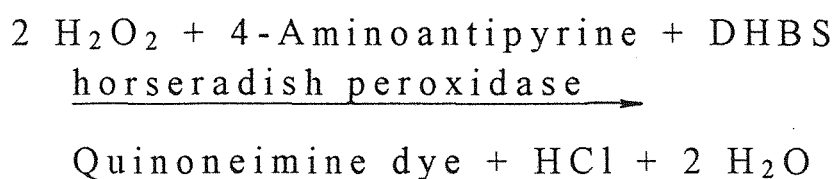
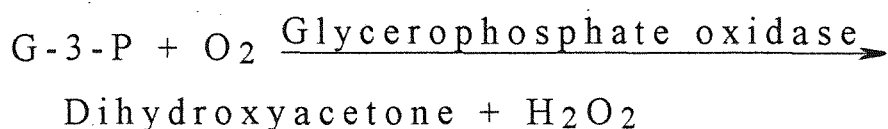
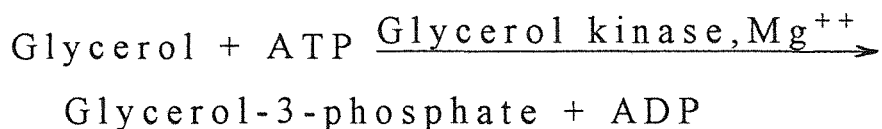
在 560 nm 比色，即可知 Total protein 之濃度。

18. Phosphorus: Phosphomolybdate method
(51, 52).



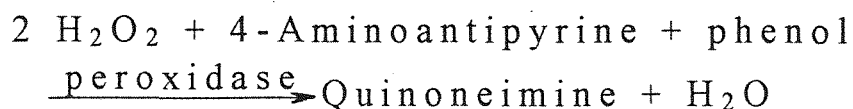
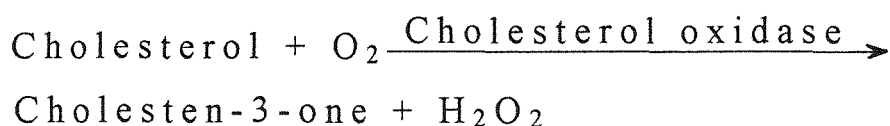
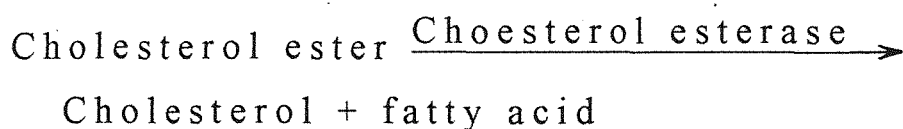
在 340 nm 測 O.D. 值，即可知 phosphorus 之濃度。

19. Triglyceride: Enzymatic GPO, Trinder method(53,54).



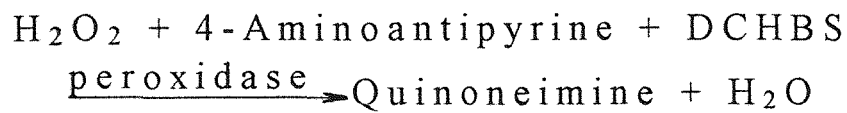
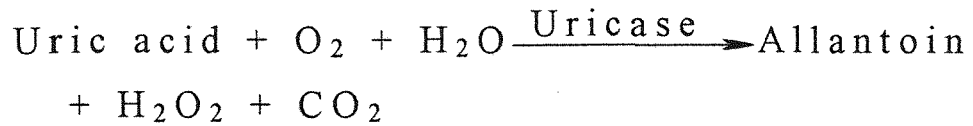
在520nm比色，即可知Triglyceride之濃度。

20. Cholesterol: Enzymatic method(55).



在520 nm 比色，即可知Cholesterol
之濃度。

21.Uric acid:Enzymatic Trinder method
(56).



在520 nm 比色，即可知 Uric acid
之濃度。

6.統計方法：

本文使用paired T test來做統計分析。

三、結果

在血球參數檢查項目中，包括WBC、RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC、Platelet 共八項，僅HCT一項在5 mg/kg (AC)₅-GP 處理時，有稍微下降外，但並無意義，其餘皆無明顯變化(Table 1)。

(AC)₅-GP處理後，對白血球分類的影響方面，只有在(AC)₅-GP 5 mg/kg 那組的單核球有升高的趨勢 ($P < 0.05$)，但 Eosinophil、Neutrophil、Lymphocyte 皆無差異存在 (Table 2)。

在淋巴球次群分析方面，T cell、B cell及NK cell均未見任何明顯差異存在。在免疫球蛋白 IgM、IgG 的測定方面，也沒有任何差異存在 (Table 3)。

血液中生化成分分析之結果：肝臟機能方面，以5 mg/kg (AC)₅-GP 處理的大白鼠，其Total protein 有下降的情形；Albumin 也有降低的情形 ($P < 0.05$)。而在10 mg/kg (AC)₅-GP 處理的大白鼠則僅 Alkaline phosphatase 有明顯降低 ($P < 0.05$)，其餘的項目AST、ALT、Bilirubin、ALP、LDH、GGT均無明顯的改變 (Table 4)。腎臟功能方面，以5 mg/kg (AC)₅-GP 處理的大白鼠顯示 Total protein, Albumin, BUN 皆呈下降 ($P < 0.05$)，但陰離子

中 Chloride 則反呈上升的情況($P < 0.05$)；而在 10 mg/kg (AC)₅-GP 處理的大白鼠則有 Na、K、Cl 三項皆升高的情形($P < 0.05$)(Table 5)，其餘的 Creatinine、Uric acid、Ca、Phosphorus 則無差異。心臟血管系統方面，則各組間的 Cholesterol、Triglyceride、AST、LDH 均無明顯差異存在 (Table 6)。胰臟機能 (Amylase) 及醣類代謝 (Glucose) 方面，各組皆無差異存在 (Table 7)。

四、討論

在(AC)₅-GP對血球參數的影響方面，並無統計上的差異，可見(AC)₅-GP對造血系統沒有毒性存在。

在白血球分類計數中，用 5mg/kg 的 (AC)₅-GP處理的大白鼠，其 Monocyte的百分比略有增加。因Monocyte和吞噬作用及處理抗原有關，所以可能是因為(AC)₅-GP打入腹腔所造成的免疫反應。

在(AC)₅-GP對免疫系統的影響而言，不論是體液免疫的Ig M、Ig G或細胞免疫的 T cell、B cell 及 NK cell，都沒有影響。

在(AC)₅-GP對肝臟膽囊系統的影響方面，用 5mg/kg的 (AC)₅-GP處理的大白鼠，其TP、Alb都呈下降的情形，可能是(AC)₅-GP降低肝臟對TP、Alb的合成或是促使動物體內分解代謝的加強，而經由腎臟排泄，所以使TP、Alb皆呈下降的趨勢。另外以10 mg/kg處理後，ALP有明顯降低；ALP的主要來源是肝臟、小腸、胎盤、肺臟，合成ALP的功能受到抑制時即會降低活性，但是究竟是抑制那個部位或可能是(AC)₅-GP直接和ALP結合，使其活性降低，則有待更深入的研究。

而在對腎臟功能的影響方面，除TP、Alb已如前述外，BUN在 5mg/kg這組呈下降的情形，可能

是(AC)₅-GP影響體內對蛋白質的吸收，使蛋白總量下降，導致蛋白分解產物的BUN亦隨之下降。另外在10mg/kg這組可見Na、K、Cl三者皆上升；而5mg/kg這組則僅有Cl一項升高而已，可能是因腹腔內注射(AC)₅-GP，使血管內水份往血管外流動，使得血漿內水份減少所造成的。也有另一種可能，就是腹腔注射的溶劑含有生理食鹽水，提供了額外的Na與Cl所導致的結果。

另外在心臟血管系統方面，皆沒有任何變化，可見(AC)₅-GP對本系統沒有毒性存在。

最後在胰臟功能及葡萄糖代謝方面，(AC)₅-GP都沒有任何影響。

總之，(AC)₅-GP對大白鼠的免疫系統並無影響，可見(AC)₅-GP在生體內及試管內抑制腫瘤細胞的機轉(12,13,14)，並非(AC)₅-GP增加大白鼠的免疫能力所造成。在另一方面，(AC)₅-GP對大白鼠的主要器官和系統，並無明顯的毒性存在；因此，(AC)₅-GP應可被考慮應用於人體腫瘤的化學治療。



Fig.1 Flower and fruits of *Gardenia jasminoides*.

Table 1. Effects of (AC)₅-GP on blood cell parameters in S-D rats.

Groups	n	WBC mm ³	RBC(x10 ⁶) mm ³	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	Platelet (x10 ³) mm ³
Normal saline	6	10250±1757	6.835±0.305	15.2±0.64	39.8±1.67	58.3±0.79	22.2±0.37	38.1±0.31	714.5±237
NS+DMSO	6	10183±2768	6.982±0.182	15.3±0.42	40.8±0.97	58.4±0.54	21.9±0.20	37.5±0.43	480.3±71
(AC) ₅ -GP 5mg/kg	6	13200±2056	6.710±0.231	14.9±0.48	39.1*±1.00	58.3±1.59	22.3±0.42	38.2±0.85	513.2±121
(AC) ₅ -GP 10mg/kg	7	9614±2508	7.081±0.439	15.8±1.20	41.3±2.74	58.3±1.01	22.2±0.53	38.2±0.59	561.4±230

Experimental rats were administrated intraperitoneally consecutive three days with (AC)₅-GP. The rats were sacrificed at the fourth day and 2ml of blood were collected in Vacutainer® EDTA tube and mixed well. Count blood cell parameters by a semiautomated hematology instrument (Sysmex K-1000). Values were mean±S.D. * P<0.05

Table 2. Effects of (AC)₅-GP on leukocyte differential count in S-D rats.

Groups	n	Eosinophil (%)	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)
Normal saline	6	1.67±0.82	11.2±5.46	84.0±6.66	3.3±2.19
NS+DMSO	6	1.50±1.87	10.2±5.38	84.8±5.91	3.7±1.03
(AC) ₅ -GP 5mg/kg	6	2.0±1.67	13.5±5.01	78.2±5.49	6.3±1.37*
(AC) ₅ -GP 10mg/kg	7	1.71±1.60	11.1±2.73	83.3±3.20	3.9±2.19

Experimental rats were administrated intraperitoneally consecutive three days with (AC)₅-GP. The rats were sacrificed at the fourth day and 2ml of blood were collected in Vacutainer® EDTA tube and mixed well. A drop of blood was smeared on slide and stained by Liu's method. Differential count of leukocyte in 1000X optical microscopoe. Values were mean ± S.D. * P<0.05

Table 3. Effects of (AC)₅-GP on immune system in S-D rats.

Groups	n	IgM mg/l	IgG mg/l	T cell %	B cell %	NK cell %
Normal saline	6	592.8±284.4	6307±1662	54.12±6.33	0.53±0.16	0.077±0.029
NS+DMSO	6	634.8±175.8	6380±1794	55.38±9.89	0.48±0.10	0.057±0.032
(AC) ₅ -GP 5mg/kg	6	725.3±226.2	5300±1098	50.04±6.39	1.13±0.78	0.083±0.036
(AC) ₅ -GP 10mg/kg	7	671.9±243.1	6911±775	59.10±7.10	1.29±1.24	0.103±0.087

Experimental rats were administrated intraperitoneally consecutive three days with (AC)₅-GP. The rats were sacrificed at the fourth day and blood were collected. Assay of IgG · IgM by RID method. On the other hand, whole blood were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies and then analyzed with FACScan to distinguish T, B or NK cells. Values were mean ± S.D.

Table 4. Effects of (AC)₅-GP on hepatobiliary function in S-D rats.

Groups	n	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	D.Bil(mg/dl)	T.Bil(mg/dl)	ALT(IU/l)	AST(IU/l)	ALP(IU/l)	LDH(IU/l)	GGT(IU/l)
Normal saline	6	8.0±0.61	2.0±0.14	0.13±0.052	0.30±0.13	48.7±2.07	283.5±66.6	176.3±51.3	7162±730	0.167±0.41
NS+DMSO	6	8.2±0.32	2.3±0.12	0.15±0.084	0.38±0.10	54.2±12.14	281.8±63.9	170.2±37.4	6986±689	0.167±0.40
(AC) ₅ -GP 5mg/kg	6	8.0±0.57*	2.0±0.22*	0.15±0.055	0.43±0.08	51.7±6.38	288±54.0	175.0±74.6	7262±1290	N.D.
(AC) ₅ -GP 10mg/kg	7	8.6±0.33	2.1±0.20	0.17±0.076	0.43±0.10	61.0±11.50	316.1±39.4	118.4±27.5*	7287±1076	0.571±1.51

Experimental rats were administrated intraperitoneally consecutive three days with (AC)₅-GP. The rats were sacrificed at the fourth day and 2ml of blood were collected in Vacutainer® heparin tube and mixed well. Heparinized plasma was assayed by an automated chemistry analyzer (Synchron CX-7). N.D.: no determined. Values were mean ± S.D. * P<0.05

Table 5. Effects of (AC)₅-GP on renal function in S-D rats.

Groups	n	TP(g/dl)	Alb(g/dl)	BUN(mg/dl)	Cre(mg/dl)	UA(mg/dl)	Na(mmol/l)	K(mmol/l)	Cl(mmol/l)	Ca(mg/dl)	Phos(mg/dl)
Normal saline	6	8.0±0.61	2.0±0.14	22.2±1.47	0.60±0.089	2.3±0.37	144.8±2.48	7.00±0.59	106.0±1.41	11.2±0.34	8.0±0.99
NS+DMSO	6	8.2±0.32	2.3±0.12	24.8±2.23	0.62±0.075	1.9±0.39	144.3±1.63	7.28±0.57	106.5±1.05	11.2±0.30	7.9±0.90
(AC) ₅ -GP 5mg/kg	6	8.0±0.57*	2.0±0.22*	20.3±1.75*	0.58±0.075	2.0±0.45	145.5±2.59	7.68±0.59	109.0±1.67*	11.0±0.48	8.3±1.24
(AC) ₅ -GP 10mg/kg	7	8.6±0.33	2.1±0.20	23.1±2.12	0.60±0.082	2.2±0.35	149.1±3.02*	8.29±0.64*	110.7±1.98*	11.1±0.49	8.9±1.11

Experimental rats were administrated intraperitoneally consecutive three days with (AC)₅-GP. The rats were sacrificed at the fourth day and 2ml of blood were collected in Vacutainer® heparin tube and mixed well. Heparinized plasma was assayed by an automated chemistry analyzer (Synchron CX-7). Values were mean ± S.D. * P < 0.05

Table 6. Effects of (AC)₅-GP on cardiovascular system in S-D rats.

Groups	n	TG (mg/dl)	Cho (mg/dl)	AST (IU/l)	LDH (IU/l)
Normal saline	6	144.7±44.0	40.2±3.92	283.5±66.6	7162±730
NS+DMSO	6	233.8±65.5	44.2±5.60	281.8±63.9	6986±689
(AC) ₅ -GP 5mg/kg	6	216.5±20.9	40.7±5.47	288.0±54.0	7262±1290
(AC) ₅ -GP 10mg/kg	7	164.1±54.5	43.0±6.38	316.1±39.4	7287±1076

Experimental rats were administrated intraperitoneally consecutive three days with (AC)₅-GP. The rats were sacrificed at the fourth day and 2ml of blood were collected in Vacutainer® heparin tube and mixed well. Heparinized plasma was assayed by an automated chemistry analyzer (Synchron CX-7). Values were mean ± S.D.



Table 7. Effects of (AC)₅-GP on pancreatic function and glucose metabolism in S-D rats.

Groups	n	Amy (U/l)	Glu (mg/dl)
Normal saline	6	1911±558	105.8±13.2
NS+DMSO	6	1814±471	106.3±6.2
(AC) ₅ -GP 5mg/kg	6	1537±176	105.7±14.9
(AC) ₅ -GP 10mg/kg	7	1521±88	109.9±6.2

Experimental rats were administrated intraperitoneally consecutive three days with (AC)₅-GP. The rats were sacrificed at the fourth day and 2ml of blood were collected in Vacutainer® heparin tube and mixed well. Heparinized plasma was assayed by an automated chemistry analyzer (Synchro CX-7). Values were mean ± S.D.

Reference

1. 李亮恭、劉榮瑞：正中植物學辭典 (1980) 臺二版，臺北，正中書局 p42.
2. 顏焜熒：原色中藥飲片圖鑑 (1980) 初版，臺北，南天書局 p103.
3. 李永春：實用中醫詞典 (1992) 初版，臺北，知音出版社 p600-601.
4. 高木村：臺灣藥用植物手冊 (1981) 初版，臺北，南天書局 p389.
5. Lin JK and Wang CJ (1986) Protection of crocin dyes on the acute hepatic damage induced by aflatoxin B1 and dimethylnitrosamine in rats. *Carcinogenesis* 7, 595-599.
6. Wang CJ, Hsu JD and Lin JK (1991) Suppression of aflatoxin B1-induced hepatotoxic lesions by crocetin (a natural carotenoids). *Carcinogenesis* 12, 1807-1810.
7. Wang CJ, Lee MJ, Chang MC and Lin JK (1995) Inhibition of tumor promotion in bezo (a) pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis* 16, 187-191.
8. Miyasita S (1976) A historical study of Chinese drugs for the treatment of jaundice. *Am J Chin Med* 4, 239-243.
9. Wang CJ, Wang SW and Lin JK (1991) Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Lett* 60, 95-102.

10. Wang SW, Lai CY and Wang CJ (1992)
Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B1-induced DNA repair synthesis in primary rat hepatocytes. *Cancer Lett* 65,133-137.
11. Chu CY, Hwang JM, Hsieh YS, Tseng TH and Wang CJ (1995) Inhibitory effect of mannitol on Paraquat-induced DNA damage and hepatic toxicity in rat hepatocytes. *Chung Shan Med J* 6,25-34.
12. Wang CJ, Chu CY, Tseng TH and Lin JK (1993)
Penta-acetyl geniposide inhibits the growth and development of C-6 glioma cells in rats. *Cancer Lett* 70,113-118.
13. Tseng TH, Chu CY and Wang CJ (1992)
Inhibition of penta-acetyl geniposide on aflatoxin B1-induced genotoxicity in C3H10t1/2 cells. *Cancer Lett* 62,233-242.
14. Wang CJ, Tseng TH and Lin JK (1992) Penta-acetyl geniposide : isolation, identification and primary effect on C-6 glioma cells in vitro. *Anticancer Res* 12,911-916.
15. Simmons A (1976) *Technical hematology*. second edition, Philadelphia, JB Lippincott Co. 50-67.
16. International Committee for Standardization in Hematology (ICSH), (1978) Recommendations for reference method for hemoglobinometry in human blood. (ICSH Standard EP 6/2:1977) and specifications for international

hemoglobin cyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3:1977), J Clin Path 31,139.

17. International Committee for Standardization in Hematology (ICSH), (1980) Expert Panel on Blood cell sizing. Recommendations for reference method for determination of packed cell volume of blood. J Clin Path 33,1.
18. Starkey PM, Sargent IL and Redman CWG (1988) Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. Immunology 65,129-134.
19. Peakman M, Tredger JM, Davies ET et al (1993) Analysis of peripheral blood mononuclear cells in rodents by three-colour flow cytometry using a small-volume lysed whole blood technique. J Immunol methods 158,87-94.
20. Webster GA and Pockley AG (1993) Effect of cell lysis protocols on the expression of rat peripheral blood lymphocyte subset and activation antigens. J Immunol methods 163, 115-121.
21. Hunter SD, Peters LE, Wotherspoon JS et al (1994) Lymphocyte subset analysis by Boolean Algebra: a phenotypic approach using a cocktail of 5 antibodies and 3 color immunofluorescence. Cytometry 15,258-266.

22. Mancini G, Carbonara AO, and Heremans JF (1965) Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2,235.
23. Fahey JC and McKelvey EM (1965) Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates. *J immunol* 194,84.
24. Scott BJ and Burnett D(1978) The effects of the protein content of diluents on peak height in rocket immunoelectrophoresis. *Clin Chim Acta* 89,475.
25. Talke H and Schubert GE(1965) Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und serum in optischen Test nach Warburg. *Klin Wochenschr* 43,174-175.
26. Tiffany TO, Jansen JM and Burtis CA (1972) Enzymatic kinetic rate and end-point analysis of substrate, by use a GeMSAEC fast analyzer. *Clin Chem* 18,829-840.
27. Stefanac Z and Simon W (1966) Highly selective cation electrode systems based on in-vitro behavior of macrotetrolides in membranes. *Chimica* 20,436-440.
28. Janz GJ and Taniguchi H: The Silver-Silver-Halide electrodes: *Clinical Reviews* volume 52-53,397-437.
29. Rosalki SB(1967) An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination.

- J Lab Clin Med 69,124-136.
30. Kadish AH and Sternberg JC (1969) Determination of glucose by measurement of rate of oxygen consumption. Diabetes 18, 467-470.
 31. Morrison B(1972)Use of the Beckman glucose analyzer for low and high glucose values. Clin Chem Acta 42,192-
 32. Friedman RB, Anderson RE, Entine SM and Hirshberg SB (1980) Effects of disease on clinical laboratory tests 26 (4 Suppl) : 1D-476D.
 33. Jeffe M(1886)ueber der Niederschlag weichen Pikrinsaure in normalen Harn erzeugt und uber eine neue Reaction des Kreatins.Z Physiol Chem 10,391-400.
 34. Szasz G (1969) A kinatic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. Clin Chem 15,142-136.
 35. Reitman S, and Frankel S(1957)A colormetric for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am J Clin Path 28,56-63.
 36. Henry RJ(1960)Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lactic dehydrogenase. Am J Clin Path 34,381-391.
 37. Henry RJ (1974)Clinical chemistry,principles

- and technics. New York, Harper and Row 815-1001.
38. Babson AL, Greeley SJ, Coleman CM and Phillips GE (1966) Phenolphthalein as a substrate for serum alkaline phosphatase. Clin Chem 12,482-490.
 39. Bowers GN Jr and McComb RB (1966) A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. Clin Chem 12,70-89.
 40. Howell BF, McClure S and Schaffer R (1979) Lactate-to-pyruvate or pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: re-examination. Clin Chem 25,269-272.
 41. Synchron as enzyme chemistry system. Module operating and service instructions 015-245224C, June 1984.
 42. Pierre KJ, Tung KK and Nadj H (1976) A new enzymatic kinetic method for determination of α -amylase. Clin Chem 22,1219.
 43. Malloy HT and Evelyn KA (1937) The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem 119, 481-490.
 44. Rosenthal P (1990) Total and direct-reacting bilirubin valued by automated methods compared with liquid chromatography and with manual methods for determining delta-bilirubin. Clin Chem 36,788-791.

45. Michaylova V and Ilkova P (1971) Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. Anal Chim Acta 53,194-198.
46. Jendrassik L and Grof P (1938) Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubin. Biochem Z 297,81-89.
47. Pinnell AE and Northam BE (1978) New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromcresol purple. Clin Chem 24,80-86.
48. Wang J and Zakowski J (1986) A stable liquid albumin reagent using BCP methodology. Clin Chem 32,1121.
49. Kinsley GR (1942) The direct biuret method for the determination of serum protein as applied to photoelectric and visual colorimetry. J Lab Clin Med 27,840-845.
50. Beckman Synchron CX 4/5 Chemistry information manual 015-246221C Nov.1989.
51. Dryer RL and Ruth JI (1963) Determination of serum inorganic phosphorus, standard methods. Clin Chem 4,191.
52. Beckman Synchron CX 4/5 Chemistry information manual 015-246236D Nov.1989.
53. Bucolo G and David H (1973) Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem 19,476-82.

54. Beckman Synchron CX 4/5 Chemistry information manual 015-248053, 1991.
55. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W and Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 20, 470-475.
56. Fossati P, Prencipe L and Berti G (1980) Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem 26, 227-231.

第二部份

戊乙醯去羧梔子苷造成

C-6神經膠瘤細胞凋謝死亡之機制

縮寫表：（第二部份）

BSA	:	Bovine serum albumin
DMSO	:	Dimethyl sulfoxide
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
MTT	:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	:	Phosphate buffered saline
TMB	:	3,3',5,5'-tetramethyl benzidine

中文摘要

戊乙醯去氫梔子苷 [pental-acetyl geniposide, (AC)₅-GP] 是從山梔子 (*Gardenia fructus*) 萃取的一種醣苷 (glycoside)，再經乙醯化 (acetylation) 而得到的。以 (AC)₅-GP 處理大白鼠的 C6 神經膠瘤細胞會使核小體內的 DNA 片段化和細胞的死亡。C6 神經膠瘤細胞以 (AC)₅-GP 處理後，使細胞死亡、染色體濃縮、核小體內的 DNA 階梯狀，且使細胞週期停在 G₀/G₁ 期，顯示 (AC)₅-GP 導致的細胞死亡似乎是由 Apoptosis 所造成的。另外，本實驗也顯示用 (AC)₅-GP (0.075 mM) 處理 1-6 小時後，bcl-2 蛋白降低了。相對地，用 (AC)₅-GP (0.075 mM) 處理 1-5 小時期間，c-myc 蛋白的表現逐漸增加。(AC)₅-GP 作用於 C6 神經膠瘤細胞，使其 c-myc 和 bcl-2 的表現改變具有 dose-dependent 的效應。但是若以 phorbol-12-myristate-13-acetate 或血清來刺激 c-fos 和 c-jun 的表現，則完全不受 (AC)₅-GP 的影響。以上結果顯示 (AC)₅-GP 處理 C6 神經膠瘤細胞所導致 Apoptosis 的部分原因，可能是經由改變 c-myc 或 bcl-2 基因的表現所造成的。

Abstract

Penta-acetyl geniposide, (AC)₅-GP, was produced by acetylation of a glycoside isolated from an extract of *Gardenia fructus*. In this study, we reported that rat C-6 glioma cells can be inhibited in culturing as well as in bearing rats by treating with (AC)₅-GP. The effect of (AC)₅-GP on inducing internucleosomal DNA fragmentation and cell death was examined in rat C-6 glioma cells. Treatment of C-6 glioma cells with the (AC)₅-GP caused cell death, chromatin condensation, internucleosomal DNA ladder and cell cycle arrest at G₀/G₁ phase revealed that (AC)₅-GP-induced cell death appears to be mediated by apoptosis. In addition, the results also showed that bcl-2 protein was decreased by the treatment of (AC)₅-GP (0.075 mM) in the experimental period 1-6 h. In contrast, the expression of c-myc protein was gradually increased during the period (1-5 h) of (AC)₅-GP (0.075 mM) treatment. The effects of (AC)₅-GP-induced alteration of c-myc and bcl-2 expression in C-6 glioma cells was dose-dependent. However, the stimulated expression of c-fos and c-jun by phorbol-12-myristate-13-acetate and serum were not affected by (AC)₅-GP. These results suggest that the apoptosis effect of (AC)₅-GP on C-6 glioma cells may be mediated partly through the alteration in the expressions of c-myc and bcl-2 genes.

一、前言

山梔子或稱梔子(*Gardenia Fructus*)是茜草科山梔(*Gardenia jasminoides* Ellis)的果實，為中藥的一種，用於治療各種發炎性及肝臟疾病。但此藥的藥理基礎尚不清楚，而我們在以前的研究(1-7)發現它有抑制腫瘤生成的效用。戊乙醯去羧梔子苷(AC)₅-GP的結構式為 1-(β-D-2'-3',4',6'-tetraacetyl glucopyranosyloxyl) - 1,4a,5,7a-tetrahydro-7-(acetomethyl)-cyclopentapyran-4-carboxylic acid methyl ester (Fig.1)，是由山梔子萃取物分離得到 iridoid glycoside 後，再經乙醯化(acetylation)作用而得(8)。先前我們曾報告過(AC)₅GP能抑制培養中(8)及大白鼠身上(9)的C-6神經膠瘤細胞，且(AC)₅-GP也能抑制大白鼠經 aflatoxin B1 所導致的基因毒性(10)。

多種細胞毒殺劑的生化作用方式已被徹底的研究，但對於如何殺死正常和惡性細胞的詳細機轉則是所知有限。最近的研究顯示凋謝死亡(Apoptosis)可能和化學治療藥物如 cisplatin, cytarabine, camptothecin, amsacrine, etoposide 和 teniposide 所導致的細胞死亡有關。已有許多證據顯示抗癌劑的效率與這些抗癌劑對腫瘤細胞造成的凋謝死亡反應的內在特性有關(11-14, 18-20)。凋謝死亡(21)是細胞死亡的一種生理模式，包括細胞

體積減小，細胞核染色質濃縮，核小體內DNA片段的形成，且膜的完整性消失，並產生apoptotic bodies(11,21,22)。凋謝死亡的詳細機轉尚未完全明瞭，目前已知細胞死亡是經由特殊基因的活化(18,23,24)及新蛋白的合成(19,25)，導致細胞的解構。

(AC)5-GP會抑制培養中(8)及大白鼠身上(9)的惡性細胞生長，但正確抗腫瘤作用的機轉仍未完全明瞭。本研究設計特別針對(AC)5-GP是否利用增加細胞毒殺活性，來對抗腫瘤細胞，使它產生凋謝死亡。另外並檢查protooncogenes在本現象所扮演的可能角色。

二、材料和方法

細胞培養

C-6神經膠腫瘤細胞株是利用 N-nitroso-methylurea 來誘發大白鼠產生大腦腫瘤所得到的 (26)。將此細胞株培養在添加 10% fetal calf serum (Gibco) 及抗生素 (100units/ml 的 penicillin 和 100ug/ml 的 streptomycin) 的 minimal essential medium (Gibco)，放在 37°C 含 5% CO₂ 的潮濕環境中培養。所有實驗都使用塑膠的組織培養皿。

(AC)₅-GP 溶液的配製

(AC)₅-GP 的化學結構如圖一所示，(AC)₅-GP 是根據我們以前的方法 (8)，從 Gardenia fructus 分離後，再乙醯化得到的。將 (AC)₅-GP 溶於 DMSO 配成保存液，避光置於 -20°C 備用。使用前再將 (AC)₅-GP 和培養液新鮮配成所需之濃度，對照組則以含 0.02% (v/v) DMSO 的 0.05ml 培養液進行。

細胞毒性的評估

細胞毒性分析是利用MTT比色分析法進行(27)，將細胞(5×10^4 cells/well)接種到12 well-plate (Nunc, Denmark)，並加入0.015-0.45mM的(AC)₅-GP，經37°C，24小時處理後，將所有處理的培養液倒掉，細胞以PBS清洗，然後更換新的培養液，再加20ul MTT(5mg/ml)培養4小時後，細胞數目/dish直接正比於formazon產生的量，可將formazon以isopropanol溶解，就可利用光譜比色計在563nm測定。

形態改變的分析

在100mm培養皿生長的細胞，經0.3mM(AC)₅-GP處理7小時，然後以PBS洗滌，離心倒去上清液後，再加PBS配成懸浮液，以Cyto-Tek細胞離心機(500rpm, 5分鐘)將細胞離心到無菌的玻璃片上，以100%甲醇固定5分鐘，然後在空氣中乾燥，再以Giemsa染色並照相。另外用propidium iodide(PI)染色後，在螢光顯微鏡下觀察。

DNA片段的測定

將細胞養在100mm培養皿，以不同濃度(0.15mM-0.6mM)的 $(AC)_5$ -GP處理6小時後，刮下細胞經800xg於4°C離心10分鐘，收集細胞。DNA分解的情形則利用洋菜膠電泳(15,17)，但做稍許修改。簡而言之，細胞先用含0.5% SDS和100mM的EDTA溶液溶解，加20ug/ml RNase A (Sigma)到細胞溶解液中，經37°C作用1小時後，再加100ug/ml proteinase K於50°C處理3小時。再用 phenol, chloroform 和 isoamylalcohol (25:24:1, v/v) 萃取後，加2倍體積的 alcohol 及0.1倍體積的3M sodium acetate (pH7.2) 於上清液中，並置於-20°C過夜。沉澱物所含的DNA片段再用14700rpm離心30分鐘。從 1×10^6 個細胞抽得的DNA，再用10ul DNase-free RNase在37°C作用1小時後，溶於TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8.0)，就可以1.5%洋菜膠分析結果。

細胞內DNA片段的ELISA

核小體內DNA片段的定量係利用免疫分析法的套組(Boehringer mannheim, GmbH, Germany)

，將在指數期生長的C-6神經膠瘤細胞，與10 μ mol/l的Brdu在37 $^{\circ}$ C培養過夜。經標幟後，接著將細胞在250xg下離心10分鐘，再懸浮於培養液。將細胞濃度調整到1x10⁵ cells/ml，然後取100ul / well 加到 microtiter plate (Nunc, Denmark)，再於每個well分別加入(AC)₅-GP溶液或培養基，最後每個well的體積為200ul。經37 $^{\circ}$ C培養6小時後，以250xg離心10分鐘，再把每個well吸掉上清液100ul，就可以用ELISA來偵測。細胞用含BSA，EDTA和Tween-20的緩衝液在室溫30分鐘加以溶解。用250xg離心10分鐘，取100ul的上清液直接加到precoated plate，在室溫反應90分鐘，清洗後，用微波照射(275Z,650W)5分鐘，使之變性及固定。然後放在-20 $^{\circ}$ C 10分鐘使plate冷卻，再加入anti-Brdu peroxidase conjugated solution，在室溫作用90分鐘。清洗後，加入基質TMB，置於室溫暗處10分鐘，最後在450nm比色。DNA片段含量與O.D.值成正比。

DNA incorporation 之測定

在約2x10⁴ cells/well (Nunc,96well)的單層細胞，加200ul培養液和10ul含0.1 μ Ci/mmol【methyl-³H】-thymidine(ICN, specificity 6.7Ci/mmol)來偵測DNA的合成。經18小時的培養後，將含放射性的培養液除去，以終止細胞攝入

放射性物質；然後用Bellco harvester將細胞收集在 glass filter 上，並加入 scintillating fluid (aquasol-2) 用 Aloka 閃爍計數儀 LSC-900 計算放射活性。測定 ^3H -thymidine 併入細胞中的量即是代表 DNA 的合成，以 dpm/ μg DNA 為單位。DNA 的測定則是採用 West 等人 (28) 的 fluorometric method。

細胞週期的分析

C₆神經膠瘤細胞培養後，加入不同濃度的戊乙醯去羥梔子苷處理 0-24 小時後，以 FACScan (21) (Becton Dickinson Immunocytometry system UK) 做細胞週期分析。細胞先以緩衝液洗滌 2 次，在 400xg 室溫下離心 5 分鐘，除去上清液後，加入 250 μl solution A (trypsin buffer) 與細胞混合均勻，在室溫作用 10 分鐘。再加入 solution B (trypsin 抑制劑及 RNase buffer)，繼續作用 10 分鐘以停止 solution A 的反應。然後以 solution C (propidium iodide stain solution) 在暗處冰上染色 10 分鐘，就可在 flow cytometry 分析。Propidium iodide 可在 488nm 被激發，螢光訊號受到對數放大，就可在 600nm 以上偵測到。結果用細胞數目對 DNA 的含量 (即螢光的強度) 來表示。

免疫轉漬

依據 Santa Cruz Biotechnology (29) 的方法稍作修改來分析 c-myc。將培養的細胞分成以 0.075mM 的 (AC)₅-GP 處理 1、2、3、4、5、6 小時後，分析其 c-myc 蛋白的表現。另外以 0.015-0.45mM 的 (AC)₅-GP 處理細胞 6 小時後，再分析 bcl-2 的表現。首先除去培養液，在室溫中用 PBS 洗滌。再加 0.1 ml 的冰 RIPA buffer，再加入新鮮的 leupeptin (10ug/ml) 和 1mM sodium orthovanadate，然後將細胞刮起來，裝入 eppendorf 內，放在冰上孵育 30 分鐘，並加 5ml 的 PMSF (10 mg/ml)，以 microfuge 在 4°C 離心 7000 RPM，20 分鐘後，將 cell lysate (內含 0.5μg 純化的蛋白質) (30) 和等體積的電泳檢體緩衝液混合均勻，並煮沸加熱 90 秒，在進行 SDS-PAGE 分析後，使用 electroblotting apparatus (Bio-Rad)，將蛋白從膠體轉移到醋酸纖維膜上，再以含 1% 脫脂牛奶和 1% 牛血清白蛋白的 PBS 加到膜上，在室溫作用 30 分鐘，以便將非特異性的結合位置除去，而後加入 1μg/ml 的 c-myc 或 bcl-2 抗體 (Santa Cruz Biotechnology) 到 PBS 中孵育 1 小時，再用 PBS 洗兩次，然後把 horseradish peroxidase conjugate anti - mouse IgG

(Amersham Life Science)用PBS做1:2000稀釋後，一起孵育，然後清洗三次，membrane和Amersham ECL試劑孵育1分鐘，再以ECL hyperfilm在暗室暴露15分鐘。

北方墨點吸漬法

A. DNA探針的製備

c-jun mRNA的DNA探針是從pHJ19質體經限制酵素PstI及EcoRI切取的約1.1kb片段，此段DNA乃是相對於c-jun蛋白的DNA binding region (31,32)。c-fos mRNA的探針則是由pfos-1質體以PstI切取的DNA片段(33)。GAPDH mRNA的DNA探針是由pIBI30質體經PstI切下的1.25kb片段，作為此實驗的internal control (34)。

純化質體DNA的方法是以英國福盟公司出品的QIAGEN plasmid DNA抽取系統。三種質體DNA經上述限制酵素分別切割後，以洋菜膠電泳檢測反應是否完全，再以DEAE cellulose membrane回收DNA片段(35)。

探針的製備是利用Amersham公司出品的Multiprime DNA labeling system製造。經 ^{32}P 標幟的DNA探針的分離是利用gel filtration的原理(36)。

B. Total RNA的抽取及RNA電泳

實驗一：先將 C-6 glioma cells 接種於 100mm 的培養皿中，待細胞長滿後進行 serum starvation 24 小時，加入各種濃度的 (AC)₅-GP，再加入 100ng/ml TPA 處理細胞 60 分鐘後，抽取 c-jun mRNA 或以 TPA 處理細胞 30 分鐘，抽取 c-fos mRNA。

實驗二：C-6 glioma cells 接種於 100mm 的培養皿中，待細胞長滿後加入血清及各種濃度的 (AC)₅-GP，分別處理 0.5 及 2 小時後，抽取 c-jun 及 c-fos mRNA。

以 1.2% 的洋菜膠進行 RNA 電泳 (10X RNA running buffer: 0.2M MOPS, 10mM EDTA, 50 mM sodium acetate pH7.0, 1.2% formaldehyde)。將 RNA 膠體浸泡 50mM NaOH/10mM NaCl 中 30 分鐘，再經 100mM Tris-HCl 中 30 分鐘，以除去 RNA 上的 formaldehyde。剪取與膠體大小相同的硝化纖維紙及 3MM 濾紙，前者以 2X SSC buffer (0.3M NaCl, 0.03M sodium citrate) 浸泡，後者以 20X SSC buffer 浸泡，取適當淺槽，以玻璃片橫架於槽上，剪一片 3MM 濾紙置於支架上，兩端垂下接觸淺槽底部，倒入 20X SSC buffer，令液體蓋過 3MM 濾紙下垂部分，使毛細現象充分進行。在室溫下轉印 24 小時後，以兩張濾紙夾住轉印膜，於 80°C 真空烘烤 2 小時後，保存於乾燥處。

C. 雜交反應

將烘烤好的硝化纖維紙以2X SSC buffer 浸濕，捲入 Hybridization tube 中，加入 prehybridization solution 【6X SSC, 10X Denhart's reagent(50X Denhart's reagent 含 0.1% Ficoll, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinyl pyrrolidone), 0.1% SDS, 50% formamide, 50ug/ml denatured salmon sperm DNA】，經42°C 反應4-24小時，取適量探針於95°C 加熱5分鐘，置於冰上5分鐘，再加入 prehybridization solution 中，繼續於42°C 下反應16-24小時。將 hybridization solution 倒出，依序加入 2X SSC/0.1% SDS；0.5X SSC/0.1% SDS 及 0.1X SSC/0.1% SDS 各於42°C 漂洗20分鐘，直到游離的同位素漂洗乾淨為止。將雜交成功的硝化纖維紙以保鮮膜包好，固定於感光夾中，置入適當大小的X光片，再將感光夾置於-70°C 冰箱，壓片時間則由放射性強弱決定。

三、 結果

(AC)₅-GP對C-6細胞存活率的影響

大部份的抗癌劑的細胞毒性評估，都是先將細胞暴露在藥物中，再用標準的MTT法分析。Fig 2. 顯示用24小時對數期生長的C-6神經膠瘤細胞，給予不同濃度的(AC)₅-GP後，進行MTT分析。結果由survial curve顯示 (AC)₅-GP對此細胞的毒性有 dose-dependent effect。在給予 0.45 mM (AC)₅-GP 24小時後，存活的細胞剩52%。

(AC)₅-GP導致C-6細胞形態的改變

以(AC)₅-GP處理細胞後，在顯微鏡下發現其形態有明顯的改變(Fig 3.)。例如處理7小時後，許多細胞和控制組比較，可見到細胞膜有明顯不規則的外形。此種細胞膜完整性的分解，使人想起"membrane-blebbing"，乃細胞進行Apoptosis的特徵(39)。處理過的細胞有許多出現呈碎片或損傷狀，也有不少細胞有兩個或多個核的存在，且

在外觀上也明顯的大於對照組細胞。所以我們更詳細的研究 $(AC)_5$ -GP導致Apoptosis的可能性。

$(AC)_5$ -GP導致C-6細胞的DNA斷裂

以0.15-0.60mM的 $(AC)_5$ -GP處理C-6細胞6小時，可見核小體內DNA片段化(Fig 4.)。暴露在 ≥ 0.30 mM $(AC)_5$ -GP下會出現180bp或整倍數大小的oligonucleosomal DNA片段的階梯狀(Fig 4. lane 3, 4, 5)。將C-6細胞溶解後，取上清液做片段DNA的定量，以總starting DNA的平均百分比表示(Fig 5.)。DNA片段與ELISA在540nm比色的吸光度成正比關係。Fig 5.顯示C-6細胞在使用 $(AC)_5$ -GP處理後，DNA片段有明顯增加。以上結果顯示DNA片段和 $(AC)_5$ -GP在C-6細胞有dose-dependent effect。

抑制DNA的合成

在不同濃度 $(AC)_5$ -GP暴露3-24小時，對DNA合成的影響見Fig 6.。在不同濃度下增加暴露的時間，DNA的合成被抑制的程度也增加。

(AC)₅-GP導致細胞週期的停止

為研究 (AC)₅-GP 媒介細胞生長的抑制作用，我們測定受 (AC)₅-GP 處理細胞的細胞週期的改變，並分析了其相對 DNA 含量。細胞以 0.15 mM (AC)₅-GP 處理 0、3、9、15 和 24 小時後，以 flow cytometry 加以分析。可見 (AC)₅-GP 導致 G₀/G₁ 期細胞的明顯增加 (Fig 7.)。G₀/G₁ 期細胞的數量和 (AC)₅-GP 的劑量成正比的增加 (Table 1.)。

(AC)₅-GP 對 c-myc 及 bcl-2 蛋白表現的影響

為了探究 c-myc 及 bcl-2 在 (AC)₅-GP 所導致的 Apoptosis 所扮演的角色，所以測試了 (AC)₅-GP 對 c-myc 及 bcl-2 蛋白合成的影響。如 Fig 8. 所示，以 0.45 mM (AC)₅-GP 處理 1-5 小時後，c-myc 的表現逐漸增加。相反的，(AC)₅-GP 處理後 1-6 小時後，bcl-2 的表現卻逐漸降低，此現象也有 dose-dependent 關係 (Fig 9.)。

(AC)₅-GP對stimulated fos/jun表現之影響

以 phorbol-12-myristate(TPA) 或血清來刺激c-fos及c-jun的表現，則完全不受(AC)₅-GP的影響(Fig 10 及 Fig 11)。

四、討論

(AC)₅-GP是從 *Gardenia fructus* 萃取物分離的 glycoside, 再經 acetylation 而得到的(8)。不論是培養的或在大白鼠身上的 C-6 細胞, 在給予 (AC)₅-GP 後, 其生長都有明顯受到抑制的效果(8,9)。就我們所知, 本研究應該是第一個顯示 (AC)₅-GP 在 C-6 神經膠瘤細胞引起的 Apoptosis 之報告。在以前已知它有抗腫瘤的活性(8,9), 雖然其機轉尚未清楚, 但本文顯示 c-myc 的表現增加, 而 bcl-2 的表現降低與 (AC)₅-GP 在早期能使細胞週期的進行受到延遲或停止, 亦即與 C-6 神經膠瘤細胞的 Apoptosis 有關。細胞在 (AC)₅-GP 處理 6 小時後, 有明顯的 DNA 片段產生。目前已知 Apoptosis 的特徵是使細胞的形態和生化特性改變(11,21,22,38), 而由本結果顯示 (AC)₅-GP 也能導致 C-6 神經膠瘤細胞產生的 Apoptosis 等現象。例如染色體的濃縮、細胞膜表面的泡泡狀及 DNA 斷裂成 180bp 的 oligomer 等現象, 皆可利用位相差顯微鏡(Fig 3.)或洋菜膠電泳(Fig 4&5)觀察得到。

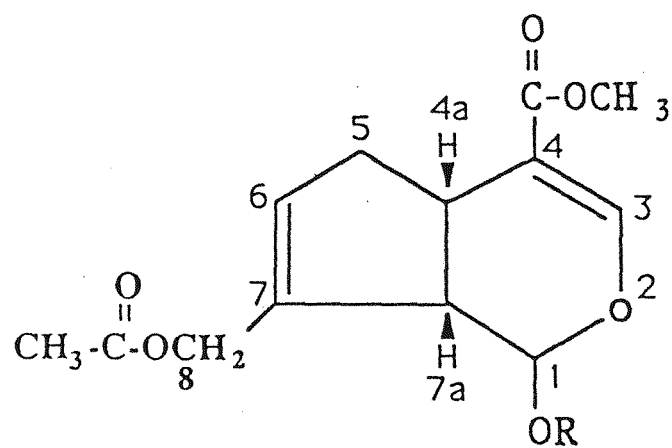
(AC)₅-GP 對 DNA 斷裂的作用與抑制 DNA 的合成有關(Fig 6.), 且使細胞週期停止在 G₀/G₁ 期(Fig 7.)。在本研究中由 (AC)₅-GP 所導致的 Apoptosis 使細胞死亡, 也和 c-myc 的明顯增加及 bcl-2 蛋白的降低表現有關。c-myc 通常參與細胞週期的進行及細胞的轉形, 可被一系列與增殖、分

化及功能活化有關的訊息所快速的活化(39, 40)。最近有人指出表現不受調節的c-myc導致細胞進行Apoptosis，即會使除去血清的大白鼠胚胎纖維芽細胞停止生長(41)。另外用c-myc的anti-mouse oligonucleotide證實可阻止c-myc蛋白的表現，而使T cell hybridomas因活化導致的Apoptosis被抑制了(42)。Oncogene bcl-2的基因產物是一種粒線體內膜蛋白，它可阻止細胞的程式死亡(PCD)(43-45)。而在β白血病細胞有大量bcl-2的表現，會阻止glucocorticoid導致的Apoptosis(46)。最近有人發現轉形的胸腺細胞能穩定的表現bcl-2，導致細胞能對多種藥物產生抗藥性，且導致與Apoptosis有關的核小體內DNA的斷裂(47)。以前也有報告指出表現低濃度bcl-2的細胞，會持續的減低c-myc的表現，可能是造成生長停頓及Apoptosis的原因(48)。無論如何，基因轉移試驗顯示bcl-2會抑制因c-myc導致的Apoptosis(49, 50)。c-myc已被証實在不同情況下，可以加速Apoptosis的速率(40, 51)。c-myc可刺激細胞進行Mitogenesis和Apoptosis，並接著活化bcl-2，致使c-myc對Apoptosis之影響失效，所以c-myc造成增殖的效果，且導致選擇性生長的優點。基於以上之研究報告，可知在腫瘤細胞接受不同藥劑所導致的Apoptosis是經由相似但不同的途徑造成的。

在此，我們知道0.015和0.6mM的(AC)₅-GP會使C-6神經膠瘤細胞的存活率降低，且會使Apoptosis特徵的核小體內DNA碎片的數量增加。

這種細胞死亡和c-myc的增加及bcl-2 oncogene的降低表現有關。我們發現bcl-2在神經膠瘤細胞的表現相對降低，同時伴隨著c-myc的表現增加，所以導致Apoptosis。

本文顯示(AC)₅-GP導致的Apoptosis與c-myc的大量表現和bcl-2 oncogene的降低表現有關，故(AC)₅-GP可能是一種有潛力的抗癌化學治療藥。



R= β -D-2, 3, 4, 6-tetra-acetyl-glucose

Fig. 1. The structure of penta-acetyl geniposide, (AC)₅-GP.

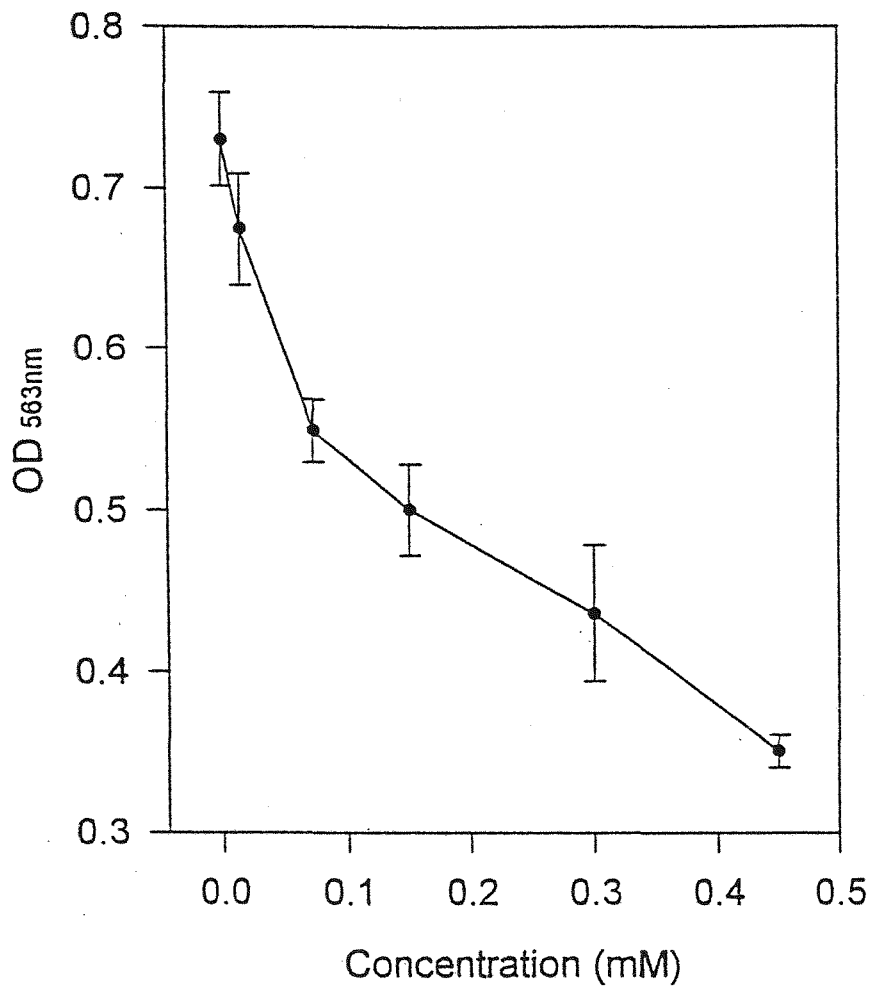


Fig. 2. Dose-response curve of C-6 glioma cells exposed to (AC)₅-GP as determined by the MTT assay. After overnight attachment of cells, the culture was exposed to indicated concentration of (AC)₅-GP for 24 h. the medium was removed and isopropanol was added to dissolve the formazan crystal. The viable cell number is directly proportional to the production of formazan.



Fig. 3. Morphological feature of C-6 glioma cells 9 h after the addition of (AC)5-GP (0.3 mM) showing apoptotic cells (arrow indicated). Cells were viewed with diphot microscope, $\times 400$.

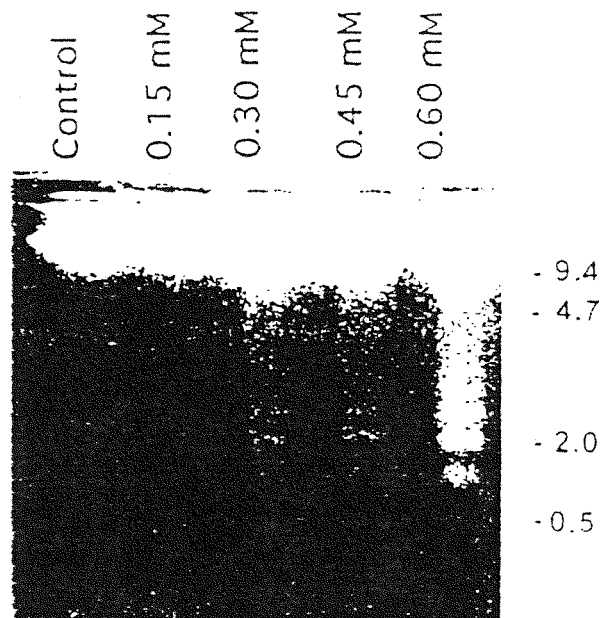


Fig. 4. Agarose gel electrophoretic analysis of the fragmented and intact DNA from (AC)₅-GP-treated and control C-6 glioma cells. Cells were incubated for 6 h in the presence of indicated concentration of (AC)₅-GP.

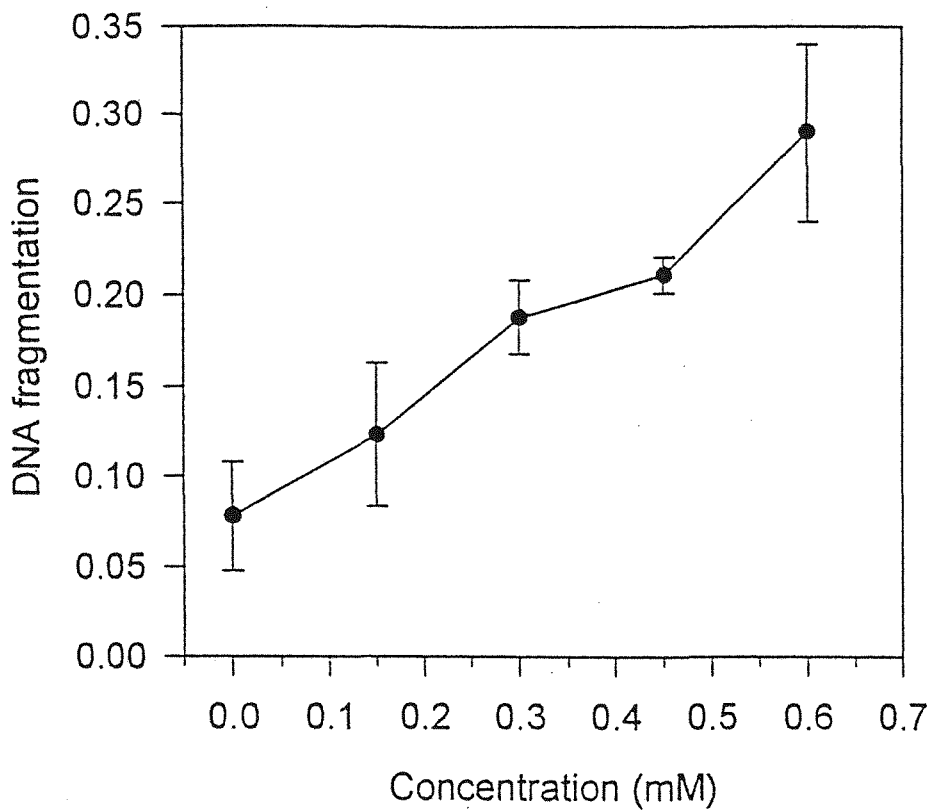


Fig. 5. Dose-response of (AC)₅-GP-induced DNA fragmentation in C-6 glioma cells. Cells were incubated in the presence of indicated concentration of (AC)₅-GP for 6 h. DNA fragmentation is directly proportional to absorbance at 450 nm.

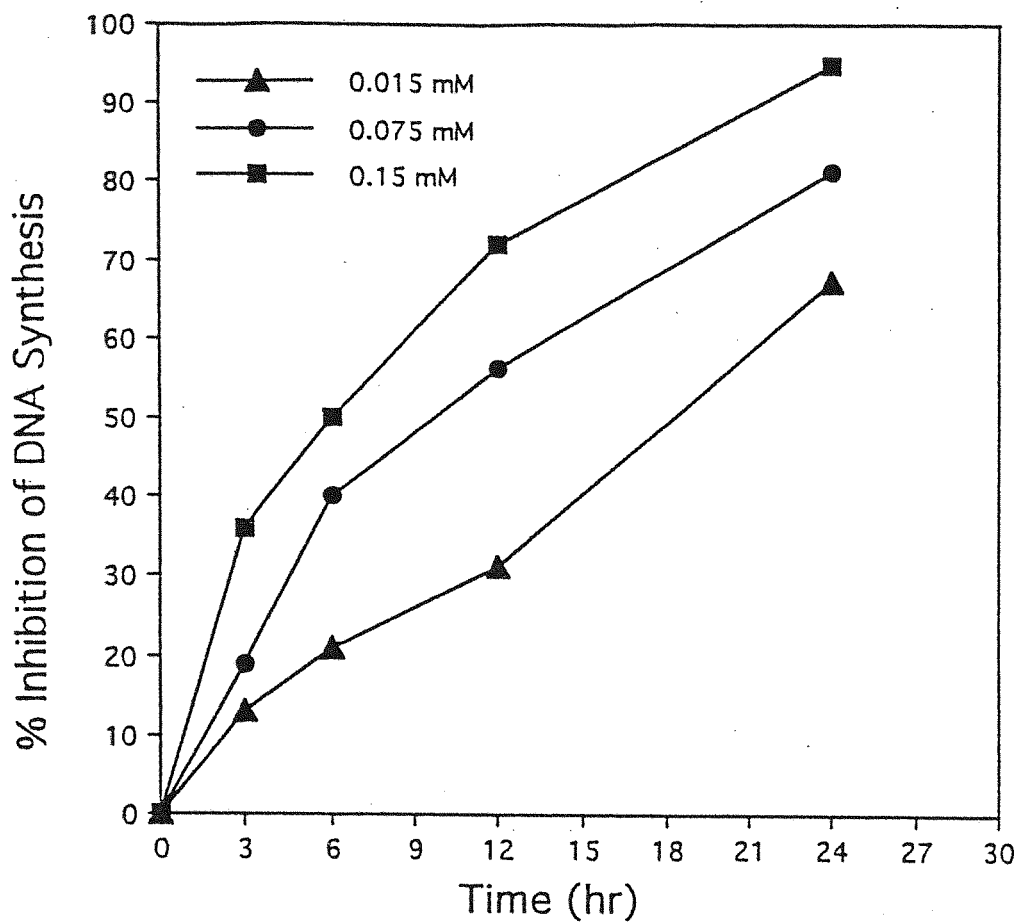


Fig. 6. Inhibitory effect of (AC)5-GP on DNA synthesis in C-6 glioma cells. C-6 cells were incubated with (AC)5-GP for indicated time intervals, then 0.1 mCi of ^3H -thymidine was added to the culture and incubated for an additional 18 h. Incorporation of ^3H -thymidine was expressed as specificity activity of DNA in the control sample for different times ranging between 1.8×10^4 to 3.1×10^4 dpm/mg DNA. Values are the average of triplicate determinations.

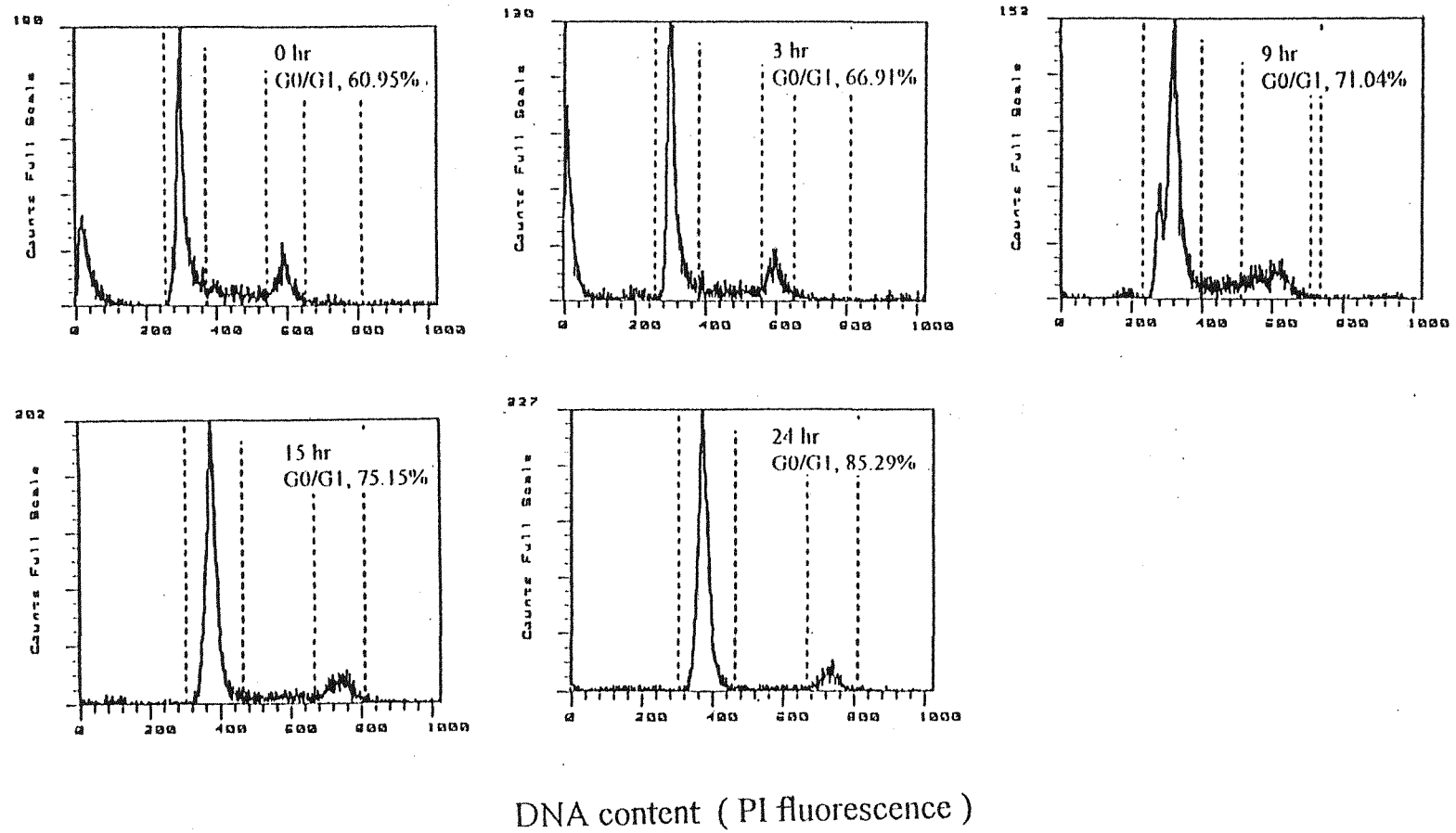


Fig. 7. Flow cytometric DNA fluorescence profiles of C-6 glioma cells incubated with (AC)₅-GP (0.075 mM) in a time-dependent experiment.

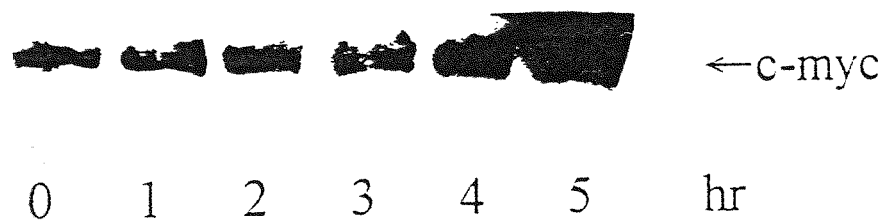


Fig. 8. Time course of (AC)₅-GP treatment on c-myc protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅-GP (0.075 mM) for indicated time. The c-myc protein was analyzed by the immunoblotting.

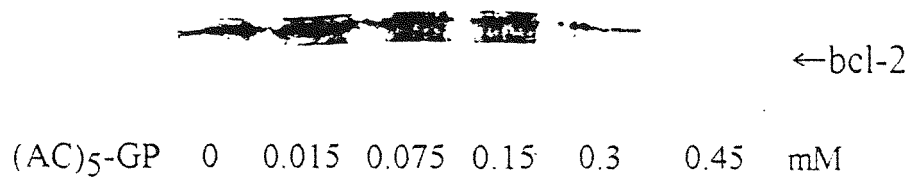


Fig. 9. Effect of (AC)₅-GP on bcl-2 expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅-GP at indicated concentrations for 6 h. The bcl-2 protein was analyzed by the immunoblotting.

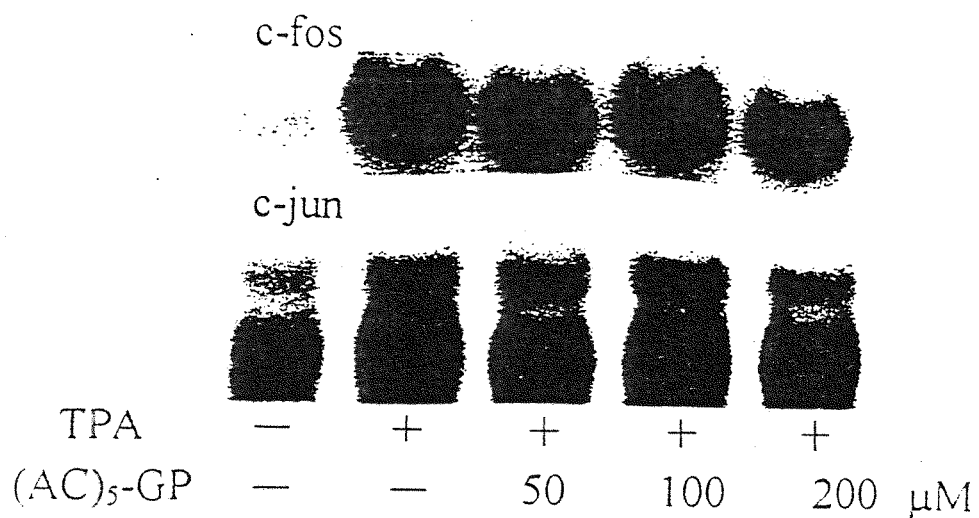


Fig. 10 Effects of (AC)₅-GP on c-fos and c-jun expression in TPA stimulated C-6 glioma cells. Cultured cells were stimulated by TPA (100ng/ml), then treated with (AC)₅-GP at indicated concentrations. The c-fos and c-jun mRNA were analyzed by the Northern blotting.

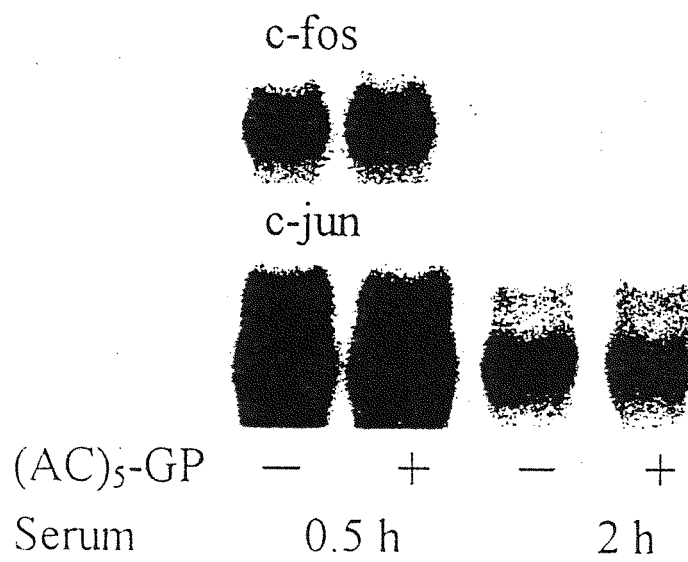


Fig.11 Effects of (AC)₅-GP on c-fos and c-jun mRNA expression in serum- induced C-6 glioma cells.

Table 1 Cell cycle distribution of C-6 glioma cells after treatment with (AC)₅-GP.

(AC) ₅ -GP ^a (mM)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ -M
0	63.13 ^b	25.47	11.40
0.015	64.70	23.11	12.19
0.075	68.91	20.27	10.82
0.150	70.24	17.78	11.98
0.300	74.51	15.18	10.31
0.450	78.11	11.54	10.35

^a Cultured cells were treated with (AC)₅-GP and incubated for 6 h.

^b Data are given as the percentage of the total number of cells. Values are the average of triplicate determinations.

References

1. Lin, J. K. and Wang, C. J. (1986) Protection of crocin dyes on the acute hepatic damage induced by aflatoxin B1 and dimethylnitrosamine in rats. *Carcinogenesis*, 7, 595-599.
2. Wang C. J. and Lin, J. K. (1989) Inhibitory effects of carotenoids and retinoids on the in vitro growth of rat C-6 glioma cells. *Proc. Natl. Sci. Counc. B, ROC*, 13, 176-183.
3. Wang, C. J. and Lin, J. K. (1991) Effect of crocetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA-binding of aflatoxin B1 in the rats. *Carcinogenesis*, 12, 459-462.
4. Wang, C. J., Hsu, J. D. and Lin, J. K. (1991) Suppression of aflatoxin B1-induced hepatotoxic lesions by crocetin (a natural carotenoids). *Carcinogenesis*, 12, 1807-1810.
5. Wang, C. J., Wang, S. W. and Lin, J. K. (1991) Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Lett.*, 60, 95-102.
6. Wang, S. W., Lai, C. Y. and Wang, C. J. (1992) Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B1-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. *Cancer Lett.*, 65, 133-137.
7. Wang, C. J., Lee, M. J., Chang, M. C. and Lin, J. K. (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo(a)pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*, 16, 187-191.
8. Wang, C. J., Tseng, T. H. and Lin, J. K. (1992) Penta-acetyl geniposide : isolation, identification and primary effect on C-6 glioma cells in vitro. *Anticancer Res.*, 12, 911-916.

9. Wang, C. J., Chu, C. Y., Tseng, T. H. and Lin, J. K. (1993) Penta-acetyl geniposide inhibits the growth and development of C-6 glioma cells in rats. *Cancer Lett.*, 70, 113-118.
10. Tseng, T. H., Chu, C. Y. and Wang, C. J. (1992) Inhibition of penta-acetyl geniposide on aflatoxin B1-induced genotoxicity in C3H10T1/2 cells. *Cancer Lett.*, 62, 233-242.
11. Eastman, A. (1990) Activation of programmed cell death by anticancer agents : cisplatin as a model system. *Cancer Cells*, 2, 275-280.
12. Walton, M. I., Whysong, D., O'Connor, P. M., Hockenbery, D., Korsmeyer, S. J. and Kohn, K. W. (1993) Constitutive expression of human bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 53, 1853-1861.
13. Barry, M. A., Reynolds, J. E. and Eastman, A. (1993) Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res.*, 53, 2349-2357.
14. Barry, M. A., Behnke, C. A. and Eastman, A. (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.*, 40, 2353-2362.
15. Ling, Y. H., Priebe, W, and Perez-Soler, R. (1993) Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in p388 parent and multidrug-resistant cell. *Cancer Res.*, 53, 1845-1852.
16. Sorenson, C. M., Barry, M. A. and Eastman, A. (1990) Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 749-755.
17. Gorczyca, W., Gong, J., Ardelt, B., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (1993) The cells cycle related difference in

- susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.*, 53, 3186-3192.
18. Lane, D. P. (1993) A death in the life of p53. *Nature (Lond.)*, 362, 786.
 19. Forbes, J. J., Zaleski, P. D., Giannakis, C. and Cowled, P. A. (1992) Induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol ester. *Exp. Cell Res.*, 198, 367-372.
 20. Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L. and Wyllie, A. H. (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature (Lond.)*, 362, 849-852.
 21. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte. *J. Immunol. Methods*, 139, 271-279.
 22. Evans, D. L. and Dive, C. (1993) Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocyte. *Cancer Res.*, 53, 2133-2139.
 23. Bhalla, K., Ibrado, A. M., Tourkina, E., Tang, C., Grant, S., Huang, Y., Ponnathpur, V. and Mahoney, M. E. (1993) High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood*, 82, 3133-3140.
 24. Wu, F. Y. H., Chang, N. T., Chen, W. J. and Juan, C. C. (1993) Vitamin K3-induced cell cycle arrest and apoptotic cell death are accompanied by altered expression of c-fos and c-myc in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncogene*, 8, 2237-2244.

25. Wei, Y. Q., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. and Uchida, A (1994) Induction of apoptosis by Quercetin : Involvement of heat shock protein. *Cancer Res.*, 54, 4952-4957.
26. Benda, P, Lightabody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161, 370-371.
27. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Metho.*, 65, 55-63.
28. West, D. C., Sattar, A. and Kumar, S. (1985) A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Anal. Biochem.* 39, 289-295.
29. Coleman, W. B., Gricham, J. W. and Smith, G. J. (1994) Morphologic transformation of the C3H10T1/2 cell line is accomopained by altereed expression of the p53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*, 15, 145-152.
30. Bradford, M. M. (1979) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
31. Ausubel, F. M., Breat R., Kingston, R. E., More, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (eds.), (1987) *Current protocols in Molecular Biology*.
32. Bohmann, D., Bos, T. T., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K. and Tjian, R., (1987) Human protooncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structure and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 1238, 1386-1392.
33. Curran, T., (1988) Fos in the oncogene hand book. (Reddy, E. P., et al eds.). Elsevier Science publisher, The Netherland. 307-326.

34. Piechaczyk, M., Blanchard, J. M., Marty, L. Dary, C., Panabiere, F., Sabouty, S., Fort, ph. and Jeanteur, ph., (1984) Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in rat tissue. *Nucleic Acid Res.*, 12, 6851-6853.
35. Sambrook, J., Eritsh, E. F., Maniatis, T., (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
36. Pieter, C., and Nicolatte, S., (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
37. Rozengurt, E., Rodriguez, P. M. and Smita K. K., (1983) Phorbol ester, phospholipase C, and growth factor rapidly stimulate the phosphorylation of Mr. 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cell. *Cell Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 7244-7248.
38. Wyllie, A. H. (1986) What is apoptosis? *Histopathology*, 10, 995-998.
39. Curran, T. and Franza, R. F. Jr. (1988) Fos and Jun : The AP-1 Connection. *Cell*, 55, 395-397.
40. Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D. and Leder, P. (1983) Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35, 603-610.
41. Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. P., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. and Honcock, D. C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69, 119-128.
42. Shi, Y., Glynn, J. M., Guilbert, L. J., Cotter, T. G., Bissonnette, R. P. and Green, D. R. (1992) Role for c-myc in activation-

- induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, 257, 212-214.
43. Korsmeyer, S. J. (1992) Bcl-2 initiates a new category of oncogenes : regulators of cell death. *Blood*, 80, 879-884.
 44. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. and Korsmeyer, S. J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature (Lond.)*, 348, 334-336.
 45. Read, J. C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.*, 124, 1-5.
 46. Alnemri, E. S., Fernandes, T. F., Haldar, S., Croce, C. M. and Litwack, G. (1992) Involvement of bcl-2 in glucocorticoid-induced apoptosis on human pre- β -leukemias. *Cancer Res.*, 52, 491-498.
 47. Miyashita, T. and Reed, J. C. (1992) Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.*, 52, 5407-5412.
 48. Kastan, M. B., Radin, A. Z., Kuerbtiz, S. J., Dnyekwere, O., Wolkor, C. A., Civin, C. Z., Stone, K. P., Woo, T., Ravindranth, Y. and Craig, R. W. (1991) Level of p53 protein increase with maturation in human hemopoietic cells. *Cancer Res.*, 51, 4279-4284.
 49. Bissonnette, R. P., Exheverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R. (1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature (Lond.)* 359, 552-554.

50. Fanidi, A., Harrington, E. A. and Evan, G. I. (1992) Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature (Lond.)*, 359, 554-556.
51. Asken, O. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. and Cleveland, J. C. (1991) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerated apoptosis, *Oncogene*, 6, 1915-1922.

《 授 權 書 》

本人所撰(著)

八十四

學年度第一學期

葉華

私立中山醫學院 學院

研究所 碩 博

士學位論文(論文名稱)

二戊乙醯去羥梳子昔對大白鼠血液細胞及生化成份的影響
C-6神經膠瘤細胞凋謝死亡之機制

之提要

同意

不同意

開放供學術利用。

姓名：林世傑

立書人：地址：台中市南區福南街49巷16號

身分證統一編號：B121020933

聯絡電話：(04)2626805

中華民國

85

年

元

月

27

日