

R
008.8
0403
88

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

PART I

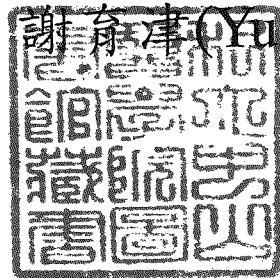
原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 誘發鼠肝
毒性之抑制作用

PART II

Esculetin 抑制癌細胞生長之作用及影響細
胞週期之分子機制探討

指導老師：曾翠華 教授
Advisor : Dr. Tsui-Hwa Tseng

研究生：謝育津 (Yu-Jin Hsieh)



中華民國八十八年七月

July, 1999

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C055236

授權書
(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
八十七學年度第二學期取得理學碩士學位之論文。

論文名稱: Part I 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 誘發鼠肝毒性
之抑制作用
Part II Esculetin 抑制癌細胞生長之機制及影響細胞
週期之分子機制探討

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、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間
與次數，以微縮、光碟或數位或等各種方式重製後散布發行或上載網路。

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，不限地域與時間，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。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名: 曾翠華

研究生簽名: 謝育津 學號: R86214
(親筆正楷)

日期: 民國 88 年 8 月 5 日

簽署人須知

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，請分別在兩種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 www.stic.gov.tw，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 www.ncl.edu.tw。
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，授權人尚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，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。
3. 全國博碩士論文全文資料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。

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：

台灣大學醫學院
生物化學研究所教授

林仁混 教授

林仁混

私立中山醫學院
生物化學研究所教授

王朝鐘 教授

王朝鐘

私立中山醫學院
生物化學研究所教授
(本論文指導教授)

曾翠華 教授

曾翠華

中華民國八十八年七月

學生謝育津論文題目為：

Part I

原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 誘發鼠
肝毒性之抑制作用

Part II

Esculetin 抑制癌細胞生長之機制及影響細
胞週期之分子機制探討

其論文已經私立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，並經由其指導教授核閱後無誤。

指導老師：曾翠華 教授

簽名：曾翠華

中華民國八十八年七月

誌謝

感謝啟蒙恩師曾翠華教授對本論文之指導，使本論文得以此結果呈現在大家面前；論文完成之初，承蒙口試委員王朝鐘博士、林仁混博士之細心斧正及提供之寶貴建議，再此深表感激。

本論文的完成，由衷感謝林偉隆醫師、劉春蘭老師在病理切片上的指導和協助，胡超群老師不厭其煩的問題討論，以及育英學姊在實驗上的指導和滄澤學弟對於動物實驗的鼎力相助，另外感謝王俊民學長在實驗上的幫忙，還有黃俊銘老師、李妙真老師、曉薇、煥昌、韋如、岑彥、妙如、春蘭、雪君、琬琪在生活上的彼此幫忙；此外也要感謝那些拋頭顱、灑熱血的老鼠們-----阿彌陀佛。

最後感謝父母對我的栽培和家人在生活上的照顧，並由衷感激寬志陪我走過七年的歲月，尤其是生活上無微不至的照顧。

僅將此論文獻給我的家人、寬志及在天上的奶奶，願您們分享這階段性的成果。

謝育津 敬誌

中華民國八十八年七月

縮寫表

PART I 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 誘發鼠肝毒性之抑制作用

Protocatechuic acid : PCA

lipopolysaccharide : LPS

malondialdehyde : MDA

alanine aminotransferase : ALT

aspartate aminotransferase : AST

o-phthalaldehyde : OPT

PART II Esculetin 抑制癌細胞生長之作用及影響細胞週期之分子機制
探討

Cyclin-dependent kinase : Cdk

PART I 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 誘發鼠肝毒性之抑制作用

| | 頁數 |
|-----------------|----|
| 中文摘要..... | 3 |
| 英文摘要..... | 4 |
| 緒論..... | 5 |
| 研究目的..... | 7 |
| 材料與方法..... | 8 |
| 結果..... | 16 |
| 討論..... | 19 |
| 參考資料..... | 22 |
| 附圖 | |
| Table 1..... | 26 |
| Figure 1..... | 27 |
| Table 2..... | 28 |
| Table 3..... | 29 |
| Table 4..... | 30 |
| Table 5..... | 31 |
| Figure 2..... | 32 |
| Figure 3..... | 33 |
| Figure 4..... | 34 |
| Figure 5..... | 35 |
| Figure 6-1..... | 36 |
| Figure 6-2..... | 37 |
| Figure 7..... | 38 |
| Figure 8..... | 40 |

目錄

PART II Esculetin 抑制癌細胞生長之作用及影響細胞週期分子機制探討

| | 頁數 |
|-----------|----|
| 中文摘要 | 42 |
| 英文摘要 | 43 |
| 緒論 | 44 |
| 研究目的 | 48 |
| 材料與方法 | 49 |
| 結果 | 54 |
| 討論 | 59 |
| 參考資料 | 62 |
| 附圖 | |
| Figure 1 | 68 |
| Figure 2 | 69 |
| Figure 3 | 70 |
| Figure 4 | 71 |
| Figure 5 | 72 |
| Figure 6 | 73 |
| Figure 7 | 74 |
| Figure 8 | 75 |
| Figure 9 | 76 |
| Figure 10 | 77 |
| Figure 11 | 78 |
| Figure 12 | 79 |
| Figure 13 | 80 |
| Figure 14 | 81 |
| Figure 15 | 82 |
| Figure 16 | 83 |
| Figure 17 | 84 |
| Figure 18 | 85 |
| Figure 19 | 86 |
| Figure 20 | 87 |
| Figure 21 | 88 |
| Figure 22 | 89 |
| Figure 23 | 90 |
| Figure 24 | 91 |

Part I

原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 誘發鼠
肝毒性之抑制作用

中文摘要

原兒茶酸(protocatechuic acid : PCA)廣佈於蔬菜、水果、花和胡桃中，乃一結構簡單的多酚類化合物。過去本研究室從中國傳統藥物亦是台灣普受歡迎的洛神花茶中分離出此化合物，並分析其具有抗氧化及抗癌化之生物活性。由實驗中發現腹腔注射 5mg/kg 的 LPS 6 小時後，可誘發血清肝功能指標 AST、ALT 生化值的升高，肝組織 GSH 的減少，NO 的大量生成，iNOS 活性及蛋白表現量的增加，轉錄因子 NF κ B 的活化及肝組織之病變，然對膜的脂質過氧化物 MDA 及抗氧化酵素 catalase、GSH peroxidase 則無意義之影響。而預先口服 5 天高劑量 (75mg/kg) 的原兒茶酸則能有效抑制 LPS 所誘發的肝毒性。

Abstract

A simple phenolic compound, protocatechuic acid, is ubiquitous in edible vegetables, fruits and nuts. In our previous study, protocatechuic acid (PCA) possessing antioxidant property and anticarcinogenic potentials was isolated from Chinese traditional herbs and beverage material in local region (Taiwan). In this experiment, we found that lipopolysaccharide (5mg/kg LPS i.p. for 6 hrs) significantly increased the serum hepatic enzyme markers (AST and ALT), serum total nitrite and iNOS activity in rats. In addition, LPS significantly decreased GSH, activated iNOS and NF- κ B of liver and enhanced liver lesion including liver cell congestion, necrosis and cellular infiltration of inflammatory leukocyte. However, the group of pretreatment 75mg/kg protocatechuic acid for five days effectively inhibited LPS-induced hepatotoxicity. So, we concluded that PCA may play a role in endotoxin-induced liver damage.

緒論

原兒茶酸(protocatechuic acid : PCA)廣布於蔬菜、水果和胡桃中，是從中國傳統藥物 *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae)中所分離出來的，乃一結構簡單的多酚類化合物，在中醫上用來解熱及治療高血壓、肝疾病。雖然對於其藥理及生化效應並不清楚，但是已有報告指出原兒茶酸具有很強的抗氧化能力(1)，而且本實驗室過去在洛神花(*Hibiscus sabdariffa* L.)成分及活性分析中亦發現：原兒茶酸具有清除自由基的能力，對於 t-BHP 引起的鼠肝細胞毒性具有保護作用(2)。此外本實驗室也發現原兒茶酸可抑制 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)誘發 female CD-1 mice 皮膚癌於 promotion phase(3)。另有許多研究指出原兒茶酸對於 diethylnitrosamine(DEN) 引起的肝癌(4)、4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQQ)引起的口腔癌(5)、azoxymethane 引起的結腸癌(6)、N-methyl-N-nitrosourea 引起的胃癌(7)及 N-butyl-N-(4hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 引起的膀胱癌(8)皆具有抑制作用。

近年來慢性發炎或感染被認為是癌症發生的原因之一(9)，而一氧化氮(NO)在發炎和多步驟致癌過程中扮演重要角色(10)；NO 是一種含自由基的小分子，在身體裡很容易與超氧陰離子產生對細胞具有毒性的 NO 衍生物(如 peroxynitrite)，或是分解成有毒的氫氧自由基(hydroxy radical ; OH⁻)和 nitrogen dioxide(NO₂[·])(11)，造成 DNA 傷害，且 NO 也可和 heme 及 non-heme iron 作用；1991 年 Radi 等(12)指出 NO 及其衍生物(peroxynitrite)可和蛋白質的 thio group 及 glutathione 結合形成 nitrosothios，進而誘發膜脂質過氧化；由過去報告知 NO 是血管擴張因子(13)、是神經的重要傳遞物質(14)並參與身體免疫反應，有其重要的生理功能，然 NO 及其衍生物不正常生成或大量積聚時則會侵犯胞器造成功能缺失、基因突變等傷害(15)。

Lipopolysaccharide(LPS : endotoxin)是革蘭氏陰性菌細胞壁的成分(16)，有研究指出將 LPS 注射入實驗動物體內，可誘發生物體產生一連串的病理解及生理效應，例如使淋巴球變性，巨噬細胞、嗜中性球和庫氏細胞的活化，補體和血液凝固路徑的啟動(17、18)，而臨床上也發現受細菌內毒素感染的病人，可導致敗血性休克和多重器官衰竭(19)。過去 Sugino 等人研究發現，LPS 主要堆積在富含網狀內皮組織的肝、脾臟器中(20)；1982 年 Nathan 等人(21)指出 LPS 可刺激巨噬細胞產生活性氧系(reactive oxygen intermediates ; ROI)，如：單氧(singlet oxygen ; O_2)、一氧化氮(nitric oxide ; NO)、過氧化氫(hydrogen peroxide ; H_2O_2)、超氧陰離子(superoxide anion ; O_2^-)、氫氧自由基(hydroxyl radical ; OH)，而這些氧自由基被認為和生物體的氧化損傷有關，能對肝細胞造成明顯的脂質過氧化，故能使脂質過氧化物 malondialdehyde(MDA)的濃度大為增加(22)，並急速提高 alanine aminotransferase (ALT)及 aspartate aminotransferase(AST)等酵素的釋放量；除此，LPS 誘發細胞的氧化損傷還可改變細胞內 prooxidant 及 antioxidant 之間的平衡，細胞中含有許多抗氧化物質，其中最重要的 endogenous antioxidant 是 GSH，在肝臟中含量豐富(23)；其它還有 catalase、glutathione peroxidase(GP)、superoxide dismutase(SOD)等抗氧化酵素。通常這些抗氧化酵素可保護細胞免於氧自由基所造成的傷害(24)。所以，本實驗利用 LPS 誘發脂質過氧化及酵素滲漏，可作為評估實驗材料是否具有抗氧化作用和抗肝毒活性的良好模式。

截至目前為止，PCA 對於發炎因子造成鼠肝(in vivo)毒性的保護作用機制尚不清楚，所以本研究以 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠為實驗材料，觀察 PCA 對 LPS 誘發大量 NO 所造成的肝細胞毒性是否具有抑制作用，並測定老鼠血清 ALT、AST 等生化值作為肝毒性指標。

研究目的

本研究擬以 LPS 誘發肝組織脂質過氧化及大量 NO 生成，探討原兒茶酸(PCA) 對於 LPS 造成的肝細胞毒性是否具有抑制作用。首先測定 AST、ALT 的生化值，作為肝細胞毒性的指標，再分析脂質過氧化物 malondialdehyde (MDA)的濃度及細胞內抗氧化系統，如 GSH、catalase 及 GSH peroxidase 等抗氧化酵素的活性，並觀察肝組織之形態變化，進一步測定 NO 含量、iNOS 活性、iNOS 蛋白表現量及轉譯因子 NF κ B 的影響，探討原兒茶酸對於 LPS 造成的肝細胞毒性是否具有抑制作用，以助供臨床上防治肝炎及肝癌之參考。

材料與方法

(一)化學試劑及使用儀器

1.化學試劑

1,1,3,3-tetramethoxypropane 、 phosphotungstic acid 、 Flanine adenodiaminase(FAD) 、 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(β -NADPH) 、 sodium pyruvate 、 o-phthalaldehyde (OPT) 、 glutathione oxidized form 、 glutathione reduced form 、 glutathione reductase 、 lactate dehydrogenase(LDH) 、 lipopolysaccharide 、 antipain 、 protocatechuic acid 、 dithiothreitol 、 chymostatin 、 nitrate reductase 、 Tris-HCl 、 mercaptoethanol 、 leupeptin 、 N-1- naphthylethylenediamine 、 TBA(thiobarbituric acid) 、 L-arginine 、 NEM ， 以上皆購自美國 sigma 公司 ； sodium nitrite 、 sodium phosphate 、 EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid) 、 SDS 、 methanol(MERCK) 、 sodium hydroxide 、 n-butanol (MERCK) 、 hydrogen chloride 、 10% formalin 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 glacial acetic acid 、 sodium hydroxyoxide 、 NaN_3 、 hydrogen peroxide(H_2O_2) 、 sulfanilamide 、 zinc sulfate (ZnSO_4) 、 HEPES 、 protein assay kit (Bio Rad) 。

2.儀器

- UV and Visible Spectrophotometer(HITACHI ; U2000)
- Fluorescence Spectrophotometer(HITACHI ; F2000)
- 倒立式相位差顯微鏡 Diaphot 300 (Nicon)
- Homogenizer(EYRLAMAZELA Z)
- Microcentrifuge(Shelton , VS 15)

(二) 實驗方法

一. 動物來源

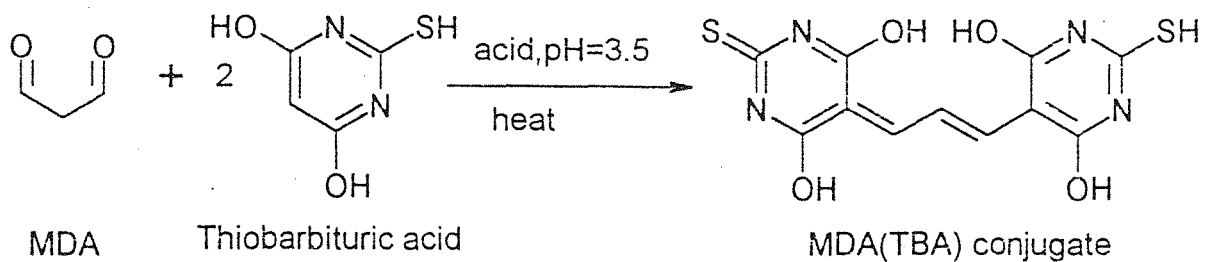
Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230±20g)購自台中榮民總醫院，實驗前至少飼養於動物房一週，使其適應環境；在動物房中，以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制飲用，並維持在日夜 12 小時循環中。

二. 動物分組及藥物處理

將 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230±20g)分成 6 組，每組 10 隻，其中 Group 1 為 normal 組，僅給予蒸餾水；Group 2 為溶劑控制組，僅給予 1% DMSO 溶液；Group 3 則僅給予 PCA(75mg/kg)，以上三組以胃管連續灌食五天，每次 2ml；Group 4 以 i.p.注射 LPS(5mg/kg)；Group 5 及 Group 6 則以胃管連續灌食 25mg/kg 和 75mg/kg 的 PCA 五天，第五天灌食後，隔一小時以 i.p.注射 LPS(5mg/kg)；LPS 注射後 6 小時，將老鼠斷頸，取其血液及肝臟。

三. Thiobarbituric acid (TBA)method

肝細胞脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法(25)，藉由 Thiobarbituric acid 來測定 malondialdehyde (MDA)的生成濃度。其測定原理為：



實驗方法：取 0.5g 肝臟，加入 3ml ice-cold 0.05M phosphate buffer(PH7.4)，然後以 polytron-like stirrer 研磨。取少部份研磨液作蛋白質定量(protein assay kit/BIO-RAD)，其餘加入 7% SDS、0.1N HCl、10% phosphotungstic acid 及 0.67% TBA 之後，避光 95°C 加熱 1 小時，冷卻後，加入 5ml n-butanol 萃取，再以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液測定螢光強度 (Ex/Em_{515/553nm})。以 1,1,3,3-tetramethoxypropane 當作 standard。

四. Glutathione Test ---(26)

(1)組織液之製備

取 0.25g 肝細胞，加入 1ml 10% metaphosphoric acid 及 3.75ml 0.1M Na₂HPO₄ 和 0.005M EDTA (PH8.0) 緩衝液，以 polytron-like stirrer 研磨後，經 39800 rpm 90 分鐘離心取上清液。

(2)還原態 glutathione 之測定

取 0.5ml 上清液，加入 4.5ml phosphate-EDTA 緩衝液 (0.1M Na₂HPO₄、0.005M EDTA，PH8.0) 稀釋後，取出 100μl，加入 0.9ml phosphate-EDTA 緩衝液與 100μl o-phthalaldehyde(1mg/ml) 充份混合後，在室溫避光反應 15 分鐘，以螢光分光光度儀於 Ex/Em_{350/420nm} 下測定。

(3)氧化態 glutathione 之測定

取 0.5ml 上清液，加入 0.4ml NEM (避免 GSH 氧化成 GSSG)，在室溫反應 20~30 分鐘後，取出 100μl，加入 0.9ml NaOH(PH12.0) 與 100μl OPT(1mg/ml) 充份混合後，在室溫避光反應 15 分鐘，以螢光分光光度儀於 Ex/Em_{350/420nm} 下測定。

五. Nitrate Test ---(27)



取 50 μ l 血清加入 110 μ l 100 μ M NADPH、10 μ M FAD 混合液及 40 μ l nitrate reductase，於 37 $^{\circ}$ C 避光反應 30 分鐘後，再加入 20 μ l 120mg/l LDH 和 20 μ l 120mM sodium pyruvate，37 $^{\circ}$ C 避光反應 5 分鐘後，加入 360 μ l 75mg/ml ZnSO₄ 充份混合後，以 2450rpm 離心 15 分鐘，取 500 μ l 上清液與 500 μ l Griess reagent 於室溫下反應 10 分鐘，再以分光光度計測定(波長 540nm)。

※ Griess reagent : sulfanilamide(1g/L) 和 N-1-naphthyl-ethylenediamine (0.1g/L)個別溶於 H₃PO₄(25g/L)中。

→使用前才以 1:1 混合

六. Nitric Oxide Synthase activity assay

本法係參考文獻(28)修飾而得。取 0.25g 肝臟，加入 3ml 20mM Tris-HCl 及 2mM EDTA 緩衝液(PH7.8)，經均質化後，在 4 $^{\circ}$ C 狀態下，以 21000 \times g 離心 20 分鐘；取 25 μ l 上清液作蛋白質定量，另取 50 μ l 上清液加入 100 μ l 50mM HEPES-2mM NADPH-10mM L-arginine 混合液，於 37 $^{\circ}$ C 水浴中避光反應 3 小時，其餘步驟同 Nitrate test。

七. Catalase activity assay(29)

取 0.25g 肝臟，加入 2ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M potassium phosphate、0.1mM EDTA，PH7.0)，經 polytron-like stirrer 研磨後，於 4 $^{\circ}$ C 狀態下，以 39000 rpm 離心 30 分鐘，取 50 μ l 上清液加入 1ml 0.1M Tris-HCl(PH7.2)，另一管取 2ml 30mM H₂O₂，分別在 30 $^{\circ}$ C 水浴中反應 1 分鐘後，立刻混合，於 240nm 波長下測其吸光值變化。

八. GSH Peroxidase activity assay(30)

取 0.25g 肝臟，加入 2ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M potassium phosphate、0.1mM EDTA，PH7.0)，經 polytron-like stirrer 研磨後，於 4°C 狀態下，以 39000 rpm 離心 30 分鐘，取 100 μ l 上清液加入 2.2ml 0.1M Tris-HCl(PH7.2)、100 μ l 0.113M NaN₃、100 μ l 30mM GSH 及 100 μ l 6mM NADPH，充分混合後，再加入 50 μ l 5IU GSH-reductase，於 37°C 水浴中反應 5 分鐘，接著立刻加入 100 μ l 30mM H₂O₂，於 340nm 下掃描 3 分鐘，測定其吸光值之變化。

九. 肝組織病理切片觀察

將老鼠斷頸後，取約 2cm×2cm 的肝臟，置於 10% 福馬林中固定，然後作蘇木紫&伊紅(Hematoxylin&Eosin)染色，觀察肝組織有無病變。其染色步驟如下：

1. 脫臘後，以蘇木紫(hematoxylin)溶液染 2~15 分鐘。
2. 以水浸洗。
3. 以 0.5% 鹽酸溶液分辨染色色度，約 1~5 秒。
4. 浸入氫水中(1000ml 的水滴入氫水兩滴)，直至組織呈現藍色。
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. 依次以 80%、90%、95%酒精浸洗
8. 依次移入 100%酒精、二甲苯(1：1)、二甲苯-木餾油(4：1)、二甲苯(I)、二甲苯(II)中各半分鐘。
9. 以二甲苯使之透明
10. 封片。
11. 以顯微鏡觀察。

十. 免疫組織化學染色

1. 將包埋在蠟中的組織切片置入已預熱至 56°C 的烘箱中脫蠟。
2. 將已加熱的切片依照順序移至純的二甲苯、絕對酒精、95%酒精中各五分鐘。
3. 將切片以二次水沖洗十分鐘。
4. 將切片移至 0.05M Tris buffer[(PH7.8)內含 0.15M NaCl 及 0.1% Triton X-100]中五分鐘。
5. 將已脫蠟完全的切片移至煮沸中的 citrite buffer，再繼續煮五分鐘。
6. 待玻片自動降溫至室溫。
7. 將玻片取出，以二次水沖洗。
8. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
9. 用 3%的 H₂O₂ 沖洗五至十分鐘。
10. 將玻片取出，以二次水沖洗。
11. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
12. 在玻片上加入一級抗體(iNOS、ERK、PY20)反應 20 至 40 分鐘。
13. 將玻片取出，以二次水沖洗。
14. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
15. 在玻片上加入二級抗體反應 30 分鐘。
16. 將玻片取出，以二次水沖洗。
17. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
18. 在玻片上加入 biotin ligand 反應 30 分鐘。
19. 將玻片取出，以二次水沖洗。
20. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
21. 加入 DAB 呈色劑在室溫下反應五分鐘。
22. 以二次水沖洗五分鐘。
23. 加入 hematoxylin 染背景，但染色時間不超過 1 分鐘。
24. 以二次水沖洗五分鐘。

25. 將已染色之玻片置於 95%酒精中。
26. 將玻片置於絕對酒精五分鐘以脫水。
27. 將玻片滴上 xylene。
28. 以封片膠封片。
29. 顯微鏡觀察

十一. iNOS immunoblotting

本實驗係參考 Nagasaki 氏(31)等之方法。取 0.25g 肝臟，加入 2.7ml 20mM HEPES(PH7.4)緩衝液(內含 1mM dithiothreitol、50 μ M antipain、50 μ M leupeptin、50 μ M chymostatin 和 50 μ M pepstatin)，經均質化後，於 4°C、25000 \times g 離心 30 分鐘，然後取上清液作蛋白質定量。

取約 80 μ g 蛋白質與 loading buffer(3ml distilled water、1ml 0.5M Tris-HCl(PH6.8)、1.6ml glycerol、1.6ml 10% SDS、0.4ml β -mercaptoethanol、0.4ml 0.5% bromophenol blue)以 1:1 比例混合，於 95°C 加熱 10 分鐘，然後放入冰浴中冷卻，再以小型離心機 spin down。接著將 sample 放入 well 內，以上層膠 70V，下層膠 120V 跑電泳；待電泳結束後，進行 transfer 以 nitrocellulose membrane 轉印，接著再以含 5%脫脂奶粉的 TBS buffer(10mM Tris、150mM NaCl、0.05% Tween-20, PH8.0)blocking 30 分鐘，wash 乾淨後，將 NC paper 置於 1 級抗體中反應 overnight(4°C)，之後以含 tween-20 之 TBS 洗三次，再以 Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody 反應 40~60 分鐘，再以含 tween-20 之 TBS 洗三次，最後加入 Amersham ECL reagents kit 反應，於暗房以 Kodak film 曝光 1~10 分鐘，以顯影劑及定影劑沖片觀察。

十二. Nuclear extraction(32)

1. 取 0.25g 肝臟加入 1ml PBS(PH7.4)
2. 以 polytron-like stirrer 研磨
3. 1500×g 離心 5 分鐘
4. pellet 加入 500μl ice-cold lysis buffer(10mM HEPES, PH7.9 ; 10mM KCl ; 0.1mM EDTA ; 0.1mM EGTA ; 1mM DTT ; 0.5mM PMSF ; proteinase inhibitor : 2μg/ml leupeptin 、 2μg/ml aoptinin 、 0.03mM sodium orthovanadate)
5. 置於冰上作用 15 分鐘
6. 加入 10% NP-40 , 劇烈震盪 10 秒鐘
7. 10000 rpm 離心 10 分鐘
8. 取 supernatants → cytosol
9. pellet 加入 ice-cold nuclear extraction buffer(20mM HEPES PH7.9 ; 400mM NaCl ; 0.1mM EDTA ; 0.1mM EGTA ; 1mM DTT ; 1mM PMSF ; proteinase inhibitor : 2μg/ml leupeptin 、 2μg/ml aoptinin 、 0.03mM sodium orthovanadate)
10. 置於冰上作用 30 分鐘(隨時拿起來搖晃)
11. 12000×g 離心 15 分鐘
12. supernatant → nuclear extracts

結果

1. 原兒茶酸對於 LPS 所誘發之肝細胞毒性的影響。

如圖 1 所示，原兒茶酸能顯著的抑制由 lipopolysaccharide 所誘導鼠肝細胞滲漏之 AST 和 ALT 生化值的升高，當以 75mg/kg 的原兒茶酸前處理時，分別降低 AST 約 50%($P<0.05$)、ALT 約 80%($P<0.05$)。

2. 原兒茶酸對於 LPS 所誘發之脂質過氧化的影響。

以 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，如 Table 2 所示，發現以 LPS (5mg/kg)處理 6 小時，鼠肝組織 MDA 濃度並未增加(和正常組比較)，而以原兒茶酸處理後，MDA 濃度亦無顯著改變。

3. 原兒茶酸對於 LPS 誘發肝組織 GSH 氧化酵素變化之影響。

如 Table 3 所示，LPS 會抑制肝細胞中還原態 glutathione 的含量。由 Table 4、5 知 LPS 可代償性微微提高 catalase 及 GSH peroxidase 的活性，而預處理原兒茶酸並無明顯改變 catalase 和 GSH peroxidase 的活性，顯示 LPS(5mg/kg)處理 6 小時所誘發之細胞傷害與細胞內氧化/還原狀態之平衡與否有關，但與 catalase 及 GSH peroxidase 等抗氧化酵素關係不大，而若以原兒茶酸前處理，則可提高還原態 glutathione 的值，故其詳細機制有待進一步探討。

4. 原兒茶酸對於 LPS 所誘發之 nitric oxide 的抑制作用。

如圖 2 所示，LPS 可刺激 nitric oxide 顯著增加，而以原兒茶酸前處理之老鼠，可有效抑制 nitric oxide 的升高，並具有劑量依存性的關係。

5.原兒茶酸對於 LPS 所誘發之 nitric oxide synthase activity 的抑制作用。

L-arginine 可經由 nitric oxide synthase 合成 NO，而 NO 非常不穩定很快就代謝成 nitrite 和 nitrate(33)，由圖 3 知 LPS 可刺激 nitric oxide synthase 的活性增加，但若以原兒茶酸前處理，則有效抑制 nitric oxide synthase 的活性，並具有劑量依存性的關係。

6. 原兒茶酸對於 LPS 所誘發之 nitric oxide synthase 的抑制作用。

由圖 4 知 LPS 可刺激 nitric oxide synthase 蛋白表現量增加，而以低濃度(25mg/kg)原兒茶酸前處理，可抑制 nitric oxide synthase 的蛋白表現量(約 50%)，若以高濃度(75mg/kg)原兒茶酸前處理，則完全抑制 nitric oxide synthase 的蛋白表現。

7. 原兒茶酸對於 LPS 所誘發之 NF κ B 的抑制作用。

有研究指出 LPS 誘發活性氧系(ROI)的產生所導致細胞之氧化損傷，會促使 NF κ B 活化(34)；另有研究報告，細胞內之氧化/還原狀態會影響 NF κ B 的活化，當細胞中的 GSH 減少，會促使 NF κ B 活化，進而活化下游 target gene 的表現(35)。由 Table 3 知，以 LPS (5mg/kg)處理 6 小時，會使細胞內的 GSH 減少(和正常組比較； $P < 0.001$)，根據之前研究想進一步探討 LPS 誘發肝細胞的損傷是否和 NF κ B 有關。由圖 5 知 LPS 可刺激 NF κ B 活化，而以原兒茶酸前處理之老鼠，可有效抑制 NF κ B 的活化。

8. 利用病理切片觀察原兒茶酸對於 LPS 所誘發之肝組織病變的抑制作用。

由圖 6 之病理切片：單獨以 LPS 處理老鼠，可看到肝組織有充血、壞死、多型核白血球浸潤及細胞排列不規則等現象，但若以高濃度 (75mg/kg) 原兒茶酸前處理，則可有效抑制。

9. 利用免疫組織化學染色觀察原兒茶酸對於 lipopoly-saccharide 所誘發之 iNOS 的抑制作用。

由圖 7 知，LPS 可刺激 iNOS 蛋白的表現(呈棕色部份)，而以高濃度原兒茶酸前處理，則可抑制其表現。

10. 利用免疫組織化學染色觀察原兒茶酸對於 LPS 所誘發之 PY-20 (Phospho-tyrosine 20) 蛋白的抑制作用。

之前有研究指出，protein tyrosine kinase inhibitor 可抑制 LPS 所誘發 NO 的大量生成及 iNOS mRNA 的表現(36)，另 Michael(37) 等提到 protein tyrosine phosphorylation 會促使 NF κ B 活化，故以免疫組織化學染色觀察 PY-20 的表現。由圖 8 知，LPS 可刺激 PY-20 蛋白的表現(呈棕色部份)，而以高濃度原兒茶酸前處理，則可抑制其表現。

討論

本實驗擬以 LPS 誘發脂質過氧化及 NO 的大量增加，評估 PCA 是否具有抗發炎作用和抗肝毒性活性。

細菌內毒素 LPS 可引起敗血性休克和多重器官的衰竭，導致生物體死亡(19)，而以原兒茶酸前處理之老鼠可增加其生存率(Table 1)；根據過去報告(22) LPS 可造成肝細胞的脂質過氧化，使脂質過氧化物 MDA 的濃度大量增加，但由 Table 2 發現：以 LPS(5mg/kg) 處理老鼠 6 小時後，取肝細胞測 MDA 濃度，和正常組及實驗組比較並無差異性，雖然有研究指出 LPS 引起組織的傷害不一定和脂質過氧化有關(38)，但本實驗必須進一步做 LPS 的 time course 決定脂質過氧化是否和 PCA 的保肝作用有關。1982 年 Nathan 等人(21)提出 LPS 可刺激巨噬細胞產生活性氧系(reactive oxygen intermediates；ROI)，造成細胞的氧化損傷，而細胞中含有許多抗氧化酵素可保護細胞免受傷害；如 Table 3 所示：LPS 可顯著抑制還原態 glutathione(GSH) (和正常組比較，抑制約 50%， $P<0.001$)，但若以高濃度原兒茶酸(75mg/kg)前處理，則可使 endogenous antioxidant GSH 增加($P<0.01$)；此外，LPS 導致 GSH 減少並無伴隨 GSSG 增加，顯示 LPS 是直接和 GSH 作用；而由 Table 4、5 知 LPS 可代償性微微提高 catalase 及 GSH peroxidase 的活性，而預處理原兒茶酸並無明顯改變 catalase 和 GSH peroxidase 的活性，顯示 LPS(5mg/kg)處理 6 小時所誘發之細胞傷害與細胞內氧化/還原狀態之平衡與否有關，但與 catalase 及 GSH peroxidase 等抗氧化酵素關係不大，但對於其詳細機制尚待進一步探討。

慢性發炎和感染被認為是癌症發生的原因之一(9)，而近年來 NO 在發炎和感染中所扮演的角色也大量被探討(10)。本篇研究發現原兒茶酸能有效抑制 LPS 所導致肝功能指標 alanine aminotransferase(ALT)及 aspartate amino-transferase(AST)等酵素生化

值之升高；而投予 75mg/kg 的原兒茶酸可有效抑制 LPS 所誘發 NO 的增加(~50%)，而對於 LPS 所誘發 iNOS 活性的升高和 iNOS 蛋白的表現，原兒茶酸皆能有效抑制；以上實驗顯示原兒茶酸對於 LPS 誘發大量 NO 造成的肝細胞毒性具有保護作用。根據過去研究(35)，當細胞受到 LPS 或氧化劑等刺激，會促使產生活性氧系(ROI)和導致 GSH depletion，進而活化轉錄因子 NF κ B，導致下游 target gene(ex: iNOS)的活化，而由本實驗發現(a) LPS 能顯著抑制 GSH 的生成，而以原兒茶酸前處理之老鼠則可增加內生性抗氧化酵素 GSH 的含量。(b) 原兒茶酸可有效抑制 LPS 所導致 iNOS 蛋白的大量表現。(c) 原兒茶酸能抑制 LPS 誘發轉錄因子 NF κ B 的活化。綜合上述，原兒茶酸對於鼠肝的保護作用和 GSH depletion. > NF κ B > iNOS 這條路徑有關。此外，由過去研究知：在未受刺激細胞之 cytosol 中，NF κ B 會和 I κ B 形成一 complex，而當細胞受到一些 inducer 刺激後，I κ B kinase 會使 I κ B 發生 phosphorylation 進而 degradation，然後促使 NF κ B translocation 至核中，而由本實驗圖五發現原兒茶酸抑制 LPS 誘發轉錄因子 NF κ B 的活化可能是經由抑制 I κ B kinase，但詳細機轉尚待進一步證實。根據之前研究，protein tyrosine kinase inhibitor 可抑制 LPS 所誘發 NO 的大量生成及 iNOS mRNA 的表現(36)，另 Michael(37)等提到發炎的細胞會製造大量的 TNF- α ，而 TNF- α 會促使 protein tyrosine phosphorylation 進一步活化 NF κ B，而由本實驗發現，LPS 可誘發 PY-20 的大量表現，以原兒茶酸前處理則能有效抑制 LPS 誘發 PY-20 蛋白的表現量，顯示原兒茶酸對於 LPS 引起的鼠肝毒性之抑制作用和 protein tyrosine kinase 有關。

過去有報告提到多型核嗜中性球是 LPS 導致肝組織發炎和傷害的指標，而由本實驗的病理切片觀察到以腹腔注射 LPS(5mg/kg) 6 小

時後，肝組織有充血、壞死、細胞排列不規則及多型核嗜中性球浸潤等現象，而以高濃度原兒茶酸處理後可有效抑制。

本篇研究對於原兒茶酸抑制 LPS 所誘發的肝細胞毒性之機制做了探討，但對於其詳細機制須再進一步證實。

參考資料

1. Huang, MT, and Ferrano, T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In : Huang MT, Ho CT, and Lee CY.(eds.), Phenolics Compounds in Food and Health : Antioxidants and Cancer Prevention, American Chemical Society Symposium Series 507 : 8-34. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1992.
2. Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, and Chu HY. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico-Biological Interaction*, 101 : 137-148, 1996.
3. Tseng TH, Hsu J.D., Lo M.H, Chu CY, Chou FP, Huang CL, and Wang CJ. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer letters*, 126 : 199-207, 1998.
4. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Yoshimi N, and Mori H. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rats. *Cancer Res.* 53 : 2775-2779, 1993.
5. Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Okamoto K, Mori H, and Hara A.. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer Res*, 54 : 2359-2365, 1994.
6. Kawamori T, Tanaka T, Kojima T, Suzui M., Ohnishi M., Mori H. Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid, *Jpn. J. Cancer Res.* 54 : 2359-2365, 1994.
7. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, and Mori H.. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer* 75 (6 Suppl.) : 1433-1439, 1995.
8. Hirose Y, Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M. i, Makia H., Mori H., Satoh K, and Hara A.. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*, 16(10) : 2337-2342, 1995.
9. Ohshima H, and Bartsch H. Chronic infection and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*, 305 (2) : 253-264, 1994.

10. Maeda H, and Akaike T. nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammatory, and cancer. *Biochemistry (Moscow)*, 63(7) : 854-865, 1998.
11. Beckman, J S, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, and Foman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 : 1620, 1990.
12. Stamler, JS., Simon DI., Osborne JA., Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, and Loscalzo, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 : 444-448, 1992.
13. Palmer, RMJ, Ferrige AG, and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327 : 524-526, 1987.
14. Bredt, DS, Hwang PM, and Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347 : 768-770, 1990.
15. Bittrich H., Matik AK, Kraker I. and Appel KE. NO₂-Induced DNA single strand breaks are inhibited by antioxidative vitamins in V79 cells. *Chemico-Biological Interaction*, 86 : 199-211, 1993.
16. Thurman RG, Mechanisms of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupper cells by endotoxin. *The American Physiological Society*, G605 -G611, 1998.
17. Morrison DC, and Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.* 28 : 293-450, 1979.
18. Morrison DC, and Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathol.* 93 : 525-617, 1978.
19. Deventer V, Buller SJH., Cate HRT, Sturk JWA., and Pauw, W. Endotoxemia : An early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancets* 8586 : 605, 1988.
20. Sugino K, Dohi K, Yamada and Kawasaki T. The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage the protective effect of antioxidants. *Surgery*, 101 : 746, 1987.
21. Nathan, C.F. Secretion of oxygen intermediates : role in effector functions of activated macrophages. *Fed. Proc.* 41 : 2206, 1982.

22. Yoshikawa Y, Takano H, Takahashi S, Ichikawa H, and Kondo M. Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in endotoxin-induced multiple organ failure. *Circ. Shock*, 42 : 53, 1994.
23. Meister A, and Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 711, 1983.
24. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science Wash. DC* 201 : 875-880, 1978.
25. Yagi, K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem Phys Lipid*, 45 : 337-351, 1987.
26. Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione : applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27 : 502-522, 1969.
27. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper P, Wishnok, JS, and Tannenbaum SR. *Anal. Biochem*, 126 : 131-138, 1982.
28. Drapier JC, Catherine Pellat, and Yann Henry. Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor targets cells cocultured with activated macrophage. *J Biol Chem*, 266(16) : 10162-10167, 1991.
29. Aebi H., *Methods Enzymol. Anal.* 2 : 673-684, 1974.
30. Lawrence RA. and Burk RF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 : 952-958, 1976.
31. Akitoshi Nagasaki, Tomomi Gotoh, Motohiro takeya, Yingjie Yu, Masaki Takiguchi, Hiromitsu Matsuzaki, Kiyoshi Takatsuki, and masataka Mori. Coindcution of nitric oxide synthase, argininosuccinate synthetase , and argininosuccinate lysase in lipopolysaccharide-treated rats. *J Biol Chem.* 271(5) : 2658-2662, 1996.
32. Edgar Schreiber, Patrick Matthias, Michael M.Muller and Walter Schaffner. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts' , prepared from a small number of cells. 17 : 6419, 1989.

33. S. Moncada RM, Palmer J, and Higgs EA. Nitric oxide : physiology , pathophysiology , and pharmacology. *Pharmacological Review*, 43(2) : 109-142,1991.
34. Schreck R, Rieber P and Baeuerle PA. Reactive oxygen species intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10 : 2247-2258, 1991.
35. Kalus SO, Los M, and Patrick A. Redox signalling by transcription factors NF κ B and AP-1 in lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 50(6) : 735-741, 1995.
36. Lee BS, Kang HS, Pyun KH., and Choi I. Roles of tyrosine kinases in the regulation of nitric oxide synthesis in murine liver cells : modulation of NF-kappa B activity by tyrosine kinases. *Hepatology*, 25(4) : 913-919, 1997.
37. Michael TA, Frank JS, Carlos G, and Leonard A. Herzenberg and Leonore A. Herzenberg. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- κ B signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 11527-11531, 1994.
38. Mercer DW, Smith GS, Cross JM, Russell DH, Chang L, And Cacioppo J. Effects of lipopolysaccharide on intestinal injury ; potential role of nitric oxide and lipid peroxidation. *J. Surg. Res.* 63(1) : 185-192, 1996.

Table 1. Effect of pretreatment protocatechuic acid on the survival rate of rats after administration of lipopolysaccharide.

| Treatment ^a | survival rate(%) ^b |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Normal(dist H ₂ O) | 100(10/10) |
| Control(1% DMSO) | 100(10/10) |
| PCA(75mg/kg) alone | 100(10/10) |
| LPS(5mg/kg) alone | 60(6/10) |
| PCA(25mg/kg) + LPS | 70(7/10) |
| PCA(75mg/kg) + LPS | 80(8/10) |

^a Rats were treated with dist.H₂O、1% DMSO、25 and 75mg/kg protocatechuic acid for five days. The rats were killed 6 hours after administration of bacterial lipopolysaccharide (5mg/kg) by i.p.

survival rate(%)^b = survival number of rats of total number of rats × 100

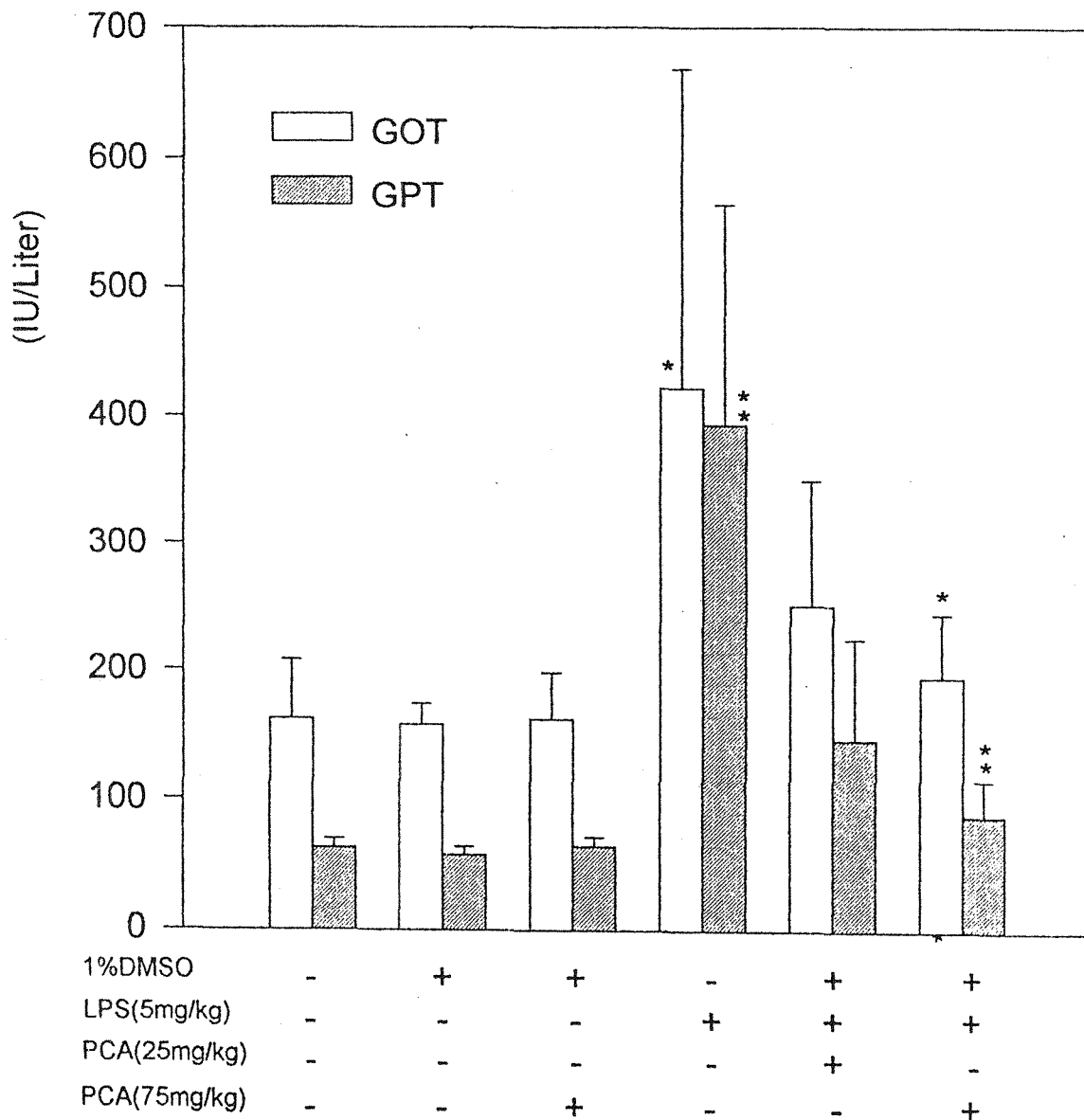


Fig. 1 Effect of pretreatment protocatechuic acid on the activities of serum alanine transaminase and aspartate transaminase after administration of lipopolysaccharide in rats. *P<0.05 , compared with normal group ; **P<0.05 , compared with lipopolysaccharide alone group. Mean±SD, t-test.

Table 2. Effect of pretreatment protocatechuic acid on lipid peroxidation products(MDA) after administration of lipopoly-saccharide in rats.

| treatment ^a | MDA(nmole/g tissue) |
|------------------------|----------------------|
| normal | 25.1630±3.4306 |
| control (1%DMSO) | 24.5610±3.5042 |
| PCA(75mg/kg) alone | 27.1147±0.5763 |
| LPS(5mg/kg) alone | 23.9600±1.5119 |
| PCA(25mg/kg)+LPS | 30.5933±3.6469 |
| PCA(75mg/kg)+LPS | 26.5760±3.1125 |

^a Rats were treated with dist.H₂O、1% DMSO、25 and 75mg/kg protocatechuic acid for five days. The animals were killed 6 hours after administration of bacterial lipopoly-saccharide (5mg/kg) and the rat livers were prepared for determination.

Table 3. Effect of pretreatment protocatechuic acid on hepatic reduced glutathione(GSH) and oxidized glutathione(GSSG) after administration of bacterial lipopolysaccharide in rats.

| Treatment ^a | nmole/mg protein | |
|------------------------|------------------|---------------|
| | GSH | GSSG |
| Normal | 49.34±4.16 | 12.97±2.63 |
| PCA | 45.48±5.06 | 11.70±3.60 |
| LPS(5mg/kg) | 25.50±4.86* | 7.66±0.81*** |
| PCA(25mg/kg)+LPS | 27.20±4.56 | 9.97±1.53 |
| PCA(75mg/kg)+LPS | 32.45±3.17** | 11.35±0.93*** |

^a Rats were treated with dist.H₂O、1% DMSO、25and 75mg/kg protocatechuic acid. Five days later. The animals with were killed 6 hours after administration of bacterial lipopolysaccharide(5mg/kg) and the rat livers were prepared for determination.*P < 0.001 , compared with normal group ; **P < 0.01 , compared with lipopolysaccharide alone group. Mean±SD.t-test

Table 4. Effect of pretreatment protocatechuic acid on hepatic GSH peroxidase activity after administration of lipopoly-saccharide in rats.

| Treatment ^a | GSH peroxidase(μ M/mg protein) |
|------------------------|-------------------------------------|
| normal | 1.79 \pm 0.26 |
| LPS(5mg/kg) | 2.61 \pm 0.58 |
| PCA(25mg/kg)+LPS | 2.23 \pm 0.24 |
| PCA(75mg/kg)+LPS | 2.29 \pm 0.13 |

^a Rats were treated with dist.H₂O、1% DMSO、25 and 75mg/kg protocatechuic acid. Five days later. The rats were killed 6 hours after administration of bacterial lipopoly-saccharide (5mg/kg) by i.p. and the rat liver were prepared for dertermination. Mean \pm SD. t-test.

Table 5. Effect of pretreatment protocatechuic acid on hepatic catalase activity after administration of lipopolysaccharide in rats.

| Treatment ^a | Catalase(k/mg protein) |
|------------------------|------------------------|
| Normal | 3.22±0.22 |
| LPS(5mg/kg) | 3.69±0.79 |
| PCA(25mg/kg)+LPS | 3.60±1.67 |
| PCA(75mg/kg)+LPS | 3.46±1.58 |

^a Rats were treated with dist.H₂O、1% DMSO、25 and 75mg/kg protocatechuic acid. Five days later. The rats were killed 6 hours after administration of bacterial lipopoly-saccharide(5mg/kg) by i.p.and the rat liver was prepared for determination.

$$k = 0.153(\log A1/A2)/\text{min}$$

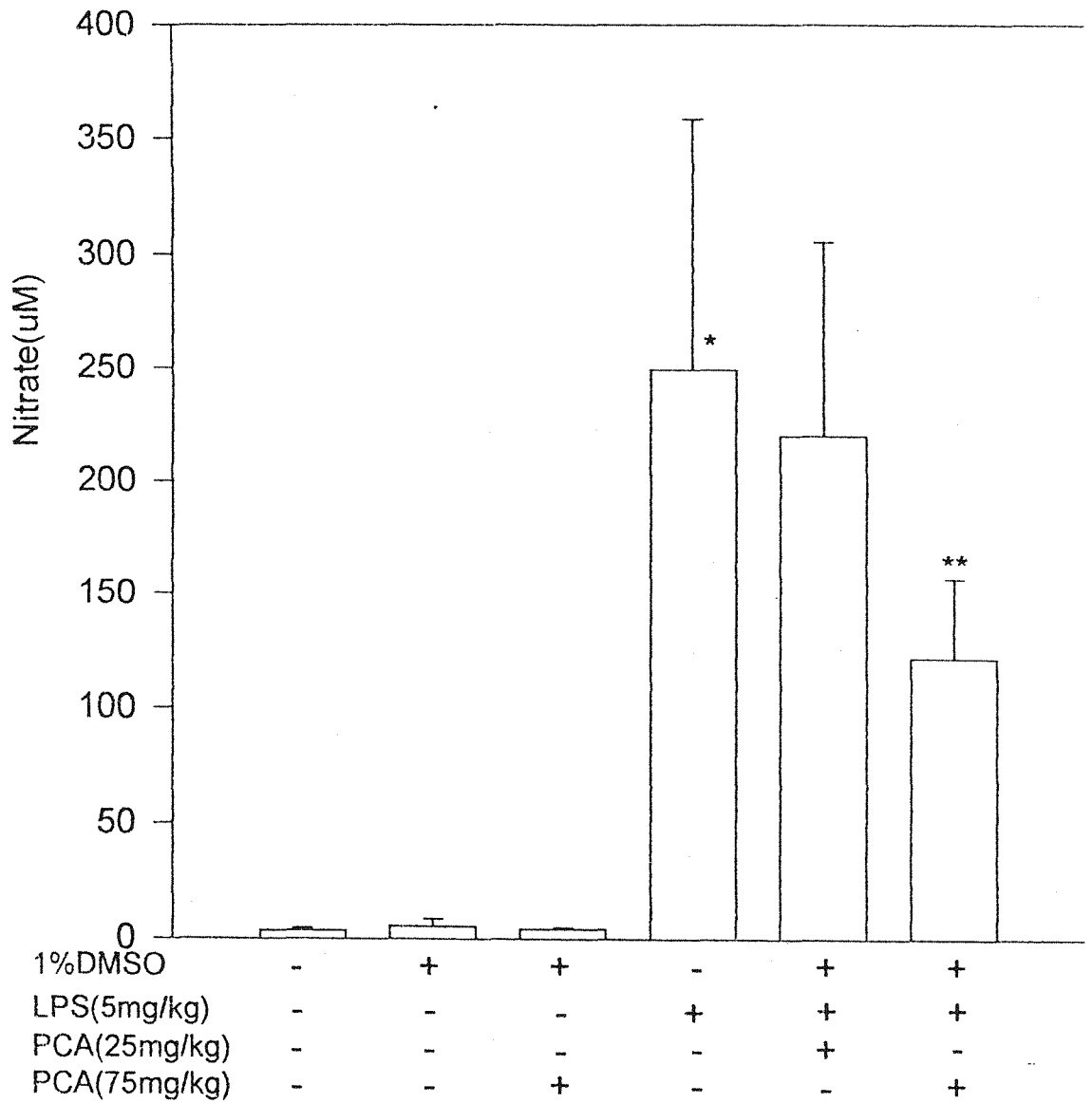


Fig 2. Effect of pretreatment protocatechuic acid on serum total nitrite after administration of lipopolysaccharide in rats. *P<0.01 , compared with normal group. **P<0.05 , compared with LPS alone group. Mean±SD, t-test.

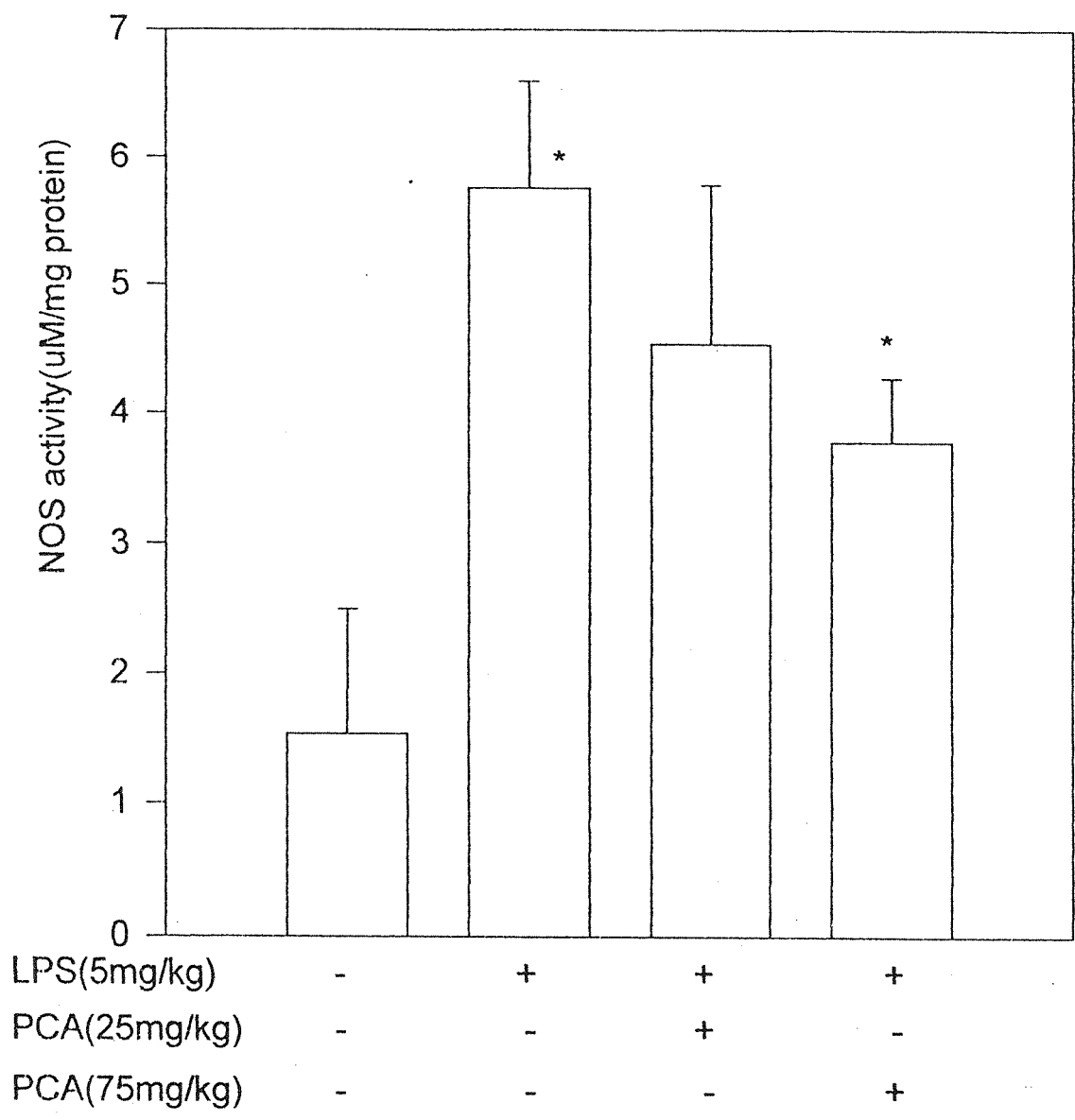


Fig 3. Effect of pretreatment protocatechuic acid on inducible nitric oxide synthase activity after administration of lipopolysaccharide in rats.*P<0.05 , compared with LPS alone group. Mean±SD, t-test.

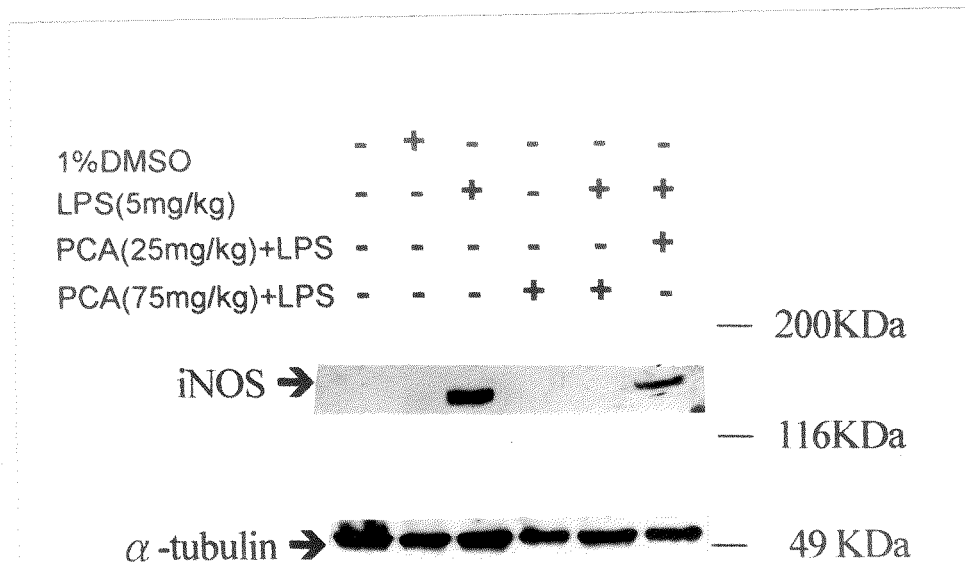


Fig 4. Effect of pretreatment protocathechuic acid on inducible nitric oxide synthase after administration of lipopolysaccharide in rats.

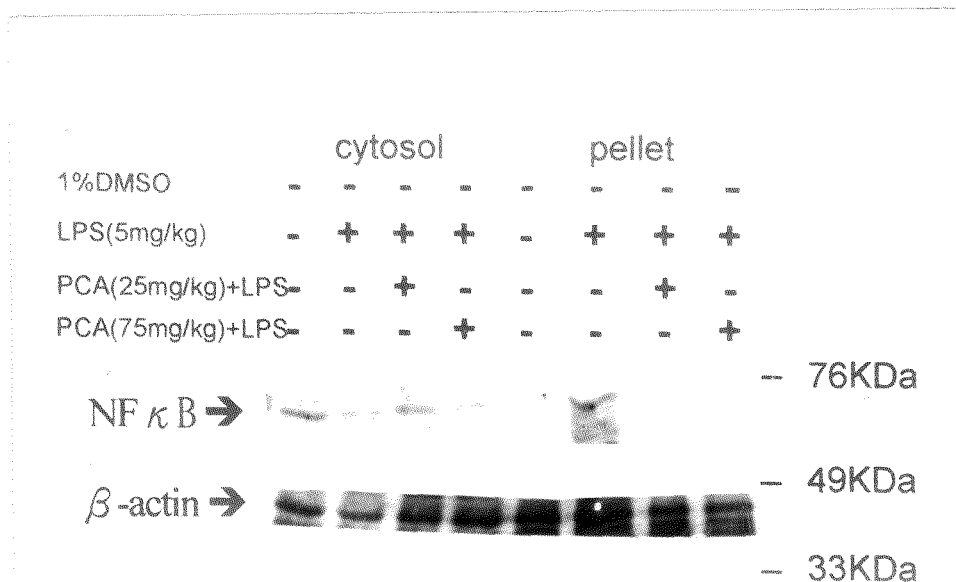


Fig 5. Effect of pretreatment protocatechuic acid on transcription factor NF κ B after administration of lipopolysaccharide in rats.

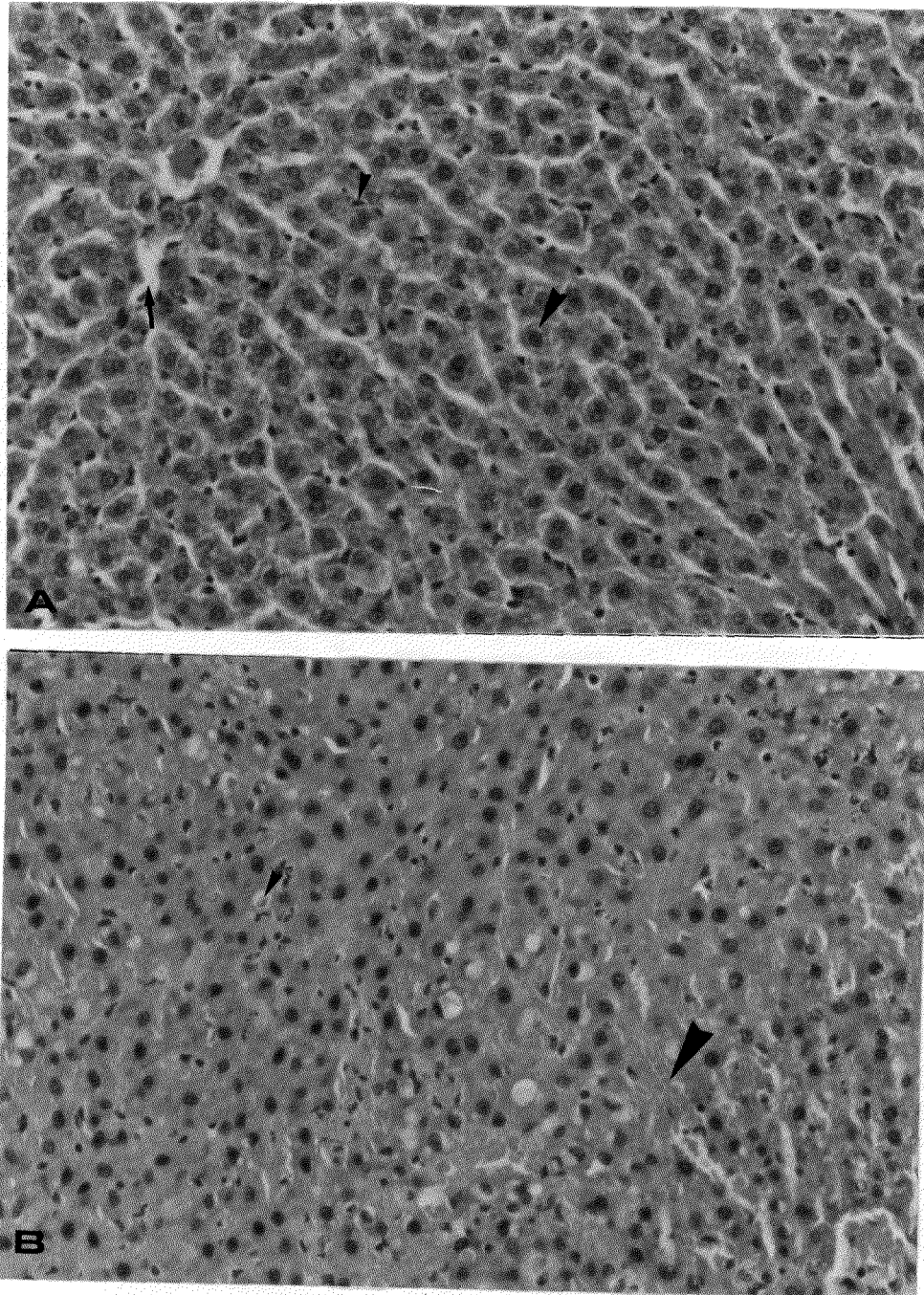


Fig 6-1. Histopathological evaluation of rats livers after treatment with dist H₂O and LPS alone. A are sections of livers of normal group. Hepatocyte(thick arrow), a sinusoidal space(arrow)and a Kupper cell(thin arrow), depict the normal liver organization and structure. B is a section of liver from LPS-treated rat ; note the diffuse cellular degenerative changes with cloudy swelling and cellular infiltration of inflammatory leukocytes(thin arrow) and congestion(thick) arrow). H and E stain.

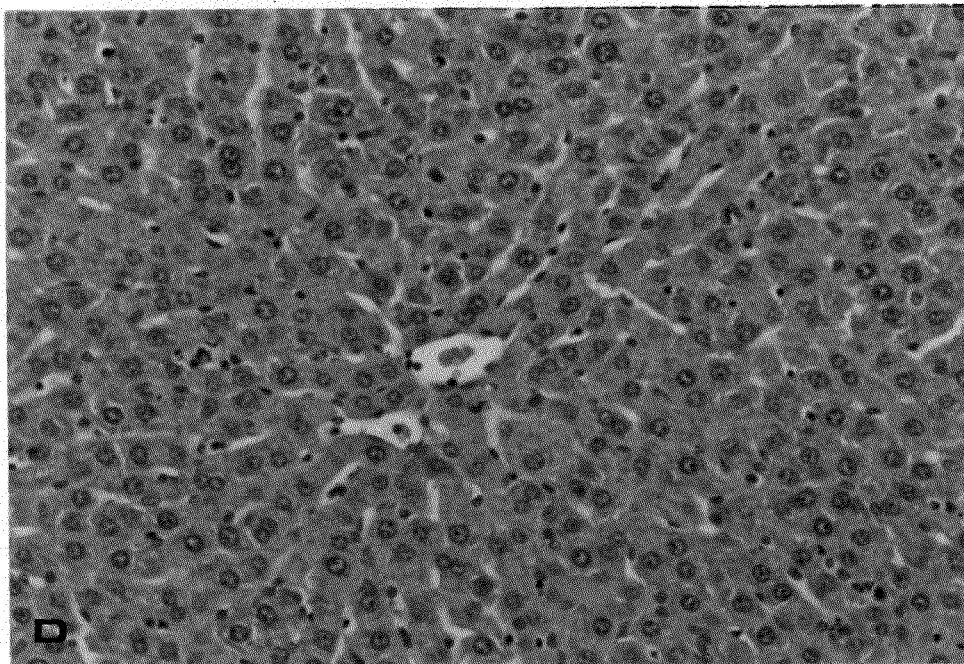
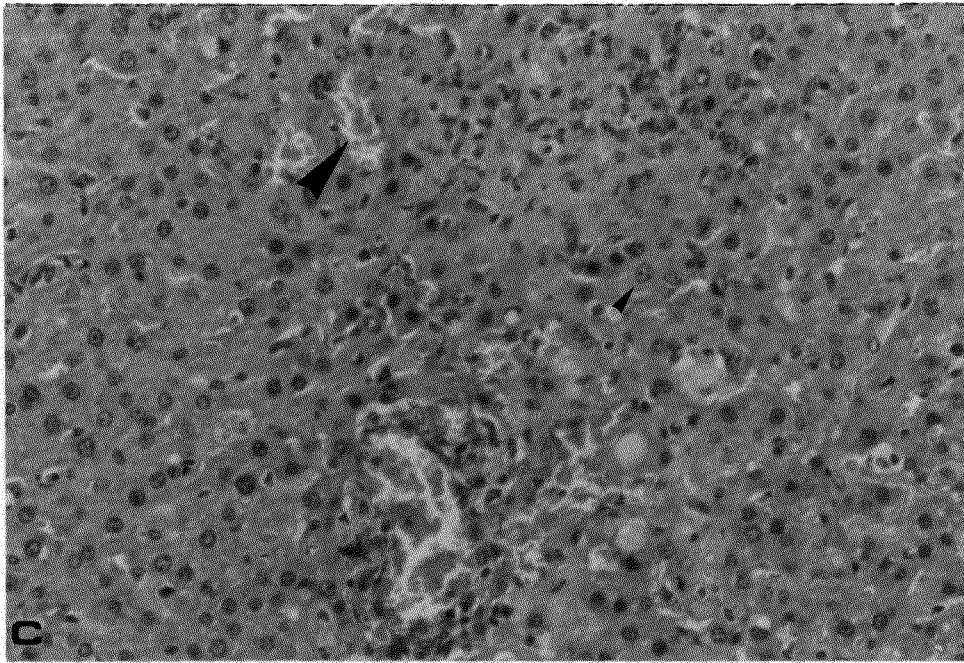


Fig 6-2. Histopathological evaluation of rats livers after treatment with low PCA(25mg/kg) 、 high PCA(75mg/kg)and LPS. C is section of a liver from an LPS + low PCA-treated rat. Some cloudy swelling of hepatocytes and infiltration of inflammatory leukocytes(thin arrow) and congestion remains. D is section of a liver from an LPS + high PCA-treated rat same as Fig 6a-(A).

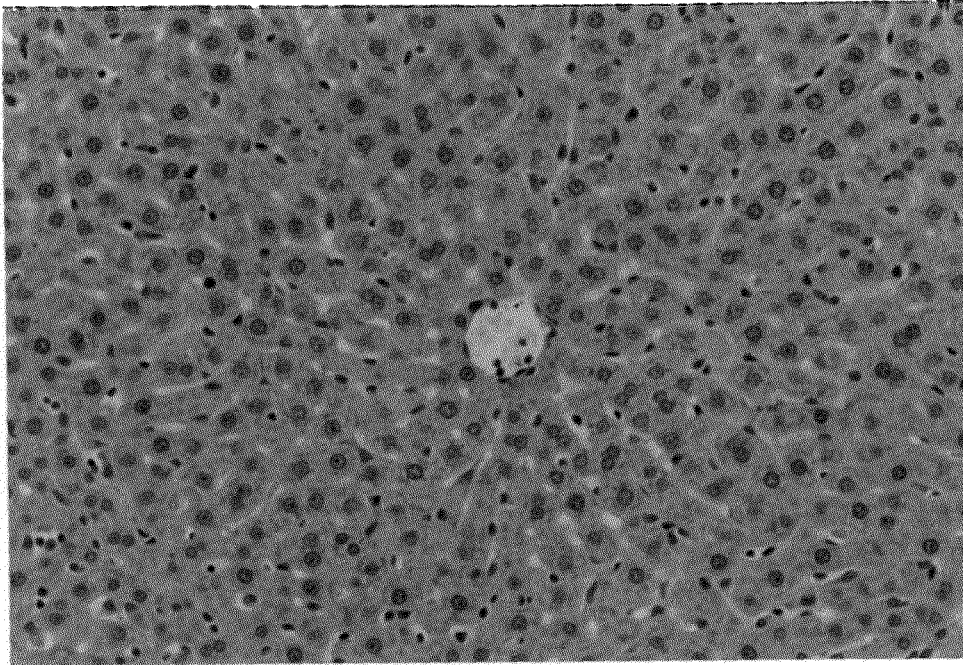


Fig.7-A. Immunohistochemical examination on inducible nitric oxide synthase in rat liver from normal group.

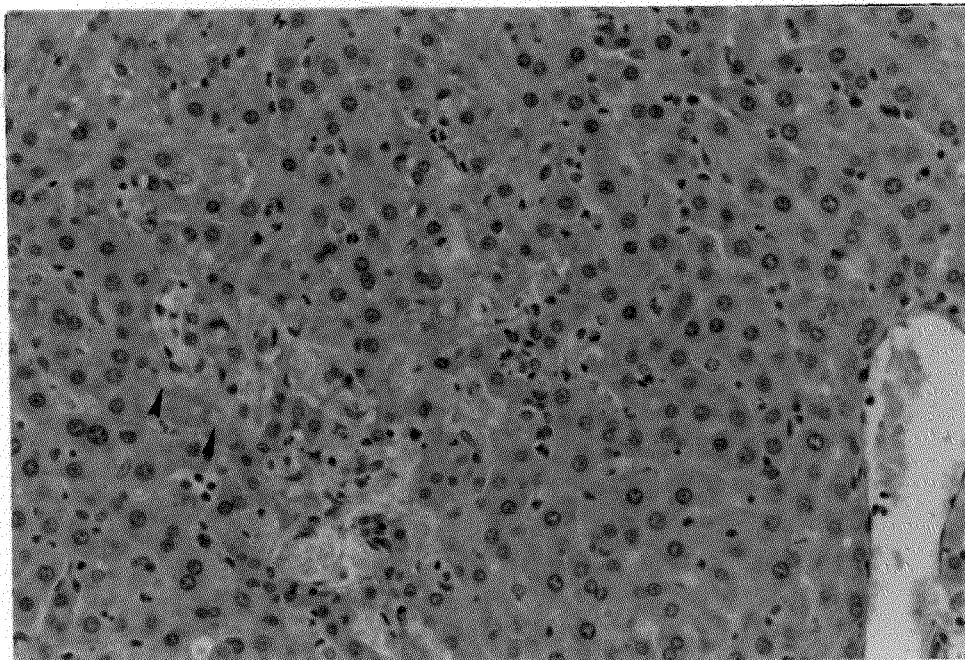


Fig.7-B. Immunohistochemical examination on inducible nitric oxide synthase in rat liver from LPS alone group.

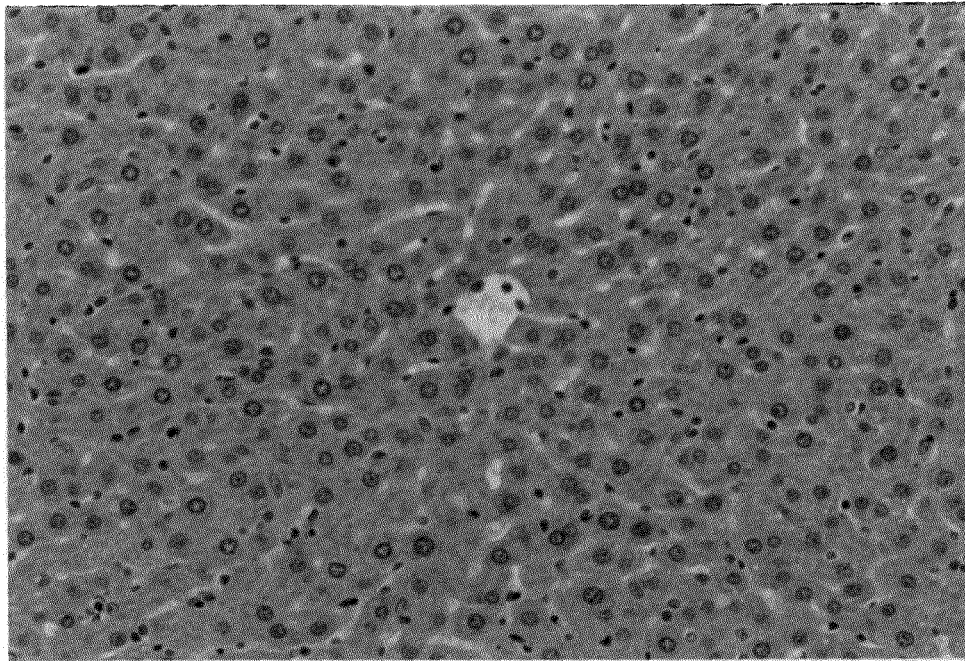


Fig.7-C. Immunohistochemical examination on inducible nitric oxide synthase in rat liver from 25mg/kgPCA +LPS group.

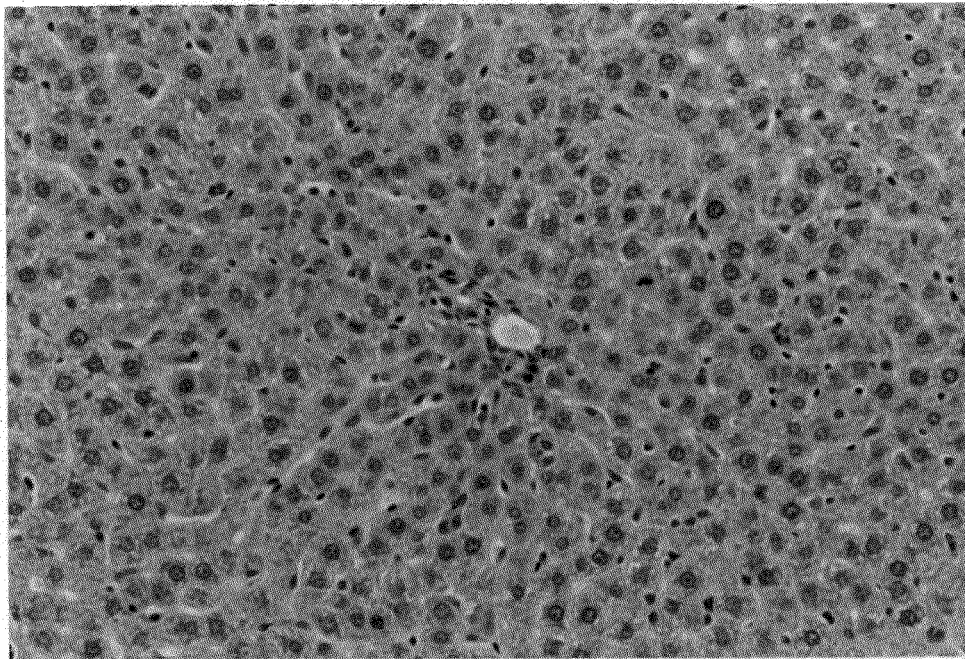


Fig.7-D. Immunohistochemical examination on inducible nitric oxide synthase in rat liver from 75mg/kgPCA + LPS group.

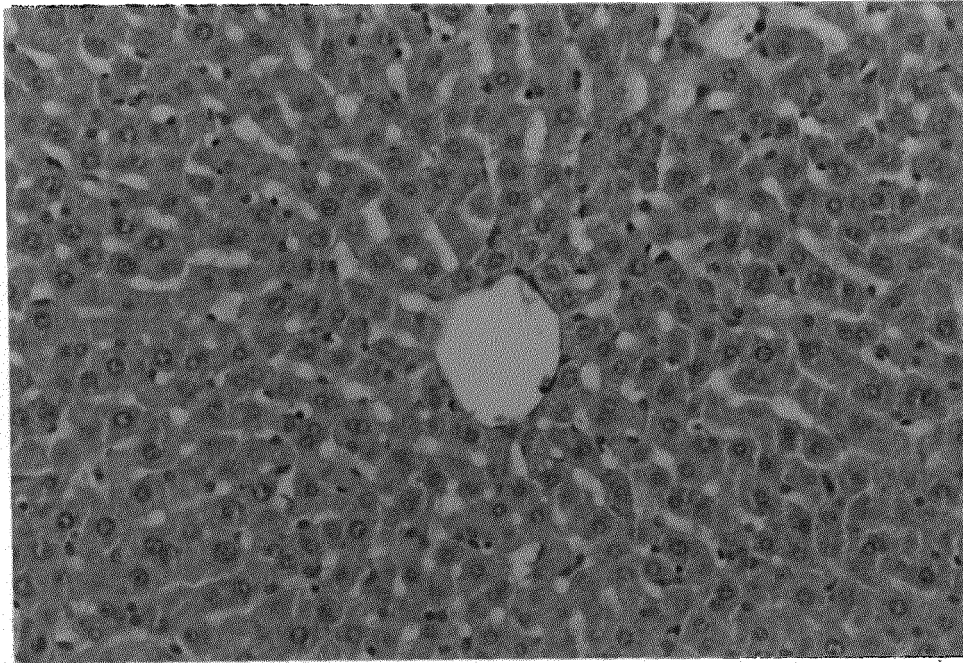


Fig.8-A. Immunohistochemical examination on phospho-tyrosine-20(PY-20) in rat liver from normal group.

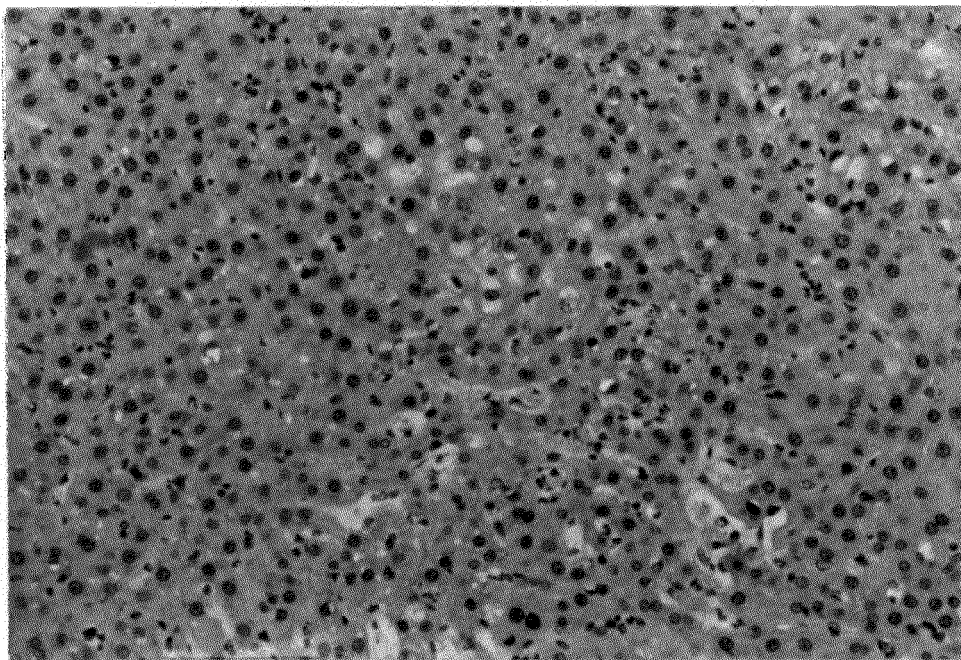


Fig.8-B. Immunohistochemical examination on phospho-tyrosine-20(PY-20) in rat liver from LPS alone group.

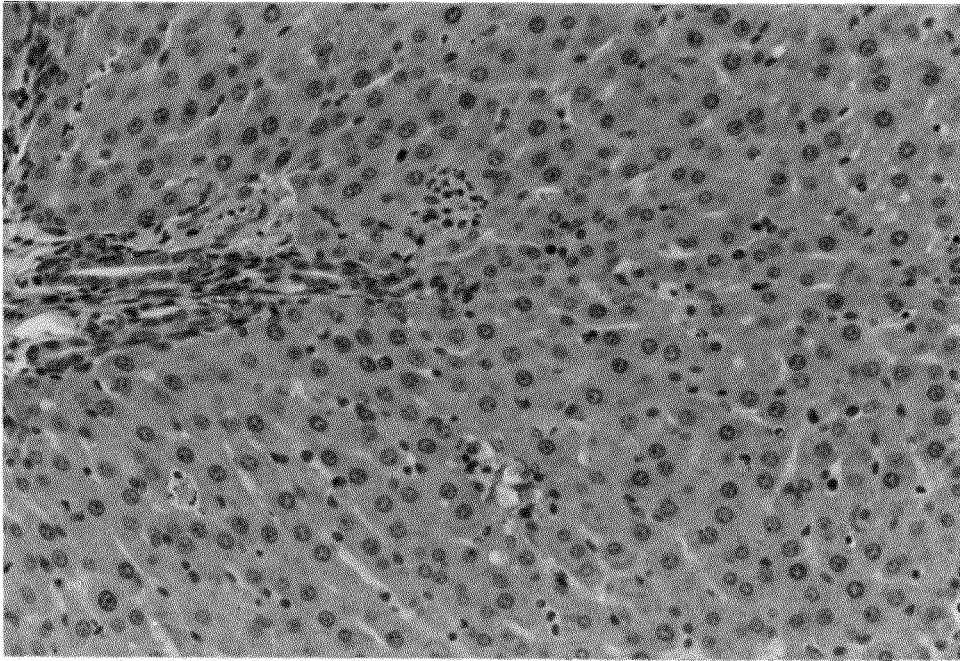


Fig.8-C. Immunohistochemical examination on phospho-tyrosine-20(PY-20) in rat liver from 25mg/kg PCA + LPS group.

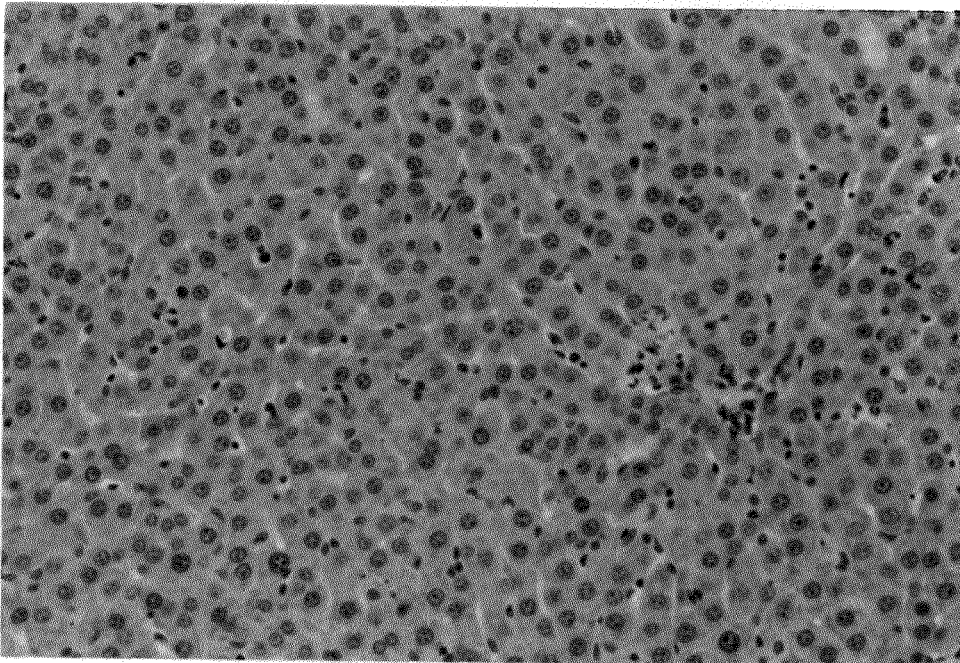


Fig.8-D. Immunohistochemical examination on phospho-tyrosine-20(PY-20) in rat liver from 75mg/kg PCA+LPS group.

PART II

Esculetin 抑制癌細胞生長之作用及影響細胞週期之分子機制探討

中文摘要

Esculetin(6,7-dihydroxycoumarin)是香豆精的衍生物之一，常見於藥用植物如菊科的茵陳蒿、芸香科的橙柚、玄參科的毛地黃、大戟科的續隨、茄科的顛茄、曼陀羅等，為一種多酚類化合物。過去本研究在抗氧化天然物開發中發現其具有不錯的抗氧化和抗發炎之作用，而近年來有文獻報告香豆精衍生物(如：1,2-benzopyrone、7-hydroxycoumarin)對人類惡性細胞株皆具有抑制生長的作用，然分子之作用機制仍不甚清楚。

近年來有許多研究指出一些抗癌藥物可藉由引起癌細胞的程序式死亡或改變癌細胞的生長週期，來達到抑制癌細胞的增生與惡化。至目前為止，對於程序式死亡的機制雖然仍不甚清楚，但一般認為細胞在接收到死亡訊息後，可能藉由改變內在 target(如粒腺體)的正常功能，進而活化一些酵素(如：CPP32、PARP- γ)，導致細胞死亡。此外，調節細胞週期進行的蛋白 cyclin、cyclin-dependent kinase 及 cyclin-dependent kinase inhibitor 與腫瘤形成有極密切的關係。在本實驗中，觀察到 esculetin 可以抑制人類血癌細胞株(HL-60)及肝癌細胞株(HepG2、H3B)的生長；由流速細胞儀測定顯示 esculetin 可使 HL-60 及 H3B 細胞週期停滯在 G1 phase 和 HepG2 細胞週期停滯在 S phase，而且發現以 esculetin 出處理 24 小時，可誘發 HL-60 apoptosis, 但 H3B、HepG2 則無。另由西方點墨法發現 esculetin 誘發 HL-60 apoptosis 是透過 cytochrome c 釋出活化 CPP32，促使 PARP- γ 裂解；亦觀察到 esculetin 導致 HL-60 細胞 G1 phase 停滯主要和 cyclin D 及 Cdk-4 有關，而 H3B 細胞則和 cyclin E 有關。此外也發現 esculetin 處理 H3B 細胞，p38MAPK 的磷酸化會增加，但對 phospho-MAPK 則無意義之影響。

Abstract

Esculetin, a phenolic compound, is a coumarin derivative containing in many plants such as *Atemisia capillaris* Flos (Compositae), leaves of *Citrus limonia* (Rutaceae), *Digitalis purpurea* L. (Scrophulariaceae), *Euphorbia lathyris* L. (Euphorbiaceae), *Atropa belladonna* (Solanaceae), *Datura stramonium* L. (Solanaceae) *Hyoscyamus niger* L. (Solanaceae). Previously, we found that esculetin exhibited antioxidant and anti-inflammatory bioactivities. It is reported that coumarin derivatives can inhibit the proliferation of human malignant cell lines. However, the molecular mechanism of anti-proliferation of these compound are remain to be defined.

To date, the mechanism about apoptosis(programmed cell death) was unclear. It is supposed generally that a promising chemotherapeutic agent will have to promote the cell entering to go these two pathway. The exploration of intrinsic and extrinsic modulation of chemotherapeutic agents may prove the efficiency of anticancer treatment. Recently, some studys suggest that anticancer drugs may induce cancer cell apoptosis or change cell cycle to prevent the cancer cell proliferation. In this present, the ability of esculetin to inhibit cell growth. The flow cytometry analysis shows the esculetin can arrest at G1 phase for HL-60 and H3B and can arrest S phase for HepG2. Also, we found HL-60 cell treatment with esculetin for 24 hours can significantly reduced the content of cyclin D and Cdk-4 and H3B cell treatment with esculetin can reduced the content of cyclin D and E 、 increase of p38MAPK phosphorylation. Finally, we observe the effect of esculetin to some apoptosis associated protein. Esculetin treatment of HL-60 cells can induce cytochrome c releasing from mitochondria and breakage of PARP- γ .

緒論

數十年來，行政院衛生署所發佈的台灣地區國人十大死因中，癌症皆為十大死因之一，這顯示預防及延遲癌症的發生實為刻不容緩的事。癌症的形成是經過一複雜且多重步驟的過程，生活環境中存在許多致癌因子，例如汽機車及工廠排放的廢氣、毒氣，家庭和工廠排放的廢水，食品中的添加物等等，而臭氧層的破壞致使人們更易受到 UV 的傷害，種種因素都是造成癌症發生率居高不下的原因。至目前為止，癌症的治療都是採用放射治療或投予抗癌藥物，但是不論放射治療或投予抗癌藥物，對人體都會產生極大的傷害，所以本實驗室致力於天然藥物的開發，希望以天然藥物來抑制癌細胞的增長與惡化；而近年來國人對健康觀念提昇，希望吃的健康，所以本實驗室趨向於開發天然藥物所含的抗癌成份，希望經由攝取天然食品達到預防癌症的發生。本篇以中國藥物香豆精衍生物(esculetin 6,7-dihydroxycoumarin)為材料，來探討其抑制癌細胞生長的機制。

esculetin (6,7-dihydroxycoumarin)是香豆精的衍生物之一，主要常見於菊科的茵陳蒿、芸香科的橙柚、玄參科的毛地黃、大戟科的續隨、茄科的顛茄及蔓陀羅等(1)，為一種多酚類化合物，在民間被作為鎮痛劑和抗發炎藥物(2)。過去研究指出 esculetin 抑制人類乳癌細胞株 HS578T 及 monoblastoid U937 細胞株的增生是透過抑制 lipoxylase pathway(3)，而 Matsunaga 等人(4)也發現 esculetin 是一 lipoxylase 抑制物，對於 N-methyl- N-nitrosourea(MNU)誘發 Sprague-Dawley 品系雌性大白鼠乳癌的形成具有抑制作用；此外，Rose 等(5)提到 esculetin 抑制人類乳癌細胞株 MDA-MB-231 生長，是選擇性抑制 5-和 12-lipoxylase，而不是抑制 prostaglandin 的生成；Noguchi 等人(6)指出 esculetin 為 lipoxylase 抑制物，當人類乳癌細胞株 MDA-MB-231 含

linoleic acid 時，會明顯降低 leukotriene B(LTB)的分泌，進而抑制細胞的生長；另外根據本實驗室研究及其它報告顯示，esculetin 及相關衍生物(如 7-hydroxycoumarin)具有良好的抗氧化能力(7-9)，而 Chang 等說明各種 coumarin 衍生物對於 xanthine oxidase 活性具有良好的抑制作用(10)和捕捉超氧陰離子(O_2^-)的能力(11)，除此，亦有研究發現 esculetin 與 3,5-ditercbutyl-4-hydroxytoluene(BHT)在 in vivo 中有相似的抗氧化功效，可提高肝臟中還原態 glutathione 的濃度，降低脂質過氧化物(thiobarbituric acid-reactive substances, TBARs)的形成，保護生物體免受氧化性損傷(12)，而 Gialin 等人提出 esculetin 對於 paracetamol 和四氯化碳(CCl_4)引起的肝細胞毒性具有保護作用(13)。1993 年 Huang 等人指出 esculetin 抑制血管平滑肌細胞之增生，可能透過抑制 protein tyrosine kinase 和 lipooxygenase 活性(14)，1994 年又提出 esculetin 可抑制人類 T 細胞淋巴瘤(CEM cells)之 protein tyrosine kinase 及 protein kinase C 的活性，且可降低 PDGF-mRNA，進而抑制細胞生長(15)。

1993 年，有研究指出 coumarin 對於 renal(ACHN 和 Caki-2)及 erythroleukemia(K562)等細胞株具有細胞毒性，以流速細胞儀測定顯示：coumarin 能使細胞停滯在 G0/G1 期(16)，少量進入 S 期；1994 年，Kahn 等人提出 coumarin 可減緩 MTV-EJras 細胞株細胞週期的進行，避免細胞過度增生(17)；另 Egan 等人發現 8-nitro-7-hydroxycoumarin 可改變 K562 和 HL-60 細胞株的細胞週期及抑制 DNA 合成，並誘發 apoptosis 導致細胞死亡(18)。

近年來有許多研究指出一些抗癌藥物可藉由引起癌細胞的程序式死亡或改變癌細胞的生長週期，來達到抑制癌細胞的增生與惡化。雖然程序式死亡的機制仍不甚清楚，但一般認為細胞在接收到死亡訊息後，可能藉由改變內在 target(如粒腺體)的正常功能，進而活化一些酵素

(如：CPP32、PARP- γ)，導致細胞死亡。此外，調節細胞週期進行的蛋白 cyclin、cyclin-dependent kinase 及 cyclin-dependent kinase inhibitor 與腫瘤形成有極密切的關係(19-23)，所以了解抗癌藥物對細胞週期的調控作用有助於提高藥物之效率。

愈來愈多研究指出癌症和細胞週期的調控有極密切的關係，而調節細胞週期進行的相關蛋白在癌症形成過程中則扮演重要角色。一般來說，mammalian cell cycle 分成四個 phase：G₀/G₁、S(replication)、G₂、M(mitosis)，而 cyclin、cyclin-dependent kinase(Cdk)及 cyclin-dependent kinase inhibitor 則是負責調控細胞週期進行的相關蛋白，其中在 G₁ 早期，cyclin D 可和 Cdk-4 或 Cdk-6 形成複合體，導致 Rb 蛋白磷酸化(pre-phosphorylation)，進而活化轉錄因子 E2F，接著在 G₁ 晚期(G₁-S)，cyclin E/Cdk-2 可使 Rb 蛋白完全磷酸化(full-phosphorylation)，進而促使細胞進入 S 期，導致 cyclin A/Cdk-2 的活化(24)。許多研究指出在腫瘤細胞中，如淋巴瘤、乳癌、頭頸部鱗狀細胞癌、結腸直腸癌、肝癌、肺癌、皮膚癌、副甲狀腺癌、胃癌、食道癌等常發現 G₁ cyclin(cyclin D、cyclin E)有過度表現的情形(19-22，25-29)，而 Haas 等人(30)說明 Cdk-4 具有 oncogenic 的能力，而 Ito 等人發現 Cdk-2 及 Cdk-4 的 overexpression 和子宮內膜異位癌有關(19)。由上述知，調節細胞週期的蛋白如果過度表現，會使細胞週期縮短，導致細胞過度增生、癌化，而有文獻報告提出以抗癌藥物處理癌細胞株可使 cyclin 及 Cdk 裂解，改變其生長週期，進而達到抑制腫瘤細胞的產生。

許多研究發現 protooncogens(如 Myc)會影響細胞的細胞週期，和癌症的形成有關，此外也影響細胞的增生、分化。Steiner 及 Pusch 等(31、32)發現 Myc 的活化會使 G₁ cyclin 及 Cdk 活性增加，促使 Rat1-MyER 細胞增生，Jansen 等(33)說明 Myc 的 overexpression 會抑制

cyclin D 的表現。最近有研究(34)指出 p42/p44MAPK 除了和細胞增生有關外，其活化也可使 cyclin D1 promotor 活性及蛋白表現量增加，而 p38MAPK 的活化，則是使 cyclin D1 promotor 活性及蛋白表現量減少，另外也有文獻指出 p38MAPK 和細胞分化有關(35)。

Apoptosis 為細胞死亡的一種形式，又稱 programmed cell death。其中有許多分子參與 apoptosis 複雜的調節過程，包括較早期位於粒腺體膜上 Bcl-2 family 成員間的相互調節(36、37)，中期 interleukin-1 β -converting enzyme(ICE) family 的活化(38-40)，以及晚期 ICE family 的受質切割斷裂，如 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP- γ)(41)、nuclear lamin(42)----- 等等。1996 年 Wang 等發現 cytochrome c 若從 mitochondria 釋放至 cytosol，可促使 caspase-3(CPP32)活化，而活化的 caspase-3(CPP32)可進一步切割 PARP- γ ，導致細胞 apoptosis(43)，且 apoptotic protease activating factor-1(Apaf-1)及 3(Apaf-3)兩種蛋白質參與 cytochrome c 活化 caspase-3 的過程(44)。

由過去研究知 esculletin 具有抗發炎及抑制癌細胞生長的功效，然其機制不明，故本研究選用 esculletin 為實驗材料，觀察其對癌細胞 (HL-60、HepG2、H3B)的生長抑制作用及對細胞週期的影響。

研究目的

根據本實驗室研究及其它報告顯示，esculetin(6,7-dihydroxycoumarin)及相關衍生物(如 7-hydroxycoumarin)具有良好的抗氧化能力，且文獻也指出香豆精衍生物如：1,2-benzopyrone、7-hydroxycoumarin 對人類惡性細胞株皆具有抑制生長的作用；故本實驗以 esculetin 為材料，利用 MTT 法測定人類血癌細胞株(HL-60)及肝癌細胞株(HepG2、H3B)的生長曲線，再以流速細胞儀分析細胞週期和以西方點墨法觀察蛋白質表現，探討 esculetin 對這三種細胞株的生長抑制作用和對細胞週期之影響。

材料與方法

(一)化學試劑

Dulbecco's Modified eagle medium、RPMI 1640 medium、PSN antibiotic mixture、fetal bovine serum、nonessential amino acid、phosphate buffered saline(PBS)、sodium pyruvate、glutamine 以上購自美國 GIBCO BRL 公司，Sodium dodecyl sulfate(SDS)、propidium iodide、ribonuclease A(RNase A)、Tris-base、Tris-HCl、MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)、sodium orthovanadate、 β -mercapoethanol、ponceau S concentrate 以上皆購自美國 Sigma 公司，Glycine、Bio-Rad TEMED(N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamine)、protein assay kit、acrylamide、bis(N',N'-Methylene-bis-acrylamide)以上購自美國 Bio-Rad 公司，methanol、sodium chloride、Tween-20、isopropanol、bromophenol blue、glycerol、Amonium persulfate、ethanol、NP-40、deoxycholic acid、PMSF、leupeptin、aprotinine、nitrocellulose membrane、X-ray film(Kodak)、 α -tubulin(T-5168)mouse monoclonal antibody(Sigma)、Cyclin E(HE12)mouse monoclonal IgG_{2b} antibody(Santa Cruz Biotechnology, sc-247)、Cyclin D mouse monoclonal IgG_{2a} antibody(upstate biotechnology, 05-362)、Cyclin dependent kinase-2(D-12)mouse monoclonal IgG₁ antibody(Santa Cruz Biotechnology, sc-6248)、Cyclin dependent kinase-4(H-303) rabbit polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology, sc-749)、c-myc(C-8) mouse monoclonal IgG_{2a} antibody(Santa Cruz Biotechnology, sc-41)、Anti-ACTIVE™ p38 pAb(Promega, cat.#V2901)rabbit polyclonal antibody、Anti-ACTIVE™ MAPK pAb(Promega, cat.#V8031)rabbit polyclonal antibody。

(二)儀器

分光光譜儀：UV and Visible Spectrophotometer(HITACHI；U2000)

倒立式顯微鏡：Nikon；Diaphot 300

流速細胞儀(Flowcytometer)

蛋白質電泳槽：Mini protein II cell (BIO-RAD)

蛋白質轉印槽：Hofer pharmacia Biotech

Microcentrifuge：Shelton VS 15

冷凍離心機：Sigma 2K 15

實驗方法

一. 細胞培養

--- 人類血癌細胞株 HL-60 (from acute promyelocytic leukemia patient, 含有 Rb 但不含 p53) 培養於 RPMI 1640 培養基{內含 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS : Gibco BRL)、1% PSN 和 1% glutamine}。

--- 人類肝癌細胞株 Hepatoblastoma G2(含有 Rb 和 P53)培養於 DMEM 培養基(Gibco BRL. MD. USA), 內含 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS : Gibco BRL)、1% PSN 和 1% nonessential amino acid。

--- 人類肝癌細胞株 Hepatocellular carcinoma 3B(不含有 Rb 和 P53) 培養於 DMEM 培養基(Gibco BRL. MD. USA)內含 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS : Gibco BRL)、1% PSN、1% nonessential amino acid 及 1% sodium pyruvate)。

將以上三種細胞株, 培養於培養箱, 培養箱維持 5%CO₂、37°C 恆溫, 細胞密度維持在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml, 每週更換 2~3 次培養基。

二. MTT 法

此法係根據 Alley 等之方法(45), 其原理是存活的細胞能經由粒腺體中的 dehydrogenase 作用, 而將 MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)代謝還原成 formazan crystal。實驗方法是在 24 well 的培養皿中置入 2×10^4 cells/ml, 然後加入 0、10、20、50、100 μ M 的 esculetin, 分別培養 24、48、72 小時後, 去除培養基, 以 PBS wash 後, 加入新的培養基及 100 μ l MTT(5mg/ml), 作用 4 小時後, 去除培養基, 加入 1ml isopropanol 將 formazan 溶解, 於光波長 563nm 下測定 OD 值

三. 細胞週期分析

--- HL-60 細胞(2×10^5 /ml) 培養於含 100 μ M esculetin 的培養基中 0、6、12、24、36、48 小時

--- H3B 或 HepG2 細胞(2×10^6 cell /dish)培養於 $100\mu\text{M}$ esculetin 的培養基中 0、24、36、48、72 小時

分別收集細胞，以冰的 PBS wash 後離心，再加入 1ml 冰的 80% ethanol 將細胞固定(一滴一滴加，使細胞充分固定)，然後置於 -20°C 冰箱 16-18 小時；隔天離心後，以 1ml PBS wash，再加入 1ml propidium iodide($10\mu\text{g/ml}$ ，內含 $40\mu\text{g/ml}$ 的 RNase A)，於 37°C 水浴中避光作用 30 分鐘，最後置於冰上，以流速細胞儀(Flowcytometer)測定。

四. Nuclear extraction

1. 以不同濃度的 esculetin 暴露 HL-60 細胞不同時間後，收集細胞以 PBS wash。
2. pellet 加入 $500\mu\text{l}$ ice-cold lysis buffer(10mM HEPES, PH7.9 ; 10mM KCl ; 0.1mM EDTA ; 0.1mM EGTA ; 1mM DTT ; 0.5mM PMSF ; proteinase inhibitor : $2\mu\text{g/ml}$ leupeptin 、 $2\mu\text{g/ml}$ apoptinin 、 0.03mM sodium orthovanadate)
3. 每管以 type B pestle 研磨 40 下
4. 於 4°C ， $1000 \times g$ 離心 10 分鐘
5. 取 supernatants，再以 $10000 \times g$ 於 4°C 離心 20 分鐘
6. pellet \rightarrow mitochondria，加入 TNC buffer(10mM tris-acetate, PH8.0，內含 0.5% NP-40 及 5mM CaCl_2 。
7. supernatants 再以 $100000 \times g$ 於 4°C 離心 1 小時
8. supernatants \rightarrow cytosols

五. 西方點墨法(Western blotting)

將 HL-60 細胞培養於含 $100\mu\text{M}$ esculetin 的培養基中於 0、6、12、24、36、48 小時收集細胞，或將 H3B 細胞培養於含 $100\mu\text{M}$ esculetin 的培養基中於 0、12、24、36、48、72 小時收集細胞，以 PBS wash 後，加入 RIPA buffer{ 150mM NaCl、1% NP-40、

0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50mM Tris, PH7.5(內含 1mM sodium orthovanadate、100 μ g/ml PMSF、170 μ g/ml leupeptin)}，於冰上震盪 30 分鐘後，再加入 100 μ g/ml PMSF，以 4 $^{\circ}$ C 10000 rpm 離心 10 分鐘，即得 total cell lysate --- 所得蛋白質再以 BIO-RAD protein assay kit 定量。

取約 60 μ g 蛋白質與 loading buffer(3ml distilled water、1ml 0.5M Tris-HCl(PH6.8)、1.6ml glycerol、1.6ml 10% SDS、0.4ml β -mercaptoethanol、0.4ml 0.5% bromophenol blue)以 1:1 比例混合，於 95 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，然後放入冰浴中冷卻，再以小型離心機 spin down。接著將 sample 放入 well 內，以上層膠 70V，下層膠 120V 跑電泳；待電泳結束後，進行 transfer 以 nitrocellulose membrane 轉印，接著再以含 5%脫脂奶粉的 TBS buffer(10mM Tris、150mM NaCl、0.05% Tween-20, PH8.0)blocking 30 分鐘，wash 乾淨後，將 NC paper 置於 1 級抗體中反應 overnight(4 $^{\circ}$ C)，之後以含 tween-20 之 TBS 洗三次，再以 Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody 反應 40~60 分鐘，再以含 tween-20 之 TBS 洗三次，最後加入 Amersham ECL reagents kit 反應，於暗房以 Kodak film 曝光 1~10 分鐘，以顯影劑及定影劑沖片觀察。

結果

一. MTT 法之細胞毒性分析

1. HL-60 細胞株暴露不同濃度的 esculetin(包括：0、10、20、50、100 μ M)24 小時後，發現在 50 μ M 及 100 μ M 濃度下可看到輕微的細胞細胞毒性，其細胞存活率分別為 80%和 75%($P<0.1$)，而以 50 μ M 及 100 μ M 濃度的 esculetin 處理細胞 48 小時後，其細胞存活率降低至約 74%和 40%($P<0.01$)。
2. HepG2 細胞株暴露不同濃度的 esculetin(包括：0、10、20、50、100 μ M)48 小時後，發現在 50 μ M 及 100 μ M 濃度下可看到輕微的細胞細胞毒性，其細胞存活率分別為 73%和 70%($P<0.01$)，而以 50 μ M 及 100 μ M 濃度的 esculetin 處理細胞 72 小時後，其細胞存活率降低至 58%和 49%($P<0.001$)。
3. Hep3B 細胞株暴露不同濃度的 esculetin(包括：0、10、20、50、100 μ M)48 小時後，發現在 20 μ M、50 μ M 及 100 μ M 濃度下可看到輕微的細胞細胞毒性，其細胞存活率分別為 87%($P<0.01$)、77%($P<0.05$)和 73% ($P<0.01$)，而以 20 μ M、50 μ M 及 100 μ M 濃度的 esculetin 處理細胞 72 小時後，其細胞存活率則降低至 75%($P<0.05$)、48%($P<0.01$)和 44%($P<0.01$)。

二. 細胞週期分析

1. 將 100 μ M esculetin 培養在 HL60 細胞株中 0、6、12、24、36、48 小時，然後以流速細胞儀分析其細胞週期變化。結果在實驗中明顯觀察到細胞週期在 24 小時有 G0/G1 phase 停滯及 G2/M phase 減少的現象，而至 36、48 小時除了有 G0/G1 phase 停滯及 G2/M phase 減少的現象外，更觀察到 hypodiploid DNA 的產生(即 apoptotic peak)。
2. 將 100 μ M esculetin 培養在 HepG2 細胞株中 0、12、24、36、48、72 小時，然後以流速細胞儀分析其細胞週期變化。結果

在實驗中明顯觀察到細胞週期在 48 小時有 S phase 停滯及 G0/G1 phase 減少的現象，而以 100 μ M esculetin 處理 36 小時後，有少許 hypodiploid DNA 的產生。

3. 將 100 μ M esculetin 培養在 Hep3B 細胞株中 0、12、24、36、48、72 小時，然後以流速細胞儀分析其細胞週期變化。結果在實驗中明顯觀察到細胞週期在 48 小時有 G0/G1 phase 停滯及 S phase 減少的現象，而以 100 μ M esculetin 處理 36 小時後，有少許 hypodiploid DNA 的產生。

三. 細胞內蛋白質之表現

1. 以 100 μ M esculetin 處理 HL-60 細胞株不同時間，觀察細胞內蛋白質之表現。

cyclin D(Fig.19)

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而 cyclin D 在細胞週期中是負責調節 G1 早期的蛋白，且研究顯示 cyclin D 與腫瘤形成有關(19-29)，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，cyclin D 在 24 小時明顯減少。

Cdk-4(Fig.20)

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而在 cell cycle 的 G1 早期，Cdk-4 可與 cyclin D 形成複合體，且研究顯示 Cdk-4 具有 oncogenic 的能力(19)，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，Cdk-4 在 24 小時明顯減少。

Cyclin E(Fig.17)

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而 cyclin E 在細胞週期中是負責調節 G1 晚期的蛋白，且研究顯示 cyclin E 與腫瘤形成有關(19-29)，故測定其蛋白表現

量。由實驗中發現，cyclin E 在 24 小時有些微下降，而在 48 小時明顯減少。

Cdk-2(Fig.18)

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而在 cell cycle 的 G1 晚期，Cdk-2 可與 cyclin E 形成複合體，且研究顯示 Cdk-2 與腫瘤形成有關(19)，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，Cdk-2 在 0~36 小時的表現量並無改變，而到 48 小時才明顯減少。

c-myc(Fig.21)

c-myc 與細胞週期進行有關。結果顯示 c-myc 隨處理時間增加，其蛋白表現量增加，而在 24 小時達最大值。

PARP- γ (Fig.24)

PARP- γ 的裂解與 apoptosis 有關。在實驗中發現 Esculetin 處理 24 小時，PARP- γ 開始分解，此結果與 CPP32 一致。

Cytochrome c

1996 年 Wang 等(43)發現 cytochrome c 從 mitochondria 釋放至 cytosol 可活化 CPP32，導致細胞走向 apoptosis 而由實驗發現，以 100 μ M esculetin 處理 cytochrome c 12 小時(Fig22、23)，cyto-chrome c 大量從 mitochondria 釋放至 cytosol。

2. 以 100 μ M esculetin 處理 H3B 細胞株不同時間，觀察細胞內蛋白質之表現。

Cyclin E(Fig.7)

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 H3B 細胞株停滯在 G1 phase，而 cyclin E 在細胞週期中是負責調節 G1 晚期的蛋白，且研究顯示 cyclin E 與腫瘤形成有關(19-29)，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，cyclin E 在 36 小時開始減少，至 72 小時幾乎完全裂解。

Cdk-2(Fig.8)

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 H3B 細胞株停滯在 G1 phase，而在 G1 晚期，Cdk-2 可與 cyclin E 形成複合體，且研究顯示 Cdk-2 與腫瘤形成有關(19)，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，Cdk-2 在 72 小時明顯減少。

Cyclin D(Fig.6)

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 H3B 細胞株停滯在 G1 phase，而 cyclin D 在細胞週期中是負責調節 G1 早期的蛋白，且研究顯示 cyclin D 與腫瘤形成有關(19-29)，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，cyclin D 至 72 小時才明顯減少。

c-Myc(Fig.5)

c-myc 與細胞週期進行有關。結果顯示 c-myc 在 24、36 小時蛋白表現量增加，而至 48 小時又開始減少。

Phospho-P38(Fig.9)

過去報告知：P38 MAPK 和細胞的 differentiation 有關，本實驗發現以 esculetin 處理 12 小時，P38 的磷酸化增加，至 24 小時達最大量。

Phospho-MAPK(Fig.10)

過去報告知：MAPK 和細胞的 antiproliferation 有關，本實驗發現 esculetin 處理 H3B，MAPK 的磷酸化並無名顯改變，顯示 esculetin 抑制 H3B 的生長，並非經由 MAPK 這條路徑。

討論

esculetin 及相關衍生物(如 7-hydroxycoumarin)具有良好的抗氧化及抗發炎能力(7-9)，對於人類惡性細胞株也具有抑制生長的作用(3-6，14-15)，而本研究以 esculetin 為材料，研究其對人類血癌細胞株(HL-60)及肝癌細胞株(HepG2、H3B)的生長抑制作用及對細胞週期之影響。結果由實驗中發現 esculetin 對 HL-60、HepG2 及 H3B 細胞皆具有細胞毒性，而比較這三種細胞發現 esculetin 對血癌細胞株 HL-60 具有較強的抑制生長之能力。由過去研究知癌症和細胞週期的調控有極密切的關係(24)，且文獻報告 coumarin 及其衍生物(8-nitro-7-hydroxycoumarin)能使 renal(ACHN 和 Caki-2)、erythroleukemia (K562)及 HL-60 等細胞株細胞停滯在 G0/G1 phase，減少細胞進入 S phase 抑制 DNA 合成(16)；結果以流速細胞儀測定顯示：100 μ M esculetin 可使 HL-60 細胞週期在 24 小時有 G0/G1 phase 停滯及 G2/M phase 減少的現象，而至 36、48 小時除了有 G0/G1 phase 停滯及 G2/M phase 減少的現象外，更觀察到 hypodiploid DNA 的產生(即 apoptotic peak)；至於 HepG2 則細胞週期在 48 小時有 G0/G1 phase 減少及停滯在 S phase 的現象；而 H3B 的細胞週期在 48 小時有 G0/G1 phase 停滯及 S phase 減少的現象，且以 100 μ M esculetin 處理 36 小時後，有少許 hypodiploid DNA(約 8%)的產生；以上實驗顯示 esculetin 對不同的細胞株具有不同的生長抑制作用。

根據過去文獻報告調節細胞週期進行的相關蛋白和癌症形成有關(24)。許多研究也指出在腫瘤細胞中，G1 cyclin(cyclin D、cyclin E)常常有過度表現的情形(19-22，25-29)，而 Hass 及 Ito 等也發現 Cdk-2 和 Cdk-4 的活性會影響細胞的週期變化，和癌症形成有關(19、30)。本實驗藉由西方點墨法觀察與細胞週期有關之蛋白質表現，發現在 HL-60 中，esculetin 處理 24 小時，cyclin D 及 Cdk-4 開始減少，然對 cyclin E、Cdk-2 則無顯著之影響，表示 esculetin 對 HL-60 細胞週期的改變是

發生在 G1 早期；相反的，在 H3B 中，esculetin 主要是造成 cyclin E 減少，而對於 HepG2 則需進一步探討。

根據過去研究粒腺體在 apoptosis 活化過程中扮演很重要的調節角色，包括一些酵素蛋白的活化、apoptosis-inducing factor(AIF)及 cytochrome c 的釋放(46)，結果在實驗中觀察到 esculetin 處理 HL-60 細胞 12 小時，cytochrome c 從 mitochondria 內釋放至 cytosol，進一步發現在處理 24 小時後，CPP32 有被活化分解及受質 PARP- γ 有被切割等現象，顯示 esculetin 導致 HL-60 細胞的 apoptosis 是透過 mitochondria：cytochrome c > CPP32 > PARP- γ 這條路徑。

許多研究發現 protooncogenes(如 Myc)會影響細胞的週期變化。由實驗結果發現，esculetin 處理 H3B 細胞 24 小時，c-Myc 的蛋白表現量有增加的情形，至 36 小時達最大量，而以 esculetin 處理細胞 24 小時，cyclin D 開始減少，處理 36 小時，cyclin E 明顯減少，此結果與 Jansen 等(31)提出 Myc 的 overexpression 會抑制 G1 cyclin 的蛋白表現相符合；除此 c-Myc 與細胞的增生、分化也有關，結果發現 esculetin 處理 H3B 48、72 小時，c-Myc 的蛋白表現量明顯減少，顯示 esculetin 可透過 c-Myc 抑制 H3B 的生長或促進其分化。有研究提到 p42/p44MAPK 除了和細胞增生有關外，其活化也可使 cyclin D1 promotor 活性及蛋白表現量增加，而 p38MAPK 的活化，則是使 cyclin D1 promotor 活性及蛋白表現量減少(34)，另外也有研究指出 p38MAPK 的磷酸化增加可促使細胞分化(35)。結果在本實驗中觀察到以 esculetin 處理 H3B 細胞，p38MAPK 磷酸化增加，p42/p44 MAPK 的磷酸化狀態並無意義之改變，而 cyclin D 的蛋白表現減少。綜合上述，以 esculetin 處理 H3B，會使 cyclin D 及 E 減少，導致細胞週期停滯在 G1 phase，而 c-Myc 也

會影響其週期變化，此外，也可透過 c-Myc 和 p38MAPK 抑制肝癌細胞株 H3B 的生長或促進其分化。

參考資料

1. Chang WS, and Chiang HC. Structure activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition .*Anticancer Res.* 15 : 1969-1974, 1995.
2. Tubaro A, Del NP, Ragazzi E, Zampiron S, and Della LR. Anti-inflammatory and peripheral analgesic activity of esculetin in vivo. *Pharmacol Res Commun*, 20 Suppl 5 : 83-85, 1988.
3. Holmanova J, Musilova E, and Kozubik A. Suppression of human cancer cell proliferation by lipoxygenase inhibitors and gamma-radiation in vitro, *Gen Physiol Biophys*, 15(4) : 317-331, 1996.
4. Matsunaga K, Ozaka Y, Yoshimi N, Yamada Y, Shimizu M, Kawabata K, Ozaka Y, hara A, and Mori H. Inhibitory effects of nabumetone, a cyclooxygenase-2 inhibitor, and esculetin , a lipoxygenase inhibitor, on N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rats. *Japanese Journal of Cancer Res.* 89(5) : 496-501, 1998.
5. Rose DP, and Connolly JM. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosonoid synthesis on growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.* 50 : 7139-7144, 1990.
6. Earashi m, Noguchi M ,and Tanaka M. In vitro effects of eicosanoid synthesis inhibitors in the presence of linoleic acid on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 37(1) : 29-37, 1996.
7. Paya M, Ferrandiz F, Miralles C, montesinos C, Ubeda A, and Alcaraz MJ. Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation. *Arzneimittel Forsch*, 43 : 655-658, 1993.

8. Paya M, Halliwell B, and Hoult JRS. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. *Biochem Pharmacology*, 44 : 205-214, 1992.
9. Hiramoto K, Ojima N, Sako KI, and Kikugawa K. Effects of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxy radical and the DNA strand breaking by hydroxy radical. *Bio Phar Bull*, 19 : 558-563, 1996.
10. Chang WS, and Chiang HC. Structure activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res*, 15(5B) : 1969-1973, 1995.
11. Chang WS, Lin CC, Chung SC, and Chiang HC. Superoxide anion scavenging of coumarins. *Am J Chin Med* 24(1) : 11-17, 1996.
12. Martin AS, Benedi JM, and Villar AM. Effects of the antioxidant (6,7-dihydroxycoumarin)esculetin on the glutathione system and lipid peroxidation in mice. *gerontology*, 44(1) : 21-25, 1998.
13. Gilani AH, Janbaz KH, and Shah BH. Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCL4. *Pharmacol Res*. 37(1) : 31-35, 1998.
14. Huang HC, Lai MW, Wang HR, Chung YL, Hsieh LM, and Chen CC. Antiproliferative effect of esculetin on vascular smooth muscle cells : possible roles of on signal transduction pathways. *European Journal of Pharmacology*, 237(1) : 39-44, 1993.
15. Huang HC, Hsieh LM, Chen HW, Lin YS, and Chen JS. Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*, 268(1) : 73-78, 1994.

16. Siegers CP, and Bostelmann HC. Effects of coumarin on cell lines. *J Irish Colleges Phys. Surg.* 22(2 Suppl.1) : 47-48, 1993.
17. Kahn J, Preis P, Waldman F. and Tseng AJ. Coumarin modulates the cell cycle progression of an MTV-EJras cell line. *Journal of cancer Research&Clinical Oncology*, 120 Suppl : S19-22, 1994.
18. Egan D., James P., Cooke D., and O'kenedy R. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action 8-nitro-7-hydroxycoumarin. *Cancer Letter*, 188(2) : 201-211, 1997.
19. Ito K, Sasano H, Yoshida Y, Sato S, and Yajima A. Immunohistochemical study of cyclins D and E and cyclin dependent kinase(cdk)2 and 4 in human endometrial carcinoma. *Anticancer Res*, 18(3A) : 1661-1664, 1998.
20. Tahara E. genetic alterations in human gastrointestinal cancer . the application to molecular diagnosis. *Cancer*, 75(6 Suppl) : 1410-1017, 1995.
21. Hunter, T., and Pines, J. Cyclin and cancer. *Cell*, 66 : 1071-1074, 1991.
22. Donnellan R, and Chetty R. Cyclin E in human cancer. *FASEB J*, 13(8) : 773-780, 1999.
23. Donnellan R, and Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Molecular Pathology*, 51(1) : 1-7, 1998.
24. Markus Hengstschlager, Katja Braum, Thomas Soucek, Angelina Miloloza, and Elke HO. Cyclin-dependent kinases at G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutation Research*, 436 : 1-9, 1999.
25. Nakamura S, Seto M, and Banno S. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 protein in hematopoeitic neoplasms with special reference to mantle cell lymphomas. *Jpn J Cancer Res*. 85 : 1270-1279, 1994.
26. Buckley MF, Sweeney KJ, and Hamilton JA. Expression and amplication of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, 8 : 2127-2133, 1993.
27. Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 196 : 1010-1016, 1993.

28. Leach F, Elledge S, and Sherr C. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res*, 53 : 1986-1989, 1993.
29. Tam, SW, Theodoras, AM, Shay, JW, Draetta, GF, and Pagano, M. Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumor human cells : association with Cdk-4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene*, 9 : 2663-2674, 1994.
30. Hass K, Staller P, Geisen C, Bartek J, Eilers M, and Morry T. Mutual requirement of CDK-4 and Myc in malignant transformation : evidence for cyclin D1/CDK-4 and P16^{INK4} as upstream regulators of Myc. *Oncogene*, 15 : 179-192, 1997.
31. Steiner P, Philipp A, Lukas J, Godden KT, Pagano M, Mittnacht S, Bartek J, and Eilers M. Identification of a Myc-dependent step during formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* 14 : 4814- 4826, 1995.
32. Pusch O, Bernaschek G., Eilers M., Hengstsich M. Activation of c-Myc uncouples DNA replication from Activation of G1-cyclin-dependent-kinases. *Oncogene*, 15 : 649-656, 1997.
33. Jansen DP, Meichle A, Steiner P, Pagano M, Finkle K, Botz J, Wessbecher J, Draetta G, and Eilers M. Differential modulation of cyclin gene expression by Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 3685-3689, 1993.
34. Josse NL, Gilles L'Allemain, Anne Brunet, Rolf Muller, and Jacques Pouyssegur. Cyclin D1 expression is regulated positively by the P42/P44^{MAPK} and negatively by the P38/HOG^{MAPK} pathway. *The Journal Biological Chemistry*, 271(34) : 20268-20616, 1996.
35. Takaya Morooka and Eishida Nishida. Requirement of p38 Mitogen-activated protein kinase of neuronal differentiation in PC12 cells. 36. Oltvai, Z., Milliman, C., and Korsmeyer, S. Bcl-2 heterdimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74 : 609-619, 1993.

36. Oltvai Z, Milliman C, and Korsmeyer S. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74 : 609-619, 1993.
37. Oltvai, Z., Korsmeyer, S. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*, 79 : 189-192, 1994.
38. Wang, X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, and Goldstein JL. Cleavage of sterol regulatory element binding protein(SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J*, 15 : 1012-1020, 1996.
39. Duan H, Chinnaiyan AH, Hudson PL, Wing JP, He W, and Dixit VM. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein ced-3 is activated during Fas and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol. Chem*, 271 : 1621-1625, 1996.
40. Schlegel J, Peter I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA., Yamin YY, and Nocholson WD. CPP32/Apopain is a key interleukin-1 β converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol. Chem*, 271 : 1841-1844, 1996.
41. Nocholson WD, Ali A., Thornberry NA., Valliancourt JP, Ding CK, Gallant M., Gareau Y, Griffin PR., Labelle M, Lazebnik YA, Munday, NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, and Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/CED3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376 : 37-43, 1995.
42. Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, and Earnshaw WC. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 92 : 9042-9046, 1995.
43. Liu X., Kim CN, Yang J, Jemmerson R., and Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extract : requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86 : 147-158, 1996.
44. Zou H, Henzel WJ, Liu XLA., and Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell*, 90 : 405-413, 1997.

45. Alley MC, Scudiero DA, Monks A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 48 : 599-601, 1988.
46. Skulachev VP. (minireview) Cytochrome c in apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, 423 : 275-280, 1998.

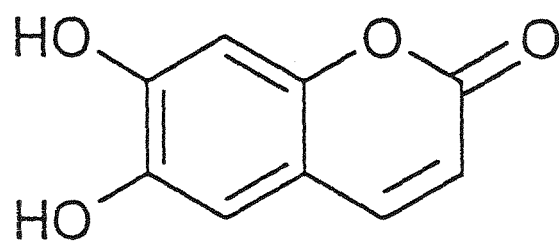


Fig 1. Structure of esculetin

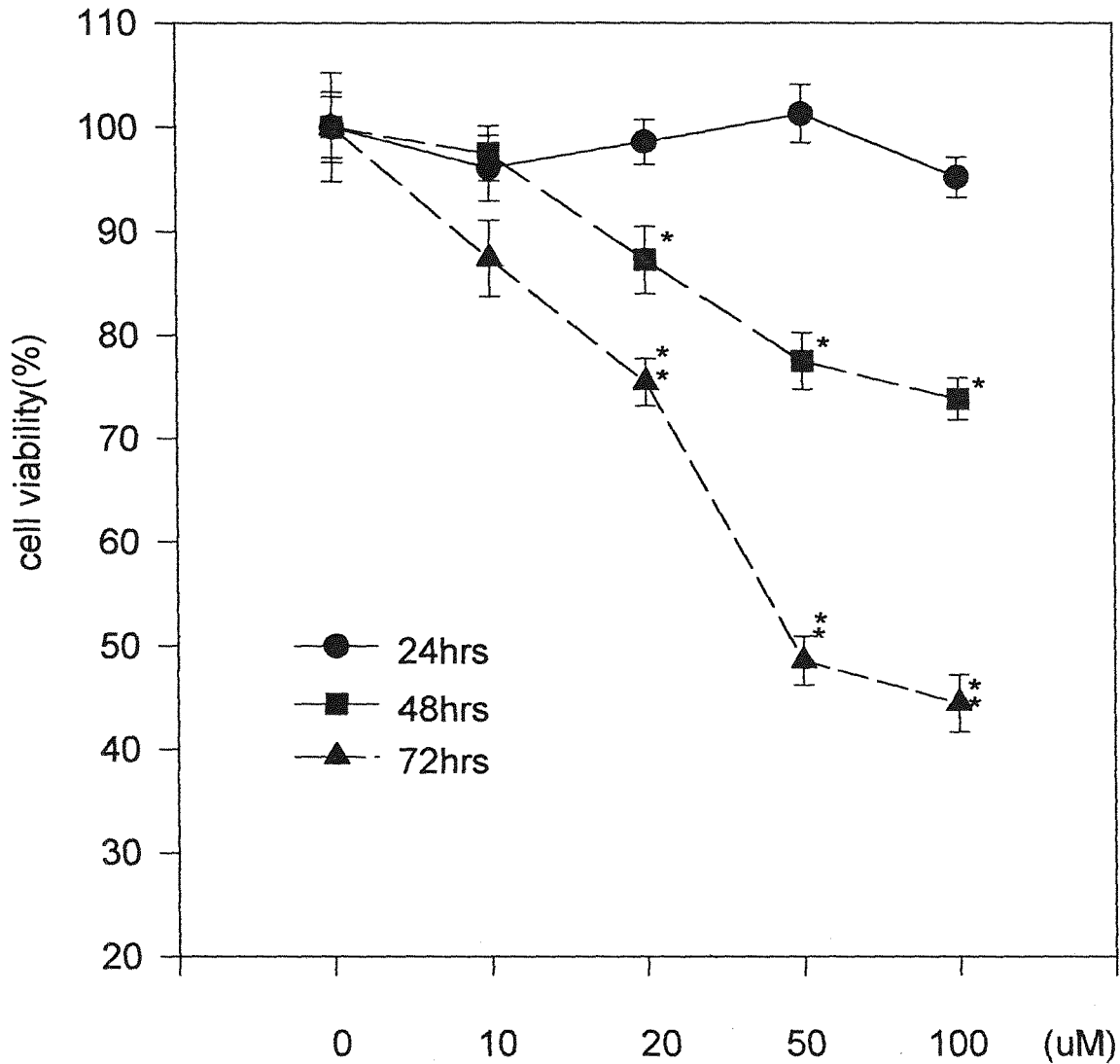


Fig 2. Cytotoxicity of esculetin in H3B. H3B cell were treated with various concentration of esculetin for 24、48、72hours, then incubated with MTT for 4 hours. Data represented as percent of 100μM esculetin.(control group : 0.2% DMSO).

*P<0.1 , **P<0.01

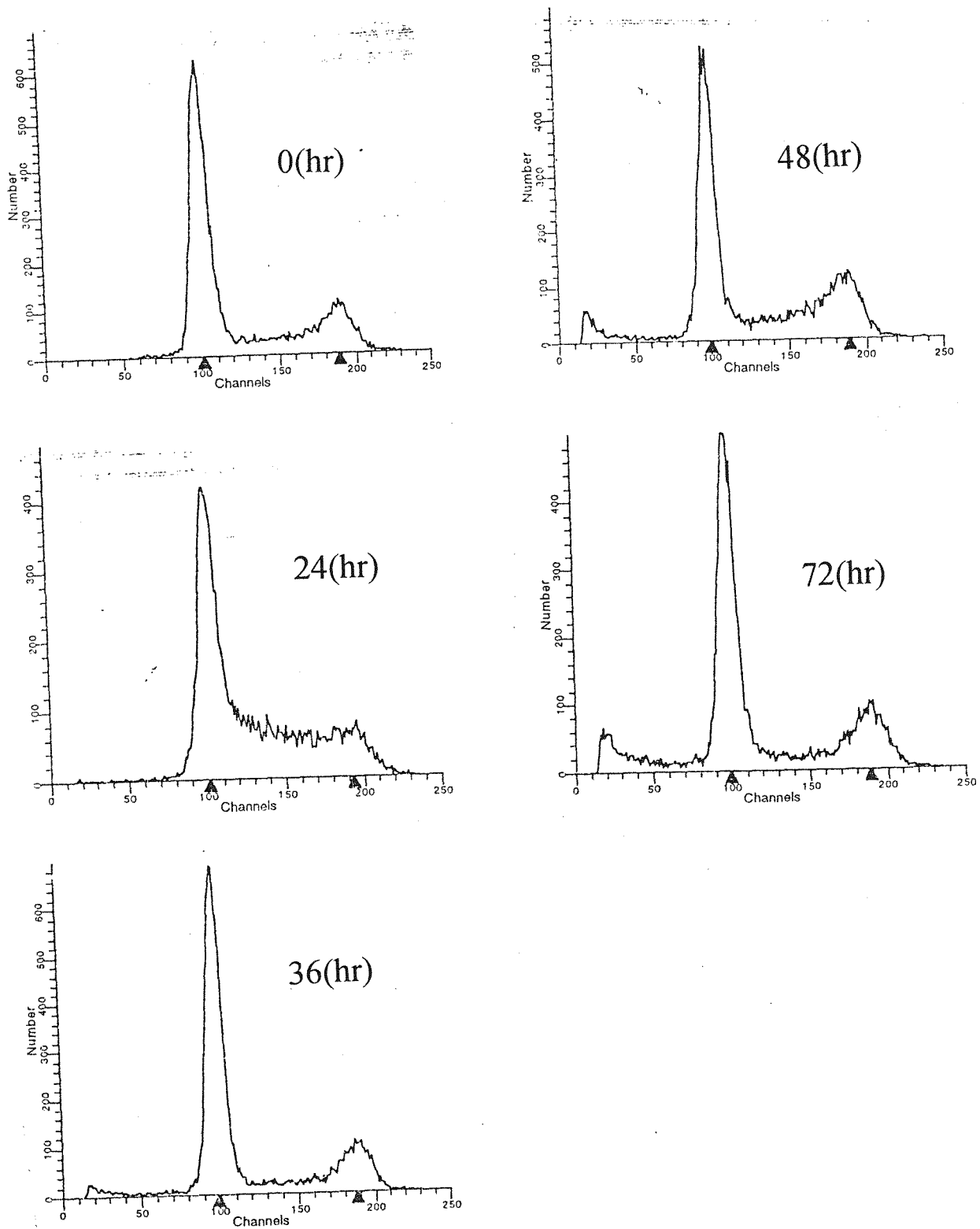


Fig 3. Flow cytometry analysis of H3B. H3B cells were incubated with 100 μ M esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed with 80% ice-ethanol and stained with propidium iodide and the DNA content was analysis by flow cytometry.

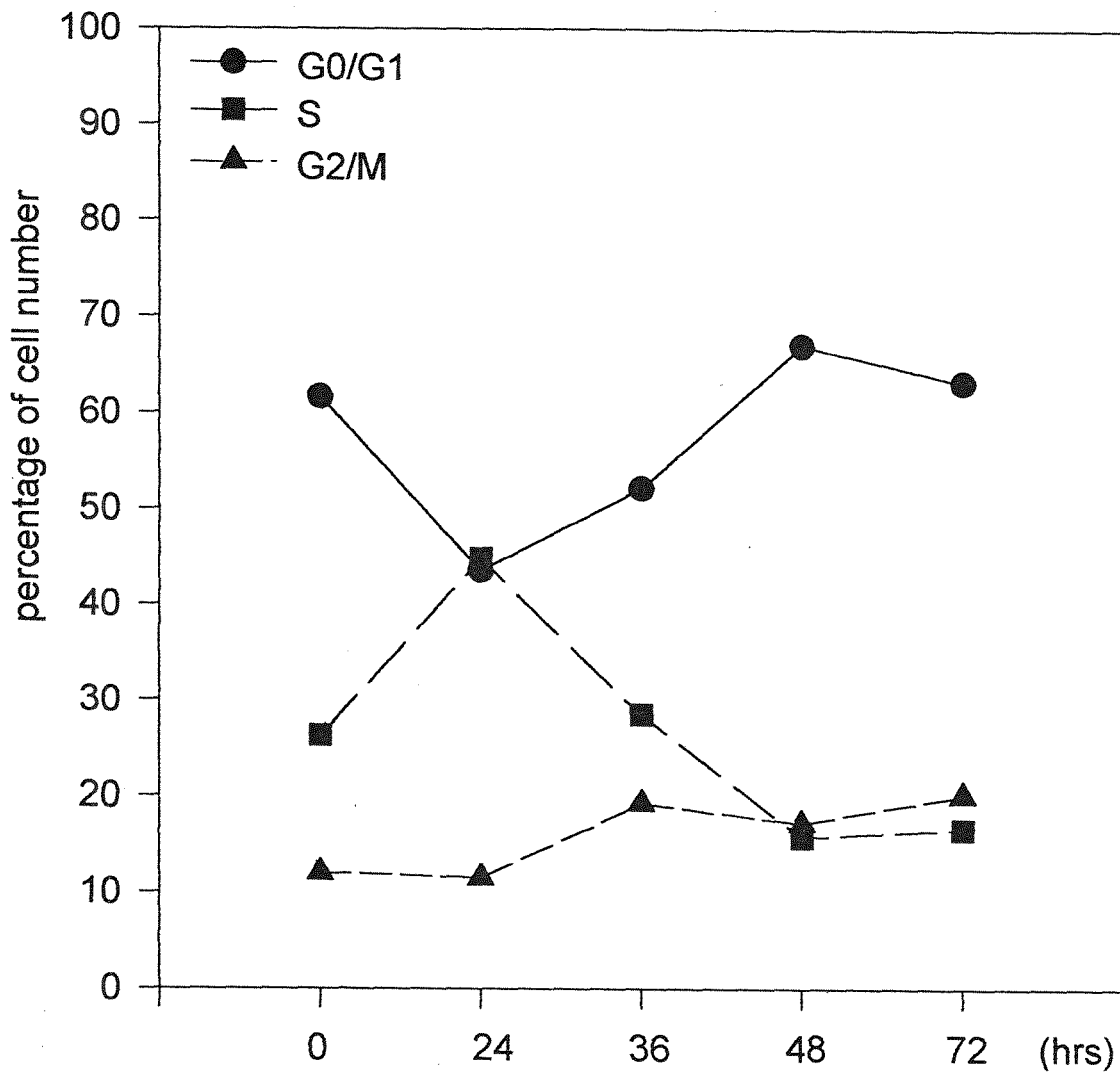


Fig 4. Redistribution of cell cycle induced by esculetin. H3B cells were incubated with 100 μ M esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed with 80% ice-ethanol and stained with propidium iodide and the DNA content was analysis by flow cytometry. The number of cells in each phase of cell cycle was calculated.

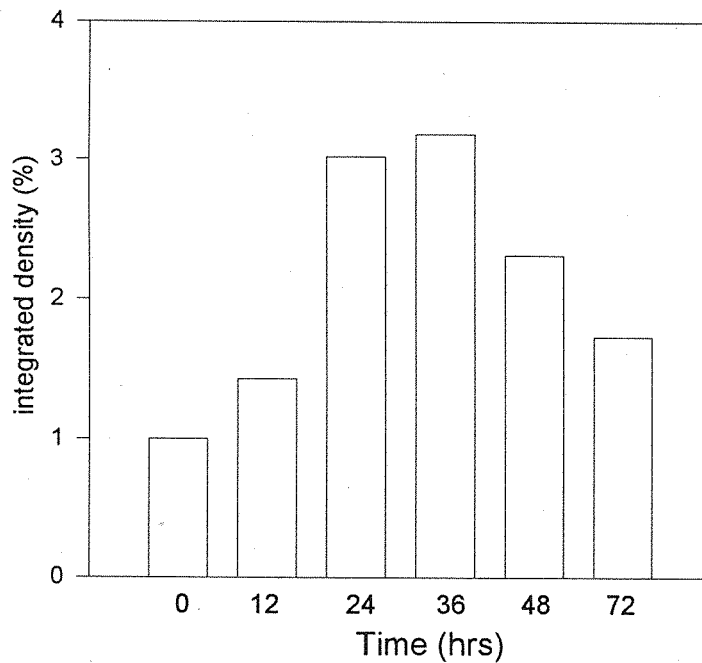
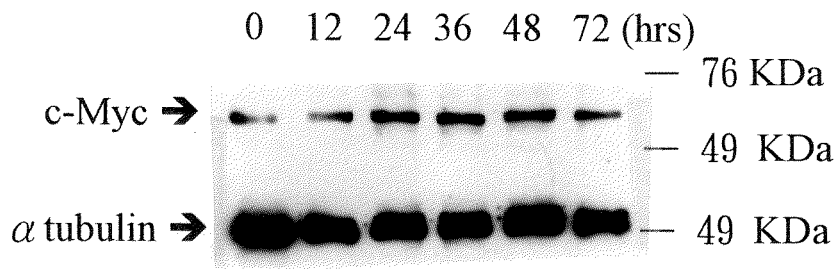


Fig 5. Effects of esculetin on c-Myc protein expressed in H3B. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electro-phoresed 10% SDS-PAGE, and blotted.

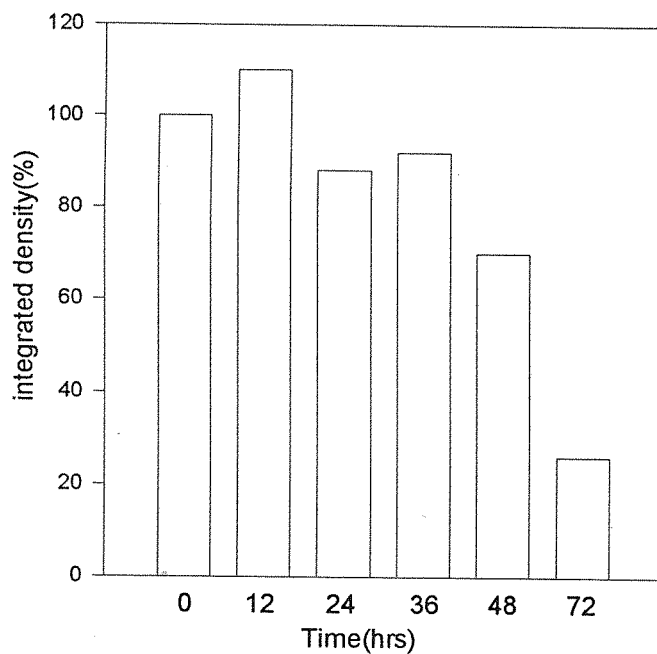
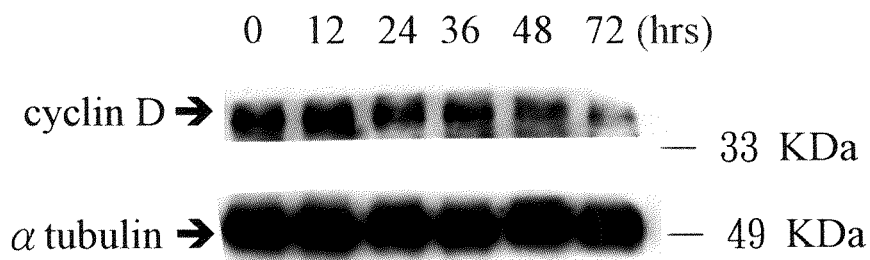


Fig 6. Effects of esculetin on cyclin D protein expressed in H3B. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 12% SDS-PAGE, and blotted.

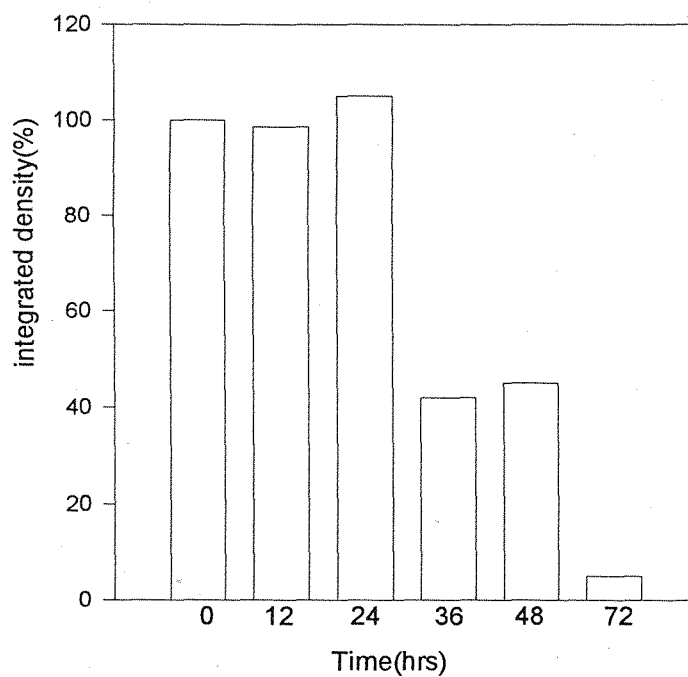
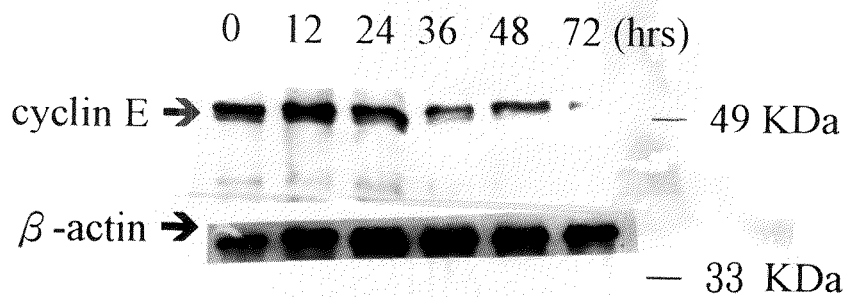


Fig. 7. Time course effect of esculetin on cyclin E protein expression in H3B. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electro-phoresed 10% SDS-PAGE, and blotted.

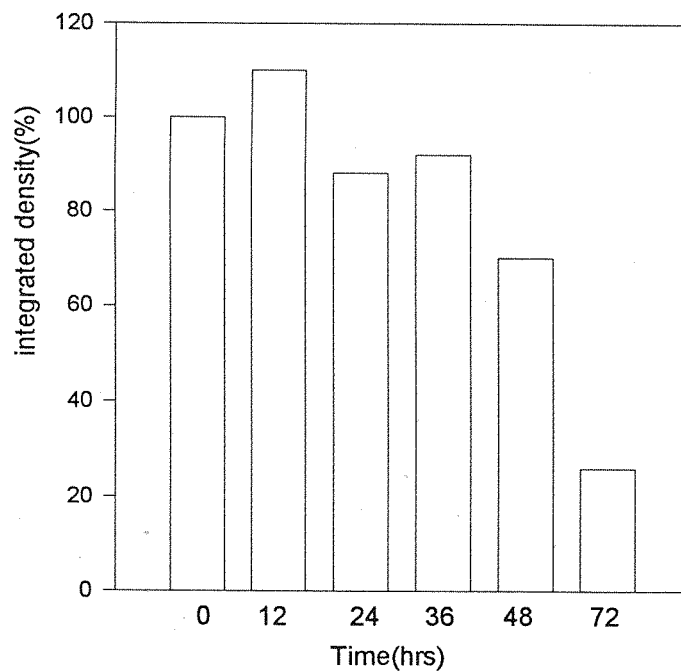
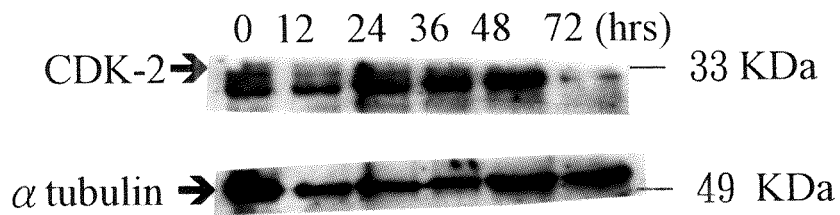


Fig.8. Effects of esculletin on Cdk-2 protein expressed in H3B. Cells were treated with 100 μ M esculletin for various times. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 12% SDS-PAGE, and blotted.

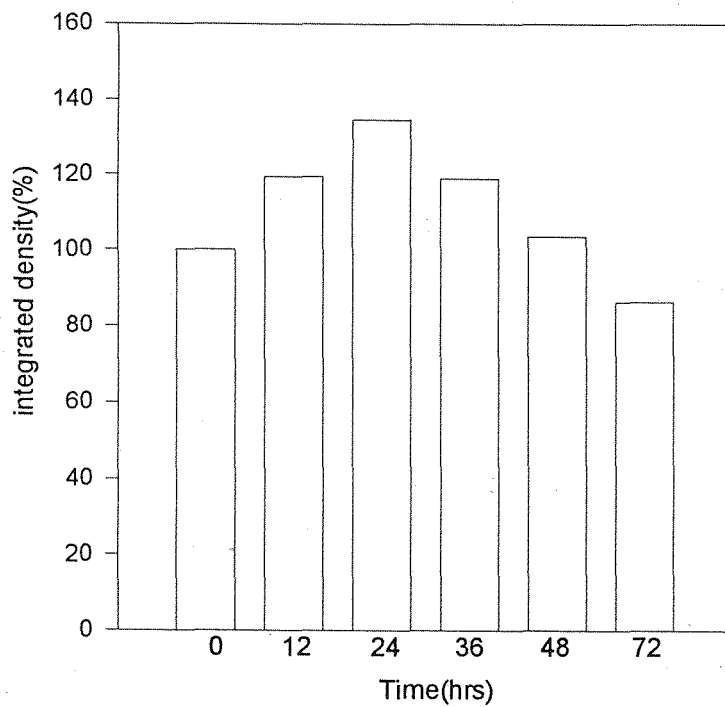
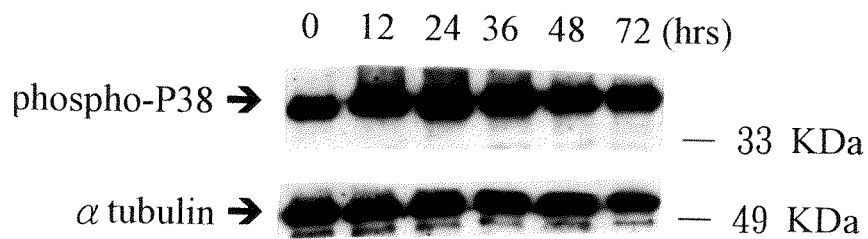


Fig. 9. Time course effect of esculetin on phospho-p38 protein expression in H3B. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 12% SDS-PAGE, and blotted.

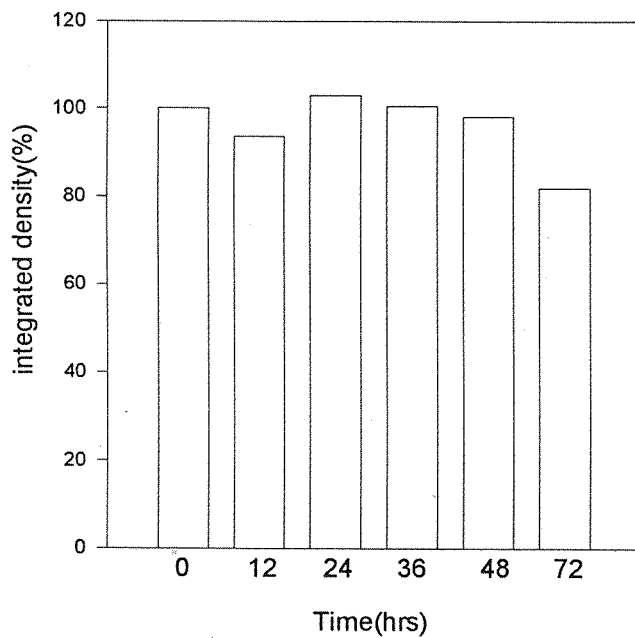
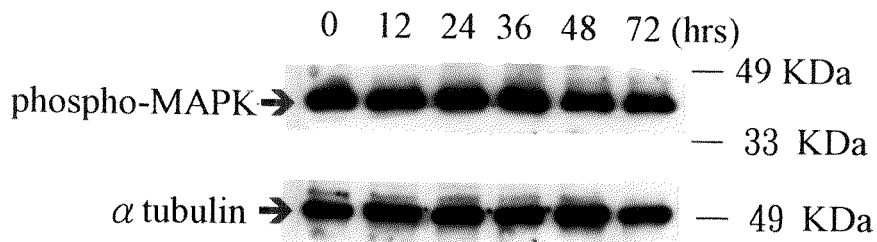


Fig.10. Time course effect of esculetin on phospho-MAPK protein expression in H3B. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 10% SDS-PAGE, and blotted.

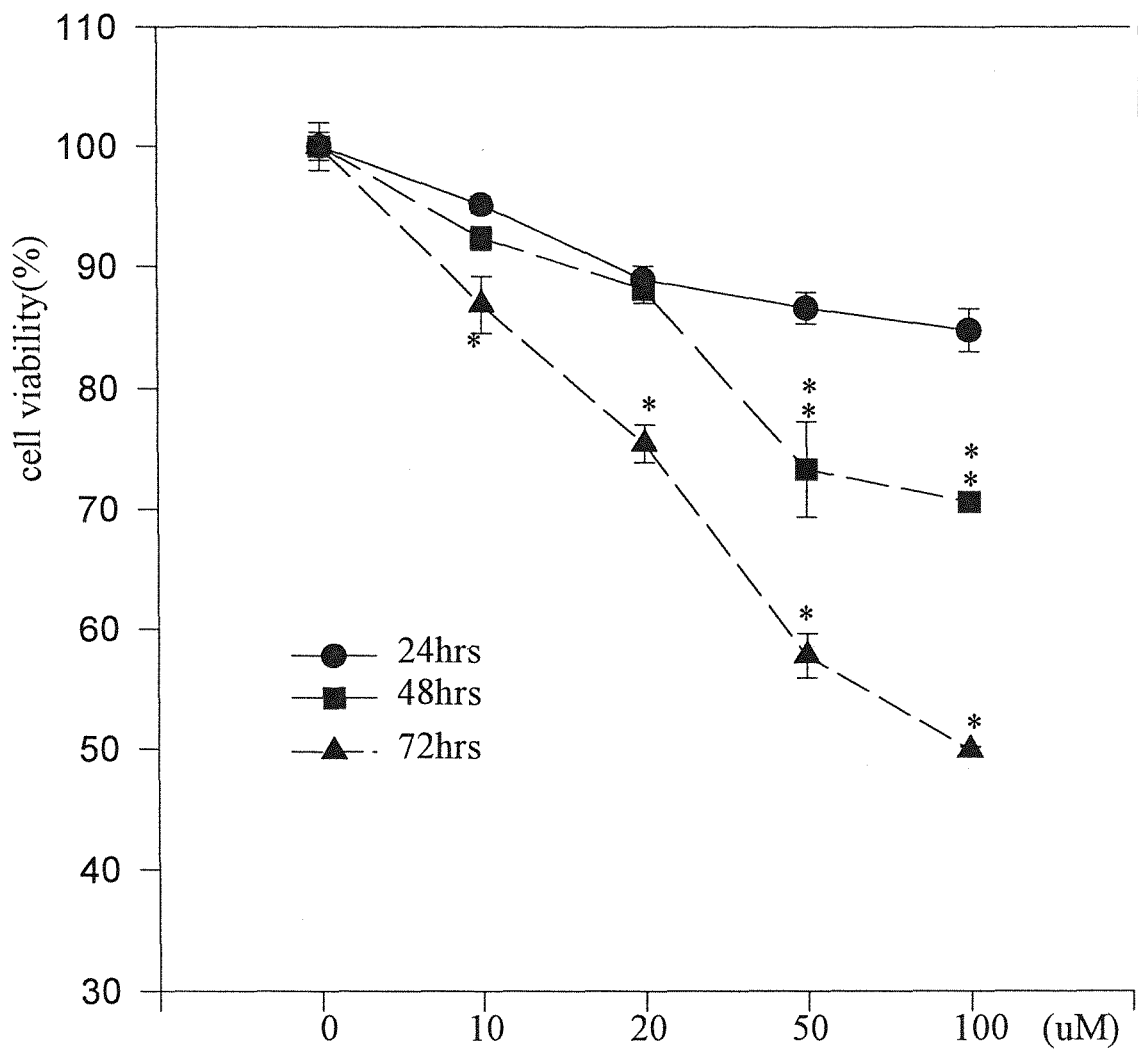


Fig 11. Cytotoxicity of esculetin in HepG2. HepG2 cell were treated with various concentration of esculetin for 24、48、72hours, then incubated with MTT for 4 hours. Data re-presented as percent of 100 μ M esculetin.(control group : 0.2% DMSO). *P<0.1 , **P<0.01

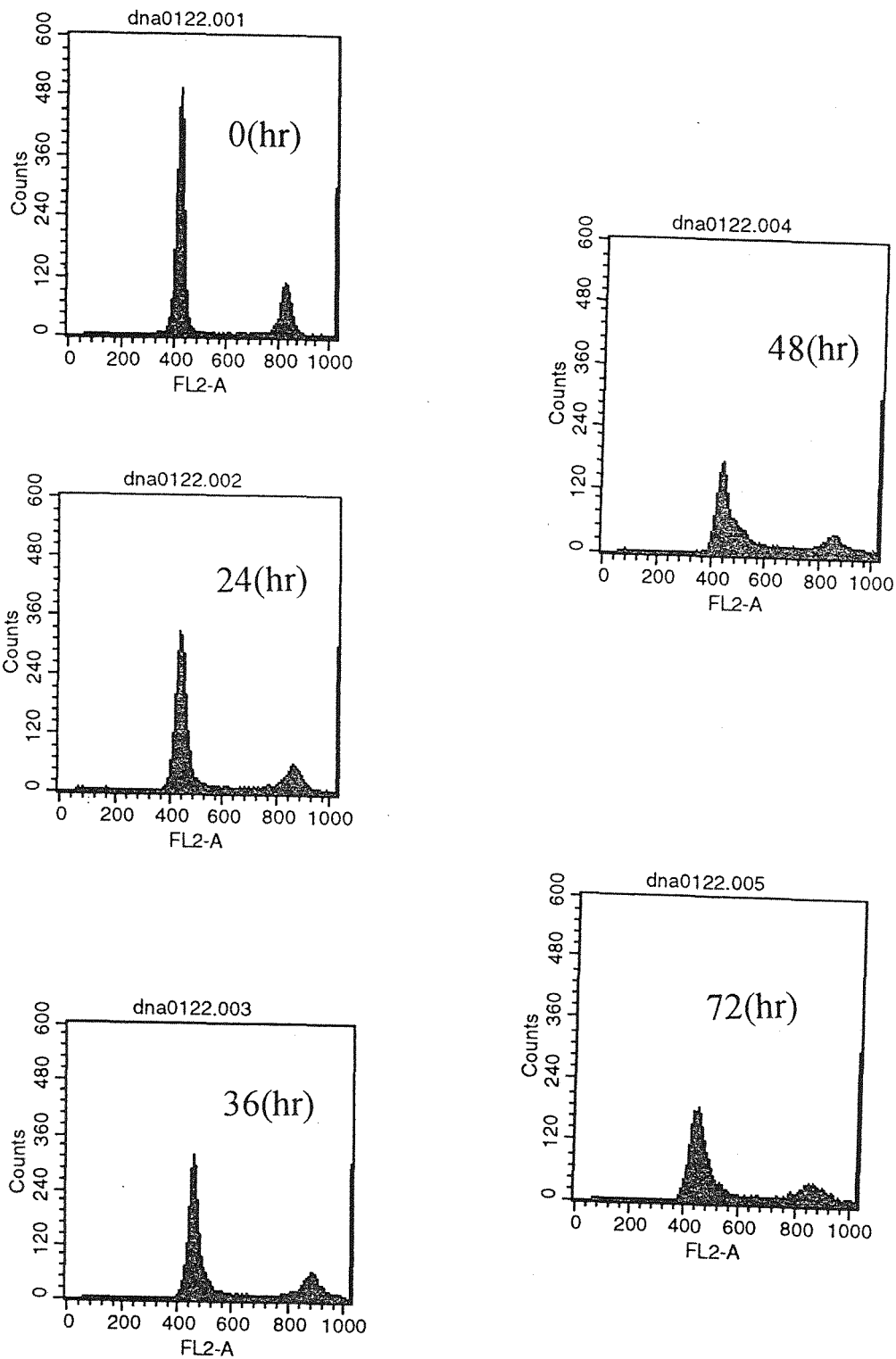


Fig 12. Flow cytometry analysis of HepG2. HepG2 cells were incubated with 100 μ M esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed with 80% ice-ethanol and stained with propidium iodide and the DNA content was analysis by flow cytometry.

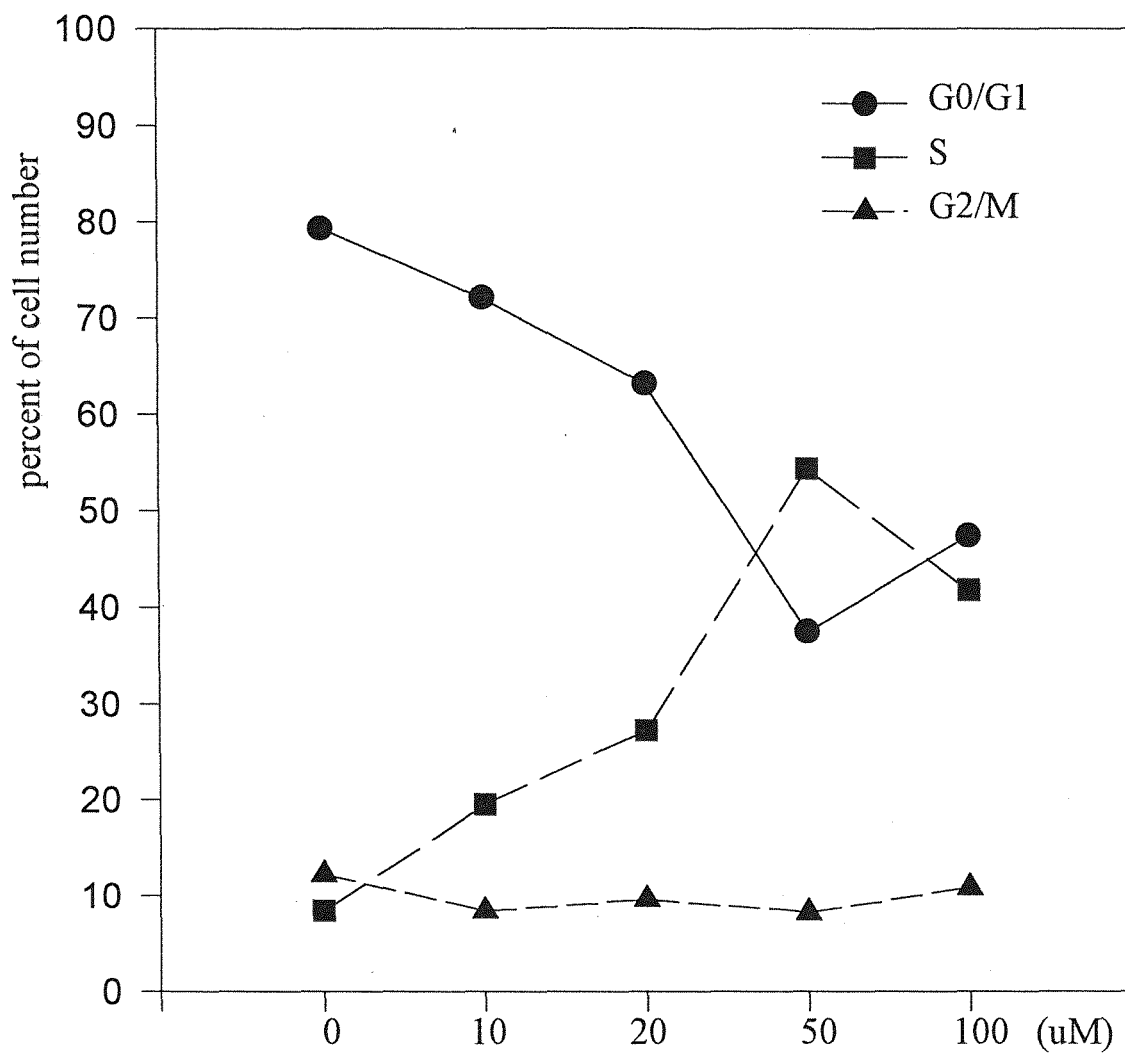


Fig 13. Redistribution of cell cycle induced by esculetin. HepG2 cells were incubated with 100 μ M esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed with 80% ice-ethanol and stained with propidium iodide and the DNA content was analysis by flow cytometry. The number of cells in each phase of cell cycle was calculated.

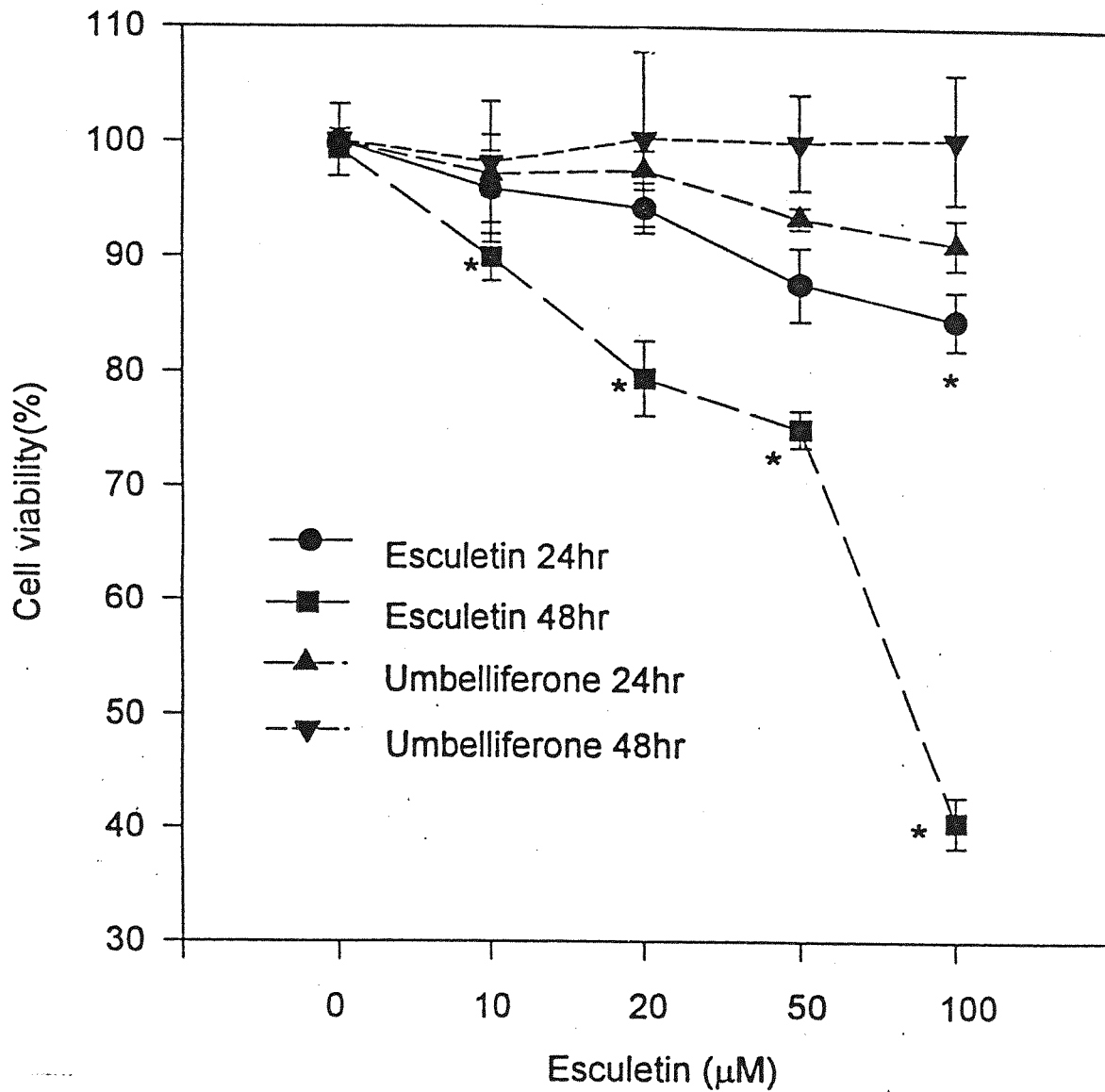


Fig.14 Cytotoxicity of esculetin in HL-60. HL-60 cell were treated with various concentration of esculetin for 24、48、hours, then incubated with MTT for 4 hours. Data represented as percent of 100μM esculetin.(control group : 0.2% DMSO). *P<0.1 , **P<0.01

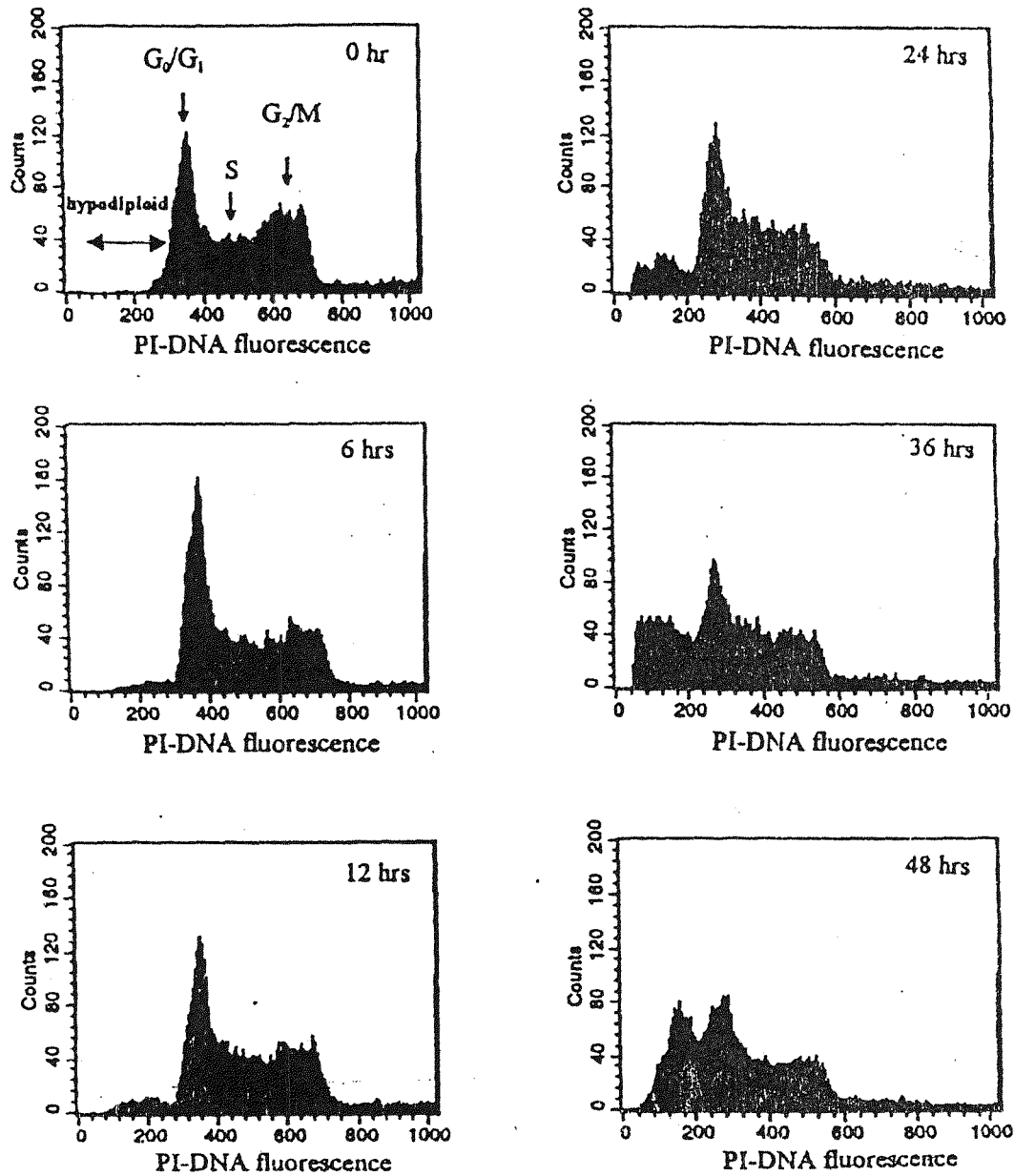


Fig 15. Flow cytometry analysis of HL-60. HL-60 cells were incubated with 100μM esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed with 80% ice-ethanol and stained with propidium iodide and the DNA content was analysis by flow cytometer.

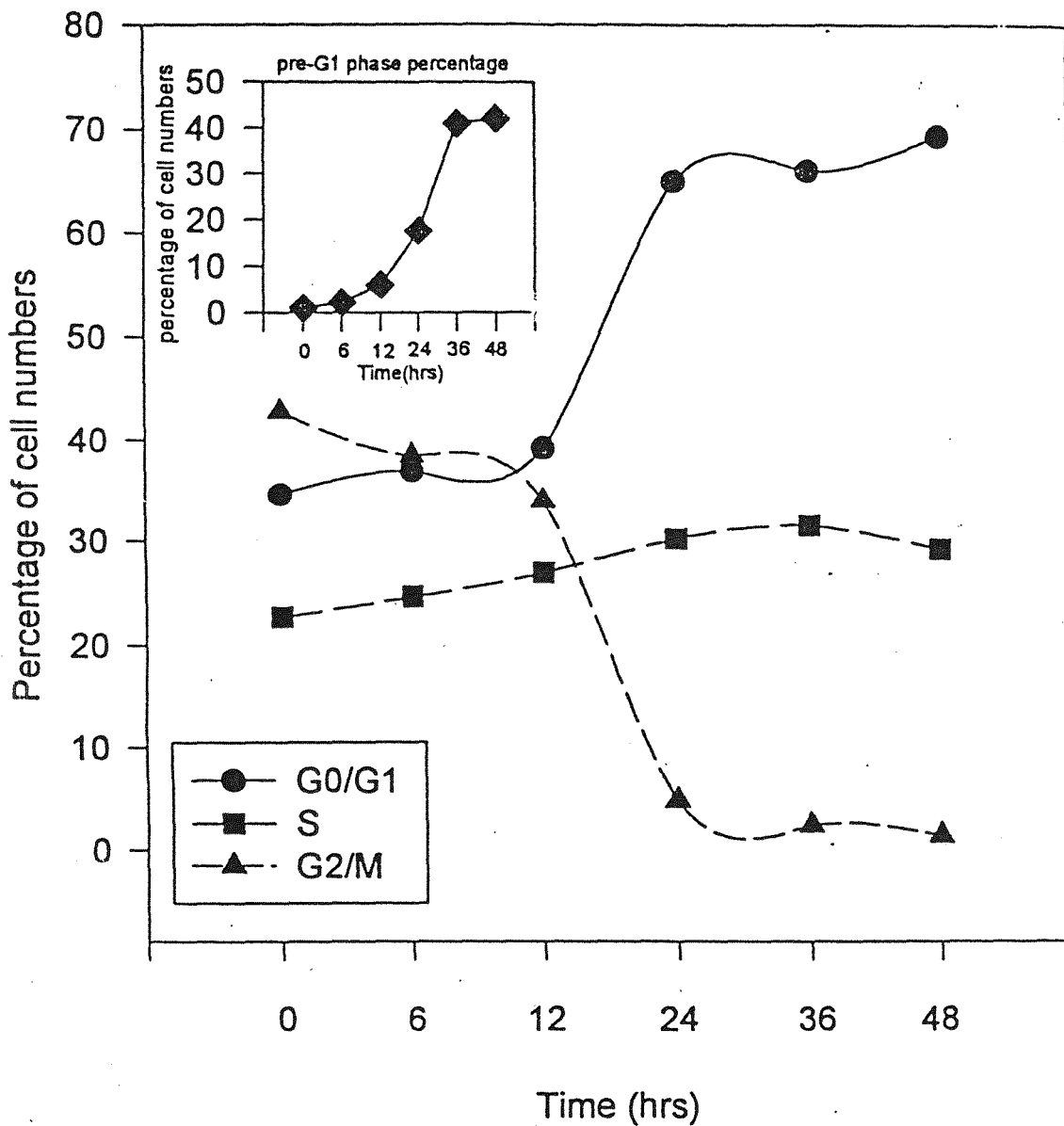


Fig 16. Redistribution of cell cycle induced by esculletin. HL-60 cells were incubated with 100 μ M esculletin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed with 80% ice-ethanol and stained with propidium iodide and the DNA content was analysis by flow cytometry. The number of cells in each phase of cell cycle was calculated.

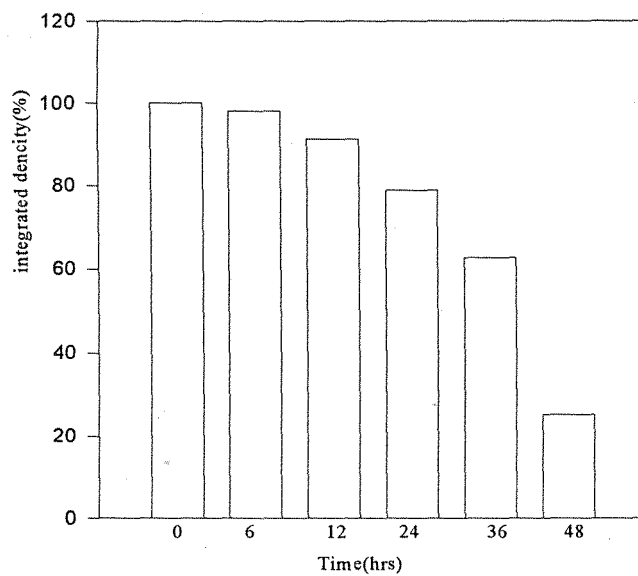
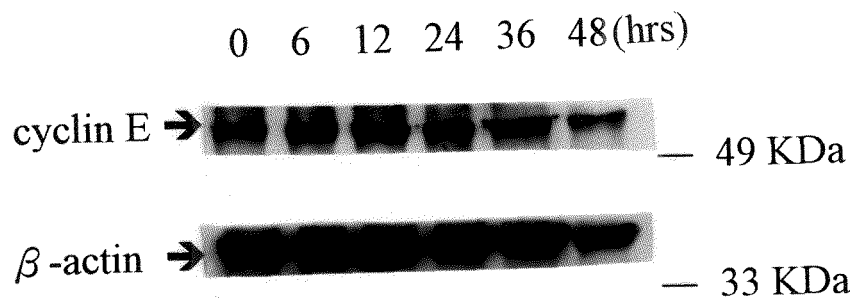


Fig. 17. Effects of esculetin on cyclin E protein expressed in HL-60. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electro-phoresed 10% SDS-PAGE, and blotted.

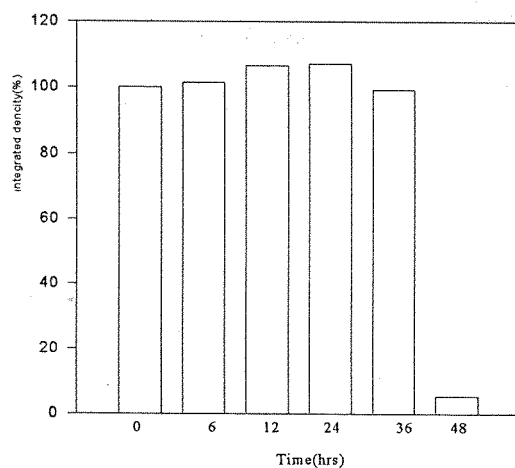
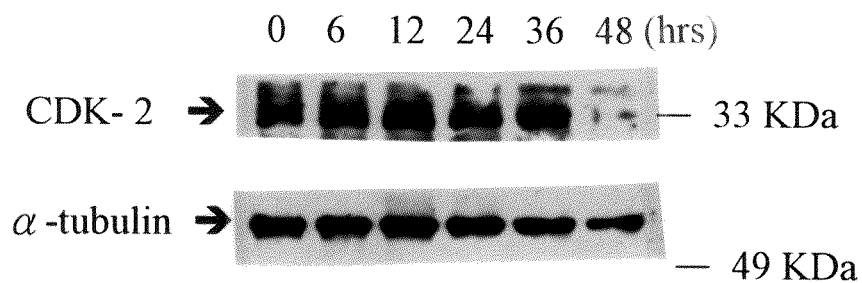


Fig. 18. Effects of esculetin on Cdk-2 protein expressed in HL-60. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electro-phoresed 12% SDS-PAGE, and blotted.

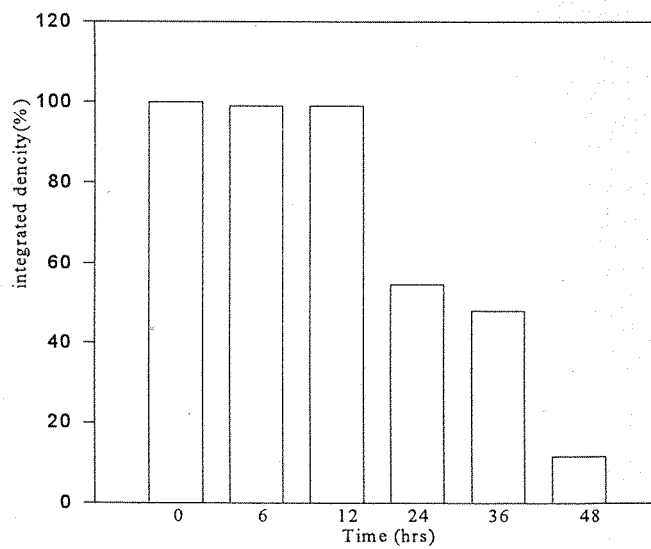
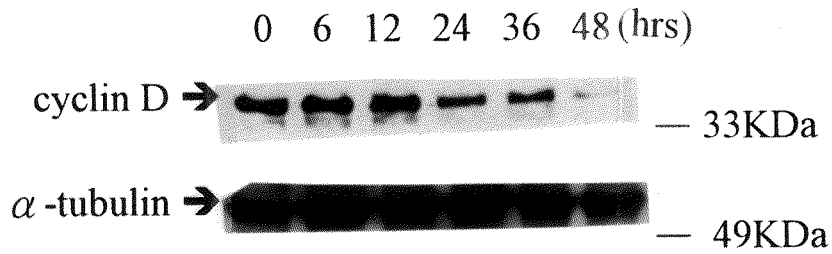


Fig. 19. Effects of esculetin on cyclin D protein expressed in HL-60. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electro-phoresed 12% SDS-PAGE, and blotted.

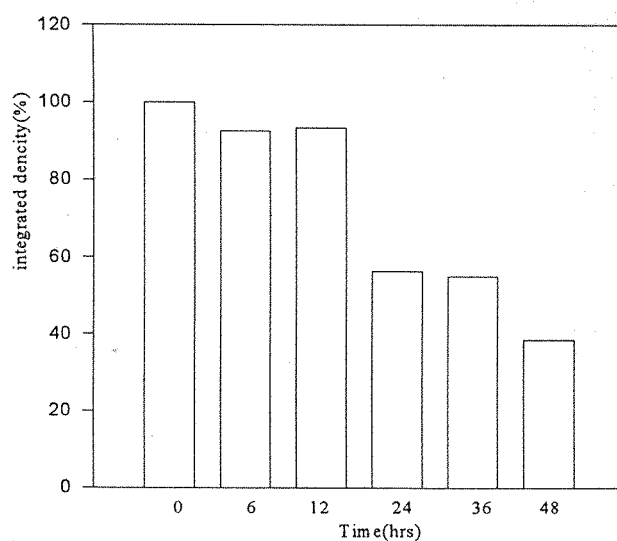
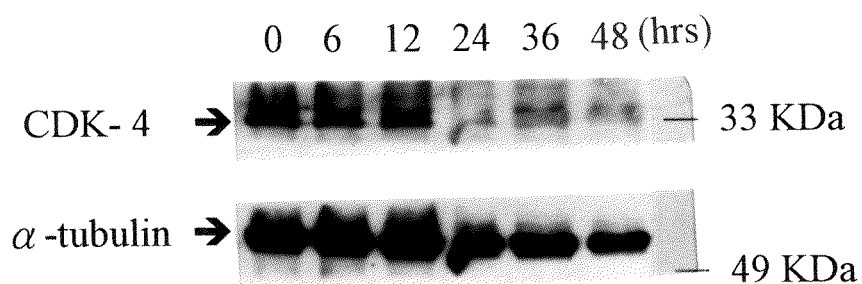


Fig. 20. Effects of esculetin on Cdk-4 protein expressed in HL-60. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electro-phoresed 12% SDS-PAGE, and blotted.

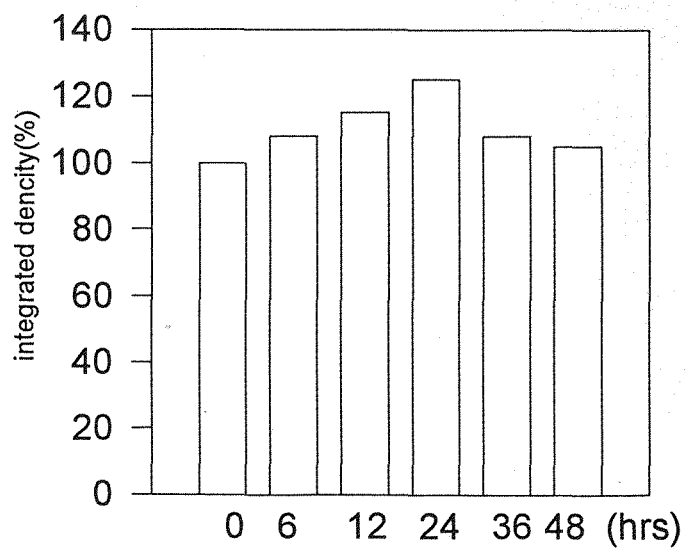
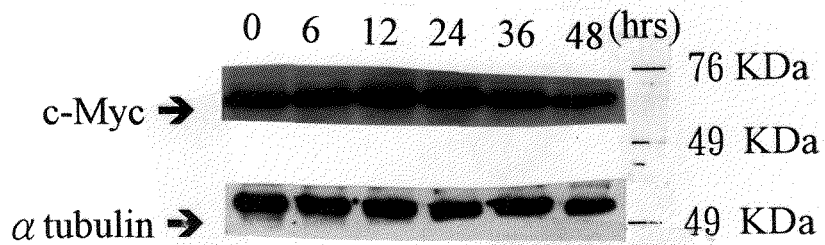


Fig.21. Effects of esculetin on c-Myc protein expressed in HL-60. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 10% SDS-PAGE, and blotted.

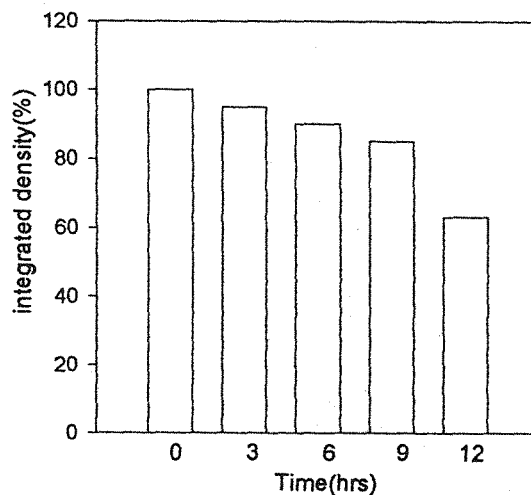
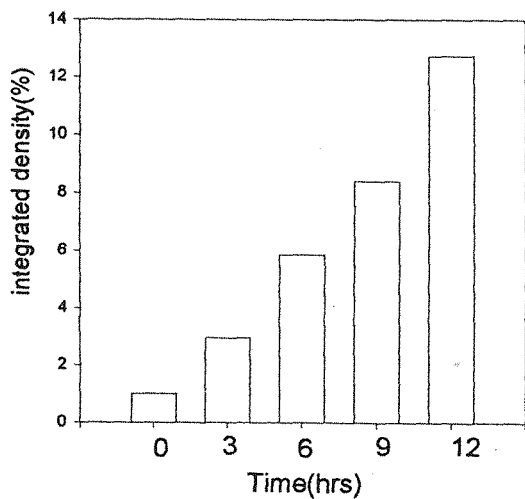
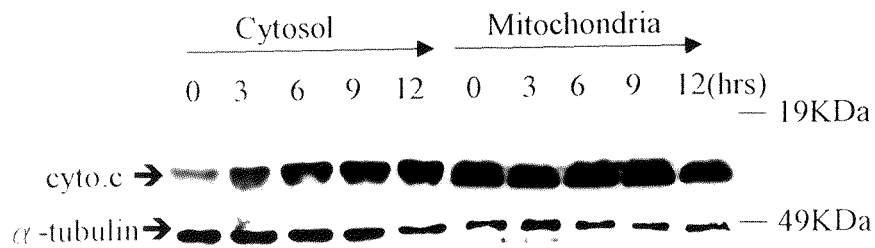


Fig.22. Time course effect of esculetin on cytochrome c protein expression in HL-60. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 15% SDS-PAGE, and blotted.

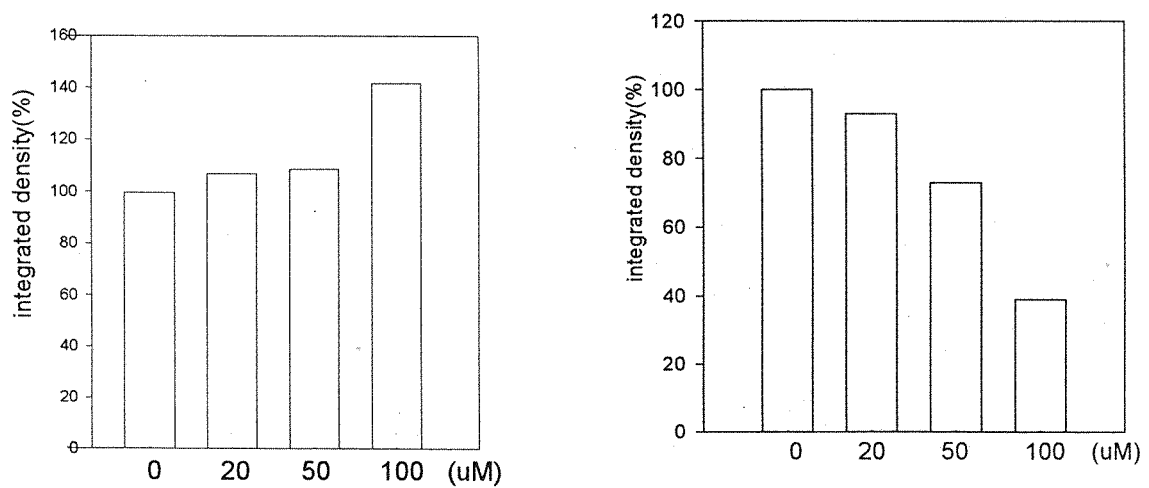
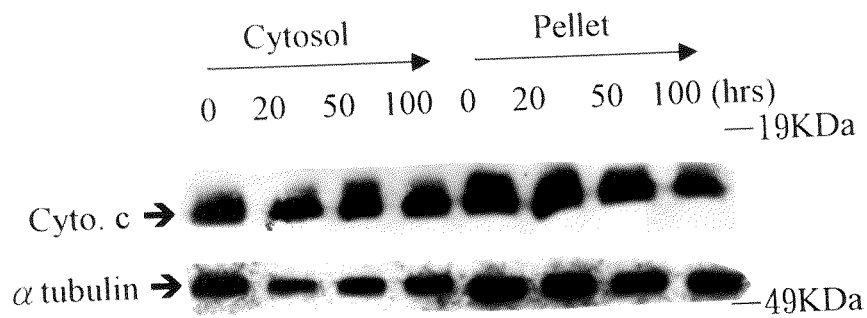


Fig.23 Dose course effect of esculetin on cytochrome c protein expression in HL-60. Cells were treated with various concentration esculetin. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 15% SDS-PAGE, and blotted.

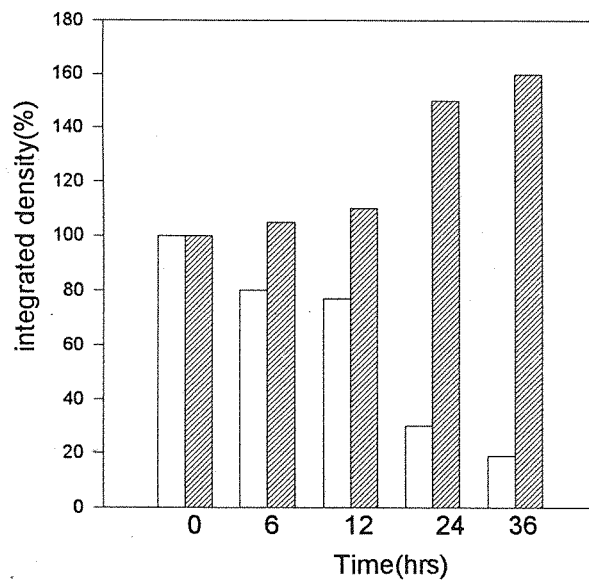
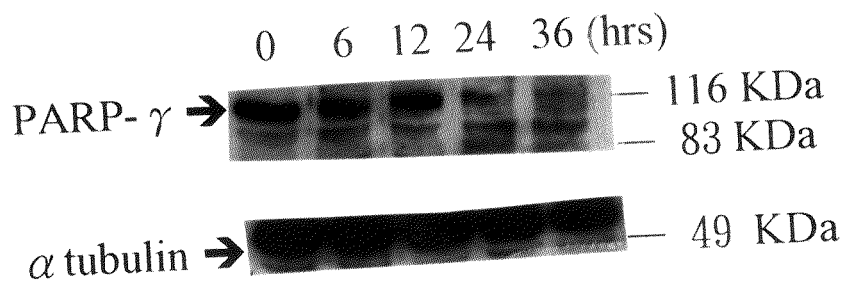


Fig. 24. Time course effect of esculetin on PARP- γ protein expression in HL-60. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates were electrophoresed 8% SDS-PAGE, and blotted.

