

第一章 前言

根據行政院衛生署自民國七十一年來的統計資料，癌症已經超過腦血管心血管疾病，居於國人十大死因的第一位。民國八十九年的統計資料顯示，惡性腫瘤佔了十大死因之第一位，其中胃癌僅次於肺癌，肝癌及直腸結腸癌而居於第四位。民國八十九年台灣死於胃癌的人數為 3970 人，其中男性有 2374 人，女性有 1596 人，男性發生胃癌比率比女性高。胃癌的形成原因，至今仍不十分明瞭，飲食的習慣與內容可能扮演一重要角色，據統計報導指出喜歡吃煙燻與鹽漬物的人，胃癌發生率比較高。另外下列幾項因素可能與胃癌的形成有關：遺傳 - 家族中有胃癌病例者，其他人得胃癌比率比一般人多 2 - 4 倍，萎縮性胃癌 - 胃酸分泌過低，胃黏膜一形成腸上皮化生而增加胃癌發生機率，胃腺性息肉 - 有 30 - 40% 會有惡性變化，曾經有胃癌病史再發機會也有很大。

惡性腫瘤又稱為癌症，相對於正常細胞的是，癌細胞具有以下幾個特性：1. 同源叢生性，起源一種細胞，再增生成一叢特別細胞。2. 自律性，不受生長激素或其他因子控制可自行無限生長。3. 退變性，喪失正常細胞分化的能力。4. 轉移性，藉淋巴、血液轉移到其他組織，侵害正常組織。此外，化學致癌物致癌過程主要分成三個步驟(如 Figure 1.)：1. 起始期(initiation)：正常細胞在受到致癌物導致基因發生改變的過程，通常只需 1-2 天的時間。2. 催化期(promotion)：需 10 年以上的催化，將初始細胞變成癌的前期細胞(Preneoplastic cell)，這期間基因還要累積一些序列性的變化，包括一些致癌基因及抑癌基因的變化累積而成。進行期(progression)：需要數年的光景，才會進行演變成癌細胞(neoplastic cell)⁽¹⁻³⁾。

前致癌因子(procarcinogen)

經細胞內代謝形成致癌物質而影響正常細胞基因

(DNA adducts)

約 1-2 天(initiation)

癌初始細胞(initiated cells)

催化期約十年(promotion)

癌前期細胞(pre-neoplastic cells)

進行期約 1-2 年

(progression)

癌細胞(neoplastic cells)

Figure1. 化學致癌物引起癌症的形成過程

癌症的形成往往由數種致癌基因的活化或數種抑癌基因的功能喪失所累積

而成的，導致癌症形成的因子中飲食占 33%、抽煙占 30%、濾過性病毒感染占 10%、性行為占 7%以及酒精、工業化職業、遺傳、環境污染、放射線、紫外線、食品添加物、不明原因等，而依流行病學統計及研究報告顯示，有超過 80%以上的人類癌症與化學致癌物有關⁽⁴⁾。而暴露在職業和環境中的化學致癌物有芳香胺類(arylamines)、多環芳香胺類、無機化合物、有機化合物、食品添加物及其他天然性的致癌物，如黃麴毒素(aflatoxin)、紫外線...等。在芳香胺類方面，已有研究發現經由餵食芳香胺類化合物可能導致動物產生癌症，但將芳香胺類化合物直接注射於動物器官卻不會產生癌症⁽⁵⁻⁷⁾。經研究顯示許多化學致癌物須經過體內酵素代謝活化後，才能形成活性更強的化學致癌物，再與細胞內 DNA 形成 DNA adducts，最後造成基因上的突變而引發癌症⁽⁸⁾。乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase；NAT)即是參與芳香胺類化合物代謝的其中一個重要酵素⁽⁹⁻¹⁰⁾。在多環芳香胺類方面，日本科學家 Yamagiwa 與 Ichikawa 將柏油塗抹於兔子上導致皮膚癌而證實柏油中含有致癌物質⁽¹¹⁾。後來經科學家發現柏油中含有多環芳香胺碳氫化物 benzo[α]-pyrene⁽¹²⁾是一種致癌物質。在無機化合物方面，如砷化物(Arsenic)、鎘化物(Cadmium)、鉻(Chromium)等，已有報告指出與皮膚癌、攝護腺癌、肺癌的產生有關。在有機化合物方面，如氯仿(Chloroform)、苯(Benzene)和硝化物(nitrate)等則與肝癌、血癌和胃癌⁽¹³⁾有關。而天然性致癌物，如發霉的花生中的黃麴毒素，已被整時會引發人類肝癌⁽¹⁴⁾，而長期暴露在紫外線下則會造成引發皮膚癌⁽¹⁵⁾。

當長期暴露於職業、環境或食物中的芳香性胺類化合物(2-aminofluorene；2-AF)後，2-aminofluorene (2-AF)先經乙醯轉移酵素(NAT)乙醯化後形成 2-Acetylaminofluorene (2-AAF)，再經細胞中的 Cytochrome P450 代謝後即形成活性強的致癌物質(ultimate carcinogen)，可以與 DNA 形成 DNA adducts 而導致癌症^(9,19)。依乙醯轉移酵素(NATs)的乙醯化能力，又分為快和慢乙醯轉移酵素(NATs)^(9,16-19)。根據流行病學統計結果，快乙醯轉移酵素者(fast NAT1)易得大腸、直腸癌⁽²⁰⁻²³⁾，慢乙醯轉移酵素者(slow NAT2)易得膀胱癌⁽²¹⁻²⁴⁾。因此參與芳香胺類致癌物乙醯化的酵素近年備受重視，若能發現影響此類酵素的藥物或化合物，使化學致癌物不會被活化或許能預防癌症的產生。

我們都知道胃癌與飲食有極大相關性⁽²⁵⁾，因此如果能由植物中搜尋出對胃癌或其他癌症有效用的成份，如可以預防癌症的發生或治療癌症的療效，而將來有機會應用於臨床上。

Apigenin、flavone、estradiol 屬於黃酮類(flavonoid)植物性賀爾蒙，在蔬菜及水果含量相當豐富大多存在豆科植物、堅果類、茶葉及柑橘類水果中⁽²⁶⁻²⁸⁾。Flavonoids 成分主要多具有很強抗氧化作用⁽²⁹⁾，有許多文獻報導指出此類成分對於許多癌症都有很好抗癌作用，例如：大腸直腸癌、前列腺癌、血癌、乳癌及皮膚癌等，⁽³⁰⁻³⁵⁾目前已經有幾種此類藥物應用於臨床上^(36,37)，因此本研究將檢測 apigenin、flavone 和 estradiol 對於人類胃癌細胞生長的影響、基因表現的影響及對乙醯轉化酵素活性的影響。

第二章 緒論

第一節 化學致癌物質在體內之致癌流程

在我們生活與職業的環境中，有許多的致癌物質暴露在其中，例如：輻射、香菸、食品添加物及有機與無機化合物等，其中以化學性的致癌物質占最多，有研究報導已指出，人類罹患癌症，有 80% 是由化學致癌物質所引起⁽⁴⁾。芳香胺類如 2-aminofluorene (2-AF)、PAH、4-aminobiphenyl 是目前已知最強致癌物質⁽³⁸⁻⁴⁰⁾，在自然界和食物中本身很安定活性低，在體內會經過乙醯轉移酵素 (N-acetyltransferases : NAT) 或 cytochrome P450 代謝成 hydroxylamine 後，在經 NAT1、NAT2、OAT、GSTM1 或 CYP1A1 等酵素作用⁽³⁹⁻⁴¹⁾，會形成具有親電性的 nitrenium ions 與 DNA 結合產生 DNA adducts 而造成 DNA 突變最後使癌症產生。(如 Figure 2.)

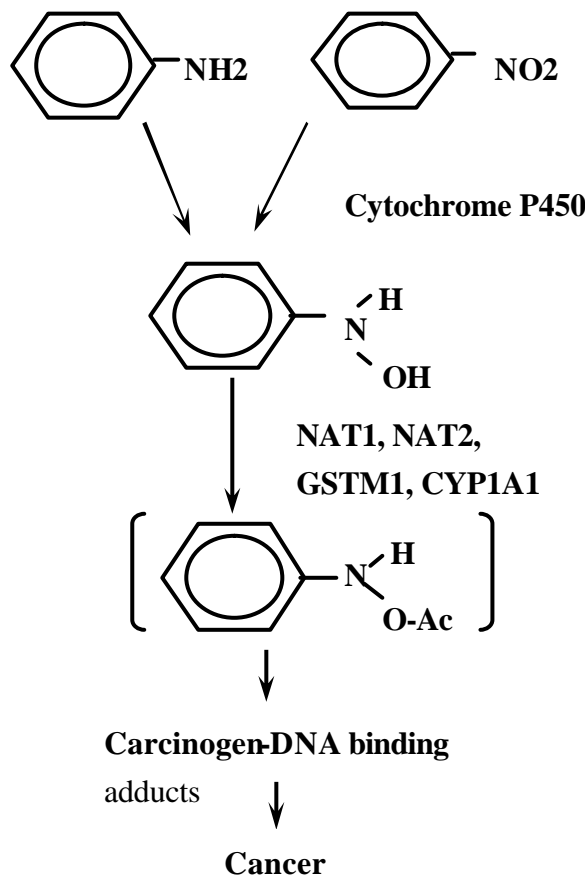


Figure 2. The carcinogenesis steps of chemical carcinogens

第二節 乙醯轉移酵素

乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase)簡稱 NAT。在許多不同物種都已被證實有乙醯轉移酵素的的存在，例如：哺乳類中的人、兔子、老鼠和豬等各組織中⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾，在兩棲類的青蛙，微生物中的白色念珠菌⁽⁴⁷⁾、沙門氏菌⁽⁴⁸⁾、大腸桿菌和胃幽門螺旋桿菌⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾均有。

在人類控制乙醯轉移酵素的基因位於 8p22 上，包含 *NAT1*、*NAT2* 和假基因 *NATP Locus* 的 genotypes^(51, 52)，此外，依乙醯轉移酵素對藥物(Dapsone、Isoniazid、Sulfamethazine)或 Caffeine 乙醯化的速度又可分為快速乙醯者(Fast acetylators)及慢速乙醯者(Slow acetylators)^(42, 52)。目前有研究報導指出，當人類快速已醯者暴露在化學致癌物時，較易罹患大腸直腸癌，慢速已醯者暴露在化學致癌物時，則較易罹患膀胱癌^(38,53)。*NAT1* 在許多組織中均有，包括肝臟、膀胱及大腸主要功能是參與 N-acetyltransferase 和 O-acetyltransferase 的活性，與快速乙醯有關。*NAT2* 的活性在肝臟及小腸組織中，與慢速乙醯有關⁽⁵²⁾。

在人類體內，乙醯轉移酵素分子量為 34 Kda，基本作用是代謝乙醯化外來的藥物及化合物，以及內生性的生化合成和去活性的功能⁽⁵⁴⁾，也是化學致癌物質代謝的第一道關卡，接著再由體內其他酵素(如：Cytochrome P450、Glutathione S-transferase)進一步代謝成具有活性之致癌物而導致標器官組織癌症的產生。而且目前已有許多研究報告指出，乙醯轉移酵素和芳香胺類化合物的致癌性有極大相關性，如果乙醯轉移酵素活性提高，同時又接觸芳香胺類化合物及抽煙，則會大大增加罹患癌症產生的機率^(38, 40, 41, 42, 43, 52, 55)。

第三節 胃癌

民國 89 年衛生署統計結果，在台灣胃癌居癌症死因的第四位，以全世界而言，日本胃癌的死亡率居第一位，其次為智利等中南美洲及東歐國家^(57, 58)。胃癌好發年齡以 50-70 居多，但是已經有年輕化的趨向。一般而言，胃癌的發生和幽門螺旋桿菌的感染、飲食習慣與社會經濟階層有關^(25, 44, 56)。根據統計資料顯示喜歡吃煙燻及鹽漬物者，胃癌的發生率較高，除此之外食物中的硝酸鹽(nitrates)，經腸道細菌還原成亞硝酸鹽(nitrites)，再形成亞硝酸胺(nitrosamine)，經動物實驗證實，亞硝酸胺為一致癌物，可引起胃癌，下列幾項因素與胃癌的形成也有關：
1. 遺傳，2. 萎縮性胃炎併腸上皮化生，3. 胃腺瘤性息肉，4. 曾經胃切除手術，5. 惡性貧血。一般胃癌是指胃腺細胞癌，另有胃平滑肌癌、胃惡性淋巴瘤、胃神經細胞瘤等，其中胃腺細胞癌佔 90%以上，胃惡性淋巴瘤佔 3-5%，胃平滑肌癌佔 1-3%。世界衛生組織將胃癌分成 Signet-ring cell, papillary, tubular, mucinous 及 undifferentiated。目前胃癌的治療以手術治療為主，化學治療的效果較不佳，而早期發現早期手術治療有 90%機率可以存活超過五年以上。

胃癌與飲食有極大關係，因此我們期望能從食物中找出對於胃癌有預防作用的成分，藉由多攝取此類食物而達到預防癌症，以減少胃癌的發生率。但是減少對含有致癌物的食品的攝取也是事先預防胃癌發生的根本方法。

第四節 胃癌與乙醯轉移酵素之關係

根據流行病學研究統計指出乙醯轉移酵素基因的多型性與癌症發展有相關包括尿道膀胱癌、大腸直腸癌、頭與頸部的癌症、乳癌、攝護腺癌及前列腺癌和肺癌等^(18, 30, 31, 42)。但是對於胃癌與乙醯轉移酵素之間的關聯性卻是了解不多，在 1995 年 Bell 等科學家發現 NAT*10 基因型可能與胃腺細胞癌有極大關聯性，由於帶有 NAT1*10 快乙醯化基因者具有較高 NAT 活性，而使罹患胃腺癌細胞危險性增加 2.1 倍⁽⁵⁹⁾。如果加上有胃幽門螺旋桿菌感染、吸煙或飲食不當則更增加罹患胃腺癌細胞危險性^(44, 60)。

第五節 Apigenin、17 α -estradiol 和 Flavone

Apigenin 和 Flavone 均屬於類黃鹼素類(Flavonoids)主要存在蔬菜水果^(26, 30, 31, 32, 61)，例如：芹菜、豆類、柑橘類水果及一些堅果類之中。此類成分毒性低且兼具有抗氧化作用⁽⁶²⁾，目前已經有許多研究報導指出此類成分也具有抗癌的效果，例如：大腸直腸癌、血癌、皮膚癌、乳癌和前列腺癌^(30, 31, 32, 33, 34, 35, 61,)，主要是引起癌細胞的細胞週期停止而造成細胞的凋亡使癌細胞增生受到抑制^(35, 61, 63)。也具有防癌的效果，因為 apigenin 可以抑制 TPA 調節的 Tumor promotion 而達到防止癌症的產生⁽⁶¹⁾。目前已經有將此類藥物的結構加以改過，使其穩定性增加後，已經應用在臨床上例如：Flavopiridol⁽³⁶⁾。

Estradiol 即是雌激素，為哺乳動物體內重要的性荷爾蒙之一，它具有刺激細胞 DNA 合成的作用是藉由刺激上皮生長因子(epidermal growth factor: EGF)⁽⁶⁴⁾。研究報導指出它可調節正常與癌症的乳房細胞增生與分化，主要活化調節細胞週期的蛋白質例如 G1 cyclins 及刺激細胞增生所需要的 proto-oncogene c-myc 的基因表現，因此它與乳癌形成有相關性。在抑制癌症方面，17 β -estradiol 可以抑制血癌⁽⁶⁵⁾、皮膚癌(melanoma)⁽⁶⁶⁾和乳癌，主要抑制細胞週期的進行及調節細胞週期的蛋白質例如：cyclin A 和 p27 或抑制 IL-8 的釋放，estradiol 具有雙面作用。而 17 α -estradiol 目前並無相關文獻指出它對胃癌細胞生長的影響及胃癌基因表現的影響，且其結構式又與 flavonoids 相似，因此本實驗選取 apigenin、17 α -estradiol 和 flavone 擬探討它們是否能對胃癌細胞乙醯轉移酶的活性、癌細胞生長和對胃癌細胞基因表現有影響，並進一步研究證明此三種藥物對胃癌細胞生長的機轉。

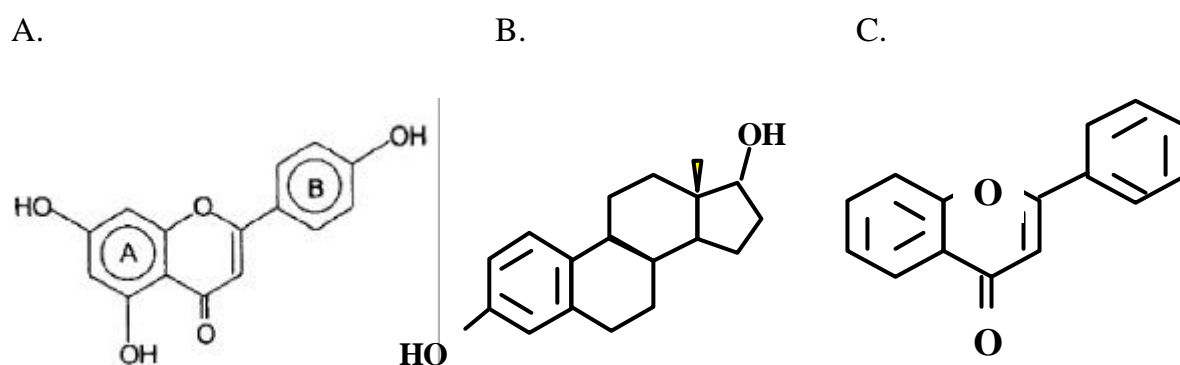


Figure 3. The structure of A. apigenin, B. estradiol, C. flavone

第六節 細胞週期與其相關酵素

細胞週期是連串有規律的步驟，使細胞成長而後分裂為兩個子細胞之過程。生物必須藉由此來完成繁衍或發育，細胞增殖受到生長因子的控制而涉及了生物體生長、再生、修復、死亡及癌症的發生，同時它與細胞分化成組織、器官及系統有關⁽⁶⁷⁾。細胞週期可分為四期：1. G1 期：G0 期是細胞週期的停止期，當細胞受到適當刺激即可誘導 G0 期進入 G1 期，是產生新的子細胞所必須經過的生長發育階段，在 G1 早期合成 RNA 結構蛋白和酶蛋白；G1 後期則合成胸苷激酶、脫氧核甘酸激酶等與 DNA 複製有關的蛋白質。S 期為 DNA 進行複製使 DNA 含量增加一倍的過程(2N 變 4N)，此期需要 6-8 小時。G2 期為 DNA 合成後至有絲分裂所必經的時期，因此必須合成與有絲分裂有關的蛋白以及組成紡錘體的微管蛋白(Microtubulin)，另外組成細胞膜的蛋白也在此期合成，此期需要 2-5 小時，DNA 的量仍為 4N。M 期為進行有絲分裂即核裂及細胞質分裂的階段⁽⁶⁸⁾。

細胞的分裂受極複雜的機制所控制，當其中重要調控因子發生突變而導致細胞週期調節失控變混亂，使細胞失去原來正常功能與生長方式最後產生癌症。調節細胞週期進行的蛋白主要分為兩種：Cyclin-dependent kinase (簡稱 CDK)及 Cyclins，再推動細胞週期進行時，CDK 與 Cyclins 必須結合形成複合物才具有功能，才能使細胞由 G1 期進入 S 期或由 G2 期進入 M 期。其中 Cyclin D (1, 2, 3) 結合 CDK4 及 CDK6 作用於 G1 中期至晚期之間，Cyclin E 與 CDK2 結合作用在 G1 晚期，Cyclin A 與 CDK2 結合作用在 S 至 G2 期，Cyclin A 及 cyclin B1 結合 CDK1 (cdc 2)作用在 G2 至 M 期，此外 Cyclin-CDK 複合物受兩組抑制劑調控，一是專一性抑制 Cyclin D-CDK4/6 的 P16、P15、P18、P19，二是可抑制許多種 Cyclin-CDK 複合物的 P21、P27、P59^(69, 70, 71)。(Figure 4)

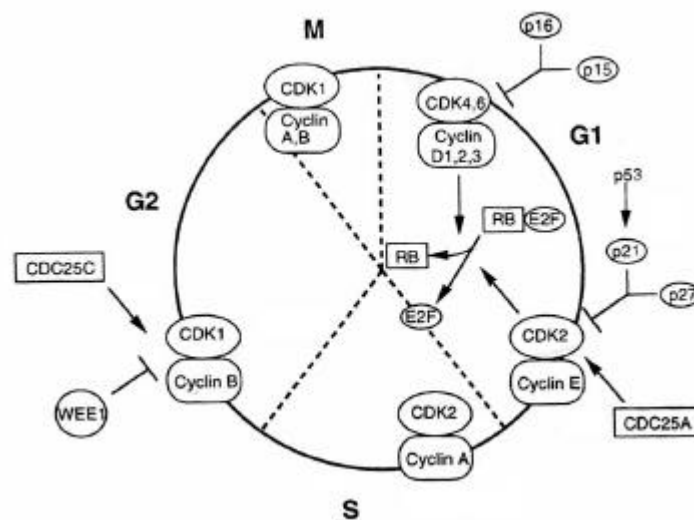


Figure 4. The pathway of cell cycle

第七節 細胞死亡

外來化學致癌物質在細胞中代謝成活性更強的致癌物後，會與 DNA 結合而可能造成細胞死亡。細胞死亡過程可分為兩種形式：

1. 細胞壞死(necrosis)：又稱為意外性死亡(accidental cell death)，因為細胞受到某些外界因素，如物理、化學或生物性損傷，透過細胞內粒腺體的感應器執行細胞死亡現象使細胞急速性死亡。細胞壞死的過程剛開始細胞膜通透性增加，外形變的不規則，細胞內有內質網擴張及染色質不規則移位現象，接著細胞核腫脹，溶小體破裂，最後細胞膜破裂，細胞內容物流出，細胞死亡。細胞壞死通常會伴隨發炎反應的發生。

2. 細胞凋亡(apoptosis)：又稱細胞計畫性死亡(normal or programmed cell death)，它是一種極特殊的、自然的細胞自殺過程，主要由多種遺傳基因在導控，如 pro-apoptotic gene：p53、Bax、Bad、Bak，anti-apoptotic gene：Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w 等，細胞會按照自身設定的程序進行，直到細胞被吞噬，目的在保持細胞或組織的恆定。細胞凋亡具有四個重要外在特徵：1. 細胞膜分割(shrinkage)，2. 染色體濃縮(condensation)，3. DNA 切段(fragmentation)，4. 凋亡小體(apoptotic body)的產生。它的特性是細胞膜不會破裂，細胞內容物不會流出，因此不會有發炎反應的產生。在細胞凋亡過程中，細胞內雙股 DNA 會被內切酶(Caspase)切斷，先形成約 300 bp 大小，再進一步裂解為約 185 bp 的核小體，最後形成凋亡小體，被吞噬細胞吞噬清除。而細胞凋亡在動物發育上有許多重要的功能，如形態改變、去掉不需要構造、控制細胞數目、去除不正常或失去功能或是有害的細胞以及產生分化細胞等。在偵測細胞死亡的實驗分析方法包括：1. 電泳分離技術：對凋亡細胞 DNA 的提取後，利用電泳分離技術，可以觀察到 DNA Ladders 梯狀圖譜，可了解 DNA 裂解程度。2. Annexin V：細胞凋亡過程中，細胞膜內的 Phosphatidylserine (PS)會移位到細胞膜外，Annexin V 是一種 Ca^{2+} dependent phospholipid-binding protein 對 PS 有高度親合力，因此可利用接有螢光的 Annexin V 偵測細胞凋亡存在與否。

第三章 材料與方法

第一節 實驗藥物

(一) 藥物

1. 17α -Estradiol、 Flavone、 Apigenin、 Propidium Iodide (PI) 、 Ethidium bromide、 Sodium azide、 Trypan blue、 Triton-X 100、 Mineral oil、 TEMED、 Sigmacoat、 Ammonium persulfate、 Tris-base、 Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma Chemical Co)
2. Dimethyl Sulfoxide(DMSO)、 BSA、 Ethanol、 Urea、 Acetonitrile、 Ethyl acetate、 KH_2PO_4 、 KCl、 Methanol、 NaCl、 Na_2HPO_4 (Merck Co)
3. 2-Aminofluorene (2-AF)、 2-acetylaminofluorene (2-AAF) (K and k Lab)
4. Agarose、 Acryl/ Bis (19:1)、 TBE (Amresco)
5. RNase A (CLONTECH)
6. RNeasy Mini KIT (Qiagen)
7. G-NOME DNA KIT (Bio101, Inc)
8. Complete Freund's adjuvant and Incomplete Freund's adjuvant PCR KIT (Gibco Laboratories)
9. Redivue[$\alpha^{35}\text{S}$]dATP AG1000 37MBq 1mCi (Amersham Pharmacia Biotech)
10. Anti-cyclin A、 B1、 E、 D1、 D2、 D3; anti-CDK1、 CDK2、 CDK6; FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (MDBio Inc.)
11. Trypsin (Gibco Laboratories)
12. PD 98059、 SB 203580 (Promega)

(二) 培養基

RPMI 1640、 Fetal bovine serum、 Penicilline /Streptomycine、 L-glutamine (Gibco Laboratories)

(三) 溶液配製

1. 1X PBS
8 g NaCl + 0.2 g KCl + 2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 0.2 g KH_2PO_4 加 D.D. Water 至 1000 ml
2. Medium
RPMI 1640 440 ml + FBS 50 ml + 10000 unit penicillin/ streptomycine 5 ml + L-glutamine 5 ml

3. Cell cycle stain reagent
1X PBS 550 μ l + 5 % Triton-X 100 200 μ l + 20 μ M PI 200 μ l + RNase A 50 μ l
4. TE buffer
10 mM Tris pH7.5 + 1 mM EDTA pH7.5
5. HPLC solvent
17 α -estradiol : 20 mM KH₂PO₄ + 100 % Acetonitrile (60 : 40)
Apigenin, flavone : 20 mM KH₂PO₄ + 100 % Acetonitrile 45 : 55)

(四) 儀器

- | | |
|--|-----------------------|
| 1. High performance liquid chromatography (HPLC) | (Beckman) |
| 2. Flow cytometry | (Becton Dickinson) |
| 3. Gene Amp PCR 2400 | (Perkin Elmer) |
| 4. RP 18 column | (Bischoff) |
| 5. Cell culture incubator | (Revco 3000 TVBA) |
| 6. Water bath | (TKS Zeta ZC-4000) |
| 7. 高速離心機 | (Hettich EBA 12R) |
| 8. 冷凍乾燥離心機 | (Labconco) |
| 9. 倒立式位像差顯微鏡 | (Nikon Ellipse TE300) |
| 10. 無菌操作台 | |
| 11. DNA 電泳槽 | (Mupid-2) |
| 12. BioMax Flim | (Kodak) |
| 13. 直立式 DNA 電泳槽 | (Gibco/BRL) |

(五) 細胞株

SC-M1 : Human stomach adenocarcinoma cell line

此細胞為貼附性之細胞株，來源為國家衛生研究院。

第二節 實驗方法

本研究將實驗分為三大部分，第一部分是分別檢測 apigenin、 17α -estradiol 及 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)生長的影響，包括檢測此三種藥物對人類胃癌細胞株的增生、細胞形態、DNA 細胞週期、cyclins 及 cyclin-dependent kinases (CDKs)的影響。第二部分，利用 differential display RT-PCR (DD RT-PCR)的方法檢測此三種藥物對胃癌細胞株基因表現影響的情形。第三部分主要檢測此三種藥物對人類胃癌細胞株的乙醯轉化? (N-acetyltransferase : NAT)活性的影響，包括藥物對胃癌細胞 SC-M1 將 2-AF 乙醯化形成 2-AAF 的影響及藥物對胃癌細胞株細胞內 NAT mRNA 量的表現。本實驗所使用的藥物以 100% DMSO 當作溶劑，配製 0.006、0.06、0.6、2、6、10、15、30 和 60 mM 等不同濃度。

第一部分 檢測 apigenin、 17α -estradiol 及 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)生長方面的影響

(一) 檢測 apigenin、 17α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株 SC-M1 細胞增生的影響

取 5×10^5 個細胞放入 12 well 培養皿中的每一 well，接著每一 well 放入 2 ml 細胞培養液，再移入 37 5% CO_2 培養箱中培養 over night，加入 20 μl 不同濃度藥物(apigenin : DMSO、0.006、0.06、0.6、2、6、10 和 15 mM。 17α -estradiol : DMSO、0.6、3、6、9 和 15 mM。flavone : DMSO、0.06、0.6、2、6、10、15 和 30 mM)，分別培養 6、12、18、24、36 和 48 小時後，收集離心，加 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ PI solution 500 μl ，接著利用流式細胞計數儀(Flow cytometer)計數存活的細胞數。

(二) 檢測 apigenin、 17α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞形態的影響

此法即是在檢測藥物對胃癌細胞株細胞膜的影響。取 5×10^5 個細胞放入 12 well 培養皿中的每一 well，接著每一 well 放入 2 ml 細胞培養液，再移入 37 5% CO_2 培養箱中培養 over night，加入 20 μl 不同濃度藥物(apigenin : 0.006、0.06、0.6、2、6、10 和 15 mM。 17α -estradiol : DMSO、0.6、3、6、9 和 15 mM。flavone : DMSO、0.06、0.6、2、6、10、15 和 30 mM)，分別培養 6、12、18、24、36 和 48 小時後，直接於光學顯微鏡下觀察細胞形態上改變並照相。

(三) 檢測 apigenin、17 α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞 DNA 的影響

利用電泳法來檢測藥物是否會使胃癌細胞株產生細胞凋亡的情形。取 $5-6 \times 10^6$ 個細胞放入 6 well 培養皿中的每一 well，加 RPMI 1640 細胞培養液使最終體積為 3 ml，移入 37 °C 5% CO₂ 培養箱中培養 over night，加入 30 μ l 不同濃度藥物(apigenin: DMSO、0.6、6、10、15 和 30 mM。17 α -estradiol : DMSO 0.6、3、6、10 和 15 mM。flavone: DMSO 0.6、6、10、15 和 30 mM)，分別培養 24 和 48 小時後收集離心並移除培養液，利用 DNA 抽取 KIT(G-NOME BIO101 Inc.)將 DNA 提取出來。首先將細胞收集放在 15 ml 離心管中並小心將 PBS 吸乾淨，接著加入 1.85 ml Cell Suspension Solution，左右搖晃使細胞完全均勻分散，加入 50 μ l RNase Mix.搖晃均勻，再加入 100 μ l Cell Lysis/ Denaturing Solution 搖晃均勻，放入 55 °C 水浴鍋中 15 分鐘，取出加入 25 μ l Protease Mix.搖晃均勻，再放入 55 °C 水浴鍋中 90 分鐘，加入 500 μ l Salt-Out Mixture 小心混合均勻並將檢體分裝到 1.5 ml 離心管中，放入 4 °C 冰箱 10 分鐘，接著離心 12000 rpm 10 分鐘後小心吸取上清液放入 15 ml 離心管中，加入 2 ml TE buffer 混合均勻，接著緩慢加入 8 ml 100 % 酒精，小心緩慢混合均勻，接著離心 1500 rpm 15 分鐘，將上清液倒掉並利用乾燥方式把酒精去除，倒立放在室溫下並放置過夜，最後加入適量 TE bufer 將 DNA 溶解。取出固定量 DNA 以 6 : 1 比例與 DNA Loading dye 混合，接著用電壓 100 mV, 1.5 % 瓊脂凝膠(Agarose)跑電泳，以 Eithidium bromide 染色，最後放入 UV 燈下檢查並照相。

(四) 檢測 apigenin、estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞週期 (Cell cycle)的影響

取 5×10^5 個細胞放入 6 well 培養皿中的每一 well，接著每一 well 放入 2 ml 細胞培養液，再移入 37 °C 5% CO₂ 培養箱中培養 over night，加入 20 μ l 不同濃度藥物(apigenin: DMSO、0.006、0.06、0.6、6、15、30 和 60 mM。17 α -estradiol : DMSO、0.006、0.06、0.6、6、15、30 和 60 mM。flavone : DMSO、0.06、0.6、2、6、10 mM、15 和 30 mM)，分別培養 6、12、18、24、36 和 48 小時後收集離心，除去培養基，將細胞拍散並加入 3 ml PBS 再次離心，除去 PBS 後，將細胞拍散緩慢加入冰浴過的 70%酒精置於-20 °C 冰箱中隔夜，取出細胞離心後以 PBS 清洗去除酒精，加入 500 μ l cell cycle stain reagent 並置於室溫下避光反應 30 分鐘，再以流式細胞儀(Flow cytometor)分析細胞週期 G₀/G₁、S、G₂/M 期 DNA 的量。

(五) 檢測 apigenin、17 α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞內細胞週期素(Cyclin)的影響

取 1×10^6 個細胞放入 6 well 培養皿中的每一 well，接著每一 well 放入 2 ml 細胞培養液，再移入 37 \pm 5% CO₂ 培養箱中培養 over night，加入 20 μ l 不同濃度藥物(apigenin : DMSO、0.006、0.06、0.6、6、15、30 和 60 mM。17 α -estradiol : DMSO、0.006、0.06、0.6、6、15、30 和 60 mM。flavone : DMSO、0.06、0.6、2、6、10 mM、15 和 30 mM)，培養 24 小時後收集離心，除去培養基，將細胞拍散並加入 100 μ l PBS，再把細胞移入 96 well 培養皿中，離心 1500 rpm，4，4 分鐘，小心倒掉上清液，加入 100 μ l 1% formaldehyde 並置於冰上反應 5 分鐘後，再加入 100 μ l 99% methanol 放置於冰上反應 30 分鐘，離心去除 formaldehyde 及 methanol 並用含 0.1% BSA 的 PBS 離心於 1500 rpm 5 分鐘清洗 2 次後，加入 100 μ l 含 0.1% Triton X-100 及 0.1% Sodium citrate 的 PBS 在冰上反應 45 分鐘，離心並以含 0.1% BSA 的 PBS 離心於 1500 rpm 5 分鐘清洗 2 次後，加入 50 μ l anti-cyclin 及 anti-CDK 單株抗體並於室溫下反應 2.5 小時，離心並以含 0.1% BSA 的 PBS 清洗 2 次後，加入 50 μ l 二次抗體(FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody)並於室溫下避光反應 30 分鐘，離心並以含 0.1% BSA 的 PBS 離心於 1500 rpm 5 分鐘清洗 2 次後，加入 100 μ l 含 0.1% BSA 的 PBS 接著用流式細胞儀(Flow Cytometer)分析細胞內 cyclins 及 CDKs 的變化。此實驗用抗體均用含 0.1% FBS 及 0.1% Sodium azide 的 PBS 稀釋。

(六) 檢測 apigenin、17 α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞內細胞週期素(Cyclin)基因表現的影響

此實驗主要利用 RT-PCR 方法偵測 apigenin、17 α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株細胞內調節細胞週期的相關酵素基因表現的影響。

(1) 反轉錄酵素(Reverse Transcriptase)反應

取 5×10^6 細胞培養在 6 well 培養皿中的每一 well，加入細胞培養液使總體積為 3 ml，再移入 37 \pm 5% CO₂ 培養箱中培養 over night，加入 30 μ l 不同濃度藥物(apigenin : DMSO、0.06、0.6、6、15 和 30 mM。17 α -estradiol : DMSO、0.6、3、6、10 和 15 mM。flavone : DMSO、0.6、6、10、15 和 30 mM)，經 24 小時培養後收集離心，以 RNA kit 抽出細胞全部 RNA，接著於 260 nm 下測吸光值(OD 值)(假使 OD 值= 1 則 RNA= 40 ng/ μ l)，每一個檢體均取 1500 ng RNA 置於 200 μ l PCR 反應管中，加入 RNA free water 使最終體積為 11.5 μ l，再加入 1 μ l oligo(dT)(0.5 μ g/ μ l)，接著置於 70 下反應 10 分鐘後迅速置於冰上 2 分鐘並 spin

down, 再加入 7.5 μ l reaction solution (2 μ l 100 mM DTT + 1 μ l 10 mM dNTP + 0.5 μ l Reverse transcriptase + 4 μ l 5X buffer), 混合均勻並 spin down 後置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 1 小時。反應後可得 75 ng/ μ l cDNA, 加入 40 μ l 滅菌過的二次水使 cDNA 最終濃度為 25 μ g/ μ l, 保存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

(2) 聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)

取 2 μ l cDNA (50 ng cDNA)加入 23 μ l PCR reaction solution (18.05 μ l d.d.water + 2.5 μ l 10X buffer + 0.75 μ l 50 mM MgCl₂ + 0.5 μ l 10 mM dNTP + 0.5 μ l forward primer + 0.5 μ l reward prmer + 0.2 μ l Taq DNA polymerase) 經混合後 spin down, 進行聚合酵素連鎖反應(PCR)。先預熱 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘, 再進行 35 個循環期: 95 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 55 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 結束後再於 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘, 最後反應終止於 4 $^{\circ}$ C。加入 5 μ l DNA loading dye 混合且 spin down 後, 取 10 μ l sample 跑 1.5% agarose gel, 然後利用 Ethidium bromide 染色約 10 分鐘, 於 UV 光下觀察並照相。

Table 1. The PCR primers were used in this study.

Primers	Sequence 5'-3'	Size (bp)	References
Act-b1	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'	21	72
Act-b2	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	25	72
Cyclin D1	5'-GAGACCATCCCCCTGACGGC-3'	18	
	5'-TCTTCCTCCTCCTCGGCGGC-3'	19	
Cyclin D3	5'-CTGGCCATGAACTACCTGGA-3'	20	
	5'-CCAGGAAATCATGTGCAATC-3'	20	
Cyclin B1	5'-AAGGCGAAGATCAACATGGC-3'	20	73
	5'-AGTCACCAATTTCTGGAGGG-3'	20	
Cyclin E	5'-GTTGCACCAGTTTGCATGTG-3'	22	
	5'-GGCCCTCCACAGCTTCAAGC-3'	20	
CDK2	5'-GCTTTCTGCCATTCTCATCG-3'	20	
	5'-GTCCCCAGAGTCCGAAAGAT-3'	20	
p16	5'-AGCATGGAGCCTTCGGCTGACT-3'	22	74
	5'-CTGTAGGACCTTCGGTACTGAT-3'	23	
p21	5'-AGTGGACAGCGAGCAGCTGA-3'	20	74
	5'-TAGAAATCTGTCATGCTGGTCTG-3'	23	
p27	5'-AAACGTGCGAGTGTCTAACGGGA-3'	23	74
	5'-CGCTTCCTTATTCCTGCGCATTG-3'	23	
p53	5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC-3'	26	75
	5'-CTATGTCGAAAAGTGTTTCTGTCATC-3'	26	

第二部分 檢測 apigenin、17 α -estradiol 及 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)基因表現的影響

此實驗主要利用 DD RT-PCR 方法來偵測 apigenin、17 α -estradiol 及 flavone 這三種藥物對胃癌細胞株基因表現的影響並觀察未加藥物與加藥物培養 24 小時之後基因表現是否有受到影響，藉由此實驗結果去推論藥物影響細胞死亡訊號傳遞路徑(Signal transduction pathway)。

(1) 反轉錄酵素(Reverse Transcriptase)反應

取 5×10^6 細胞培養在 6 well 培養皿中的每一 well，加入細胞培養液使總體積為 3 ml，再移入 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養箱中培養 over night，加入 30 μ l 不同濃度藥物(apigenin:DMSO 0.6 mM、6 mM, 17 α -estradiol:DMSO 0.6 mM、6 mM, flavone : DMSO、0.6 mM、6 mM)，經 24 小時培養後收集離心，以 RNA kit 抽出細胞全部 RNA，接著於 260 nm 下測吸光值(OD 值)(假使 OD 值 = 1 則 RNA = 40 ng/ μ l)，將 RNA 稀釋使為 0.1 μ g/ μ l 並將 RNA 分成三組(T₁₁A、T₁₁C、T₁₁G)(Table 2.)，每一組各取 3 μ l 後分別再加入 14.85 μ l RNA free water，接著第一組加入 3 μ l、2 μ M H-T11A，第二組加入 3 μ l、2 μ M H-T11C，第三組加入 3 μ l、2 μ M H-T11G，混合均勻且 spin down 後在 70 $^{\circ}$ C 下反應 10 分鐘，取出立即放入冰上靜置 1 分鐘以上，接著取出 spin down 每一管均加入 9.15 μ l reaction solution (6 μ l 5X buffer (M-MLV RT 5X buffer) + 2.4 μ l 250 μ M dNTP + 0.75 μ l MMLV RT)，混合均勻並 spin down，在 37 $^{\circ}$ C 下反應 1 小時後 75 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘將酵素去活性，最後終止反應於 4 $^{\circ}$ C。

Table2. The primers of H-T11A、H-T11C and H-T11G

1. H-T11A	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'
2. H-T11C	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'
3. H-T11G	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'

(2) 聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)

配製 PCR reaction solution (d.d. H₂O 5 μ l + 1 μ l 10X buffer + 0.8 μ l 25 μ M dNTP + 1 μ l 2 μ M H-AP primer (Table 3.) + 1 μ l H-T₁₁A(H-T₁₁C、H-T₁₁G) + 0.1 μ l [α ³⁵S]dATP + 0.1 μ l Taq DNA polymerase)分裝成每一管為 9 μ l，加入 1 μ l 的 RT 產物的 cDNA 使最終體積為 10 μ l，每一管均滴入 1 滴礦物油(Mineral oil)，混合均勻並 spin down 後放入 PCR 機器中反應，進行 40 cycles：94 $^{\circ}$ C 30sec，40 $^{\circ}$ C 2 min，72 $^{\circ}$ C 30sec，結束後 72 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，最後終止反應於 4 $^{\circ}$ C。PCR 反應結束後將產物取出加入 2 μ l Stop solution (98% deionized formamide + 10mM EDTA (pH 8.0) + 0.025% Xylene cyanol + 0.025%

Bromophenol blue), 混合均勻並 spin down 後放入 0 °C 冰箱保存。

Table 3. The DD RT-PCR primers were used in this study.

	Number of primers	Primers sequence
1.	H-AP9	5'-AAGCTTCATTCCG-3'
2.	H-AP10	5'-AAGCTTCCACGTA-3'
3.	H-AP11	5'-AAGCTTCGGGTAA-3'
4.	H-AP12	5'-AAGCTTGAGTGCT-3'
5.	H-AP13	5'-AAGCTTCGGCATA-3'
6.	H-AP14	5'-AAGCTTGGAGCTT-3'
7.	H-AP15	5'-AAGCTTACGCAAC-3'
8.	H-AP16	5'-AAGCTTTAGAGCG-3'
9.	H-AP73	5'-AAGCTTAGTTATC-3'
10.	H-AP74	5'-AAGCTTCAAGTTT-3'
11.	H-AP75	5'-AAGCTTTTATTCG-3'
12.	H-AP76	5'-AAGCTTGTTATAG-3'
13.	H-AP77	5'-AAGCTTTGAATTC-3'
14.	H-AP78	5'-AAGCTTAAATCGA-3'
15.	H-AP79	5'-AAGCTTGTCTAAA-3'
16.	H-AP80	5'-AAGCTTCTATTTC-3'

(3) 製備 6% Acrylamide/ urea 電泳膠

(I) 製備 6% Acrylamide/ urea solution :

取 40% Acrylamide solution (Tris : Bis = 19 : 1) 60 ml 加入 168 g urea 及 80 ml 5X TBE buffer 最後加入二次水至總體積為 400 ml, 放入磁石混合均勻, 以濾紙 (0.45- μ pore size) 過濾, 最後放入冰箱保存備用。

(II) 電泳膠製備 :

取 80 ml Acrylamide/ urea solution 加入 0.8 ml 10% Ammonium persulfate 混合均勻, 再加入 20 μ l TERMD 混合均勻, 迅速倒入由兩片玻璃所組合而成的灌膠槽中(如 Figure 5.所示), 再插入鋸齒狀的 Cone 夾上夾子, 蓋上保鮮膜, 放置隔夜等待膠凝固。切記在灌膠過程中膠不能有氣泡的產生, 否則會影響跑膠結果造成 Band 扭曲而不平整。

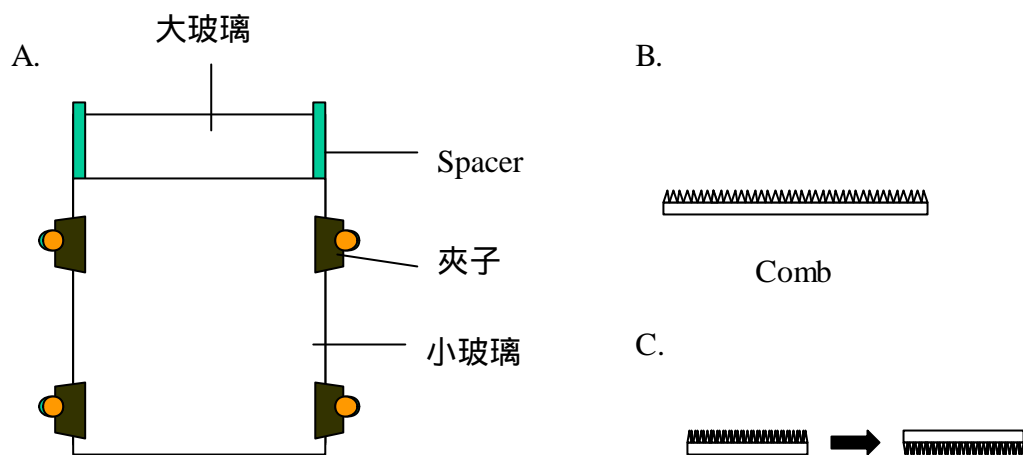


Figure 5. 電泳膠配置裝置示意圖

(4) 跑膠與壓片

將 Acrylamid/ urea Gel 拿至放射線實驗室並撕下下端膠帶，把 Acrylamide/ urea Gel 垂直立於電泳槽中且將玻璃夾緊，上層倒入 0.5X TBE buffer，下層倒入 1X TBE buffer，而 buffer 必須蓋過膠，接著將 Cone 拔出後，用滴管沖一沖與 buffer 接觸的膠面，插上電極，用 1100 voltage 電壓預跑 30 分鐘，關掉電極，將 comb 倒插入槽中(如 Figure 5. (C))，取 3 μ l sample loading 入孔中，將電壓調至 1900 voltage 插入電極，每隔 5 至 10 分鐘觀察跑膠的溫度，不可使溫度超過 55 $^{\circ}$ C，跑至第二條 dye 距下端 3 公分處即可將電極關閉關掉，取下玻璃並小心撬開，放上一張 Paper 將膠黏附於紙上後，放到乾燥膠的機器上使膠乾燥，拿至暗房中以 X 光片進行壓片，放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存至隔夜沖片觀看結果，接著再壓一次片放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存 3-5 天後再沖片，而此張 X 光片作為結果保存用。

(5) Reamplification of cDNA probes

先將第一片 X 光片上有差異的 band 用針頭扎洞，接著將 Acrylamide/ urea Gel 與 X 光片對齊，依 X 光片上差異的 band 的位置用針頭在膠上扎洞以確認 band 位置，用手術刀取下寬約 1 mm 的膠，而切下的膠即是 cDNA probe。

將取下的 cDNA probes 放入 200 μ l PCR tube 中，加入 100 μ l 二次水後放置於室溫下 10 分鐘，在 95 $^{\circ}$ C 下反應 15 分鐘，離心 12000 rpm 2 分鐘，取上清液加入 Salt-out solution (450 μ l 100% iced ethanol + 10 μ l 3M Sodium acetate + 5 μ l 10 mM Glycogen) 混合均勻後，放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱反應 30 分鐘，離心 12000 rpm 10 分鐘，注意觀察有沒有 DNA pellet，小心去除上清液，加入 200 μ l 70% iced ethanol，離心 12000 rpm 約 2 分鐘，將上清液完全去除乾淨，加入 10 μ l 滅菌的二次水。

取 2.5 μ l cDNA 加入 47.5 μ l PCR reaction solution (28 μ l d.d. water + 5 μ l 10X Ex buffer + 4 μ l 250 μ M dNTP + 5 μ l H-T11A (or H-T11C or H-T11G) + 5 μ l H-AP primer + 0.5 μ l Ex Taq DNA polymerase) 經混合後 spin down, 進行聚合酶連鎖反應 (PCR)。進行 40 個循環期：首先於 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 接著於 50 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 在設於 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 結束後再於 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘, 最後反應終止於 4 $^{\circ}$ C。

取出 5 μ l Reamplificated cDNA 加入 1 μ l DNA loading dye 混合且 spin down 後, 跑 1.5% agarose gel, ethidium bromide 染色, 於 UV 光下觀察並照相。

取出 30 μ l Reamplificated cDNA 放入 1.5 ml 離心管中, 標明清楚 Template 名稱, 再取每一個檢體約 1-2 μ l 20 μ M primer 一起送至明欣生物科技公司作 DNA 定序。

(6) 將已經被定序出的檢體利用 NCBI 網站進行 DNA 比對工作, 比對是否有無相同 DNA 序列, 比對結果作為實驗設計參考用。

(7) 利用 RT-PCR 檢測不同濃度 17 α -estradiol 作用 24 小時後, oncostatin M receptor 及 ATP synthase 6 mRNA 量是否隨著 17 α -estradiol 濃度增加而表現受到影響, 再次證明 DD RT-PCR 實驗之結果。本實驗方法與檢測細胞內 Cyclins/ CDKs 基因表現的影響之實驗方法相同, 所使用的 Primer 如 Table 4. 中所列。

Table 4. The PCR primers of β -actin, OSMR and ATP synthase

Primers	Sequence 5'-3'	Size (bp)	Ref.
Act-b1	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'	21	72
Act-b2	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	25	
F2-ATP synthase 6	5'-CCATACACAACACTAAAGGACGAACC-3'	26	
R2-ATP synthase 6	5'-TGGCCTGCAGTAATGTTAGCG-3'	21	
F3-OSMR	5'-TAAAGTTTCCACCAATTCTACGCG-3'	24	
R3-OSMR	5'-CACAGTCTGTGAAACAAAGACACGTT-3'	26	

(8) 將經由 DD RT-PCR 實驗所得到的結果, 檢測 17 α -estradiol 是否經由 Oncostatin M receptor 所影響的下游 MAPK pathway 而導致人類胃癌細胞死亡。因此先加入 MAPK 抑制劑 pretreatment 3 小時後, 再分成幾組實驗組：1. Control (DMSO), 2. 60 μ M 17 α -estradiol, 3. 100 μ M 17 α -estradiol, 4. 10 μ M

SB203580 5. 10 μ M SB203580+60 μ M 17 α -estradiol 6. 10 μ M SB203580+100 μ M 17 α -estradiol、 7. 20 μ M PD98059、 8. 20 μ M PD98059+60 μ M 17 α -estradiol、 9. 20 μ M PD98059+100 μ M 17 α -estradiol，培養 24 小時，將細胞收集離心，加 4 μ g / μ l PI solution 500 μ l，接著利用流式細胞計數儀(Flow cytometer)計數存活的細胞數。

(9) 加入 MAPK inhibitors pretreatment 3 小時後，再加入 60 μ M 17 α -estradiol，檢測 17 α -estradiol 誘導人類胃癌細胞的細胞凋亡是否受到抑制，進而證明 17 α - estradiol 經由 MAPK 訊息傳導路徑而影響人類胃癌細胞的死亡。本實驗方法與檢測 apigenin 17 α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株 (SC-M1)細胞 DNA 的影響方法相同，主要實驗分成 1. Control (DMSO)、 2. 60 μ M 17 α -estradiol、 3. 10 μ M SB203580、 4. 10 μ M SB203580+60 μ M 17 α -estradiol、 5. 20 μ M PD98059、 6. 20 μ M PD98059+60 μ M 17 α -estradiol 等六組。

第三部分 檢測 apigenin、 estradiol 及 flavone 對人類胃癌細胞株的乙醯轉化酵素 (N-acetyltransferase, NAT)活性及基因表現的影響

(1) 檢測 apigenin、 estradiol 及 flavone 對人類胃癌細胞株將 2-AF 乙醯化成 2-AAF 的影響

取 5×10^5 細胞，將細胞培養於 24 well 培養皿中的每一 well 並加入 1 ml 培養液培養至隔夜，每一 well 先加入 10 μ l 6.75 mM 2-AF 後接著加入 10 μ l 不同濃度的藥物(apigenin : DMSO、 0.006、 0.06、 0.6、 6、 15、 30、 60 mM。 17 α -estradiol : DMSO、 0.006、 0.06、 0.6、 6、 15、 30、 60mM。 flavone : DMSO、 0.006、 0.06、 0.6、 6、 15、 30、 60mM)，再移入 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培養箱中，分別培養 6、 12、 18、 24、 36 和 48 小時後收集上層的細胞培養液，分別加入 2 ml 萃取液(Ethyl acetate : Methanol = 95 : 5)混合均勻後靜置，離心收集有機溶媒層並以冷凍乾燥機乾燥，加入 50 μ l Methanol，取出 20 μ l 利用高效液相層析儀(High performance liquid chromatography ; HPLC) 分析 2-AF 代謝產物的量，然後利用已知標準濃度的 2-AF 和 2-AAF 而換算出實驗組的 2-AF 及 2-AAF 的量。

(2) 檢測 apigenin 17 α -estradiol 及 flavone 對人類胃癌細胞株中乙醯轉化酵素 (NAT)基因的表現

此實驗主要利用 RT-PCR 方法偵測 apigenin、 17 α -estradiol 和 flavone 對人類胃癌細胞株細胞內乙醯轉化酵素基因表現的影響。

本實驗方法與檢測細胞內 Cyclins/ CDKs 基因表現的影響之實驗方法相同，所使用的 Primer 如 Table 4.中所列。

Table 4. The PCR primers of β -actin and NAT1

Primers	Sequence 5'-3'	Size (bp)	Ref.
Act-b1	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'	21	72
Act-b2	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	25	
B-MDIEA-NAT1	5'-CACCCGGATCCCGGGATCATGGACATTGAAGC-3'	31	75
VPKHGD-X-NAT1	5'-GGT CCT CGAGTCAATCACCATGTTTGGGCAC-3'	31	

第四章 結果

第一節 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞生長方面的影響

(一) 檢測 apigenin 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞生長方面的影響

(1) 檢測 apigenin 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞增生的影響

我們發現給予 apigenin 經不同時間培養之後，在 6 小時藥物對胃癌細胞作用並不明顯，於 150 μM apigenin 細胞存活率仍然達 83% 左右，在 12 小時開始細胞生長的抑制，隨著藥物濃度的增加而抑制越明顯且當時間增長則細胞存活率越來越低，因此我們從這個結果可以發現 apigenin 確實對胃癌細胞的增生方面有很明顯的抑制。如 Figure 6。

(2) 檢測 apigenin 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞形態的影響

由實驗結果 Figure 7. 至 Figure 12. 發現當 apigenin (60、100、150 μM) 濃度增加，SC-M1 細胞的細胞膜漸漸漲大而且懸浮在細胞培養液的細胞也增加，經 24、36 和 48 小時之後更可清楚看見細胞碎片，從照片中可以觀察到經高濃度的 apigenin (100、150 μM) 作用的 SC-M1 細胞都已經平平貼在培養皿，細胞膜不像控制組細胞膜平滑有立體感。

(3) 檢測 apigenin 對胃癌細胞株(SC-M1) DNA 的影響

由細胞存活率及形態學上我們發現 apigenin 對胃癌細胞確實都有很明顯的影響，因此我們利用電泳法去觀察 apigenin 對胃癌細胞 DNA 造成何種影響，由實驗結果 Figure 13. 發現將細胞加 apigenin 分別培養 24 和 48 小時後，在 24 小時，6 μM 已觀察到細胞 DNA 斷裂，在 48 小時則沒有觀察到有 DNA Ladders 的產生，因此 apigenin 對 SC-M1 細胞造成凋亡(apoptosis) 在 24 小時較明顯，所以可以推論胃癌細胞在 apigenin 24 和 48 小時作用之後分別造成的細胞死亡是使 SC-M1 細胞 DNA 產生斷裂造成細胞的凋亡及可能造成細胞壞死。

(4) 檢測 apigenin 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞週期的影響

我們由實驗結果 Figure 14. 觀察到 apigenin (60、150、300、600 μM) 可使 SC-M1 細胞週期停止在 G2/M 期，隨著藥物濃度的增加停止於 G2/M 期細胞漸增。而且隨著藥物作用時間增長 apigenin 在 36、48 小時作用後，SC-M1 細胞停止在 G2/M 期更明顯增加，相對 G0/G1 期的細胞則是減少。而 G2/M 停止現象從 18 和 24 小時作用已初步觀察到，因為在 18 和 24 小時已經可以發

現隨著 apigenin 藥物濃度增加，停在 G0/G1 期的 SC-M1 細胞已經漸漸減少，相對的 S 和 G2/M 期則是漸漸上升，最後在 36 及 48 小時，細胞週期停留在 G2/M 期。

(5) 檢測 apigenin 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞週期素(Cyclins)的影響

由細胞週期的結果已經發現在 36 和 48 小時 apigenin 可使 SC-M1 細胞的細胞週期停止於 G2/M 期，而在 24 小時 apigenin 作用，SC-M1 細胞週期同時發現 S 期 G2/M 期都有增加。利用 Flow cytometry 分析偵測 SC-M1 細胞內 Cyclins 和 CDKs 的結果 Figure 15.，經 24 小時 apigenin 作用後發現調控 G2/M 期的 Cyclin B1 和 CDK1 從 60 μ M 開始隨著 apigenin 濃度增加很明顯受到抑制。對於調節細胞週期由 S 期進入 G2/M 期的 cyclin E 沒有很大影響，但是 CDK2 則是隨著 apigenin 濃度增加一樣明顯受到抑制。

經 24 小時 apigenin 作用後，SC-M1 細胞內 p53 也隨著濃度增加而被抑制，控制組 82.11 ± 0.08 ，實驗組分別為 0.06 μ M : 82.88 ± 1.40 、0.6 μ M : 81.18 ± 3.17 、6 μ M : 80.03 ± 3.92 、60 μ M : 66.77 ± 2.75 、150 μ M : 61.02 ± 2.75 、300 μ M : 47.00 ± 1.96 、600 μ M : 30.45 ± 1.50 ，此結果可由統計 Figure 16 顯示。

(6) 檢測 apigenin 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞內細胞週期素(Cyclins)基因表現的影響

經 24 小時作用後發現 SC-M1 細胞內調節細胞週期 G2/M 期的 cyclin B1 的 mRNA 的量隨著濃度增加而漸漸被抑制(Figure 17.)，調節細胞進入 G0/G1 期的 cyclin D1 mRNA 的量也受到抑制使細胞無法進入 G0/G1 期(Figure 18.)，而 CDK2 mRNA 的量則是沒有很大的影響(Figure 19.)。對於 cyclin-dependent kinase inhibitor 包括 p21 (Figure 20.)和 p53 (Figure 21.)方面，p53 mRNA 的量很明顯受到 apigenin 的抑制而 p21 mRNA 的量則是漸漸增加。

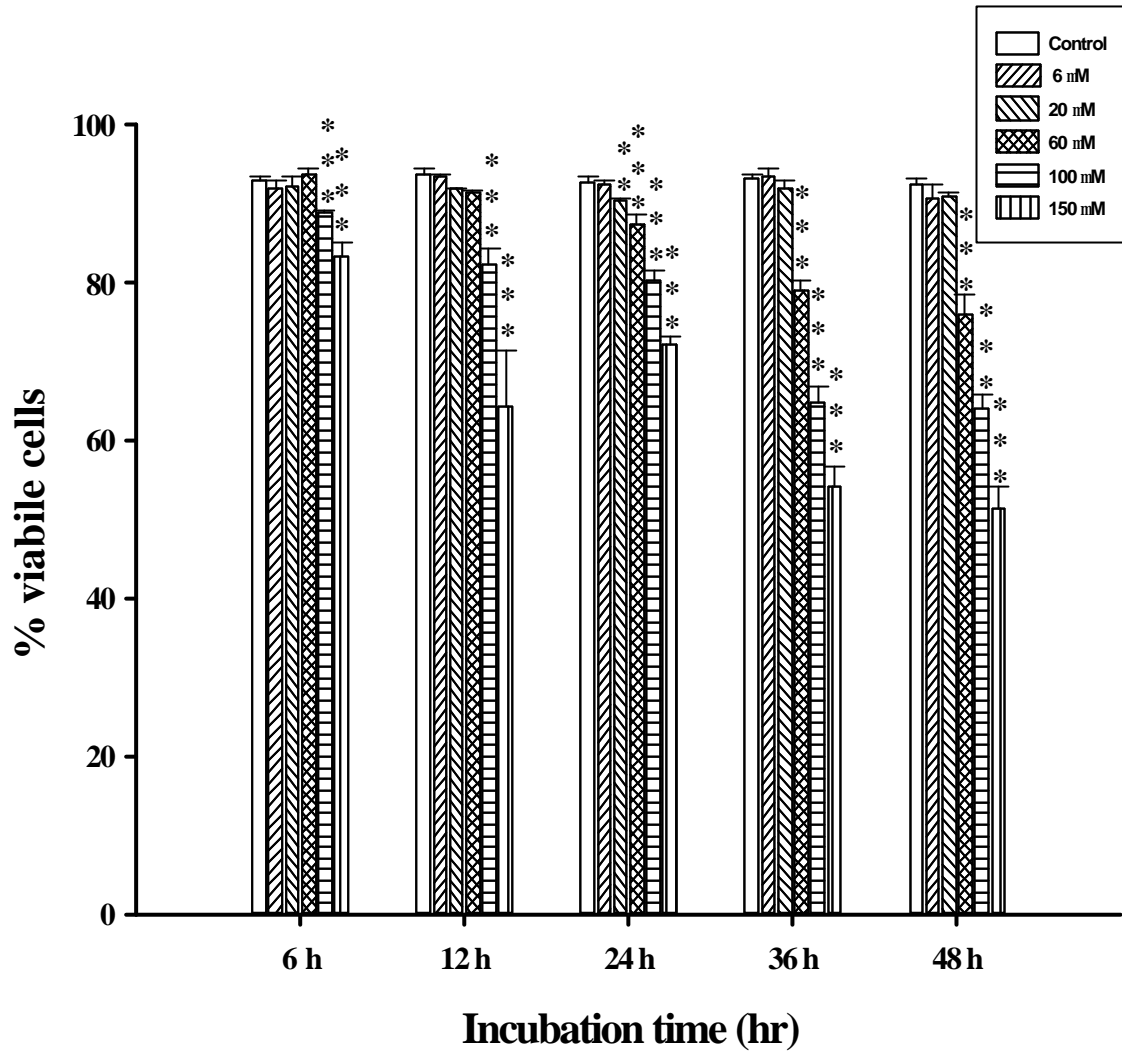


Figure 6. Percentage of viable SC-M1 cells after cotreatment with different doses of apigenin for 6, 12, 24, 36 and 48 hrs incubation. After the treatment of various concentrations of apigenin, cells were harvested PI stain solution and assayed for % viable cells by FACS analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean± SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

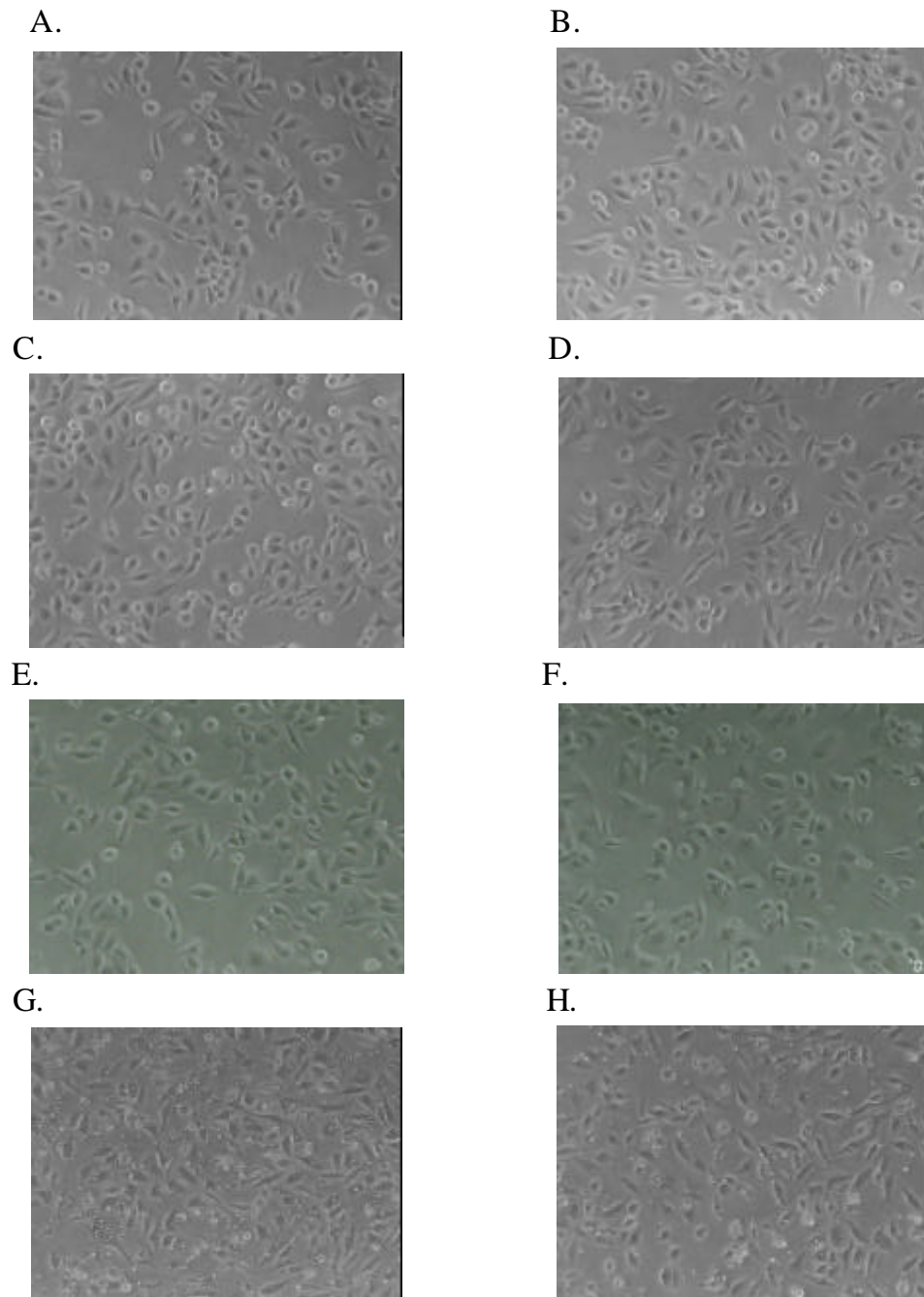


Figure 7. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to the different doses of apigenin for 6 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.06 μ M, C : 0.6 μ M, D : 6 μ M, E : 20 μ M, F : 60 μ M, G : 100 μ M, H : 150 μ M.

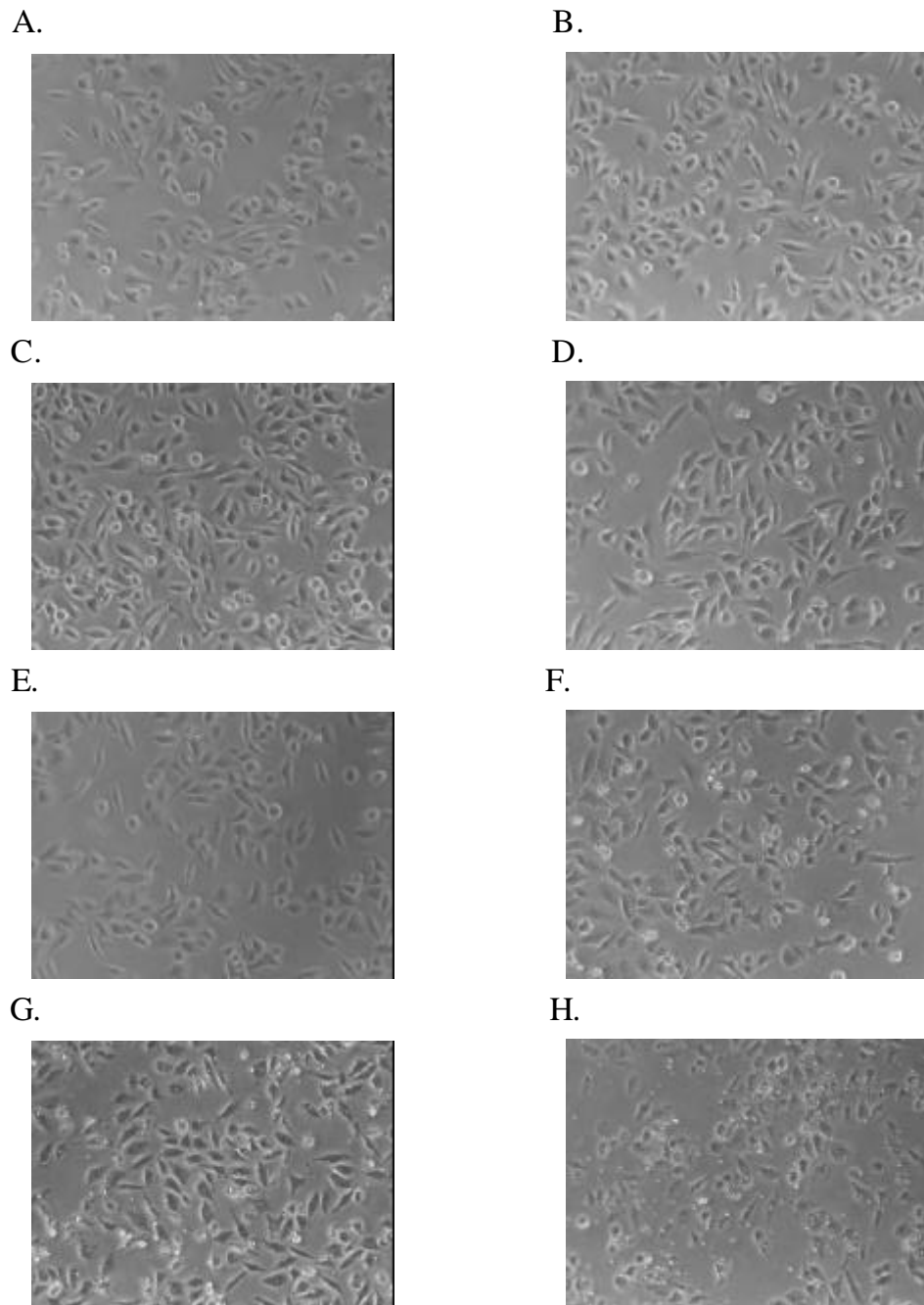


Figure 8. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to the different doses of apigenin for 12 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.06 μ M, C : 0.6 μ M, D : 6 μ M, E : 20 μ M, F : 60 μ M, G : 100 μ M, H : 150 μ M.

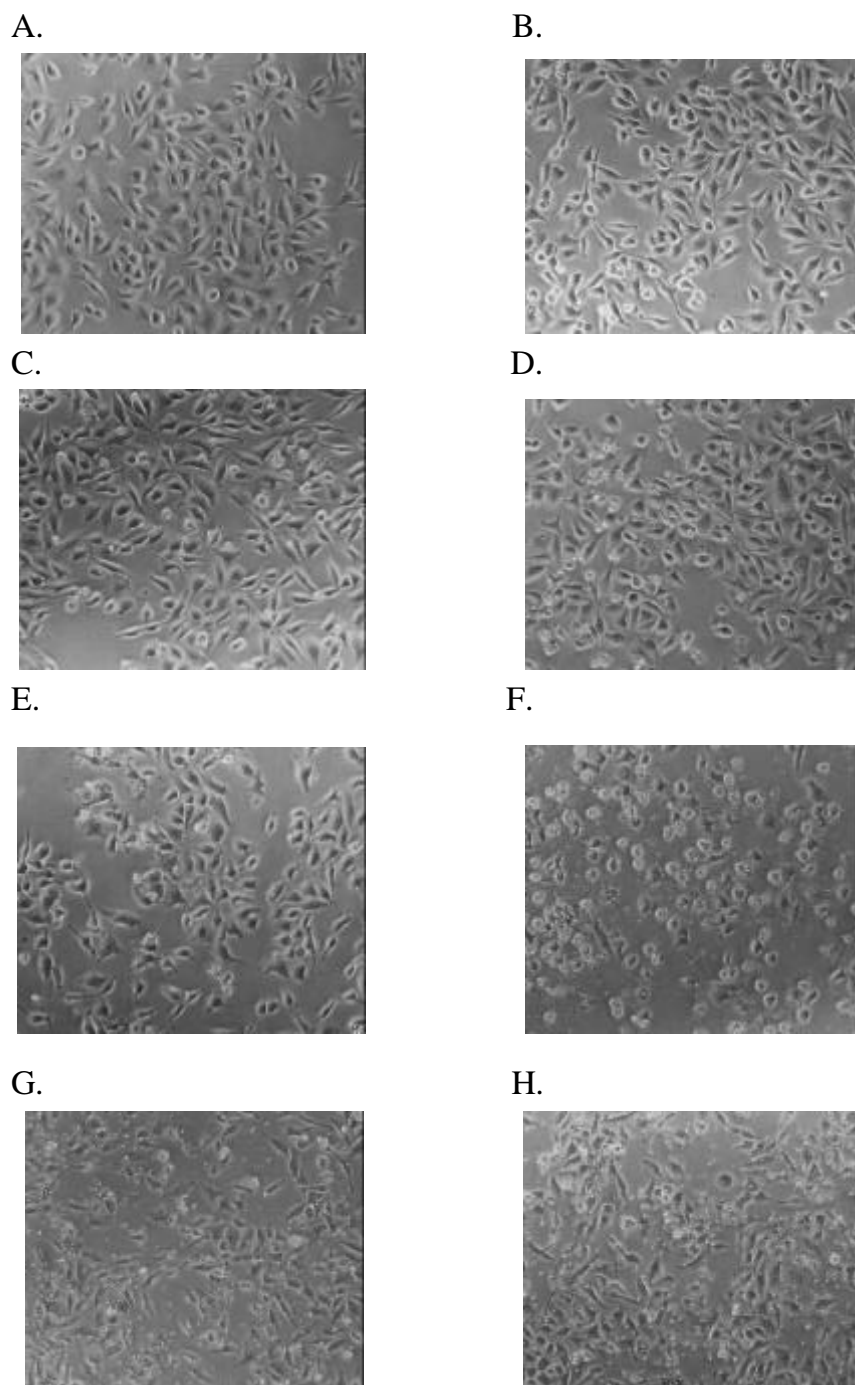


Figure 9. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to the different doses of apigenin for 18 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.06 μM , C : 0.6 μM , D : 6 μM , E : 20 μM , F : 60 μM , G : 100 μM , H : 150 μM .

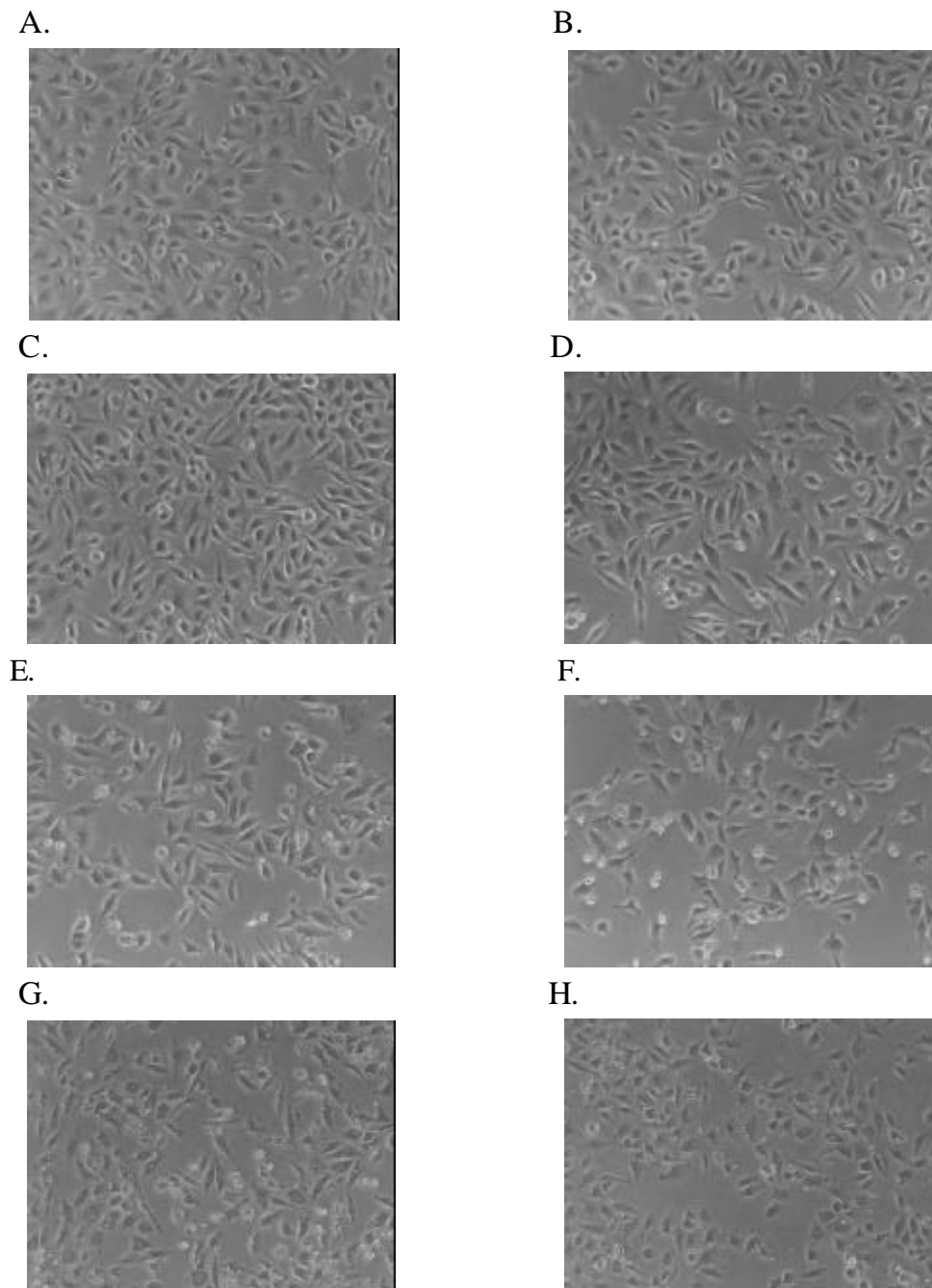


Figure 10. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to the different doses of apigenin for 24 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.06 μ M, C : 0.6 μ M, D : 6 μ M, E : 20 μ M, F : 60 μ M, G : 100 μ M, H : 150 μ M.

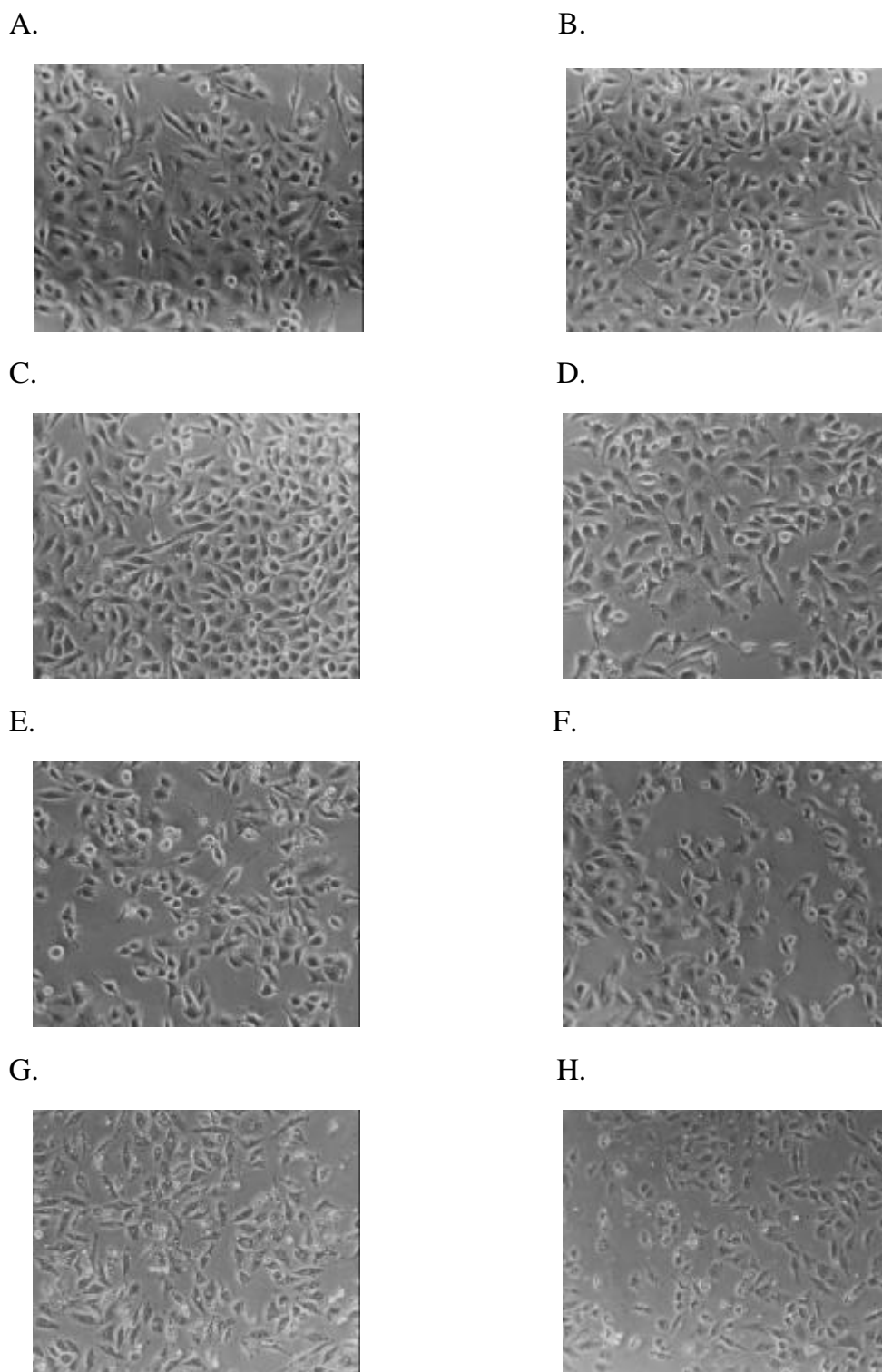


Figure 11. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to the different doses of apigenin for 36 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.06 μ M, C : 0.6 μ M, D : 6 μ M, E : 20 μ M, F : 60 μ M, G : 100 μ M, H : 150 μ M.

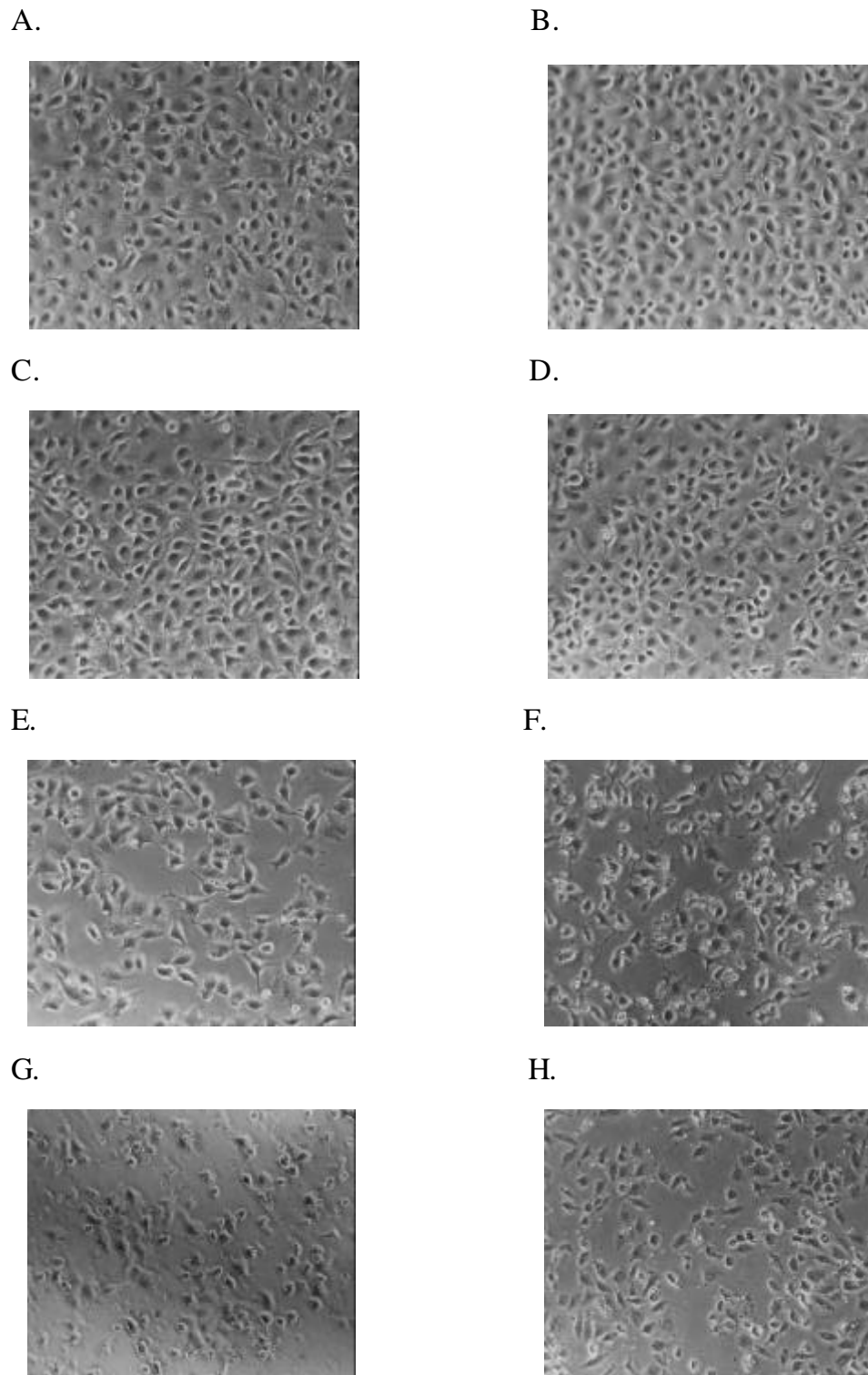
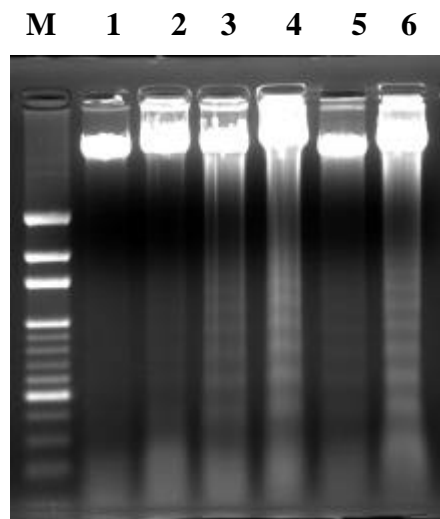


Figure 12. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to the different doses of apigenin for 48 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.06 μM , C : 0.6 μM , D : 6 μM , E : 20 μM , F : 60 μM , G : 100 μM , H : 150 μM .

A.



B.

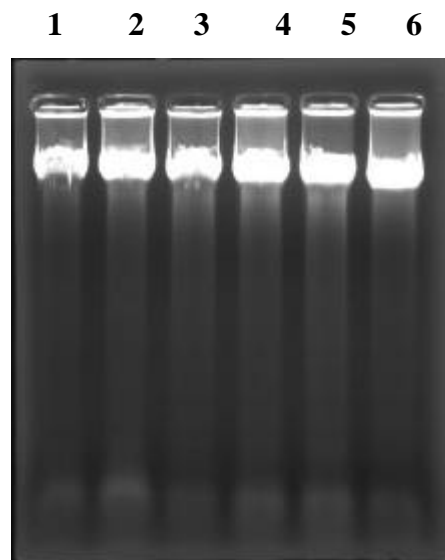


Figure 13. An agarose electrophoresis of DNA from human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to various concentrations of apigenin for 24 (A) and 48 hr (B). M : DNA Maker ; Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 0.6 μ M ; Lane 3 : 6 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M.

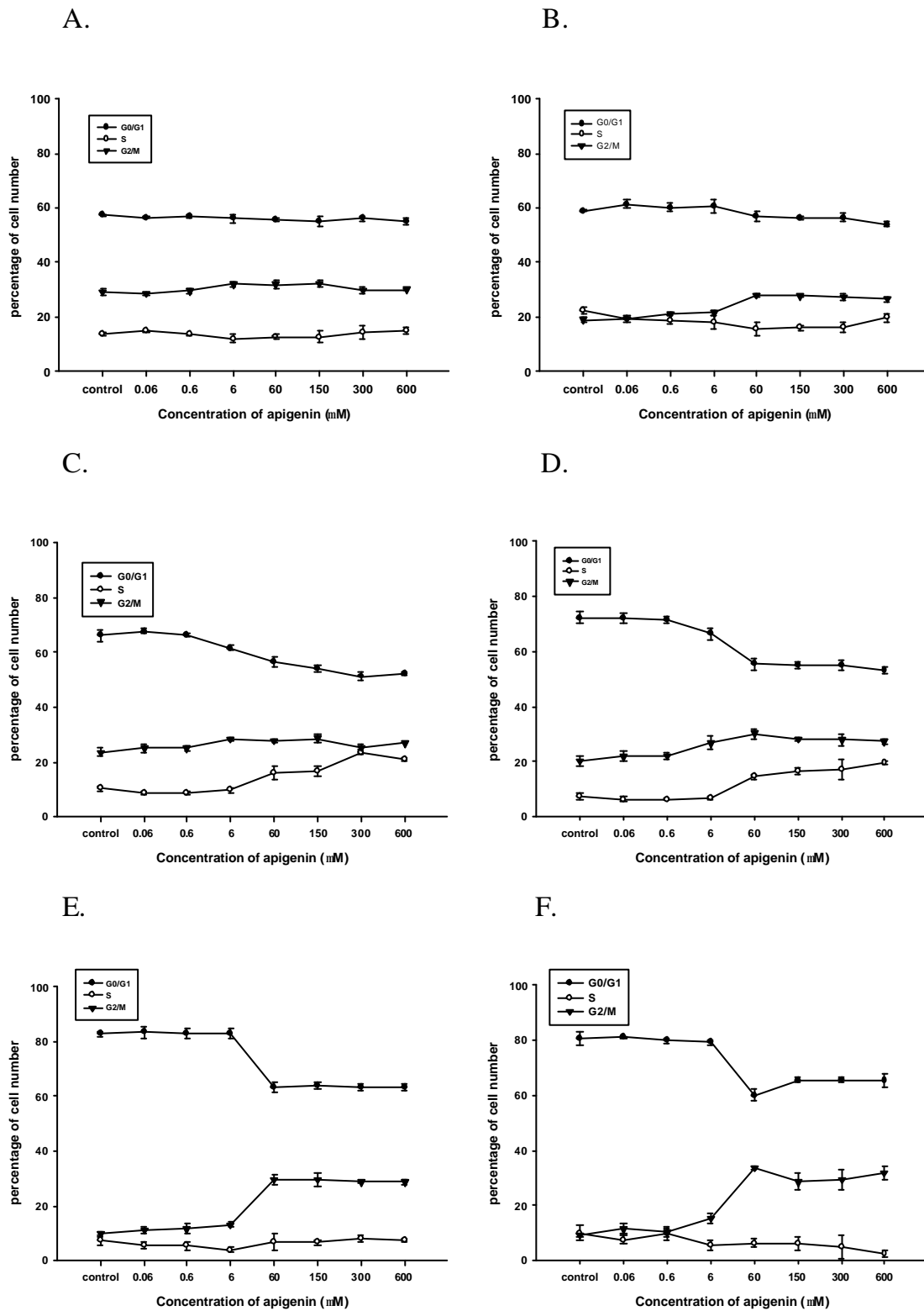


Figure 14. The cell cycle distribution of SC-M1 cells growing in the percentage of different doses of apigenin for (A) 6hr, (B) 12 hr, (C) 18 hr, (D) 24 hr, (E) 36 hr and (F) 48 hr incubated. After the treatments of cells were harvested and analyzed by FACS for cell cycle. Values= means± SD n=3

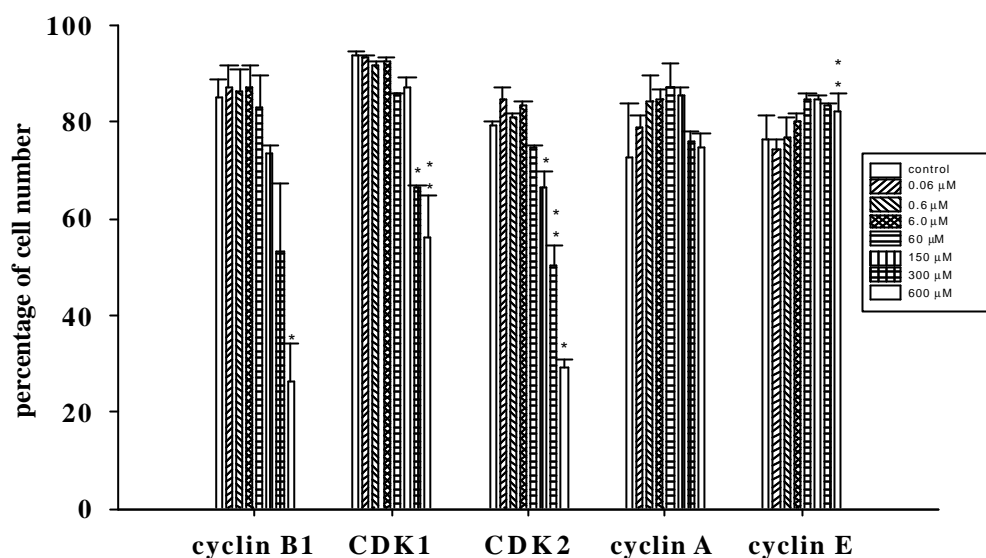


Figure 15. The data analysis for intracellular cyclins distribution of human stomach cancer (SC-M1) cells repressing in the presence of different doses of apigenin for 24 hr. The cell cyclins were analyzed by FACS. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean± SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

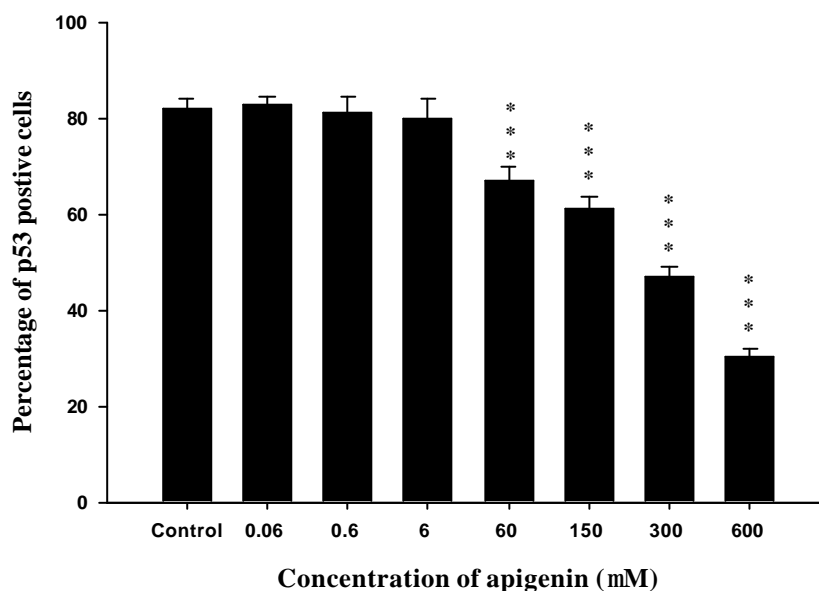
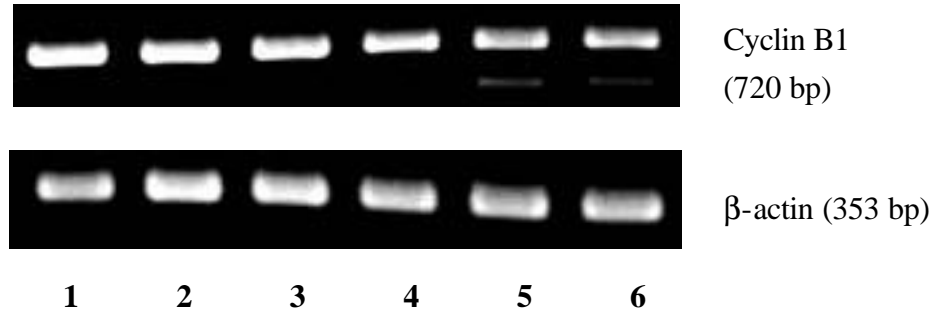


Figure 16. The data analysis for intracellular p53 distribution of human stomach cancer (SC-M1) cells repressing in the presence of different doses of apigenin for 24 hr. The p53 were analyzed by FACS. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean± SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

A.



B.

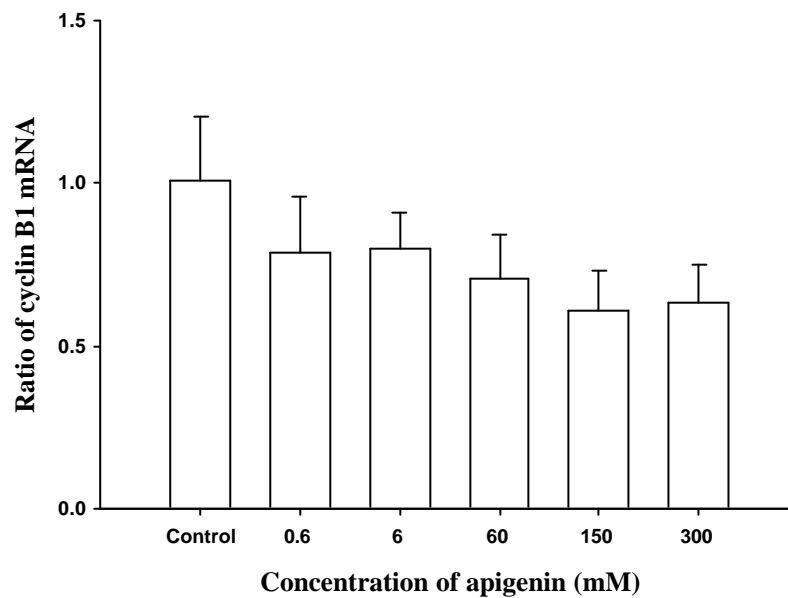


Figure 17. RT-PCR analysis of cyclin B1 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of apigenin. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 0.6 μ M ; Lane 3 : 6 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M. (B) The statistic figure of cyclin B1 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

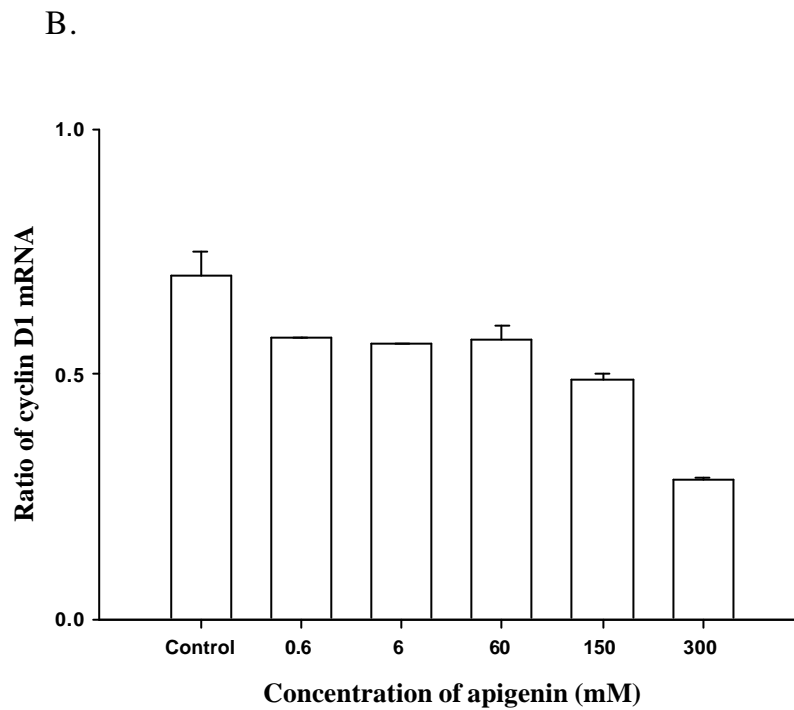
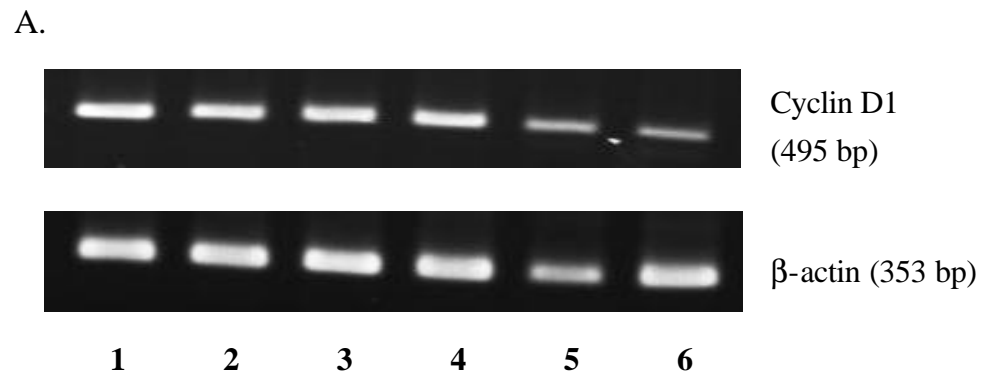


Figure 18. RT-PCR analysis of cyclin D1 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of apigenin. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 0.6 μ M ; Lane 3 : 6 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M. (B) The statistic figure of cyclin D1 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

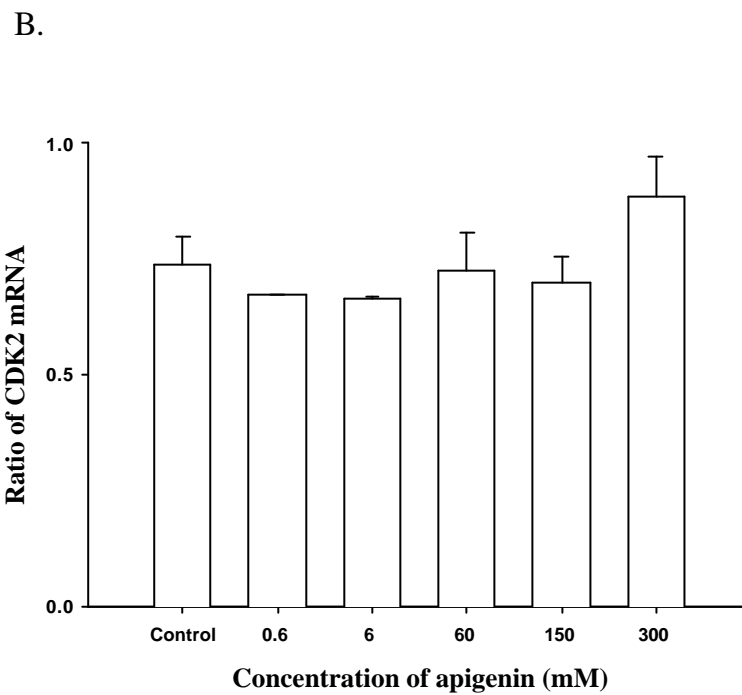
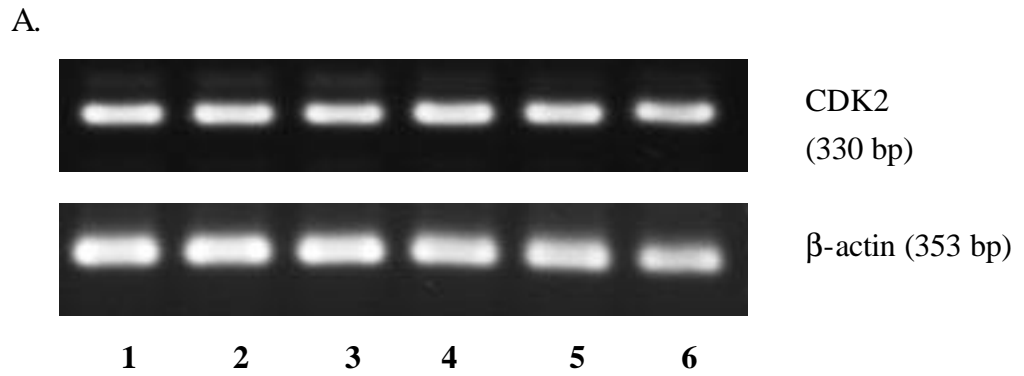


Figure 19. RT-PCR analysis of CDK2 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of apigenin. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 0.6 μ M ; Lane 3 : 6 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M. (B) The statistic figure of CDK2 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

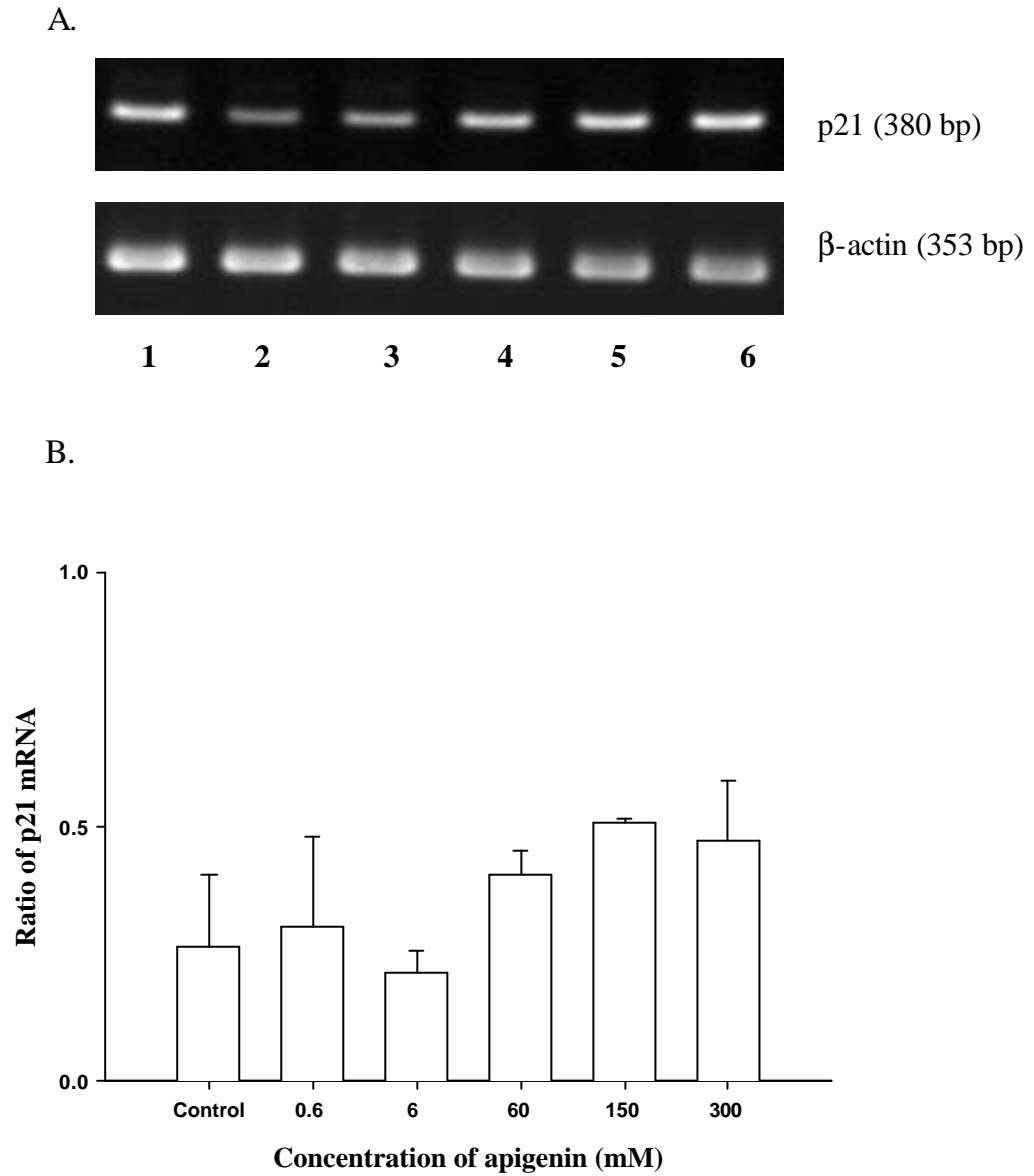


Figure 20. RT-PCR analysis of p21 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of apigenin. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 0.6 μ M ; Lane 3 : 6 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M. (B) The statistic figure of p21 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

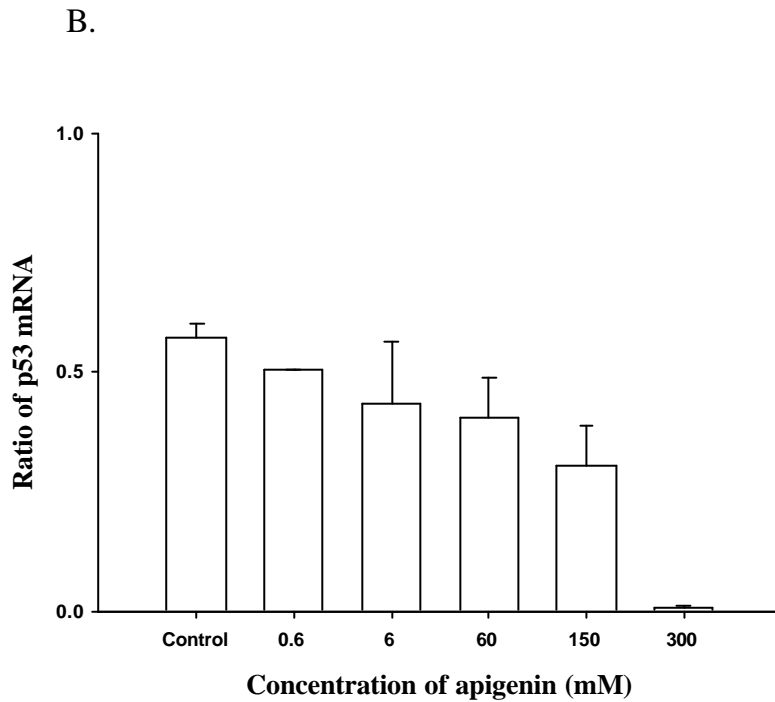
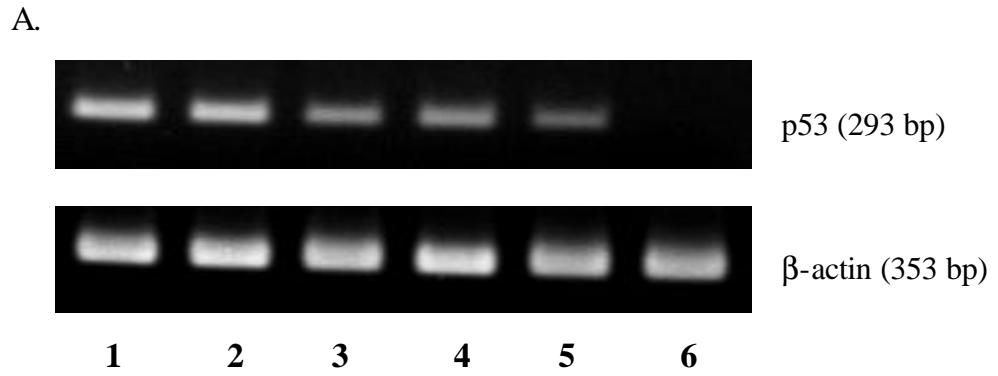


Figure 21. RT-PCR analysis of p21 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of apigenin. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 0.6 μ M ; Lane 3 : 6 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M. (B) The statistic figure of p53 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

(二) 檢測 17 α -estradiol 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞生長方面的影響

(1) 檢測 17 α -estradiol 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞增生的影響

Figure 12. 結果發現給予 17 α -estradiol 經不同時間培養之後，在 6 小時對胃癌細胞已有抑制細胞生長的作用，於 150 μ M 17 α -estradiol，細胞存活率為 66.12 \pm 2.21%，在 12、18、24、36 和 48 小時，細胞生長抑制隨著藥物濃度的增加及時間的增長而抑制作用越明顯，因此從這個實驗結果可以發現 17 α -estradiol 確實對胃癌細胞的增生方面有很明顯的抑制。

(2) 檢測 17 α -estradiol 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞形態的影響

由實驗結果 Figure 23.至 Figure 28.發現當 17 α -estradiol (60、100、150 μ M) 濃度增加，SC-M1 細胞的細胞膜漸漸產生皺折而且懸浮在細胞培養液的細胞也增加，經 24、36 和 48 小時之後更可清楚看見細胞碎片而且細胞也很明顯減少，從照片中可以觀察到經高濃度的 17 α -estradiol (100、150 μ M)作用的 SC-M1 細胞都已經平平貼在培養皿，細胞膜不像控制組細胞膜平滑而具有立體感。

(3) 檢測 17 α -estradiol 對胃癌細胞株(SC-M1) DNA 的影響

由細胞存活率及形態學上發現 17 α -estradiol 對胃癌細胞確實都有很明顯的影響，因此利用電泳法觀察 17 α -estradiol 對胃癌細胞 DNA 造成何種影響，由實驗結果 Figure 29.發現將細胞加藥分別培養 24 和 48 小時後，在 30 μ M 就觀察到細胞 DNA 斷裂現象，而發現在 48 小時 17 α -estradiol 對 SC-M1 細胞造成凋亡(apoptosis)更明顯，因此我們可以推論胃癌細胞在 17 α -estradiol 24 和 48 小時作用之後所造成的細胞死亡是使 SC-M1 細胞 DNA 產生斷裂造成細胞的凋亡。

(4) 檢測 17 α -estradiol 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞週期的影響

由實驗結果 Figure 30.觀察到 17 α -estradiol (60、150、300、600 μ M)可使 SC-M1 細胞週期停止在 G2/M 期，隨著藥物濃度的增加停止於 G2/M 期細胞漸增，且在 24 小時作用後，SC-M1 細胞停止在 G2/M 期的最明顯，而在 6 和 12 小時細胞週期並沒有受到影響。從 18 小時作用已經可以初步看到，因為在 18 小時已經可以發現隨著 17 α -estradiol 藥物濃度增加，停在 G0/G1 期的 SC-M1 細胞已經漸漸減少，相對的 S 和 G2/M 期則是漸漸上升。

(5) 檢測 17 α -estradiol 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞週期素(Cyclins)的影響

由細胞週期的結果已經發現在 24 小時 17 α -estradiol 可使 SC-M1 細胞的細胞週期停止於 G2/M 期最明顯。經 24 小時 17 α -estradiol 作用後，偵測 SC-M1 細胞內 Cyclins 和 CDKs 的結果 Figure 31.發現調控 G2/M 期的 Cyclin B1 和

CDK1 隨著濃度增加很明顯受到抑制，而調節細胞週期由 S 期進入 G2/M 期的 cyclin E 和 CDK2 及調節 G0/G1 期的 cyclin D1、cyclin D2、cyclin D3 和 CDK6 則是沒有很大影響。

SC-M1 細胞內 p53 經 24 小時 17 α -estradiol 作用後，隨著濃度增加並沒有很明顯受到抑制，控制組 88.40 \pm 1.08，實驗組分別為 0.6 μ M : 85.87 \pm 0.24、6 μ M : 84.43 \pm 1.00、30 μ M : 81.23 \pm 1.19、60 μ M : 80.03 \pm 1.00、100 μ M : 78.47 \pm 0.59、150 μ M : 77.88 \pm 0.41 及 300 μ M : 71.81 \pm 0.75，此結果可由統計 Figure 32 顯示。

(6) 檢測 17 α -estradiol 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞內細胞週期素(Cyclins)基因表現的影響

經 24 小時作用後發現 SC-M1 細胞內調節細胞週期 G2/M 期的 cyclin B1 mRNA 的量並沒有隨著 17 α -estradiol 濃度增加而受到抑制(Figure 33.)，調節細胞進入 G0/G1 期的 cyclin D1 及 CDK2 mRNA 的量也沒有受到抑制(Figure 34 35)，但是 cyclin E 隨著濃度增加漸漸受到抑制(Figure 36.)。對於 cyclin-dependent kinase inhibitor 包括 p53 和 p21 方面，p53 mRNA 的量(Figure 37.) 沒有明顯受到 17 α -estradiol 的抑制，而 p21 mRNA 的量(Figure 38.)則是漸漸增加。

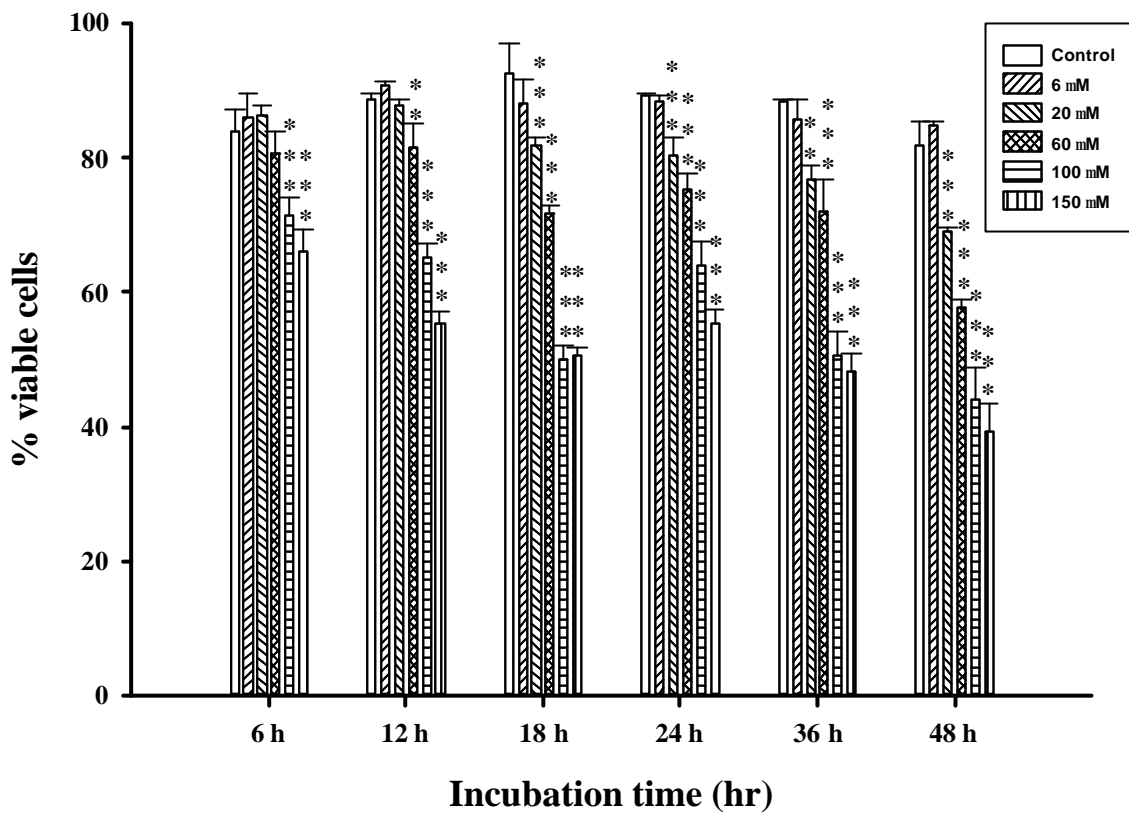


Figure 22. Percentage of viable SC-M1 cells after cotreatment with different doses of 17α -estradiol for 6, 12, 18, 24, 36 and 48 hrs incubated. After the treatment of various concentrations of apigenin, cells were harvested PI stain solution and assayed for % viable cells by FACS analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean \pm SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

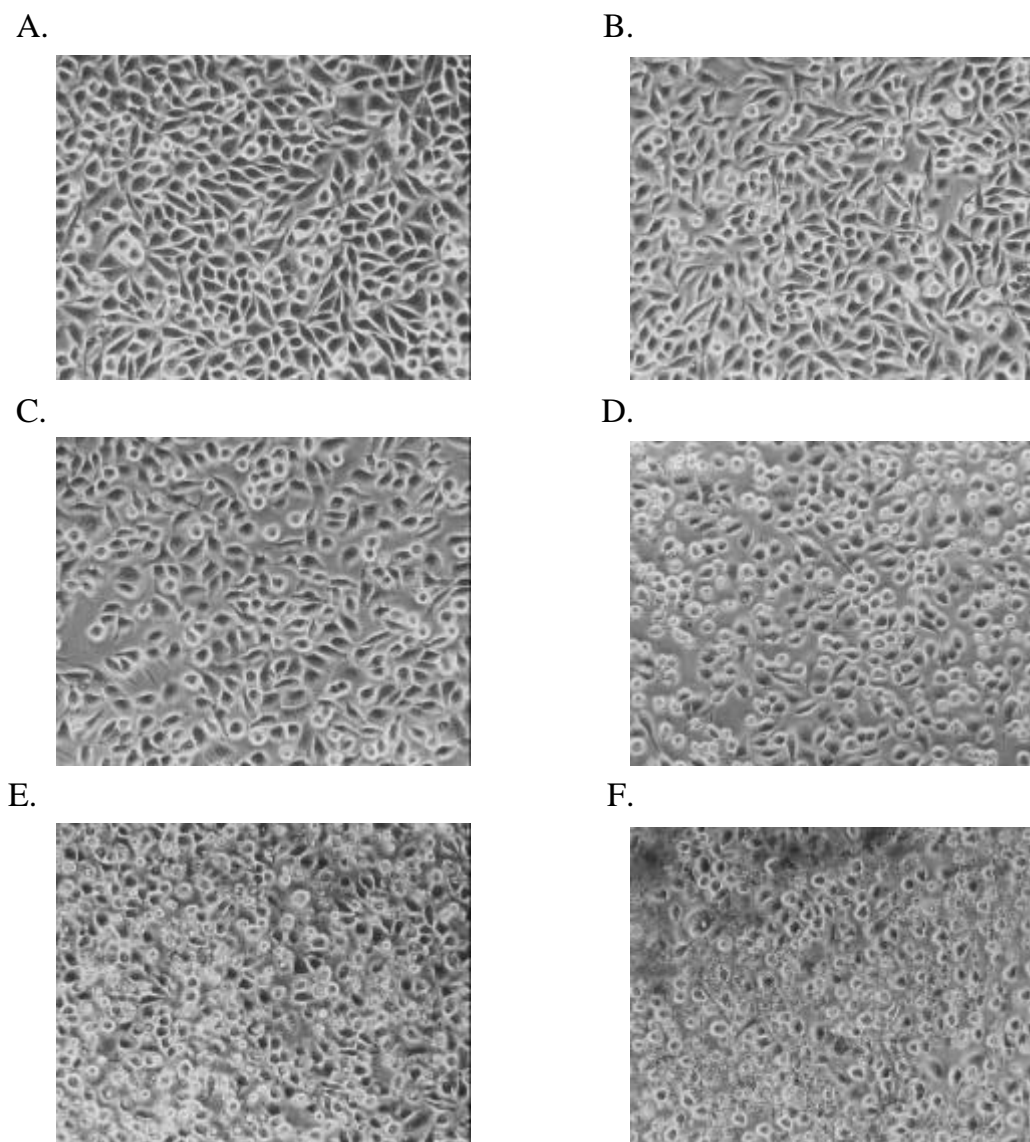


Figure 23. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to 17α -estradiol for 6 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 6 μ M, C : 30 μ M, D : 60 μ M, E : 100 μ M, F : 150 μ M.

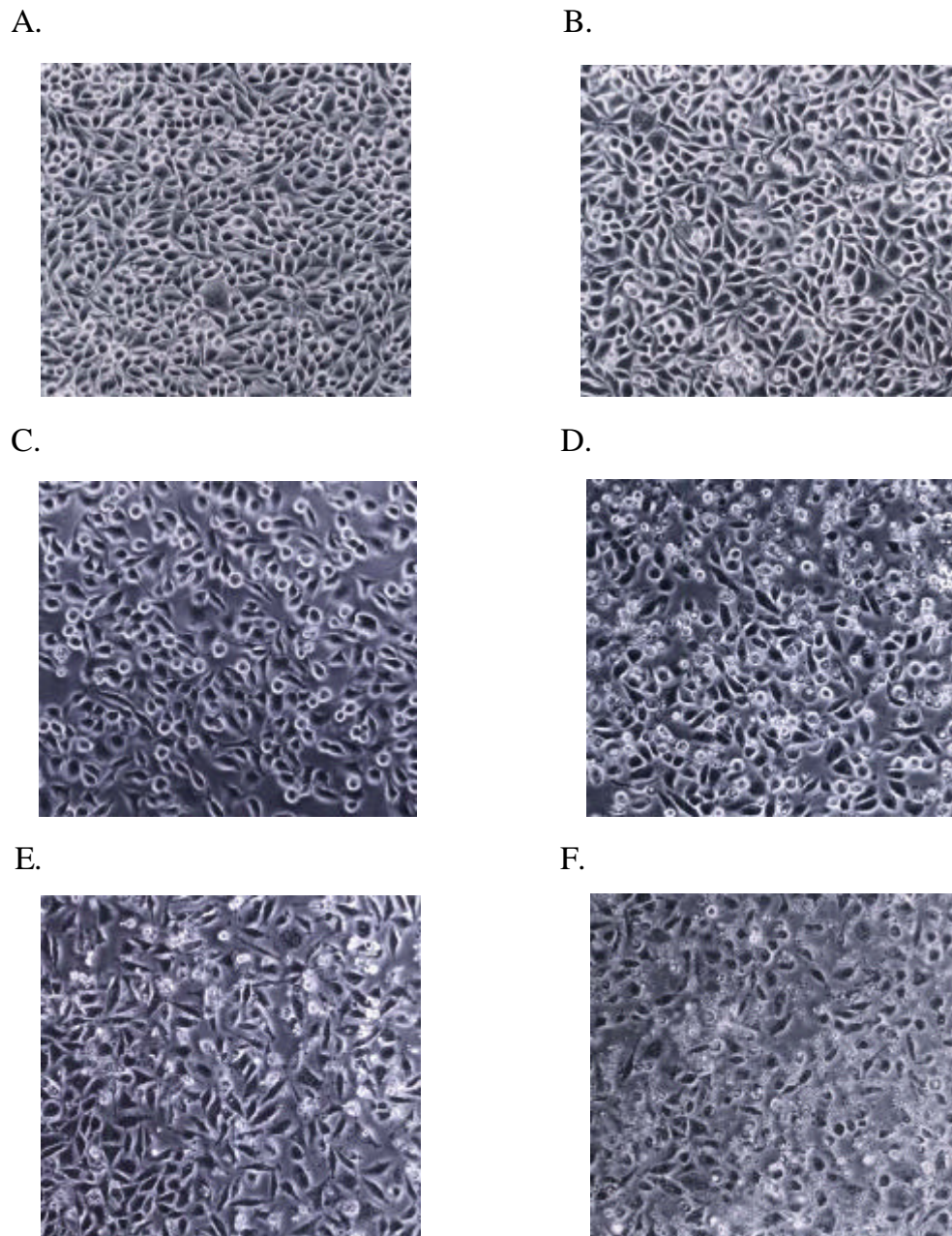
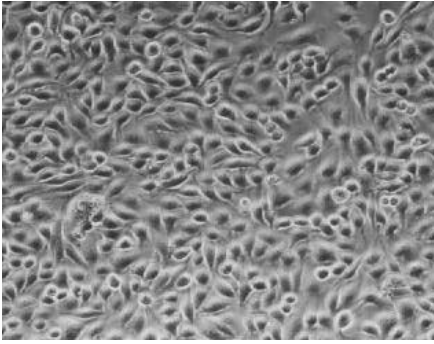
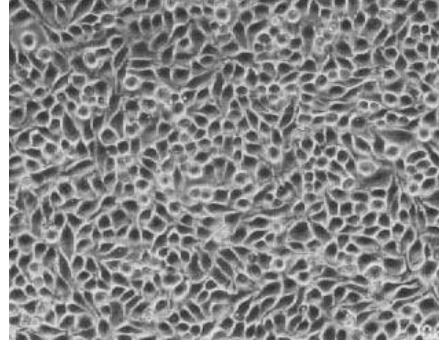


Figure 24. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to 17α -estradiol for 12 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 6 μM , C : 30 μM , D : 60 μM , E : 100 μM , F : 150 μM .

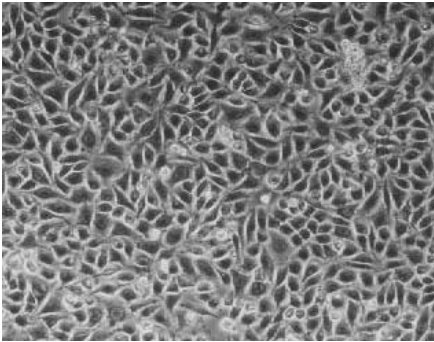
A.



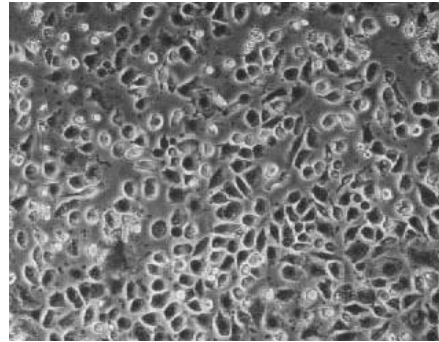
B.



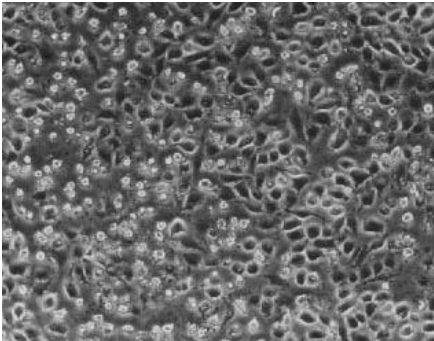
C.



D.



E.



F.

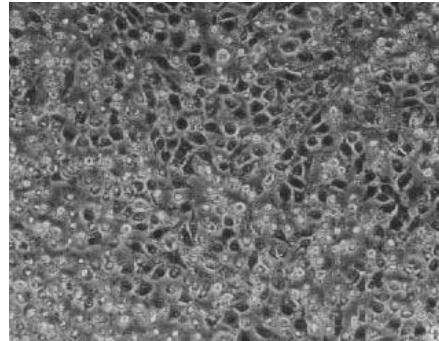


Figure 25. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to 17α -estradiol for 18 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : $6\ \mu\text{M}$, C : $30\ \mu\text{M}$, D : $60\ \mu\text{M}$, E : $100\ \mu\text{M}$, F : $150\ \mu\text{M}$.

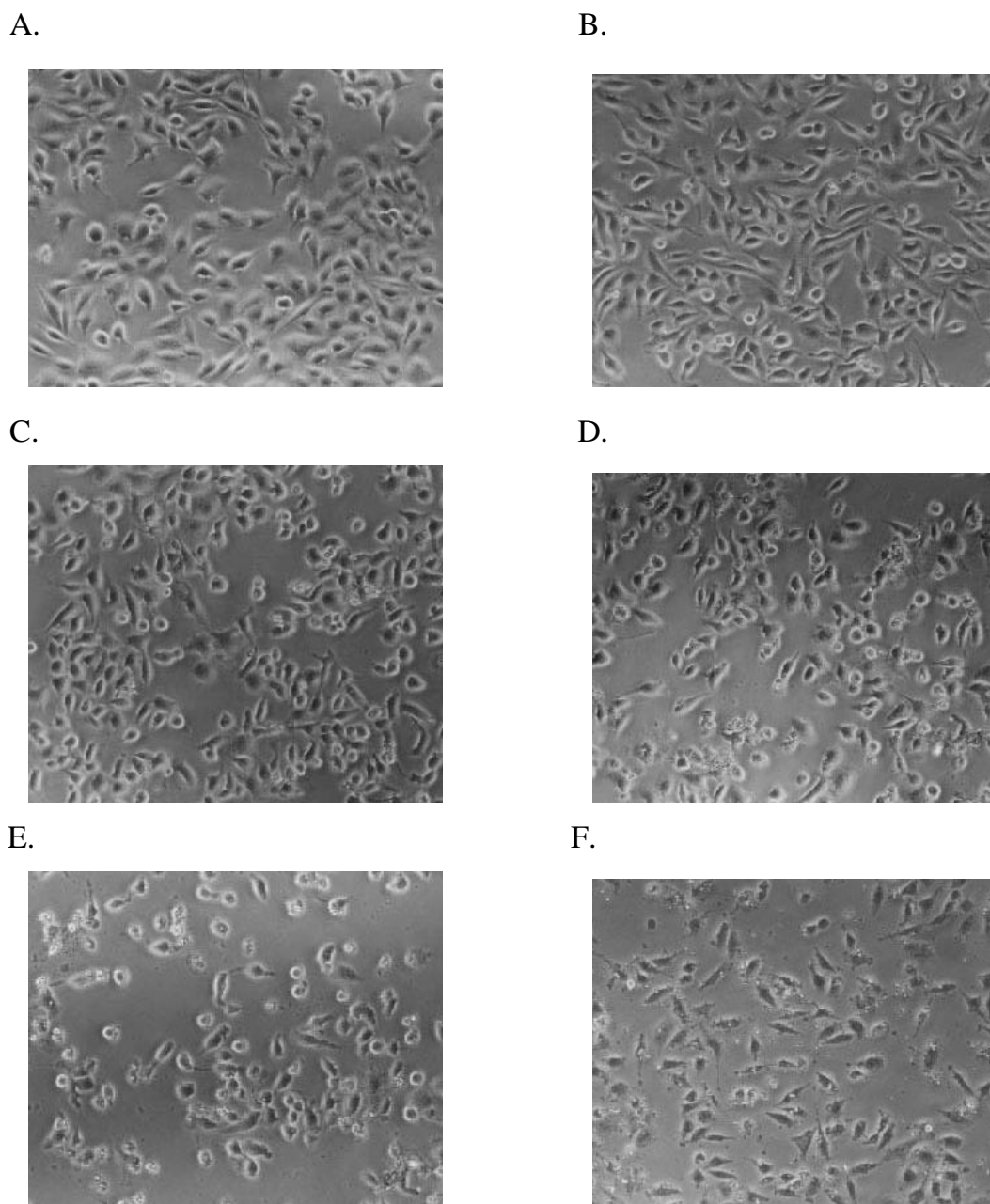


Figure 26. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to 17α -estradiol for 24 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 6 μM , C : 30 μM , D : 60 μM , E : 100 μM , F : 150 μM .

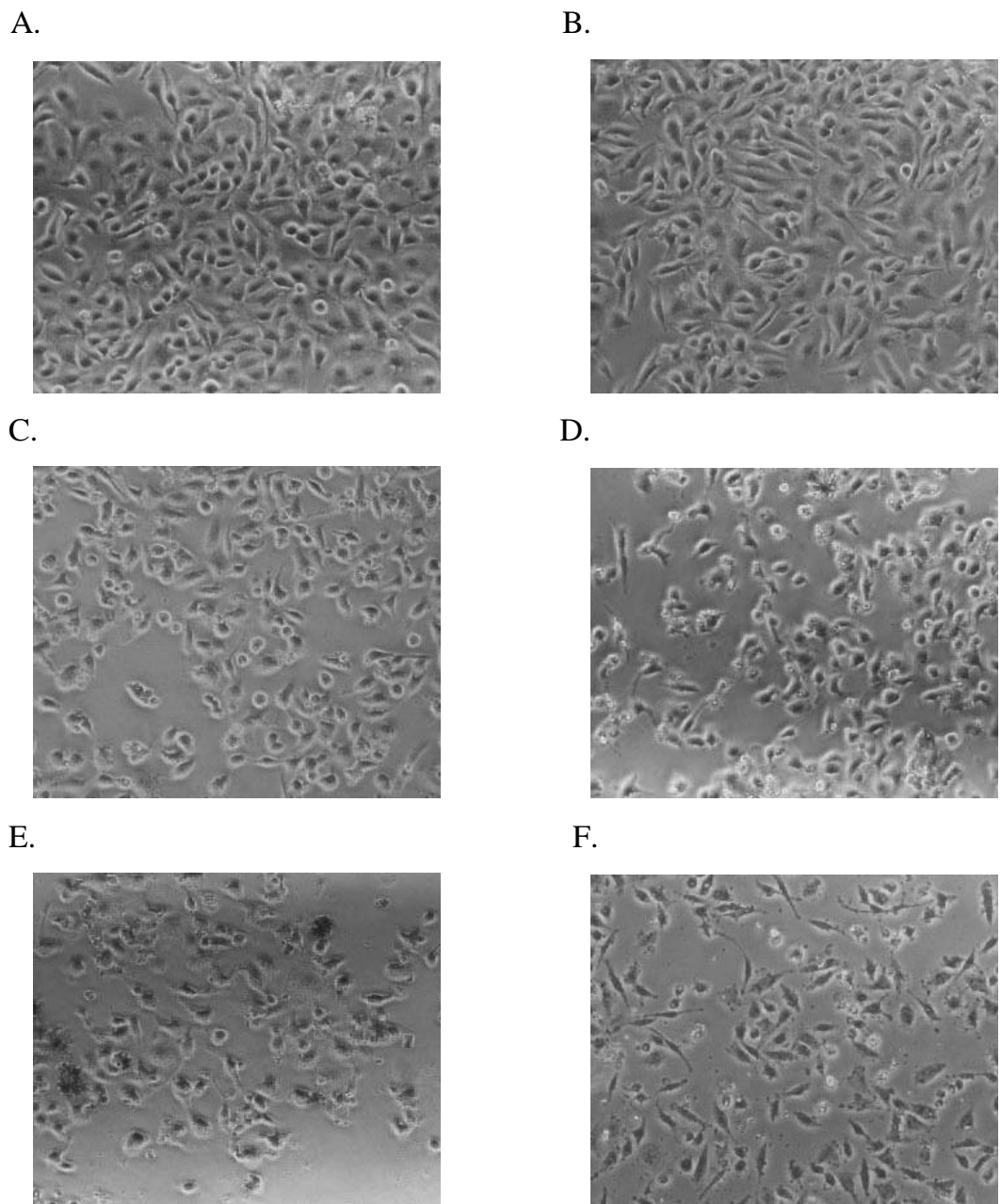


Figure 27. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to 17α -estradiol for 36 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 6 μ M, C : 30 μ M, D : 60 μ M, E : 100 μ M, F : 150 μ M..

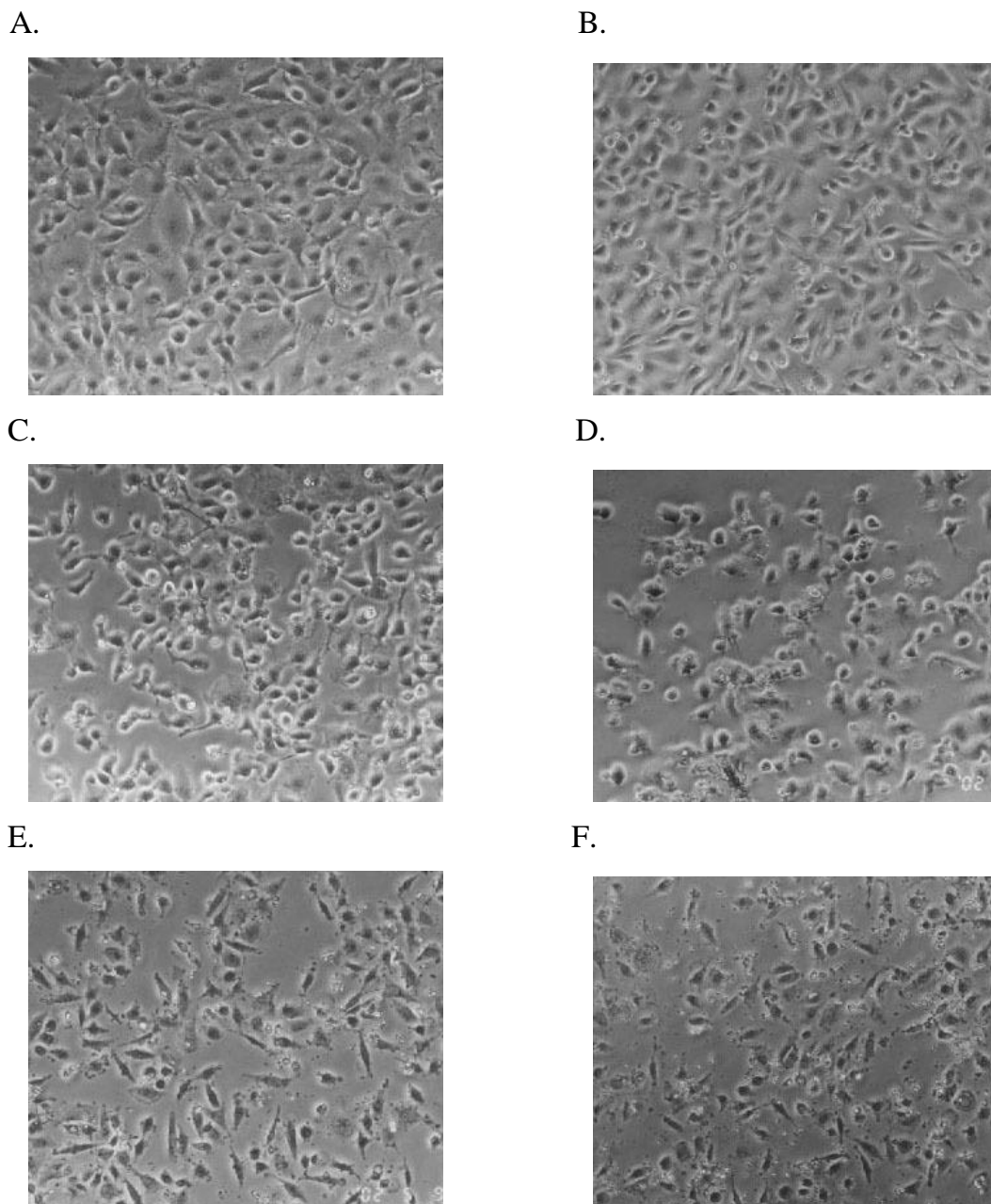
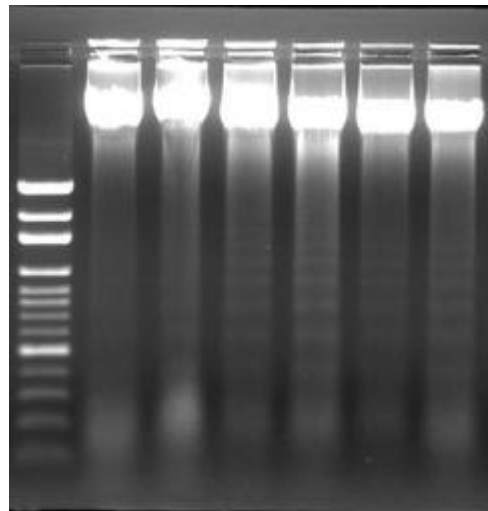


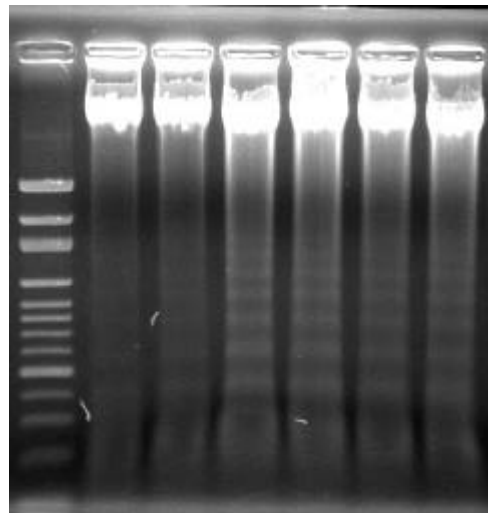
Figure 28. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to 17α -estradiol for 48 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 6 μM , C : 30 μM , D : 60 μM , E : 100 μM , F : 150 μM .

A.



1 2 3 4 5 6 7

B.



1 2 3 4 5 6 7

Figure 29. An agarose electrophoresis of DNA from human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to various concentrations of 17α -estradiol for A: 24 hr; B: 48 hr. Lane 1 : Maker ; Lane 2 : DMSO ; Lane 3 : 6 μ M ; Lane 4 : 30 μ M ; Lane 5 : 60 μ M ; Lane 6 : 150 μ M ; Lane 7 : 300 μ M.

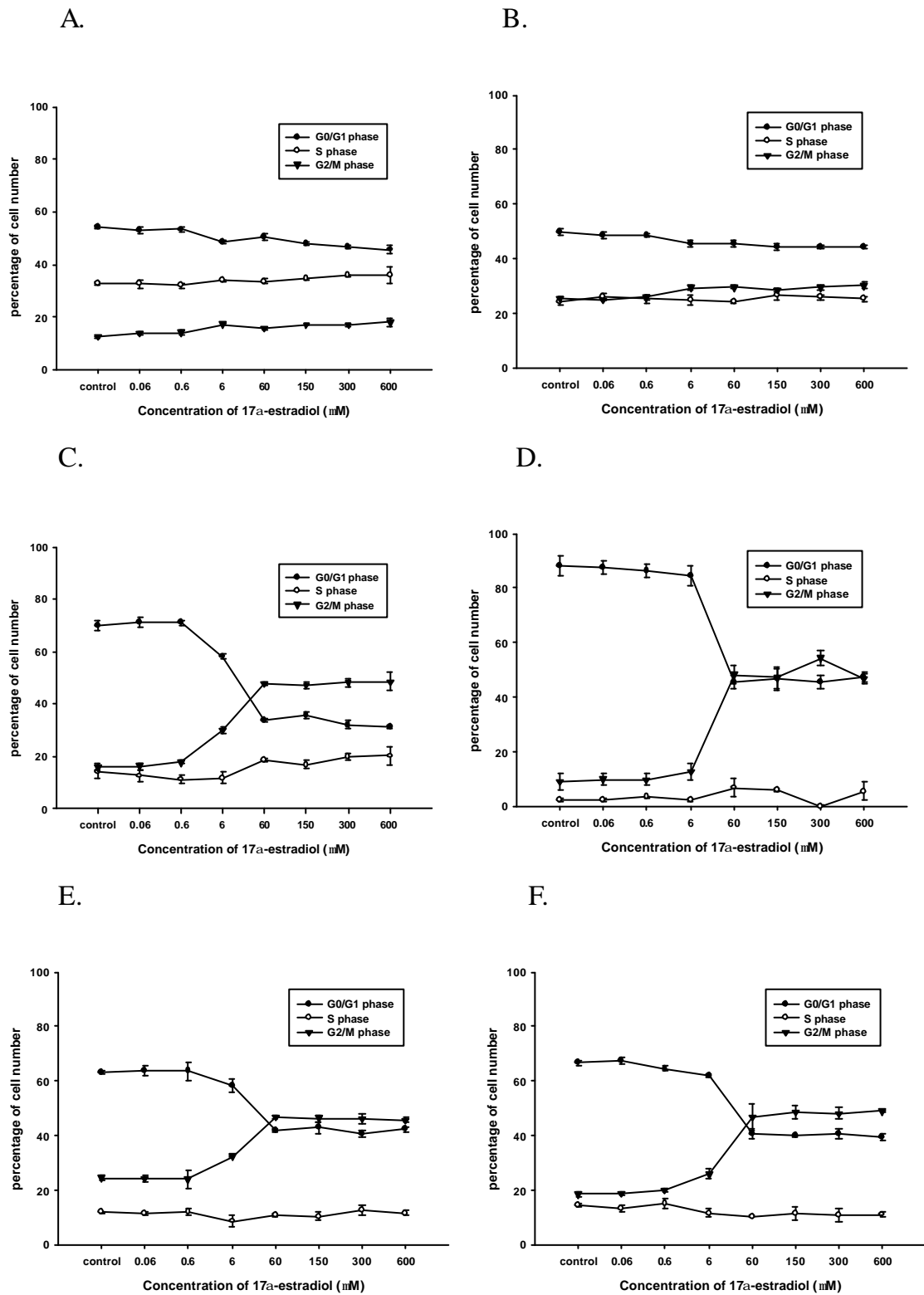
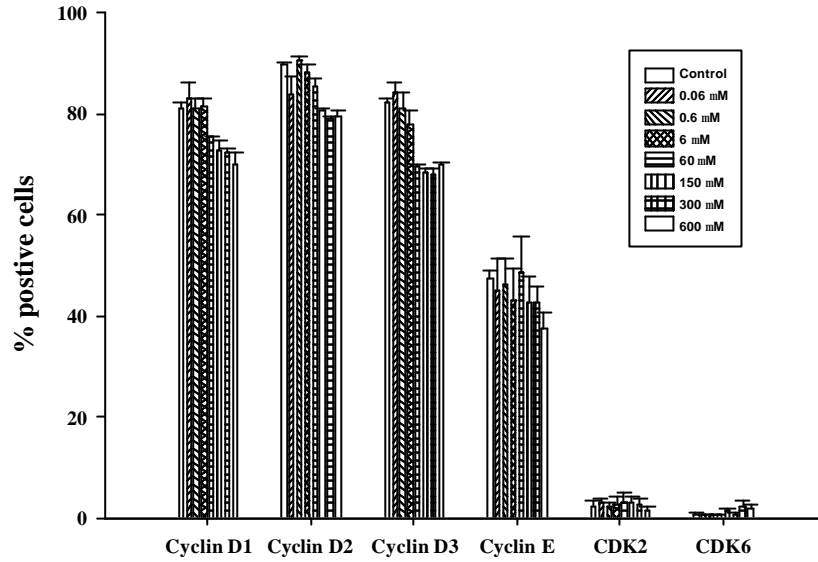


Figure 30. The cell cycle distribution of SC-M1 cells growing in the percentage of different doses of 17α -estradiol for 6hr (A), 12 hr (B), 18 hr (C), 24 hr (D), 36 hr (E) or 48 hr (F) incubated. After the treatments of cells which were harvested and analyzed by FACS for cell cycle.

A.



B.

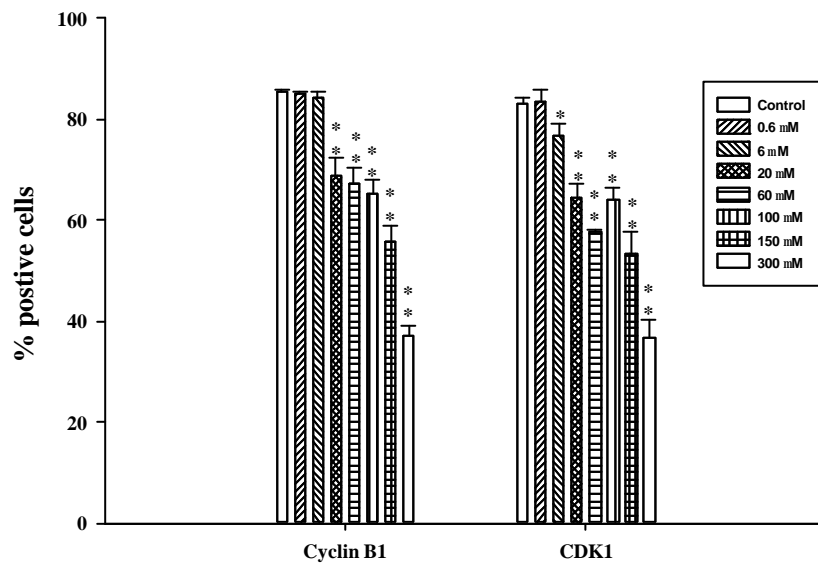


Figure 31. The data analysis for intracellular cyclins distribution of human stomach cancer (SC-M1) cells repressing in the presence of different doses of 17α-estradiol for 24 hr. The cell cyclins were analyzed by FACS. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean± SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

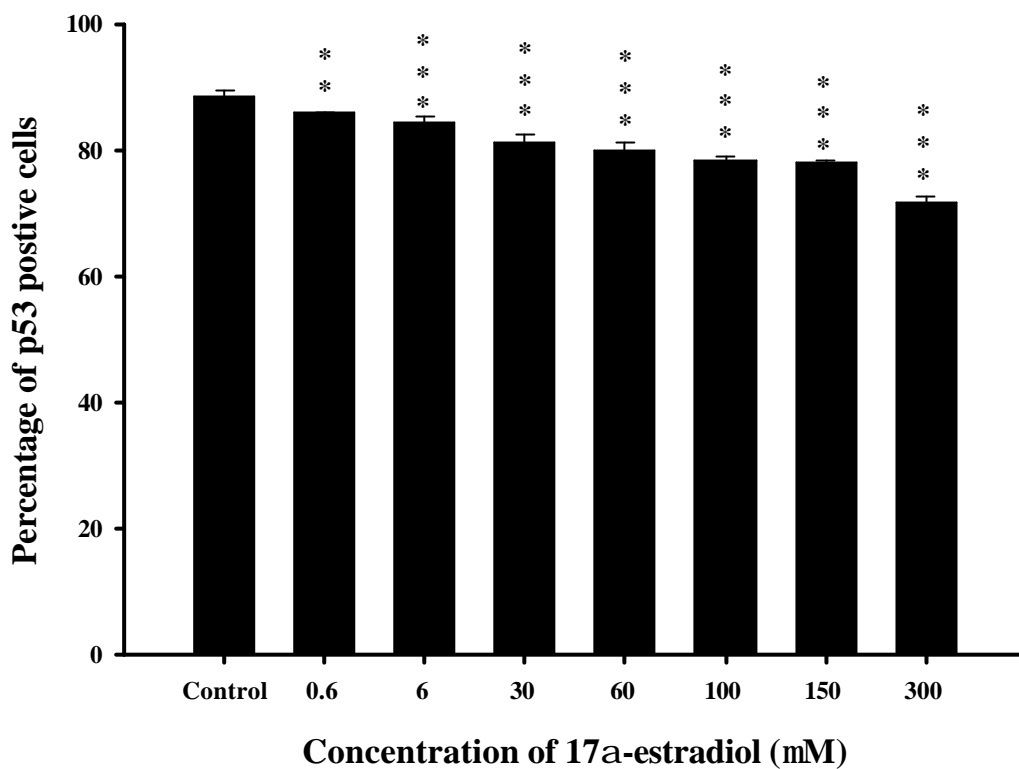


Figure 32. The data analysis for intracellular p53 distribution of human stomach cancer (SC-M1) cells less repressing in the presence of different doses of 17 α -estradiol for 24 hr. The cell cyclins were analyzed by FACS. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean \pm SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

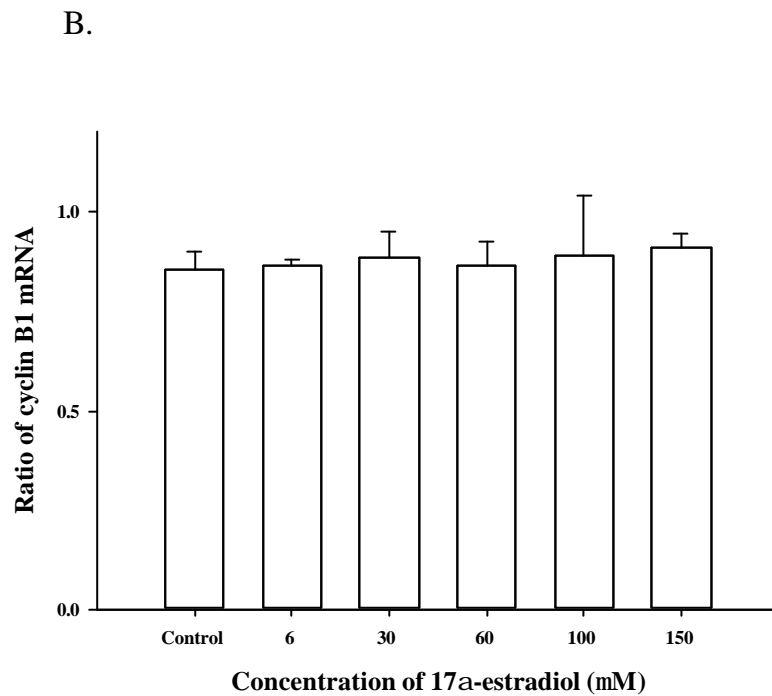
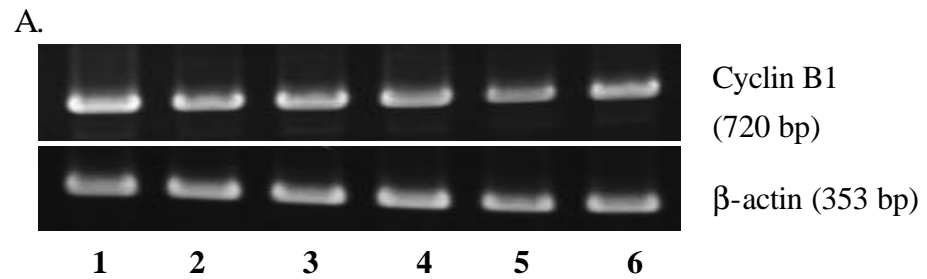


Figure 33. RT-PCR analysis of cyclin B1 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 30 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 100 μ M ; Lane 6 : 150 μ M. (B) The statistic figure of cyclin B1 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

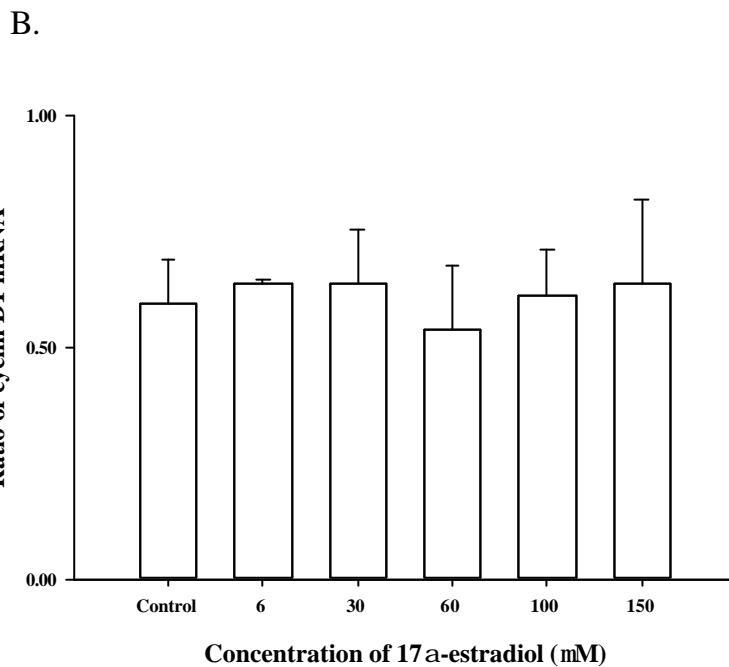
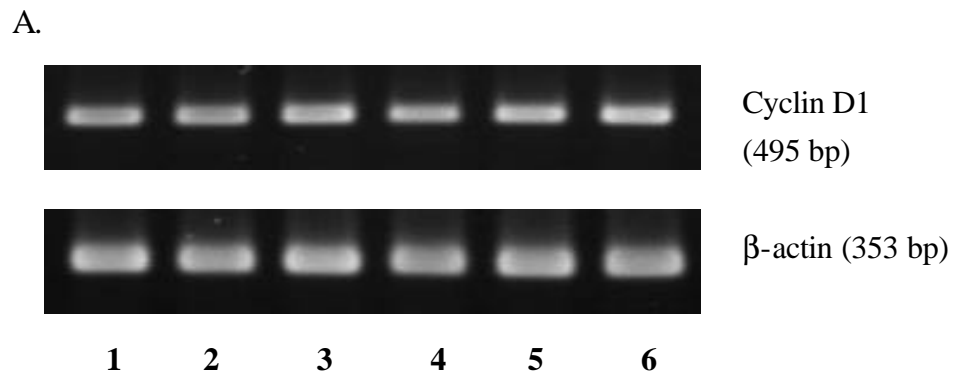


Figure 34. RT-PCR analysis of cyclin D1 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 30 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 100 μ M ; Lane 6 : 150 μ M. (B) The statistic figure of cyclin D1 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

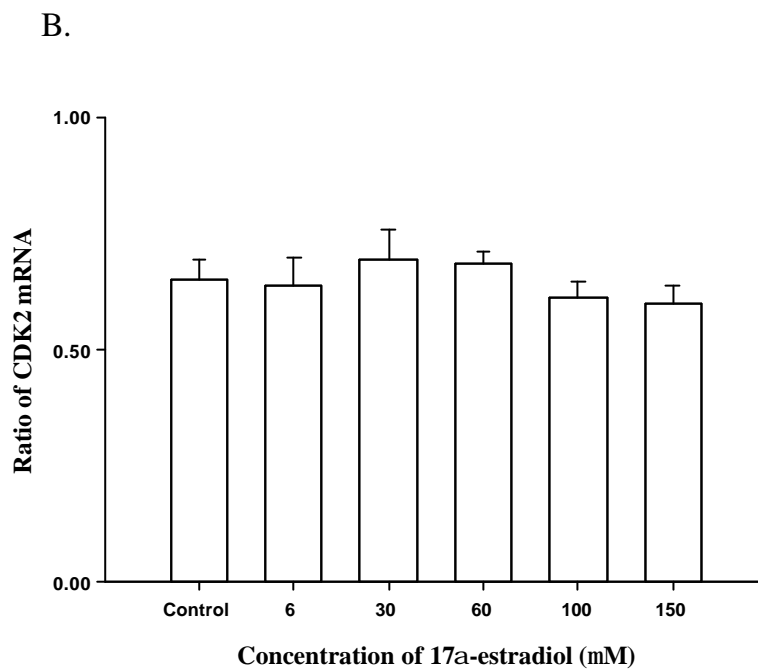
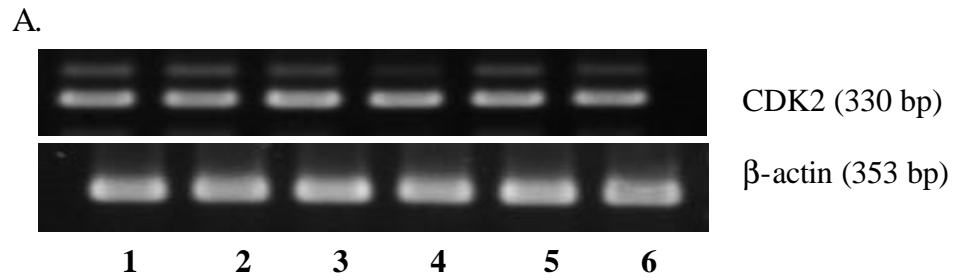


Figure 35. RT-PCR analysis of CDK2 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 30 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 100 μ M ; Lane 6 : 150 μ M. (B) The statistic figure of CDK2 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

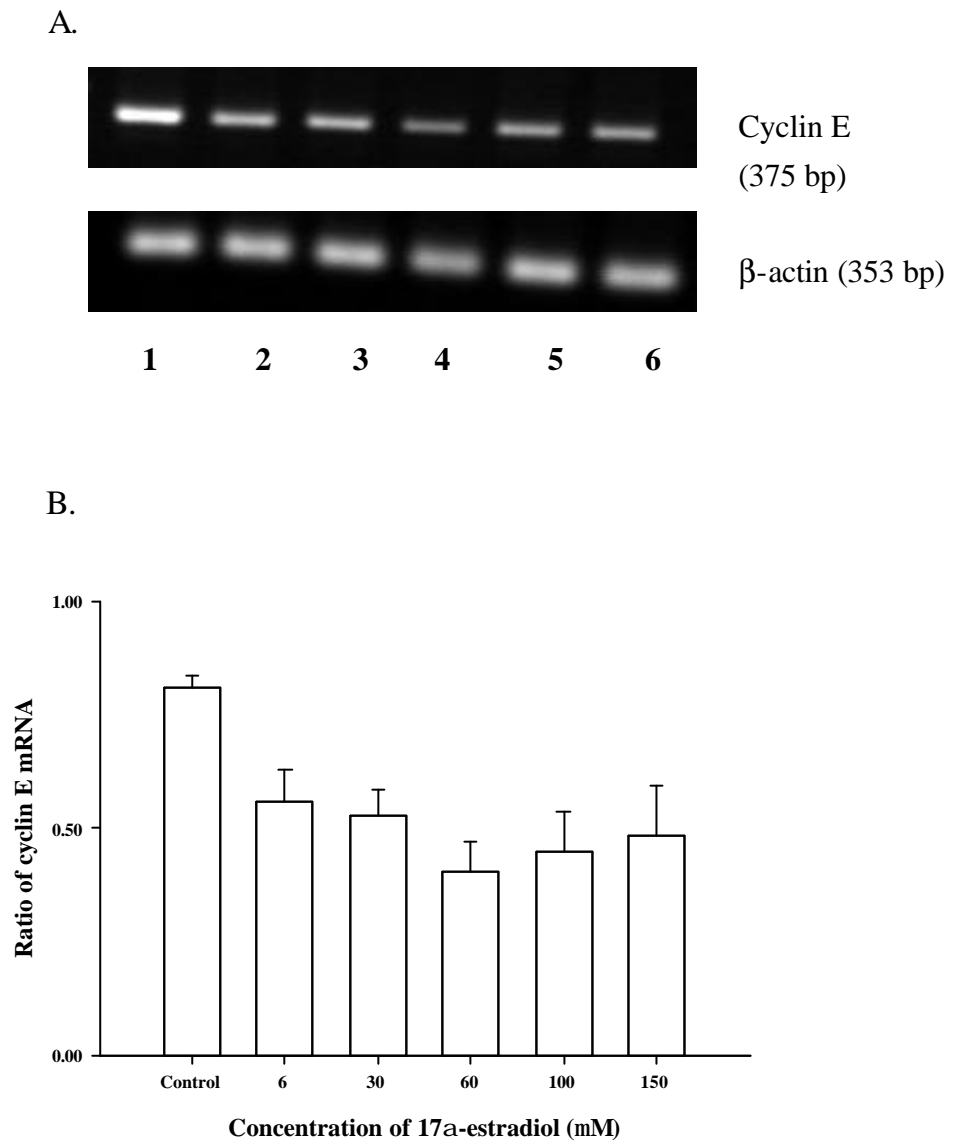


Figure 36. RT-PCR analysis of cyclin E and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 30 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 100 μ M ; Lane 6 : 150 μ M. (B) The statistic figure of cyclin E mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

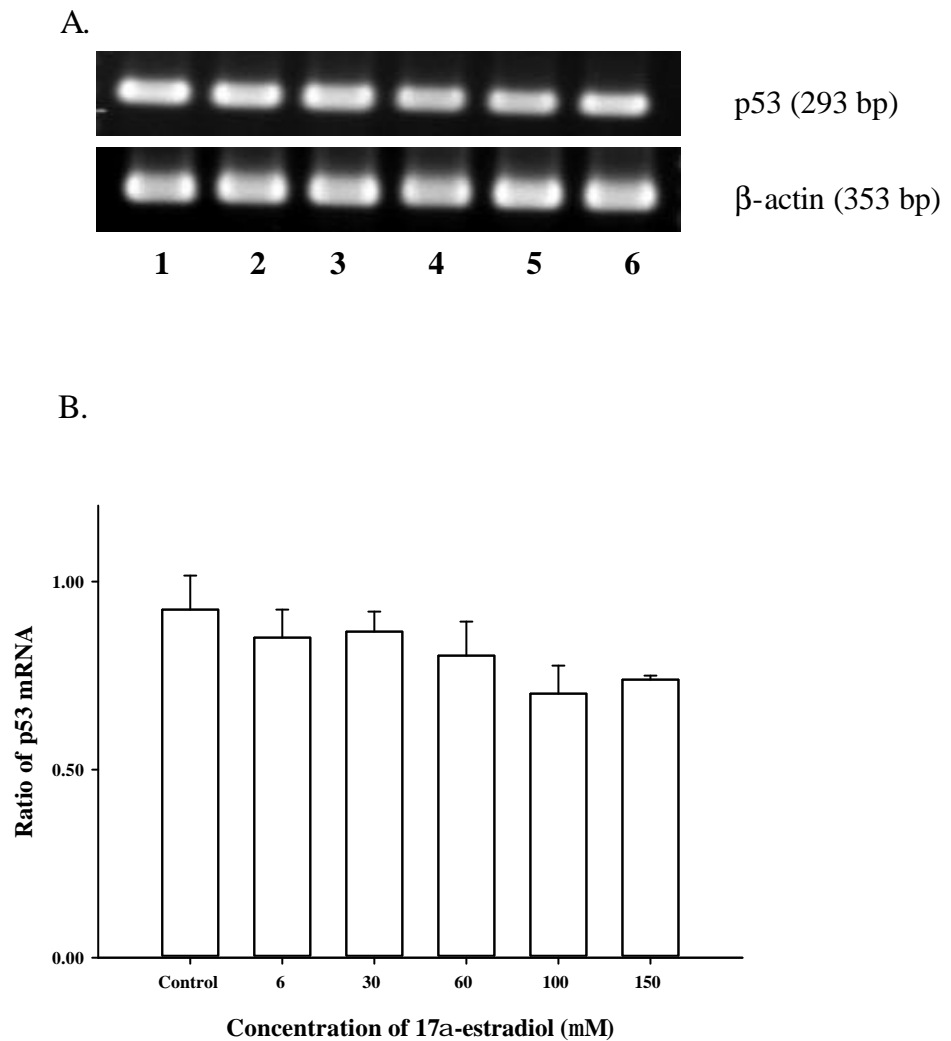


Figure 37. RT-PCR analysis of p53 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 30 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 100 μ M ; Lane 6 : 150 μ M. (B) The statistic figure of p53 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

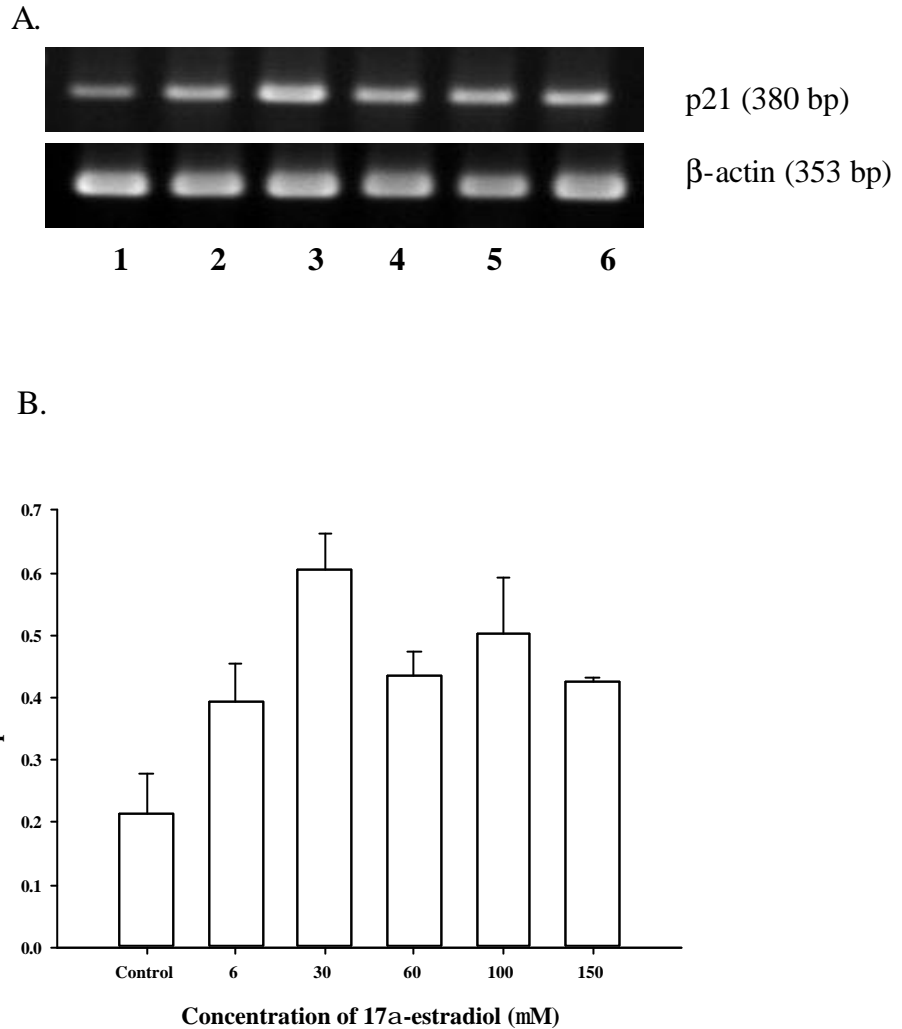


Figure 38. RT-PCR analysis of p21 and beta-actin in human stomach cancer (SC-M1) cells for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 30 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 100 μ M ; Lane 6 : 150 μ M. (B) The statistic figure of p21 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

(三) 檢測 flavone 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞生長的方面

(1) 檢測 flavone 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞增生的影響

Figure 39 結果發現給予 flavone 經不同時間培養之後，在 6 小時 flavone 對胃癌細胞已經有抑制細胞的生長的作用，於 150 μM flavone 細胞存活率為 40%左右，於 300 μM flavone 細胞存活率只為 1.19%，在 12、24、36、48 小時胃癌細胞生長抑制，從 60 μM 至 300 μM 隨 flavone 濃度的增加而抑制越明顯且當時間增長則細胞存活率越來越低，因此從這個結果可以發現 flavone 確實對胃癌細胞的增生方面有很明顯的抑制。

(2) 檢測 flavone 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞形態的影響

由實驗結果 Figure 40 至 Figure 45 發現當 flavone (60、100、150、300 μM) 濃度增加，SC-M1 細胞的細胞形態越來越不規則且細胞膜有漲大的現象，懸浮在細胞培養液的細胞也增加，經 12、24、36 和 48 小時之後，於高濃度 flavone 作用後更可清楚看見細胞碎片而且細胞也明顯減少，從照片中也可以觀察到經高濃度的 flavone (150、300 μM) 作用的 SC-M1 細胞的細胞膜不像控制組細胞膜平滑有立體感。

(3) 檢測 flavone 對胃癌細胞株(SC-M1) DNA 的影響

由細胞存活率和形態學上發現 flavone 對胃癌細胞確實都有很明顯的影響，為了觀察 flavone 對胃癌細胞 DNA 造成何種影響，因此利用電泳法分析檢測，由實驗結果 Figure 46 發現將細胞加藥分別培養 24 和 48 小時後，在 24 小時，在 60 μM 可以清楚觀察到細胞 DNA 斷裂，在 48 小時即使是高濃度都沒有觀察到有 DNA Ladders 的產生，因此 flavone 對 SC-M1 細胞造成凋亡 (apoptosis) 在 24 小時較明顯，所以我們可以推論胃癌細胞在 flavone 24 和 48 小時作用之後分別造成的細胞死亡是使 SC-M1 細胞 DNA 產生斷裂造成細胞的凋亡及可能造成細胞壞死。

(4) 檢測 flavone 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞週期的影響

由實驗結果 Figure 47 觀察到 flavone (60、150、300、600 μM) 可使 SC-M1 細胞週期停止在 G2/M 期，隨著藥物濃度的增加停止於 G2/M 期細胞漸增而且在 48 小時作用後，SC-M1 細胞停止在 G2/M 期的最明顯，在 6 和 12 小時並沒有影響。從 18 小時作用已經可以初步看到，因為在 18 小時已經可以發現隨著 flavone 藥物濃度增加，停在 G0/G1 期的 SC-M1 細胞已經漸漸減少，相對的 S 和 G2/M 期則是漸漸上升。

(5) 檢測 flavone 對胃癌細胞株(SC-M1)細胞週期素(Cyclins)的影響

由細胞週期的結果已經發現在 24 小時 flavone 可使 SC-M1 細胞的細胞週期停止於 G2/M 期明顯，經 24 小時 flavone 作用後，偵測 SC-M1 細胞內 Cyclins 和 CDKs 的結果 Figure 48，發現調控 G2/M 期的 Cyclin B1、CDK1 及 Cyclin A

隨著濃度增加很明顯受到抑制，而對於調節細胞週期由 S 期進入 G2/M 期的 cyclin E 和 CDK2 則是沒有很大影響。

(6) 檢測 flavone 對人類胃癌細胞株(SC-M1)細胞內細胞週期素(Cyclins)基因表現的影響

經 24 小時作用後發現 SC-M1 細胞內調節細胞週期 G2/M 期的 cyclin B1 的 mRNA 的量隨著濃度增加有明顯抑制(Figure 49)，而 CDK2 mRNA 的量同樣沒有很大的影響(Figure 50)，但是 cyclin E 隨著濃度增加漸漸受到抑制(Figure 51)。對於 cyclin- dependent kinase inhibitor 包括 p53 和 p21 方面，p53 mRNA (Figure 52)的量沒有明顯受到 flavone 的抑制而 p21 mRNA (Figure 53) 的量則是漸漸抑制。

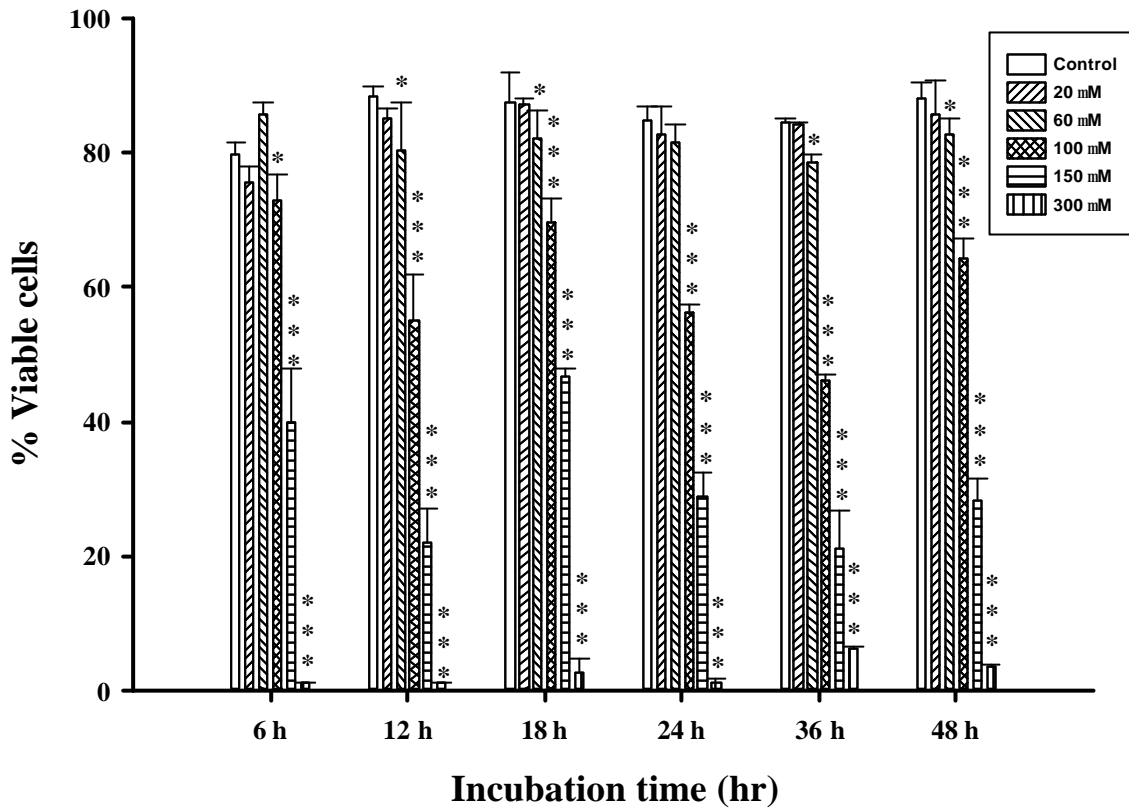


Figure 39. Percentage of viable SC-M1 cells after cotreatment with different doses of flavone for 6, 12, 18, 24, 36 and 48 hrs incubated. After the treatment of various concentrations of flavone, cells were harvested PI stain and assayed for % viable cells by FACS analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean± SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

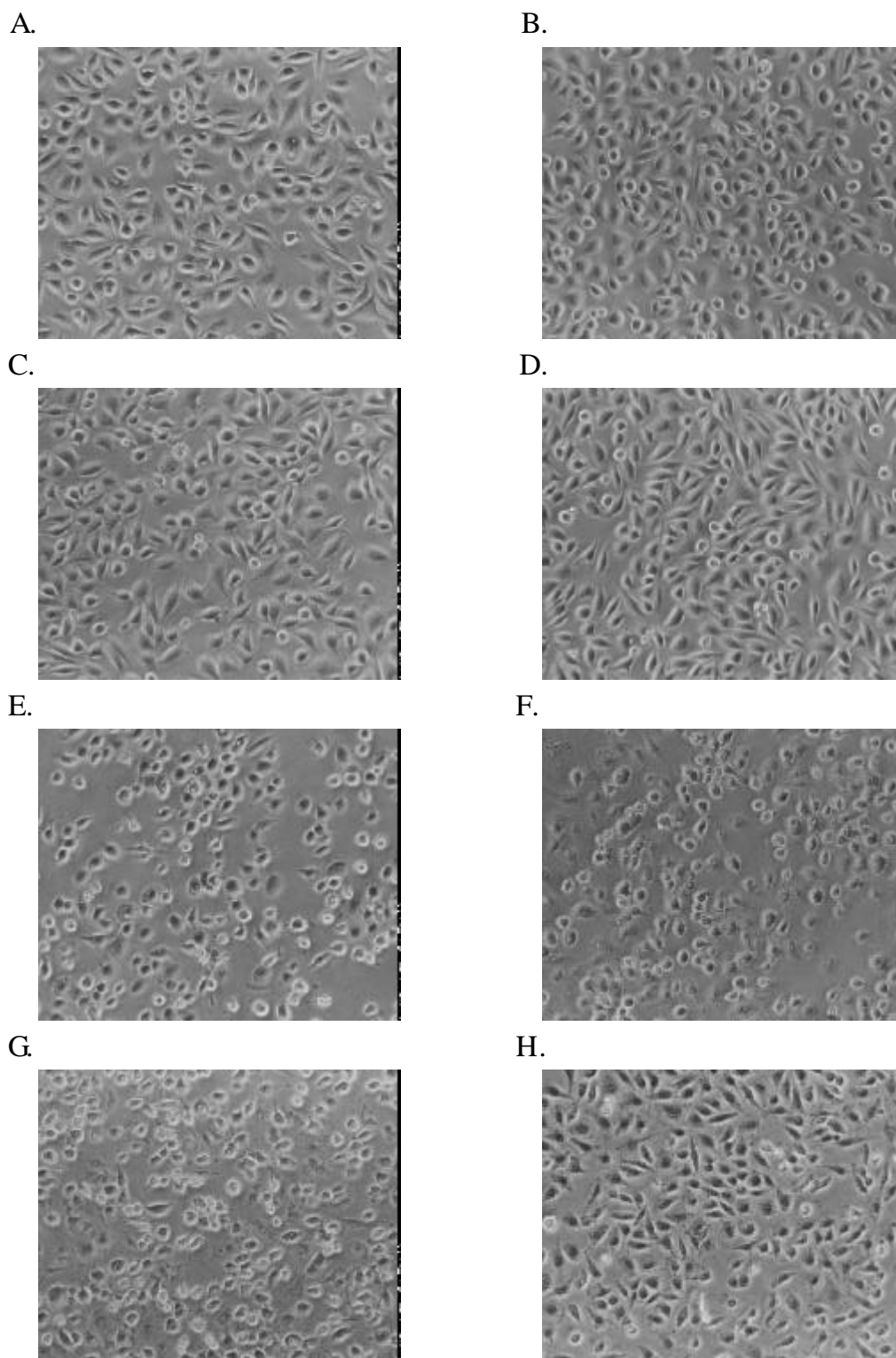


Figure 40. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to flavone for 6 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x).
A : Control, B : 0.6 μ M, C : 6 μ M, D : 20 μ M, E : 60 μ M, F : 100 μ M, G : 150 μ M, H : 300 μ M.

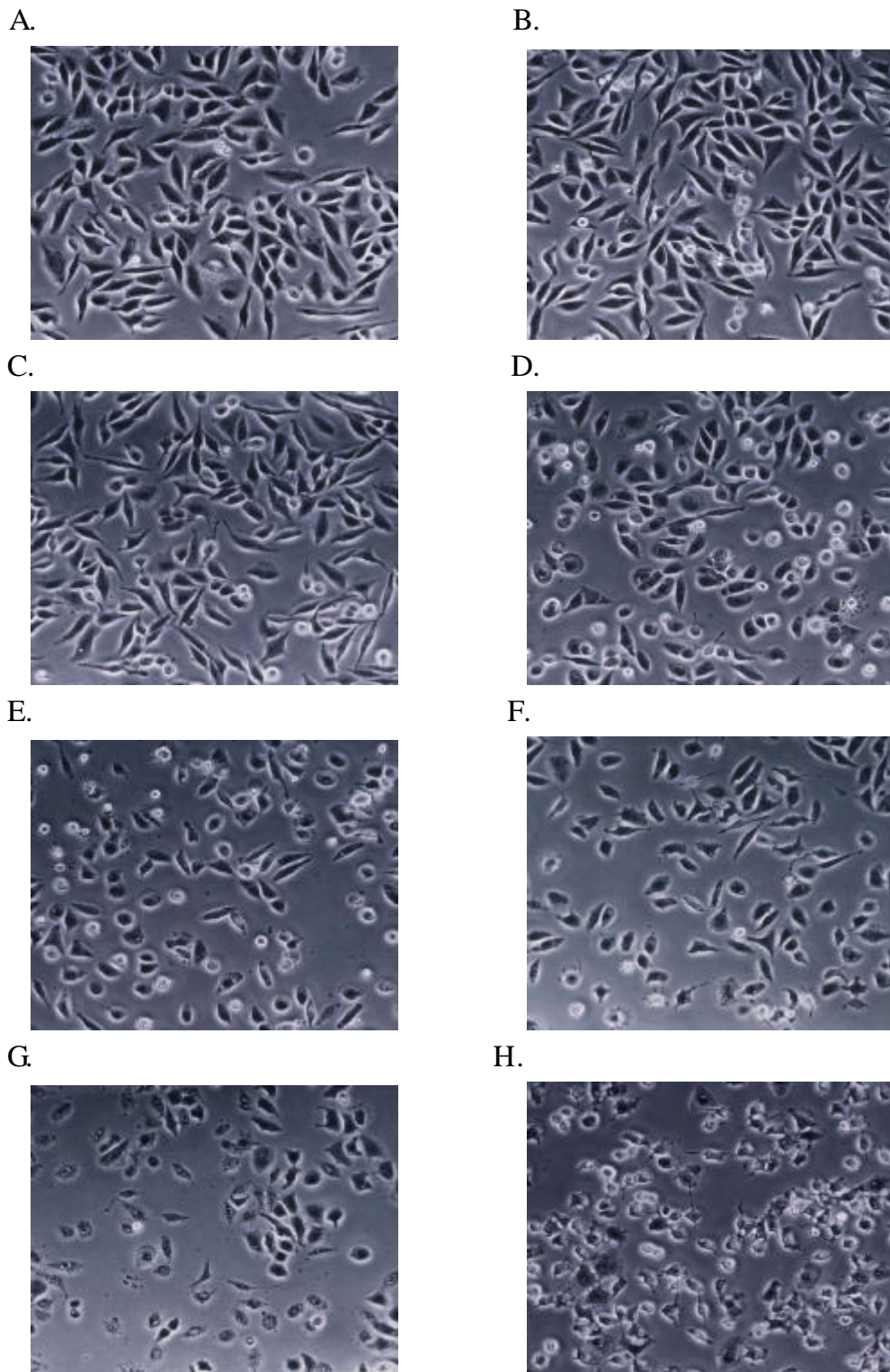


Figure 41. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to flavone for 12 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.6 μ M, C : 6 μ M, D : 20 μ M, E : 60 μ M, F : 100 μ M, G : 150 μ M, H : 300 μ M.

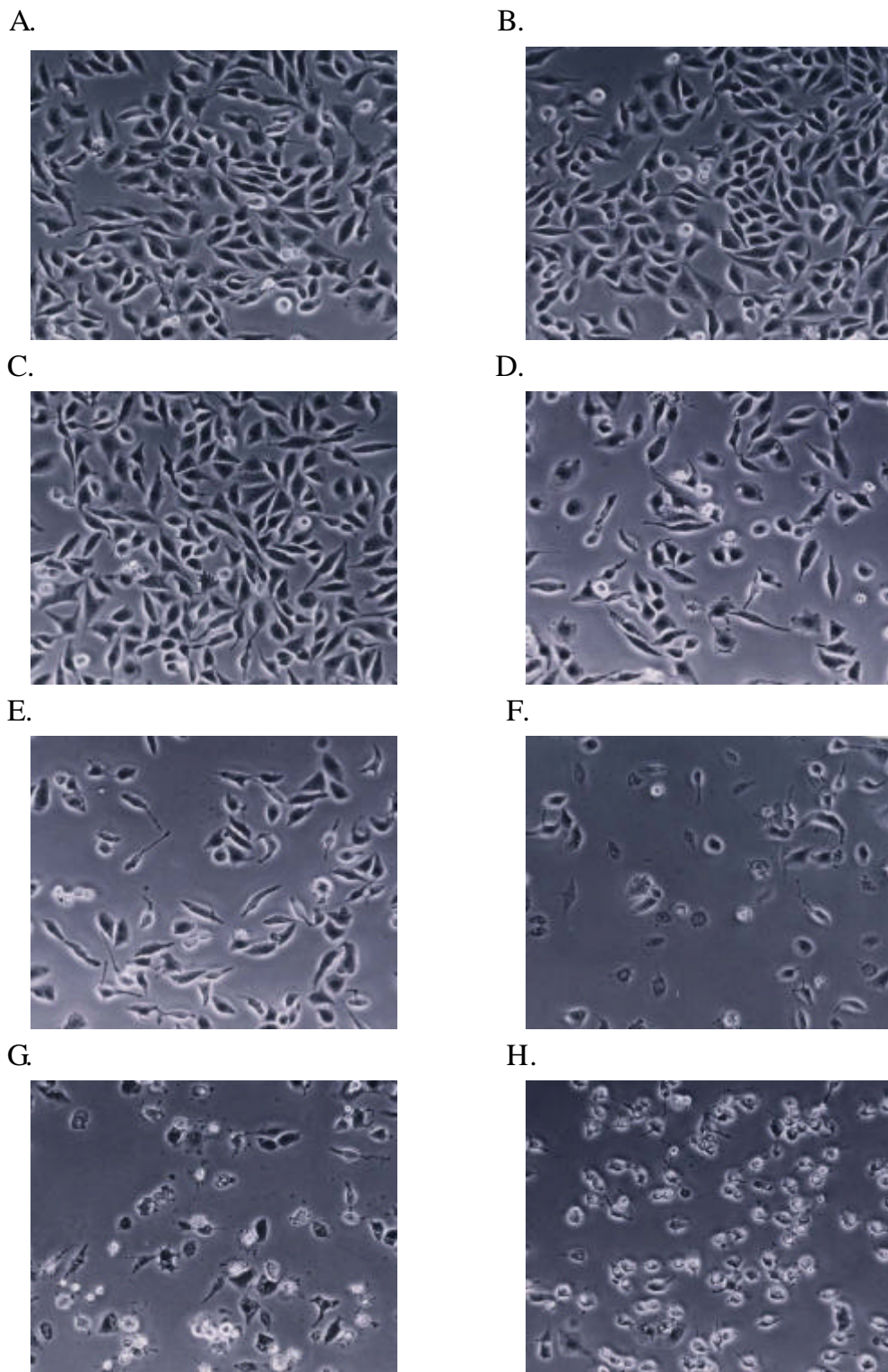


Figure 42. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to flavone for 18 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.6 μ M, C : 6 μ M, D : 20 μ M, E : 60 μ M, F : 100 μ M, G : 150 μ M, H : 300 μ M.

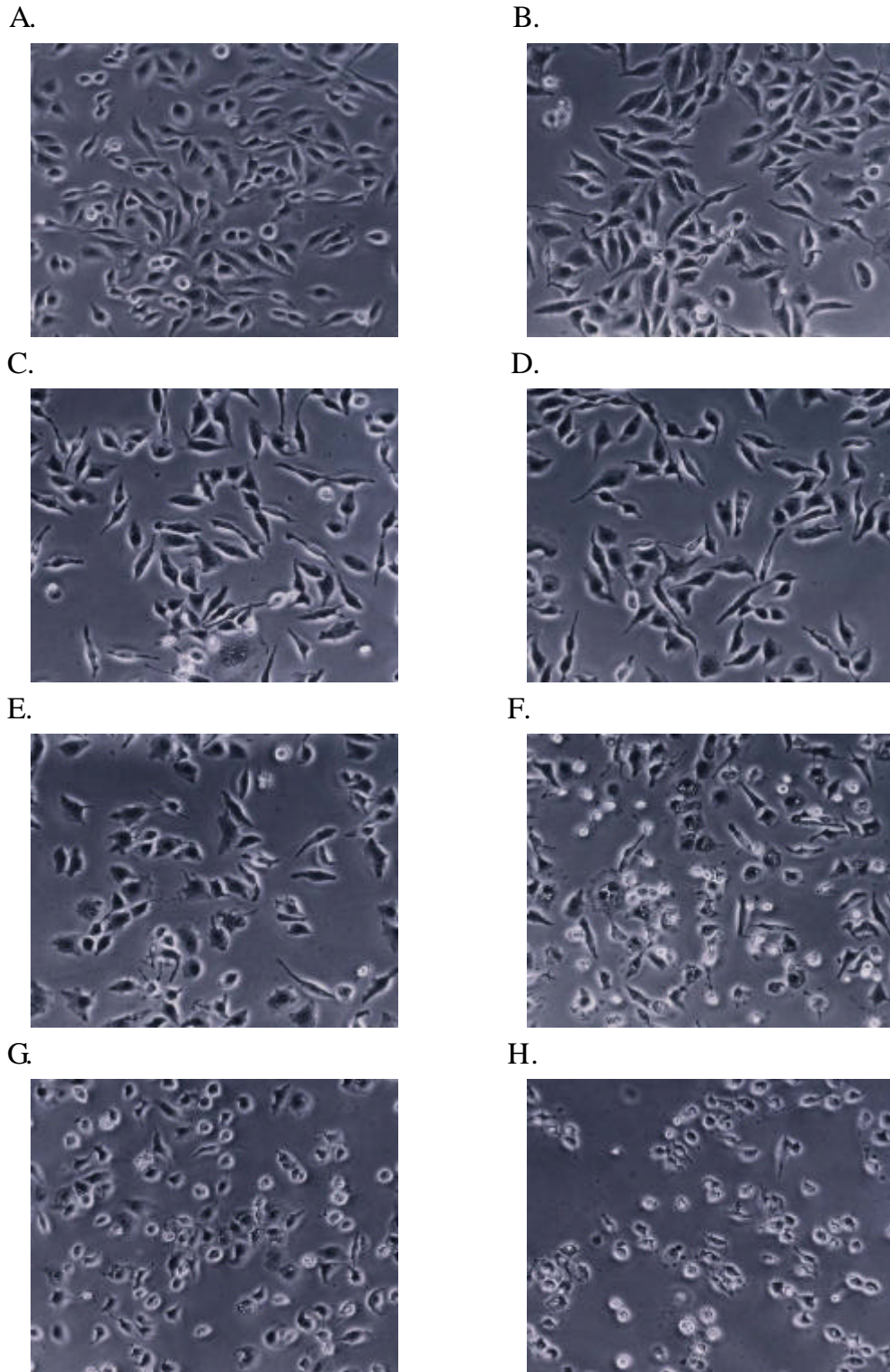


Figure 43. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to flavone for 24 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.6 μ M, C : 6 μ M, D : 20 μ M, E : 60 μ M, F : 100 μ M, G : 150 μ M, H : 300 μ M.

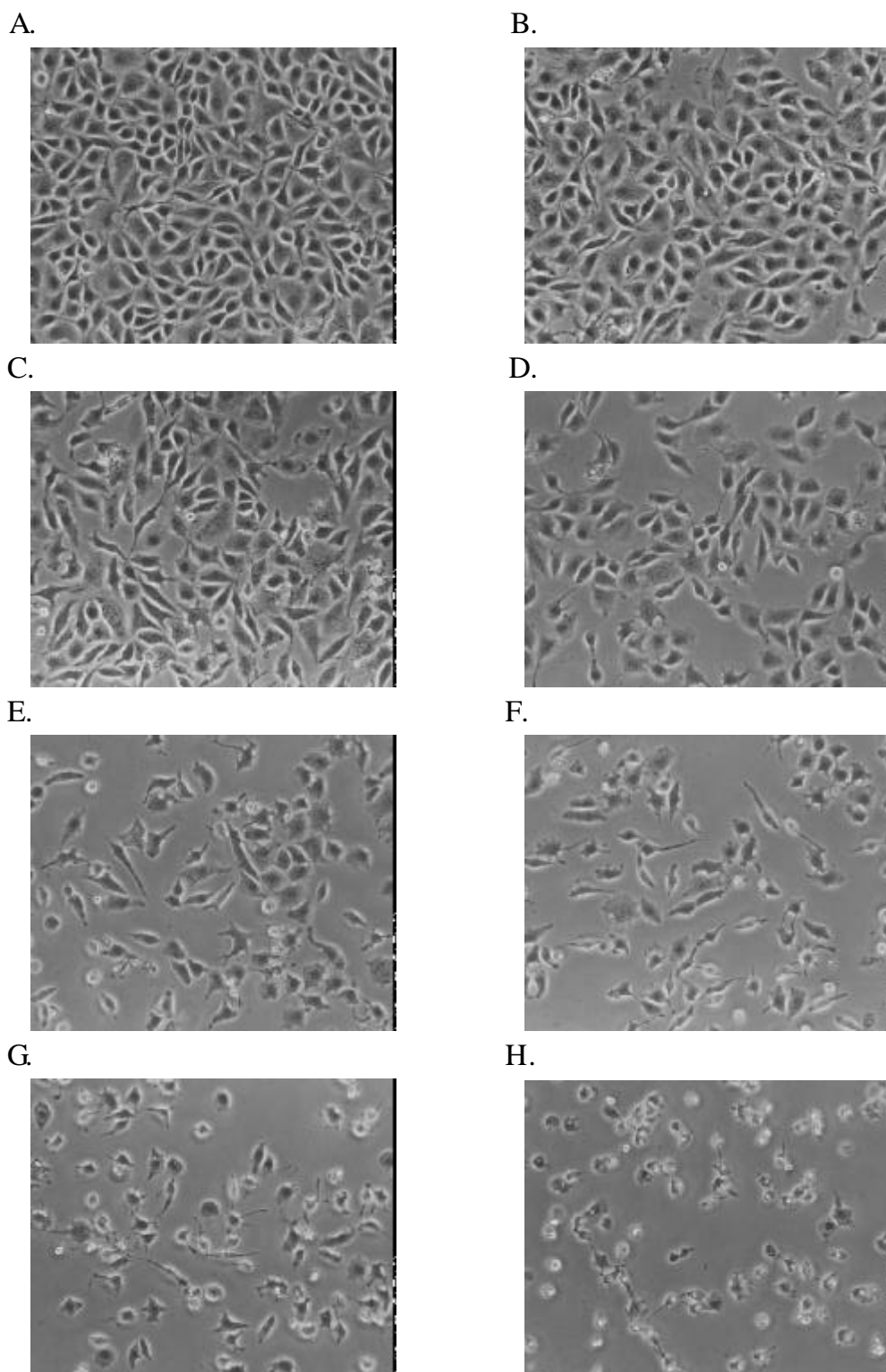


Figure 44. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to flavone for 36 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.6 μ M, C : 6 μ M, D : 20 μ M, E : 60 μ M, F : 100 μ M, G : 150 μ M, H : 300 μ M.

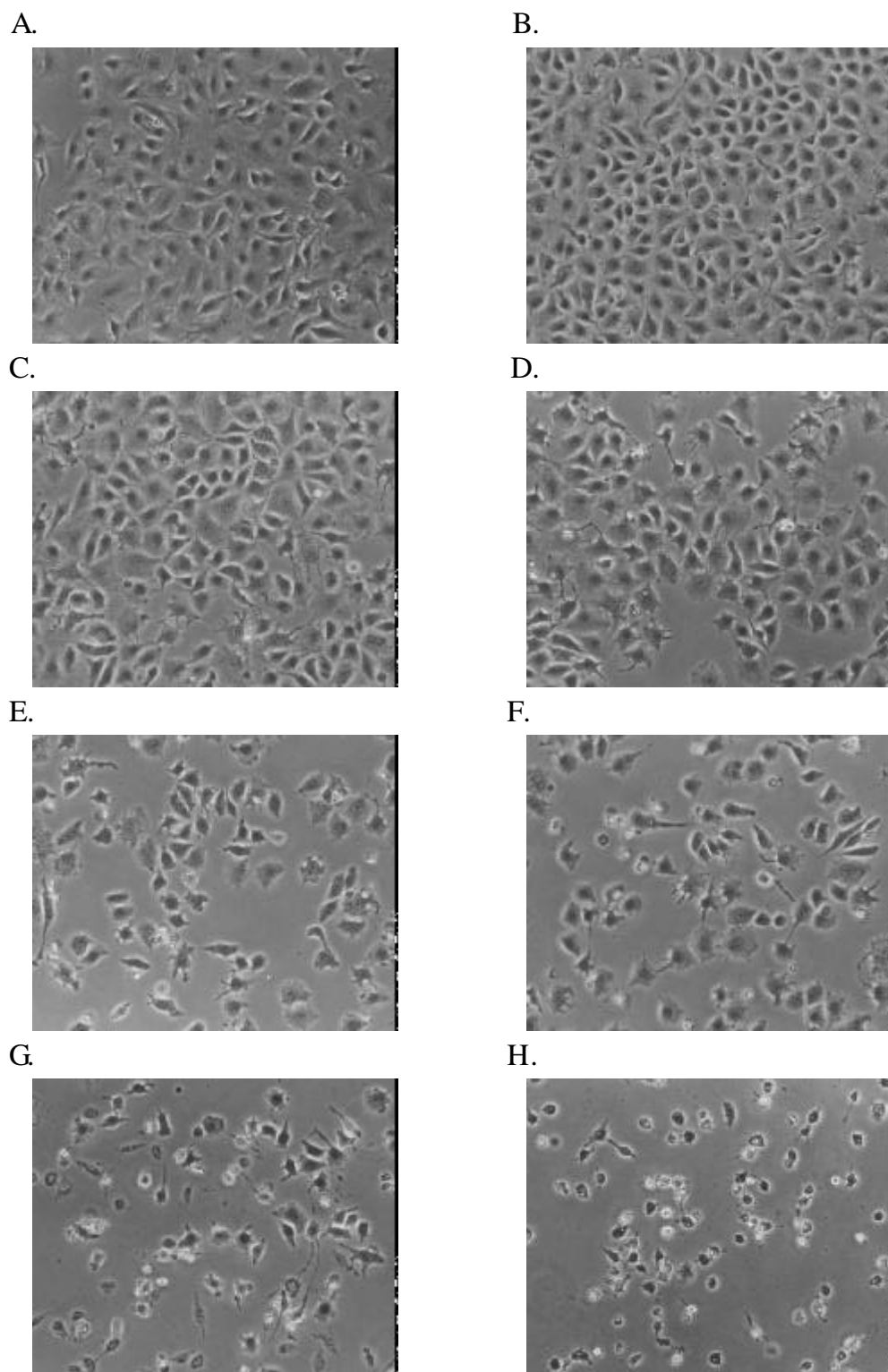
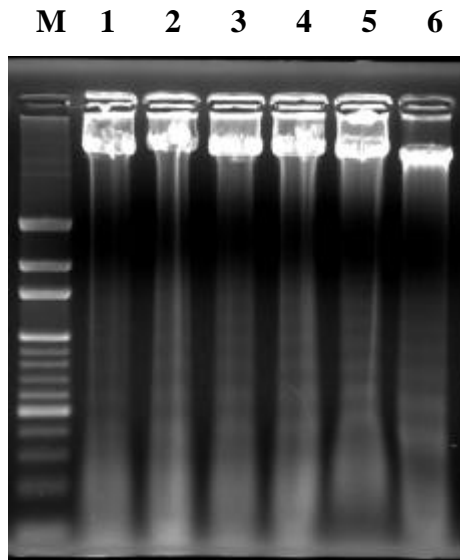


Figure 45. The morphology of human stomach cancer (SC-M1) cells after exposure to flavone for 48 hr then were examined and photographed by phase microscope (200x). A : Control, B : 0.6 μ M, C : 6 μ M, D : 20 μ M, E : 60 μ M, F : 100 μ M, G : 150 μ M, H : 300 μ M.

A.



B.

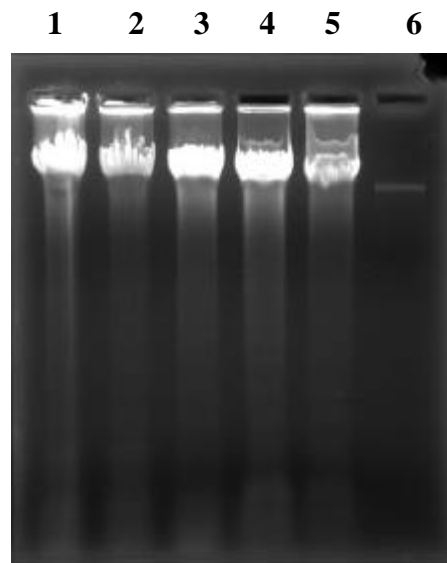


Figure 46. An agarose electrophoresis of DNA from human stomach cancer cell line (SC-M1) after exposure to various concentrations of flavone for 24 and 48 hr. M : DNA makers ; Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 20 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M.

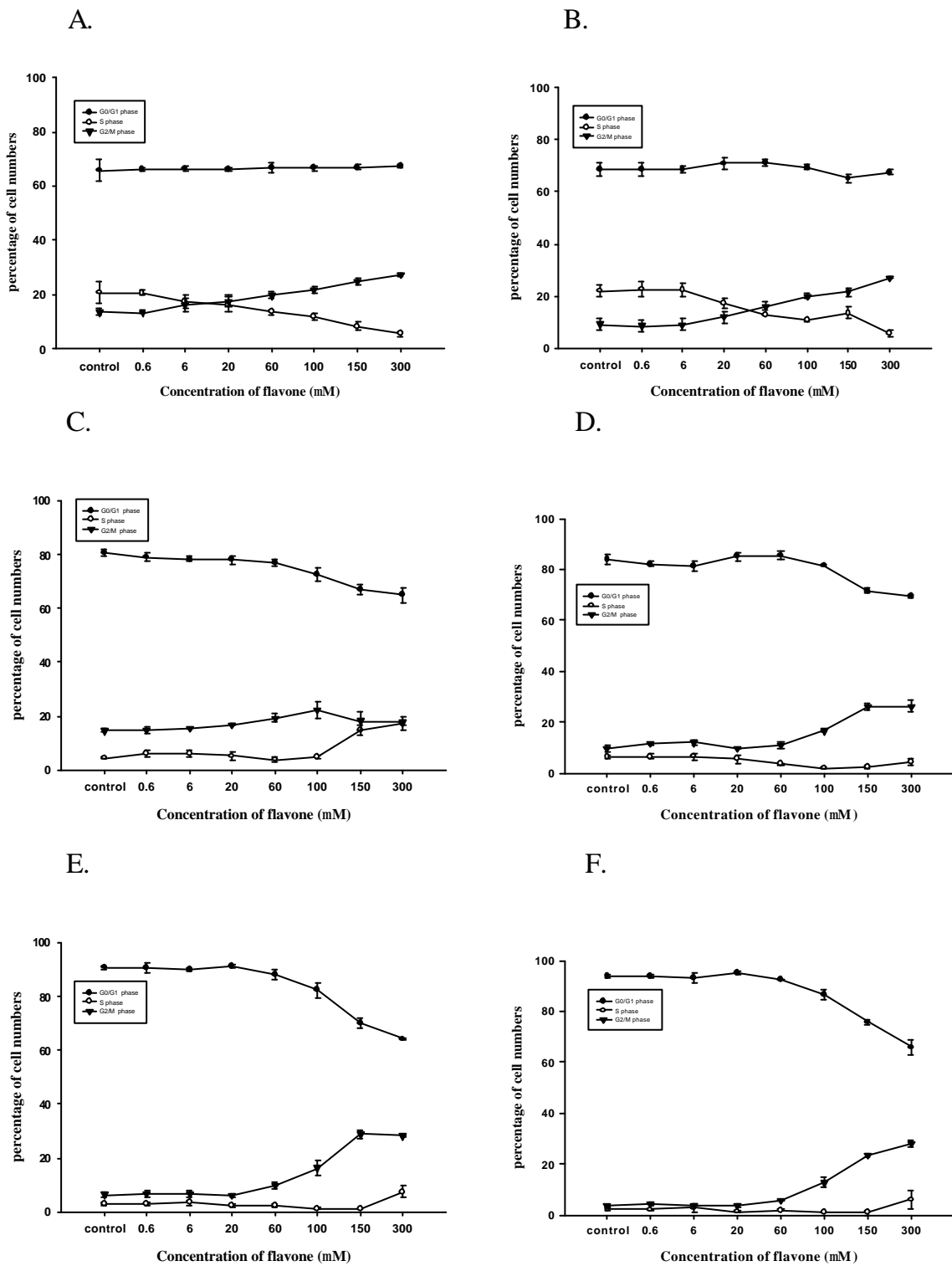


Figure 47. The cell cycle distribution of SC-M1 cells growing in the percentage of different doses of flavone for (A) 6hr, (B) 12 hr, (C) 18 hr, (D) 24 hr, (E) 36 hr or (F) 48 hr incubated. After the treatments of cells which were analyzed by FACS for cells.

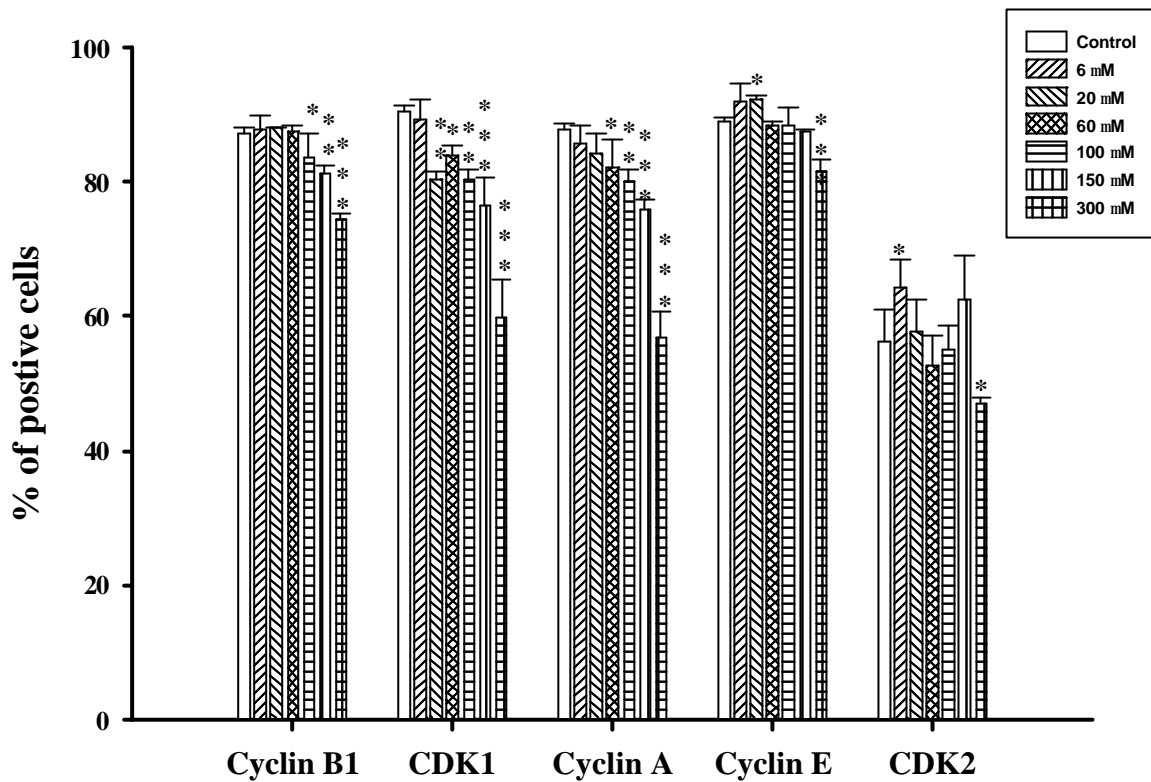


Figure 48. The data analysis for intracellular cyclins distribution of human stomach cancer (SC-M1) cells repressing in the presence of different doses of flavone for 24 hr. The cell cyclins were analyzed by FACS. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean± SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

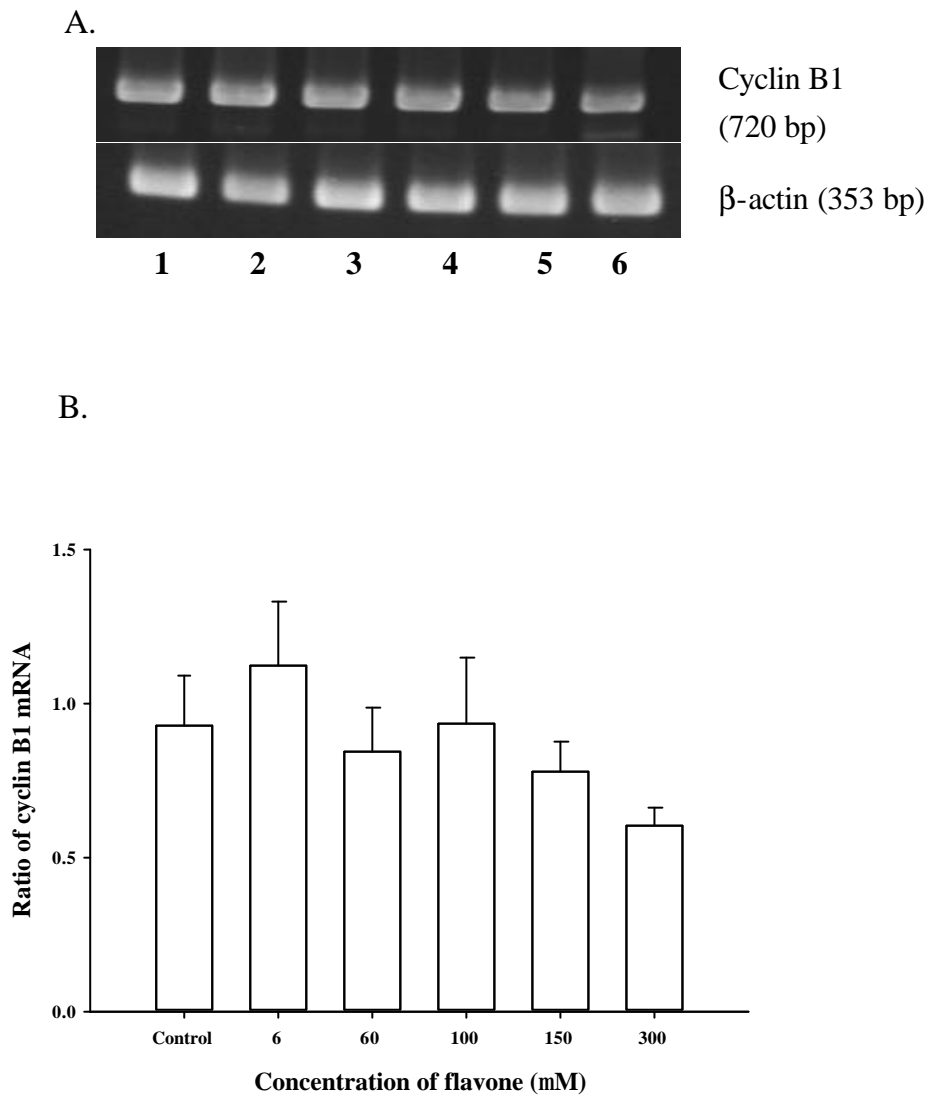
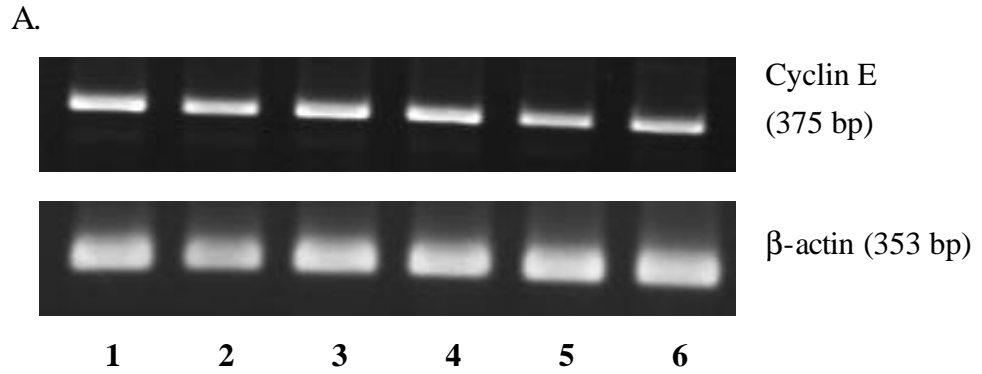


Figure 49. RT-PCR analysis of cyclin B1 and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of flavone. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 60 μ M ; Lane 4 : 100 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M (B) The statistic figure of p21 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2



B.

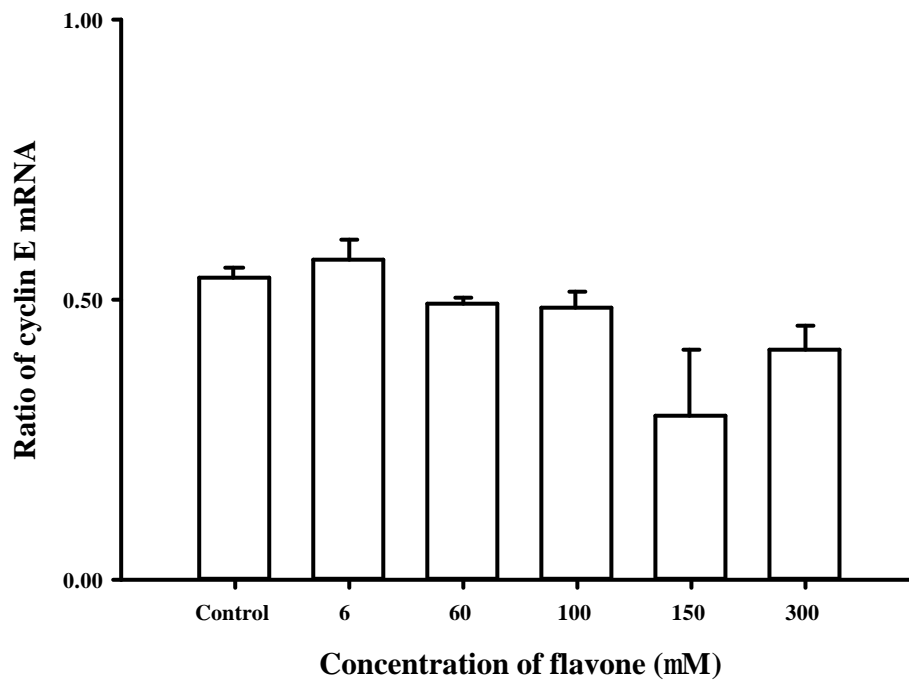
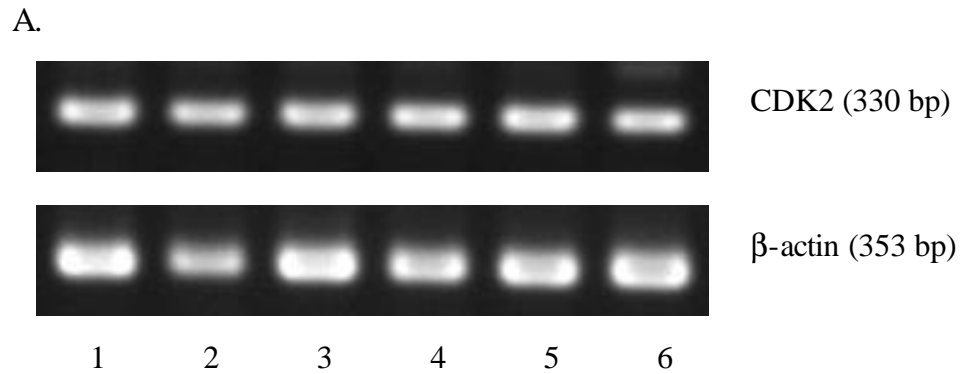


Figure 50. RT-PCR analysis of cyclin E and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of flavone. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 60 μ M ; Lane 4 : 100 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M (B) The statistic figure of p21 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2



B.

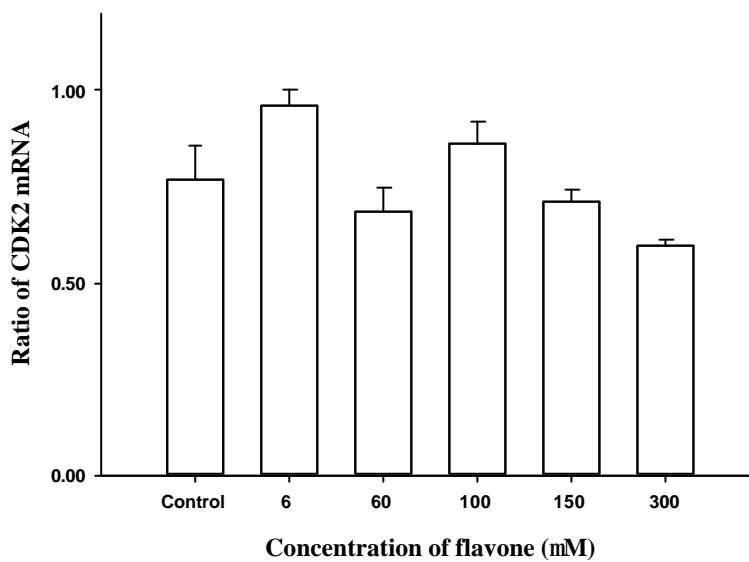


Figure 51. RT-PCR analysis of CDK2 and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of flavone. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 60 μ M ; Lane 4 : 100 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M (B) The statistic figure of p21 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

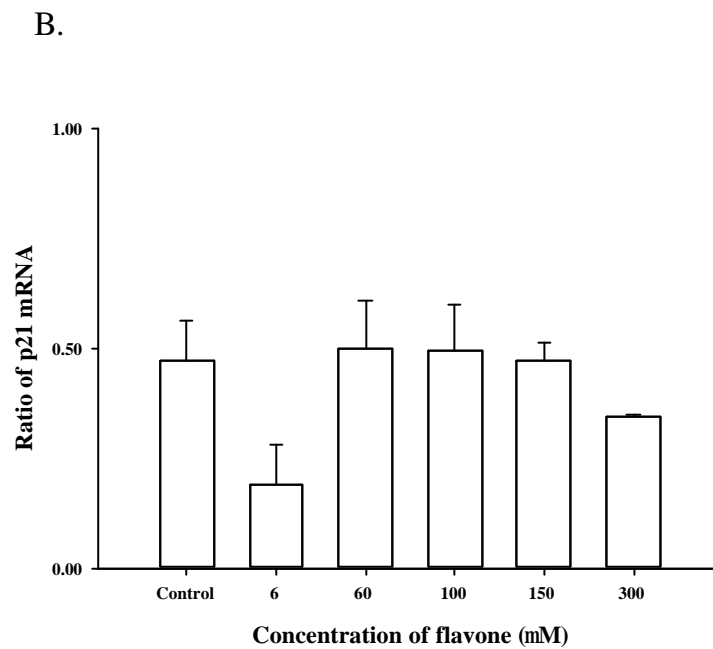
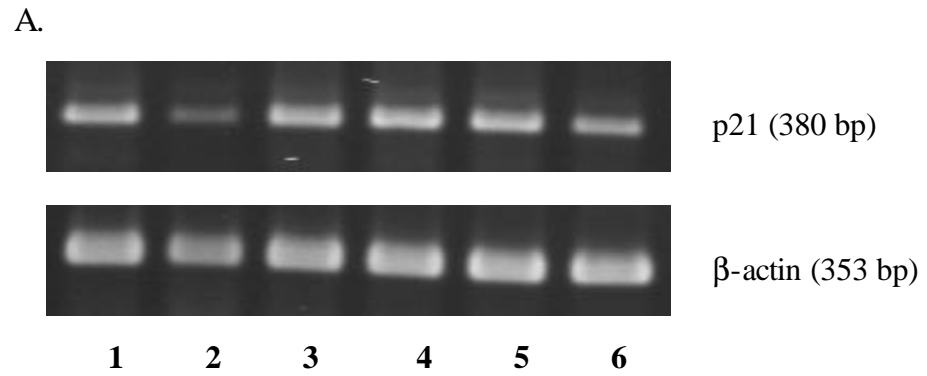


Figure 52. RT-PCR analysis of p21 and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of flavone. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 60 μ M ; Lane 4 : 100 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M (B) The statistic figure of p21 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

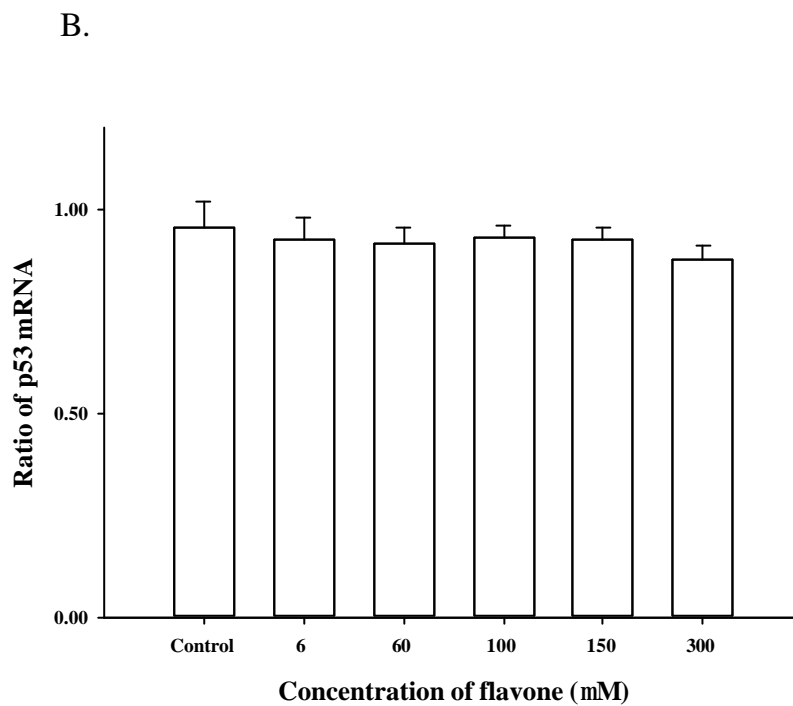
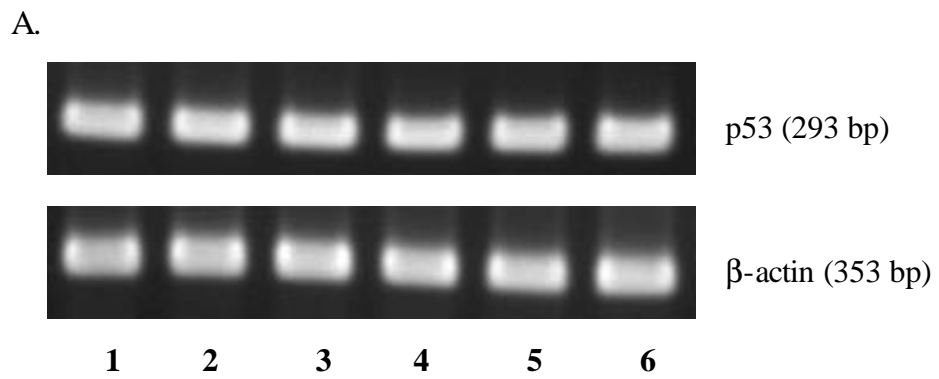


Figure 53. RT-PCR analysis of p53 and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of flavone. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 60 μ M ; Lane 4 : 100 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M (B) The statistic figure of p21 mRNA levels. Values are mean \pm SD n= 2

第三節 對人類胃癌細胞株基因表現的方面

1. 利用 DD RT-PCR 方法偵測 apigenin 17 α -estradiol 和 flavone 對 SC-M1 細胞基因表現的影響

利用 mRNA 鑑別展示(DD RT-PCR)找出所有受藥物影響的基因接著將有差異的 band 取下後進行核酸序列分析。如表六及表七是經 NCBI 基因庫比對之結果。如 Figure 54 至 Figure 59 及表六結果顯示胃癌細胞受 17 α -estradiol (E2)影響的基因共有 32 個，有 12 個基因被誘導表現，有 20 個基因表現被抑制，其中 9 個基因是未知的。受 flavone 影響基因共有 22 個，有 5 個被誘導表現，有 17 個基因被抑制其中有 3 個是屬於未知的基因。如 Figure 60 至 64 及表七受 apigenin 影響的基因共有 47 個基因，有 25 個被誘導表現，有 22 個基因被抑制其中有 17 個是屬於未知的基因。

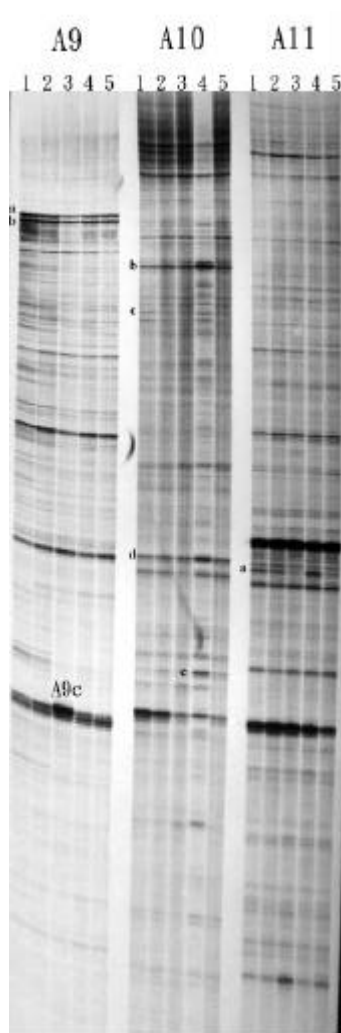


Figure 54. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR after exposure to various doses of 17 α -estradiol and flavone for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 17 α -estradiol 6 μ M, Lane 3 : 17 α -estradiol 60 μ M, Lane 4 : flavone 6 μ M, Lane 5 : flavone 60 μ M.

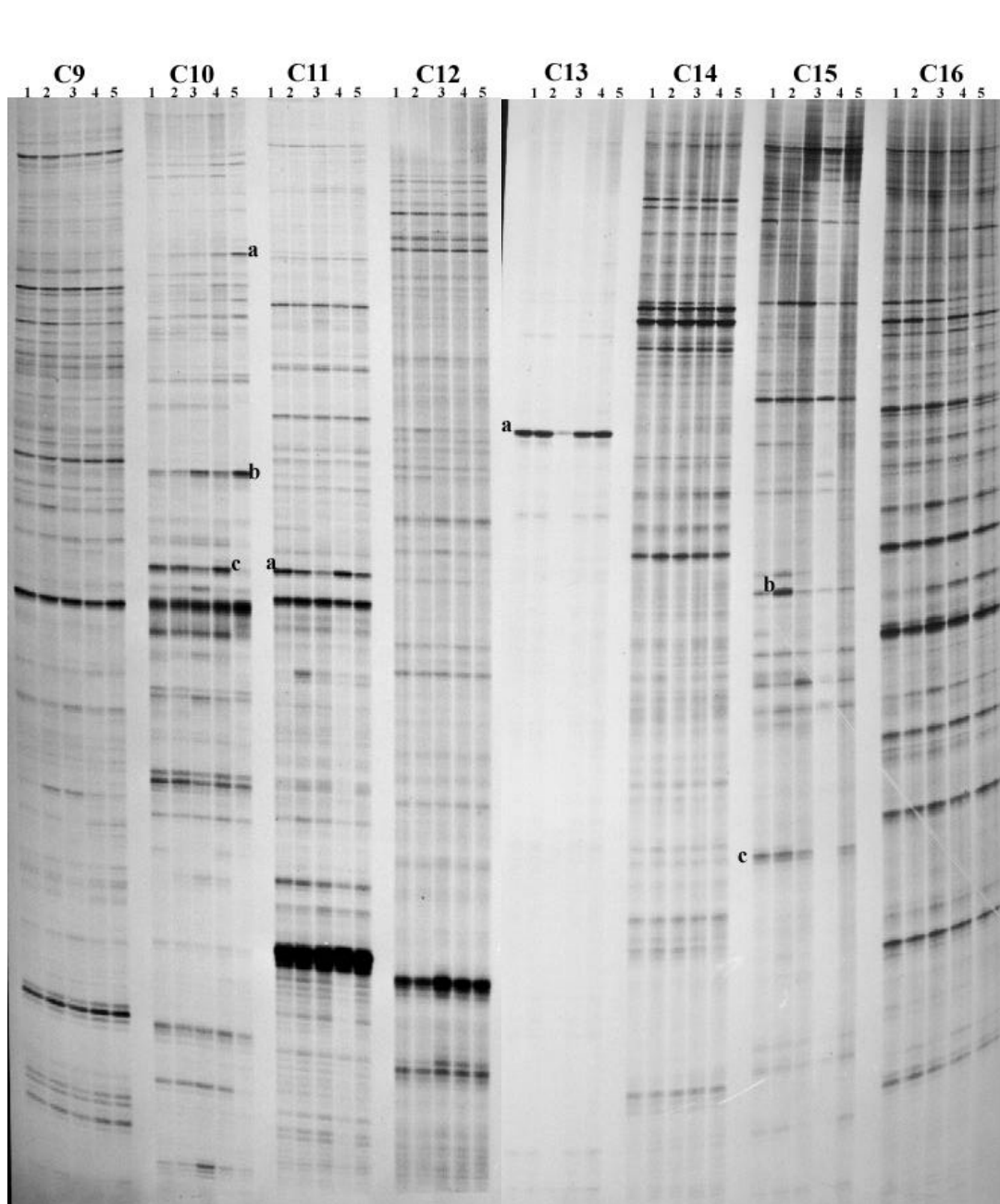


Figure 55. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR after exposure to various doses of 17α-estradiol and flavone for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 17α-estradiol 6 μM, Lane 3 : 17α-estradiol 60 μM, Lane 4 : flavone 6 μM, Lane 5 : flavone 60 μM.

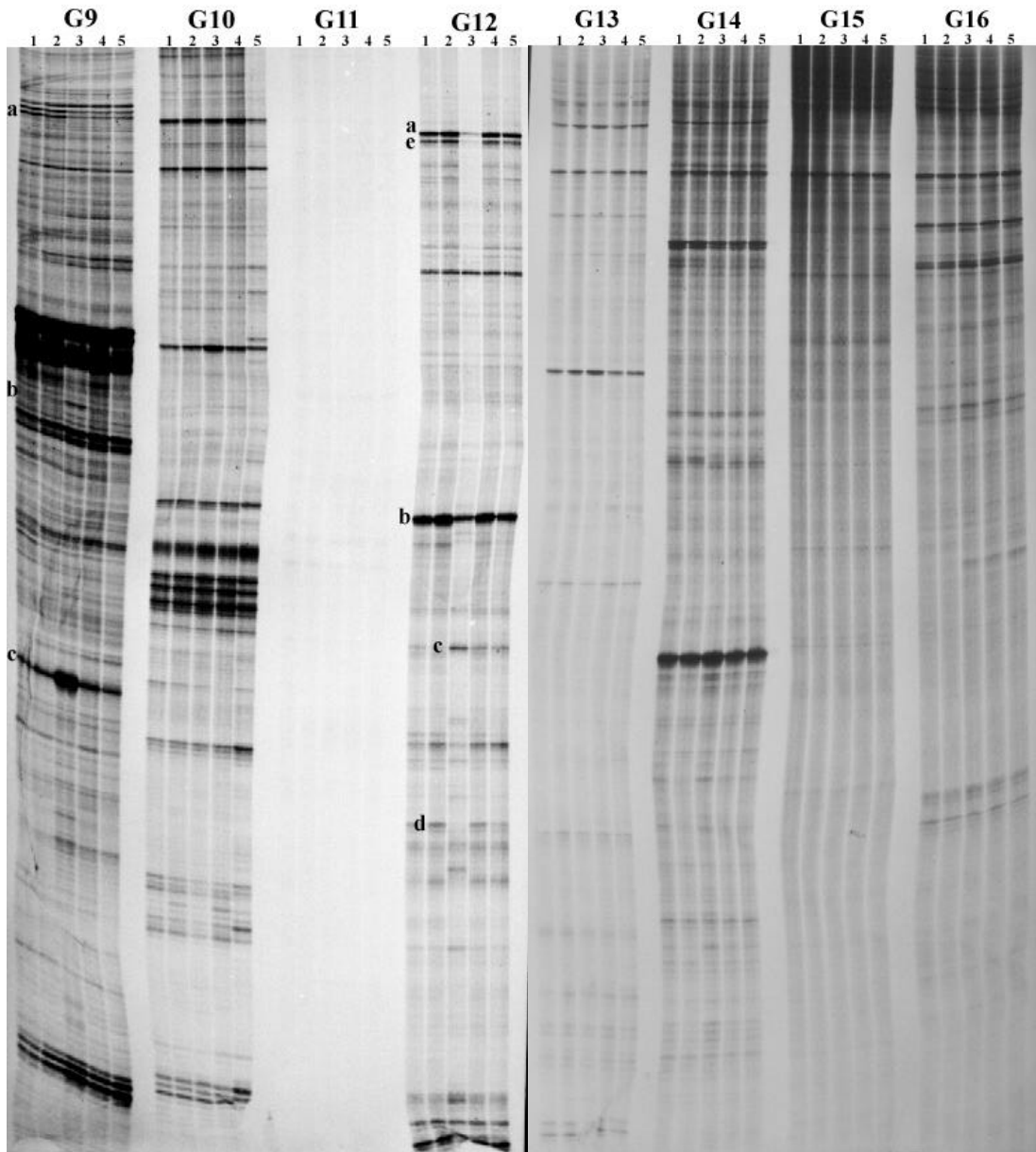


Figure 56. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR after exposure to various doses of 17α-estradiol and flavone for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 17α-estradiol 6 μM, Lane 3 : 17α-estradiol 60 μM, Lane 4 : flavone 6 μM, Lane 5 : flavone 60 μM.

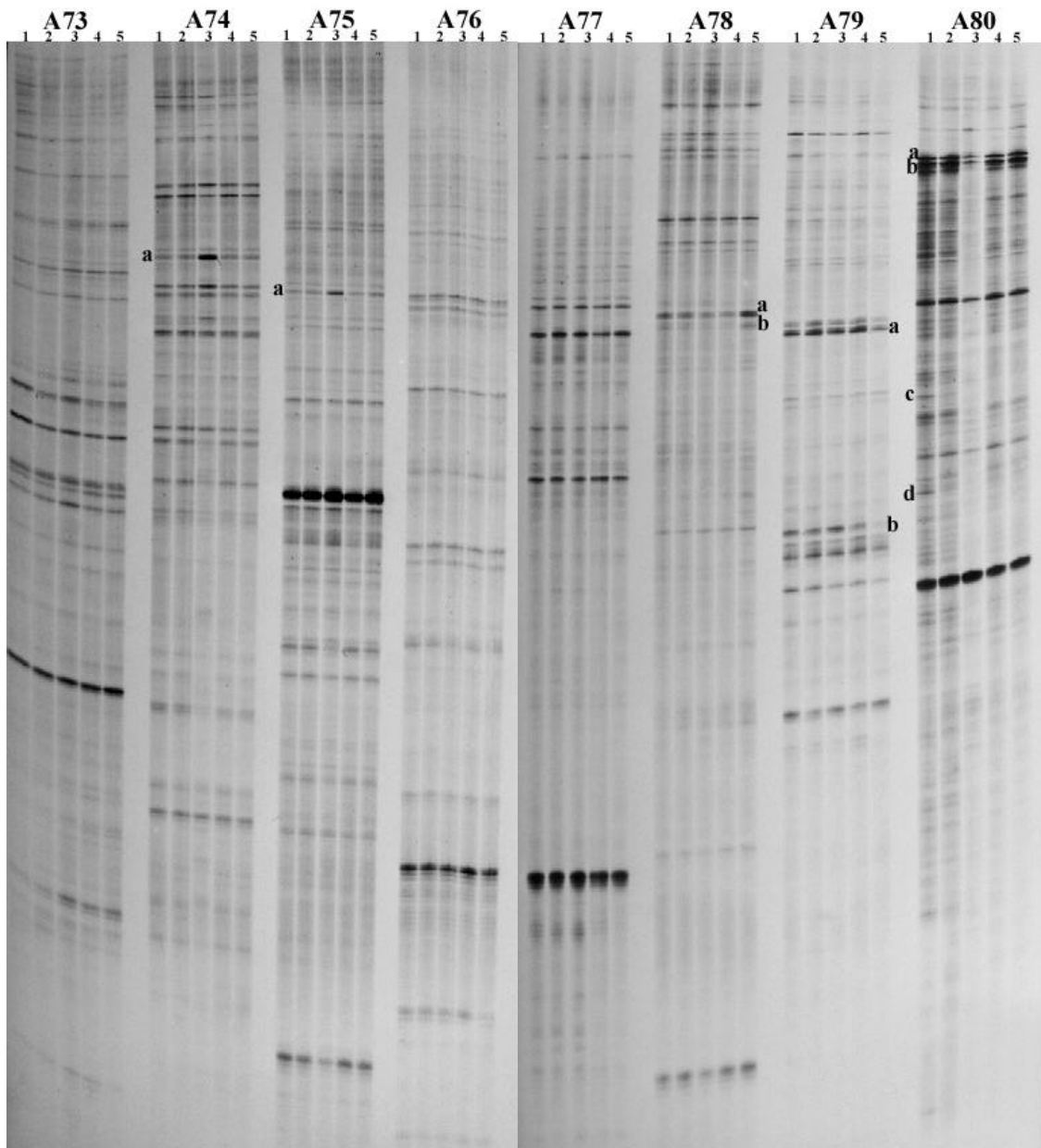


Figure 57. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR after exposure to various doses of 17α -estradiol and flavone for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 17α -estradiol 6 μ M, Lane 3 : 17α -estradiol 60 μ M, Lane 4 : flavone 6 μ M, Lane 5 : flavone 60 μ M.

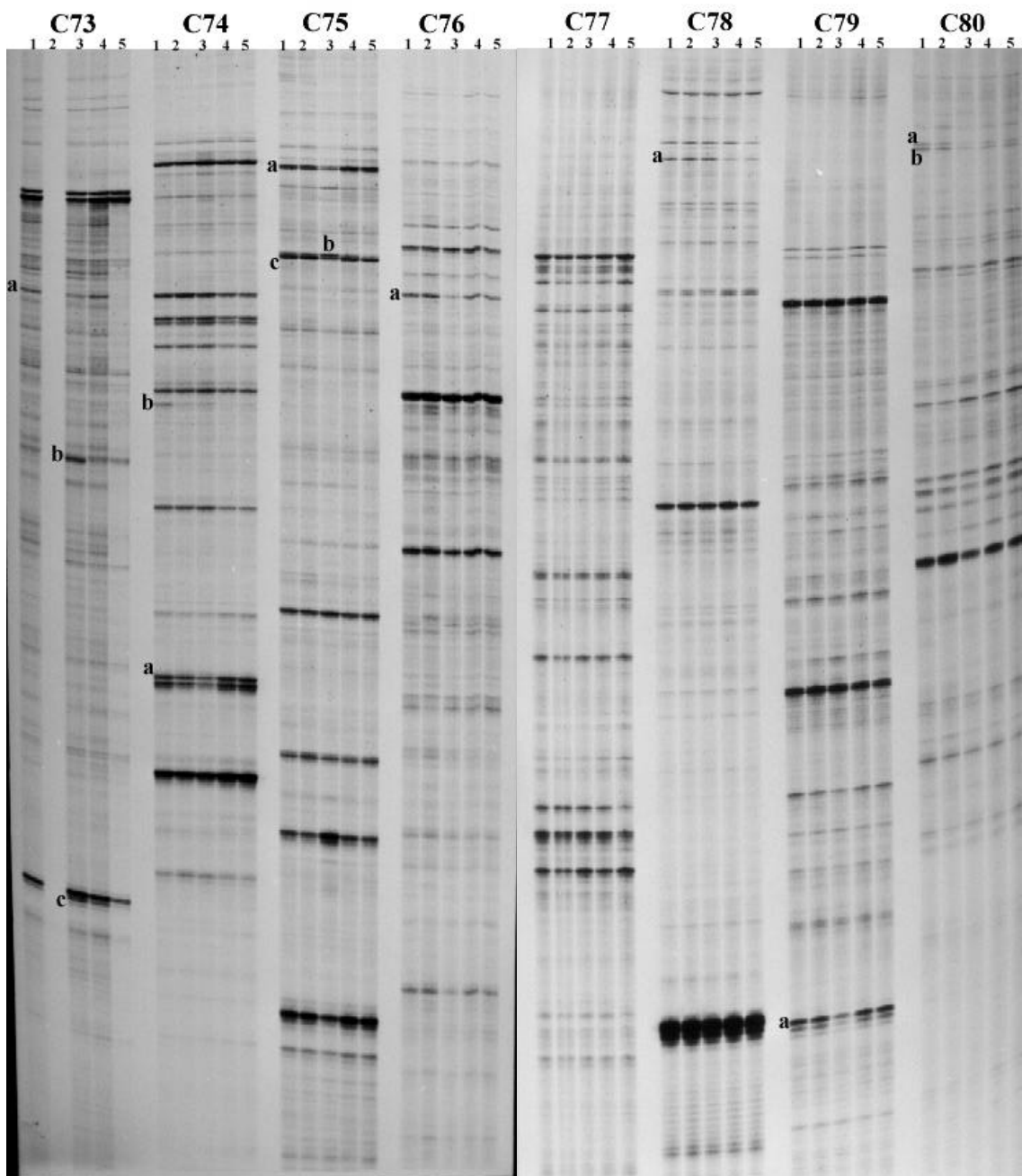


Figure 58. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR after exposure to various doses of 17α-estradiol and flavone for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 17α-estradiol 6 μM, Lane 3 : 17α-estradiol 60 μM, Lane 4 : flavone 6 μM, Lane 5 : flavone 60 μM.

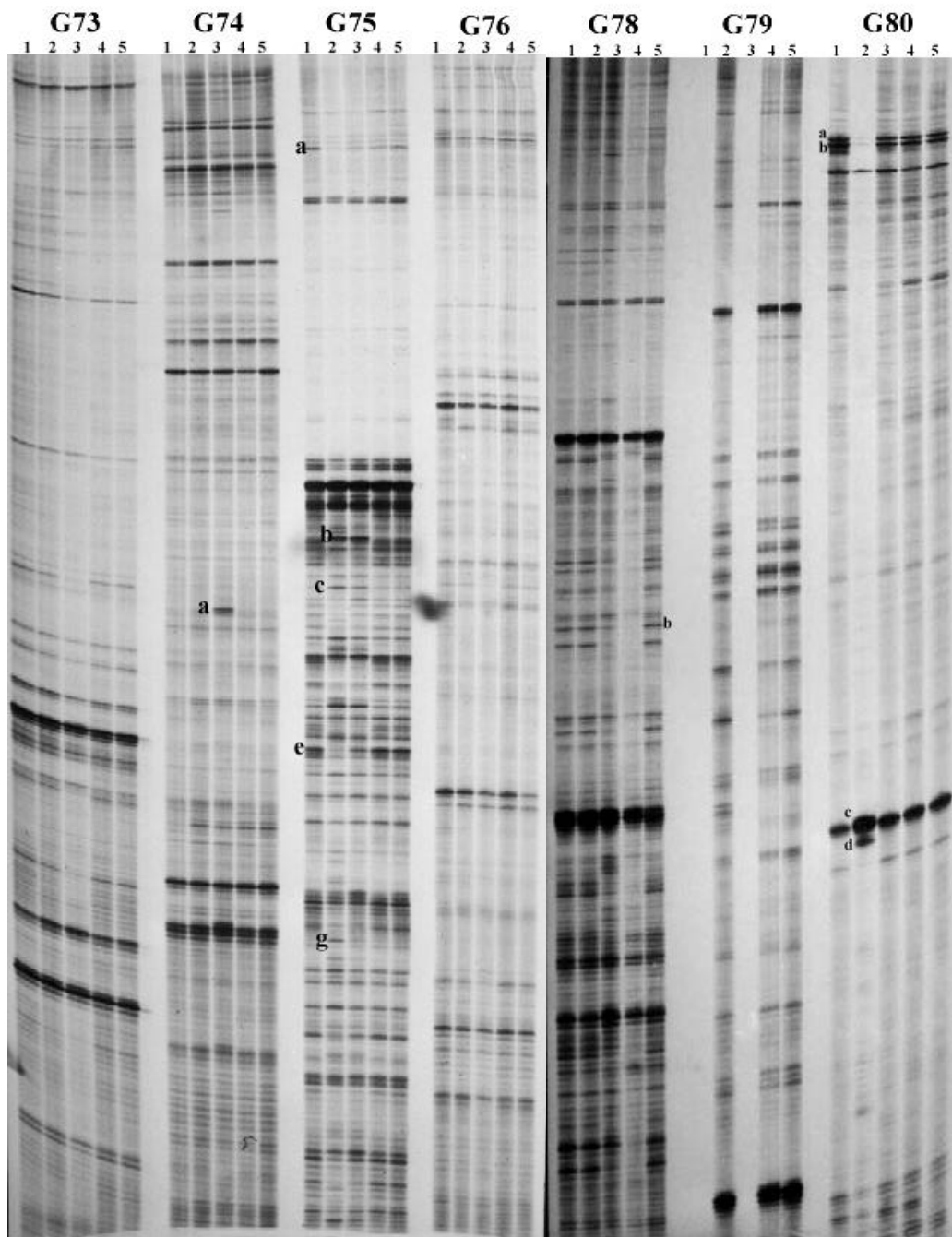


Figure 59. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR after exposure to various doses of 17α-estradiol and flavone for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 17α-estradiol 6 μM, Lane 3 : 17α-estradiol 60 μM, Lane 4 : flavone 6 μM, Lane 5 : flavone 60 μM.

表六：胃癌細胞受 17 α -estradiol (E)和 flavone (F)影響的所有基因

PCR No.	Sequence result	Induced	Inhibit
1. A9a, A9b (E)	Cytochrome b (Mitochondrion)		+
2. A9c (E)	Similared Oncostatin M receptor	+	
3. A10b (F)	Chromodomain- helicase-DNA-binding protein	+	
4. A10c (E, F)	NADH dehydrogenase subunit 2		+
5.A10d (F)	Homo sapiens cDNA: FLJ22135 fis, clone HEP20858	+	
6.A10e (F)	No-homology	+	
7. A10f (E, F)	Cytochrome C oxidase subunit III		+
8.A11a (E, F)	Similar to unknow HERV-H protein		+
9.C10a (F)	Hypothetical protein	+	
10. C10b (E, F)	Sodium bicarbonate cotransporter 2b	+	
11.C10c (F)	Hypothetical protein		+
12.C11a (E, F)	Similar to unknow HERV-H protein		+
13.C13a (E)	no-homology		+
14.C15b (E)	no-homology	+	
15.C15c (F)	Cytochrome c oxidase subunit I		+
16.G9a (E)	Cytochrome b		+
17.G9b (E)	Similared Oncostatin M protein	+	
18.G9c (E)	Similared Oncostatin M protein	+	
19.G12a, G12d (E)	Homo sapiens, clone IMAGE: 4081483, mRNA		+
20.G12b (E)	Hypothetical protein		+
21.G12c (E) (homo with G12e)	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	+	
22.G12e (E)	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2		+
23.A74a (E)	Hypothetical protein	+	
24.A75a (E)	No-homology	+	
25.A78a, A78b (E, F)	Adenomatosis polyposis coli (APC)		+
26.A79a (F)	Chromosome 4		+
27.A79b (F)	Chromosome 6q16 2-21		+
28.A80a, A80b (E)	ATP synthase 6		+
29.A80c (E)	No-homology		+
30.A80d (E)	No-homology		+

表六(續)：胃癌細胞受 17 α -estradiol (E)和 flavone (F)影響的所有基因

31.C73a (F)	No-homology		+
32.C73b (E)	Mycoplasma hyorhinis strain BTS7 16S ribosomal RNA	+	
33.C73c (F)	Chromosome 6q12-14.3		+
34.C74a (E)	Proliferation-associated gene (peroxiredxin 1)		+
35.C74b (F)	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase		+
36.C75a (E)	No-homology		+
37.C75b (F)	No-homology		+
38.C75c (E)	Ubiquitin protein ligase E3A		+
39.C76a (E)	Chromosome 19		+
40.C78a (F)	NAC		+
41.C79a (E)	No-homology		+
42.C80a, C80b (E, F)	ATP synthase 6		+
43.G74a (E)	Ribosomal protein L10 (hypothetical protein)	+	
44.G75a (F)	No-homology		+
45.G75b (E)	IQ motif containing GTPase activating protein 1	+	
46.G75c (E)	No-homology	+	
47.G75e (E)	No-homology		+
48.G75g (E)	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor (monocyte/macrophile elastase inhibitor gene)	+	
49.G78b (E, F)	Human DNA sequence from clone 191J18 on chromosome 6q16.1-22.33, complete sequence		+
50.G80a, G80b (E)	ATP synthase 6		+
51.G80c, G80d (E)	Chromosome 13	+	

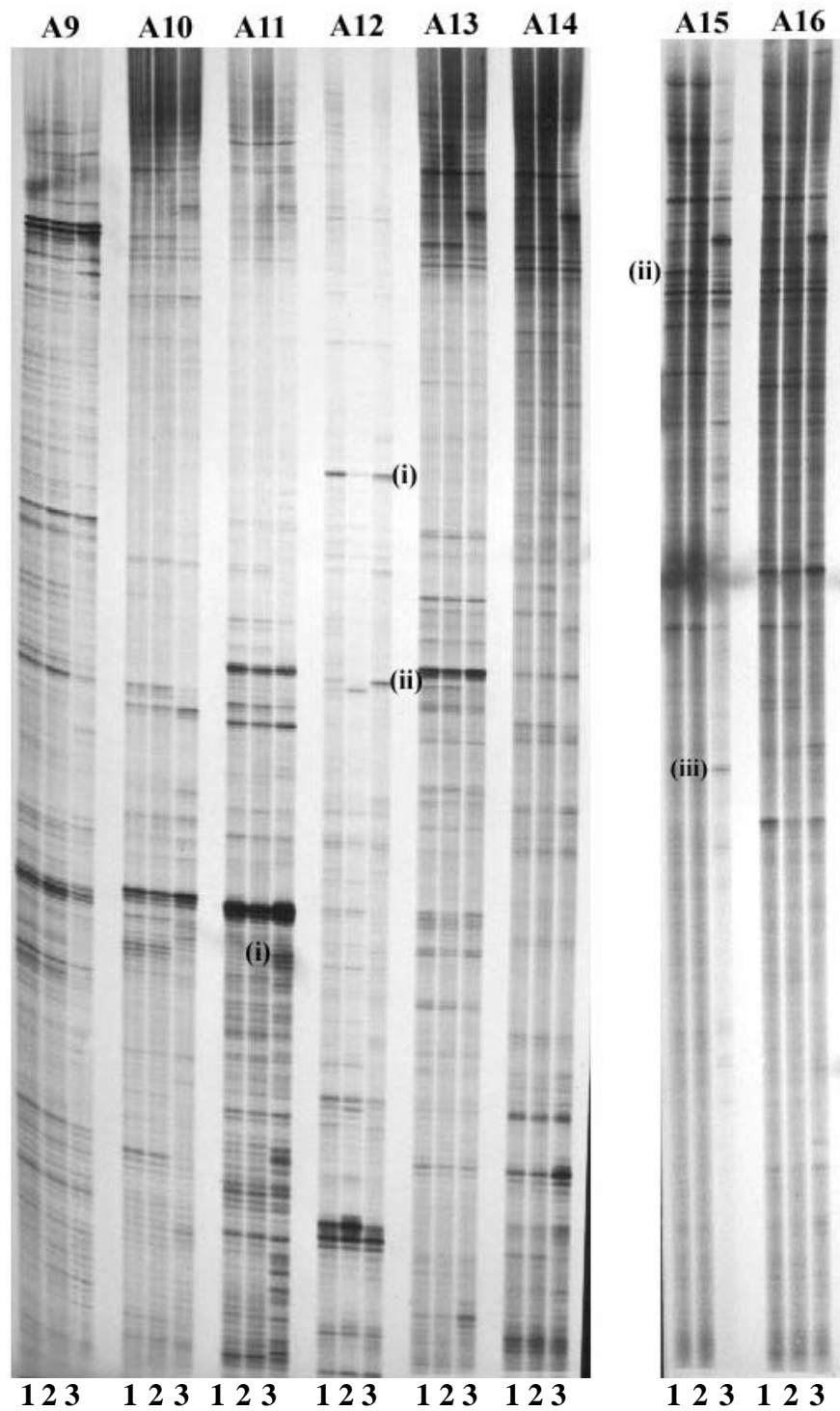


Figure 60. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR after exposure to various doses of apigenin for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 6 μ M, Lane 3 : 60 μ M.

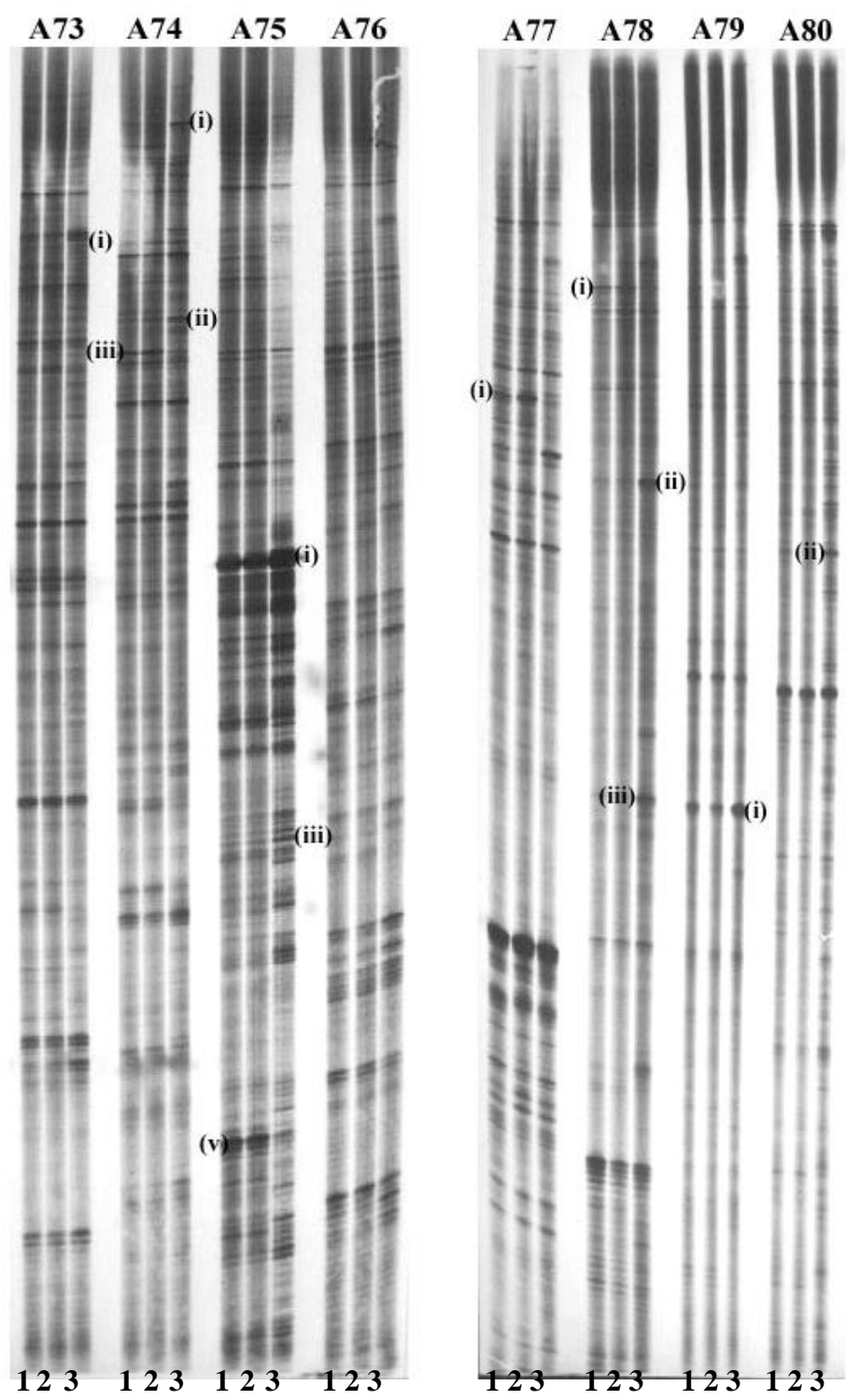


Figure 61. The gel electrophoresis of the product from DD RT-PCR after exposure to various doses of apigenin for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 6 μM, Lane 3 : 60 μM.

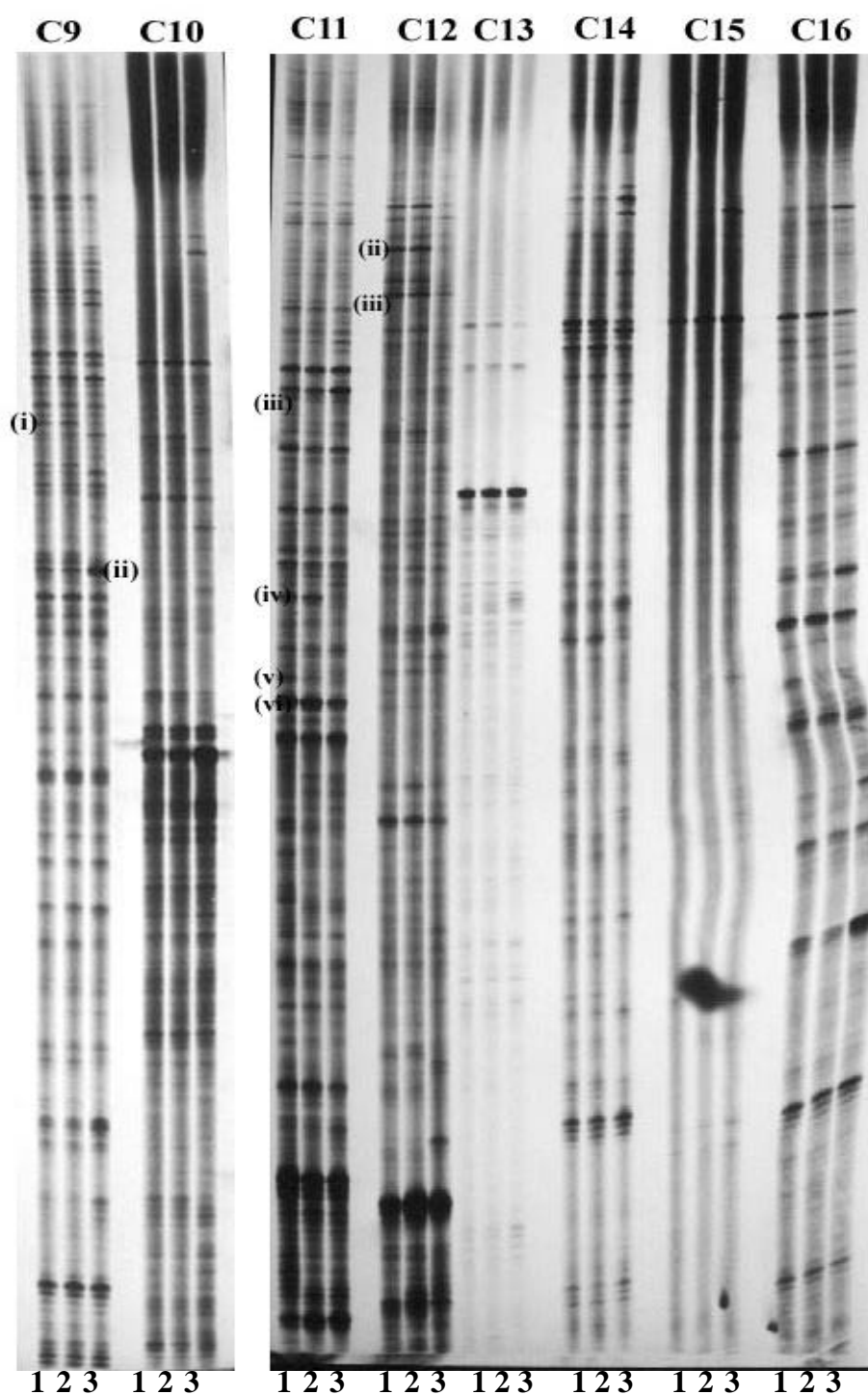


Figure 62. The gel electrophoresis of the product from DD RT-PCR after exposure to various doses of apigenin for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 6 μ M, Lane 3 : 60 μ M.

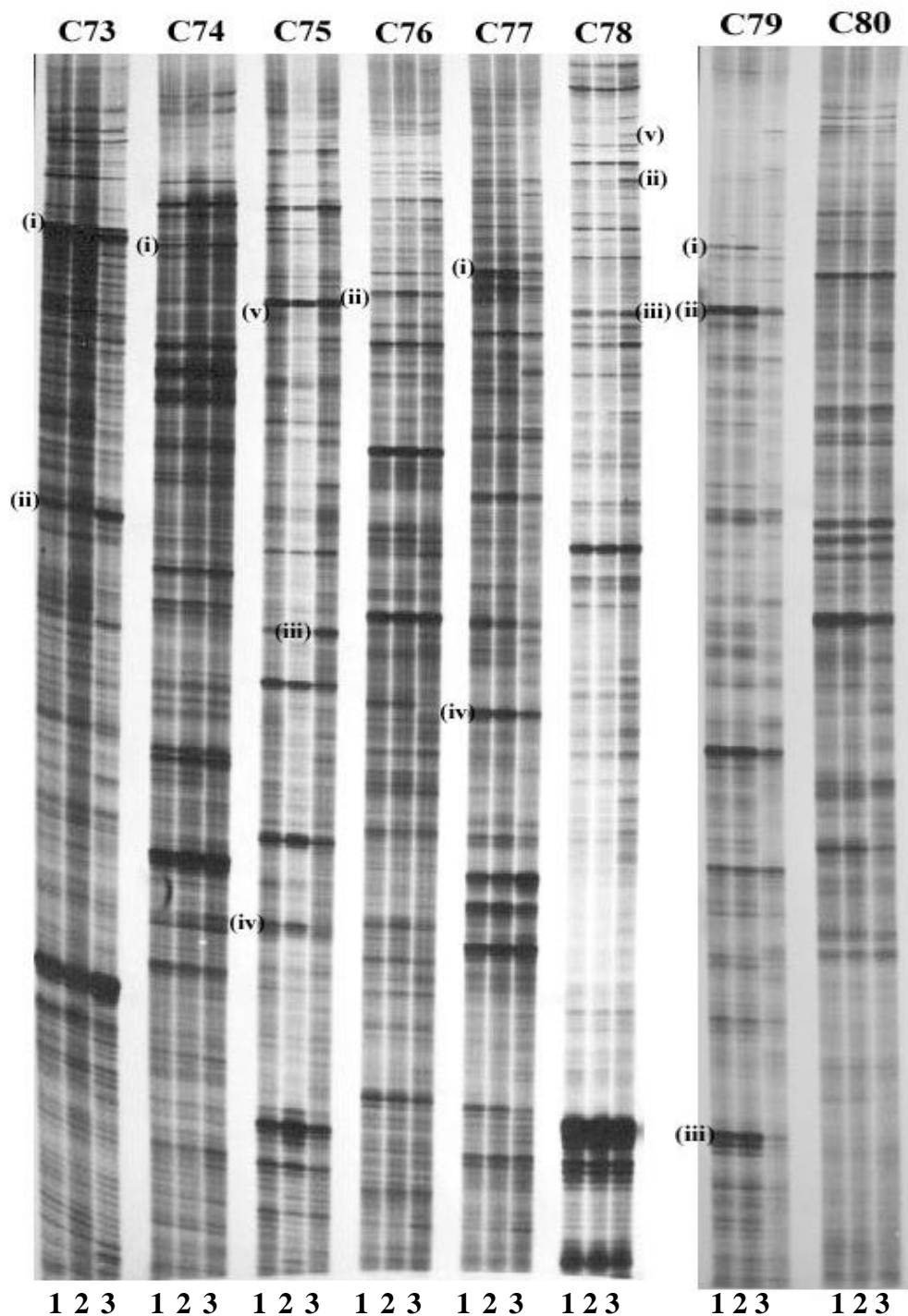


Figure 63. The gel electrophoresis of the product from DD RT-PCR after exposure to various doses of apigenin for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 6 μM, Lane 3 : 60 μM.

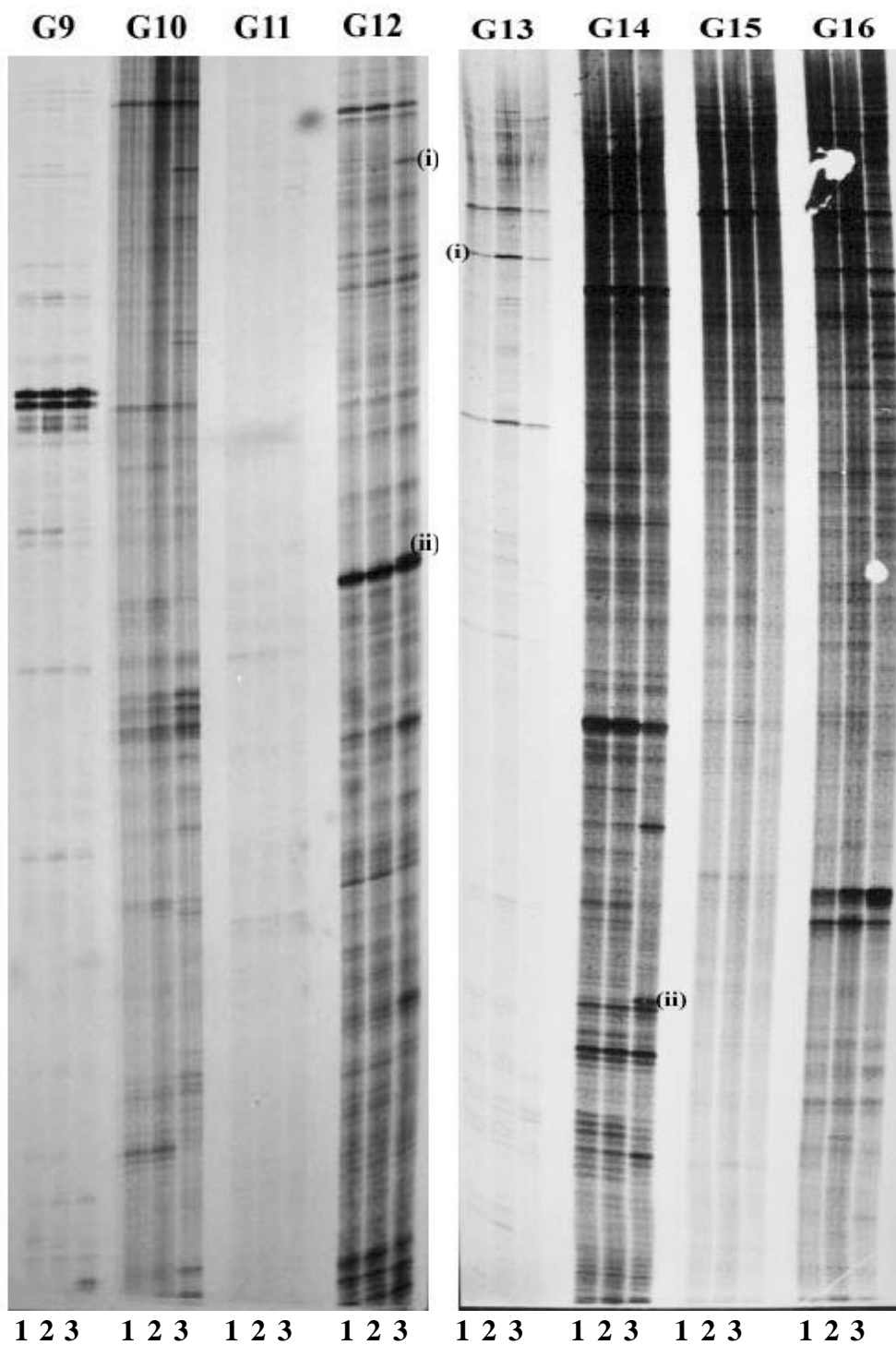


Figure 64. The gel electrophoresis of the product from DD RT-PCR after exposure to various doses of apigenin for treatment 24 h. Lane 1 : DMSO, Lane 2 : 6 μ M, Lane 3 : 60 μ M.

表七：胃癌細胞受 apigenin 影響的所有基因

PCR No.	Sequence result	Induced	Inhibited
1.A11 (i)	No-homology	+	
2. A12 (i)	Human Xq13 3' end of PAC 92E23 containing the X inactivation transport		+
3. A12 (ii)	No-homology	+	
4. A15 (ii)	ATP synthase 6		+
5. A15 (iii)	No-homology	+	
6. A73 (i)	Chromosome 1 DNA complete sequence	+	
7. A74 (i)	No-homology	+	
8. A74 (ii)	Hypothetical protein DKFZp 761C169	+	
9. A74 (iii)	Chromosome 10 complete sequence		+
10.A75 (i)	GiI1 protein or cystein-rich angiogenic inducer 61	+	
11.A75 (iii)	No-homology	+	
12.A75 (v)	Similar to programmed cell death 6 or similar to probable calcium-binding protein ALG-2		+
13.A77 (i)	Hypothetical protein		+
14.A78 (i)	Voltage-dependent anion channel 3		+
15.A78 (ii)	No-homology	+	
16.A78 (iii)	No-homology	+	
17.A79 (i)	Eukaryotic translation elongation factor 1 2 hypothetical protein	+	
18.A80 (ii)	Chromosome 7	+	
19.C9 (i)	Chromosome 14		+
20.C9 (ii)	No-homology	+	
21.C11 (iii)	TAR DNA binding protein mRNA		+
22.C11 (iv)	Hypothetical protein		+
23.C11 (v)	Hypothetical protein		+
24.C11 (vi)	Chromosome 19		+
25.C12 (ii)	Hypothetical protein		+
26.C12 (iii)	No-homology		+
27.C73 (i)	Chromosome 6		+
28.C73 (ii)	Mycoplasma hyorinis 16S ribosomal mRNA gene	+	
29.C74 (i)	No-homology	+	

表七(續)：胃癌細胞受 apigenin 影響的所有基因

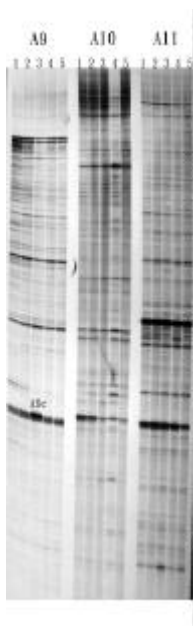
30.C75 (ii)	No-homology	+	
31.C75 (iii)	No-homology	+	
32.C75 (iv)	Serine (orcystein) proteinase inhibitor (monocyte/netrophil elastase inhibitor)		+
33.C75 (v)	Ubiquitin protein ligase E3A (Homology with C75c)		+
34.C77 (i)	Highly similar to Elongation factor 1- 1		+
35.C77 (iv)	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1		+
36.C78 (ii)	No-homology	+	
37.C78 (iii), C78 (v)	No-homology	+	
38.C79 (i)	Netrin 4		+
39.C79 (ii)	Chromosome 4 clone C0315N08		+
40.C79 (iii)	Hypothetical protein PRO2822 (PRO2822)		+
41.G12 (i)	Hypothetical protein PRO2822 (chromosome 10)	+	
42.G12 (ii)	No-homology	+	
43.G13 (i)	No-homology	+	
44.G14 (ii)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H 1	+	
45.G74 (i)	No-homology	+	
46.G76 (i)	Chromosome 17		+
47.G78 (i)	No-homology	+	

2. 檢測 17 α -estradiol 對 SC-M1 細胞的細胞膜上 Oncostatin M receptor 的影響

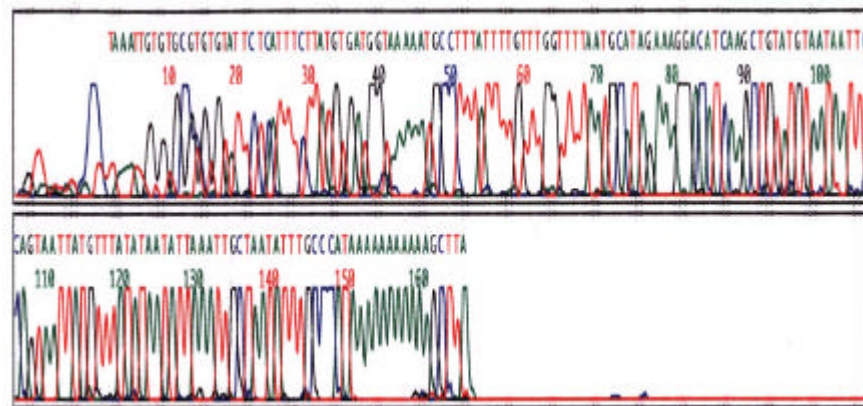
由 DD RT-PCR 結果 Figure 54、56 和 Table 6 發現 17 α -estradiol 可以誘導 Oncostatin M receptor 基因的表現，因此我們利用抗體檢測 17 α -estradiol 是否真的會增加細胞膜上 Oncostatin M receptor 的表現，而結果與 DD RT-PCR 結果是相符合。

3. 加入 p38 MAPK 抑制劑 SB 203580 和 MAPK/ERK kinase I 抑制劑 PD 98059 檢測對人類胃癌細胞株 SC-M1 的存活率的影響，由 Figure 66 結果發現在有先加入 10 μ M SB 203580 作用 3 小時後的細胞存活率增加 6%，因此推論 17 α -estradiol 是藉由 oncostatin M receptor 下游訊息調控路徑 p38 MAPK 來導致人類胃癌細胞株 SC-M1 產生細胞凋亡。

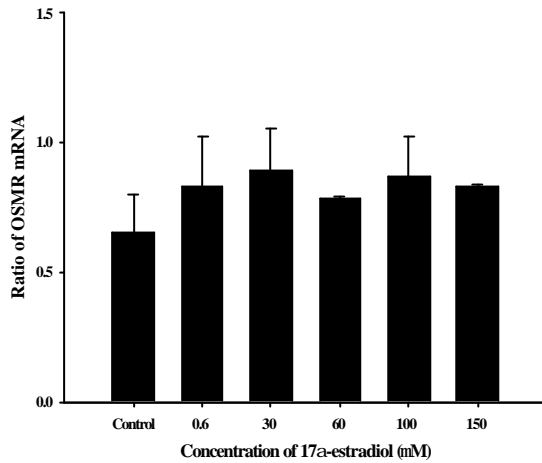
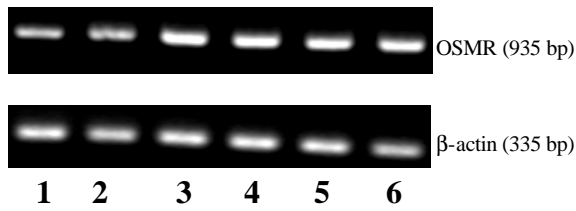
A.



B.



C.



D.

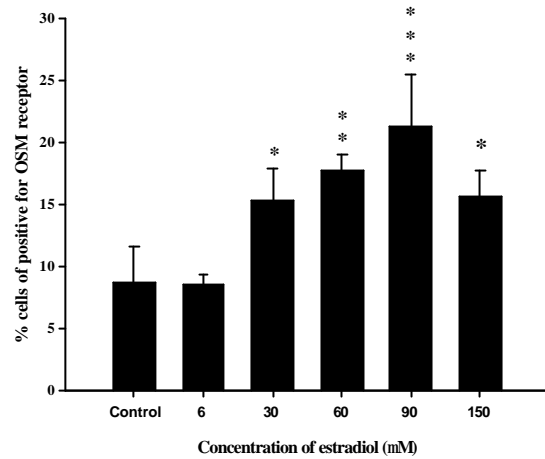


Fig 65. The distribution of OSM receptor from SC-M1 cells that growing in the present of different doses of 17 α -estradiol treatment for 24 hr. The gel electrophoresis of the products from DD RT-PCR (A) and DNA sequence (B) of oncostatin M receptor. (C) The gel electrophoresis and statistic figure of RT-PCR analysis of OSMR and beta-actin for treatment with different doses of 17 α -estradiol. . Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 60 μ M ; Lane 4 : 100 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M Values are mean \pm SD n= 2. (D) The data of oncostatin M receptor that was analyzed by FACS. Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean \pm SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

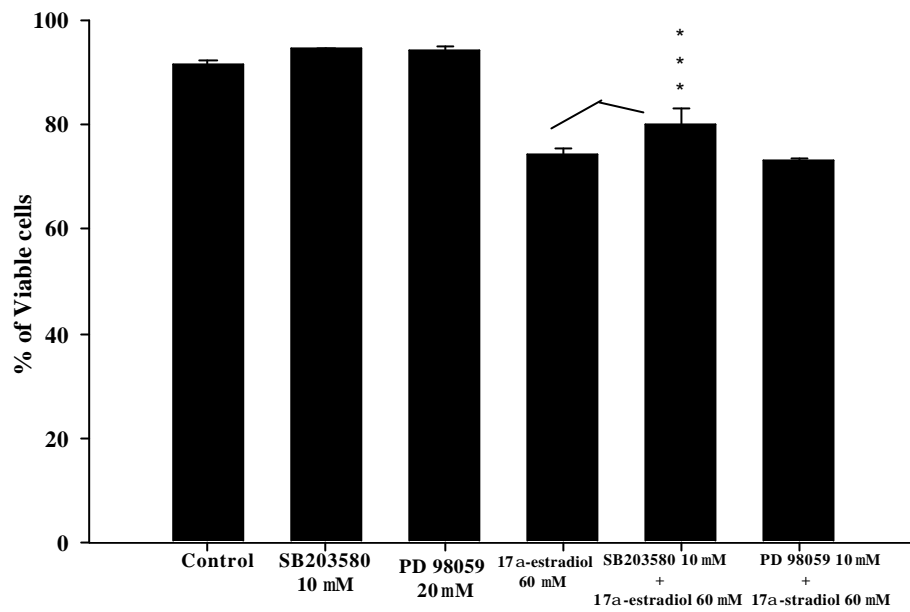


Figure 66. The effects of p38 MAPK inhibitor (SB 203580) and MAPK/ERK kinase I inhibitor (PD 98059) on the viable cells of SC-M1 before 17 α -estradiol treatment for 24h. The total viable cells were measured by FACS as described in the materials and methods. Differ between 60 μ M 17 α -estradiol and 10 μ M SB 203580+ 60 μ M 17 α -estradiol, ***p<0.001.

第四節 檢測 apigenin、17 α -estradiol 及 flavone 對人類胃癌細胞株的乙醯轉化酵素(N-acetyltransferase, NAT)活性及基因表現的影響

(一) 檢測 apigenin 對人類胃癌細胞株的乙醯轉化酵素(NAT)活性及基因表現的影響

- (1) 由結果 Figure 67 發現隨著 apigenin 濃度增加並不一定能抑制乙醯轉化酵素(NAT)活性，但在 24、36 和 48 小時，只有 150 μ M apigenin 能對乙醯轉化酵素(NAT)活性產生抑制作用，在 6、12 和 18 小時對乙醯轉化酵素(NAT)活性沒有影響。
- (2) 利用 RT-PCR 方法檢測 apigenin 對乙醯轉化酵素(NAT)基因表現的影響，由 Figure 68 發現在 150 μ M、300 μ M apigenin 可以抑制乙醯轉化酵素(NAT)基因表現。

(二) 檢測 17 α -estradiol 對人類胃癌細胞株的乙醯轉化酵素(NAT)活性及基因表現的影響

- (1) 由結果 Figure 69 發現隨著 17 α -estradiol 濃度增加乙醯轉化酵素(NAT)活性被抑制，在 18、24 和 36 小時作用最明顯，在 6、12 和 48 小時對乙醯轉化酵素(NAT)活性沒有影響。
- (2) 利用 RT-PCR 方法檢測 apigenin 對乙醯轉化酵素(NAT)基因表現的影響，由 Figure 70 發現 17 α -estradiol 對乙醯轉化酵素(NAT)基因表現沒有抑制作用。

(三) 檢測 flavone 對人類胃癌細胞株的乙醯轉化酵素(NAT)活性及基因表現的影響

- (1) 由結果 Figure 71 發現隨著 flavone 濃度增加乙醯轉化酵素(NAT)活性被抑制，在 18、24、36 和 48 小時作用最明顯，在 6 和 12 小時對乙醯轉化酵素(NAT)活性沒有影響。
- (2) 利用 RT-PCR 方法檢測 flavone 對乙醯轉化酵素(NAT)基因表現的影響，由 Figure 72 發現 flavone 對乙醯轉化酵素(NAT)基因表現沒有抑制作用。

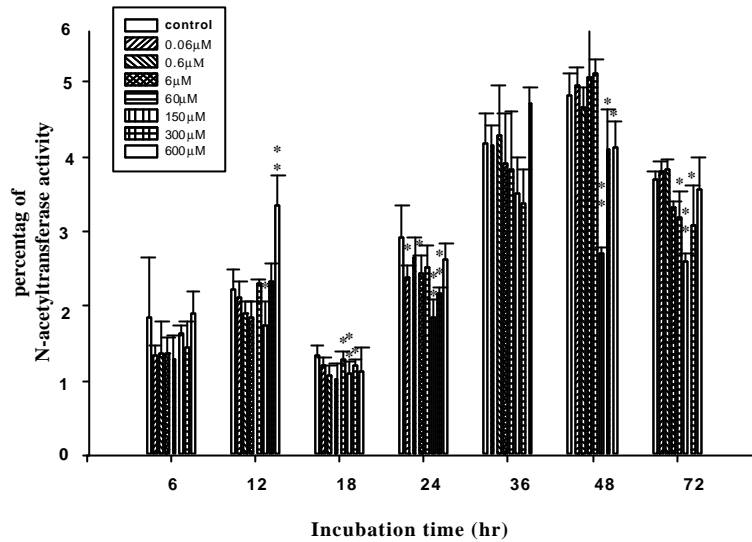


Figure 67. Time-course of apigenin on acetylation of 2-AF in human stomach cancer cell line (SC-M1). Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean± SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

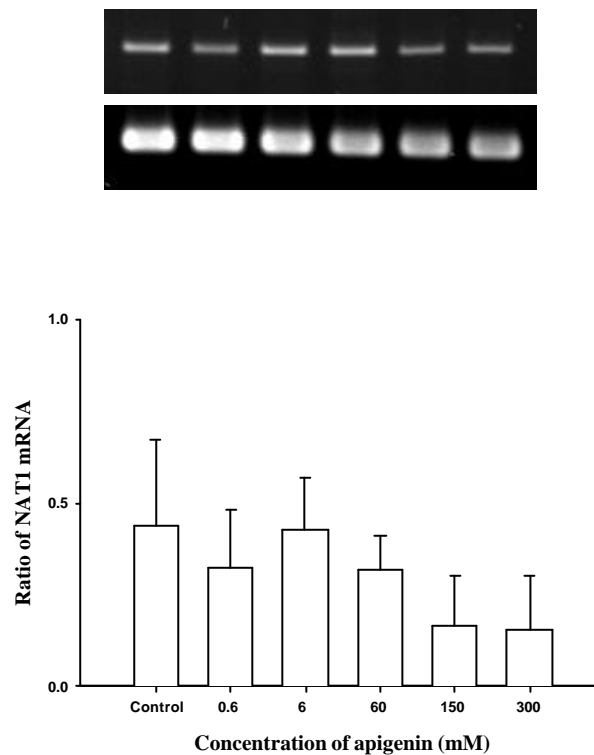


Figure 68. RT-PCR analysis of NAT1 and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of apigenin. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 0.6 μM ; Lane 3 : 6 μM ; Lane 4 : 60 μM ; Lane 5 : 150 μM ; Lane 6 : 300 μM

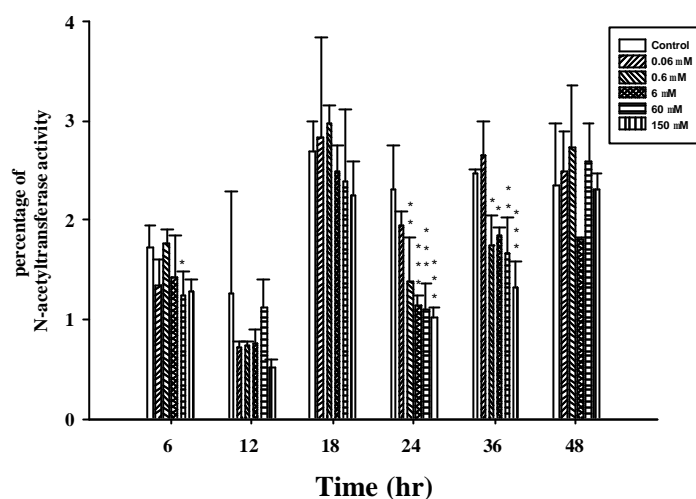


Figure 69. Time-course of 17 α -estradiol on acetylation of 2-AF in human stomach cancer cell line (SC-M1). Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean \pm SD, n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

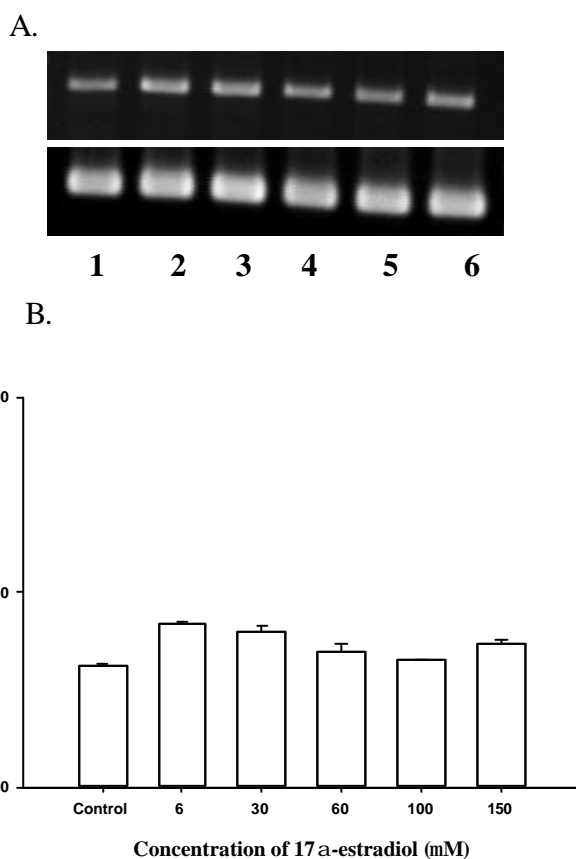


Figure 70. RT-PCR analysis of NAT1 and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 3 : 30 μ M ; Lane 4 : 60 μ M ; Lane 5 : 100 μ M ; Lane 6 : 150 μ M

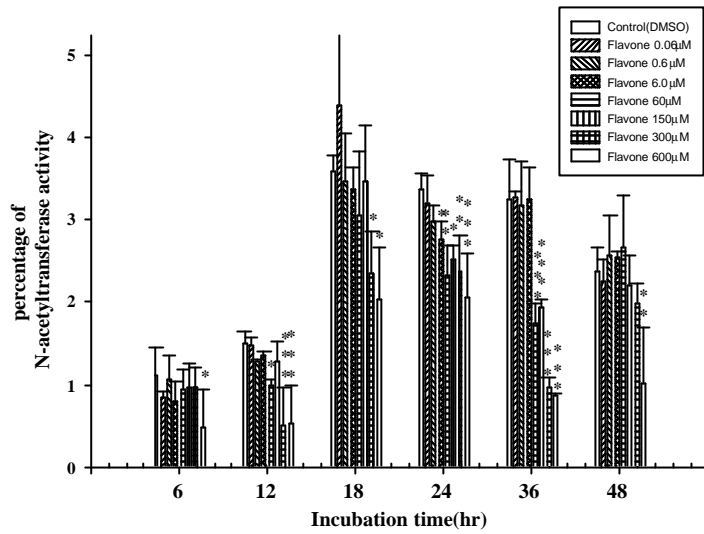


Figure 71. Time-course of flavone on acetylation of 2-AF in human stomach cancer cell line (SC-M1). Data were analyzed by one-way ANOVA. Value= mean \pm SD n=3 *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

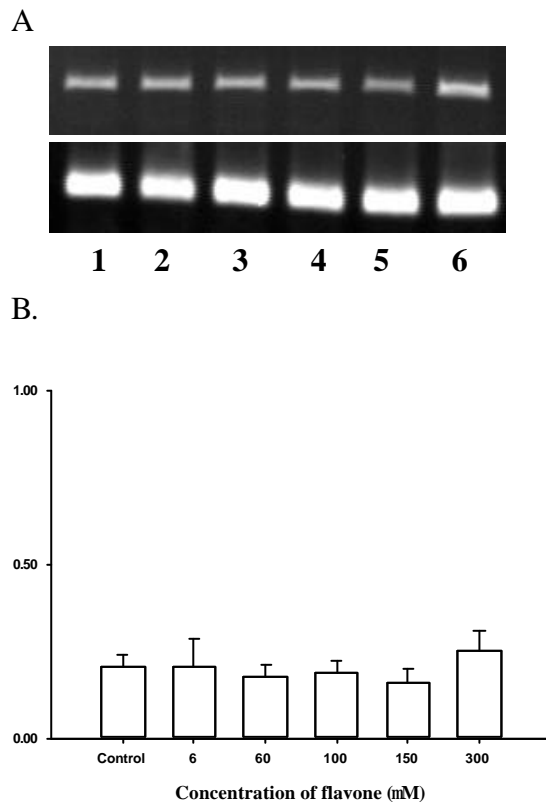


Figure 72. RT-PCR analysis of NAT1 and beta-actin in human stomach cancer cell line (SC-M1) for treatment with different doses of 17 α -estradiol. (A) Gel electrophoresis. Lane 1 : DMSO ; Lane 2 : 6 μ M ; Lane 60 μ M ; Lane 4 : 100 μ M ; Lane 5 : 150 μ M ; Lane 6 : 300 μ M. Values are mean \pm SD n= 2

第五章 討論

自從民國七十年開始，癌症已是國人十大死因之第一位，所以研究如何防治癌症已經是目前重要的課題。既然為防治癌症，所以必須包含了預防與治療兩方面，在預防方面，本實驗針對化學致癌物質(Chemical carcinogenesis)引發癌症產生之路徑和相關酵素如何作用於致癌物作研究，利用不同純化合物作進一步的篩選結果，進而找出三種藥物(apigenin、flavone 和 17α -estradiol)作用於人類胃癌細胞的過程；在治療方面，則是針對已形成的癌症細胞株研究其生長是否受到此三種藥物的影響並利用 mRNA 鑑別顯示技術尋找可能導致胃癌的致癌基因或抑癌基因及一些相關未知的基因。有關 apigenin、flavone 和 17α -estradiol 對於胃癌細胞的作用的相關文獻並不多，因此增加我們對於 flavonoids 及胃癌之間的相互作用的興趣，所以本實驗就在探討 apigenin、flavone 和 17α -estradiol 此三種成分對胃癌細胞作用為何。

Apigenin、flavone 和 17α -estradiol 此三種成分已經被證實在大部分蔬菜及水果中均含有，其中 17α -estradiol 與 flavonoids 均為植物性賀爾蒙⁽²⁹⁾。有許多研究指出 apigenin 及 flavone 為毒性低的 flavonoids 具有抗氧化及抑制癌細胞生長的作用^(78,79)，例如：apigenin 藉由抑制 epidermal ornithine decarboxylase 而可以抑制老鼠皮膚癌的產生⁽³¹⁾，目前本實驗研究的結果顯示此三種藥物：apigenin、flavone 和 17α -estradiol 都能引起人類胃癌細胞株(SC-M1)的死亡，此結果可由細胞存活數目減少、細胞形態的改變(甚至分解)而得知，而且此三種藥物造成細胞的死亡是使細胞進行計畫性的死亡(apoptosis)，此可由 DNA 片段電泳和 FACS 的結果而得到。當 flavone 增加高的濃度和更長時間的培養(300 μ M)時則引發 necrosis。

文獻報導指出 apigenin 可以誘導血癌細胞(HL-60)產生 apoptosis，藉由刺激勵粒腺體中 cytochrome c 及活化 caspase-9 和 caspase-3⁽⁶¹⁾；flavone 也是細胞凋亡誘導劑⁽³³⁾。在本實驗結果也發現 apigenin 及 flavone 作用 24 小時後，也有產生 apoptosis，但在 48 小時卻沒有，因此推論可能藥物作用很強，在 48 小時時已經造成細胞的壞死尤其在細胞形態圖中可以看出，有些細胞已分解成碎片。也有研究指出 2-methoxyestradiol(為 estrogen 的其中一個代謝物)可誘導 caspase-3 活化及 apoptosis 且使胃癌細胞的細胞週期停止於 G2/M 期⁽⁸⁰⁾，而本實驗所使用的 17α -estradiol 是屬於人體的其中一種 estrogen，在高濃度無論是 24 小時或 48 小時也都可觀察到經由分別抽取 DNA 然後跑電泳有 DNA 梯狀圖譜。除此之外 apigenin 尚可抑誘導制人類皮膚癌細胞的生長^(30,77)、大腸癌細胞⁽³²⁾、血癌細胞⁽⁶¹⁾和乳癌細胞⁽³⁵⁾的生長，雖然文獻已報導 apigenin、flavone 和 17α -estradiol 能影響癌細胞的生長，但沒有報導有關對人類胃癌細胞生長的影響，目前的結果證實顯示此三種藥物可引起人類胃癌細胞的生長抑制，也許可以作為進一步抗癌的參考，最值得注意的是此三種藥物經由口腔進入體內，首先也必須停留在胃中，因而對胃癌細胞的研究就更顯重要。

有研究指出 flavone 為大腸癌細胞的細胞凋亡誘導劑，可以誘導 apoptotic gene bak 的表現及抑制 anti-apoptotic gene Bcl-xL 的表現導致大腸癌細胞產生細胞凋亡，且會誘導 Cyclin-CDK inhibitor p21 基因表現而抑制參與細胞週期重要的蛋白質(cyclin B1 和 cyclin E)表現，達到抑制大腸癌細胞生長⁽³³⁾；flavone 及 apigenin 會影響調節細胞週期的蛋白質(CDK2 和 CDK1)進而對人類皮膚癌細胞的細胞週期有影響⁽⁸¹⁾。目前本實驗研究結果也與其相符合，apigenin、flavone 和 17 α -estradiol 都可影響人類胃癌細胞的細胞週期，而把細胞停留在 G2/M 期。有許多文獻已經說明細胞週期的進行是牽涉到其中一些特殊基因的表現，例如與 G0/G1 相關基因：D-type cyclins (cyclin D1、D2、D3)、cyclin E、CDK4、CDK6 及 CDK2；與 S 期相關的基因：cyclin A 及 CDK2；與 G2/M 相關基因：cyclin B1、cyclin A 及 CDK1；cyclin-dependent kinase inhibitor：p16、p21、p27 及 p59。目前由 Flow cytometry 分析人類胃癌細胞分別有無加入不同濃度的此三種檢測藥物，然後收集細胞，分別用第一次抗體針對該基因的產物和第二次含螢光抗體去該基因的產物染色後，用 FACS 檢測，最後用電腦分析結果顯示，發現 apigenin 對調節 G2/M 期的蛋白質 cyclin B1 及 CDK1 都有抑制的作用，對於調節 S 期的 CDK2 也具有抑制作用；17 α -estradiol 同樣會抑制調節 G2/M 期的蛋白質 cyclin B1 及 CDK1 的表現，對於調節細胞週期由 S 期進入 G2/M 期的 cyclin E 和 CDK2 及調節 G0/G1 期的 cyclin D1、cyclin D2、cyclin D3 和 CDK6 則是沒有很大影響；flavone 對調控 G2/M 期的 Cyclin B1、CDK1 及 Cyclin A 隨著濃度增加很明顯受到抑制，而對於調節細胞週期由 S 期進入 G2/M 期的 cyclin E 和 CDK2 則是沒有很大影響。因而由這些結果就可相互驗證此三種檢測藥物可影響細胞週期而且經由抑制此相關的基因所致。

由於上述的發現，本實驗再利用與細胞週期有關的基因的特殊 primers⁽⁷²⁻⁷⁵⁾ 作 RT-PCR 產物再經由瓊脂電泳膠結果發現 apigenin 可抑制 cyclin B1 和 cyclin D1 基因的表現，而 p53 基因很明顯也受到 apigenin 的抑制而 p21 mRNA 的量則是漸漸增加，因此 cyclin B1 及 cyclin D1 基因表現被抑制是否與 p21(cyclin-dependent kinase)表現增加有關值得我們繼續探討下去；17 α -estradiol 對 cyclin B1、cyclin D1 及 CDK2 基因表現並沒有影響，對 cyclin E 則隨著濃度增加漸漸受到抑制，對 p21 則是會誘導其基因表現；flavone 對 cyclin B1 和 cyclin E 基因表現有明顯抑制，但對其他基因如 CDK2、p53 則沒有影響。經由此兩種方法相互驗證此三種藥物檢測人類胃癌細胞的週期是經由影響其相關基因而導致影響這些細胞週期有關酵素。尤其目前在臨床上醫師已使用 Taxol 治療癌症(例如肺癌、乳癌等)病人，更重要的一點是 Taxol 已經證實可以使細胞週期停在 G2/M 期且會引起 apoptosis。

由於 RT-PCR 結果顯示 apigenin、flavone 和 17 α -estradiol 確實對人類胃癌細胞已有影響因而引發一個重要觀念是否這三種藥物能影響胃癌細胞內其他相關已知和未知的基因的表現，因而本實驗就利用新的分子生物技術稱為 DD RT-PCR (Differential Display RT-PCR)^(82,83) 來進一步證明，結果顯示此三種藥物確實對其他基因表現有影響，例如：17 α -estradiol 影響 ATP synthase 6、similared oncostatin M

receptor、NADH dehydrogenase subunit 2、cytochrome c oxidase subunit III 及 Cytochrome b 基因等；flavone 影響 ATP synthase 6、cytochrome c oxidase subunit I 及其他一些功能未知的基因；apigenin 則影響 ATP synthase 6 及其他功能未知的假設性基因。而這些結果還未被其他學者提到，因而這是相當值得注意及作為將來進一步研究的新方向以便進一步去了解這些基因的產物如何導致這些細胞的死亡或週期的改變，最後了解到 Cell signal transduction pathway 進而解開導致細胞死亡之謎。

由目前的結果也發現 apigenin、flavone 和 17α -estradiol 確實對 NAT 酵素有影響，而此影響是減少其乙醯化 2-AF 的量，由結果顯示此影響是 dose 和 time course dependent。也就是說利用整個活的細胞經由培養在培養基中直接加入 2-AF 再加入不同濃度藥物然後經由不同時間培養(6、12、18、24、36、48 小時)收集培養液經萃取後加入 methanol，再由 HPLC 分析其乙醯化和未乙醯化 2-AF 的量，發現此三種藥物可減少 2-AF 的量，更有趣的結果由 PCR 也發現 apigenin 確實也能影響 NAT 的基因表現(NAT mRNA)，由於學者已經報導如果增加 NAT 酵素的活性，當個體再暴露到多量芳香胺類化合物，則這個個體就會提升致癌的機率⁽⁸⁵⁾。當然也有一些學者報導，改變 NAT 酵素的活性當個體暴露到相關的芳香胺類致癌物與引發肝和膀胱癌有相關連⁽⁸⁶⁾。當然降低 NAT 酵素活性是否能降低與芳香胺類有關的致癌則是目前本實驗相當有興趣的研究。為了進一步了解將來作 in vivo 才能解答。

在 DD RT-PCR 實驗結果發現 apigenin、flavone 和 17α -estradiol 都能抑制粒腺體中 ATP synthase 6 基因的表現。而 ATP synthase 在粒腺體中主要是參與呼吸鏈的反應，跟能量 ATP 的產生有很大關係⁽⁸⁶⁾，也有研究報導指出有些血癌細胞中 ATP synthase 6、cytochrome c oxidase subunit 2 及 NADH-dehydrogenase subunit 1 和 4 基因有過度表現，而這些基因與粒腺體中氧化磷酸化的路徑有相關⁽⁸⁷⁾，因此如果能藉由抑制 ATP synthase 6 的表現而達到阻斷癌細胞能量的來源，進而可以抑制癌細胞生長或導致癌細胞的死亡，或許可以發展出新的治療癌症方法。除此之外，由 DD RT-PCR 實驗結果還發現 17α -estradiol 可以誘導 simlared oncostatin M receptor 基因表現，這個 receptor 是位於細胞膜上的 transmembrane protein，而且我們也利用抗體和 RT-PCR 分析結果再一次證明發現 17α -estradiol 確實能誘發 oncostatin M receptor 的表現，而文獻有指出 oncostatin M protein 是屬於 IL-6 family 中的一員，它與細胞存活、增生及分化的路徑有很大相關性⁽⁸⁸⁾，當細胞受到外來刺激(如發炎物、壓力或生長因子等)會藉由與其相關接受器 oncostatin M receptor 結合而活化下游基因(MEKK4、TAK、ASK1)及訊息傳遞路徑(如 p38 MAPK、SAPK/JNK)接著誘導細胞產生凋亡或分化，因此它具有雙向功能，一可與其專一的接受器 (oncostatin M receptor)結合，對於癌細胞它具有抑制其生長的功能，二對於正常細胞則是會促進其增生與分化⁽⁸⁵⁾。而 17α -estradiol 可以誘發 oncostatin M receptor 表現，如此一來就可以增加 oncostatin M protein 與其結合的機率，進而可以有更大機會去抑制人類胃癌細胞的生長，也有可能 17α -estradiol

是與 oncostatin M receptor 結合而對胃癌細胞產生有關生長的抑制，目前這個結果仍未其他學者報導出來，因此更增加我們對其兩者之間的關係研究的興趣，希望能找出 17 α -estradiol 抑制癌細胞生長的路徑。因此接著本實驗利用 p38 MAPK 的抑制劑 SB 203580 先加到細胞培養液中反應 3 小時後再加入 60 μ M 17 α -estradiol 培養 24 小時後將細胞收集，利用 FACS 分析細胞存活率，結果發現有加入 p38 MAPK inhibitor SB 203580 處理的胃癌細胞的細胞存活率增加 6 %，因此推論 17 α -estradiol 是透過 p38 MAPK pathway 而誘導胃癌細胞死亡的。

由於以上幾點可以發現此三種藥物 apigenin、flavone 和 17 α -estradiol 可影響人類胃癌細胞，造成癌細胞死亡的影響包括經由細胞計畫性死亡(apoptosis)，影響細胞週期和與細胞週期相關的基因表現，同時也發現影響細胞質內 NAT 酵素，也影響一些細胞相關的其他基因。

參考文獻

1. Lin Jen-Kun, Liang Yu-Chih and Lin-Shiau Shoei-Yn: Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signaltransduction blockade, *Biochemical Pharmacology* 58 (1999) 911-915.
2. Quintanilla M., Brown. K, Fee F, Young S. and Balmain A.: Oncogene mutation and amplification during initiation and progression stages of mouse skin carcinogenesis, *Growth Factors, Tumor Promoters, and Cancer Genes* (1998) 257-266.
3. Colette S., Brain W, Michael R., Cheryl L.: An overview of tumor biology, *Cancer Investigation* 7(3) (1989) 247-265.
4. Cambers R. W.: Chemical carcinogenesis: A biochemical overview, *Clinical Biochemistry* 18 (1985) 158-168.
5. Tannock I. F. and Hill R. P.: The basic science of oncology, *Chemical Carcinogenesis* (1992) 102-118.
6. Regina M. Santella : DNA adducts in human as biomarkers of exposure to environmental and occupational carcinogens, *Environ. Carcino. & Ecotox. Revs.* C9 (1) (1991) 57-81.
7. Rosalind A. B., M. P. H., John D. S., Carolin M. F. and Larry G. K.: Americans' knowledge of cancer risk and survival, *Preventive Medicine* 26 (1997) 170-177.
8. Selkrik J. K. and Maccleod M. C.: Chemical carcinogenesis: Nature's metabolic mistake. *Bioscience* 32 (1982) 601-605
9. Herman Autrup: Genetic polymorphisms in human xenobiotical metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response, *Mutation Research* 464 (2000) 65-76.
10. Adamson R. Gustafsson J. A., Ito N., Nagao M., Sugimura T., Waka abayashi K. and Yamazoe Y.: Heterocyclic aminea in cooked foods, *Proc. 23rd Int. Priness Takamatsu Cancer Research Fund.* Princeton Scientific, Priceton, NJ (1995) 1-360.
11. Yamagiwa K. and Ichikwa K.: Experimentelle studie uber pathogens der epithelial qeschwulste, *Mitlelungen Med. Facultat Kaiserl, Uniiu. Tokyo* (1915) 15-295.
12. Kennaway E. C.: The identification of a carcinogenic compound in coal-tar, *Br. Med J.* 2 (1995) 749-752.
13. Acad S. Preliminary Surverys Cancer Institute, Department of Epidemiology: Chinese academy of medical science on the epidemiology factor of esophageal cancer in China, *Cancer Treat. Control* 2 (1977) 85.
14. Peers F. G. and Linsell C. A.: Dietary aflatoxin and human primary cancer, *Annales de la Nutrition et de l' Alimentation* 31 (1977) 1005-1017.

15. de Gruijl F. R.: Skin cancer and solar UV radiation, *European Journal of Cancer Part A* 35(14) (1999) 2003-2009.
16. Claudia B., Jurgen B., Ingolf C., Ivar R. and Hans-Hubert B.: Correlation between genotype and phenotype of the human arylamine N-Acetyltransferase type 1 (NAT1), *Biochemical Pharmacology* 58 (1999) 1759–1764.
17. David W. H.: N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis, *Toxicology Letters* 112–113 (2000) 349–356.
18. David W. H., Mark A. D., Adrian J. F., Matthew A. L., Stephanie J. W., Gong H. X., Udaya-Sankar D., Norma A. N. and Yi Feng: Molecular genetics and epidemiology of the *NAT1* and *NAT2* acetylation polymorphisms, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9 (2000 January) 29–42.
19. Lutz W.: N-acetyltransferase genetic polymorphism and its role in the development of neoplastic disease, *Prevention Medicine* 51(3) (2000) 277-84.
20. Brockton N., Little J., Sharp L., Cotton SC.: N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer, a HuGE review, *American Journal Epidemiol* 1; 151(9) (2000 May.) 846-61.
21. Hein D. W.: N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis, *Toxicology Letters* 112-113 (2000 Mar) 349-56.
22. Hirvonen A.: Chapter 20. Polymorphic NATs and cancer predisposition, *IARC Sci Publ* 148 (1999) 251-70.
23. Hengstler J. G., Arand M., Herrero M. E., Oesch F.: Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility, *Recent Results Cancer Res* 154 (1998) 47-85.
24. Green J., Banks E., Berrington A., Darby S., Deo H., Newton R.: N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene-environment interaction, *Br J Cancer* 83(3) (2000 Aug) 412-7.
25. Tomnaga S.: Major avoidable risk factors of cancer, *Cancer Letters* 143 Suppl (1999) S19-S23.
26. Miesan K. H., Mohamed S.: Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants, *J Agric Food Chem* 49(6) (2001 Jun) 3106-12.
27. Trochon V., Blot E., Cymbalista F., Engelmann C., Tang R. P., Thomaidis A., Vasse M., Soria J., Lu H., Soria C.: Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting P21 and P27 expression, *Int J Cancer* 85(5) (2000 Mar) 691-6.

28. Nazaruk J., Gudej J.: Apigenin glycosides from the flowers of *Bellis perennis* L, *Acta Pol Pharm* 57(2) (2000 Mar-Apr) 129-30.
29. Jean-Christophe Le Bail, Yves Champavier, Albert-Jose Chulia and Gerard Habrioux: Effects of phytoestrogens on aromatase, 3β and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells, *Life Sciences*, Vol. 66, No. 14, pp. (2000) 1281-1291.
30. Denise M.Lepley, Boyong Li, Diane F.Birt and Jill C.Pelling : The chemopreventive flavonoid apigenin induces G₂/M Arrest in, *Carcinogenesis* vol. 17 no. 11 pp. (1996) 2367-2375.
31. Huachen Wei Laura Tye, Edward Bresnick, and Diane F. Birt: Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice, *Cancer Research* 50 (1990) 499-502.
32. Wang Weiqun, Heideman Laura, Chung Chilly S., Pelling Jill C., Koehler Kenneth J. and Birt Diane F.: Cell-cycle arrest at G₂/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines, *Molecular Carcinogenesis* 28 (2000) 102-110.
33. Wenzel U., Kuntz S., Brendel MD. Daniel H.: Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells, *Cancer Research* 60 (2000) 3823-3831.
34. Jan Tesarik, Loreto Garrigosa, Carmen Mendoza: Estradiol modulates breast cancer cell apoptosis: a novel nongenomic steroid action relevant to carcinogenesis, *Steroids* 64 (1999) 22-27.
35. Nomoto S., Arao Y., Horiguchi H., Ikeda K. and Kayama F.: Oestrogen causes G₂/M arrest and apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231, *Oncol Rep* 9(4) (2002 Jul-Aug) 773-776.
36. SENDEROWICZ A. M.: Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials, *Investigational New Drugs* 17(3) (1999) 313-20.
37. Ripple G. H. and Wilding G.: Drug development in prostate cancer, *Seminars in Oncology* 26(2) (1999 Apr) 217-26.
38. J.H. Lee, J.G. Chung, J.M. Lai, G.N. Levy, W.W. Weber : Kinetics of arylamine N-acetyltransferase in tissues from human breast cancer. *Cancer Letters* 111 (1997) 39-50
39. Bernadette Schoket, Gizella Papp, Katalin Lévy, Gabriela Mracková, Fred F. Kadlubar, István Vincze : Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutation Research* 482 (2001) 57-69.
40. P.A. Thompson, F. Seyedi, N.P. Lang, S.L. MacLeod, G.N. Wogan, K.E. Anderson, Y. M. Tang, B. Coles, F.F. Kadlubar: Comparison of DNA adduct levels associated with exogenous and endogenous exposures in human pancreas in relation to metabolic genotype, *Mutation Research* 424 (1999) 263-274.

41. Culp S. J., Riberts D. W., Talaska G., Lang N. P., Fu P. P., Lay Jr. J. O., Teitel C. H., Snawder J. E., Von Tungeln L.S. and Kadlubar F.F.: Immunochemical, ³²P-postlabeling and GC/MS detection of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human peripheral lung in relation to metabolic activation pathways involving pulmonary N-oxidation, conjugation, and peroxidation, *Mutation Research* 378 (1997) 97–112.
42. Paolo Vineis and Paul A. Schulte: Scientific and ethical aspects of genetic screening of workers for cancer risk: the case of the N-acetyltransferase phenotype, *J Clin Epidemiol* Vol. 48, no. 2, pp. (1995) 189-197.
43. Sumiko Ishizu, Chise Hashida, Tomoyuki Hanaoka, Kikio Maeda and Yukihiko Ohishi: N-acetyltransferase activity in the urine in Japanese subjects : comparison in healthy persons and bladder cancer patients, *Jpn. J.Cancer Res.* 86(1995) 1179-1181.
44. Robert J., Boissy, Mary A. Watson, David M.Umbach, Mark Deakin James Elder, Richard C. Strange and Douglas A. Bell: A Pilot study investigating the role of nat1 and nat2 polymorphisms in gastric adenocarcinoma, *Int. J.Cancer* 87 (2000) 507-511.
45. Heares D. J., Weber W. W.: Multiple N-acetyltransferase and drug metabolism, tissue distribution, characterization and significance of mammalian N-acetyltransferase, *Biochem* 132 (1993) 353-357.
46. Hein D. W., Rustan J. D., Furman E. J. and Martin W. J.: Extrahepatic expression of the N-acetylation poly- morphism toward arylamine carcinogens in tumor target organ of an inbred rat model, *J. pharmacol Exp Ther* 258 (1991) 232-236.
47. Fang S. H., Chung J. G. Levy G. N. and Weber W. W.: Candida albican arylamine N-acetyltransferase and characterization, *Toxicol Letter* (1997).
48. Watanabe M., Sofuni T. and Nohmi T.: Involvement of Cys69 residue in the catalytic mechanism of N-hydroxyarylimine O-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium*, *J. Biol Chem.*, 267 8429-8436.
49. Chang F.C.: 2-aminofluorene metabolism by human digest system bacteria, Master Thesis (1996).
50. Chung J. G., Wang H. H., Lo H. H., Chang S. S., Wu L. T., Lee J. H., Hund C. F.: Evidence for arylamine N-acetyltransferase activity in the bacteria *helicobacter pylori* *Toxicol Letter* (1998).
51. Hickman D., Risch A., Buckle V., Spurr N., Jeremiah S. J., McCarthy A. and Sim E.: Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase, *Biochem. J.* 297 (1994) 441-455.
52. Herman Autrup: Genetic polymorphisms in human xenobiotical metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response, *Mutation Research* 464 (2000)

53. Risch A., Wallace DMA, Bathers S. and Sim E.: Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet* 4 (1995) 231-36.
54. Pires de Melo M., Curi TCP, Curi R., Di Mascio P., Cilento G.: Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid, *Photobiol* 65 (1997) 338-341.
55. Kazuo F., Masatoshi W., Taizo S., Mariko S., Mariko M., Hiroji U., Yoshinobu K., Juichi K., Hhruo I. and Ryuichi Yatani: N-cetyltransferase 1 genetic polymorphism influences the risk of prostate cancer development, *Cancer Letters* 136 (1999) 83-87.
56. Abraham M. Y., Nomura, Grant N., Stemmermann and Po-Huang Chyou: Gastric cancer among the Japanese in Hawaii, *Japan Journal of Cancer Research* 86 (1995 Oct.) 916-23.
57. Wang Jane-Jen, Liu Tsung-Yun, Yin Pen-Hui, Wu Chew-Wun, Chern Yaw-Terng and Chi Chin-Wen: Adamantyl maleimide induced changes in adhesion molecules and ros are involved in apoptosis of human gastric cancer cells, *Anticancer Research* 20 (2000) 3067-3074.
58. Chang Yuh-Fang, Li Li Lydia, Wu Chew-Wun, Liu Tsung-Yun, Lui Wing-Yiu, Peng Fang-Ku and Chi Chin-Wen: Paclitaxel-induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines, *American A Cancer society* (1996).
59. Bell D.A., Watson M., Castranio T., Stephens E., Deakin M., Elder J., Duncan H., Hendrickse C. and Strange R.C.: A new genetic risk maker : NAT1 gene defect is associated with increase risk for gastric cancer, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 36 (1995) 283.
60. Takahiko K., Robert B., Naoki N., Kyoko K., Yusuke K., Hideaki I., Toshihiro K. and Douglas A. B.: Inherited polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma, *Int. J. Cancer* 85 (2000) 46-49.
61. Wang I.-K., Lin-Shiau S.-Y. and Lin J.-K.: Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells, *European Journal of Cancer* 35(10) (1999) 1517-1525.
62. Hollman P. C., Van Trijp J. M., Buysman M. N., et al.: Relative bioavailability of antioxidant flavonoid quercetin various foods in man, *FEBS Letters* 418 (1997) 152-156.
63. Theodore F., Michael S.P., Erkan A., Stephen B., Sirpa R., Herman A., Kristiina

- W., Roberto M. and Lothar S.: Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis, *Cancer Research* 57 (1997) 2916-2921.
64. Lee C. H., Edwards A. M.: Stimulation of DNA synthesis and c-fos mRNA expression in primary rat hepatocytes by estrogens, *Carcinogenesis* 22(9) (2001) 1473-1481.
65. Jenkins J.K., Suwannaroj S., Elbourne K. B., Ndebele K. and McMurray R.W.: 17-beta-estradiol alters Jurkat lymphocyte cell cycling and induces apoptosis through suppression of Bcl-2 and cyclin A, *Int Immunopharmacol* 1(11) (2001 Oct) 1897-911.
66. Kanda N, and Watanabe S.: 17beta-estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production, *J Invest Dermatol* 117(2) (2001 Aug) 274-83.
67. Michalides R.J.A.M.: Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer, *Journal of Clinical Pathology* 52(8) (1999) 555-568.
68. Steven M. Jones, Andrius Kazlauakas : Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Letters* 490 (2001) 110-116.
69. Deanna M. Koepf, J. Wade Harper and Stephen J. Elledge: How the cyclin became a cyclin : regulated proteolysis in the cell cycle, *Cell* 97 (1999 May) 431-434.
70. Mitchell S. Steiner, Daniel J. Satterwhite, and Harold L. Moses: Molecular insights into altered cell cycle regulation and genitourinary malignancy, *Urol Oncol.* 1 (1995) 3-17.
71. David Wynford-Thomas: Cellular senescence and cancer, *Journal of Pathology* 187 (1999) 100-111.
72. Homo sapiens actin, beta (ACTB), Mrna. Gi | 5016088 | ref | NM-001101.2 | . Gene Bank number NM-001101
73. Florence V., Gael D., Jocelyn C., Brigitte D. and Jean-Pierre B.: p53-independent regulation of cyclin B1 in normal human fibroblasts during UV-induced G2-arrest, *Biology of the Cell* 91 (1999) 665-674.
74. Howard Wong and Karl Riabowol: Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fiboblast, *Experimental Gerontology* 31 (1996) 311-325.
75. Shinya Kato, Takami A., Kazuhisa S., Akio K. and Mitsuru A.: Evaluation of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR analysis IV : study of c-myc, c-fos and p53 mRNA expression, *Biomaterials* 21 (2000) 521-527.
76. Human NAT1 gene for arylamine N-acetyltransferase. Gi | 34993 | emb | X17059.1 | HSNAT1. Gene Bank number X17059.
77. Sara Caltagirone, Cosmo Rossi, Andreina Poggi et al.: Flavonoids apigenin and

- quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential, *Int. J. Cancer* 87 (2000) 595-600.
78. Ross JA, Kasum CM.: Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety, *Ann Rev Nutr* 22 (2002) 19-34.
 79. Depeint F., Gee J. M., Williamson Gand Johnson I. T.: Evidence of consistent patterns between flavonoids structures and cellular activities, *Proc Nutr Soc* 61(1) (2002 Feb) 97-103.
 80. Lin H. L., Liu T. Y., Wu C. W. and Chi C. W.: 2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells, *Cancer* 92(3) (2001 Aug 1) 500-9
 81. Fabrice Casagrande and Jean-Marie Darbon: Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1, *Biochemical Pharmacology* 61 (2001) 1205–1215.
 82. Haojie Huang, Christopher P. Reed, Jin-San Zhang, Viji Shridhar, Liang Wang and David I. Smith: Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells, *Cancer Research* 59 (1999) 2981-2988.
 83. Chung Jing-Gung, Yeh Kun-Tu and Ho Heng-Chien et al.: Novel transmembrane GTPase of non-small cell lung cancer identified by mRNA differential display, *Cancer Research* 61 (2001) 8873-8879.
 84. Einisto P., Watanabe M., Ishidate M. and Nohmi T.: Mutagenicity of 30 chemicals in *S. tryphimurium* possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities, *Mutation Research* 259 (1991) 95-102.
 85. Weber W. W. and Hein D. W.: N-acetylation pharmacogenetics, *Pharmacological Reviews* 37 25-79.
 86. Nadine Camougrand, Patrick Pelissier, Gisele Velours and Martine Guerin: NCA2, a second gene required for the control of mitochondrial synthesis of subunits 6 and 8 of ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Biol.* 247 (1995) 588-596.
 87. Tarantul V. Z., Hnsmann G.: Mitochondrial polypeptides of the oxidative phosphorylation pathway as potential new targets for anti-cancer therapy, *Medical Hypotheses* 56(3) (2001) 386-387.
 88. Gomez-Lechon M. J.: Oncostatin M: signal transduction and biology activity, *Life Sciences* 65(20) (1999) 2019-2030.
 89. Grant Susan L. and Begley C. Glenn: Review: The oncostatin M signaling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Molecular Medicine Today* 5 (1999 September) 406-412.

