



行政院衛生署八十八年度委託研究計畫

大黃成份 anthrone 及 anthraquinones 對人類胃癌細胞
生長的影響

委託研究成果報告

執行機構：私立中國醫藥學院

計畫主持人：鍾景光

執行期限：87年1月1日至88年6月30日

目錄

中文摘要-----	ii
英文摘要-----	i
前言-----	1
材料與方法-----	4
結果-----	7
討論-----	10
結論與建議-----	12
參考文獻-----	13
圖一.不同濃度的Emodin在不同時間培養影響人 類胃癌細胞的生長-----	15
圖二.不同濃度的Aloe-emodin在不同時間培養影 響人類胃癌細胞的生長-----	16
圖三.不同濃度的Rhein在不同時間培養影響人類 胃癌細胞的生長-----	17
圖四.電泳(Agarose gel)顯示DNA片斷由於加入 Emodin到人類胃癌細胞的結果-----	18
圖五.電泳(Agarose gel)顯示DNA片斷由於加入 Aloe-emodin到人類胃癌細胞的結果-----	19
圖六.電泳(Agarose gel)顯示DNA片斷由於加入 Rhein到人類胃癌細胞的結果-----	20
圖七.不同濃度 Emodin 影響人類胃癌細胞株的- 細胞型態-----	21
圖八.不同濃度 Aloe-emodin 影響人類胃癌細胞 株的細胞型態-----	22
圖九.不同濃度 Rhein 影響人類胃癌細胞株的細 胞型態-----	23
圖十.不同濃度的Emodin抑制人類胃癌細胞乙醯 化2-AF的量-----	24
圖十一.不同濃度的Aloe-emodin抑制人類胃癌細 胞乙醯化2-AF的量-----	25
圖十二.不同濃度的Rhein抑制人類胃癌細胞乙醯 化2-AF的量-----	26

圖十三.不同時間的培養對Emodin抑制人類 胃癌細胞乙醃化不同濃度2-AF的量-----	27
圖十四.不同時間的培養對Aloe-emodin抑制人類 胃癌細胞乙醃化不同濃度2-AF的量-----	28
圖十五.不同時間的培養對Rhein抑制人類胃癌細 胞乙醃化不同濃度2-AF的量-----	29
圖十六.Emodin, aloe-emodin和Rhein 影響胃癌細胞cell cycle的Flow cytometry分析圖-----	30
表一.大黃成份Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 引起人類胃癌細胞Apoptosis-----	34
表二. 胃癌細胞有無不同濃度的 Emodin 培養後 細胞週期的分佈-----	35
表三. 胃癌細胞有無不同濃度的Aloe-emodin培養 後細胞週期的分佈-----	37
表四. 胃癌細胞有無不同濃度的 Rhein 培養後細 胞週期的分佈-----	39

附件 2

編號：CCMP88-RD-024

中文研究計畫題目

大黃成份 anthrone 及 anthraquinones 對人類胃癌細胞生長的影響

計畫主持人

鍾景光

執行單位

中國醫藥學院醫學系

摘要

以大黃的主成份 anthraquinones (emodin, aloe-emodin) 和 anthrone (rhein) 來測定是否能抑制人類的胃癌細胞之生長、DNA 破壞、細胞週期、染色體及細胞形態的傷害和對乙醯轉移酵素活性的影響，本計畫是利用整個活的人類胃癌細胞經由培養來分析，測定成份 emodin, aloe-emodin 和 rhein 的影響則利用兩種主要的儀器，一是流式細胞計數儀(Flow cytometry)，另一是高效液相層析儀(HPLC)。本實驗的目的是決定大黃的主成份 emodin, aloe-emodin 和 rhein 能否抑制人類胃癌細胞的增生及分化。實驗結果顯示大黃的三種主成份 emodin, aloe-emodin 和 rhein 能引起對人類胃癌細胞的毒，抑制細胞週期(降低細胞在 S 期的數目)，改變細胞形態及染色體，最後也發現抑制該細胞的 N-乙醯轉移酵素。

關鍵詞：大黃成份(emodin, aloe-emodin 和 rhein)，細胞毒，N-乙醯轉移酵素，人類胃癌細胞。

附件 3

CCMP88-RD-024

英文研究計畫題目

Effects of Da-hung components (anthrone and anthraquinones) on growth of human stomach cancer cells

計畫主持人英文名

Jing-gung Chung

執行單位英文名稱

china medical college

ABSTRACT

Anthraquinones (emodin, aloe-emodin) and anthrone (rhein), major components of Da-hung, were used to determine inhibition of cell growth, DNA damage, cell cycle, chromosomal damage, and arylamine N-acetyltransferase (NAT) activity in a human stomach adenocarcinoma cell line. The assay system was performed with intact cell suspensions. The assays will be used by flow cytometry and high performance liquid chromatography. The purpose is try to determine whether emodin, aloe-emodin and rhein could inhibit stomach tumor cell proliferation and differentiation. The results indicated that emodin, aloe-emodin and rhein did induce cytotoxicity, inhibition of cell cycle, decrease % of S phase cell number, change of cell morphology and chromosome, and decrease N-acetyltransferase activity in human stomach cancer cell line.

Keywords : Da-hung components (Emodin, aloe-emodin, rhein), cytotoxicity, cell cycle, N-acetyltransferase, human stomach cancer cell.

附件 4

壹、前言

消化性潰瘍（胃潰瘍及十二指腸潰瘍）及胃癌是國人常發生的疾病，導致消化性潰瘍的二個主要因素被認為是胃酸過多及幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 感染，此幽門螺旋桿菌對於消化不良、胃炎、潰瘍及胃癌都被認為有直接的關係，甚至有百分之 95 以上的十二指腸潰瘍也與此細菌有直接的關連，醫學報告也指出若將此細菌由胃中清除，可使潰瘍癒合，降低再發的可能性。根據台大醫院所作流行病學的調查，台灣地區每兩個人就有一人遭幽門螺旋桿菌感染。西醫利用三合一的藥物（二種抗生素及一個胃酸抑制劑）來清除胃中的細菌，去年(86 年)我們的衛生署研究計畫(CMP87-RD-D12)主要研究有關大黃成分 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對引起人類胃癌有關的幽門螺旋桿菌生長的抑制作用，結果發現此三種成分確實能對此細菌產生抑制作用，emodin 也可破壞該細菌的 DNA(1)，四篇論文已發表於 SCI 級雜誌中(1-4)。

胃癌也是世人包括國人很重要致死的疾病之一，文獻也明顯地指出與幽門螺旋桿菌相關連(5-8)。中藥中之大黃已被認為可抑制此菌，但是大黃中此三種主要成分對胃癌細胞的影響卻尚未有研究報告，在中國大陸已把大黃運用於臨床感染幽門螺旋桿菌的病人，利用大黃清除此細菌以達到治療消化性潰瘍的目的，因此我們提出本研究計畫，擬進一步探討大黃成分對胃癌細胞株的影響，以更進一步了解此三種成分是否有抗癌的功能，結果可提供國內中醫師將來處方此中藥給病人時的參考，因而具有價值。

Emodin 已有文獻指出具抗菌及抗癌的功能(9),同時也可產生免疫抑制的效果(10),也有研究指出 emodin 有調節腸壁平滑肌的運動及腸壁鈣離子的影響(11),Emodin 能抑制 protein tyrosine kinase 和具有高的選擇性抑制 src-Her-2/neu 和 ras-oncogenes 的作用(12)且沒有直接經由細胞毒(cytotoxicity)來抑制癌細胞株(13)也許尚有別的路線。最近我們的研究也指出 emodin 可抑制幽門螺旋桿菌的生長並破壞 DNA(1-2)；Aloe-emodin 來自大黃，當服用大黃時，在人體血液中可偵測到 aloe-emodin，同時在 *in vitro* 研究也指出 aloe-emodin 可破壞 DNA 而導致癌細胞的死亡(14,15),我們的研究也發現 aloe-emodin 可抑制幽門螺旋桿菌的生長(3),但是此現象是否表示有抗癌作用，目前仍未有文獻報告，因此值得進一步的探討；另外 Rhein 已被指出對人類有抗發炎及抗風濕的作用(16,17)，同時也有學者指出 rhein 有抗人類腦癌細胞及老鼠皮膚癌細胞的作用(18-20)，也有其他學者報告 rhein 可抑制

superoxide 的產生及溶解酵素(Lysosome enzymes)的作用(21-22)，我們的研究也發現具有抗菌作用(4)。

當人類暴露到芳香胺類化合物時 此化合物先由乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase)的乙醯化再由其他的酵素代謝,最後會與細胞內的大分子 DNA 結合,形成 DNA 添加物 (DNA adduct),當細胞複製 DNA 時,即可能導致基因突變,最後引發癌症;而個體可依乙醯化的快慢而將人類區分為快乙醯轉移(Rapid acetylators)和慢乙醯轉移者(slow acetylators)(23).在人類流行病學研究依據統計顯示:人經由職業暴露到化學致癌物(2-AF)後,快乙醯轉移的個體則易得大腸直腸癌(24,25),而慢乙醯轉移的個體較易得膀胱癌(26),而文獻也報導改變肝中乙醯轉移酵素 NAT 的活性與其他器官的病變有直接相關連例如乳癌和膀胱癌(23);也有文獻報導當 NAT 的活性上升時,將令暴露到芳香胺類化學致癌物的個體,更容易引發癌症(27)。因此降低此酵素的活性,也就是減少芳香胺類化學致癌物的乙醯化,是否可相對地減少癌症的發生是目前許多學者有興趣的探討方向。換句話說中藥大黃的主要成份 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對人類胃癌細胞乙醯轉移酵素 NAT 活性的影響,目前尚未有任何文獻報導。

綜合上面其他學者和我們先前的研究,可以看出目前並沒有明確報告有關大黃此三種成分能否影響人類的胃癌細胞,而大黃已被大陸的醫師於臨床上運用於病患的治療,因此我們提出此研究計畫,擬探討此三種成分對胃癌細胞的影響,並進一步了解其作用機轉。

本計畫之目的就是要了解中藥之大黃其主要成分 Emodin、Aloe-emodin 和 Rhein 是否有抑制胃癌細胞株的作用,這一年中所要完成之研究工作可分為下列五項

- 一.檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株是否有細胞毒性 (cytotoxicity)的作用
- 二.檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株 DNA 破壞(DNA damage)的情形
- 三.檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株細胞週期(cell cycle)的影響
- 四.檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株細胞核破壞 (Chromosomal damage)和細胞形態(morphology)的影響
- 五.檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株中乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase)活性的影響

癌細胞往往都是細胞未成熟就分裂，因而導致很多沒有成熟功能的細胞。本計劃在探討大黃內的成分 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 是否能引起 DNA 破壞和直接檢測能否引起 Cytotoxicity 來相輔相成，同時也利用此三種成分來檢測能否影響胃癌細胞週期，進一步了解是否影響 G_0/G_1 、S 或 G_2/M 期而了解能否有抗癌作用。

貳、材料與方法

一.材料

培養皿(6、24 和 96 孔),培養瓶(25 和 75 cm²),吸管(1.5 和 10 ml),試管(1.5、2、5、15 和 50 ml)吸管光頭,微量吸管(1、10、10-50、50-200 μl),培養基(RPMI-1640,胎牛血清, Trypsin, penicillin-streptomycin),大黃的成分 Emodin、Aloe-emodin 和 Rhein),乙醯轉移酵素的受質 2-aminofluorene (2-AF)和 P-aminobenzoic acid (PABA)。^o標準乙醯化的 2-AF 和 PABA (N-acetyl-2-aminofluorene [2-AAF])和(N-acetyl-P-aminobenzoic acid [N-Ac-PABA]),生理食鹽水,高壓層析儀用的溶液(KH₂PO₄ 和 Acetonitrile)。

二.方法

(一).檢測 Emodin, Aloe-emodin和Rhein對胃癌細胞株是否有細胞毒性(cytotoxicity)的作用

胃癌細胞株(Human stomach adenocarcinoma)放入75cm²培養瓶,內含RPMI 1640培養基+ 15%胎牛血清+ 2% penicillin-streptomycin (10,000 U/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin),培養於 37°C 5% CO₂ 培養箱,讓胃癌細胞大量增生。各取1×10⁶ cells 放入24 well plate中,於37°C 5% CO₂培養箱24小時分別加入不同濃度(0.05、0.5、5、50 and 500 μM)的Emodin, Aloe-emodin或Rhein (以不加者為對照組)經過不同時間的培養後,離心收集癌細胞利用Trypan blue染色,以顯微鏡檢測活的和死的癌細胞(活細胞透明無色,死細胞呈淡藍色,因Trypan blue會進入死細胞)分別在顯微鏡下,以400倍放大,利用細胞計數皿計算死及活的細胞數目,以不加藥者為實驗對照組,最後利用活的細胞數 / 原有的細胞數= % Viable cell 計算% Viable cell,然後再利用不同濃度及不同培養時間的數據統計計算及分析預期的結果。將可得到不同濃度和不同培養時間的Emodin, Aloe-emodin, Rhein 所引起的細胞毒性。

(二).檢測 Emodin, Aloe-emodin和Rhein對胃癌細胞株DNA破壞(DNA damage)的情形

各取 1×10^7 cells放入6 well培養皿中，再移入 37°C 5% CO_2 培養箱24小時，分別加入不同濃度(0.05、0.5、5、50 and 500 μM)的Emodin, Aloe-emodin 或Rhein (以不加者為對照組)經過不同時間的培養後，離心收集癌細胞，利用DNA抽取Kit (Genone Kit)，由Sigma公司購得，抽取DNA檢測 280/260 OD值分別放入跑電泳膠 (1.2% agarose gel)，75 volt 1小時利用Ethidium bromide染色，放入UV燈 檢查照相如果DNA受破壞則有fragment移動，可與對照組作比較可看到不同濃度和不同培養時間的 Emodin, Aloe-emodin, Rhein 所引起的 DNA 碎片。

(三). 檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株細胞週期(cell cycle)的影響

各取 5×10^5 cells放入24 well培養皿中，再移入 37°C 5% CO_2 培養箱24小時，分別加入不同濃度(0.05、0.5、5、50 and 500 μM)的 Emodin, Aloe-emodin或Rhein (以不加藥者為對照組)，經過不同時間的培養後，收集癌細胞 (離心) 利用Propidium iodine染色30分鐘，放入流式細胞計數儀分析細胞週期DNA的變化，可得 G_0/G_1 、S & G_2/M phase DNA含量的變化，以電腦分析 DNA S phase的百分比可得知 Emodin, Aloe-emodin或Rhein是否會影響細胞週期及DNA含量，並與對照組作比較。不同濃度和不同培養時間的Emodin, Aloe-emodin或Rhein對細胞週期DNA量的影響。

(四). 檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株細胞核破壞 (Chromosomal damage)和細胞形態(morphology)的影響

各取 1×10^6 cells 放入24 well培養皿中，再置於 37°C 5% CO_2 培養箱24小時，分別加入不同濃度(0.05、0.5、5、50 and 500 μM)的 Emodin, Aloe-emodin或Rhein (以不加者為對照組)經過不同時間的培養後，收集癌細胞 (離心) 利用Gimesa stain 染色細胞核或直接用顯微鏡檢查照相，經由顯微鏡鏡檢照相檢查癌細胞染色體破壞和細

胞形態影響的情形，再決定每100個細胞內含有多少個染色體破壞和細胞形態改變的細胞而決定百分比，再與對照組作比較不同濃度和不同培養時間的Emodin, Aloe-emodin或Rhein對染色體和形態的破壞。

(五). 檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株中乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase)活性的影響

各取 1×10^6 cells放入24well培養皿中，再置於 37°C 5% CO₂培養箱24小時，分別加入不同濃度(0.05、0.5、5、50 and 500 μM)的Emodin, Aloe-emodin或Rhein (以不加者為對照組)，同時也加入不同濃度的2-AF，經過不同時間的培養後，再離心，收集上層液利用ethylacetate / methanol (95:5) 萃取兩次，再放入冷凍乾燥機約一小時乾燥後再加入200 μl methanol，混和均勻取20 μl打入高效液相層析儀HPLC分析乙醯化的2-AAF及未乙醯化的受質2-AF的量，並與對照組作比較決定N-acetyltransferase (NAT)酵素活性的影響。不同濃度和不同培養時間的Emodin, Aloe-emodin或Rhein對胃癌細胞NAT活性的影響。

參、結果

一. 檢測 Emodin, Aloe-emodin和Rhein對胃癌細胞株是否有細胞毒性(cytotoxicity)的作用

細胞毒的決定是根據存活細胞數來相對的判斷，將胃癌細胞分別給予不同濃度的Emodin、Aloe-emodin和Rhein 放入 1×10^5 cells在每一個well中(24well plate)，經過不同時間的培養，然後收集細胞，再分別由trypan blue染色來決定胃癌細胞數目的存活率，活細胞維持原來的顏色，但死細胞則成淡藍色，結果呈於圖一和圖三中。由此三種大黃成分於6小時就可看出胃癌細胞數目明顯減少，繼續培養到48小時則有較明顯的細胞毒，且隨著檢測大黃成分濃度上升細胞數目也跟著上升，但在低濃度(0.05和0.5 μM) 0到12小時則沒有減少細胞數目，而到24小時之後所有檢測濃度有明顯的降低存活細胞數，同時隨著培養時間增加也有明顯毒性增加。每一組重覆做三次，每次做三個實驗，因而數據共有9個，然後根據student's t test發現 $p < 0.05$ 為有意義。因此可知此三種大黃成分對胃癌細胞具有毒性，而結果顯示毒性之順序是Emodin>Aloe-emodin>Rhein。

二. 檢測 Emodin, Aloe-emodin和Rhein對胃癌細胞株DNA破壞(DNA damage)的情形

於6well中每well中加入 6×10^6 cells，然後分別有無加入不同濃度的Emodin、Aloe-emodin 或Rhein，然後置於培養箱經過不同時間的培養，離心收集細胞及利用Genone Kit收集及純化DNA，再跑電泳膠片及照相，所得結果呈於圖四、五、六及表一中，由這些結果可知大黃的成分Emodin、Aloe-emodin和Rhein可引起細胞內DNA成不同片斷在電泳膠片內移動，根據這些移動可得知細胞核內DNA先分成不同數目的片斷，因而可明顯看到不同base pairs 的DNA移動，這就是apoptotic DNA，也就是胃癌細胞經由大黃這三種成份處理後形成了Apoptosis。同時也表示越高濃度檢測大黃成分對引起apoptosis越明顯。但是在高濃度的Emodin和Aloe-emodin則沒有清楚的base pair

存在，而是一大片斷裂的DNA移動，這是DNA damage的現象。

三. 檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株細胞週期(cell cycle)的影響

取 5×10^5 cells放入6 well plate中的每一well，然後分別有無加入不同濃度的Emodin、Aloe-emodin或Rhein，沒有加入的則為Control，然後再由培養箱中培養不同時間，再離心收集細胞，經處理然後利用Flow Cytometry來分析細胞週期和DNA的量，結果呈現於表二、三和表四中。首先由濃度不同的影響可知，在6小時這三種成分影響 G_0/G_1 和S phase，在12小時低濃度影響 G_0/G_1 、S、 G_2/M phase，但在高濃度則影響S期，在24和48小時結果相當類似。每一組重覆做三次，每次做三個實驗，因而數據共有9個，然後根據student's t test發現 $p < 0.05$ 為有意義。由這些結果可得大黃的成分Emodin、Aloe-emodin和Rhein確實影響人類胃癌細胞。

四. 檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株細胞核破壞(Chromosomal damage)和細胞形態(morphology)的影響

於24well中分別於 1×10^6 cells加入每一well中，再分別有無加入不同濃度的Emodin、Aloe-emodin 和Rhein，沒有加入的則為Control，經過不同時間，然後在顯微鏡下觀察及照相，所得結果呈於圖七、八和圖九中，由這些結果顯示，越高濃度檢測大黃這三種成分可形成細胞分斷和破裂(裂解)，即細胞死亡，同時隨著時間增加此結果也越明顯。

五. 檢測 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 對胃癌細胞株中乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase)活性的影響

首先將培養的人類胃癌細胞分別取 1×10^6 cells加入於24well中每一well。然後分別有無加入Emodin、Aloe-emodin或Rhein，沒有加入的則為Control，然後同時也加入不同濃度的2-AF，最後再培養不

同時間，而收集培養上層液，乾燥後再溶於methanol，然後由HPLC分析。結果呈現於圖十、十一、十二、十三、十四和十五中。不加黃成分的隨著時間和2-AF濃度的增加，胃癌細胞乙醯化的2-AAF的量也跟著增加，加大黃成分的則隨著培養時間和濃度的增加，胃癌細胞乙醯化的2-AAF的量減少，到48小時，所加濃度的大黃成分皆能顯著抑制2-AF乙醯化的量。每一組重覆做三次，每次做三個實驗，因而數據共有9個，然後根據student's t test發現 $p < 0.05$ 為有意義。由此可知，大黃的成分Emodin、Aloe-emodin和Rhein確實可抑制人類胃癌細胞(Intact cells)乙醯化受質的量。

肆、討論

正常細胞有一定正常的週期，但是癌細胞則與正常細胞週期有差異，有時此種癌細胞是尚未成熟就使DNA增生(由細胞週期中S phase可得知)，細胞就分裂而分裂出來的細胞往往未進入分化的成熟功能的階段，因而形成功能不健全的細胞導致一些病變。如能檢測一些藥物來看能否抑制細胞週期，如降低或停止S phase，則可令癌細胞不再無限制的大量增生，而使細胞進入成熟分化的階段，進一步可以達到抑制癌症的作用，雖然大黃已被中醫早就用於大陸臨床，這些大黃被用於胃癌病的病人。同時我們先前的研究也用大黃的主要成份Emodin, Aloe-emodin和Rhein來檢測其對胃幽門螺旋桿菌的影響，結果發現可抑制胃幽門螺旋桿菌的生長，也隨著大黃成份濃度增加抑制效果也跟著越大。因為此菌與胃癌也有相關連，因而本研究就是進一步了解此大黃三種成分可否抑制人類胃癌細胞。

N-acetyltransferase (NAT)已經被證實發現於不同實驗動物和人類的各種組織中(23)，當一些外來的化學芳香胺類致癌物經由細胞內NAT乙醯化後，再進一步由肝中酵素代謝而成為更強的致癌物。人體內NAT有兩種isozymes (NAT₁和NAT₂)，證實快和慢在NAT₂上。本研究選用2-AF作為受質有兩種理由：一. 2-AF是屬於芳香胺類的化學致癌物。二. 2-AF是NAT₁和NAT₂的共同受質。學者也證實提高個人NAT酵素的活性，當暴露到芳香胺類化學致癌物時，會提昇致癌的機率。同時改變NAT酵素的活性也與乳癌和膀胱癌的發生率相關連，相對的降低此酵素的活性，可否降低致癌率也是我們實驗室目前及將來研究的一大目標。

本研究的結果發現幾點值得進一步討論：

第一. 大黃此三種主要成份Emodin, Aloe-emodin和Rhein三者均可引起cytotoxicity，導致一些人類胃癌細胞死亡，而且隨著培養時間增加和大黃濃度增加細胞死亡的數目也跟著增加(dose- and Time-dependent effects)，細胞死亡的現象可分為二種情形：一. 是經由Necrosis現象，此種方式是經由細胞膜破裂而引起細胞死亡。二. 另一種情形為Apoptosis現象，經由nuclear change & disruption而導致細胞和細胞核解體形成大小不一的apoptosis bodies。這種現象可由粹取DNA跑電泳來區別。Necrosis現象DNA破壞會形成一片大小不一base pairs的DNA片斷，整排移動無法區別DNA碎片的base pairs，由圖四、五、六中高濃度三種大黃成份對DNA的影響可知。Apoptosis現象則可明顯看到base pairs如階梯狀在膠片上。因而為了要證實大黃成份Emodin, Aloe-emodin和Rhein引起

那一種胃癌細胞的死亡，我們又做了 DNA 純化跑 DNA 電泳，然後由照片顯示 DNA 有階梯狀出現，有明顯的 Apoptosis 現象。此 Apoptosis 現象也同時由另一種實驗結果圖七、八、九中，由細胞形態及內部細胞株照相可相印證。

第二. 大黃此三種成份也發現影響人類胃癌細胞的細胞週期，結果由流氏細胞計數儀(Flow cytometry)分析可知明顯的降低 S phase 的細胞數目，也有降低 G_0/G_1 phase 的細胞數目，同時由附加代表性的圖示於圖十六和十七可知也有 apoptosis cell 出現。

第三. 大黃此三種成份也發現可抑制人類胃癌細胞乙醯化致癌物 2-AF 的量，也就是說可抑制 2-AAF 的產生。目前不了解其抑制的真正機轉，但有二種可能：一是降低 NAT 量，也就是降低細胞 mRNA 形成 NAT 酵素的量，另一種是此大黃三種成份也許與酵素反應中心相結合，故受質 2-AF 與 NAT 作用減少，當然這二種推測須將來進一步由實驗來證實。

第四. 選擇 $60 \mu\text{M}$ 2-AF 作為受質濃度是先前我們的研究已經做過不同濃度 2-AF 被癌細胞乙醯化的濃度變異，結果顯示 $60 \mu\text{M}$ 2-AF 最好，同時此濃度也不引起對胃癌細胞的細胞毒，而且被胃癌細胞 1×10^6 cells 的乙醯化量最大。由培養時間也發現，隨著培養時間增加乙醯化的 2-AAF 量也相對重量增加，在檢測的各時間裡都可明顯發現受到 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 的影響，目前我們無法結論降低 NAT 活性及降低乙醯化 2-AF 的量是否能抑制癌症及防止癌症的產生，仍須進一步的探討。

伍、結論與建議

大黃主要成份 Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 可抑制人類胃癌細胞的細胞週期，減少 Sphase 的細胞數目，形成 apoptosis 和降低 NAT 乙醯化受質 2-AF 的量。由這些 In vitro 的研究顯示此成份也許可抑制人類胃癌細胞的增生，也可做抑制胃癌的參考，當然這點仍需更進一步在動物體內 In vivo 的研究。

陸、參考文獻

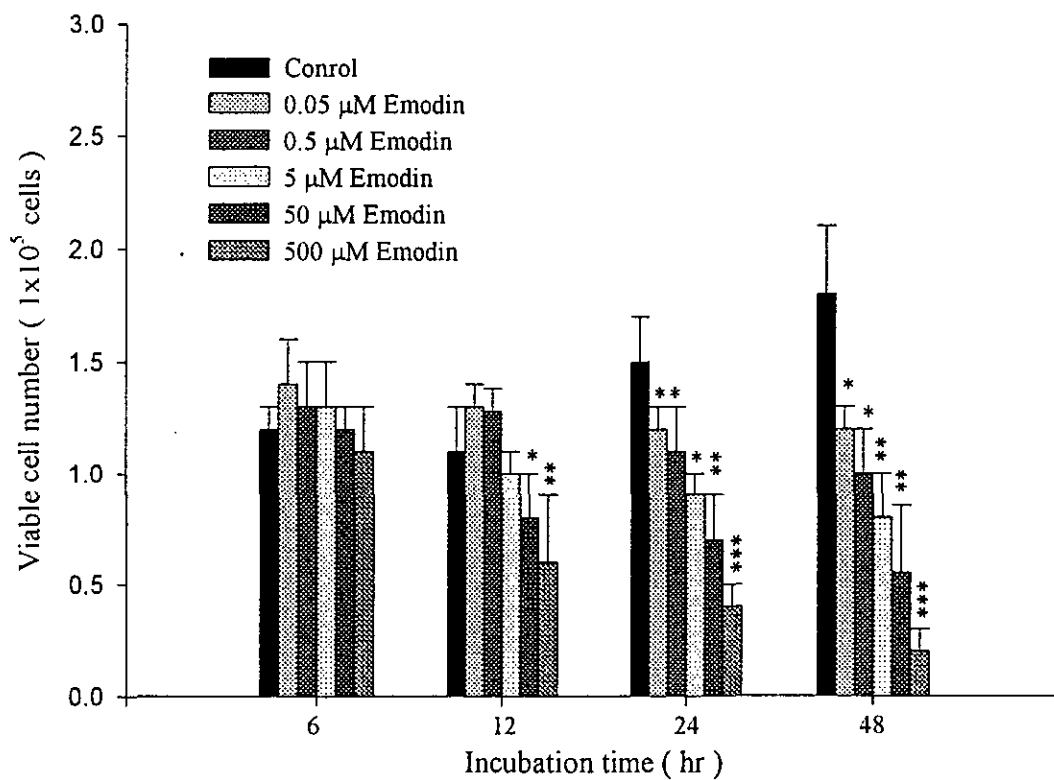
1. Wang H H, Chung J G : Emodin induced cytotoxicity and DNA damage of *Helicobacter pylori* . *Curr. Microbiol.* 1997;35:262-266.
2. Chung J G , Wang H H , Wu L T , et al : Inhibitory actions of emodin on arylamine N-acetyltransferase in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients . *Food and Chemical Toxicol* 1997 ; 35 : 1001-1007.
3. Wang H H , Chung, J G , Ho C C , et al : Aloe-emodin affects arylamine N-acetyltransferase activity of the bacterium *Helicobacter pylori* . *Planta Med* 1998 ; 64 : 176-178.
4. Chung J G , Tsou M F , Wang H H , et al : Rhein affects arylamine N-acetyltransferase activity of the bacteria *Helicobacter pylori* . *J. App. Toxicol* 1998 ; 18 : 117-123.
5. Kato J , Tominaga S . , Ito Y : A prospective study of atrophic gastritis and stomach cancer risk . *Jpn. J. Cancer Res* 1992 ; 83 : 1137-1142.
6. Marshall B : *Campylobacter pylori* and gastritis . *J. Infect. Dis* 1986 ; 153 : 650-657.
7. Dixon M.F : *Campylobacter pylori* and chronic gastritis. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease . *Oxford blackwell Scientific Publication* 1989 ; 106-116.
8. Marshall B, Goodfwin C.S , J.R. Warren : Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Cancer* 1998 ; 2 : 1437-1447.
9. Liberman D F , Fink R C , Shaofers F. L , et al : Mutagenicity of anthroquinone and hydroxylated anthroquinones in the Ames/Salmonella microsome system. *Appl. Environ. Microbiol* 1983 ; 43 : 1354-1359.
10. Huang H.S , Chu S H, Lee P.D : Vasolexants from chinese herbs, emodin and scoparone, posses immunosuppressive properties. *Eur. J. Pharmacol* 1991 ; 198 : 211-216.
11. Masudo J , Ueno Y : Microsomal transformation of emodin into a direct mutagen. *Mutation Res* 1983 ; 125 : 135-144.
12. Chang C J , Ashendel C L , Geahlen R L , et al : Oncogene signal transduction inhibitors from medicinal plants. *In Vivo* 1996 ; 10 : 185-190.
13. Kuo Y C , Sun C M . , Tsai W J : A tumor cell growth inhibitor from polygonum hypoleucum Ohwi . *Life Science* 1997 ; 61 : 2335-2344.
14. Westendorf J , Poginsky B , Marquardt H , et al : *Planta. Med* 1986 ; 54 : 562-565.
15. Westendorf J , Marquardt H , Poginsky B , et al : *Mutation Res* 1990 ; 240 : 1-12.
16. Kay A G L , Griffiths L F , Volans G N , et al : Preliminary experience with diacetylrhein in the treatment of osteoarthritis . *Curr. Med. Res. Opin* 1980 ; 6 : 548-551.
17. Neuman M. : Clinical, biological and gastric fibroscopic tolerance of a new non-steroid anti-inflammatory analgesic diacetylrhein (urtrodar) . *Drug Exptl. Clin. Res* 1980 ; 6 : 53-64.
18. Pomarelli B , Berti M , Gatti M.T , et al : Non-steroid anti-inflammatory drug that stimulates prostaglandin release . *Farmaco* 1990 ; 35 : 836-842.
19. Floridi A , Cartiglione S , Bianchi C , et al : Effect of rhein on the glucose metabolism of Ehrlich ascites tumor cells . *Biochem. Pharmacol* 1990 ; 40 : 217-222.
20. Floridi A , gentile F P , Bruno T , et al : Growth inhibition by rhein and ionidamine of human glioma cells *in vitro* . *Anticancer Res* 1990 ; 10 : 1633-1636.
21. Biemond P , Swaak A T G , Penders J H A , et al : Soperoxide production by polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis : In vivo inhibition by the antirheumatic drug piroxicam due to interference with the activation of the NADPH oxidase . *Ann. Rheum. Dis* 1986 ; 45 : 249-255.
22. Mian M , brunelieschi S , Tarli S , et al : Rhein : an anthraquinones that modulates superoxide anion production from human neutrophils. *J. Pharm. Pharmacol* 1987 ; 39 ; 845-847.
23. Weber W W , Hein D W : N-acetylation pharmacogenetics . *Pharmacol. Rev* 1985 ; 37 :

25-79.

24. Lang N P , Chu D Z J , Hunter C F , et al : Role of aromatic amine acetyltransferase in human colorectal can . *Arch. Surg* 1987 ; 121 : 1259-1261.
25. Ilett K K , David B M , Detchon P , et al : Acetylator phenotype in colorectal carcinoma . *Cancer Res* 1987 ; 47 : 1466-1469.
26. Cartwright R A , Glasham, R W , Rogers H J , et al : The role of N-acetyltransferase phenotype in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer . *Lancet* 1982 ; 2 : 842-846.
27. Einisto E P , Watanabe M. , Ishidate M , et al : Mutagenicity of 30 chemicals in *S.typhimurium* possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities . *Mutat. Res* 1991 ; 259 : 95-102.

柒、圖、表

Fig.1

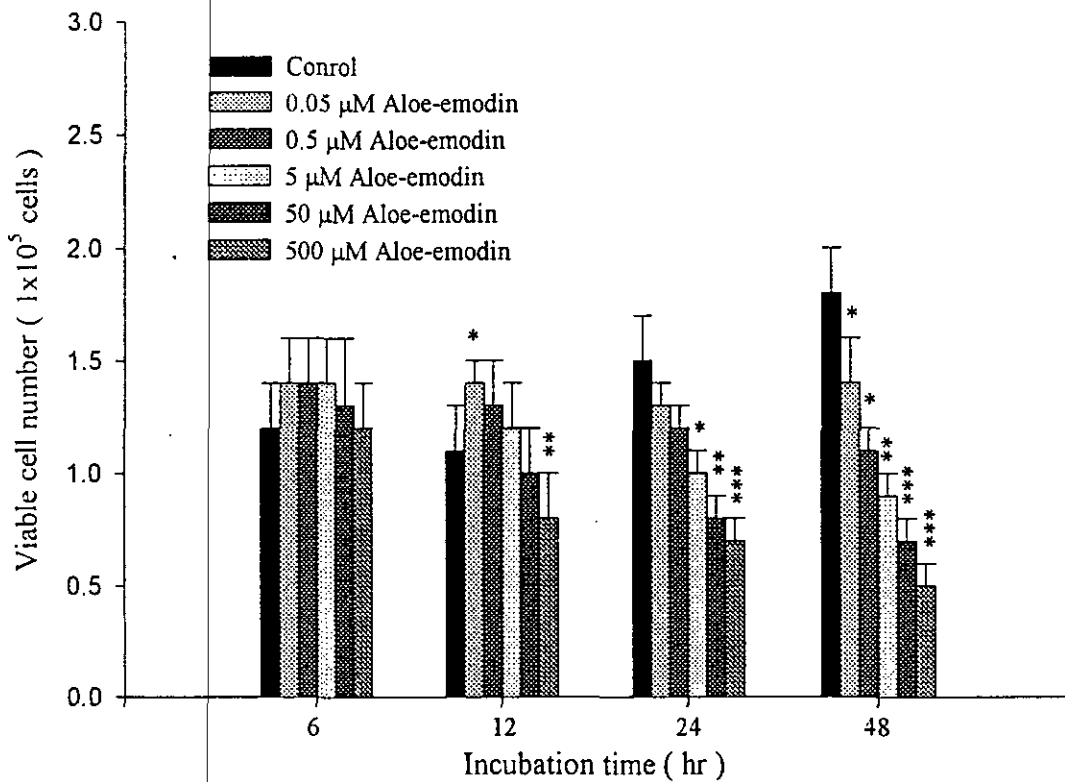


圖一.不同濃度的Emodin在不同時間培養影響人類胃癌細胞的生長

首先分別取 1×10^5 cells放入每一24well plate中，同時有無加入不同濃度的Emodin，然後在培養室培養不同時間(0-48hr)，然後算出存活細胞數目而決定其影響。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

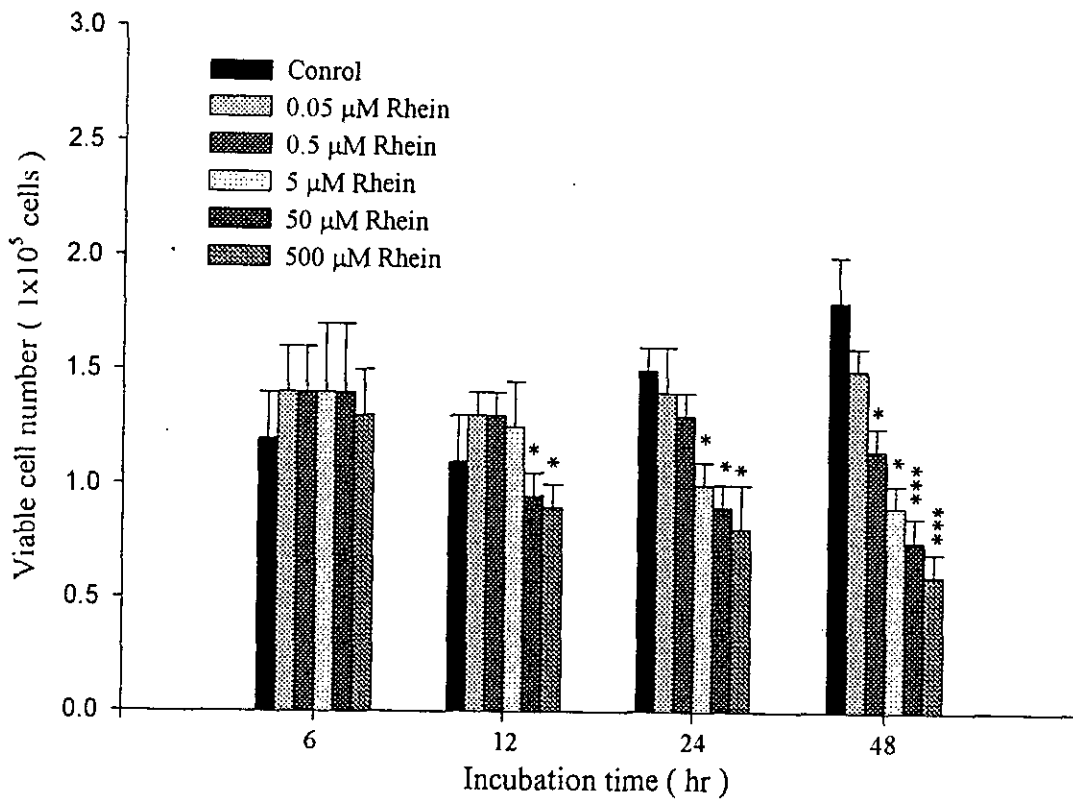
Fig.2



圖二.不同濃度的Aloe-emodin在不同時間培養影響人類胃癌細胞的生長

首先分別取 1×10^5 cells放入每一24well plate中，同時有無加入不同濃度的Aloe-emodin，然後在培養室培養不同時間(0-48hr)，然後算出存活細胞數目而決定其影響。利用個別與control比較，而經由Student's t test 分析 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Fig.3

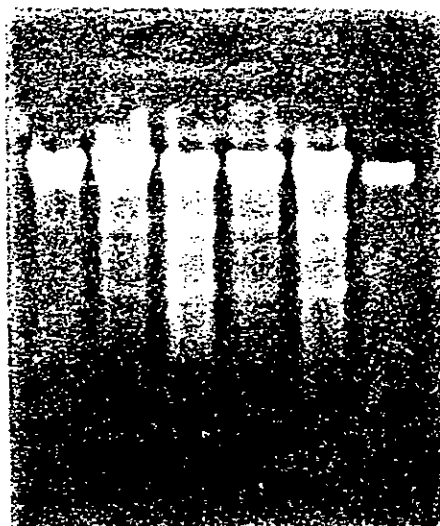


圖三.不同濃度的Rhein在不同時間培養影響人類胃癌細胞的生長

首先分別取 1×10^5 cells放入每一24well plate中，同時有無加入不同濃度的Rhein，然後在培養室培養不同時間(0-48hr)，然後算出存活細胞數目而決定其影響。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

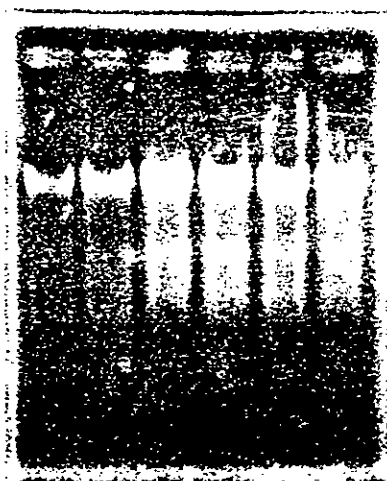
Control.	0.05 μ M	0.5 μ M	5 μ M	50 μ M	500 μ M
----------	--------------	-------------	-----------	------------	-------------



圖四. 電泳(Agarose gel)顯示DNA片斷由於加入Emodin到人類胃癌細胞的結果

人類胃癌細胞於每 6×10^6 cells放入6well plate中每一well，分別有無加入不同濃度的Emodin然後經過不同時間培養，收集細胞粹取DNA，再跑1.2% agarose電泳照相而得到。

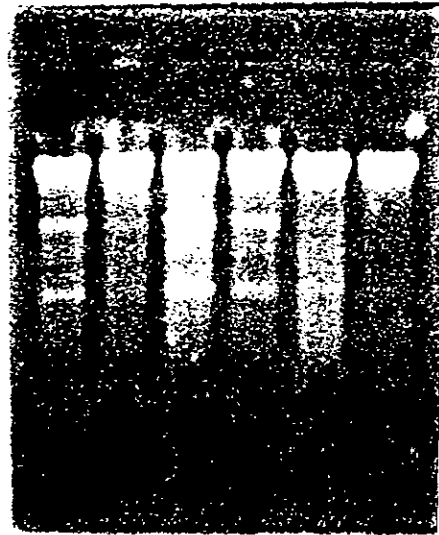
Control	500 μ M	50 μ M	5 μ M	0.5 μ M	0.05 μ M
---------	-------------	------------	-----------	-------------	--------------



圖五.電泳(Agarose gel)顯示DNA片斷由於加入Aloe-emodin到人類胃癌細胞的結果

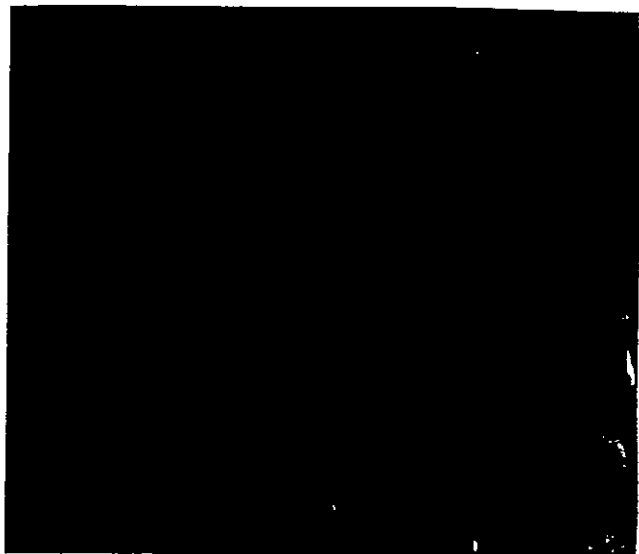
人類胃癌細胞於每 6×10^6 cells放入6-well plate中每一well，分別有無加入不同濃度的Aloe-emodin然後經過不同時間培養，收集細胞粹取DNA，再跑1.2% agarose電泳照相而得到。

0.05 μ M
0.5 μ M
5 μ M
50 μ M
500 μ M
Control



圖六. 電泳(Agarose gel)顯示DNA片斷由於加入Rhein到人類胃癌細胞的結果

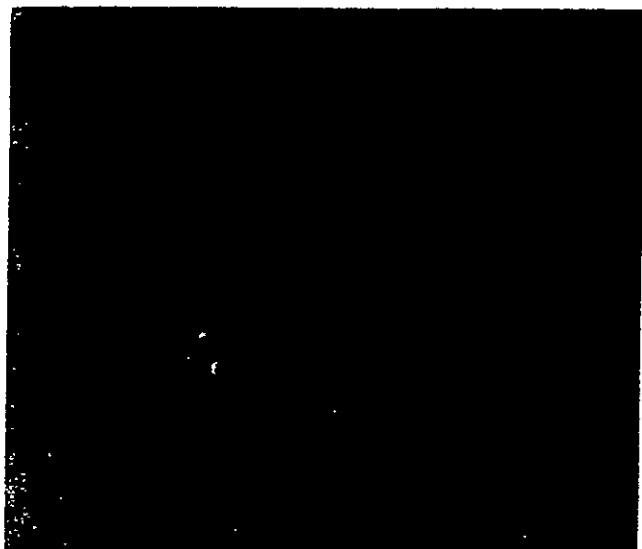
人類胃癌細胞於每 6×10^6 cells放入6-well plate中每一well，分別有無加入不同濃度的Rhein然後經過不同時間培養，收集細胞粹取DNA，再跑1.2% agarose電泳照相而得到。



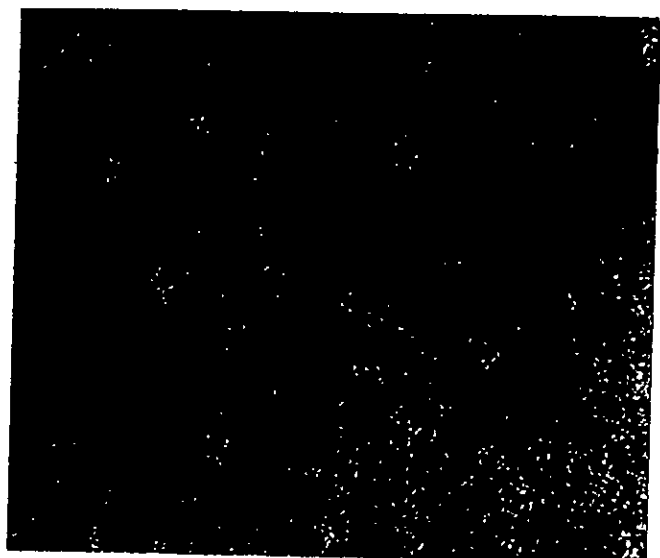
Control 18 hr
morphology



Control 18hr
chromosome



Emodin 18 hr
morphology



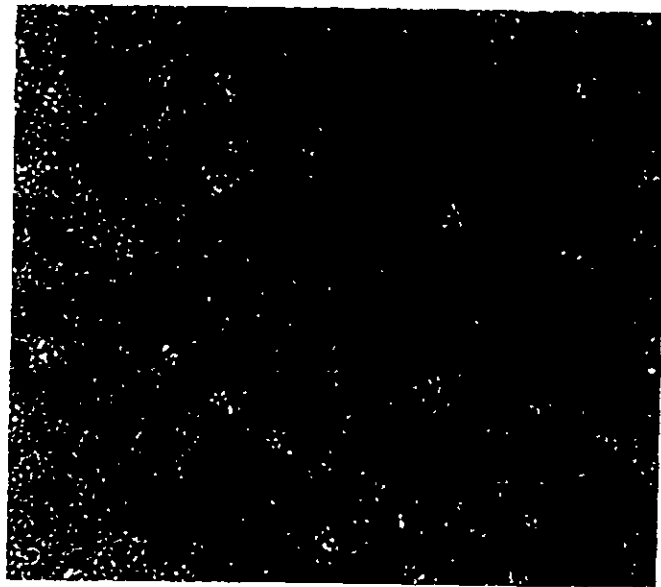
Emodin 18 hr
chromosome

圖七.不同濃度 Emodin 影響人類胃癌細胞株的細胞型態

於 6 well plate 中每一 well 分別加入 1×10^6 cells，然後分別加入不同濃度的 Emodin，再經過不同時間的培養，再經由倒立顯微鏡觀察及照相。

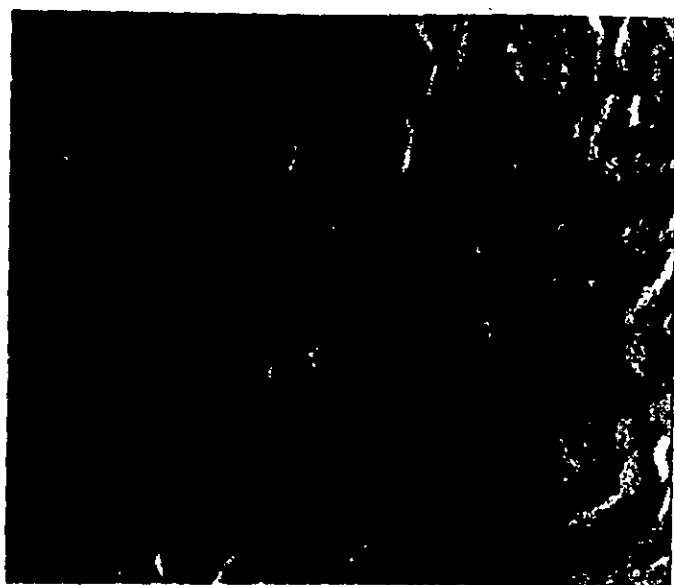


Aloe-emodin 18hr
morphology



Aloe-emodin 18hr
chromosome

圖八. 不同濃度 Aloe-emodin 影響人類胃癌細胞株的細胞型態
於 6 well plate 中每一 well 分別加入 1×10^6 cells，然後分別加入
不同濃度的 Aloe-emodin，再經過不同時間的培養，再經由倒立顯
微鏡觀察及照相。



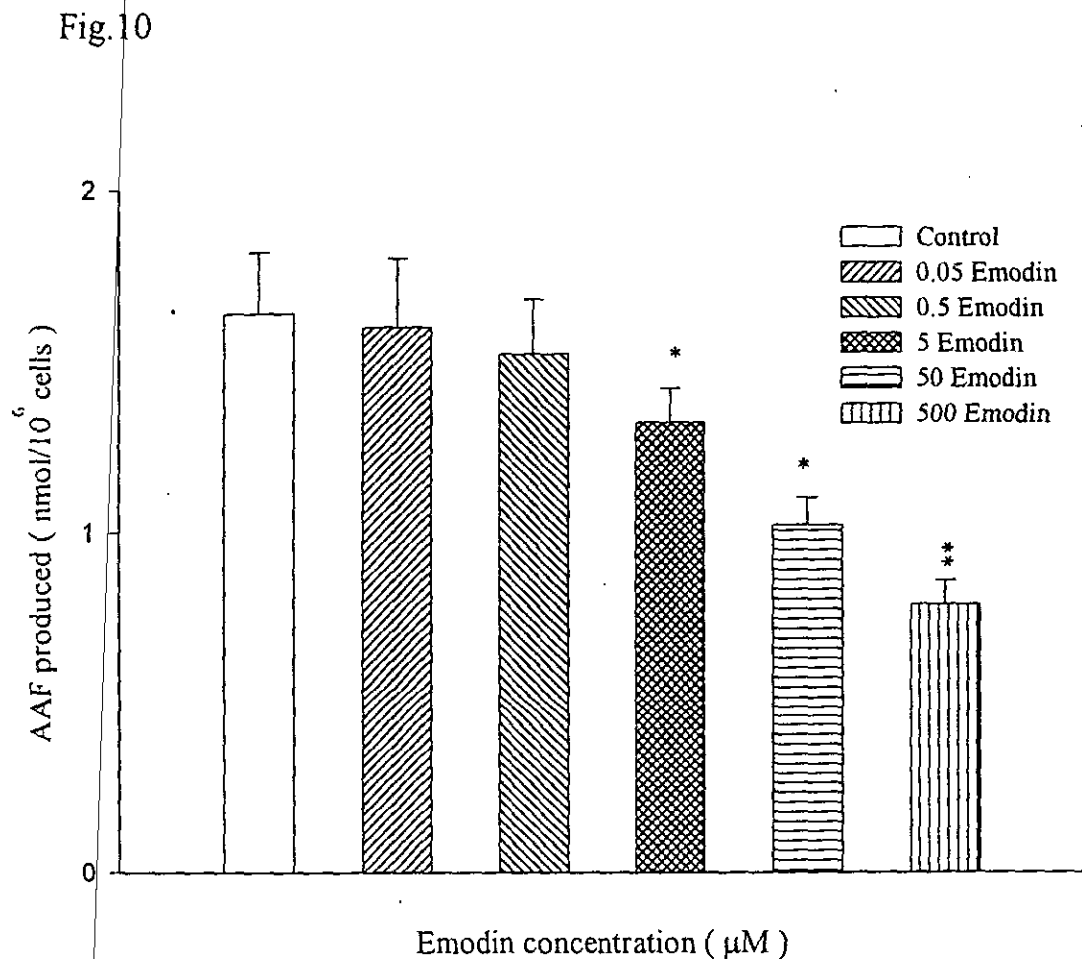
Rhein 18hr
morphology



Rhein 18hr
chromosome

圖九. 不同濃度 Rhein 影響人類胃癌細胞株的細胞型態

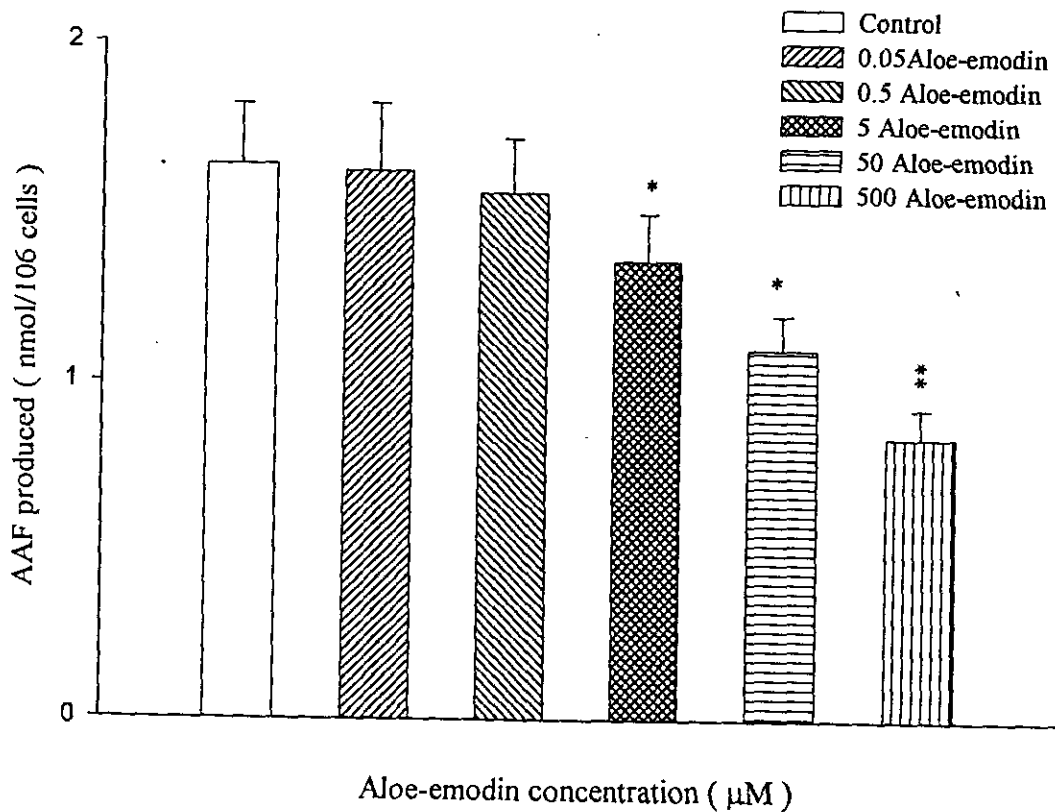
於 6 well plate 中每一 well 分別加入 1×10^6 cells，然後分別加入不同濃度的 Rhein，再經過不同時間的培養，再經由倒立顯微鏡觀察及照相。



圖十.不同濃度的Emodin抑制人類胃癌細胞乙醃化2-AF的量

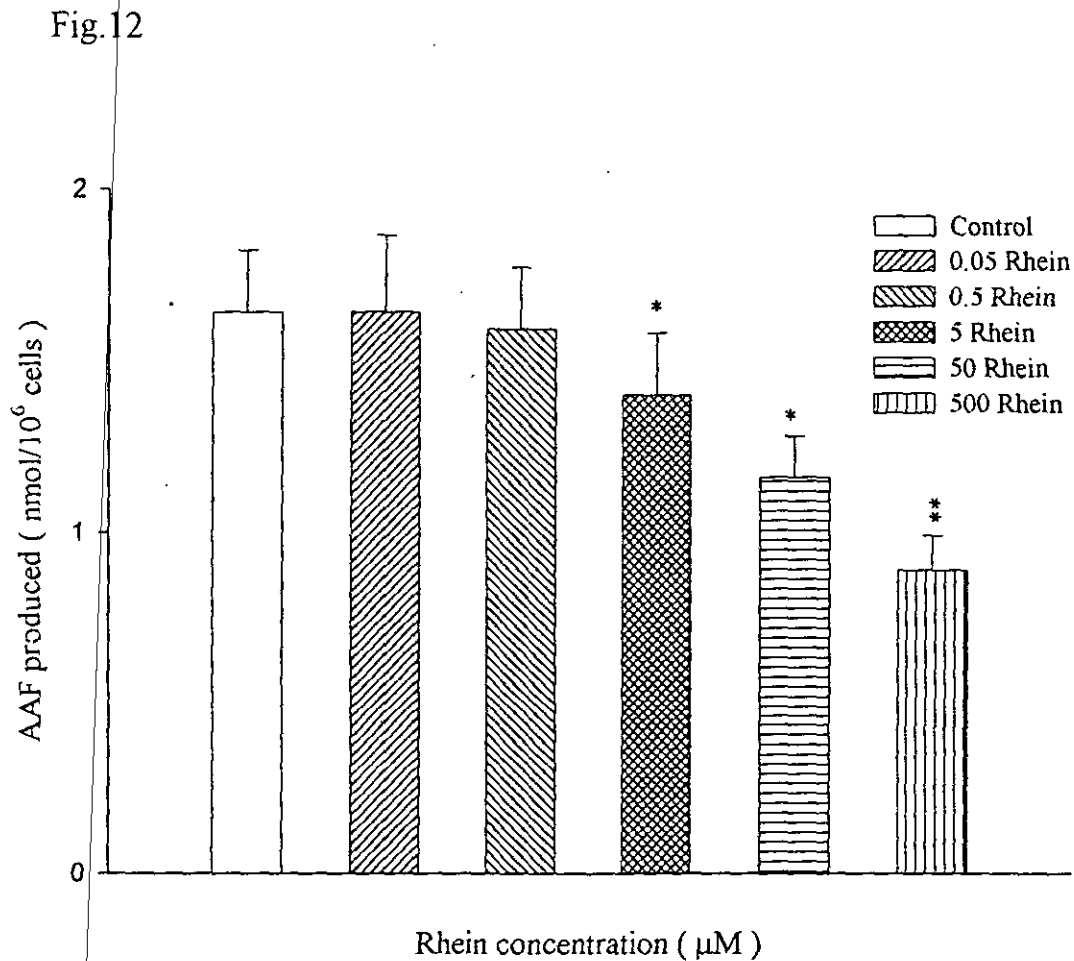
不同濃度的Emodin加入每一well，讓well含有 1×10^6 cells人類胃癌細胞，同時加入 $60 \mu\text{M}$ 的2-AF，然後培養18小時，而收集上層液，而乾燥，溶於methanol，再由HPLC來分析乙醃化的2-AAF和未乙醃化的2-AF的量。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Fig.11



圖十一.不同濃度的Aloe-emodin抑制人類胃癌細胞乙醯化2-AF的量

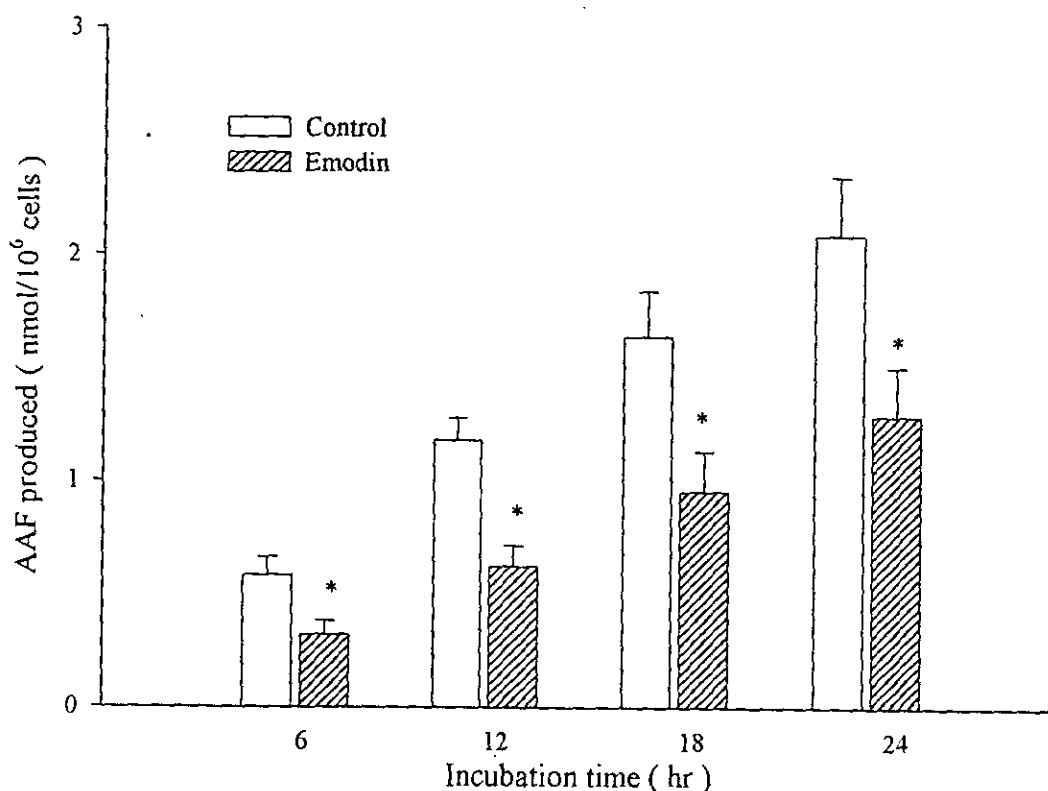
不同濃度的Aloe-emodi加入每一well，讓well含有 1×10^6 cells人類胃癌細胞，同時加入60 µM的2-AF，然後培養18小時，而收集上層液，而乾燥，溶於methanol，再由HPLC來分析乙醯化的2-AAF和未乙醯化的2-AF的量。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



圖十二.不同濃度的Rhein抑制人類胃癌細胞乙醯化2-AF的量

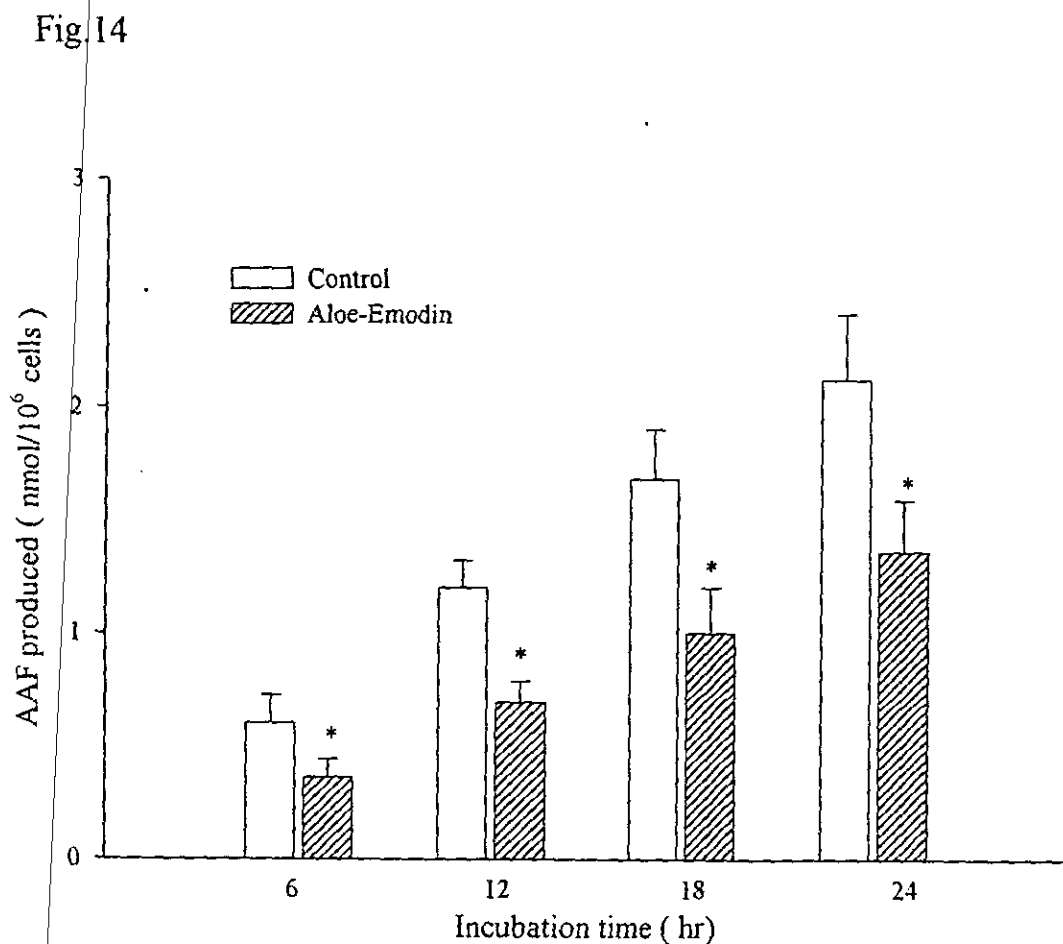
不同濃度的Rhein加入每一well，讓well含有 1×10^6 cells人類胃癌細胞，同時加入 $60 \mu\text{M}$ 的2-AF，然後培養18小時，而收集上層液，而乾燥，溶於methanol，再由HPLC來分析乙醯化的2-AAF和未乙醯化的2-AF的量。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Fig.13



圖十三.不同時間的培養對Emodin抑制人類胃癌細胞乙醯化 60 μ M 2-AF的量

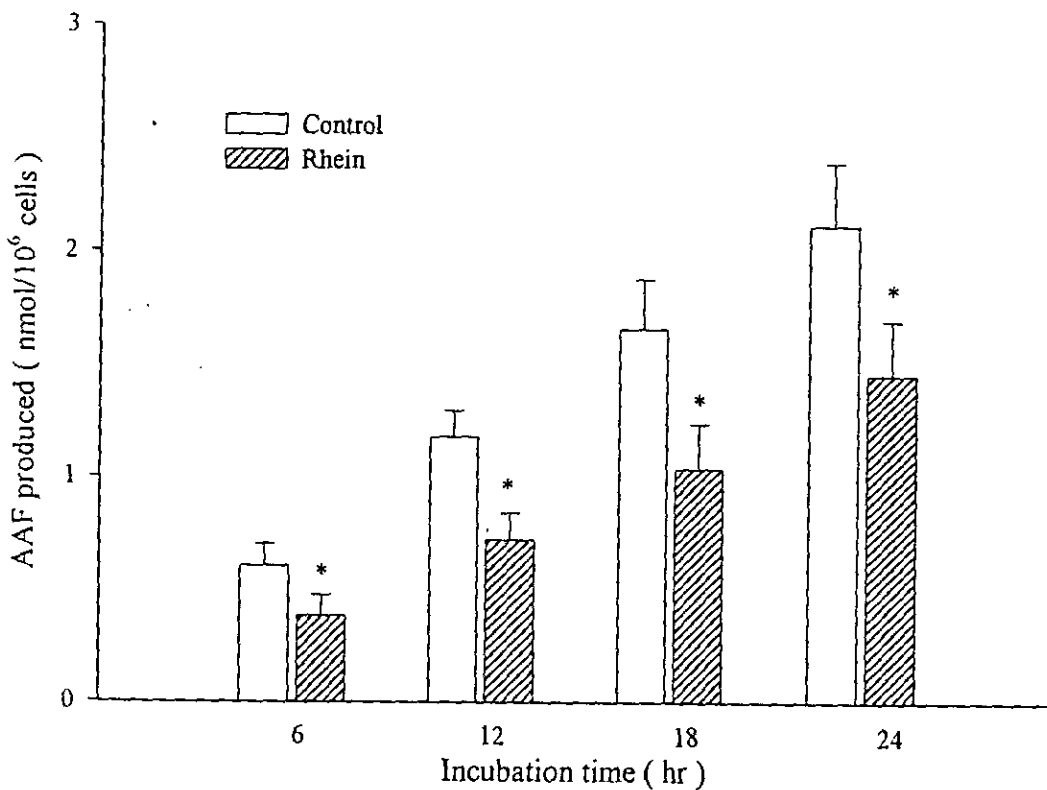
不同濃度的2-AF分別加入24well中，每well含有 1×10^6 cells，再經過不同時間的培養後，收集上層液，而乾燥，然後溶於methanol，再由HPLC分析乙醯化的2-AAF量和未乙醯化2-AF的量。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析* $p < 0.01$



圖十四.不同時間的培養對Aloe-emodin抑制人類胃癌細胞乙醃化60 μM 2-AF的量

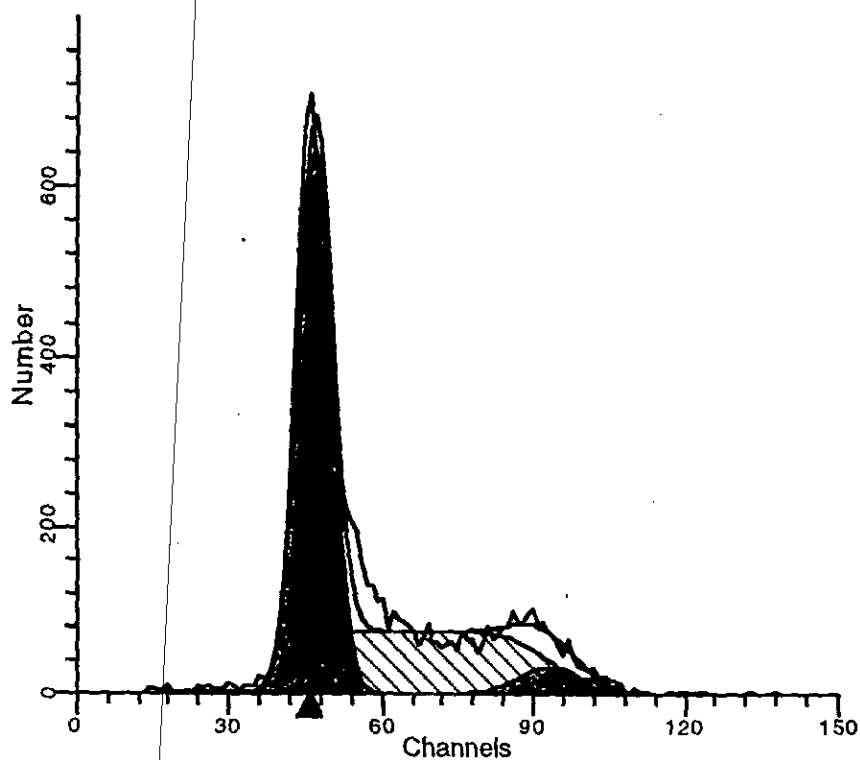
不同濃度的2-AF分別加入24well中，每well含有 1×10^6 cells，再經過不同時間的培養後，收集上層液，而乾燥，然後溶於methanol，再由HPLC分析乙醃化的2-AAF量和未乙醃化2-AF的量。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析* $p < 0.01$

Fig.15



圖十五.不同時間的培養對Rhein抑制人類胃癌細胞乙醃化60 μ M 2-AF的量

不同濃度的2-AF分別加入24well中，每well含有 1×10^6 cells，再經過不同時間的培養後，收集上層液，而乾燥，然後溶於methanol，再由HPLC分析乙醃化的2-AAF量和未乙醃化2-AF的量。利用個別與control比較，而經由Student's t test分析* $p < 0.01$



Date acquired: 8-Oct-98
 File: 191009.001
 Source: t-24
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 57.40 % at 46.75
 Dip G2-M: 5.71 % at 93.67
 Dip S: 36.89 % G2/G1: 2.00
 Dip %CV: 7.13

Total S-Phase: 36.89 %

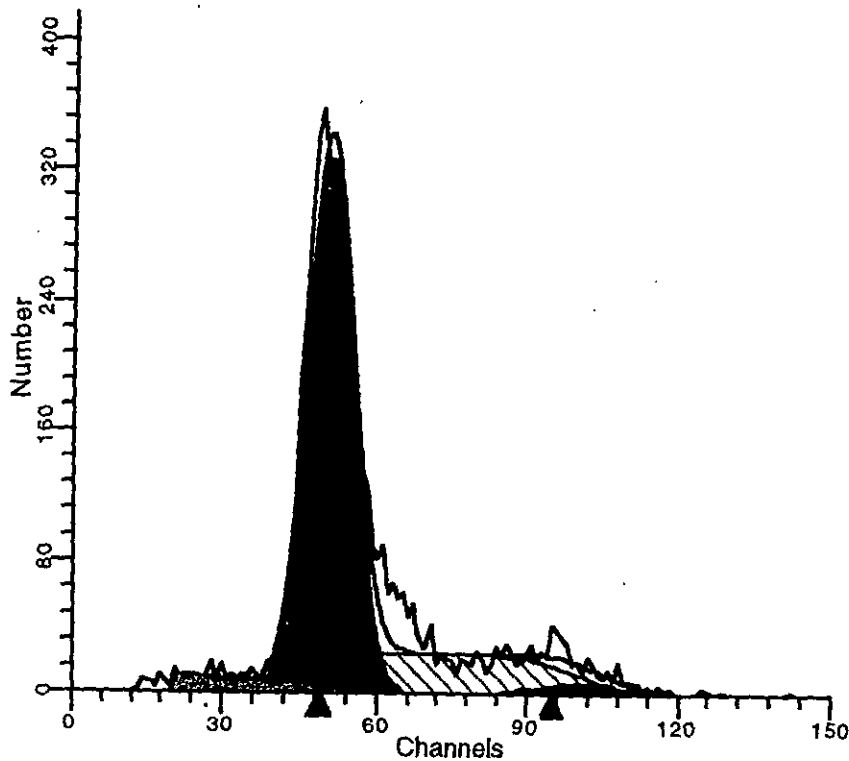
Extra Pop: %
 Debris: 1.67 %
 Aggregates: 0.57 %
 Modeled Events: 9631
 RCS: 3.129

Diploid B.A.D.: 0.89 %

Control

圖十六. Emodin, aloë-emodin和Rhein 影響胃癌細胞cell cycle的Flow cytometry分析圖

胃癌細胞分別有無加入50 μ M和500 μ M大黃此三種成份，然後培養18小時，再收集細胞，然後再由Flow cytometry分析細胞週期。



Date acquired: 8-Oct-98
 File: 191009.004
 Source: t-24
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

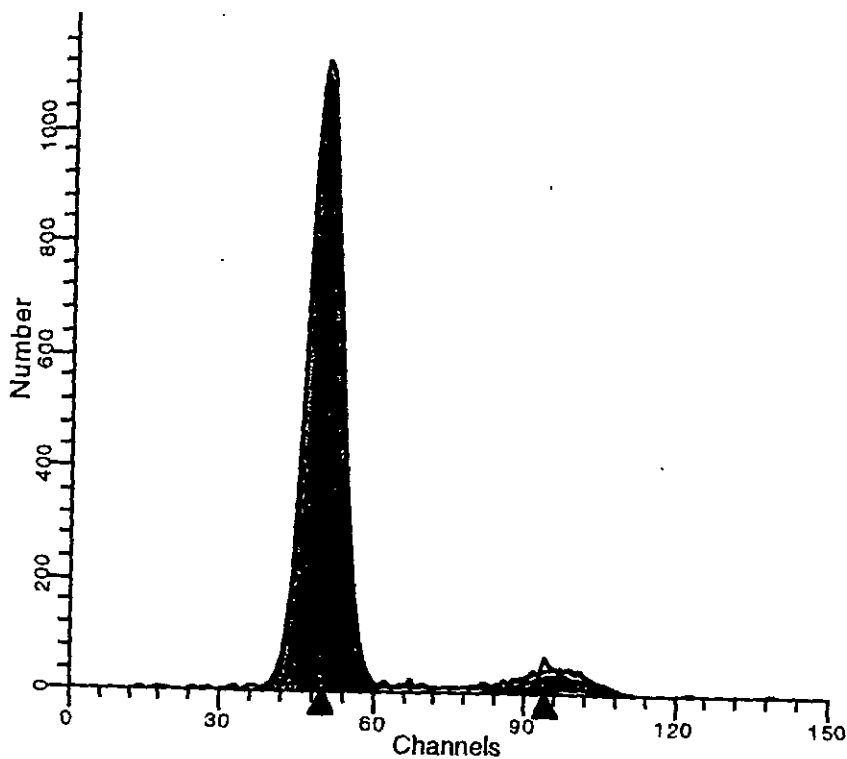
DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 72.73 % at 50.60
 Dip G2-M: 2.56 % at 99.46
 Dip S: 24.70 % G2/G1: 1.97
 Dip %CV: 8.55

Total S-Phase: 24.70 %

Extra Pop: %
 Debris: 5.33 %
 Aggregates: 0.91 %
 Modeled Events: 5256
 RCS: 2.665

Diploid B.A.D.: 1.40 %

Emodin 50 μ M



Date acquired: 8-Oct-98
 File: 191009.008
 Source: t-24
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

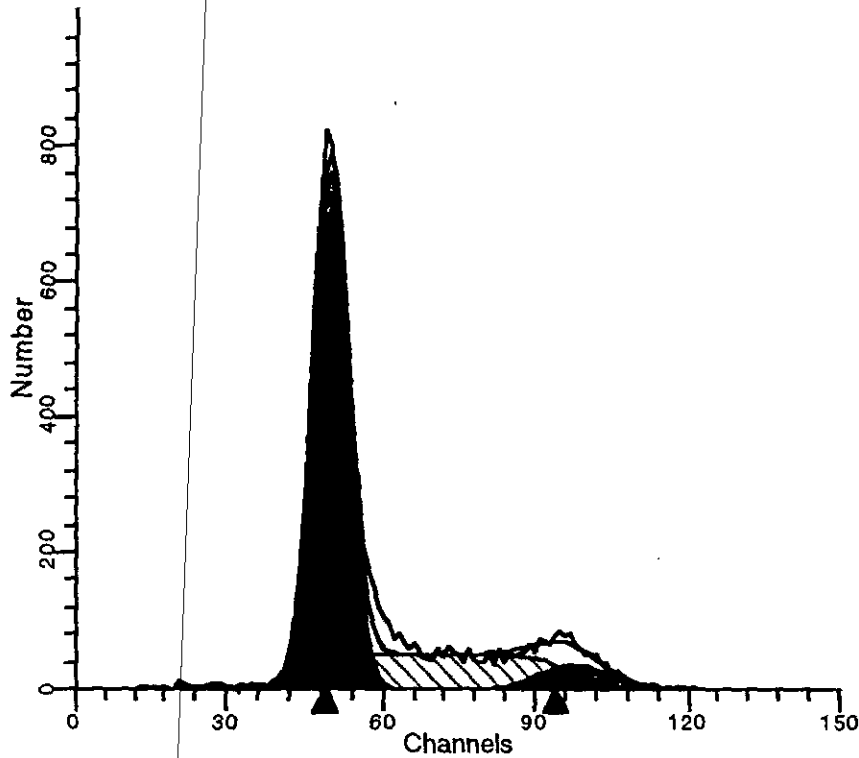
DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 89.41 % at 49.78
 Dip G2-M: 5.31 % at 96.35
 Dip S: 5.28 % G2/G1: 1.94
 Dip %CV: 6.26

Total S-Phase: 5.28 %

Extra Pop: %
 Debris: 0.98 %
 Aggregates: 1.29 %
 Modeled Events: 9816
 RCS: 1.160

Diploid B.A.D.: 0.50 %

Emodin 500 μ M



Date acquired: 8-Oct-98
 File: 191009.002
 Source: t-24
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

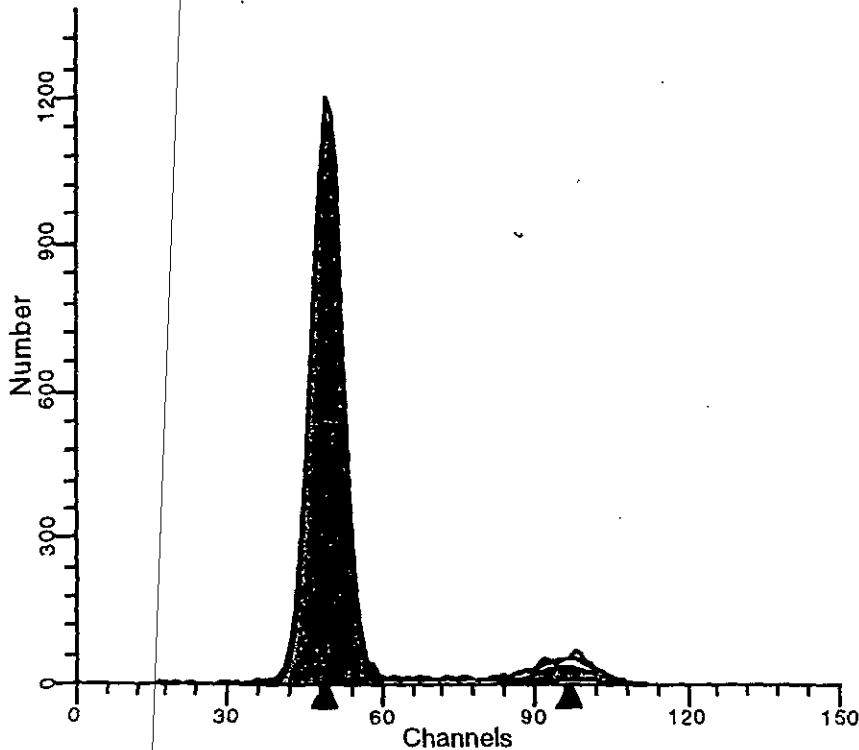
DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 67.79 % at 49.80
 Dip G2-M: 6.40 % at 97.61
 Dip S: 25.81 % G2/G1: 1.96
 Dip %CV: 6.72

Total S-Phase: 25.81 %

Extra Pop: %
 Debris: 2.09 %
 Aggregates: 0.63 %
 Modeled Events: 9737
 RCS: 2.279

Diploid B.A.D.: 1.00 %

Aloe-emodin 50µM



Date acquired: 8-Oct-98
 File: 191009.007
 Source: t-24
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

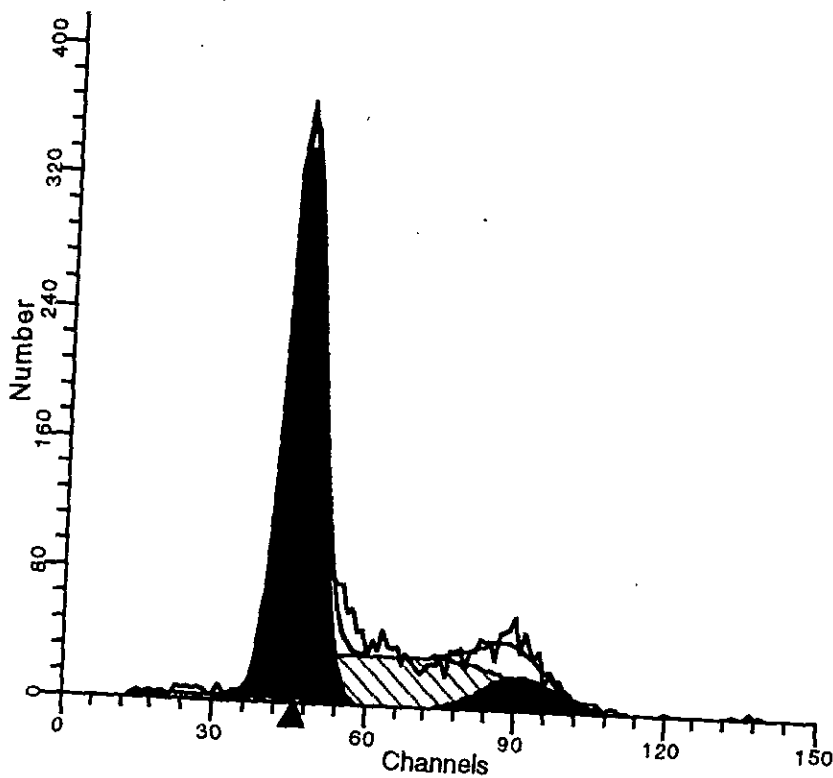
DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 88.04 % at 49.22
 Dip G2-M: 5.65 % at 96.20
 Dip S: 6.31 % G2/G1: 1.95
 Dip %CV: 5.88

Total S-Phase: 6.31 %

Extra Pop: %
 Debris: 1.25 %
 Aggregates: 1.76 %
 Modeled Events: 9811
 RCS: 1.435

Diploid B.A.D.: 0.89 %

Aloe-emodin 500 µM



Date acquired: 8-Oct-98
 File: 191009.003
 Source: t-24
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

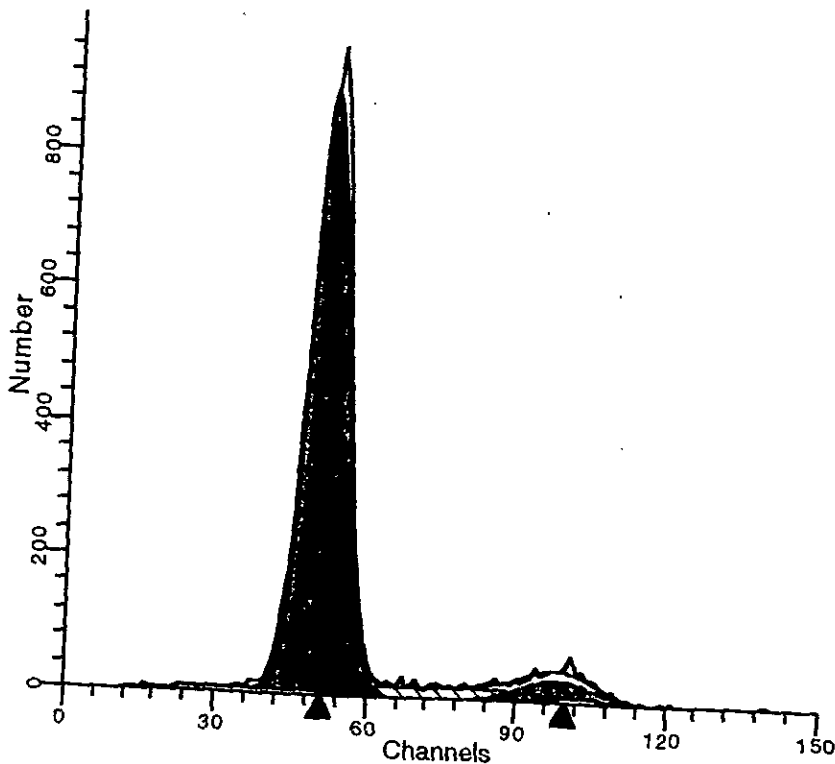
DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 63.23 % at 46.17
 Dip G2-M: 7.92 % at 90.95
 Dip S: 28.85 % G2/G1: 1.97
 Dip %CV: 7.53

Total S-Phase: 28.85 %

Extra Pop: %
 Debris: 3.83 %
 Aggregates: 1.09 %
 Modeled Events: 4942
 RCS: 1.190

Diploid B.A.D.: 1.94 %

Rhein 50 μ M



Date acquired: 5-Oct-98
 File: 19981006.007
 Source: t-24
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 85.77 % at 50.90
 Dip G2-M: 6.13 % at 98.45
 Dip S: 8.10 % G2/G1: 1.93
 Dip %CV: 7.01

Total S-Phase: 8.10 %

Extra Pop: %
 Debris: 3.36 %
 Aggregates: 1.45 %
 Modeled Events: 9743
 RCS: 2.622

Diploid B.A.D.: 1.61 %

Rhein 500 μ M

表一.大黃成份Emodin, Aloe-emodin 和 Rhein 引起人類胃癌細胞Apoptosis

Treatment(μm)	6hr	12hr	24hr	48hr
Control	-	-	-	-
Emodin				
0.05	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+
5	+	+	+	+
50	+	+	+	+
500	0	0	0	0
Aloe-emodin				
0.05	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+
5	+	+	+	+
50	+	+	+	+
500	0	0	0	0
Rhein				
0.05	-	+	+	+
0.5	+	+	+	+
5	+	+	+	+
50	+	+	+	+
500	+	+	+	+

人類胃癌細胞 8×10^6 cells有無加入不同濃度大黃成份，然後分別培養不同時間，再收集細胞純化DNA，再跑1.2% agarose gel 電泳。

結果 - :未necrosis and apoptosis

+ : apoptosis

0 : necrosis

表二. 胃癌細胞有無不同濃度的 Emodin 培養後細胞週期的分佈

Emodin(μm)	Treatment(μm)	% cells		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	6	51.6 \pm 0.5	26.0 \pm 0.6	22.4 \pm 0.6
0.05	6	59.8 \pm 0.7	***15.1 \pm 0.6	25.1 \pm 0.2
0.5	6	58.6 \pm 1.6	***17.0 \pm 1.4	24.4 \pm 1.4
5	6	61.6 \pm 0.6	***15.0 \pm 0.2	23.4 \pm 0.2
50	6	63.4 \pm 0.7	***14.8 \pm 0.6	21.8 \pm 0.7
500	6	64.9 \pm 1.2	***12.9 \pm 0.7	22.2 \pm 0.1
Control	12	56.1 \pm 1.6	23.3 \pm 0.6	20.6 \pm 0.4
0.05	12	63.5 \pm 0.2	**15.8 \pm 0.4	20.7 \pm 1.7
0.5	12	64.8 \pm 0.3	**16.0 \pm 0.4	19.2 \pm 0.4
5	12	69.2 \pm 0.6	**14.2 \pm 1.3	16.6 \pm 0.6
50	12	70.3 \pm 0.3	***12.4 \pm 0.8	17.4 \pm 0.3
500	12	72.4 \pm 1.7	***10.3 \pm 0.7	17.3 \pm 1.6
Control	18	62.7 \pm 0.2	24.3 \pm 0.6	13.0 \pm 0.8
0.05	18	79.3 \pm 1.4	***14.6 \pm 0.3	6.1 \pm 1.9
0.5	18	80.0 \pm 0.2	***12.4 \pm 1.9	7.0 \pm 2.4
5	18	78.4 \pm 0.8	***12.8 \pm 0.4	8.8 \pm 0.6
50	18	68.8 \pm 2.6	**16.4 \pm 1.8	14.8 \pm 0.4
500	18	64.9 \pm 1.7	**16.9 \pm 1.4	19.2 \pm 1.2
Control	24	62.4 \pm 0.8	20.2 \pm 0.6	17.4 \pm 1.9
0.05	24	80.3 \pm 0.2	***11.9 \pm 1.8	7.8 \pm 0.4
0.5	24	81.3 \pm 2.6	***10.0 \pm 0.2	8.7 \pm 2.6
5	24	81.9 \pm 0.7	***9.0 \pm 0.9	9.1 \pm 0.4
50	24	82.0 \pm 2.4	***8.2 \pm 0.7	9.8 \pm 1.3
500	24	82.2 \pm 0.6	***6.4 \pm 0.7	11.4 \pm 0.4
Control	48	66.4 \pm 1.8	19.9 \pm 1.2	13.3 \pm 0.8
0.05	48	69.1 \pm 0.7	17.6 \pm 0.8	15.1 \pm 1.2
0.5	48	68.5 \pm 0.9	*14.8 \pm 1.4	16.7 \pm 0.8

續表二.

Emodin(μm)	Treatment(μm)	% cells		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
5	48	72.4 \pm 1.4	***11.9 \pm 1.4	15.3 \pm 0.6
50	48	69.7 \pm 0.8	**14.1 \pm 0.8	16.4 \pm 1.3
500	48	58.9 \pm 0.6	20.9 \pm 0.7	20.2 \pm 0.6
Control	48	84.5 \pm 1.6	9.8 \pm 0.6	5.7 \pm 0.9
0.05	72	86.5 \pm 1.0	8.2 \pm 0.4	5.3 \pm 0.8
0.5	72	87.7 \pm 0.7	7.5 \pm 0.6	4.8 \pm 0.2
5	72	84.7 \pm 0.9	8.8 \pm 0.9	6.5 \pm 0.4
50	72	87.4 \pm 0.9	9.5 \pm 1.0	3.1 \pm 0.7
500	72	83.5 \pm 1.2	8.7 \pm 0.4	7.8 \pm 1.0

數據是mean \pm SD，每一個data代表由三次實驗平均所得，胃癌細胞 1×10^6 cells在6 well，然後分別有無加入不同濃度的Emodin培養，然後培養不同時間，再收集細胞，再由Flow cytometry分析cell cycle。經由與control分別相比較，而由student's t test分析 *p<0.05 **P<0.005 ***P<0.0001 ****P<0.00005

表三. 胃癌細胞有無不同濃度的Aloe-emodin培養後細胞週期的分佈

Aloe-emodin(μm)	Treatment(μm)	% cells		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	6	52.8± 0.4	27.1± 0.3	20.1± 0.6
0.05	6	54.3± 0.7	*20.4± 1.0	25.3± 0.6
0.5	6	54.0± 1.2	*19.8± 1.2	26.2± 0.7
5	6	56.2± 0.7	*17.6± 0.4	26.0± 0.9
50	6	56.9± 1.0	**16.0± 0.8	27.1± 0.4
500	6	59.8± 0.6	**15.0± 0.7	25.2± 0.4
Control	12	53.4± 0.9	27.0± 0.6	19.6± 0.4
0.05	12	57.9± 1.2	*20.2± 1.4	21.9± 0.4
0.5	12	54.1± 1.3	23.8± 1.8	22.1± 1.8
5	12	53.6± 0.7	25.4± 3.2	21.0± 1.0
50	12	50.4± 0.8	29.0± 1.6	20.6± 0.7
500	12	46.7± 0.9	*34.5± 1.7	18.8± 1.4
Control	18	65.3± 1.0	27.6± 0.6	7.1± 0.4
0.05	18	67.9± 2.2	*22.4± 1.0	9.7± 0.6
0.5	18	69.8± 0.8	*20.1± 1.2	9.5± 0.6
5	18	70.4± 0.7	*18.6± 0.4	11.0± 1.0
50	18	69.8± 0.4	**17.5± 0.8	12.7± 0.6
500	18	70.4± 1.3	**16.2± 1.0	13.4± 1.2
Control	24	64.9± 2.0	23.7± 1.8	11.4± 2.0
0.05	24	65.8± 1.6	**16.4± 2.2	17.8± 0.4
0.5	24	67.4± 0.7	**13.7± 1.9	18.9± 1.2
5	24	69.9± 0.9	**12.0± 3.1	18.1± 1.6
50	24	73.4± 2.2	**10.3± 2.4	16.3± 2.0
500	24	73.6± 3.1	***8.7± 1.0	17.7± 2.2
Control	48	70.6± 3.4	20.4± 2.8	9.0± 0.9
0.05	48	71.9± 2.1	19.8± 1.6	8.3± 1.2
0.5	48	73.8± 0.9	18.6± 1.4	7.6± 0.8

續表三.

Aloe-modin(μm)	Treatment(μm)	% cells		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
5	48	74.0 \pm 1.3	17.9 \pm 1.6	8.1 \pm 0.9
50	48	71.2 \pm 1.0	18.4 \pm 0.7	10.4 \pm 2.2
500	48	69.4 \pm 2.2	19.8 \pm 2.0	10.8 \pm 0.9
Control	48	77.5 \pm 2.7	13.4 \pm 0.9	9.1 \pm 0.7
0.05	72	78.3 \pm 2.0	12.0 \pm 1.0	9.7 \pm 1.3
0.5	72	79.6 \pm 1.4	11.0 \pm 0.8	9.4 \pm 0.8
5	72	80.4 \pm 0.9	10.4 \pm 0.9	9.2 \pm 1.0
50	72	82.8 \pm 1.8	*8.9 \pm 0.7	8.3 \pm 0.9
500	72	80.9 \pm 2.3	11.9 \pm 0.6	7.2 \pm 0.6

數據是mean \pm SD，每一個data代表由三次實驗平均所得，胃癌細胞 1×10^6 cells在6 well，然後分別有無加入不同濃度的Aloe-emodin培養，然後培養不同時間，再收集細胞，再由Flow cytometry分析cell cycle。經由與control分別相比較，而由student's t test分析*p<0.05 **P<0.005 ***P<0.0001 ****P<0.00005

表四. 胃癌細胞有無不同濃度的 Rhein 培養後細胞週期的分佈

Rhein(μm)	Treatment(μm)	% cells		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	6	59.7± 0.6	20.8± 0.3	19.5± 0.4
0.05	6	62.3± 1.0	17.2± 0.7	20.5± 0.9
0.5	6	62.0± 1.2	17.9± 1.0	20.1± 1.0
5	6	62.4± 0.9	16.8± 1.4	20.8± 0.8
50	6	62.0± 0.8	*15.9± 1.6	22.1± 1.0
500	6	62.8± 1.0	*16.0± 0.8	21.2± 0.3
Control	12	69.7± 0.7	19.7± 1.0	10.6± 0.7
0.05	12	67.4± 1.4	19.5± 0.8	13.1± 0.7
0.5	12	69.4± 1.0	18.9± 1.2	11.7± 1.0
5	12	64.8± 2.2	22.1± 2.0	13.1± 0.9
50	12	67.9± 2.6	19.4± 1.4	13.2± 1.0
500	12	68.7± 0.7	***9.6± 0.3	11.7± 0.4
Control	18	72.4± 2.2	20.8± 0.9	6.8± 0.9
0.05	18	73.9± 3.8	18.4± 1.2	7.7± 1.0
0.5	18	76.4± 3.1	17.0± 0.8	6.6± 0.6
5	18	78.5± 2.6	*15.4± 2.1	6.1± 0.6
50	18	79.0± 1.6	*14.3± 0.7	6.5± 1.0
500	18	81.4± 1.8	**12.6± 0.9	6.0± 0.7
Control	24	65.6± 0.7	25.8± 0.3	8.6± 0.7
0.05	24	67.4± 2.4	*17.4± 1.0	15.2± 1.2
0.5	24	69.0± 3.0	*15.3± 2.2	15.7± 0.6
5	24	70.4± 2.6	**12.0± 0.8	17.6± 2.2
50	24	72.2± 1.8	***9.4± 1.0	18.4± 1.4
500	24	73.6± 0.9	***7.9± 0.9	18.5± 0.9
Control	48	70.8± 2.6	20.9± 3.8	8.3± 0.6
0.05	48	72.4± 2.1	18.4± 1.0	9.2± 1.2
0.5	48	74.6± 1.9	17.0± 1.2	8.4± 0.7

續表四.

Rhein(μm)	Treatment(μm)	% cells		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
5	48	75.6 \pm 2.0	*15.7 \pm 0.9	8.7 \pm 1.0
50	48	74.9 \pm 0.9	17.0 \pm 1.2	8.1 \pm 1.1
500	48	69.9 \pm 1.2	20.9 \pm 0.8	9.2 \pm 0.6
Control	48	80.4 \pm 0.2	12.4 \pm 0.9	7.2 \pm 0.9
0.05	72	80.0 \pm 1.9	12.7 \pm 1.0	7.3 \pm 1.0
0.5	72	79.4 \pm 2.0	14.5 \pm 0.6	6.1 \pm 0.6
5	72	78.6 \pm 2.2	15.8 \pm 1.9	5.6 \pm 0.7
50	72	79.4 \pm 1.7	13.4 \pm 0.7	7.2 \pm 0.9
500	72	78.4 \pm 1.0	14.0 \pm 1.0	7.6 \pm 1.0

數據是mean \pm SD，每一個data代表由三次實驗平均所得，胃癌細胞 1×10^6 cells在6 well，然後分別有無加入不同濃度的 Rhein 培養，然後培養不同時間，再收集細胞，再由Flow cytometry分析cell cycle。經由與control分別相比較，而由student's t test分析 *p<0.05 **P<0.005 ***P<0.0001 ****P<0.00005