

R
0688
4404
87

中山醫學院生物化學研究所碩士論文

PART I Baicalein 抗氧化及抗癌作用之機制研究

(一) Baicalein 對 tert-Butyl Hydroperoxide 誘發
大白鼠肝細胞氧化性損傷之保護作用機制探討

(二) Baicalein 抗 TPA 促癌作用及機制研究

PART II Esculetin 誘發人類白血癌細胞(HL-60)凋亡及其 機制之探討

PART I Studies on the antioxidant and antitumor activity of baicalein

(1) Baicalein protects against oxidative damage
induced by tert-butyl hydroperoxide in rat
hepatocytes.

(2) Antitumor-promoting activity and mechanism
of action of baicalein

PART II Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells

指導教授：朱嘉一 教授 (Chia-Yih Chu)

曾翠華 教授 (Tsui-Hwa Tseng)

研究生：蔡育英 (Yu-Ying Tsai) 撰

參考書恕不外借

中華民國八十七年七月

中山醫學院圖書館



C050042

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
_____ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：PART I Baicalein 抗氧化及抗癌作用之機制研究

(一) Baicalein 對 tert-Butyl Hydroperoxide 誘發大白鼠肝細胞氧化性損傷之保護作用機制探討

(二) Baicalein 抗 TPA 促癌作用及機制研究

PART II Esculetin 誘發人類白血癌細胞(HL-60)凋亡及其機制之探討

同意 不同意

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

同意 不同意

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

同意 不同意

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

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

指導教授姓名：朱嘉一、曾翠華

研究生簽名：蔡育昇 學號：R85206
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 8 月 1 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

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

研究生姓名：梁育英 聯絡電話：02-86656282

地址：北京新店市中國路三段227號7F

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

口試委員：

臺灣大學醫學院
生物化學研究所教授

林仁混 教授

林仁混

陽明大學
生物化學研究所教授

魏耀揮 教授

魏耀揮

中山醫學院
生物化學研究所教授

王朝鐘 教授

王朝鐘

中山醫學院
生物化學研究所教授
(本論文指導教授)

朱嘉一 教授

朱嘉一

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

中華民國八十七年六月

學生蔡育英論文題目為 PART I Baicalein 抗氧化及抗癌作用之機制研究(一)Baicalein 對 tert-Butyl Hydroperoxide 誘發大白鼠肝細胞氧化性損傷之保護作用機制探討(二)Baicalein 抗 TPA 促癌作用及機制研究 PART II Esculetin 誘發人類白血癌細胞(HL-60)凋亡及其機制之探討，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並經由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：

朱嘉一 教授

簽名：



曾翠華 教授

簽名：



中華民國八十七年七月

誌 謝

這兩年研究生活對我而言，真是來匆匆去匆匆，但帶給我的收獲卻是好多好多，真是筆墨難以形容，在研究過程體會到實驗的失敗挫折，也得到辛苦代價後的喜悅。本論文承蒙台大生化所林仁混教授和陽明大學生生化所魏耀輝教授在繁忙之中撥冗審查，給我許多珍貴的意見，讓我有更深一層的想法觀念，實在收獲良多。

這兩年碩士班生涯，非常感謝我的指導老師曾翠華、朱嘉一老師，在研究過程給我指導和幫助，並對我生活上時時關心，讓我感受到溫暖；同時亦感謝王朝鐘老師、周芬碧老師、劉哲育老師、謝易修老師、陳凌雲老師、馬明琪老師、黃俊銘老師、胡超群老師等平日的關心與課業上的指導，點點滴滴的感激都會存放在我的內心。此外，謝謝元志、愛琪在我遭受人生低潮時陪伴在我身邊，給我鼓勵和安慰，也謝謝羅銘香、李妙真學姐、玉娟、彥敏、育津、俊民、曉薇、朝祿、林吳、韋如、岑彥、妙如等同學及學弟妹在我實驗過程的幫忙並在實驗室中製造許多歡樂的氣氛。並感謝病理科林偉隆醫師對細胞形態及組織切片上的幫助及徐再靜學姐對細胞週期測定的協助。

非常謝謝親愛的維哲常在深夜陪伴我度過許多實驗的夜晚，分享我的憂傷與快樂，最後感謝我爸媽及小弟的支持讓我順利如期的完成碩士班學業，願將本論文獻給所有我愛的人及愛我的人。

蔡育英 謹誌於
中山醫學院生物化學研究所
中華民國八十七年七月

縮 寫 表

PART I Baicalein 抗氧化及抗癌作用之機制研究

(一)Baicalein 對 tert-Butyl Hydroperoxide 誘發大白鼠肝 細胞氧化性損傷之保護作用機制探討

BAL : baicalein

t-BHP : tert-butyl hydroperoxide

DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

UDS : unscheduled DNA synthesis

8-OH-dG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

MDA : malondialdehyde

ALT : alanine transaminase

LDH : lactate dehydrogenase

MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

(二)Baicalein 抗 TPA 促癌作用及機制研究

B[a]P : benzo[a]pyrene

TPA : 12-O-Trtradecanoylphorbol-13-acetate

ODC : ornithine decarboxylase

H₂O₂ : hydrogen peroxide

MPO : myeloperoxidase

PART II Esculetin 誘發人類白血癌細胞(HL-60)凋亡及其機制之探討

MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

HL-60 : Human leukaemia cell line

FACS ; flow cytometer

PKC δ : protein kinase C δ

目 錄

PART I Baicalein抗氧化及抗癌作用之機制研究

(一)Baicalein對tert-Butyl Hydroperoxide誘發大白鼠肝細胞 氧化性損傷之保護作用機制探討

	頁碼
目錄	1
中文摘要	5
英文摘要	6
緒論	7
研究目的	10
研究方法	11
結果	19
討論	22
參考文獻	25
附圖(表)	
圖一	30
表一	31
表二	32
表三	33
圖二	34
圖三	35
圖四	36
圖五	37

圖六	38
----------	----

(二)Baicalein抗TPA促癌作用及機制研究

中文摘要	39
英文摘要	40
緒論	41
研究目的	44
研究方法	45
結果	55
討論	58
參考文獻	60
附圖(表)	
圖一	63
圖二	64
圖三	65
圖四	66
表一	67
表二	68
圖五	69
表三	70
表四	71
表五	72

PART II Esculetin誘發人類白血癌細胞(HL-60)凋亡及其機制之探討

中文摘要	73
英文摘要	74
緒論	76
研究目的	80
研究方法	81
結果	88
討論	92
參考文獻	95
附圖(表)	
圖一	102
圖二	103
圖三	104
圖四	105
圖五	106
圖六	107
圖七	108
圖八	109
圖九	110
圖十	111
圖十一	112
圖十二	113
圖十三	114
圖十四	115

圖十五 116

圖十六 117

PART I Baicalein 抗氧化及抗癌作用之機制研究

**(一) Baicalein 對 tert-Butyl Hydroperoxide
誘發大老鼠肝細胞氧化性損傷之保護作用機
制探討**

中文摘要

黃芩甘元(baicalein ; BAL)為唇形科植物”黃芩”(Scutellaria baicalin GEORGI)中所含主要的類黃酮成分。本研究在於探討baicalein對於第三丁基過氧化氫(tert-butyl hydroperoxide ; t-BHP)所誘發初代培養肝細胞毒性之抑制作用，及其對脂質過氧化作用之影響。由實驗發現baicalein可以捕捉1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH)，表示其具有抗氧化的作用；進一步的實驗顯示t-BHP處理初代培養肝細胞三十分鐘後培養基中LDH和ALT等酵素含量及肝細胞脂質過氧化生成物MDA的升高均能顯著地被baicalein (0.001mM,0.005mM, 和 0.010mM)所抑制。以unscheduled DNA synthesis(UDS)和粒線體去極化(mitochondrial depolarization)的方法測知baicalein可以減低由t-BHP所誘發的基因毒性以及粒線體的損傷；又利用8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)濃度，當作DNA傷害之標記物，結果顯示baicalein也能減少肝細胞核內8-OH-dG的產生。綜合以上結果證明，baicalein能經由捕捉自由基的能力來抑制由t-BHP所誘發的氧化壓力(oxidative stress)造成之肝細胞損傷和基因毒性。

Abstract

Baicalein(BAL), a main flavonoid constituent of *Scutellaria radix*, was studied for the inhibitory effects on the tert-butyl hydroperoxide(t-BHP)-induced hepatotoxicity and oxidative damage in primary culture of rat hepatocytes. In the preliminary study, baicalein showed an effective antioxidant property tested by its capacity for quenching 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH). Further investigations showed that baicalein at the concentrations of 0.001mM, 0.005mM, and 0.010mM decreased the leakage of lactate dehydrogenase(LDH) and alanine aminotransferase(ALT), formation of malondialdehyde (MDA) induced by 30 min treatment of t-BHP(1.5mM) in primary cultured rat hepatocytes. Baicalein also attenuated t-BHP induced mitochondrial depolarization as determined by a retention test of rhodamine 123 and DNA repair synthesis as evidenced by unscheduled DNA synthesis(UDS). In addition, baicalein decreased the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG) content that acted as a DNA damage marker. The sum of the results suggested that the protective effect of baicalein against cytotoxicity and genotoxicity of hepatocytes induced by t-BHP is via its ability to quench free radicals.

緒 論

最近醫學的進步有目共睹，許多傳染病已經能夠防治，但肝炎至今仍是危害最大的一種傳染病，在台灣慢性肝炎及肝硬化佔台灣十大死因第六位，而B型肝炎帶原率佔世界第一位(1)。今日醫學研究指出肝炎是由病毒、酒精、脂肪過氧化物、食物中毒或肝毒性藥物所引起，然而環顧目前醫學界，治療肝炎仍缺乏適當藥物的治療，一般除臨床休息和補充營養的食物控制外，雖有免疫抑制法及抗病毒藥物(如interferon)，然而此等療法均尚在試驗階段，可是天然物生藥中則有不少對肝炎有效的藥物，所以由天然藥物中篩選一有效治療肝炎以及保肝的藥物，實為當前刻不容緩之事。黃芩(*Scutellaria baicalein* GEORGI)為唇形科(Labiatae)植物的乾燥根，民間常用為清熱利濕之中草藥，其功能清熱燥濕，瀉火解毒，利小便(2)。根據研究指出黃芩具有清熱解毒，消除炎症，擴張膽管，加速膽汁排泄，從而幫助消化，促進食慾，同時還可以擴張血管，改善肝內循環(3)；黃芩甘元對家兔具有促進膽汁排泄及利尿作用(4)。臨床上能治急性黃膽型、急性無黃膽型肝炎及慢性B型肝炎(5)。黃芩甘元(baicalcin)為黃芩中之主要成分，化學結構上屬類黃酮(如圖一所示)，根據報告一般類黃酮成分多具有抗炎、抗過敏及抗氧化作用(6)。

黃芩甘元(baicalcin；5,6,7-trihydroxyflavone)，近幾年來被認為具有抗癌的功能，Motoo等人(7)以中藥方劑小柴胡湯(Sho-saiko-to)當中含有黃芩甘元(baicalcin)，研究其對human hepatoma cell lines(PLC/PRF-/5和Hep-G2)、human liver cell(Chang)和human pancreatic cancer line等癌細胞的抑制效果，結果發現其中baicalcin對human hepatoma cells及其它人類細胞的生長具抑制作用；而Huang等人(8)(9)則發現baicalcin對vascular

smooth muscle cells有抑制增生的效果，透過抑制protein tyrosine kinase activity和PDGF-A mRNA表現來抑制T-lymphoid leukemia cells增生，但對PMA(phorbol-12-myristate 13-acetate)所刺激protein kinase C的活性並無相關性(dose-dependent inhibition)作用；So等人(10)，在1997年說明flavonoids其抑制細胞增生的機制可能透過與estrogen receptor的結合作用。

有機過氧化氫tert-butyl hydroperoxide能在生物體系統中提高oxidative stress，對肝細胞能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，以及GSH/GSSG的比值下降，並急速提高lactate dehydrogenase (LDH)，alanine aminotransferase (ALT)等酵素之釋放量，開啟一連串有害反應可導致細胞的死亡(11)(12)(13)；亦可在顯微鏡下觀察到細胞胞器形態之改變(14)。除此，過去Deliconstantinos等人(15)研究發現，tert-butyl hydroperoxid能造成human erythrocytes提高peroxynitrite(ONOO⁻)及MDA的產生，抑制Ca²⁺ pump ATPase activity，進一步以tert-butyl hydroperoxide與hemoglobin(Hb)和methemoglobin(metHb)作用則發現會引起superoxide(O₂⁻)與hydrogen peroxide(H₂O₂)的增加；因此利用tert-butyl hydroperoxid所誘導的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(anti-lipoperoxidant properties)和抗肝毒活性(anti-hepatotoxic activity)(16)的良好模式。

因為截至目前為止baicalein對肝細胞組織培養方面的抗肝毒性作用機制尚未見有報告，因此本研究採用初代培養之肝細胞，觀察baicalein對tert-butyl hydroperoxide誘發的肝細胞損傷作用的保護作用以及DNA損傷修補之調節作用，並測定肝細胞培養基中ALT、AST等生化值作為肝

毒性之指標，以和參考物質quercetin的抑制作用做比較，可進一步闡明baicalein抑制過氧化劑所誘發肝細胞損傷之作用機制。

研究目的

本研究以黃芩抽取之主要成分baicalein作為實驗材料，將其加入初代培養之鼠肝細胞中，採用對肝細胞能誘發脂質過氧化之有機過氧化劑tert-butyl hydroperoxide為誘導劑，誘發鼠肝細胞損傷後，以測定肝細胞脂質過氧化物之分解物malondialdehyde(MDA)的濃度及DNA傷害標記物8-OH-dG濃度，以及ALT、LDH等酵素含量生化值作為肝細胞毒性的分析指標(14)(15)，探討baicalein對肝細胞損傷的抑制作用。進一步利用初代培養之肝細胞，觀察baicalein對tert-butyl hydroperoxide所誘發肝細胞的粒線體膜電位改變和DNA損傷修補之調節作用，採用unscheduled DNA synthesis(UDS)的方法觀察DNA損傷之修補作用(17)，俾探討baicalein對抗肝細胞損傷之作用機制，以提供臨床上防治肝炎及肝癌之參考。

研究方法

(一)化學試劑及使用儀器

1. 化學試劑

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)、TBA (thiobarbituric acid)、collagenase、t-BHP (tert-butyl hydroperoxide)、[methyl-3H]-thymidine、SDS、EDTA、thymidine、MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)、alanine transaminase (ALT) kit、lactate dehydrogenase (LDH) kit、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG) standard、phosphotungstic acid、rhodamine 123以上皆購自美國sigma公司，Williams' medium E、PBS、fetal bovine serum、PSN antibiotic mixture、glutamine、HBSS (Hanks' balanced salt solution)以上皆購自美國GIBCO BRL公司、Aquasol-2閃爍液 (New England Nuclear)、baicalein(Wako)、protein assay kit (Bio-Rad)、percoll、isopropanol(皓峰)、HCl、n-butanol(MERCK)、methanol (MERCK)、培養皿為丹麥Nunc公司產品。

2. 儀器

UV and Visible Spectrophotometer (HITACHI ; U2000)

Fluorescence Spectrophotometer (HITACHI ; F2000)

Scintillation Counter (ALOKA ; LSC-900)

HPLC (BSA and SHIMADZU)

倒立式顯微鏡Diaphot 300 (Nicon)

Centrifuge(KUBOTA ; 2010) (SK-70)

(二) 實驗方法

一. 初代肝細胞之培養

初代培養之肝細胞係根據Bonney氏等之方法(18)，以肝臟灌流方法取得 (two-stage liver perfusion method)。由Wistar品系大白鼠腹腔注射戊基巴比妥 (pentobarbital) (50mg/ml)劑量每100公克體重為0.2ml麻醉後，打開腹腔，以20G血管導管穿刺肝門脈，固定以加EDTA不含鈣、鎂離子之HBSS緩衝液100ml灌流，同時剪斷下腔靜脈放血，再以含膠原酵素(collagenase)之HBSS緩衝液灌流100ml後，取下肝臟，分離肝細胞，以 2×10^5 cell/ml之細胞密度培養於含10%胎牛血清(Calf bovine serum)、1% PSN、1% glutamine之William's E培養基中(Gibco)，於37°C 5% CO₂中培養。於最初四小時更換培養基，除去未貼壁之細胞。Baicalein以先加入DMSO溶解再以兩次水稀釋至所需濃度，而tert-butyl hydroperoxide則直接以PBS配製，添加於培養基中，控制組則單獨加入DMSO(0.5% V/V)。

二. MTT法之細胞活性分析

細胞之活性分析係根據Alley等之方法(19)，其原理為存活的肝細胞能將MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (tetrazolium salt)經由粒線體中dehydrogenase作用代謝還原成formazan crystal，來測其細胞存活。實驗方法是在12 well的培養皿中置入一定量肝細胞(5×10^4 cell/ 2 ml medium)，於37°C 5% CO₂中培養四小時，然後加入各種不同濃度之tert-butyl hydroperoxide(0.5mM、1.0mM、1.5mM)

或 baicalein(0.001mM, 0.005mM, 及 0.010mM), 培養一小時後, 除去 medium, 加入新 medium 與 200 μ l MTT (5mg/ml), 培養貼壁四小時後, 移去 medium 加入 isopropranol 2ml, 將 formazan 溶解, 於光波長 563nm 下測定 OD 值, 由 control 與實驗組比較, 觀察 tert-butyl hydroperoxide 與 baicalein 加入後的細胞存活率, 以作為毒性劑量之選擇。

三. 自由基捕捉劑之測定

本實驗使用 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基, 因其在結構上可以產生穩定的共振, 可在適當的狀態下長時間保存, 且其在 571nm 的波長下有獨特的吸光值(20), 當 DPPH 的濃度降低, 其吸光值亦隨之降低。測定係將不同濃度 baicalein(0.001mM、0.005mM 及 0.010mM) 溶於 DMSO 中及以 DMSO 為控制組均取 100 μ l 加入含 2.87ml methanol 和 30 μ l 10mM DPPH 的 reaction mixture, 於室溫中反應 30 mins, 再加入 1ml redistilled water 與 3ml 的 toluene 充分混合, 之後以 3000rpm 離心 10 mins, 取上清液置 spectrophotometer 於 571nm 波長下測其吸光值。

四. 肝細胞毒性分析

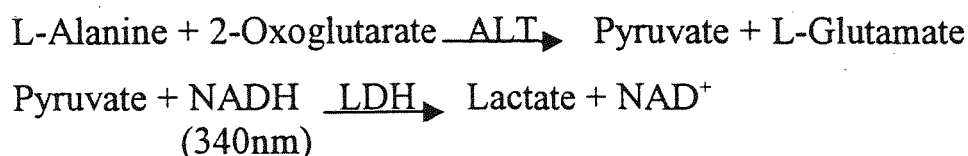
以肝功能診斷酵素包括 lactate dehydrogenase (LDH)、alanine aminotransferase (ALT) 作為急性肝細胞毒性分析的指標。LDH 的測定係將不同濃度 baicalein(0.001mM, 0.005mM, 及 0.010mM) 預先加入培養之肝細胞培養基中分別培養一小時, 再加入 tert-butyl hydroperoxide (1.5 mM) 培養三十分鐘, 以及單獨處理 tert-butyl hydroperoxide 者做為控制組, 之後收集培養基, 分別取 1ml 的培養基, 以 Sigma Lactate dehydrogenase

(LDH) kit、Alanine aminotransferase(ALT) kit在波長340nm下測定NADH的生成或減少表示LDH及ALT的活性，其測定原理分別為：

LDH為

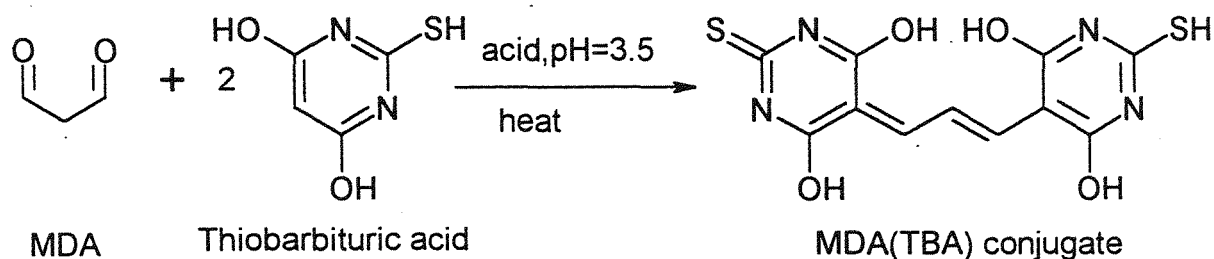


ALT為



五. MDA生成濃度之分析

肝細胞中脂質過氧化係根據Yagi氏等修飾之螢光測定法(21)藉著thiobarbituric acid(TBA)來測定malondialdehyde(MDA)的生成濃度。其測定原理為：



實驗方法是在肝細胞 1×10^6 cell中，加入不同濃度之baicalein(0.001mM, 0.005mM, 及 0.010mM) 培養一小時後，再加入 tert-butyl hydroperoxide(1.5 mM)，繼續培養三十分鐘，另以單獨處理tert-butyl hydroperoxide者作為控制組。除去medium，以PBS wash及1 ml 50 mM phosphate buffer收集細胞，取0.5 ml細胞懸浮液加入3% SDS、0.1N HCl、10% phosphotungstic acid、0.7% 2-thiobarbituric acid之後，避光下

加熱100°C 30min，再加入5ml n-butanol萃取，最後以3000rpm離心10min取上清液測定。根據Bradford(22)採用1,1,3,3-tetramethoxypropane當作standard於激發光波長 λ_{ex} 515nm，發射光波長 λ_{em} 553nm下測定螢光強度。取0.1 ml細胞懸浮液用protein assay kit(BIO-RAD)，以BSA當standard，定量蛋白質含量。

六. DNA損傷修補作用之測定(Unscheduled DNA Synthesis)

本實驗以tert-butyl hydroperoxide誘發DNA損傷修補係根據Felix等敘述之方法(17)測定之，藉由tritium labeled thymidine，在hydroxyurea存在下，併入DNA的tritium labeled thymidine含量定之。將培養之肝細胞 1×10^6 cell先以1.5 mM hydroxyurea處理一小時後，分別加入tert-butyl hydroperoxide(1.5 mM)誘導劑和不同濃度之baicalein(0.001mM, 0.005mM, 及0.010mM)以及 ^3H 標示的thymidine (1 $\mu\text{Ci/ml}$)繼續培養18小時後，除去medium，以PBS wash及收集細胞，置於25 mm 2 μm 孔徑的PC濾紙上，以10 ml lysing buffer(2%SDS、0.025M EDTA、0.5mg/ml thymidine ^3H 、0.1M glycine(pH 10)及0.15mg/ml之proteinase K)沖洗，再以3 ml buffer (2% SDS、0.025M EDTA、0.5mg/ml thymidine、0.1M glycine(pH 10)、0.5N HClO₄)，將濾紙置於含1ml 0.5N HClO₄之試管中，於60°C下加熱一小時後，取懸浮液加入閃爍液，以Aloka LSC-900測其放射強度以dpm/ μg DNA表示。DNA含量之測定係根據Rvytasek之方法(23)，取懸浮液與DABA試劑反應呈色，以Hitachi Fluorescence spectrophotometer (F-2000)於excitation 450nm/emission 505nm測其螢光強度。

七. 粒線體膜電位測定

baicalein對粒線體膜電位變化之影響係藉著測定對rhodamine 123之uptake程度而定。當細胞中粒線體損傷時，一般即表示細胞受到了傷害，而mitochondrial damage初步可由mitochondrial membrane potential觀察，其原理為正常的細胞粒線體為產生能量必須有正常proton concentration gradient即為membrane electric potential，形成electrochemical force用來形成ATP保持mitochondria中Ca²⁺的平衡，當細胞中粒線體受損傷，會導致ATP depletion及Ca²⁺ cycle失去平衡，使帶正電的rhodamine 123流入粒線體中，降低cytosol中的rhodamine 123含量(23)。其實驗方法根據Imberti記述的方法(24)，在肝細胞培養基中(1 × 10⁶ cell/dish)加入不同濃度之baicalein(0.001mM, 0.005mM, 及0.010mM)一小時後，加入tert-butyl hydroperoxide(0.15mM)與rhodamine 123(1μM)於37°C下分別培養三十分鐘，以單獨處理tert-butyl hydroperoxide(0.15mM)培養三十分鐘作為控制組。先除去medium，以PBS wash及收集細胞，然後以含0.1% Triton X-100的PBS將細胞lyse，之後6000xg離心。測定上清液中所含rhodamine 123之濃度，於excitation 490nm/emission 515nm測其螢光強度。

八. DNA萃取、水解及肝細胞中8-Hydroxy-Deoxyguanosine(8-OH-dG)含量之分析

在肝細胞培養基(5 × 10⁶ cell/dish)中加入不同濃度之baicalein(0.001mM, 0.005mM, 及0.010mM)一小時後，加入tert-butyl hydroperoxide(1.5mM)於37°C下分別培養三十分鐘，收集1.5~1 × 10⁷以PBS wash後，以2ml lysis buffer (0.1% BHT、0.5% SDS、100mM

EDTA、10 mM Tris, pH 8.0), 另外加入RNase A 200 μ g/ml, 於37 $^{\circ}$ C下反應1小時, 接著加入500 μ g/ml proteinase K, 於50 $^{\circ}$ C下作用12~24小時, 直至澄清。

以與sample 1:1比例加入phenol萃取, 接著在4000rpm離心30 mins取上清液, 接著以與sample 1:1比例加入chloroform-isoamylalcohol(24:1)萃取, 接著再以4000rpm離心30分鐘取上清液, 再以與sample 1:1比例加入phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1)萃取, 然後再以4000rpm離心30 mins取上清液, 之後重覆以上步驟, 最後加入約sample 1/10容積的3M sodium acetate(pH 7.2)與兩倍容積冰冷的純酒精均勻混合, 置於-80 $^{\circ}$ C overnight, 再以4,000rpm、40 mins離心將DNA沉澱, 去除上清液加入70%酒精, 再以4,000rpm、40 mins離心將DNA沉澱並去除上清液; 將DNA溶於無菌水(充分溶解), 進一步以UV spectrophotometer在吸光值的比例定量DNA(25)。

依所定量之DNA濃度, 將DNA調至100 μ g DNA/50 μ l 無菌水, 加熱100 $^{\circ}$ C、30 mins, 之後加入2 μ l 1M sodium acetate(pH 4.8)、4 μ g(1 μ l) nuclease P1(5 mg/ml)加熱作用37 $^{\circ}$ C、1小時, 再加入16 μ l 1M Tris-HCl(pH 7.2)、1.3 units alkaline phosphatase(type III from *E. coli*)之後再加熱37 $^{\circ}$ C反應一小時(26)。

最後使用BSA公司產製之HPLC和column(C-18, 100 \times 3.2mm i.d.), 併用UV detector在波長254nm及ECD dector調整其電壓在+0.8V下, 以eluent buffer(12.5 mM citric acid、30 mM sodium hydroxide、25 mM sodium acetate、10 mM acetic acid及5% methanol, pH 5.3)沖提, 測定之(27)(28)。

九、分析統計

實驗過程每組皆三次重覆以上，採用 Student's t-test 統計分析，凡 $p < 0.05$ 以下時表示為有意義的差異。

結 果

一. MTT法之細胞活性分析

如表一 a,b 所示，利用 MTT 法測定細胞活性時，當 tert-butyl hydroperoxide 濃度為 1.5 mM 時，吸光值與與控制組比較為 91%，顯示該濃度適合作為細胞毒性誘導劑的濃度；至於 baicalein 在三個實驗濃度為 0.001mM、0.005mM、及 0.010mM 時顯示對細胞沒有影響，因此本研究採用該三個濃度作為實驗之非毒性劑量。

二. Baicalein 對自由基捕捉能力之測定

利用 DPPH test 測定結果，顯示 baicalein 對自由基之捕捉作用，具有劑量依存性關係，如表二所示在實驗濃度 baicalein 0.001mM、0.005mM 及 0.010mM 下之捕捉能力分別為 5%($P < 0.05$)、28%($P < 0.001$) 及 54%($P < 0.001$)，若與 quercetin standard 濃度 0.010mM 比較 (61%, $P < 0.001$) 具有同樣顯著的捕捉自由基能力。

三. Baicalein 對於 Tert-Butyl Hydroperoxide 誘發之肝細胞毒性的影響

如圖二所示，baicalein 能顯著地抑制由 tert-butyl hydroperoxide 所誘導的肝細胞培養基中所滲漏的 LDH 值和 ALT 值升高的現象，當先經以 baicalein 0.010mM 前處理時分別降低 LDH 28%($P < 0.001$)；ALT 30%($P < 0.001$)，並且呈現劑量依存性關係。

四. Baicalein對Tert-Butyl Hydroperoxide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，如圖三所示，單獨以1.5mM tert-butyl hydroperoxide處理之控制組，其肝細胞中MDA濃度急速升高，但先經以baicalein (0.001mM、0.005mM、及0.010mM)前處理一小時，結果與單獨處理tert-butyl hydroperoxide之控制組比較，MDA分別降低了13%($P<0.01$)、27%($P<0.01$)和46%($P<0.001$)。

五. Baicalein對Tert-Butyl Hydroperoxide誘發DNA損傷修補作用之影響

baicalein對tert-butyl hydroperoxide誘發肝細胞DNA損傷修補作用係藉著UDS方法來測定。結果如表三所示，預先處理baicalein可以降低對tert-butyl hydroperoxide誘發DNA損傷之修補作用，在baicalein濃度0.001mM和0.005mM以及0.010mM下修補作用均具有顯著的降低情形分別降低為95%($P<0.05$)、90%($P<0.05$)和72%($P<0.001$)。

六. Baicalein對Tert-Butyl Hydroperoxide誘發粒線體去極化的影響

粒線體膜電位之變化係藉著滯留細胞質中rhodamine 123之螢光度測定之，亦即代表粒線體受損傷之程度。測定結果如圖四所示，單獨處理tert-butyl hydroperoxide者，cytosol中rhodamine 123螢光量顯著下降，但預先處理baicalein則具有明顯的阻止tert-butyl hydroperoxide所誘導粒線體去極化的作用(分別為baicalein 0.001mM, $P<0.05$ 、0.005mM和0.010mM, $P<0.001$)。

七. Baicalein 對 Tert-Butyl Hydroperoxide 誘發肝細胞中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)含量之分析

利用細胞中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG) 加成物濃度可當作 tert-butyl hydroperoxide 誘發肝細胞 DNA 傷害之指標。測定結果如圖五、圖六所示，單獨以 tert-butyl hydroperoxide 誘導劑處理之控制組其 8-OH-dG 濃度與先經 baicalein 前處理，後加入 tert-butyl hydroperoxide 處理之實驗組作比較時，後者具有顯著地降低 8-OH-dG 的作用，並呈現劑量依存性關係(分別為 baicalein 0.001mM, $P < 0.05$; 0.005mM, $P < 0.001$ 和 0.010mM, $P < 0.001$)。

討 論

黃芩甘元(baicalein ; BAL)為我國民間傳統醫學上常用之清熱利濕中草藥”黃芩”(Scutellaria radix)中所含主要的類黃酮成分(2)。類黃酮成分為一群廣泛存在於植物界中的低分子量Benzo- γ -pyrone衍生物，根據報告一般類黃酮成分多具有抗炎、抗過敏和抗病毒作用(6)，能抑制腫瘤細胞之DNA合成及抑制癌促進作用(29)(30)；同時有許多類黃酮成分也具有抗氧化的作用(6)。由於baicalein對肝細胞的抗肝毒性及抗氧化作用尚未見報告，而且一般在探討肝毒性時多採用四氯化碳(CCl_4)作為誘導劑，可是以 CCl_4 作為誘導肝細胞損傷的實驗模式中，造成脂質過氧化仍有許多爭議(31)，也可能是與 CCl_4 本身為一有機溶劑所造成的溶劑效應有關(Solvent effect)(32)(33)，因此本研究採用另一種引起肝毒性的有機誘導劑tert-butyl hydroperoxide來誘發肝毒性，根據報告tert-butyl hydroperoxide可能是一種研究抗肝毒性藥物較理想的實驗模式(34)。綜合以上原因，所以本研究探討baicalein對抗tert-butyl hydroperoxide所誘發肝細胞損傷的作用機制。

首先以DPPH test測定baicalein對自由基的捕捉作用已獲得初步結果，顯示baicalein在0.010mM時其活性與quercetin同濃度下大致相同($P < 0.001$)，表示baicalein為一有效的抗氧化劑。因為tert-butyl hydroperoxide能藉著產生自由基中間體的細胞毒性以造成細胞脂質過氧化(35)(36)，其本身為自由基又可誘發細胞產生更多自由基，導致細胞內的oxidative stress提高造成細胞損傷(37)，因此在本實驗中預先以baicalein處理肝細胞後，再加入tert-butyl hydroperoxide誘導劑三十分鐘，其肝細胞毒性分析與脂質過氧化生成物malondialdehyde(MDA)測定

結果，顯示baicalein能抑制由tert-butyl hydroperoxide所誘發之alanine aminotransferase (ALT)和lactate dehydrogenase (LDH)等酵素含量生化值之升高，並減少肝細胞膜上malondialdehyde(MDA)的生成濃度，證明baicalein具有抗氧化及保肝作用。進一步採用unscheduled DNA synthesis(UDS)和粒線體去極化的方法測得baicalein能顯著的降低由tert-butyl hydroperoxide所誘發的肝細胞內DNA和粒線體損傷，顯示baicalein除了具備抗氧化作用外，亦可經由捕捉自由基而降低由tert-butyl hydroperoxide所誘發的基因毒性。

因細胞DNA中最易受自由基攻擊的含氮鹼基為guanine，當DNA被細胞毒性物質作用產生的氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)攻擊時，最容易在deoxyguanosine的第八個C位置上加成形成一種共振穩定性結構的中性基團成為DNA adduct，亦即8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)(38)；此外tert-butyl hydroperoxide能引起細胞內的oxidative stress增加，導致hydroxyl radicals的形成並攻擊DNA，可運用自由基捕捉劑捕捉tert-butyl hydroperoxide所形成的tert-butoxyl radical，抑制oxidative stress的提高(40)，因此本研究利用脂質過氧化及8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)當作肝細胞受氧化傷害的生物指標(Biomaker)，其目的是探討從“細胞膜上”到“細胞核內”受氧化壓力所造成的肝細胞損傷的情況。由實驗數據顯示baicalein由0.001mM~0.010mM均能顯著地降低了肝細胞核DNA中8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)的濃度，由此更進一步證明baicalein抑制肝細胞毒性與基因毒性，不僅作用在肝細胞膜上阻止了脂質過氧化作用，更抑制了tert-butyl hydroperoxide誘導劑所產生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基去攻擊細胞核內DNA而導致的氧化傷害。

綜合上述，證明baicalein對抗肝細胞DNA損傷的作用機制是經由

baicalein抑制肝細胞膜的脂質過氧化作用，另外也可能是經由baicalein捕捉了tert-butyl hydroperoxide誘發肝細胞損傷所產生氫氧自由基之去毒作用機制所致。

參考文獻

1. 行政院衛生署，中華民國八十年台灣區衛生資料，行政院衛生署出版，114-116, 1992.
2. 謝明村，中國藥材學，國立編譯館，171-174, 1988.
3. Takagi, K., Kimura, M., Otsuka, Y. Pharmacology of medicinal Herbs in east asia, Nanzando Co. Ltd., Tokyo, 87, 1982.
4. 陳榮福，顏焜榮，中藥藥理學，國立中國醫藥研究所，153, 1991.
5. Chang, H.M., But Paul P.H. Pharmacology and applications of chinese materia media, World scientific Publishing Co Pte Ltd., Philadelphia PA USA, 1022-1028, 1986.
6. Havsten B. Flavonoids, a class of natural products high pharmacological potency, *Biochem Pharmacol.* 32, 1141, 1983.
7. Motoo, Y., Sawabu, N. Antitumor effects of saikoponins, baicalein and baicalein on human cell lines. *Cancer Lett.* 89, 91-95, 1994
8. Huang, H.C., Wang, H.R., and Hsieh, L.M. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from Chinese herb, on vascular smooth muscle cell, *Eur J Pharmacol.* 251, 91, 1994.
9. Huang, H.C., Hsieh, L.M., Chen, H.W., Lin, Y.S. Chen, J.S. Effects of baicalein and esculein on transduction signal and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 268, 73-78, 1994.
10. So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F., Moussa, M., Carroll, K.K. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer.* 26, 167-181, 1996.
11. Gebhart, R. Antioxidative and protective properties of extracts from

- leaves of the artichoke(*Cynara scolymus L.*) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 147, 135-142, 1997.
12. Azorin, I., Carmen, B.M., Iborra, B., Fornas, E., Renau-Piqueras, J. Effect of tert-butyl hydroperoxide addition on spontaneous chemiluminescence in brain. *Free Rad Biol Med.* 19, 795-803, 1995.
 13. Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S., Chu, H.Y. *Hibiscus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 101, 137-148, 1996.
 14. Glenn, F.R., Joel R.G., Mary G.R. et al. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 78, 473-483, 1984.
 15. Deliconstantinos, G., Villiotou, V., Stavrides, J.C. Tumor promoter tert-butylhydroperoxide induces peroxynitrite formation in human erythrocytes. *Anticancer Res.* 16(5A), 2969-2979, 1996.
 16. Michel, J., Alain R., Jacques F. et al. Tert-butyl hydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes: a model for studying antihepatotoxic crude drugs. *Planta Medica.* 56, 171-174, 1989.
 17. Felix, R.A., Susan D.L., Gerald L.S. et al. Chemical quantification of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogenes. *Cancer Lett.* 42, 3010-3015, 1982.
 18. Bonney, V.R., Becker J.E., Walker P.R. et al. Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cell suitable for study of the regulation of enzyme synthesis in vitro. *Rochille,* 9, 399-413, 1974.
 19. Alley, M.C., Scudiero D.A., Monkds A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines a microculture tetrazolium assay.

- Cancer Res., 48, 599-601, 1988.
20. Ursini, F., Maiorino M., Morazzoni P., Roveri A., Pifferi G. A novel antioxidant flavonoid (1Dg 1031) affecting molecular mechanisms of cellular. *Free Radical Biol Med.*, 16, 547-553, 1994.
 21. Yagi, K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem Phys Lipids*, 45, 337-351, 1987.
 22. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
 23. Tyson, C.A., Frazier, J.M.. *Methods in toxicology : Part B In vitro toxicity indicators*, Academic Press, 23-32, 1994.
 24. Imberti, R., Nieminen A.L., Herman B., Lemasters, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butyl hydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 265, 392-399, 1993.
 25. Meßmer, U.K., Reed, J.C., and Brune, B. Bcl-2 protects macrophage from nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 271(33), 20192-20197, 1996.
 26. Shogenaga, M.K., Aboujaoude, E.N., Chen, Q. Ames, B.N. Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods in enzymology.* 234, 16-24, 1994.
 27. Kasai, H., Nishimura S. Hydrolyation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Research.* 12, 2137-2145, 1984.
 28. Park, J.W., Cundy, K.C., Ames, B.N. Detection of DNA adducts BY

- high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis*, 10, 827-732, 1989.
29. Nakamura, Y., Colburn, H.N., and Ginhart, T.D. Role of reactive oxygen in tumor promotion: implication of superoxide anion in promotion of neoplastic transformation in JB-6 cell by TPA, *Carcinogenesis*. 6, 299, 1985.
 30. Xiao., Wang X., Lin, L., et al. Inhibition of DNA synthesis in leukemia 7712 cells and induction of sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by quercetin, *Clin J Pharmacol Toxicol*. 2, 317, 1988.
 31. Poil, G., Gravella, E. In : McBrien, D.C.H., Slater, T.F.(eds). Free radicals, Lipid Peroxidation and Cancer, Academic Press, 215-241, 1982.
 32. Berger, M.L., Bhatt, H., Combes, B., Esterbrook R.W. CCl₄-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. *Hepatology*. 6, 36-45, 1986.
 33. Berger, M.L., Sozeri, T. Rapid halogenated hydrocarbon toxicity in isolated hepatocytes is mediated by direct solvent effects. *Toxicology*. 45, 319-330, 1987.
 34. Rush, G., Gorski, J.R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P. and Hewitt, W.R. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 78, 473-483, 1985.
 35. Thornalley, P., Trotta, R.J. and Stern, A. Free radical involvement in the oxidative phenomema induced by tert-butyl hydroperoxide in erythrocytes. *Biochem Biophys Acta*. 759, 16-22, 1983.
 36. Hogberg, J., Orrenius, S. and O'brien, P. Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem.*, 59, 449-455, 1975.

37. Orrenius, S., Ormstad, K., Thor, H. and Jewll, S.A. Turnover and functions of glutathione studies with isolated hepatic and renal cells. Fed Proc. 42, 3177-3188, 1983.
38. Cosman M., de los Santos, C., Fiala R. et al. Solution conformation of the major adduct between the carcinogen(+)-anti-Benzo[a]pyrene diol epoxide and DNA. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 89, 1914-1918, 1992.
39. Robert, A.F. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. Carcinogenesis. 9, 1447-1450, 1990.
40. Altman, S.A., Zastawny, T.H., Randers, L., Lin, Z., Lumpkin, J.A., Remacle, J., Dizdaroglu, M., Rao, G. Mutation Research, 306, 35-44, 1994.

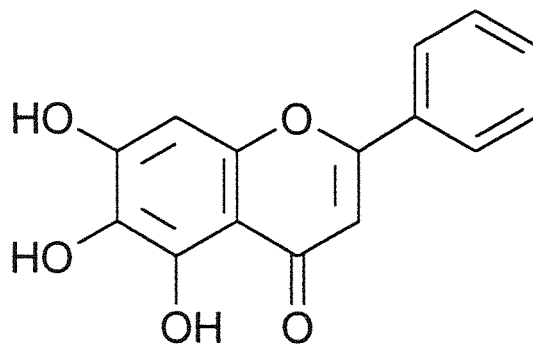


Fig 1 Structure of baicalein

Table 1a The cytotoxicity of t-BHP analyzed by MTT assay.

Treatment ^a	OD ^b _{563nm}	% of control absorbance
control	0.86 ± 0.05	100
t-BHP(0.5mM)	0.83 ± 0.02	96
t-BHP(1.0mM)	0.80 ± 0.03	93
t-BHP(1.5mM)	0.78 ± 0.04	91
t-BHP(2.0mM)	0.72 ± 0.02	84*

^a Hepatocyte culture was treated with various doses of tert-butyl hydroperoxide for 30 min.

^b * $p < 0.05$, Mean ± SD, n=3

Table 1b The cytotoxicity of baicalein analyzed by MTT assay.

Treatment ^a	OD ^b _{563nm}	% of control absorbance
Baicalein(1 μM)	0.85 ± 0.03	99
Baicalein(5 μM)	0.84 ± 0.02	98
Baicalein(10 μM)	0.83 ± 0.03	96

^a Hepatocyte culture was treated with various doses of baicalein for 2 hours.

^b Mean ± SD, n=3

Table 2 Free radical-quenching ability of baicalein determined by DPPH test

Concentration ^a	OD ^b _{517nm}	% of control absorbance
Baicalein		
0 mM	1.98 ± 0.03	100
1 μM	1.88 ± 0.05 ^c	95
5 μM	1.43 ± 0.04 ^{***}	72
10 μM	0.91 ± 0.10 ^{***}	46
Quercetin		
10 μM	0.78 ± 0.04 ^{***}	39

^a Quercetin and various doses of baicalein were mixed with DPPH (10mM,30μM) in methanol. The reaction mixtures were then colored by the addition of toluene, and read at 517nm against black without baicalein. The fraction of DPPH bleaching was calculated by comparing with the absorbance of DPPH solution containing only DMSO (100μl) as 0 %.

^b Mean ± SD, n=3.

^c *p<0.05, ***p<0.001, compared with solvent control, t-test.

Table 3 Effect of baicalein on t-BHP-induced DNA damage in primary culture rat hepatocytes

Treatment	dpm/ μ g DNA	% of t-BHP control
t-BHP (1.5mM)	653 \pm 12 ^b	100
t-BHP (1.5mM) plus		
Baicalein (1 μ M)	621 \pm 18*	95
Baicalein (5 μ M)	591 \pm 28*	90
Baicalein (10 μ M)	474 \pm 26***	72

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

^b Mean \pm SD, n=3

^c *p<0.05, ***p<0.001, compared with the 1.5mM t-BHP-treated group, t-test

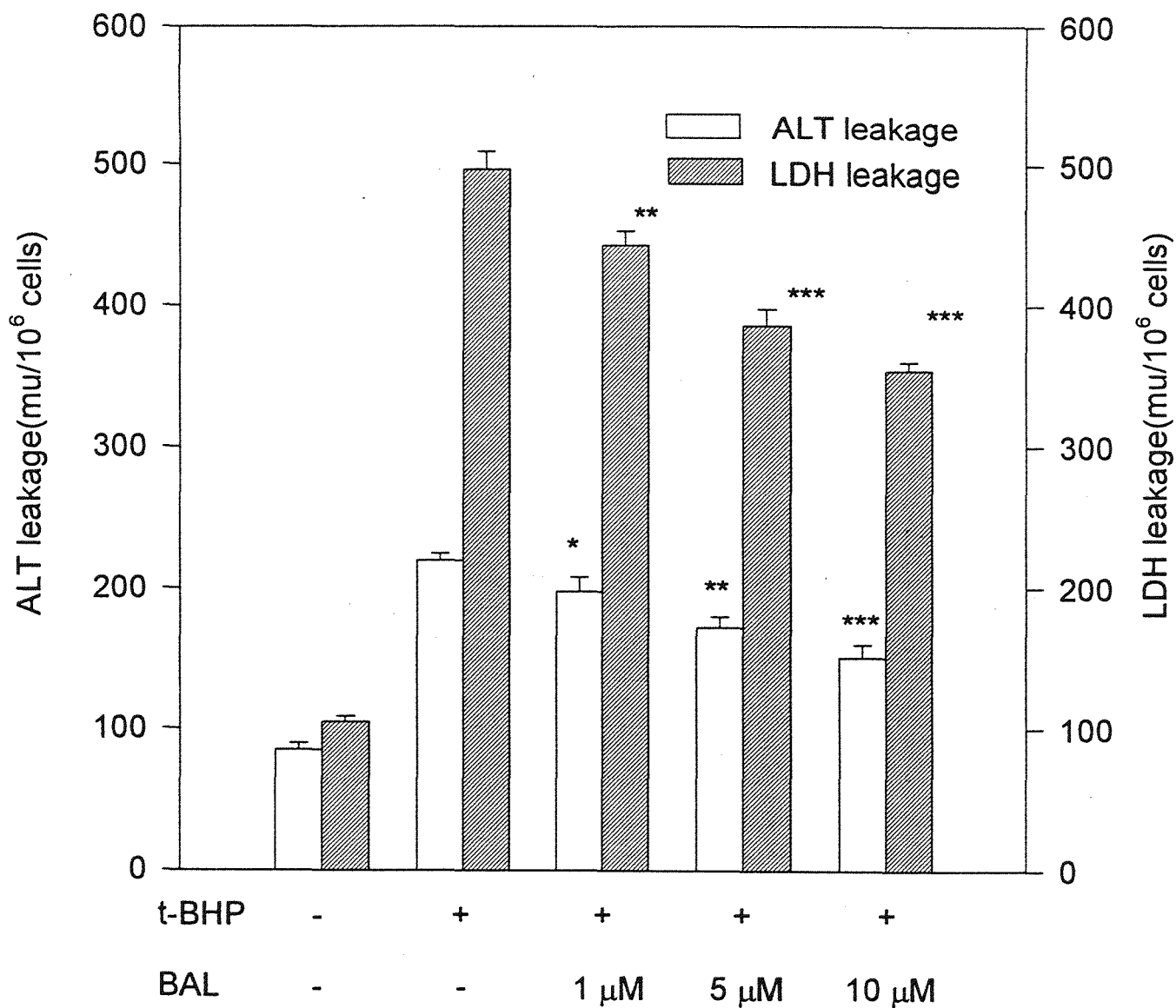


Fig.2 Effect of baicalein (BAL) on the leakage of alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase treated with 1.5mM t-BHP for 30 min in primary cultured rat hepatocytes.*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, compared to treatment with t-BHP alone.

n=3, Mean ± SD, t-test

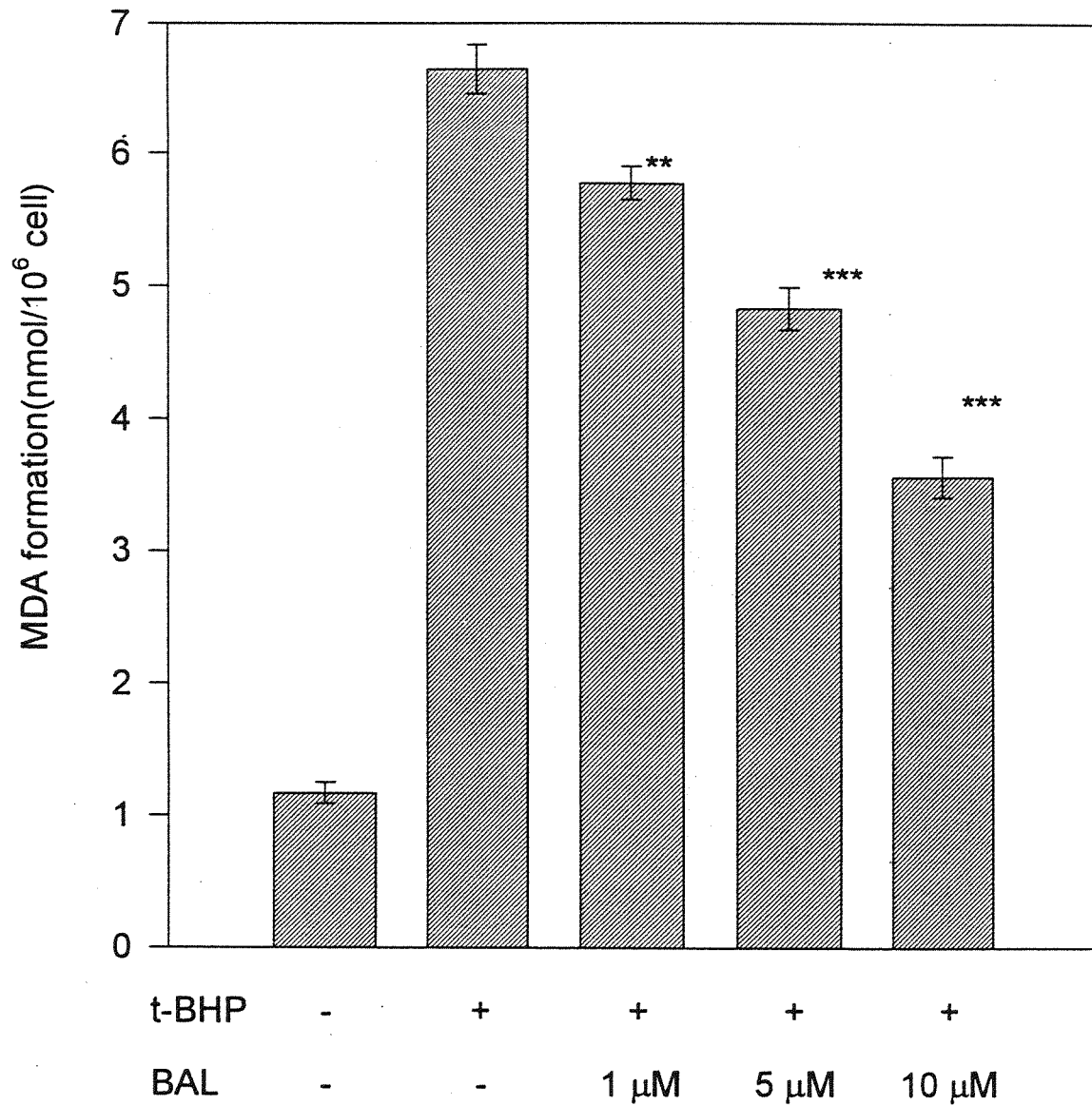


Fig.3 Effect of baicalein (BAL) on the 1.5mM t-BHP-induced lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. **p<0.01; ***p<0.001, compared to treatment with t-BHP alone. n=3, Mean \pm SD, t-test

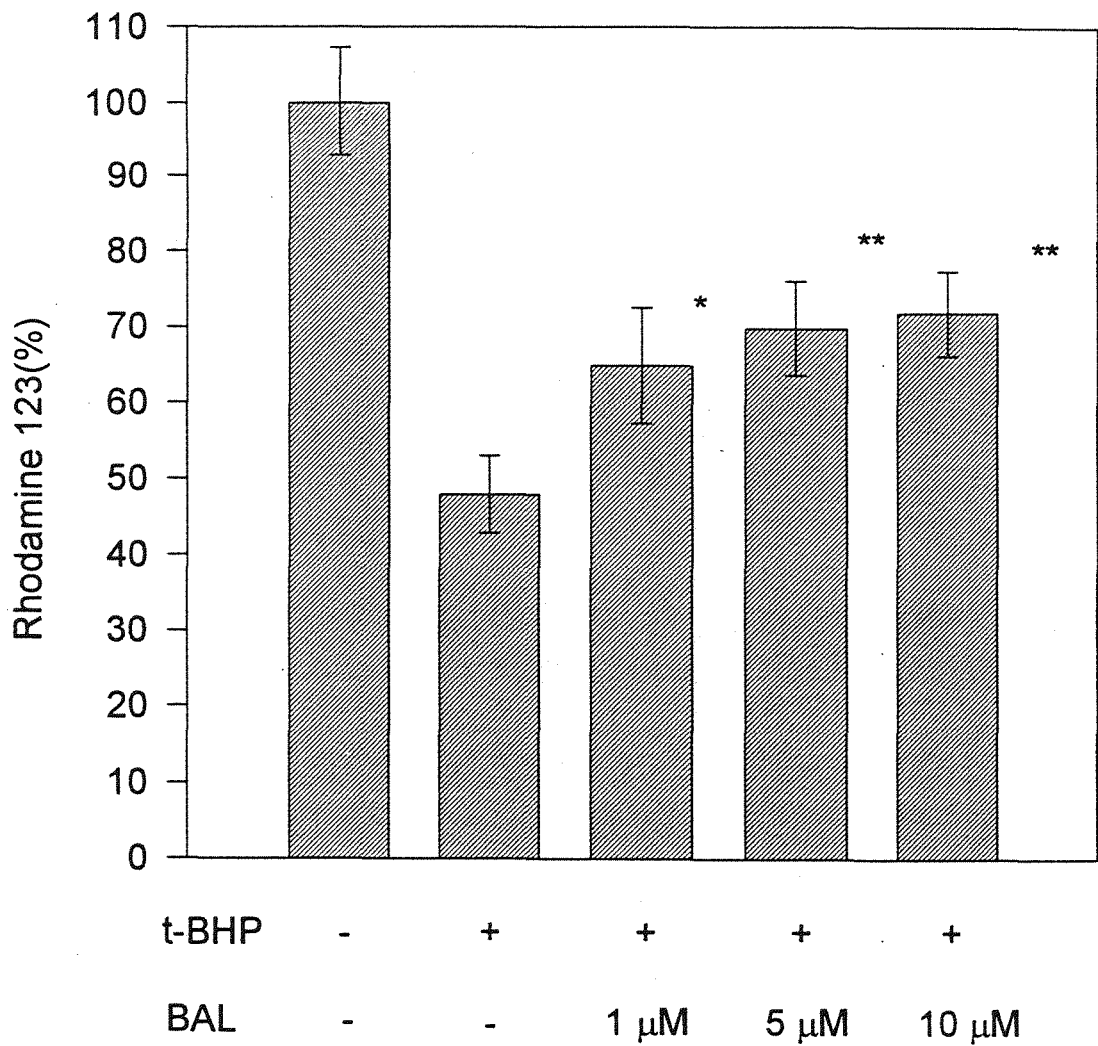


Fig.4 Effect of baicalein (BAL) on mitochondrial depolarization induced by t-BHP for 1hr in primary cultured rat hepatocytes. Mitochondrial depolarization was evaluated by the measuring the fluorescence of rhodamine 123. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to treatment with t-BHP (0.1mM) alone.

n=3, Mean \pm SD, t-test

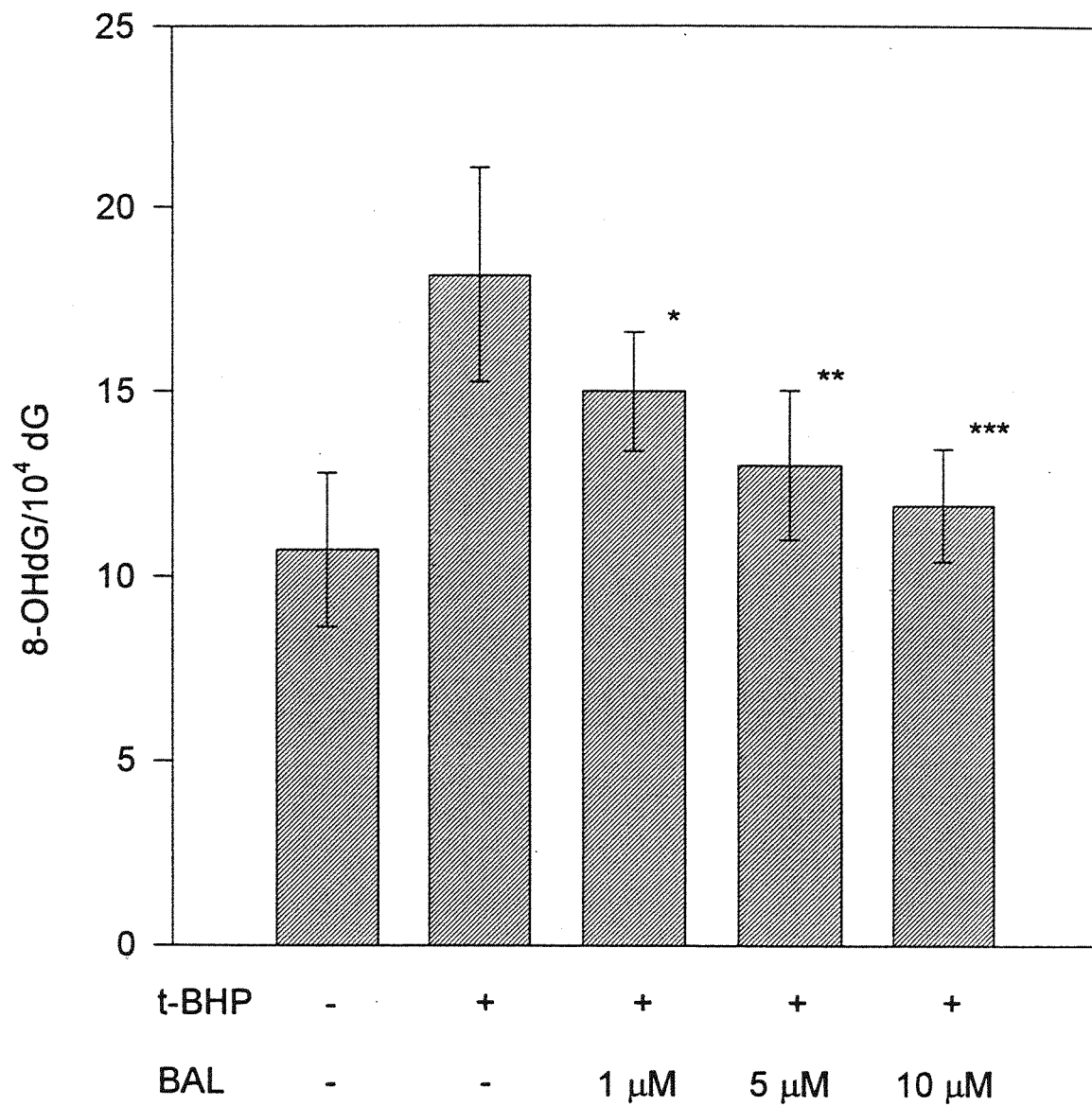


Fig.5 Effect of baicalein (BAL) on the 1.5mM t-BHP-induced 8-OH-dG formation in primary cultured rat hepatocytes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to treatment with t-BHP alone.

n=6, Mean \pm SD, t-test

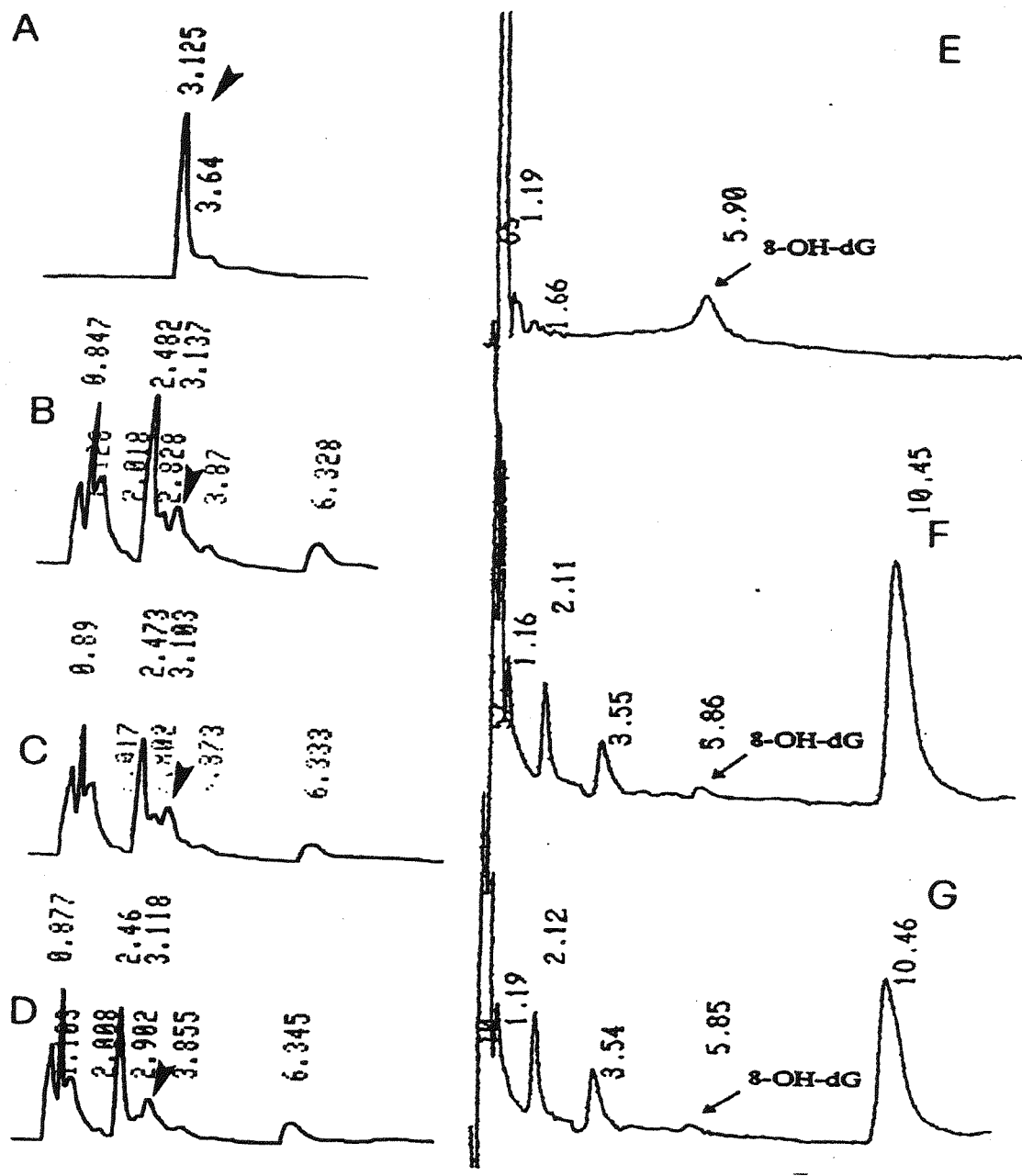


Fig. 6 Detection of 8-OH-dG with HPLC-ECD system
 A. dG standard(1mM) B. dG of t-BHP(1.5mM) only
 C. dG of 5 μ M baicalein and t-BHP(1.5mM)
 D. dG of 10 μ M baicalein and t-BHP(1.5mM)
 E. 8-OH-dG standard(1 μ M)
 F. 8-OH-dG of t-BHP(1.5mM) only
 G. 8-OH-dG of 5 μ M baicalein and t-BHP(1.5mM)

PART I Baicalein 抗氧化及抗癌作用之機制研究

(二)Baicalein 抗 TPA 促癌作用及機制研究

中文摘要

唇形科植物“黃芩”中所含的主要成分黃芩甘元(baicalein)對於TPA所誘發的CD-1品系老鼠皮膚腫瘤、發炎反應、上皮細胞增生、ODC活性、H₂O₂及MPO活性的增加由本實驗中發現皆具有抑制的作用。

首先在老鼠背部以0.2 μmol B[a]P /200μl acetone處理1週及5 nmol TPA /200 μl acetone處理23週以誘發皮膚腫瘤的實驗中，發現baicalein(80nmol、160nmol、200nmol)對皮膚腫瘤的形成具有顯著的抑制作用，僅在給予低濃度baicalein(80nmol)的實驗組於23週有少量的腫瘤形成；以0.5nmol TPA/20 μl acetone塗抹在老鼠耳朵上以測試其發炎反應，結果發現分別以baicalein 80nmol、160nmol、200nmol預處理的實驗組，耳朵平均重量分別下降了38%、47%、53%；以TPA 5nmol塗抹於老鼠皮膚上再取下皮膚作病理切片觀察，結果發現以baicalein預處理者對TPA所引起的上皮增生具有抑制效果；在TPA所誘發的ODC(ornithine decarboxylase)活性實驗中也發現baicalein(80nmol、160nmol、200nmol)對ODC活性分別抑制了88%、96%、97%；除此以TPA刺激老鼠皮膚所引起的H₂O₂及MPO活性實驗中也發現baicalein具有抑制作用。

綜上所述證明baicalein對TPA所引起的癌促進作用具有明顯的抑制作用，所以baicalein可能具有癌症化學抑制劑的作用。

Abstract

The effects of topical application of baicalein on 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced promotion of skin tumors, hyperplasia, ornithine decarboxylase (ODC) and inflammation were evaluated in female CD-1 mice. Topical application of baicalein (80, 160, or 200nmol) with TPA (5 nmol) twice weekly for 23 weeks to mice previously initiated with benzo[a]pyrene (B[a]P) significantly inhibited the number of TPA-induced tumors per mouse. Preapplication of the same amount of baicalein also afforded significant protection against TPA-induced hyperplasia in the ear skin. Topical application of baicalein inhibited tumor promoter-caused induction of epidermal ODC activity by TPA (5 nmol). The topical application of baicaleine (80, 160, or 200nmol) inhibited TPA-induced edema of mouse ears by 38%, 47% or 53%, respectively. Pretreatment of mouse skin with various amounts of baicalein caused inhibition of hydrogen peroxide (H₂O₂) and myeloperoxidase (MPO) formation by TPA. These results indicate that baicalein possesses potential as a cancer chemopreventive agent.

緒 論

自民間七十一年至八十六年惡性腫瘤即成為台灣十大死亡原因之第一位，在民國八十五年與八十六年肝癌的死亡率又佔癌症死亡率的第一位及第二位，在台灣地區肝炎及肝硬化則佔十大死亡原因之第六位(1)，而B型肝炎帶原率佔世界首位。現在醫學進步，但對於肝炎的治療仍缺乏適當的藥物，所以本研究由天然生藥中篩選有效治療肝炎及預防保健的藥物。黃芩(*Scutellaria baicalein* GEORGI)為唇形科(Labiatae)植物的乾燥根，民間常用為清熱利濕之中草藥，其性味苦、寒，功能為清熱燥溼、瀉火解毒，利小便(2)。根據文獻指出“黃芩”具有清熱解毒、抗菌、抗炎、降壓和鎮定作用具有良好的保肝效果(3)(4)；黃芩甘元(baicalein)為黃芩根部的主要成份，化學結構屬黃酮類化合物(flavonoid compound)，根據過去研究為黃芩主成份之一的黃芩甘元(baicalein, 5,6,7-trihydroxyflavone)，近幾年來被認為具有抗癌的功能，Motoo等人(5)以中藥方劑小柴胡湯(Sho-saiko-to)中含有黃芩甘元(baicalein)，研究其對human hepatoma cell lines(PLC/PRF-/5和Hep-G2)、human liver cell(Chang)和human pancreatic cancer line等癌細胞的抑制效果，結果發現其中Baicalein對human hepatoma cells及其它人類細胞的生長具有抑制作用；而Huang等人(6)(7)則發現baicalein能抑制血管平滑肌細胞(CCRF-CEM；CEM cells)及癌細胞的增生，透過抑制protein tyrosine kinase activity和PDGF-A mRNA表現來抑制T-lymphoid leukemia cells增生，但對TPA(phorbol-12-myristate 13-acetate)所刺激protein kinase C的活性並無相關性(dose-dependent inhibition)作用；So等人(8)，在1996年說明flavonoids其抑制細胞增生的機制可能透過與estrogen receptor的結合作

用。

B[a]P(benzo[a]pyrene)是一種常見且與環境相關的致癌物，特別是對皮膚和肺的致癌力最強，結構上屬於多環芳香烴，可由煙焦污染環境中分離到，燃料油不完全燃燒是生成的主因，因其廣泛分佈於環境中，因此也經常存在於各類食品中。B[a]P常被使用於動物模式當作癌起始劑(initiator)，通常於老鼠皮膚上給予B[a]P再併用TPA當作癌促進劑(promoter)則可誘發皮膚癌的形式。

TPA(12-O-Trtridecanoylphorbol-13-acetate)為一很強的癌促進劑，是由Croton Trigilium的種子提鍊的巴荳油中萃取出的一種phorbol ester。TPA能使嗜中性吞噬細胞(phagocytic neutrophil)產生發炎反應刺激釋放自由基，包括oxygen radical($\cdot O_2$)和hydrogen peroxide(H_2O_2)等(9)(10)，TPA能類似signal刺激neutrophil導致氧自由基(oxygen radical)釋放來殺死細菌，但同時也會傷害宿主(host)(11)，進而促使細胞產生脂質過氧化及染色體異常，oxygen radicals會引起DNA的single strand breaks及modify DNA base(12)，這些傷害作用與癌化形成有關；TPA本身不具致癌力，但可以促進化學致癌物的致癌作用，能促使已被initiatoin的皮膚產生癌化，並使腫瘤數目增加(13-15)，它在促進皮膚癌方面的作用方式包括：(A)誘發上皮中鳥胺酸脫羧酵素(ornithine decarboxylase；ODC)上升，(B)誘發上皮增殖肥大，(C)在不同細胞中引發活性氧系(reactive oxygene species)形成及(D)引起氧化性DNA base損傷的作用(16)。

由許多研究顯示，具有抗氧化或抗發炎的物質，往往也具有抑制TPA的促癌作用(17)。baicalein是一種抗氧化劑也是一種抗炎劑，從第一部分實驗中得知baicalein對有機過氧化劑tert-butyl hydroperoxide所誘導的肝細胞脂質過氧化、DNA和粒線體的損傷具有保護作用，故本實驗擬

以動物模式，進一步進行其抗癌的活性分析。本研究擬以B[a]P當作起始因子(initiator)，再以TPA當作癌促進劑(promotor)以誘發小白鼠發生皮膚癌的動物實驗模式，觀察在併用baicalein下，小白鼠皮膚癌受抑制的情況，並測定ornithine decarboxylase、myeloperoxidase、水腫測試、 H_2O_2 生成、皮膚組織變化等為指標探討並分析baicalein抑制癌瘤的作用。

研究目的

根據本實驗室上一篇的研究得知黃芩萃取物中之主成份baicalein，對於過氧化物所誘發的肝細胞損傷具有保護作用，因此本篇研究進一步以動物皮膚癌模式，使用B[a]P當作起始因子，再以TPA(12-O-Tridecanoylphorbol-13-acetate)作為癌促進劑誘發小白鼠皮膚癌生成，觀察baicalein在動物模式(in vivo)中對癌促進過程之抑制作用，首先以預先塗抹baicalein測定老鼠皮膚腫瘤生成的數量和TPA誘發老鼠耳朵水腫模式觀察其抗發炎反應，再進一步以TPA處理皮膚觀察其在組織形態上改變的保護作用，並以鳥胺酸脫羧酵素活性測試(ornithine decarboxylase, ODC)為早期皮膚癌化的指標作為參考；同時觀察TPA誘發老鼠上皮中過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)以及脊髓過氧化酵素(myeloperoxidase, MPO)的生成，俾進一步探討Baicalein在生物體中抗癌活性的作用機制。

實驗方法

(一)化學試劑及使用儀器

1. 化學試劑

sodium azide、benzo[a]pyrene(B[a]P)、citric acid、dithiothreitol、ethylenediamine - tetraacetic acid(EDTA)、phenol red、L-ornithine-HCl、tris[hydroxymethyl]aminomethane、sodium hydroxide、peroxidase、12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)以上皆購自美國Sigma Chemical Co、potassium dihydrogenphosphate(KH_2PO_4)、baicalein購自日本Wako公司、hexadecyltrimethyl ammonium、4-aminoantipyrine、phenol、hydrogen peroxide購自MERCK公司、protein assay kit(Bio-Rad)、DL- ^{14}C ornithine(57mCi/mmol)(Amershan)

2. 儀器

UV and Visible Spectrophotometer (HITACHI ; U2000)

Scintillation Counter (ALOKA ; LSC-900)

Homogenizer (EYELA MAZELA Z)

(二)實驗方法

一、動物來源

ICR strain 雌性小白鼠(約六週大)購自臺大醫學院動物中心，使用前至少飼養於動物房一週。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。藥物處理前至少兩天以電動除毛刀剃除老鼠背部的毛，以利藥物吸收。

二、老鼠皮膚的腫瘤研究

(一)動物分組

六週大的CD-1系female mice以隨機分組分成七組，每組10隻，以電動除毛刀剃除背部的毛，並在背部塗抹藥物以觀察腫瘤的生長。各組給藥的情形是Group 1為溶劑控制組，僅給予200 μ l acetone；Group 2給予initiator：B[a]P(0.2 μ mol 溶於Acetone中)僅第一週給藥一次，其後由第二週至第二十四週如同Group 1方式給予acetone，每週兩次；Group 3給予promoter：在給予acetone後一週，開始給予TPA(5nmol溶於acetone中)每週兩次，持續至第二十四週；Group 4則第一週以0.2 μ mol B[a]P當initiator同Group 2方式給藥外，由第二週至第二十四週則同Group 3方式也給予TPA；Group 5、Group 6和Group 7則分別以三種不同劑量baicalein(80nmol、160nmol 和 200nmol)，在每次給予TPA前5分鐘給予baicalein，之後如同Group 4給藥方式給予TPA。

給藥情形整理如下表：

分組	第一週(1次)	第二週至第二十四週(2次/wks)之藥物處理
Group 1	acetone	acetone(先)+acetone(後)
Group 2	B[a]P	acetone(先)+acetone(後)

Group 3	acetone	acetone(先)+TPA(後)
Group 4	B[a]P	acetone(先)+TPA(後)
Group 5	B[a]P	baicalein 80nmol(400 μ M)(先)+TPA(後)
Group 6	B[a]P	baicalein 160nmol(800 μ M)(先)+TPA(後)
Group 7	B[a]P	baicalein 200nmol (1mM)(先)+TPA(後)

給藥濃度為B[a]P 0.2 μ mol(1mM)、TPA 5 nmol(25 μ M)，每次塗藥容積200 μ l；第二週起至二十四週每次塗藥前先處理acetone(solvent control)或baicalein，5分鐘後再處理acetone(solvent control)或TPA。

(二)測量方法

本實驗參照Huang等(18)的方法來測量，每週觀察一次老鼠皮膚上腫瘤生長的情形，以量尺在固定面積內(面積計算公式: $A = \pi / 6 \times D1 \times D2$)量取直徑大於1mm的腫瘤才可列入計算並紀錄下來，共紀錄二十四週，結果以tumors/mouse及percentage/mice with tumors來表示。

三、老鼠耳朵水腫測試

baicalein的抗發炎作用以TPA 0.5nmol引起的老鼠耳朵水腫，觀察其抑制作用之實驗方法來測知。

(一)動物分組

同樣以CD-1 female mice隨機分為五組，每組六隻，給藥方式如下表：

分組	藥物處理
Group 1	acetone(先)+acetone(後)
Group 2	acetone(先)+TPA(後)

Group 3	baicalein 8nmol(0.4mM)(先)+TPA(後)
Group 4	baicalein 16nmol(0.8mM)(先)+TPA(後)
Group 5	baicalein 20nmol(1mM)(先)+TPA(後)

給藥濃度為TPA 0.5nmol(25 μ M)，acetone、baicalein及TPA每次塗藥容積為20 μ l；每次塗藥前先處理acetone(solvent control)或baicalein，5分鐘後再給予acetone(solvent control)或TPA。

(二)測試方法

本實驗參照Huang等(19)的方法作修飾後來作測試，在CD-1 雌鼠的右耳以藥物塗抹，塗抹完畢5小時後，將老鼠斷頸犧牲，接著將右耳藥物處理部份以打洞機打出直徑約6mm的切割部份，將此切割部份拿來稱重、平均計算，結果以mean \pm SD來表示，加藥後所增加的重量則可反應發炎的程度。

四、以TPA處理小白鼠之皮膚形態改變之測試

(一)動物分組

CD-1 female mice以隨機方式分為五組，每組6隻，在老鼠背上剃毛兩天後，給予藥物處理，各組給藥情形如下表：

分組	藥物處理
Group 1	acetone(先)+acetone(後)
Group 2	acetone(先)+TPA(後)
Group 3	baicalein 80nmol(0.4mM)(先)+TPA(後)
Group 4	baicalein 160nmol(0.8mM)(先)+TPA(後)
Group 5	baicalein 200nmol(1mM)(先)+TPA(後)

給藥濃度為TPA 5nmol(25 μ M)，acetone、baicalein及TPA每次塗藥容積為200 μ l；每次塗藥前先處理acetone(solvent control)或baicalein，5分鐘後再給予acetone(solvent control)或TPA。

(二)測試方法

本實驗參照Huang等(19)的方法來偵測，將藥物塗抹於老鼠皮膚，一天兩次，連續四天，在最後一次給藥後18小時，將老鼠斷頸犧牲，取下約2cm \times 2cm的背部皮膚，立即浸泡於10% neutral buffered formalin中固定，然後作H & E stain，H & E stain步驟如下：

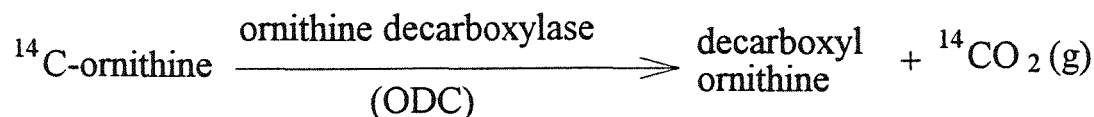
1. 脫蠟後，以紫蘇木(hematoxylin)溶液染2-15分鐘。
(時間可長可短，視紫蘇木溶液之不同而異)
2. 以水浸洗。
3. 以0.5%鹽酸溶液行分辨染色色度，約1-5秒。
4. 浸入氫水(水1000 ml中滴入氫水2滴)至組織呈現藍色，約須數秒。
5. 於流水中清洗，至少須15分鐘。
6. 染以0.5%伊紅Y溶液，數秒至2分鐘。
7. 依次通過80%、90%、95%酒精。
8. 移入100%酒精、二甲苯-100% (1:1)、二甲苯-木餾油(4:1)、二甲苯(I)、二甲苯(II)各半分鐘。
9. 以二甲苯使之透明。
10. 封蓋。

本實驗結果表示的方法共分4部份，(一)發炎細胞(leukocyte)浸潤(infiltration)的情形乃是藉著與溶劑控制組(acetone control)比較上皮中單

核發炎細胞(mononuclear inflammation cells)的diffuse infiltration，結果以輕微(slight,+)及重度(severe,++)來表示；(二)細胞間的水腫(intercellular edema)即上皮細胞間體液的堆積，以存在或不存在來計數；(三)細胞層數則是每一片切片中隨機選取5處來平均計算；(四)非角質細胞層厚度則是利用類似前述方法來計算，結果以mean±SD來表示。本實驗使用顯微鏡放大200倍(物鏡×目鏡)來觀察。

五、鳥胺酸脫羧酵素 (ornithine decarboxylase, ODC)活性測試

皮膚癌早期是以ODC的上升為一種指標，若ODC的濃度升高，則顯示著可能引起皮膚癌。其測定的原理為：



至於測定的方法則是參考文獻(19-21)修飾而成，其實驗步驟為：

(一)動物分組

將ICR品系小白鼠隨機分成五組，每組6隻，先剃除背部的毛之後再將藥物塗抹於背部，至於各組的處理情形如下表：

分組	藥物處理
Group 1	acetone(先)+acetone(後)
Group 2	acetone(先)+TPA(後)
Group 3	baicalein 80nmol(0.4mM)(先)+TPA(後)
Group 4	baicalein 160nmol(0.8mM)(先)+TPA(後)
Group 5	baicalein 200nmol(1mM)(先)+TPA(後)

給藥濃度為TPA 5nmol(25μM)，acetone、baicalein及TPA每次塗藥容積

為200 μ l；每次塗藥前先處理acetone(solvent control)或baicalein，5分鐘後再給予acetone(solvent control)或TPA。

(二)ODC活性測試實驗步驟

1. 藥物處理老鼠皮膚，5小時後，將老鼠斷頸犧牲，取背部皮膚，直徑約1.5公分。
2. 上皮以58 $^{\circ}$ C水浴30秒，然後快速置於冰上，刮取上皮(epidermis)。
3. 將上皮置於homogenization buffer(25mM Tris、5mM dithiothreitol (DTT)及0.1mM EDTA, pH 7.2)。
4. 在冰上進行均質化30秒，以20,000xg、4 $^{\circ}$ C下離心20分鐘。
5. 取上清液分成四等份，每等份50 μ l，置於ependorf中，一等份作protien assay，三等份作ODC activity assay，存於-70 $^{\circ}$ C, overnight。
6. 每一試管內放30 μ l上清液，加入200 μ l reaction buffer(Tris 25mM、200mM pyridoxal phosphate、1mM EDTA、5mM DTT、L-ornithine-HCl, pH 7.2)，先預先作用37 $^{\circ}$ C、5分鐘。
8. 再加入0.5 μ Ci L-[14 C]D,L-ornithine monohydrochloride，中間以線懸吊ependorf內含0.2ml 2N NaOH，而後立刻密風試管口(以上步驟均於冰上操作，試管裝置請看Figure 6)，於37 $^{\circ}$ C水浴恆溫槽中進行酵素反應，時間為1小時。
9. 然後用內裝0.5ml 2M citric acid的注射針筒打入反應液中以中止反應，以內裝0.2 ml sodium hydroxide的ependorf吸收釋出之CO₂，溫和的搖晃反應overnight。
10. 打開反應試管，取出裝sodium hydroxide的小杯子，整個放入輻射計數小瓶(counting vial)中，加4ml液體閃爍液，以閃爍計數儀計數

輻射量(dpm)。

11. 計數出之dpm轉換成 $^{14}\text{CO}_2$ 的莫耳數，測出之ODC以nmol $^{14}\text{CO}_2$ evolved/h/mg protein表示。
12. 蛋白質濃度測定使用Bio-Rad公司 protein assay kit來測定。

六、老鼠上皮中過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)的測定

為了利用 *in vivo* 的方法測定TPA處理於老鼠皮膚時，上皮中 H_2O_2 含量的變化，本實驗根據Pick及Keisari修飾的方法(22-23)測定之。

(一)動物分組

將ICR品系小白鼠隨機分為五組，每組六隻，將其背部的毛剃除後以藥物處理，處理情形如下表所示：

分組	藥物處理
Group 1	acetone(先)+acetone(後)
Group 2	acetone(先)+TPA(後)
Group 3	baicalein 80nmol(0.4mM)(先)+TPA(後)
Group 4	baicalein 160nmol(0.8mM)(先)+TPA(後)
Group 5	baicalein 200nmol(1mM)(先)+TPA(後)

給藥濃度為TPA 5nmol(25 μM)，acetone、baicalein及TPA每次塗藥容積為200 μl ；每次塗藥前先處理acetone(solvent control)或baicalein，5分鐘後再給予acetone(solvent control)或TPA。

(二) H_2O_2 的測試

老鼠皮膚塗抹藥物20小時後，在老鼠斷頸犧牲前1小時，再重覆塗抹一次藥物，之後以打洞機打洞取下直徑2cm的皮膚，刮取上皮(方法同

ODC activity assay)並用剪刀剪碎置於4ml的buffer(10 mM 的sodium azide 溶於50 mM的KH₂PO₄中)內，在冰上用polytron homogenizer均質化30秒，再以10,000 rpm離心20分鐘，之後將上清液用兩層紗布過濾後，取澄清的液體0.5 ml，加入0.5 ml 的phenol red(PR)/horseradish peroxidase(HRPO)(5 mg PR/ml and 10 mg HRPO/ml)，在室溫下靜置5分鐘後加入10N NaOH 10 μ l以終止反應，接著在波長610 nm下測定吸光值。

(三)H₂O₂ 標準曲線的測定

配製不同濃度的H₂O₂標準溶液，包括0, 6.5, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 μ M 的H₂O₂(避光保存)，置於室溫下5分鐘後，取不同濃度H₂O₂ 0.5 ml，加入0.5 ml 的phenol red(PR)/horseradish peroxidase(HRPO)(5 mg PR/ml and 10 mg HRPO/ml)，室溫下靜置5分鐘後加入10N NaOH 10 μ l以終止反應，接著在波長610 nm下測定吸光值。

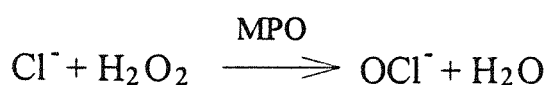
七、老鼠皮膚中脊髓過氧化酵素 (myeloperoxidase, MPO)的測試

(一)動物分組

如同前述之H₂O₂測試方法之動物分組方式。

(二)MPO 的測試

當細胞內有大量的H₂O₂時，MPO的量會增加(24)，其應用原理為：



本實驗乃是參考以往文獻(35)修飾而成，其實驗方法如下：

老鼠皮膚塗抹藥物20小時後，再重覆給予一次藥物，1小時後將老鼠斷頭犧牲，以剪刀取下約直徑2cm的皮膚，並用剪刀剪碎置於2ml的

homogenization buffer (0.5% hexadecyltri-methyl ammonium、50mM potassium phosphate)內，用polytron homogenizer在4°C均質化30秒，再以10,000 rpm 離心 20 min，之後取上清液置於冰上。取 reaction buffer(25mM 的 4-aminoantipyrine-2% phenol solution)1.3 ml 及 1.7mM H₂O₂ 1.5ml混勻平衡約3-4分鐘，在建立了這個基礎反應速率之後，取澄清的液體0.2 ml，加入前述的混合液中迅速混合均勻，接著在510nm 波長下峰測吸光值並紀錄4分鐘。MPO活性由所紀錄之曲線的直線部份計算得到，結果以units/cm² area of mouse skin來表示。一個unit的MPO表示在25°C時，每分鐘水解1 μmol H₂O₂的能力。

八、分析統計

實驗過程每組皆六隻小白鼠以上(n=6)，以 Student's t-test統計分析，於p<0.05表示為有意義的差異。

結 果

一、Baicalein對抗TPA誘發癌促進作用的效果

第一週在ICR系female mice皮膚上塗抹initiator B[a]P 0.2 μ mol後，第二週開始在每次塗抹TPA 5nmol(25 μ M)之前，皆預先以不同濃度baicalein處理，包括80 nmol(0.4mM)、160 nmol(0.8mM)、200 nmol(1mM)三種濃度，連續處理二十三週，每週塗藥兩次，實驗過程共二十四週。結果發現約在第十週開始以B[a]P為initiator併用TPA為promotor的實驗組開始有皮膚腫瘤產生，隨著週數的增加腫瘤數目也隨之增加；在預處理baicalein不同濃度之實驗組均有明顯的抑制作用，只在第23週低劑量baicalein 80 nmol(0.4mM)，可觀察到平均每隻mice不到一個腫瘤的生成，其餘包括控制組或單給予B[a]P或TPA者皆無腫瘤的產生(Fig 2-4)。

二、Baicalein對於TPA誘發之老鼠耳朵水腫的抑制作用

以0.5nmol(25 μ M)的TPA塗抹於老鼠右耳，5小時後以打洞機取下直徑約6mm的耳朵稱重後發現每一片耳朵的平均重量約16.62mg，而在以baicalein 80 nmol(0.4mM)、160 nmol(0.8mM)、200 nmol(1mM)分別預先處理的實驗組則發現耳朵的平均重量分別降低38%、47%、53%，表示baicalein可以有效的減少TPA所引起的發炎反應。(Table 1)

三、Baicalein對於TPA誘發的hyperplasia之抑制作用

以單獨塗抹TPA引起皮膚形態的改變作為控制組，並與baicalein作前處理的實驗組來作比較。結果以上皮細胞層數、上皮層厚度、上皮發炎細胞(白血球)的滲出及細胞間的水腫等四部份來表示。在上皮細胞層數

方面，未塗抹TPA及baicalein處理者只有2-3層，塗抹TPA的實驗組增加為4-7層，而在預先處理baicalein 80 nmol(0.4mM)、160 nmol(0.8mM)、200 nmol(1mM)的實驗組則分別使細胞層數減少為2-4層；在上皮厚度方面，塗抹了TPA後比未處理TPA及藥物者增厚為2倍，若經預先處理baicalein之實驗組，此種增厚情形隨著baicalein濃度的增加有減輕的現象；在發炎細胞的滲出方面，塗抹TPA的控制組有少量的增加，而在預先處理baicalein的實驗組可觀察到滲出現象減輕；至於在細胞間的水腫情形，在投予高濃度baicalein(200 nmol)有抑制作用，而發炎細胞滲出的情形則在低劑量的baicalein(80 nmol)即已被抑制。(Table 2、Fig 5)

四、Baicalein對於TPA誘發老鼠上皮的鳥胺酸脫羧酵素活性(ODC)之抑制作用

以5 nmol(25mM)的TPA處理在老鼠皮膚上，5小時後取下皮膚測鳥胺酸脫羧酵素活性為每小時每毫克蛋白質 5082.83 ± 65.83 pmol CO₂，預先處理baicalein 80 nmol(0.4mM)、160 nmol(0.8mM)、200 nmol(1mM)之實驗組則分別降低了88%、96%及97%。(Table 3)

五、Baicalein對於TPA誘發過氧化氫(hydrogen peroxide, H₂O₂)產生時的抑制作用

老鼠皮膚塗抹藥物20小時後，在老鼠斷頸犧牲前1小時，再重覆塗抹一次藥物，包括預處理不同濃度的Baicalein及TPA 5nmol(25μM)誘使H₂O₂的產生，結果發現在每平方公分皮膚中產生 19.37 ± 3.19 nmol的H₂O₂，是未給予TPA者的3.5倍。當以baicalein 80 nmol(0.4mM)、160

nmol(0.8mM)、200 nmol(1mM)前處理之老鼠皮膚，再給予TPA後發現H₂O₂的產量分別被抑制了73%、74%及76%。(Table 4)

六、Baicalein對於TPA誘發MPO的產生之抑制作用

與H₂O₂的實驗方法相同，在間隔20小時中，前後給予2次的TPA 5nmol(25μM)，以偵測MPO產生的情形，結果發現每平方公分皮膚中產生448.37±59.84 units，明顯的觀察到MPO的活性上升，在以baicalein 80 nmol(0.4mM)、160 nmol(0.8mM)、200 nmol(1mM)前處理後再給予TPA的實驗組中則發現MPO的量分別被抑制了42%、53%及67%。(Table 5)

討 論

黃芩甘元(baicalein ; BAL)為我國民間傳統醫學上常用之清熱利濕中草藥”黃芩”(Scutellaria radix)中所含主要的類黃酮成分(2)。根據報告一般類黃酮成分多具有抗炎、抗過敏和抗病毒作用(4)，能抑制腫瘤細胞之DNA合成及抑制癌促進作用(25)(26)；同時有許多類黃酮成分也具有抗氧化的作用(4)。baicalein在過去研究中証實其對氧化物所造成的氧化性傷害具有良好的保護作用，可預防及降低細胞過氧化物malondialdehyde(MDA)的生成及DNA的損傷包括unscheduled DNA synthesis(UDS)以及8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)的生成。在本實驗的老鼠皮膚癌模式中採用B[a]P為癌起始劑(initiator)，併用TPA為癌促進劑，TPA本身不具基因毒性(non-genotoxic substance)，在促進癌腫瘤生成過程包括兩種機制，第一、TPA為強烈的癌促進劑，可藉由活化以及與protein kinase C結合，直接刺激導致epidermal hyperplasia，而不造成皮膚損傷；第二、併用其它物質引起腐蝕性的效果或連續性刺激，造成皮膚損傷(12)，在腫瘤誘發過程其可能經由兩個機制，其一為致癌基因(oncogene)的活化作用，另一可能透過發炎細胞(inflammatory cells)的各種氧化性酵素活化過程(12)。

在本實驗中，長期以TPA為promoter促進皮膚腫瘤發生，結果觀察到baicalein 80nmol低劑量下即可以抑制TPA(5nmol)所誘發的癌化形成，而在老鼠耳朵水腫實驗中，baicalein可以降低TPA所刺激的發炎反應以及水腫的情況。在組織形態方面，用TPA引起皮膚形態上的改變，可觀察到其上皮增生、白血球滲出及細胞間水腫發生，這些皆可被baicalein所抑制；由過去文獻知道TPA會與人類和動物嗜中性吞噬細胞(phagocytic

neutrophils) 產生作用，以形成 oxygen radical($\cdot O_2^-$) 和 hydrogen peroxide(H_2O_2)(11)，baicalein能對吞噬細胞所產生的ROS(reactive oxygen species)產生抑制作用，而ROS等自由基在癌促進過程中扮演很重要的角色(27)；一些會生成自由基的化合物在老鼠皮膚上具促癌作用，本研究在baicalein預處理下，可以明顯地降低 H_2O_2 及MPO的活性，並減少早期皮膚癌指標ODC酵素的活性。由此顯示baicalein對於TPA所誘發的促癌作用具有顯著的抑制作用，因此證明baicalein具有癌症化學抑制劑的作用。

參考文獻

1. 行政院衛生署, 中華民國八十六年台灣區衛生資料, 行政院衛生署出版
2. 謝明村, 中國藥材學, 國立編譯館, 171-174, 1988.
3. Takagi, K., Kimura, M., Otsuka, Y. Pharmacology of medicinal Herbs in east asia, Nanzando Co. Ltd., Tokyo, 87, 1982.
4. Havsten B. Flavonoids, a class of natural products high pharmacological potency, *Biochem Pharmacol.* 32, 1141, 1983.
5. Motoo, Y., Sawabu, N. Antitumor effects of saikoponins, baicalein and baicalein on human cell lines. *Cancer Lett.* 89, 91-95, 1994
6. Huang, H.C., Wang, H.R. and Hsieh, L.M.. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from Chinese herb, on vascular smooth muscle cell, *Eur J Pharmacol.* 251, 91, 1994.
7. Huang, H.C., Hsieh, L.M., Chen, H.W., Lin, Y.S., Chen, J.S., Effects of baicalein and esculein on transduction signal and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 268, 73-78, 1994.
8. So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F., Moussa, M., and Carroll, K.K. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer.* 26, 167-181, 1996.
9. Goldstein, B.D., Witz, G., Amoruso, M., and Troll, W. Protease inhibitors antagonize the activation of polymorphonuclear leukocyte oxygen consumption. *Biochem Biophys Res. Comm.* 88, 854-860, 1979.
10. Troll, W., and Wiesner, R. The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 509-528, 1985.

11. Troll, W. Protease inhibitors interfere with the necessary factors carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 81, 59-62, 1989.
12. Ingram, A.J., and Grasso, P. Evidence for and possible mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis in mouse skin. *Mutat Res.* 248, 333-340, 1991.
13. Slaga, T.J. Overview of tumor promotion in animals. *Environ Health Perspect.* 50, 3-14, 1983.
14. Slaga, T.J. Mechanisms of Tumor Promotion II. Tumor promotion and skin carcinogenesis. CRC Press, Boca Raton, FL. 1984.
15. Digiovanni, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Therapy.* 54, 63-128. 1992.
16. Wei, H., and Frankel, K. *In vivo* formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Cancer Res.* 51, 4443-4449, 1991.
17. Katiyar, S.K., Mohan, R.R., Agarwal, R., and Mukhtar, H. Protection against induction of mouse skin papillomas with low and high risk of conversion to malignancy by green tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 18, 497-502, 1997.
18. Huang, M.T., Wang, Z.T., Georgiadis, C.A., Laskin, J.D., and Conney, A.H. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis.* 13, 2183-2186, 1992.
19. Huang, M.T., Smart, R.C., Wong, C.Q., and Conney, A.H. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 48, 5941-5946, 1988.
20. Slaga, T.J., Das, S.B., Rice, J.M., and Thompson, S. Fractionation of mouse epidermal chromatin components. *J Invest Dermatol.* 63, 343-349, 1974.

21. Smart, R.C., Huang, M.T., and Conney, A.H. sn-1,2-Diacylglycerols mimic the effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate *in vivo* by inducing biochemical changes associated with tumor promotion in mouse epidermis. *Carcinogenesis*. 7, 1865-1870, 1986.
22. Pick, E., and Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 38, 161-170, 1980.
23. Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., and Brit, D.F. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res*. 50, 499-502, 1990.
24. Krystyna, F. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac Ther*. 53, 127-166, 1992.
25. Nakamura, Y., Colburn, H.N., and Ginhart, T.D. Role of reactive oxygen in tumor promotion: implication of superoxide anion in promotion of neoplastic transformation in JB-6 cell by TPA, *Carcinogenesis*. 6, 299, 1985.
26. Xiao., Wang X., Lin L., et al. Inhibition of DNA synthesis in leukemia 7712 cells and induction of sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by quercetin, *Clin J Pharmacol Toxicol*. 2, 317, 1988.
27. Cerutti, P.A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science*. 227, 375-381, 1985.

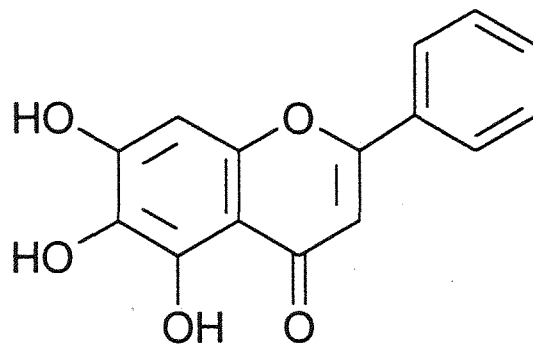


Fig 1 Structure of baicalein

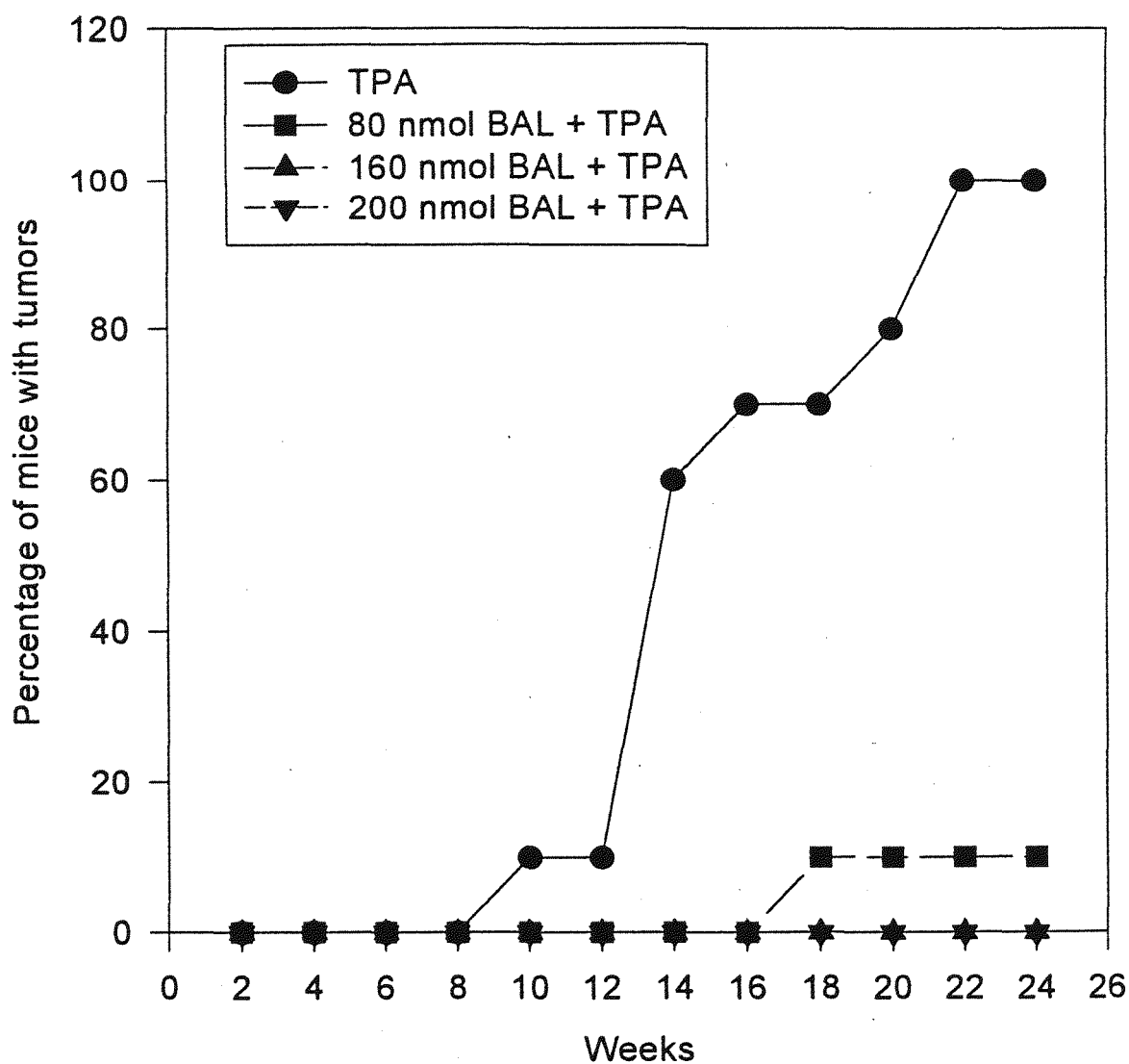


Fig 2 Inhibitory effect of topical application of baicalein(BAL) on TPA-induced tumor promotion in mouse skin. Female CD-1 mice (6 weeks old; 10/group) were initiated with benzo[a]pyrene 0.2 μmol (1mM). One week later, the mice were promoted with TPA (5 nmol) or TPA together with baicalein(80 nmol, 160 nmol or 200 nmol) twice weekly for 23 weeks. Skin tumor of diameter >1mm were counted and recorded every 2 weeks. All skin tumors were papilloma.

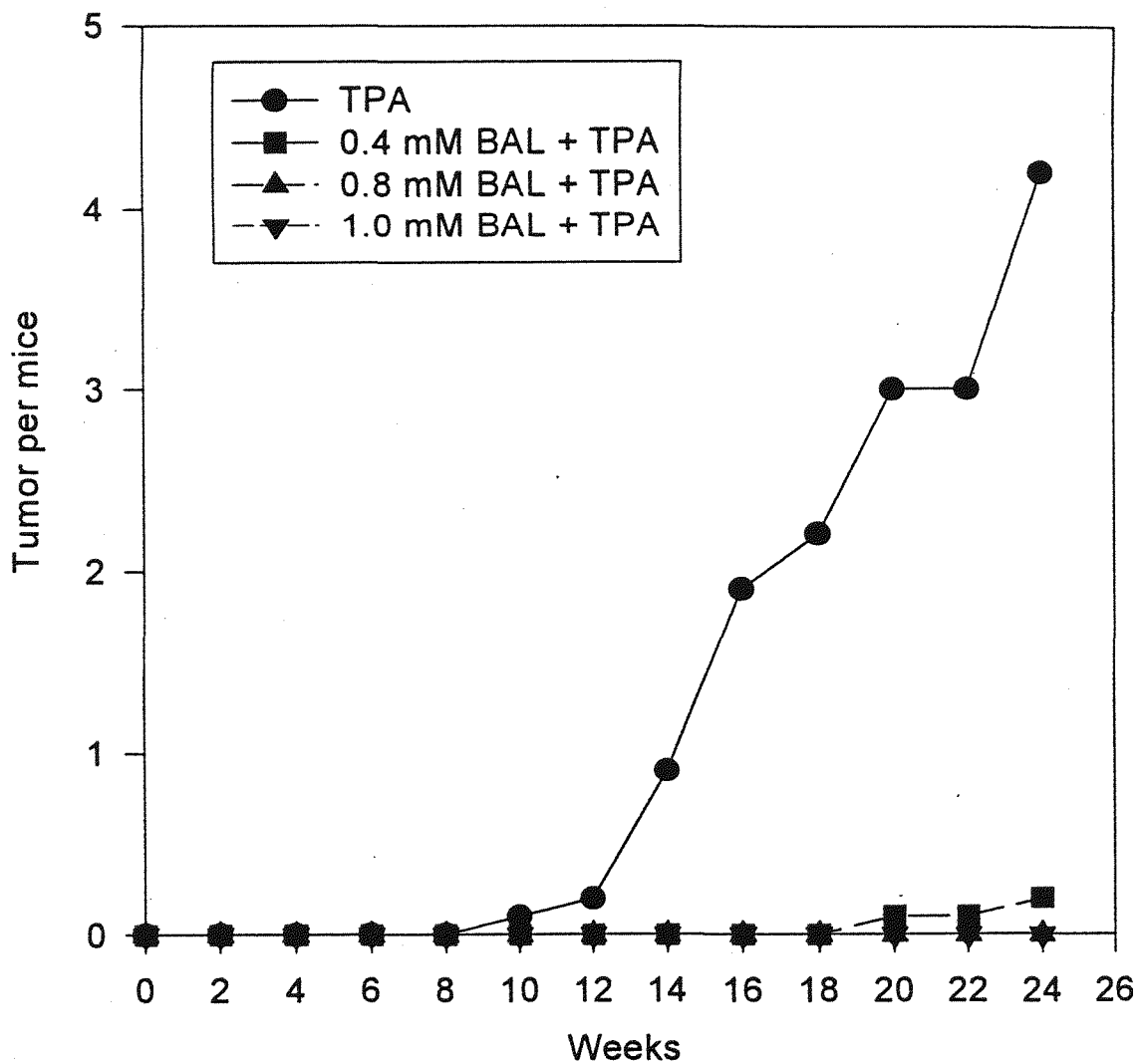


Fig 3 Inhibitory effect of topical application of baicalein(BAL) on TPA-induced tumor promotion in mouse skin. Female CD-1 mice (6 weeks old; 10/group) were initiated with benzo[a]pyrene 0.2 μ mol (1mM). One week later, the mice were promoted with TPA (5 nmol) or TPA together with baicalein(80 nmol, 160 nmol or 200 nmo) twice weekly for 23 weeks. Skin tumor of diameter>1mm were counted and recorded every 2 weeks. All skin tumors were papilloma.

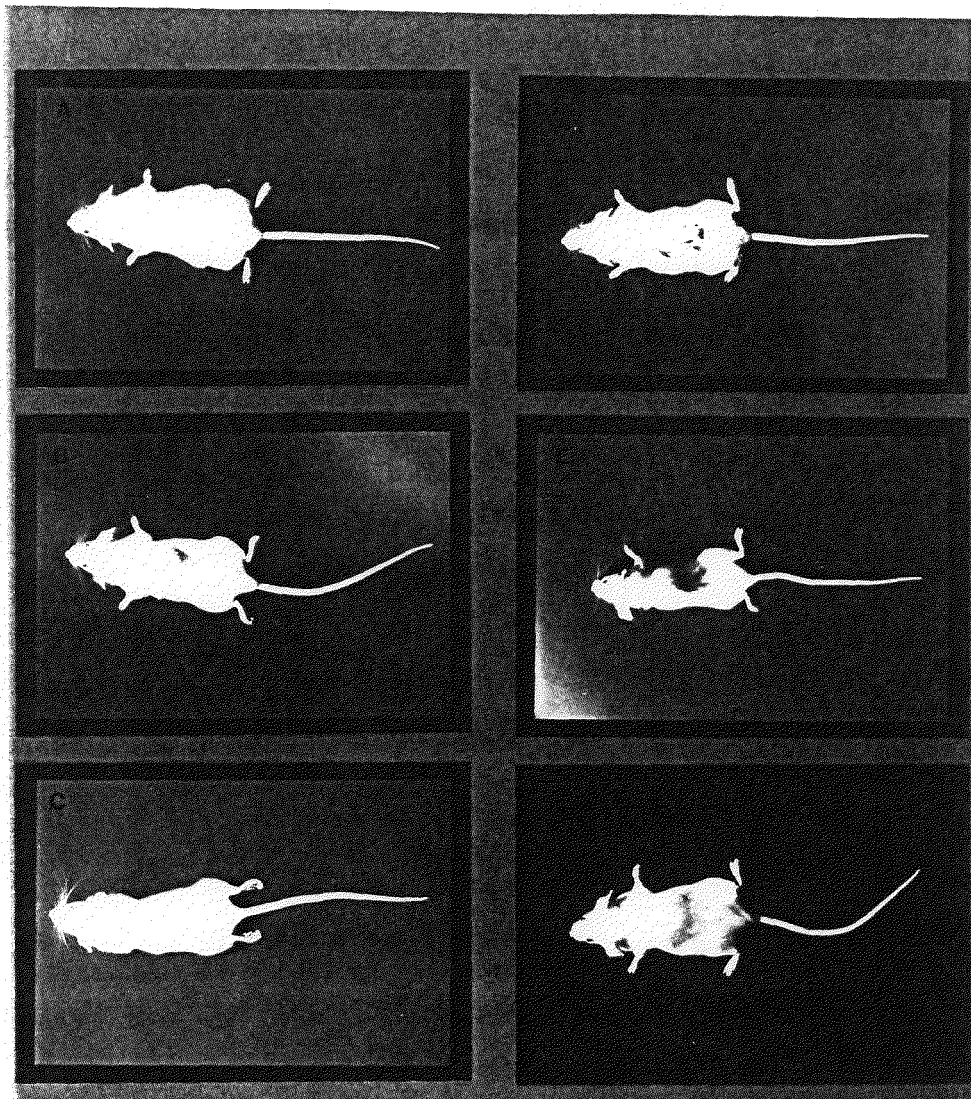


Fig 4 Inhibitory effect of baicalein on TPA-induced tumor promotion with B[a]P initiation in mouse skin.

- A. Acetone
- B. 0.2 μmol B(a)P alone
- C. 5 nmol TPA alone
- D. B(a)P + TPA
- E. B(a)P + 80 nmol BAL + 5 nmol TPA
- F. B(a)P + 160 nmol BAL + 5 nmol TPA

Table 1 Inhibitory effect of topical application of baicalein on TPA-induced edema of mouse ears

Group	Treatment ^a	Weight/punch/mg	inhibition / %
1	Acetone	7.50 ± 3.14	-
2	TPA	16.62 ± 2.70	-
3	Baicalein (8 nmol) + TPA	13.17 ± 1.85***	38
4	Baicalein (16 nmol) + TPA	12.37 ± 2.21***	47
5	Baicalein (20 nmol) + TPA	11.75 ± 2.05***	53

^a Mouse ears were treated with acetone (20 μ l), TPA (0.5 nmol) in acetone (20 μ l) or TPA(0.5 nmol) together with baicalein in acetone (20 μ l). Five hours later, the animals were killed and ear punches (diameter 6 mm) were weighed.

The data represent the mean \pm SD from 6 mice/group.

*** P < 0.001. Statistically different from TPA group, t-test.

Percent of inhibition(%)=Group 2- Group 3(or 4.)/Group 2- Group 1 \times 100%

Table 2 *Inhibitory effect of topical application of baicalein on the TPA-induced morphological changes in epidermis.*

Group	Treatment ^a	No. of epidermal layers	Epidermal thickness (μm)	Leukocyte infiltration ^b	Intercellular edema ^c
1	Acetone	2-3	15.63 ± 5.12	0	0
2	TPA	4-7	70.00 ± 16.58	++	+
3	TPA + Baicalein (80 nmol)	3-6	53.75 ± 17.85**	++	0
4	TPA + Baicalein (160 nmol)	3-5	48.43 ± 15.14***	++	0
5	TPA + Baicalein (200 nmol)	2-4	45.75 ± 8.47***	+	0

^a Mice were treated topically with acetone (200 μl), TPA (5 nmol) in acetone (200 μl), or TPA (5 nmol) together with baicalein in acetone (200 μl) twice a day for four days. The animals were killed 18 h after the last dose and skins were processed for histological tests. Data are expressed as the mean ± SD from 6 mice/group.

P < 0.01; *P < 0.001. Statistically different from TPA group, t-test.

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

^c Intracellular edema was scored as present(+) or absent(0).

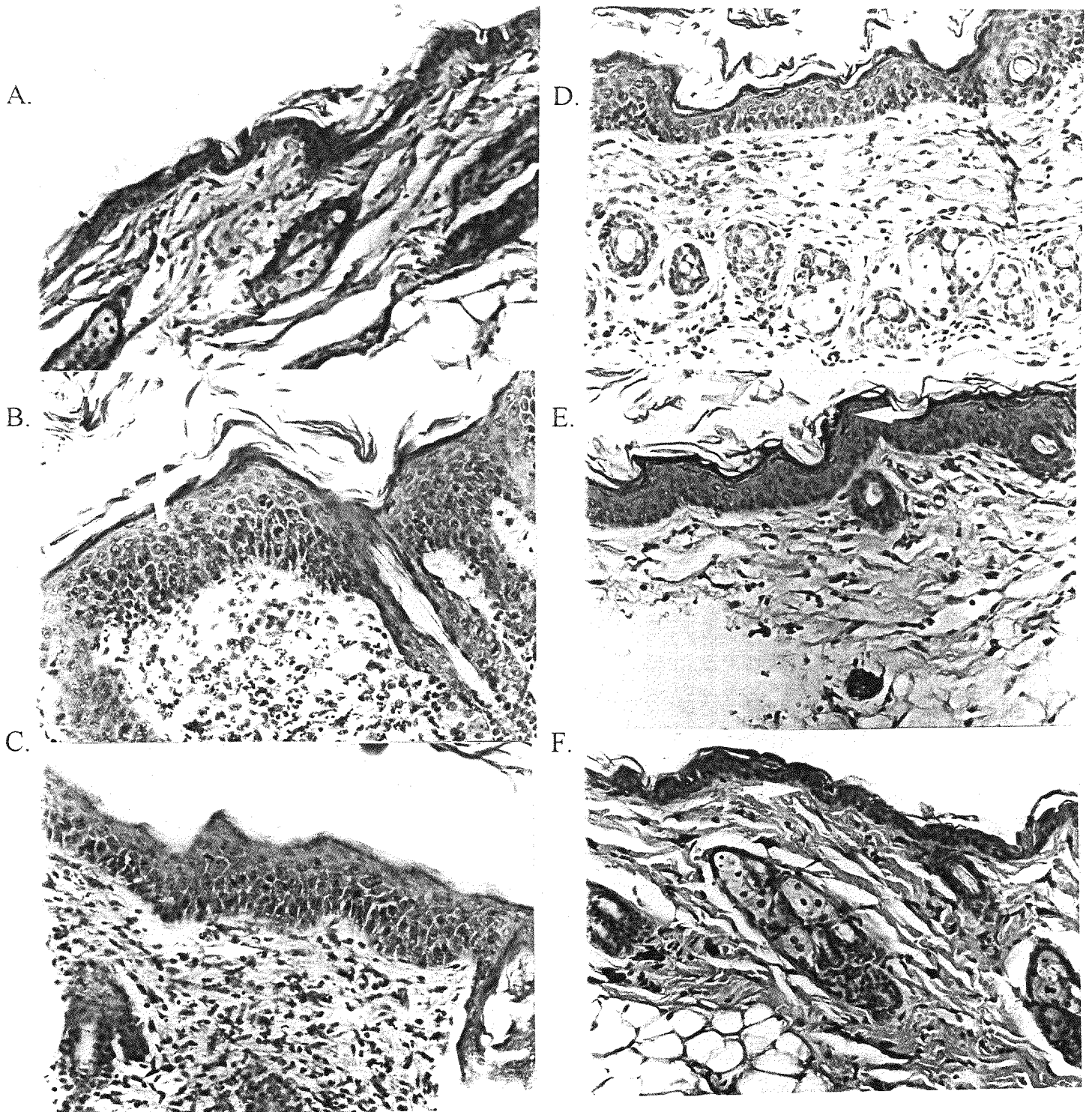


Fig 5 Morphological examination of TPA-treated mouse skin. Mice were treated topically with acetone(A) or TPA(B、C). The epidermis of skin treated with TPA become thick, leukocytes infiltration and intercellular edema were observed. Before application of TPA, mice had been pretreated topically with baicalein 80 nmol(D), 160 nmol(E) or 200 nmol(F). It showed slight or no inflammation. (H & E $\times 200$)

Table 3 Inhibitory effect of baicalein on TPA-induced epidermal ornithine decarboxylase

Group	Treatment ^a	Ornithine decarboxylase activity / pmol CO ₂ / mg protein / h	inhibition / %
1	Acetone	690.22 ± 30.98	-
2	TPA	5082.83 ± 65.83	-
3	Baicalein (80 nmol) + TPA	1227.43 ± 65.99***	88
4	Baicalein (160 nmol) + TPA	871.70 ± 29.54***	96
5	Baicalein (200 nmol) + TPA	807.26 ± 30.05***	97

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

*** P < 0.001. Statistically different from TPA group, t-test

Percent of inhibition(%) = $\frac{\text{Group 2} - \text{Group 3 (or 4.)}}{\text{Group 2} - \text{Group 1}} \times 100\%$

Table 4 Inhibitory effect of baicalein on the formation of H₂O₂ in mouse skin treated with TPA

Group	Treatment ^a	H ₂ O ₂ / nmol / cm ²	inhibition / %
1	Acetone	5.47 ± 0.99	-
2	TPA	19.37 ± 3.19	-
3	Baicalein (80 nmol) + TPA	9.27 ± 0.87***	73
4	Baicalein (160 nmol) + TPA	9.15 ± 0.55***	74
5	Baicalein (200 nmol) + TPA	8.75 ± 1.75***	76

^a CD-1 mice were treated with acetone (200 μl), TPA (5 nmol) in acetone (200 μl) or TPA (5 nmol) together with baicalein in acetone (200 μl). The mice were killed 1 h after the second TPA application and their skins were removed. H₂O₂ activity was determined. Data are expressed as the mean ± SD from 6 mice/group.

***P < 0.001. Statistically different from TPA group, t-test

Percent of inhibition(%)=Group 2- Group 3(or 4..)/Group 2- Group 1 × 100%

Table 5 Inhibitory effect of baicalein on MPO activity in mouse skin treated with TPA

Group	Treatment ^a	MPO / units / cm ²	inhibition / %
1	Acetone	17.09 ± 8.79	-
2	TPA	448.37 ± 59.84	-
3	Baicalein (80 nmol) + TPA	269.35 ± 83.09**	42
4	Baicalein (160 nmol) + TPA	219.41 ± 71.60***	53
5	Baicalein (200 nmol) + TPA	160.70 ± 68.08***	67

^a CD-1 mice were treated with acetone (200 μl), TPA (5 nmol) in acetone (200 μl) or TPA (5 nmol) together with baicalein in acetone (200 μl). The mice were killed 1 h after the second TPA application and their skins were removed. MPO activity was determined. Data are expressed as the mean ± SD from 6 mice/group.

P < 0.01; * P < 0.001. Statistically different from TPA group, t-test

Percent of inhibition(%) = (Group 2 - Group 3(or 4..)/Group 2 - Group 1) × 100%

**PART II Esculetin 誘發人類白血癌細胞(HL-60)凋亡
及其機制之探討**

中文摘要

Esculetin(6,7-dihydrocoumarin)是一種香豆精(coumarin)衍生物，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、莨菪等(16)，過去我們在抗氧化天然物開發中發現其具有不錯之抗氧化及抗發炎的作用，而近年來有文獻報告nonsteroidal antiinflammatory drugs對乳癌細胞株具有抑制生長之作用(10)，又香豆精衍生物如1,2-benzopyrone、7-hydroxycoumarin 對人類惡性細胞株皆有抑制生長之作用(22-24)，然以上作用機制目前仍不明朗。

最近很多報告指出一些抗癌藥物可藉由引起癌細胞程式性死亡(apoptosis)或改變癌細胞之生長週期來達到抑制癌細胞之增長與惡化(41-43)，雖然程式性死亡之機制仍不甚清楚，一般認為細胞在接收到死亡訊息後可能改變內在target(如粒線體)之正常功能，進而活化一些分解性酵素(如 caspases: CPP32)，使細胞死亡；又細胞週期的進行需pRb、cyclin、cyclin dependent kinase、cyclin dependent kinase inhibitor等蛋白的調控，因此了解抗癌藥物對癌細胞之調節作用將有助於提高藥物之效率。在本實驗結果中，觀察到esculetin可以抑制HL-60之細胞生長，並具有細胞毒性可以導致細胞死亡，在形態上可觀察到apoptosis的特徵，膠電泳中發現處理100 μ M esculetin可以在36、48小時明顯出現DNA ladder，進一步以ELISA定量DNA片段觀察到處理100 μ M esculetin 24小時後，DNA片段提高為正常的2.5倍；在細胞週期上esculetin可以使細胞週期停滯在G₀/G₁ phase，再觀察與apoptosis相關蛋白質的表現，發現Bcl-2減少、CPP32活化等現象。

Abstracts

Esculetin 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.(Euphobiaceae), *Atropa belladonna*(Solanaceae), *Datura stramonium* L.(Solanaceae) *Hyoscyamus niger* L(Solanaceae)(16). Previously, we found that esculetin presented antioxidant and antiinflammatory bioactivities (unpublished data). It is reported that nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of breast cancer cells (10). Furthermore, 1,2 benzopyron(coumarin) and 7-hydroxycoumarin showed growth-inhibitory effects on human malignant cell lines *in vitro* (22-24). However, the mechanisms of antiproliferation of these compounds are remain to be defined.

Recently, many chemotherapeutic agents showed antitumor activity on the regulation of cell proliferation including programmed cell death (apoptosis) and the negative growth control of growth arrest(41-43). It is supposed that a promising chemotherapeutic agent will have to promote the cells entering to go these two pathways. The exploration of extrinsic and intrinsic modulation of chemotherapeutic agents may improve the efficacy of anticancer treatment. In this experiment, the ability of esculetin to affect cell viability, DNA fragmentation, cell cycle delay, and the level of cell apoptosis associated protein like Bcl-2, CPP32 has been studies in HL-60 cell line. Within a concentration of 100 μ M, a 48hr exposure of esculein decrease the cell number and inhibit the metabolic ratio of MTT in HL-60 cell. Esculetin also causes the morphological change in nuclei of HL-60 that undergoing apoptosis. DNA ladder was also observed in the electrophoresis

of the nuclear after 36, 48 hr exposure under 100 μ M esculetin. Moreover, by the measurement of ELISA, 24hr exposure of esculetin, increase the concentration of DNA fragmentation to 2.5 fold compared to the normal cell. The flow cytometry analysis shows the esculetin can arrest at the G₀/G₁ phase. Finally, we examine the effect of esculetin to some apoptosis associated protein. Esculetin treatment of HL-60 cells can significantly reduce the content Bcl-2 and enhance the activity of CPP32.

緒 論

由最近行政院衛生署八十五年的台灣地區國人十大死亡原因，癌症仍為十大死亡原因之首，這顯示預防或延緩癌症的發生實為刻不容緩的事，而癌症的形成是透過許多複雜與多重的過程，表示出生活環境中，許多致癌因子的存在，包括空氣污染、水源污染、食品中的添加物，更嚴重的為地球溫室效應的產生，導致人們更容易受到UV的傷害，環境中許許多多的致癌因素，導致癌症的發生的發生率高居不下，由於近年來國人對健康的概念提升，對於生活品質要求及希望吃得健康，本實驗室致力於開發天然物中所含的抗癌成份，希望可以由攝取食品達到預防癌症的發生，更進一步抑制癌症及導致癌細胞死亡。目前癌症的治療無論是化學治療或投予抗癌藥物，皆對人體產生極大的傷害，故目前許多研究趨向以天然藥物達到抑制癌細胞的增長與惡化，本篇中以中國藥材中常見成份香豆精衍生物(esculetin, 6,7-dihydroxycoumarin)，來探討其誘發人類血癌細胞(human leukemia cells, HL-60)死亡的機制。

Esculetin(6,7-dihydroxycoumarin) 為 香 豆 精 (coumarin, 1,2-benzopyrone)的衍生物之一，coumarin廣泛存在許多植物中，過去臨床上曾被使用做為治療水腫、多種癌症和血管栓塞治療(1-4)及其具有抗發炎功效(5)；在in vivo中能活化macrophages，以及影響interleukin產生和致癌基因(oncogene)的表現(6-8)，其衍生物包括7-hydroxycoumarin、4-hydroxycoumarin 顯示具有抑制 prostaglandin 生成的能力(9)，6,7dihydroxycoumarin 會明顯降低 leukotriene B(LTB) 分泌(10)，7-hydroxycoumarin 並透過抑制 mRNA 層次 down-regulation 調節血小板調節

因子A和B(platelet-derived growth factors A and B)抑制增生(11)，而根據過去本實驗室研究以及其它報告顯示，coumarin衍生物esculetin具有良好的抗氧化作用(12-14)以及Chang等(15,16)說明各種coumarin的衍生物其有抗氧化功效，能夠抑制xanthine oxidase活性，進而抑制代謝過程的superoxide anion的產生。

Esculetin其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、茄科的曼陀羅等(16)，為一種phenolic antioxidant compound，在民間被作為鎮痛和抗炎藥物。在過去研究發現esculetin與3,5-ditercbutyl-4-hydroxytoluene(BHT)在in vivo中有相似的抗氧化功效，可以提高glutathione，防禦有機體(organism)存在oxidative stress下，能夠降低氧化性傷害(17)；esculetin對於xanthine oxidase活性具有良好的抑制作用和捕捉superoxide anion的能力(15)，在Rose等(18)提到在MDA-MB-231 human breast cancer cell line中esculetin會選擇性的抑制5-和12-lipoxygenases，但不會抑制prostaglandin生成，進而抑制細胞生長，在Huang等人(19,20)指出esculetin在vascular smooth muscle cell中具有抗發炎的效能，其可能部分透過調節protein tyrosine kinase和調節抑制lipoxygenases；Noguchi等人(21)亦指出esculetin為lipoxygenases inhibitor，在human breast cancer cell line中linoleic acid存在與不存在下細胞成長皆會受抑制。

在1987年，即有研究顯示coumarin在部分癌細胞中表現出細胞毒性，包括renal(ACHN和Caki-2)、erythroleukemic(K562)等細胞株，以細胞流速分析儀分析顯示coumarin能使大部分細胞的細胞週期停滯在G₀/G₁ phase，少量進入S phase；在human malignant cell lines中加入coumarin和7-hydroxycoumarin，能明顯抑制DNA合成，表示其可降低

RNA及蛋白質的合成(22,23)。在1997年，Egan等人說明8-nitro-7-hydroxycoumarin在K562、HL-60中會透過誘發apoptosis導致細胞死亡，同時顯示細胞週期的改變及抑制DNA的合成(24)。

Apoptosis為細胞死亡的一種形式，又稱programmed cell death，在發生apoptosis的細胞中，可以觀察到nucleus condensation、membrane-bound apoptotic bodies、nuclear fragment等形態上的特徵(25,26)，其中有許多分子參與apoptosis複雜的調節過程，包括較早期的位於粒線體膜上Bcl-2 family成員的相互調節(27,28)，以及中期interleukin-1 β -converting enzyme(ICE) family的活化(29-31)，晚期ICE family的受質切割斷裂包括poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)(32)、sterol-regulatory element-binding proteins(SREBPs)(29)、nuclear lamin(33)和U1 associated 70-kDa protein(34)以及形態上的改變。Wang等在1996年發現cytochrome c與apoptosis有關(35)，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(36)，更進一步證明Apaf-3即為caspase family成員之一的caspase-9，caspase-9與Apaf-1在cytochrome c及dATP存在下，能經由NH-terminal CED-3 homologous domains來互相結合，導致caspase-9的活化進一步切斷及活化caspase-3(37)，而位於粒線體膜上的Bal-XL或Bcl-2則可以藉由與cytochrome c結合，抑制cytochrome c從粒線體內釋放細胞質中，抑制了apoptosis的進行，但目前為止apoptosis進行過程其調控機制的過程並未完全明朗。

由上述得知coumarin具有抗發炎、抑制癌細胞生長的功效，然其機制不明，故本實驗選用esculetin為實驗材料，利用HL-60(human leukemia cancer cell line)細胞模式觀察esculetin對HL-60細胞生長抑制作

用，及其分子機制探討。

研究目的

根據本實驗室過去研究發現 coumarin(1,2-benzopyrone) 衍生物 esculletin(6,7-dihydroxycoumarin)，在過氧化物誘發肝細胞損傷中具有良好的抗氧化和抗發炎的功能 (unpublished data)；而 nonsteroidal antiinflammatory drugs 對癌細胞株具有誘發癌細胞凋亡之作用，又文獻中指出 coumarin 衍生物 1,2-benzopyrone、7-hydroxycoumarin 對人類惡性細胞株皆有抑制生長之作用(22-24)；故本實驗利用 HL-60 細胞模式，以測定細胞生長曲線、細胞毒性及形態上觀察，再併用膠電泳、ELISA 的 DNA 分析、細胞週期和西方點墨法分析 (western blot)，探討 esculletin 對 HL-60 生長抑制作用及其分子作用機制。

材料與方法

(一)化學試劑及使用儀器

1. 化學試劑

tris-base、ethylenediamine - tetraacetic acid(EDTA)、citrate、sodium hydroxide、MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)、proteinase K、Ribonuclease A(RNase A)、Ribonuclease、PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)、sodium orthovanadate、SDS、sodium chlorid以上皆購自美國Sigma Chemical Co、Bio-Rad protein assay kit、ammonium persulfate、TEMED(N',N',N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)、bis(N,N'-Methylene-bis-acrylamide)、acrylamide、prestained SDS-PAGE standard以上購自美國BIO-RAD公司、RPMI 1640、PBS、fetal bovine serum、PSN antibiotic mixture、glutamine以上皆購自美國GIBCO BRL公司、hydrogen peroxide(MERCK)、X-ray film(Kodak)、Bcl-2(p25) mouse monoclonal IgG1 antibody(Santa Cruz Biotechnology, SC-509)、Rb(IF-8) mouse monoclonal antibody(NEO MARKERS Fremont CA, 107P609)、CPP32(1-219) mouse monoclonal antibody(Transduction Laboratories, C-31720)、try54 mouse monoclonal antibody(Transduction Laboratories, P38620)、PKC δ (114-289) mouse monoclonal antibody(Transduction Laboratories, P14820)、 α -tubulin(DM1A) mouse monoclonal antibody(CALBIOCHEM, CP06)、anti-mouse Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody(from sheep)(Amersham LIFE SCIENCE)

2. 儀器

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

螢光光譜儀：Spectrophotometer (HITACHI；F2000)

倒立式顯微鏡：Nikon；Diaphot 300

均質機：Tokyo Rikakikai；Eyela Mazela-Z

蛋白質電泳槽：Mini protein II cell(BIO-RAD)

蛋白質轉印槽：Hoefer Pharmacia Biotech

冷凍離心機：Sigma 2K 15

(二)實驗方法

一、細胞培養

將人類白血癌細胞HL-60(Human leukaemia cell line)培養於RPMI 1640 培養基(含10 % Fetal bovine serum及1% PSN、1% glutamine)中，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，每週更換二~三次培養基，以離心1000 rpm、5分鐘，移去上清液，加入新鮮培養基。

二、細胞生長曲線測定

將不同濃度esculetin包括0、10、20、50、100 μ M等幾種濃度加入 1×10^5 cell/ml HL-60 cell，在不同的時間計算細胞的總數量，主要觀察的時間為0、24、48、72小時，以trypan blue dye exclusion方法來計算細胞生長速率。

三、MTT法之細胞毒性分析

此細胞毒性分析係根據Alley等之方法(38)，其原理為存活的細胞能將 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (tetrazolium salt)經由粒線體中dehydrogenase作用代謝還原成Formazan Crystal，來測其細胞存活。實驗方法是在12 well的培養皿中置入 2×10^5 cell/ml，然後加入各種不同濃度之esculetin (包括0、10、20、50、100 μ M)，並以umbelliferone(7-Hydroxycoumarin)作為比較，分別培養24、48小時後，離心除去培養基，加入新培養基與200 μ l MTT (5mg/ml)作用四小時後，離心移去上清液加入isopropranol 2~5ml，將formazan溶解，於光波長563nm下測定OD值，由控制組與實驗組比較，觀察

esculetin及umbelliferone加入後的細胞存活率。

四、細胞型態及核染色觀察

將HL-60 cell(2×10^5 cell/ml)培養於不同濃度esculetin下，分別在0、24、48小時在倒立式顯微鏡觀察並拍照，觀察細胞apoptosis的產生時間，是否有apoptotic body、細胞皺縮、泡狀外膜形成、核濃縮等現象產生，再調整細胞濃度為 2×10^5 /ml以cytospin 850 rpm、5分鐘打在玻片上並以絕對酒精固定，然後分別以0.1% haematoxylin及50 μ g/ml propidium iodide(P.I.)染色1分鐘，再以大量蒸餾水沖洗，避光晾乾再封上蓋玻片，於螢光顯微鏡下觀察是否有核濃染現象(39)。

五、粒線體膜通透性之測定 (mitochondrial membrane potential determination)

當細胞中粒線體損傷時，一般即表示細胞受到了傷害，而粒線體損傷初步可由mitochondrial membrane potential觀察，本實驗擬以rhodamine 123滯留作用來評估粒線體膜電位之變化，粒線體可能為apoptosis過程中與酵素活化有重要關係。實驗方法將 1×10^6 cell加入100 μ M esculetin，在不同的時間收集加藥和未加藥細胞並在收集前預處理1 μ M rodamine 123 分鐘之後儲存於-80 $^{\circ}$ C，細胞收集完以3 ml 0.1% triton-100打破細胞，再以6000 xg離心15 min，最後以螢光光度計Ex_{490nm}/Em_{515nm}測定之(44)。

六、DNA萃取與agarose電泳

在HL-60細胞(3×10^6 cell/per dish)培養於esculetin 100 μ M，於0、24、48小時收集 1×10^7 細胞並以PBS wash後，以1ml lysis buffer(0.1%

BHT、0.5% SDS、100mM EDTA、10 mM Tris, pH 8.0), 另外加入 RNase A 200 μ g/ml, 於37 $^{\circ}$ C下反應1小時, 接著加入500 μ g/ml proteinase K, 於50 $^{\circ}$ C下作用12~24小時, 直至澄清。

以與sample 1:1比例加入phenol萃取, 接著在10000rpm離心10分鐘取上清液, 接著以與sample 1:1比例加入chloroform-isoamylalcohol(24:1)萃取, 接著再以10000rpm離心10分鐘取上清液, 再以與sample 1:1比例加入phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1)萃取, 然後再以10000rpm離心10分鐘取上清液, 之後重覆以上步驟, 最後加入約sample 1/10容積的3M sodium acetate(pH 7.2)與兩倍容積冰冷的純酒精均勻混合, 置於-80 $^{\circ}$ C overnight, 再以14000rpm離心10分鐘將DNA沉澱, 去除上清液加入70%酒精, 再以10000rpm、10分鐘離心將DNA沉澱並去除上清液, 接著靜置1~2個小時使酒精揮發, 進一步以RNase-TE buffer (100 μ g/ml RNase, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) 37 $^{\circ}$ C反應2h溶解DNA, 以UV Spectrophotometer在OD_{260nm/280nm}定量DNA(40)。

取等量DNA跑1.5% agarose gel用0.5X TBE buffer於100V下進行電泳, 跑完電泳後將gel以ethidium bromide(EtBr)染色 30分, 二次水退染30分, 置UV燈下以拍立得照相。

七、細胞DNA片斷ELISA之分析

在HL-60細胞培養於不同濃度的esculetin包括0、10、20、100 μ M, 於24小時收集細胞, 以cellular DNA fragmentation ELISA kit (Boehringer Mannheim)來定量片斷DNA, 觀察不同濃度esculetin是否呈現dose response關係。實驗方法是細胞培養於含10 μ mol/ml BrdU labeling reagent的RPMI 1640中37 $^{\circ}$ C 24小時, 再將細胞種microtiter plate並加入

不同濃度esculetin 24小時；另準備一滅菌96 well microtiter dish，每個well加入100 μ l coating solution(含anti-DNA antibody)，蓋上adhesive cover foil 4 $^{\circ}$ C反應overnight於使用前倒掉solution，清洗3次，然後將處理過esculetin之細胞100 μ l(2×10^4)加入，37 $^{\circ}$ C反應1小時，再以微波爐500-1000w 加熱5分，再加入 conjugation solution、substrate solution搖晃60分鐘，最後以1M硫酸停止反應，於450 nm下測定。

八、細胞週期測定

在HL-60細胞(2×10^5 cell/ml)培養於esculetin 100 μ M，於0、3、6、9、12、24、36、48小時分別收集 1×10^6 cell，PBS wash後離心，以80% ethanol將細胞固定，放置-20 $^{\circ}$ C 1~2小時，再以PBS wash、離心，加入RNase 50 μ g/ml和10 μ l propidium iodide(0.5mg/ml)(P.I.)染色，置放冰上以flow cytometer (FACS)分析(45)。

九、西方點墨法(Western blotting)

在HL-60細胞(2×10^5 cell/ml)培養於含esculetin 100 μ M培養基中，於0、3、6、9、12、24、36、48小時分別收集 9×10^6 cell，以PBS wash後離心，加入RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50mM Tris, pH 7.5)先將細胞溶解，立刻加入1mM sodium orthovanadate、100 μ g/ml PMSF、170 μ g/ml leupeptin、81 μ g/ml aprotinine，在冰上充分vortex 30分鐘，最後再加入100 μ g/ml PMSF後，以4 $^{\circ}$ C 10000 xg離心10分鐘即得total lysate，所得蛋白質以BIO-RAD protein assay kit定量。

取約80 μ g~100 μ g蛋白質與loading buffer(3ml distilled water、1ml

0.5M Tris-HCl, pH 6.8、1.6ml glycerol、1.6 ml 10% SDS、0.4ml β -mercaptoethanol、0.4ml 0.5% bromophenol blue)以1:1比例混合，於95°C加熱3分鐘，將sample放入well以上層膠 100V下層膠150V跑電泳，完成後再進行transfer以nitrocellulose membrane轉印，轉印完的NC paper先以ponceau s溶液(0.5% ponceau s concentrate、0.5% acetic acid)浸泡1分鐘觀察蛋白質轉印情形，再以含5% 脫脂奶粉TBS buffer(10mM Tris、150mM NaCl、0.05% tween-20, pH 8.0) blocking 30分鐘，接著將NC paper置入含0.5-1 μ g primary antibody 的TBS buffer，4°C反應overnight，之後以TBS洗3次，再以Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody反應40分以TBS buffer洗3次，最後加Amersham ECL reagents kit反應，於暗房以Kodak film曝光1~10 min，以顯影劑及定影劑沖片觀察。

十、分析統計

實驗過程每組皆三次重覆以上，以Student t-test統計分析，於 $p < 0.05$ 表示為有意義的差異。

結 果

一、細胞生長曲線測定

將不同濃度esculetin(包括0、10、20、50、100 μ M)等幾種濃度加入 1×10^5 cell/ml HL-60 cell，在不同的時間計算細胞的總數量，主要觀察的時間為0、24、48、72小時，結果發現在加藥24小時以內其細胞生長並無明顯差異，在48小時以上可以看明顯觀察到50 μ M以上濃度，細胞生長受到抑制，並有細胞死亡的現象($P < 0.01$) (Fig. 2)。

二、MTT法之細胞毒性分析

在實驗結果中觀察到暴露不同濃度的esculetin包括0、10、20、50、100 μ M 24小時後，在50 μ M、100 μ M esculetin濃度下可以看到輕微的細胞毒性存活率約80%、75%($P < 0.01$)，48小時後觀察處理50 μ M、100 μ M esculetin的實驗組細胞存活降低至74%、40%($P < 0.01$)，以umbelliferone(7-Hydroxycoumarin)作為比較，發現在相同的劑量下相同時間其不具細胞毒性 (Fig. 3)。

三、細胞型態及核染色觀察

HL-60 cell培養於不同濃度esculetin下，在48小時在倒立式顯微鏡可以觀察到100 μ M esculetin處理的細胞有apoptosis的產生，由細胞型態上可以明顯觀察到apoptotic body、細胞皺縮、泡狀外膜形成等現象產生，進一步在螢光顯微鏡下觀察是否有核濃染現象，結果發現在24小時即有DNA濃染的現象 (Fig. 4-5)。

四、DNA片段的形成

HL-60 cell培養於100 μ M esculetin下，在不同的時間收集細胞，觀察到細胞片段的產生，結果在36、48小時可以看到明顯DNA ladder的產生，表示細胞內DNA產生片斷化現象(Fig. 6)。

五、細胞DNA片斷ELISA之分析

以HL-60加入不同濃度的esculetin(0, 10, 20, 50, 100)培養24小時，觀察定量DNA產生斷裂的情形，結果觀察到隨著劑量的提高，DNA斷裂的情形增加，在50 μ M及100 μ M esculetin處理下，DNA片斷分別增加1.6倍及2.5倍($P < 0.05$)(Fig 7)。

六、細胞週期分析

以Flow cytometer(FACS)分析，培養於100 μ M esculetin下的細胞，其細胞週期的變化，在實驗結果中可以明顯觀察到細胞週期在24小時有停滯在 G_0/G_1 phase的現象， G_2/M phase減少，至36、48小時除了 G_0/G_1 phase停滯的現象和 G_2/M phase減少，更觀察到hypodiploid DNA的產生即細胞內DNA產生片斷化的現象為apoptotic peak。(Fig 8-10)

七、粒線體膜電位通透性影響

由近來研究得知粒線體在apoptosis過程，可能調節酵素活化、cytochrome c、bcl-2蛋白的重要角色，以及與apoptosis-inducing factor(AIF)釋於有關，而粒線體損傷初步可由粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)觀察，本實驗擬以rhodamine 123滯留作用來評估粒線體膜電位之變化。細胞培養於100 μ M esculetin下，在不同的時間收集加藥與不加藥細胞，結果顯示細胞質中的rhodamine 123

中的含量並未隨時間的增加而降低，表示粒線體膜電位在apoptosis活化過程並未產生去極化的現象，故粒線體在調控apoptosis過程可能是透過其它路徑(Fig. 12)

八、細胞內蛋白質表現

將HL-60處理100 μ M esculetin，以time-course觀察細胞內的蛋白質表現：

pRB

由細胞週期測定顯示esculetin會導致HL-60細胞週期的改變，而RB蛋白對於細胞生長、分化及細胞死亡等調控有密切的關係()，故觀察RB的磷酸化狀態，結果顯示HL-60在暴露100 μ M esculetin 24小時後，hyper-RB的量開始下降，而hypo-RB的表現量則開始增加，在48小時RB去磷酸化的情況便更加顯著(Fig 11)。

Bcl-2

過去已知Bcl-2為Bcl-2 family的成員之一，其表現與早期細胞apoptosis有密切的關係，其表現量影響apoptosis之進行，在實驗結果中觀察Bcl-2在24小時內的表現量，發現Bcl-2在3~6小時即有表現下降的現象，之後保持一定的表現量(Fig 13)。

CPP32

CPP32的切割活化能起始apoptosis的進行，在實驗中CPP32在24小時有明顯活化，至36小時可以觀察到CPP32完全被分解活化(Fig 14)。

Tyrosine phosphorylation

過去研究指出esculetin在抗發炎反應過程，其可能透過抑制protein tyrosine kinase活性(19-20)又tyrosine phosphorylation與細胞的增殖及分化有密切關係(46)，故本實驗進一步探討esculetin在HL-60細胞中，其

抑制細胞生長與誘發細胞凋亡是否有關，結果在電泳圖中可以觀察到分別約在80 kDa、60~50 kDa、40 kDa等tyrosine磷酸蛋白，在細胞暴露於100 μ M esculetin下其磷酸化隨著暴露esculetin時間的增加，tyrosine phosphorylation均有受到抑制(Fig 15)。

PKC δ

由過去文獻說明protein kinase C(PKC) family的活化對於控制細胞生長、分化及細胞死亡等訊息的調節扮演重要的角色，其中PKC δ 近來發現與interleukin-1 β converting enzyme(ICE)的活化相關，並且活化方式相似(47)；另外在in vivo研究中發現PKC δ 為PKC family中能夠受到tyrosine phosphorylation的isoform，故本實驗進一步觀察在esculetin誘發apoptosis過程中，PKC δ 的表現是否有所改變。PKC δ 在活化過程必須改變結構或受到蛋白酵素分解使活化區暴露，實驗結果中觀察到細胞在處理100 μ M esculetin下，PKC δ 在24小時開始明顯活化，隨著暴露時間增加PKC δ 持續活化在48小時則活化程度最高(Fig 16)。

討 論

Coumarin及其衍生物具有抗氧化、抗發炎，以及抑制癌細胞生長的功能，目前顯示其透露可能透過訊息路徑包括在1. human malignant cell lines中加入coumarin和7-hydroxycoumarin，能抑制DNA合成，降低RNA及蛋白質的表現(22)；2. Egan等(24)以8-nitro-7-hydroxycoumarin處理K562、HL-60中會改變細胞週期及抑制DNA的合成，並透過誘發apoptosis導致細胞死亡；3. Huang等(19,20)指出esculetin在vascular smooth muscle cell中可能部分透過抑制protein tyrosine kinase和調節抑制lipoxygenases，達到抗發炎及抗增生的效果。

而本實驗以HL-60細胞模式研究其細胞生長及死亡的路徑，在處理esculetin不同濃度下及不同的時間觀察，可以看到在48小時50 μ M即能使細胞生長速率降低，並使細胞產生死亡(apoptosis)並在細胞毒性分析觀察到esculetin對HL60細胞具有細胞毒性與umbelliferone(7-Hydroxycoumarin)相較，esculetin具有較強抑制細胞生長能力及細胞毒性；在形態學上在處理100 μ M esculetin 24小時即可觀察到核濃染，在48小時可以明顯觀察到apoptotic body、細胞皺縮、泡狀外膜形成等現象產生；進一步在膠電泳觀察apoptosis所產生的典型的DNA fragmentation，結果在100 μ M esculetin的劑量下，在36、48小時則明顯觀察到apoptotic ladder再ELISA定量DNA產生斷裂的情形，結果在24小時50 μ M及100 μ M esculetin處理下，DNA片斷分別增加1.6倍及2.5倍(P<0.05)。由過去的研究發現coumarin的藥物會使某些細胞株停滯在G₀/G₁ phase減少細胞進入S phase抑制DNA合成(22-24)，且在許多調控apoptosis的訊息傳遞亦影響到細胞週期(45)，而結果在實驗中可以觀察

到細胞暴露於100 μ M esculetin下，24小時開始細胞有停滯在G₀/G₁中情形，且隨著時間增加停滯在G₀/G₁中情形也變得嚴重，在至36、48小時除了G₀/G₁ phase除了停滯的現象，更觀察到apoptotic peak產生表示細胞DNA產生斷裂的情況嚴重。

根據過去文獻指出粒線體在apoptosis活化過程扮演很重要的調節角色，包括許多酵素蛋白的調節活化、apoptosis-inducing factor(AIF)和cytochrome c的釋放(48)，在本實驗中觀察粒線體膜電位的改變，結果在esculetin誘發apoptosis的過程粒線體膜電位並未隨著時間產生去極化的現象，故其可能未影響粒線體膜電位而是透過其它路徑。觀察細胞內與apoptosis有關的蛋白質表現，首先由實驗結果可以看到以處理100 μ M esculetin的time-course蛋白質RB在24小時開始hyper-RB有去磷酸化的現象形成hypo-RB，與細胞週期中24小時開始產生G₀/G₁ arrest的時間相符；Bcl-2 family其主要位於粒線體外膜，以dimer形式來調節細胞死亡或細胞存活的過程，在實驗中發現Bcl-2表現在6小時開始下降，之後保持一定的表現量，而Bcl-2表現降低亦表示粒線體中許多apoptosis的活化因子可能不受到抑制包括AIF、cytochrome c等，進而在24小時開始活化水解CPP32起始apoptosis的路徑。

由過去文獻說明esculetin在抗發炎反應過程，具有抑制癌細胞株生長的作用，其可能透過抑制protein tyrosine kinase活性(19-20)，故本實驗進一步探討esculetin在HL-60細胞中，對其抑制細胞生長與誘發細胞凋亡是否與抑制tyrosine phosphorylation有關，實驗結果可以觀察到未暴露esculetin的細胞分別約在80 kDa、60~50 kDa、40 kDa等蛋白質tyrosine有磷酸化的現象，細胞暴露在100 μ M esculetin下其磷酸化隨著暴露esculetin時間的增加，tyrosine phosphorylation均有受到抑制。

由過去研究已知protein kinase C(PKC) family的活化對於控制細胞生存(mitosis)和細胞死亡(apoptosis)之平衡訊息的調節扮演重要的角色(49)，但對於如何調節細胞死亡的過程仍了解很少。PKC family哺乳類生物中發現至少有十個成員包括 α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ξ 、 η 、 θ 和 λ ，來自9個code(50)，而這些酵素又被分為group A(cPKC)(α 、 β I、 β II和 γ)、group B(nPKC)(δ 、 ϵ 、 η 和 θ)和group C(aPKC)(ξ 和 λ)，其中PKC δ 近來發現與interleukin-1 β converting enzyme(ICE)的活化相關，並且活化方式相似(46)；另外在in vivo研究中發現PKC δ 為PKC family中能夠受到tyrosine phosphorylation產生活化的isoform(51)(52)，故本實驗探討在esculetin誘發apoptosis過程，是否與PKC δ 的活化有關，在實驗結果中觀察到細胞在處理100 μ M esculetin下，PKC δ 在24小時開始明顯活化，隨著暴露時間增加PKC δ 持續活化在48小時則活化程度最高，其生長抑制及細胞死亡亦可能與PKC δ 活化有關。

在本實驗中證實esculetin能使HL-60細胞抑制生長並產生apoptosis，並透過改變細胞週期，使hyper-RB去磷酸化轉為hypo-RB表現量增加，實驗中進一步探討esculetin在促進細胞產生apoptosis過程，是透過那一條訊息路徑導致細胞死亡，發現esculetin在誘發HL-60細胞死亡過程，細胞內部分蛋白tyrosine磷酸化有降低的情況，可能與protein tyrosine kinase受到抑制有關，其過程影響PKC δ 活化並參與細胞死亡訊息傳遞。

參考文獻

1. Egan, D., O'Kennedy., Moran, E., Cox., D., Prosser, E., Thornes, R.D. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab. Rev.* 22, 5, 503-529, 1990.
2. Piller, N.B. The action of benzopyrones on an experimental model of lymphoedema : A contribution to their mode of action. *Br J Exp Pathol.* 57, 713-721, 1976.
3. Dunn, C.J., Koh, M.S., Willoughby, D.A., Giroud, J.P. The value of multifactorial screening for antiinflammatory activity as shown by coumarin. *J Pathol*, 122, 201-207, 1977.
4. Feur, G., Kellen, L.A., and Kovacs, K. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast carcinoma by coumarin in the rat. *Oncology.* 33, 35-39, 1976.
5. Ivanovska, N., Yossifova, T., Vassileva, E., and Kostova, I. Effect of some hydroxycoumarins on complement-mediated hemolysis in human serum. *Meth Find Exp Clin Pharmacol.* 16, 557-562, 1994.
6. Tseng, A., Lee, W.M., Jakobovits, E.B., Kirslén, E., Hakam, A., Mclick, J., Bukj, K., Kun, E. Prevention of tumourigenesis of oncogen-transformed rat fibroblasts with DNA site inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1107-1111, 1987.
7. Piller, N.B. A morphological assessment of the stimulatory effect of coumarin on macrophages. *Br J Exp Pathol.* 59, 93-96, 1978.
8. Hardt, T.S., Ritschel, W.A. The effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin on in vitro macrophage phagocytosis of latex particles. *Meth Find Exp Clin Pharmacol.* 5, 39-43, 1983.

9. Lee, R.E., Bykadi, G., Ritschel, W.A. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by coumarin, 4-hydroxycoumarin, and 7-hydroxycoumarin. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 31, 640-642, 1981.
10. Earashi, M., Noguchi, M., Kinoshita, K., and Tanaka, M. Effects of eicosanoid synthesis inhibitors on the in vitro growth and prostaglandin E and leukotriene B secretion of a human breast cancer cell line. *Oncology.* 1995, 52, 150-155.
11. Maxwell, M., Naber, S.P., Wolf, H.J., Galantopoulos, T., Hedley-Whyte, E.T., Black, P.M., Antoniades, N.H. Coexpression of platelet derived growth factor(PDGF) and PDGF-receptor gene by primary astrocytomas may contribute to their development. *J Clin Invest.* 86, 131-140, 1990.
12. Paya, M., Ferrandiz, F., Miralles, C., Montesinos, C., Ubeda, A., Alcaraz, M.J. Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation. *Arzneimittel Forsch.* 43, 655-658, 1993.
13. Paya, M., Halliwell, B., Hoult, J.R.S. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 44, 205-214, 1992.
14. Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K.I., and Kikugawa, K. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol Pharm Bull.* 19, 558-563, 1996.
15. Chang, W.S., Lin, C.C., Chuang, S.C., and Chiang, H.C. Superoxide anion scavenging effect of coumarins. *American Journal of Chinese Medicine.* 24, 11-17, 1996.
16. Chang, W.S., and Chiang, H.C. Structure-activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res.* 15, 1969-1974, 1995.
17. Martin-Aragon, S., Benedi, J.M., and Villar, A.M. Effect of the

- antioxidant(6,7-dihydroxycoumarin) esculetin on the glutathione system and lipid peroxidation in mice. *Gerontology*. 44, 21-25, 1998.
18. Rose, D.P., Connolly, J.M. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res*. 50, 7139-7144, 1990.
 19. Huang, H.C., Lai, M.W., Wang, H.R., Chung, Y.L., Hsieh, L.M., and Chen, C.C. Antiproliferative effect of esculetin on vascular smooth muscle cell: possible role of signal transduction pathways. *Japan Journal of Pharmacology*. 237, 39-44, 1993.
 20. Huang, H.C., Hsieh, L.M., Chen, H.W., Lin, Y.S., Chen, J.S., Effects of baicalein and esculein on transduction signal and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *Eur J Pharmacol*. 268, 73-78, 1994.
 21. Noguchi, M., Earashi, M., Minami, M., Miyazaki, I., Tanaka, M., and Sasaki, T. Effects of piroxicam and esculetin on the MDA-MA-231 human breast cancer cell line. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential fatty acids*. 53, 325-329, 1995.
 22. Marshall, M.E., Albainy-Jenei, S., Umerani, A., Zhao, Q. Direct cytotoxic effects of coumarin and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J Irish Colleges Phys. Surg*. 22(2suppl.), 71, 1993.
 23. Siegers, C.P., Bostelmann, H.C. Effects of coumarin on cell lines. *J Irish Colleges Phys. Surg*. 22(2suppl. 1), 47-48, 1993.
 24. Egan, D., James, P., Cooke, D., and O'Kennedy, R. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. *Cancer Lett*. 118, 201-211, 1997.
 25. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. Cell death : the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-305, 1980.

26. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284, 555-556, 1980.
27. Oltvai, Z., Millman, C., and Korsmeyer, S. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74, 609-619, 1993.
28. Oltvai, Z., and Korsmeyer, S. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*. 79, 189-192. 1994.
29. Wang, X., Zelenski, N.G., Yang, J., Sakai, J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. Cleavage of sterol regulatory element binding protein(SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J*. 15, 1012-1020, 1996.
30. Duan, H., Chinnaiyan, A.H., Hudson, P.L., Wing, J.P., He, W., and Dixit, V.M. 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.
31. Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D.K., Thornberry, N.A., Yamin, Y.Y., and Nicholson, W.D. CPP32/Apopain is a key interleukin 1 β converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 271, 1841-1844, 1996.
32. Nicholson, W.D., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., and Miller, D.K. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376, 37-43, 1995.
33. Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during

- apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92, 9042-9046, 1995.
34. Casciola-Rosen, L.A., Miller, D.K., Anhalt, G.J., and Rosen, A. Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 269, 30757-30760, 1994.
 35. Liu, X., Kim, C.N., 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.
 36. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., 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.
 37. Li, P., Nijhawan, D., Buihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptosis protease cascade. *Cell.* 91, 479-489, 1997.
 38. Alley M.C., Scudiero D.A., Monkds A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48, 599-601, 1988.
 39. Ramachandra, S., and Studzinski, G.P. Morphological and biochemical criteria of apoptosis. *Cell Growth and Apoptosis.* Oxford University Press Ins., New York, 1995.
 40. Meßmer, U.K., Reed, J.C., and Brune, B. Bcl-2 protects macrophage from nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 271, 33, 20192-20197, 1996.
 41. Sachs, L., and Lotem, J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells : New implications for therapy. *Blood* 82, 15-21,

- 1993.
42. Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026, 1994.
 43. Sen, S., and D'Incalci, M. Apoptosis: Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Lett.* 307, 122, 1992.
 44. Imberti, R., Nieminen A.L., Herman B., Lemasters, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butyl hydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 265, 392-399, 1993.
 45. Walker, P.R., Kwast-Welfeld, J., Gourdeau, H., Leblanc, J., Neugebauer, W., and Sikorska, M. Relationship between apoptosis and cell cycle in lymphocytes: role of protein kinase C, tyrosine phosphorylation, and AP1. *Experimental Cell Research.* 207, 142-151, 1993.
 46. Frank, D.A., and Sartorell, A.C. Alterations in tyrosine phosphorylation during the granulocytic maturation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res.* 48, 52-58, 1988.
 47. Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamem, R., Weichselbaum, R., and Kufe, D. Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE-like protease in apoptosis cells. *The EMBO Journal.* 14, 6148-6156, 1995.
 48. Skulachev, V.P. (minireview) Cytochrome c in the apoptic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 423, 275-280, 1998.
 49. McCabe, M.J., JR., Orrenius, S. Protein kinase C: a key enzyme determining cell fate and apoptosis? *Protein kinase C* edited by J.F. Kuo, Oxford University press, 290-304, 1994
 50. Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258, 607-614, 1992.



51. Shanmugam, M., Krett, N.L., Peters, C.A., Maizels, E.T., Murad, F.M., Kawakatsu, H., Rosen, S.T., Hunzicker-Dunn, M. Association of PKC δ and active Src in PMA-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene*. 16, 1649-1654, 1998.
52. Li, W., Mischak, H., Yu, J.C., Wang, L.M., Mushinski, J.F., Heidaran, M.A. and Pierce, J.H. Tyrosine phosphorylation of protein kinase C- δ in response to its activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 269, 2349-2352.

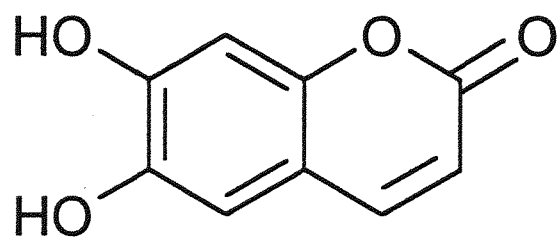


Fig. 1 Structure of esculetin

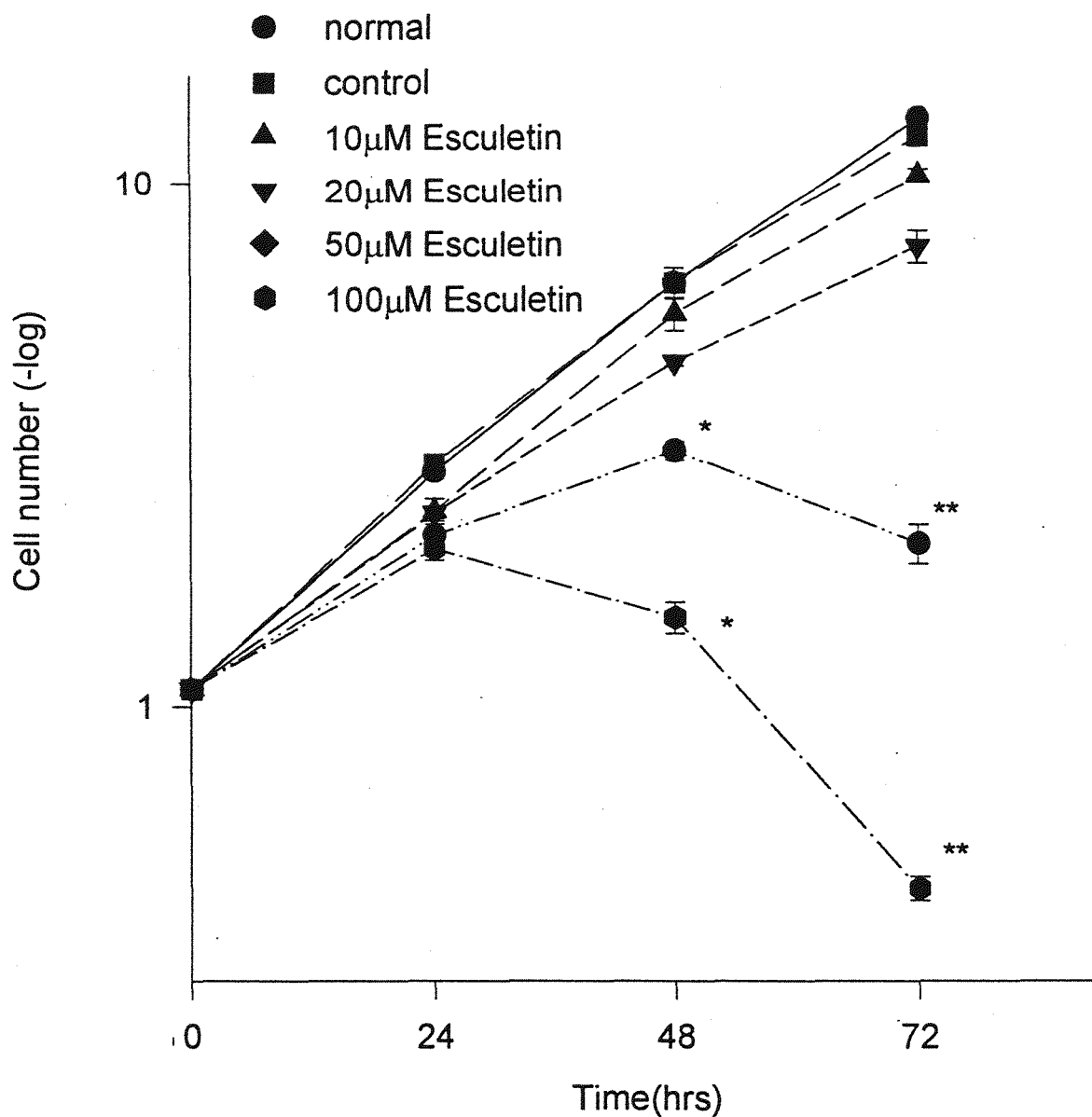


Fig. 2 Effect of esculetin on HL-60 cell proliferation. Cells were incubated in various concentration of esculetin, after indicated time survival cells were calculated. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

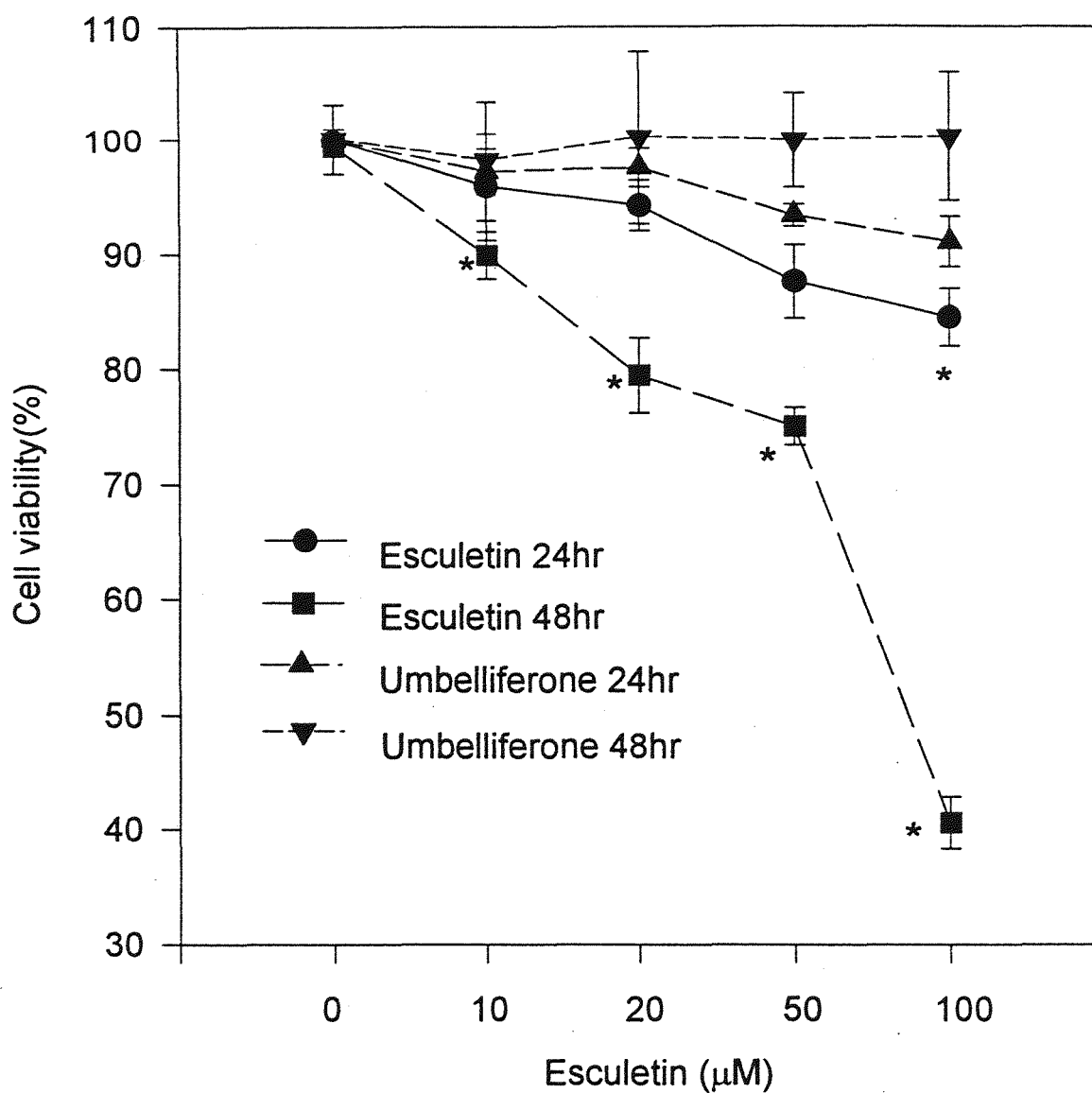


Fig. 3 Cytotoxicity of esculetin in HL-60. HL-60 cells were treated with various concentration of esculetin or umbelliferone for 24 and 48 hours, then incubated with MTT for 4 hours. Data represented as percent of 0 mM esculetin (control group, 0.2% DMSO).

*p<0.01

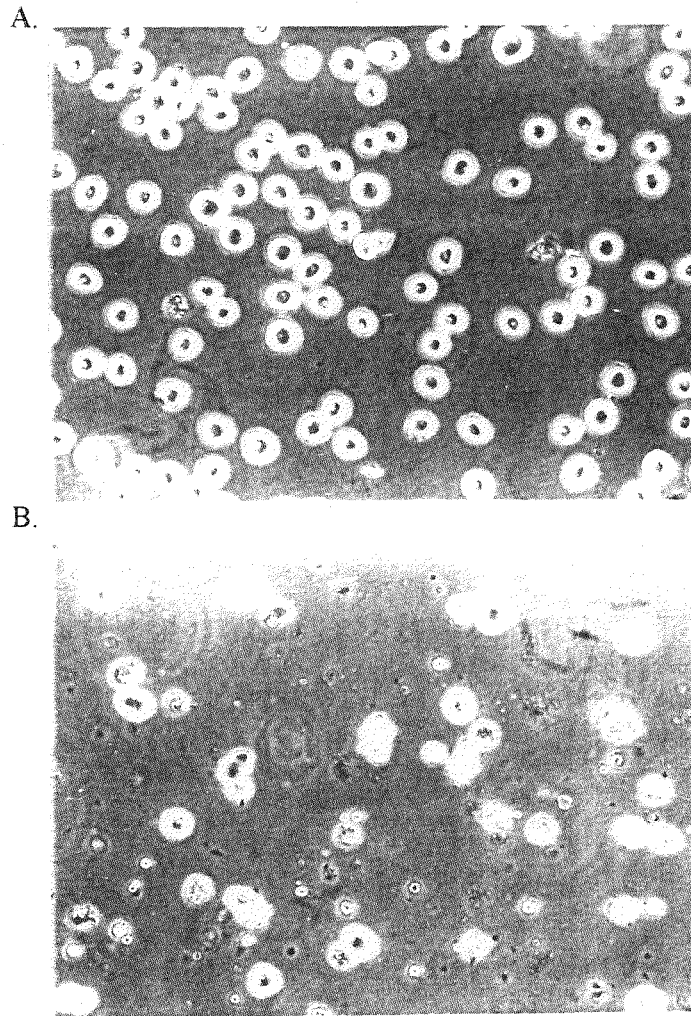


Fig. 4 The morphology of HL-60 with or without 100 μ M esculetin treatment. Cells were treated with 0.2% DMSO(A) or 100 μ M esculetin(B) for 48 hours. Cells treated with esculetin showing membrane blebbing, cell shrinkage and apoptotic bodies appearance.

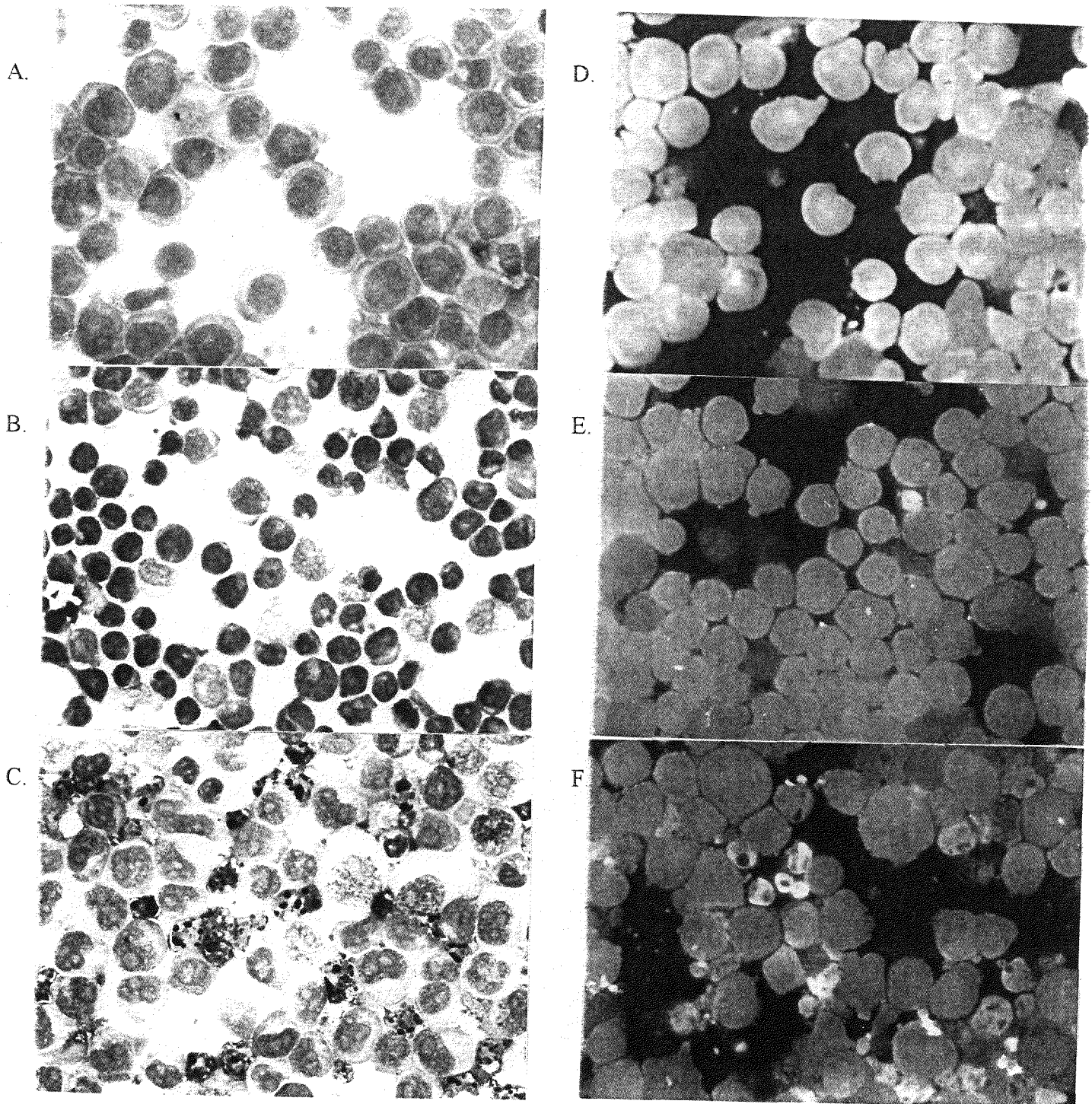


Fig.5 Staining of chromatin in HL-60 cells with or without esculetin treatment. Cells were treated with 50 μM (B, E) ,100 μM (C, F) esculetin or 0.2% DMSO(A, D) for 24 hours, then stained by haematoxylin(A, B, C) or P.I.(D, E, F). Cells treated with esculetin showing DNA condensation and apoptotic bodies appearance.

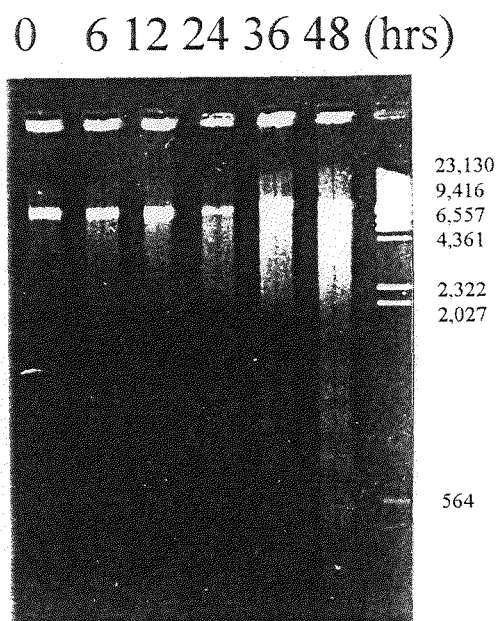


Fig. 6 DNA fragmentation of HL-60 cells induced by esculetin. Agarose gel electrophoretic patterns of DNA were isolated from esculetin-treated and untreated HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. After extraction, pure DNA were electrophored in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination.

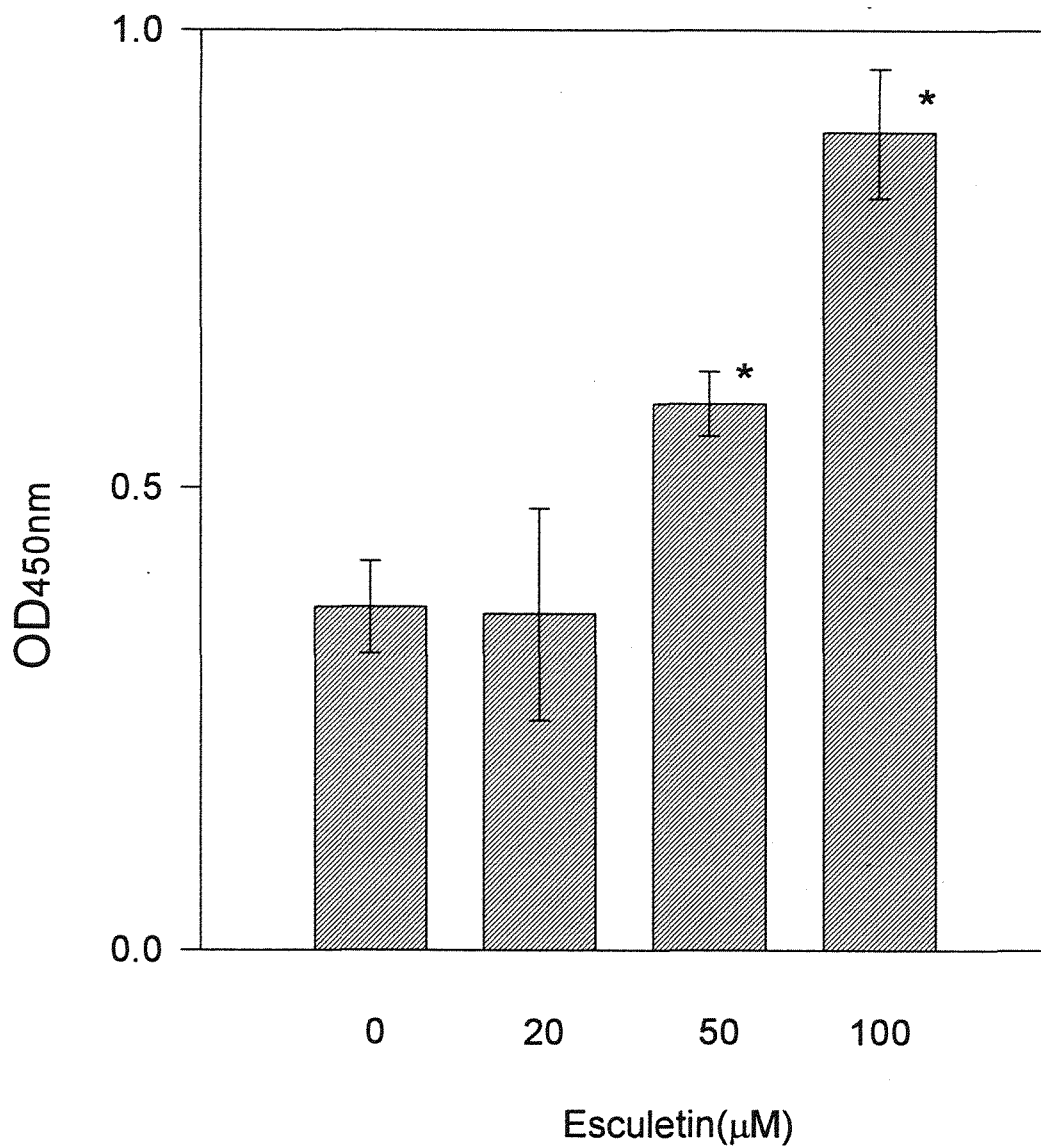


Fig.7 Quantitation of DNA fragmentation by ELISA methods. Cells were treated with 10, 20, 50, or 100μM esculetin or 0.2% DMSO for 24 hours. *p<0.05

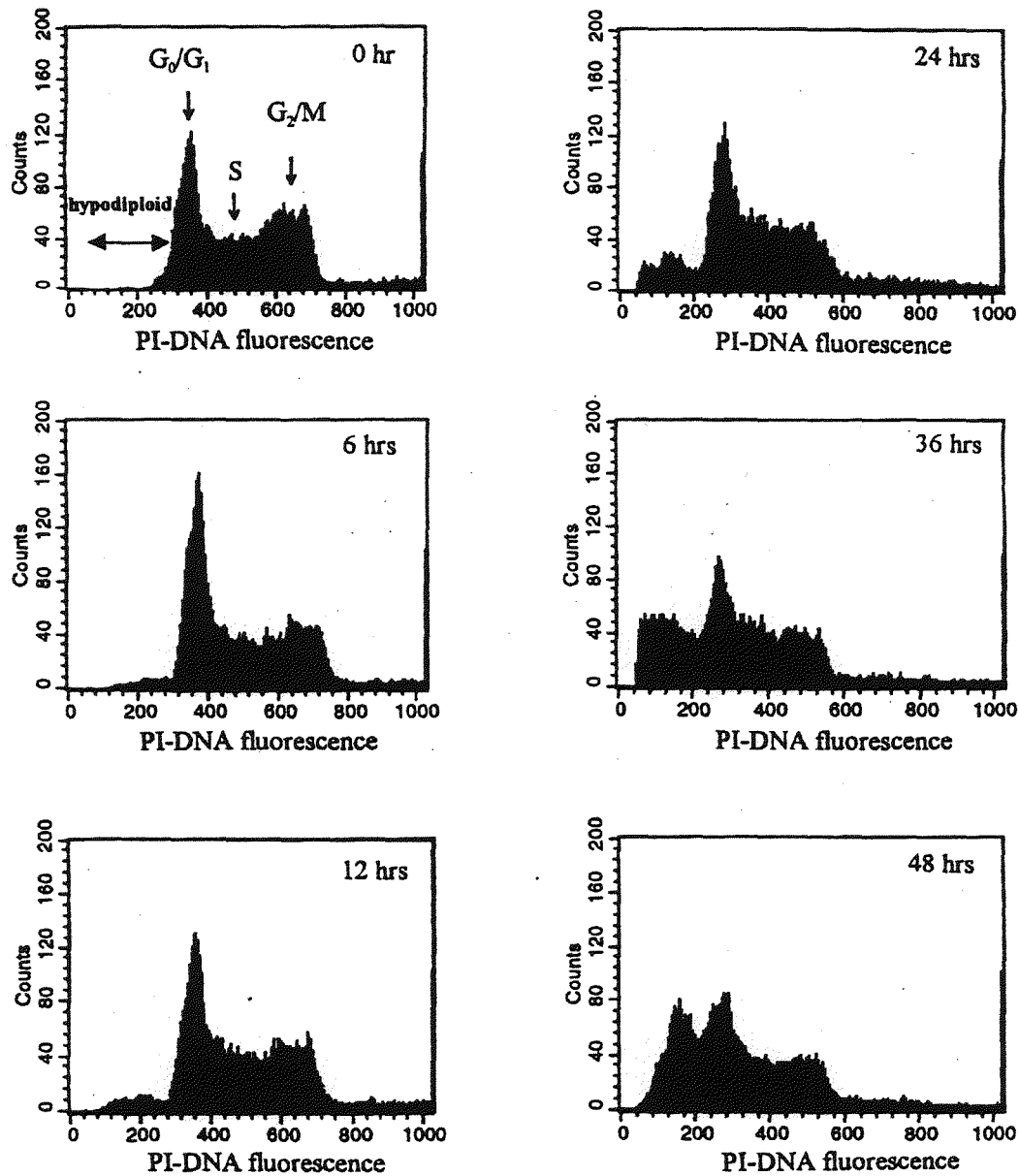


Fig. 8 Redistribution of cell cycle induced by esculetin. HL-60 cells were incubated with 100 μ M esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide (P.I.) and the DNA content was analyzed by flow cytometry.

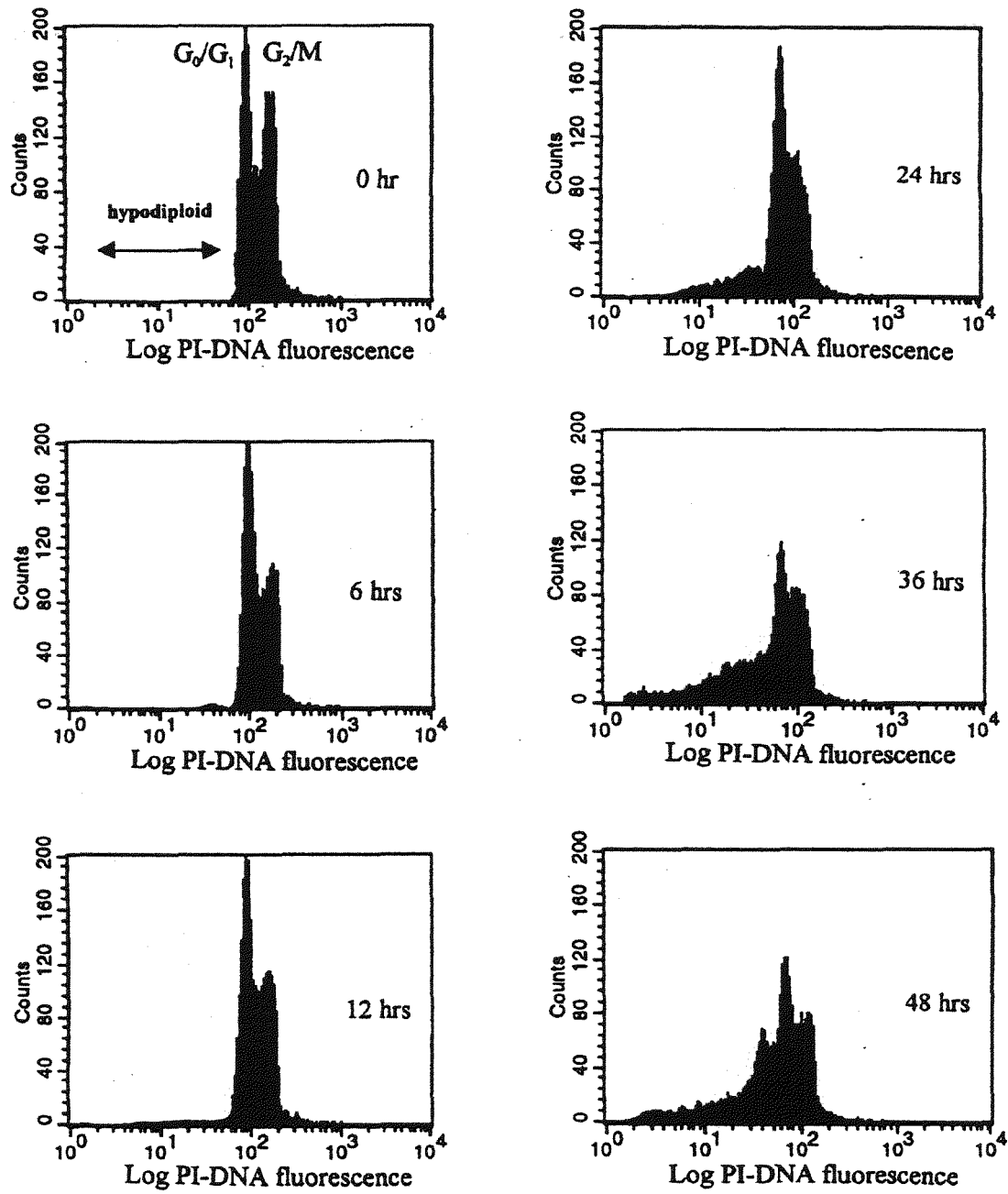


Fig. 9 Redistribution of cell cycle induced by esculetin. HL-60 cells were incubated with 100 μ M esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide (P.I.) and the DNA content was analyzed by flow cytometry.

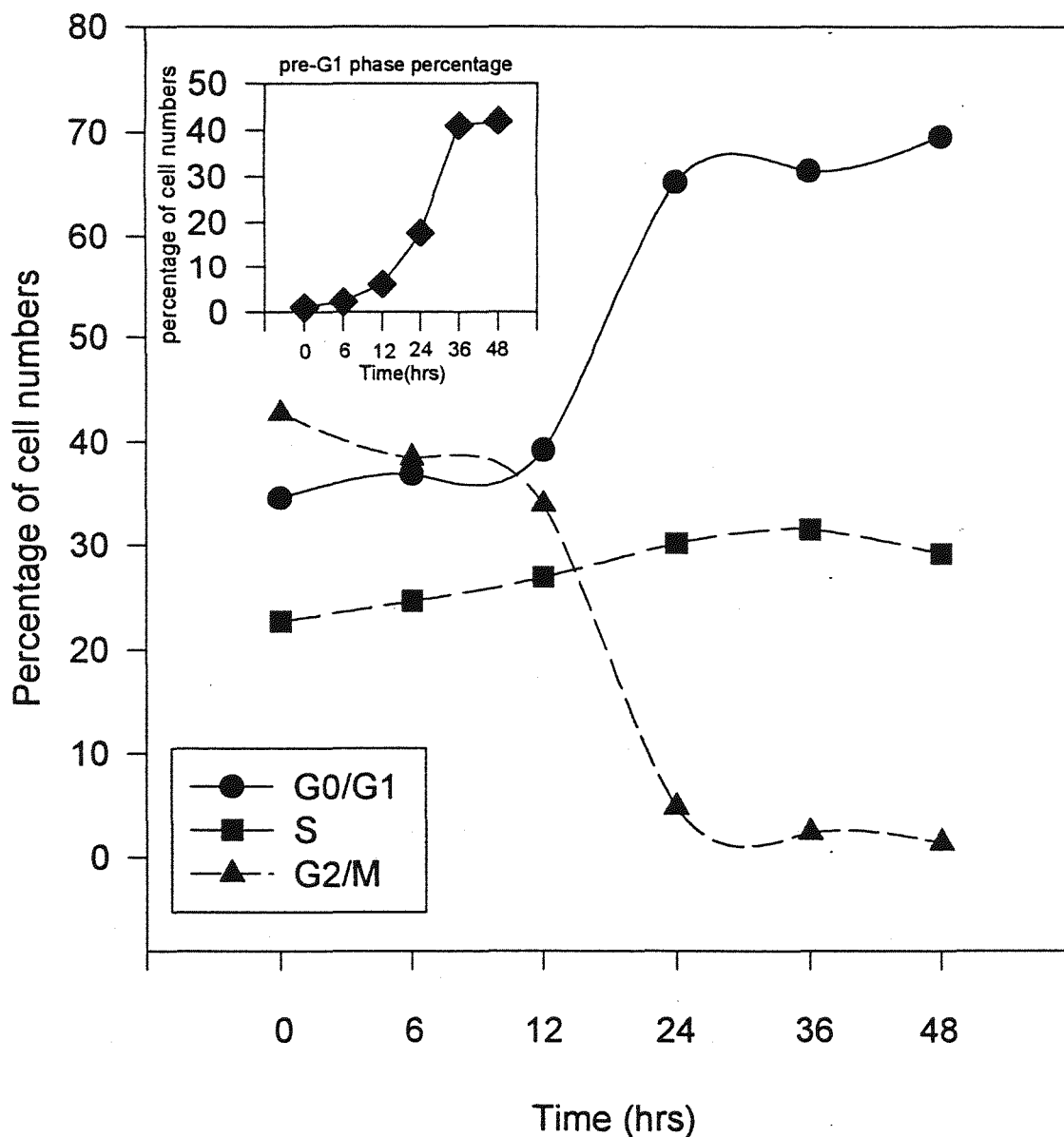


Fig. 10 Redistribution of cell cycle induced by esculetin. HL-60 cells were incubated with 100 μ M esculetin for indicated time, then washed and harvested. The cells were fixed and stained with propidium iodide (P.I.) and the DNA content was analyzed by flow cytometry. The number of cells in each phase of the cell cycle was calculated.

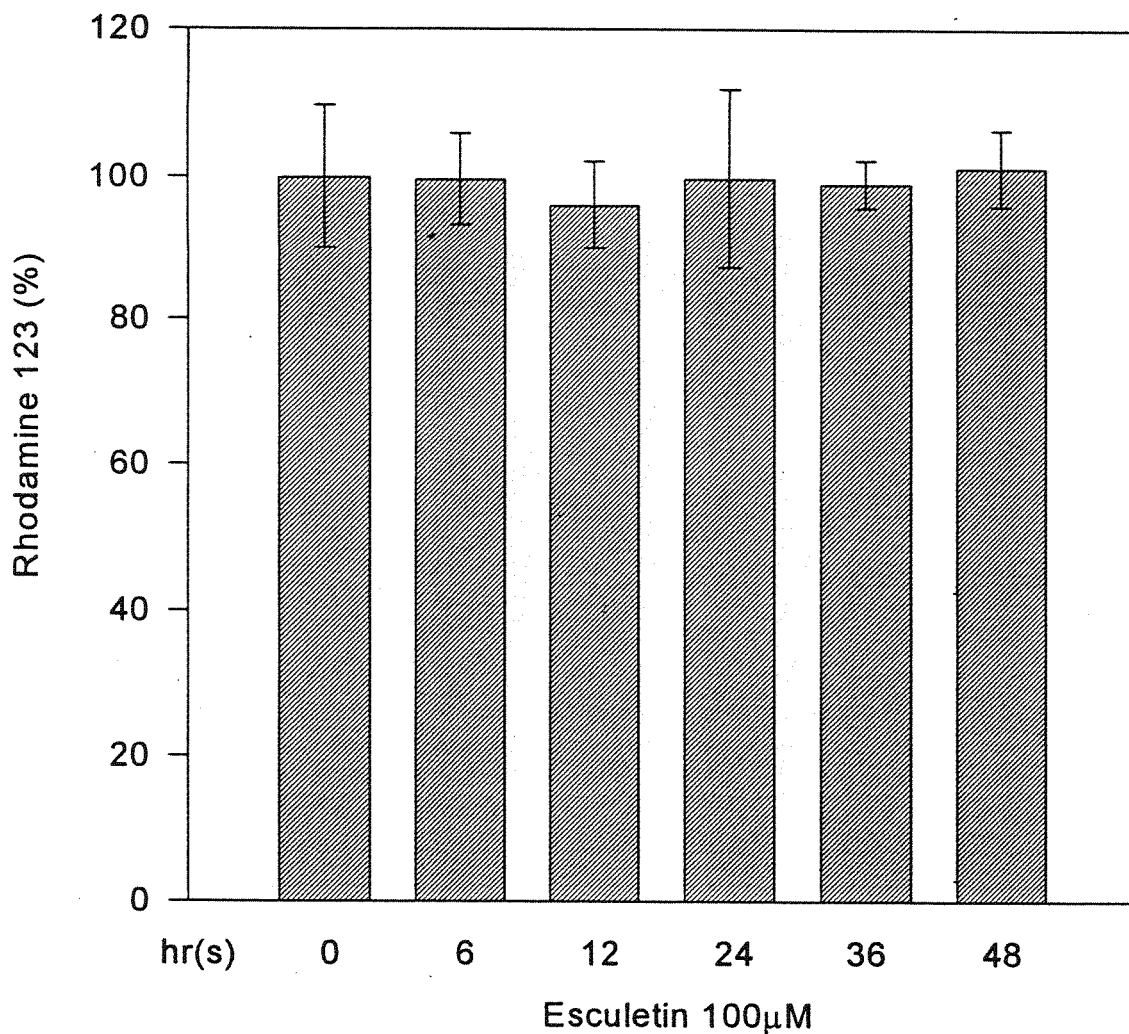


Fig.11 Time course effect of membrane potential of HL-60 cells by treatment of esculetin. HL-60 cells were pretreated with rhodamine 123 for 30 mins, then treated with 100µM esculetin or 0.2% DMSO for various times. Data were determined by measuring the fluorescence of rhodamine 123, and represented as percentage (compared with control at indicated time).

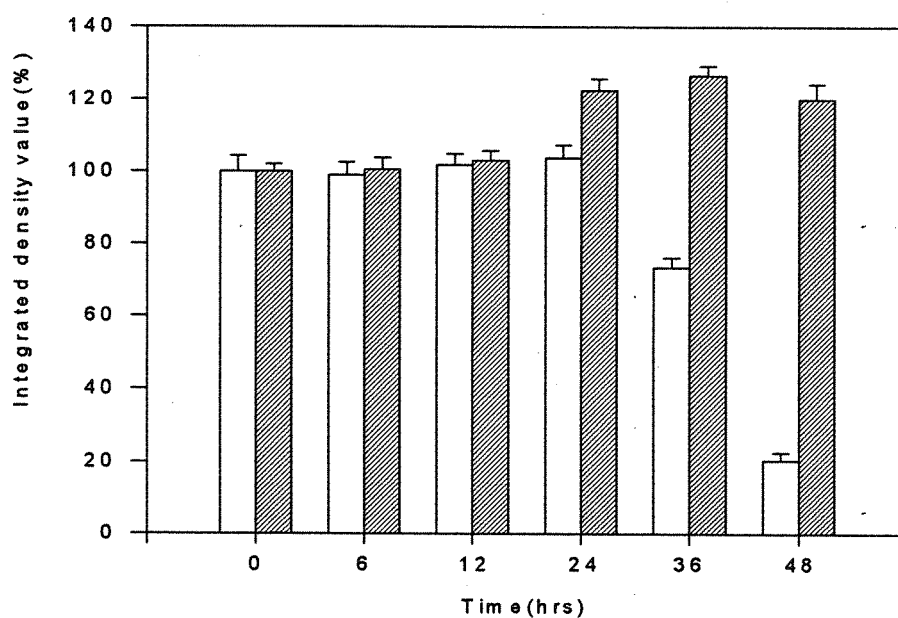
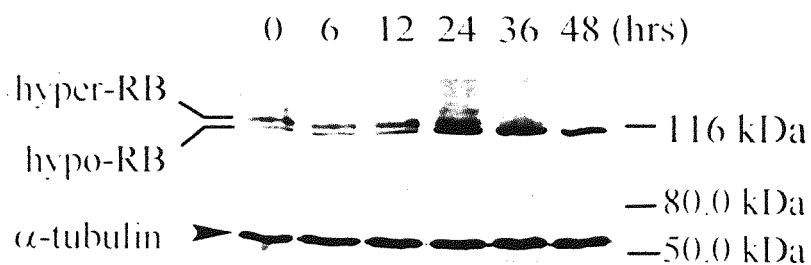


Fig. 12 Effects of esculetin on RB protein expressed in HL-60 cells. Cells were treated with 2mM esculetin for various times. After extraction, equal cell lysates were electrophoresed on 8% SDS-PAGE, and blotted.

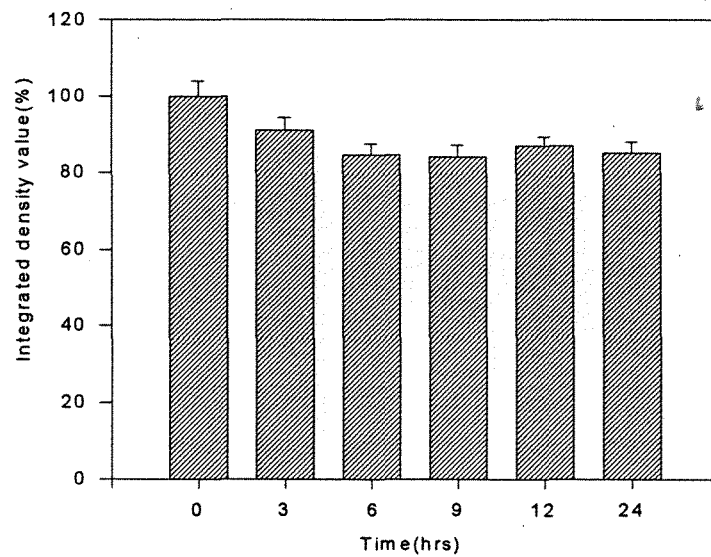
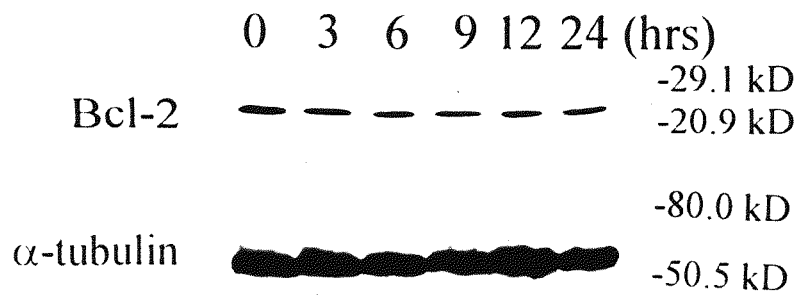


Fig. 13 Time course effect of esculetin on Bcl-2 protein expression. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates was performed as described in methods. Lysates were electrophoresed on 12% SDS-PAGE, and blotted.

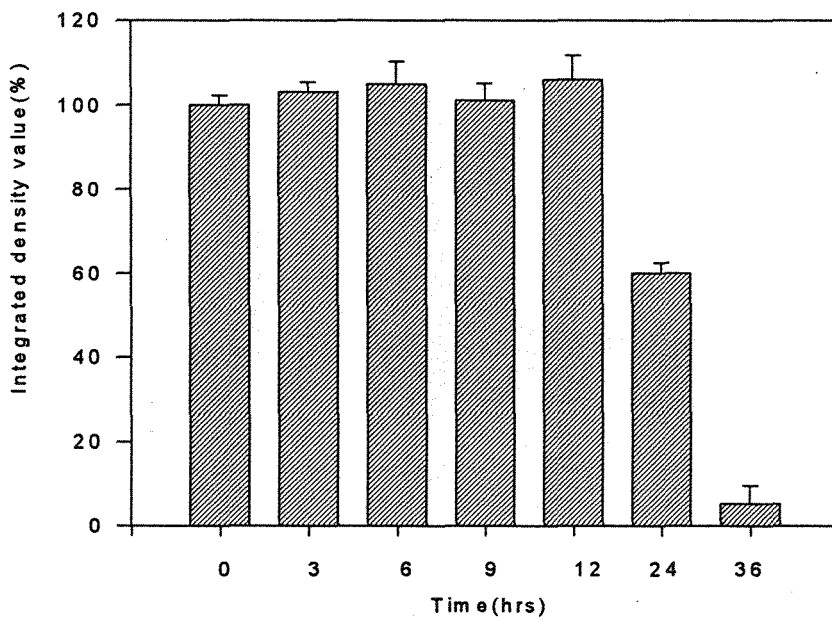
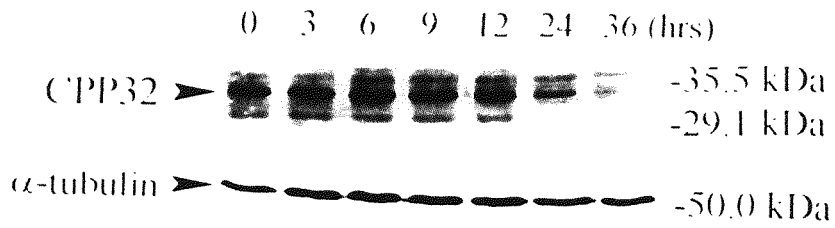


Fig. 14 Time course effect of esculletin on CPP32 protein expression. Cells were treated with 100 μ M esculletin for various times. The extraction of total cell lysates was performed as described in methods. Lysates were electrophoresed on 12% SDS-PAGE, and blotted.

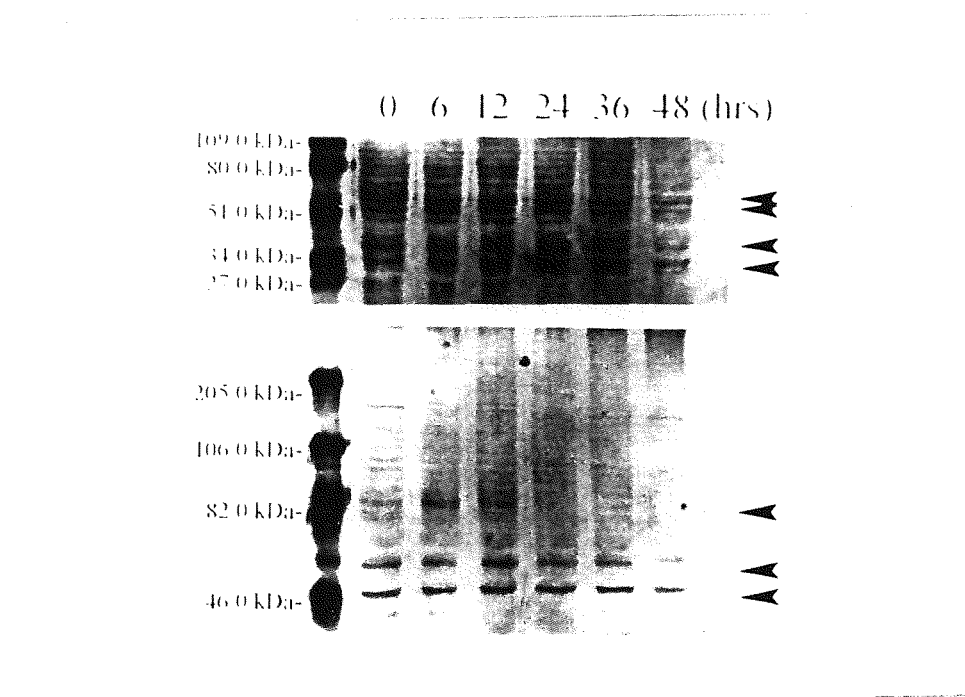


Fig. 15 Time course effect of esculetin on tyrosine phosphorylated protein expression. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates was performed as described in methods. Lysates were electrophoresed on 8% and 15% SDS-PAGE, and blotted.

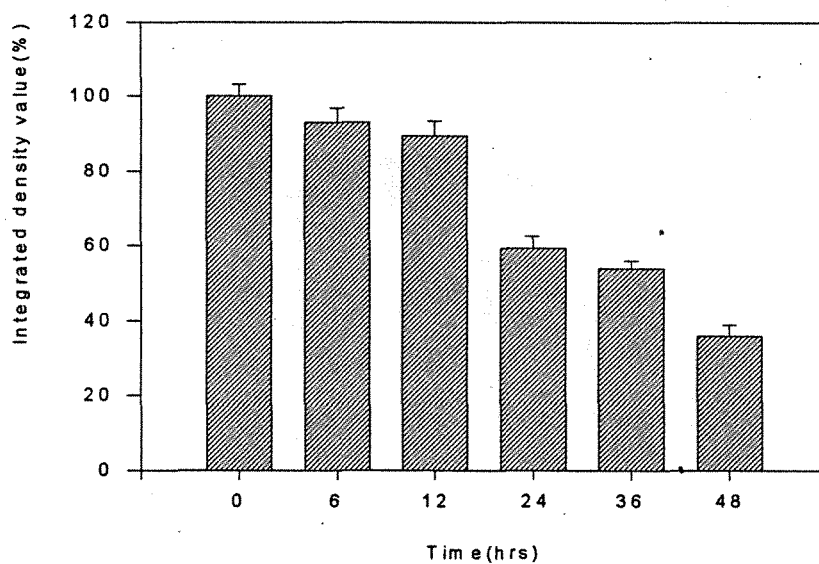
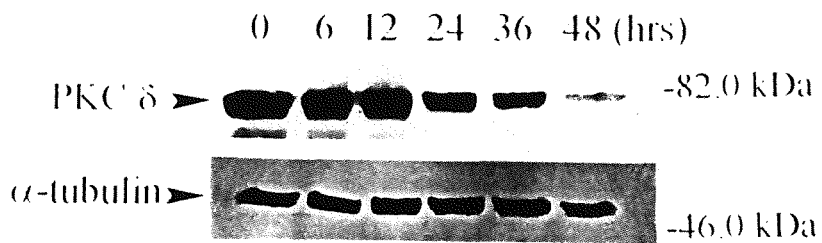


Fig. 16 Time course effect of esculetin on protein kinase C δ protein expression. Cells were treated with 100 μ M esculetin for various times. The extraction of total cell lysates was performed as described in methods. Lysates were electrophoresed on 12% SDS-PAGE, and blotted.