

## 中文摘要

在民間盛傳為藥虎之一的台灣金線連對保肝作用有顯著功效，本研究以台灣金線連為研究題材，試著探討台灣金線連是否具有抑制癌細胞生長的能力。以不同分化程度的肝癌細胞 HepG2、Hep3B、Mal5、SK 進行細胞生長抑制實驗，結果顯示在 HepG2 細胞株中對台灣金線連的感受性特別好，在 10  $\mu$ g/ml 濃度下即有抑制近 50 % 生長率的效果出現，顯示金線連對於分化程度較好的肝癌細胞有較明顯抑制生長的效果。在加藥後 GSH 量有顯著下降的功能，CuZn-SOD 量有漸增的趨勢，catalase 量在加藥後有漸少的趨勢。SOD 活性隨時間而增加，catalase 活性在 24 小時後，有相對減少的趨勢，在 48 小時後相對減少的量最多，在 72 小時後相對的減少量最少。GPx、SOD、catalase mRNA level 皆有明顯之差異。luciferase activity assay 結果顯示，加藥組與對照組之比較轉染具有 NF- $\kappa$ B 結合位而影響轉錄子活性約下降 4.6 倍；轉染具有 AP-1 結合位而影響轉錄子活性約下降 6.1 倍，兩者均有明顯之差異。推測金線連透過抑制 NF $\kappa$ B，AP-1 與 GCS-HS 啟動區結合造成 GCS-HS mRNA 合成減少，進而造成 GSH 表現量減少，因而使得 HepG2 細胞生長受到抑制。在外加過氧化氫的實驗結果顯示，以台灣金線連先處理過 HepG2 細胞後在 1,2,4 小時內對超氧自由基、過氧化氫有比較強的清償能力。

## 英文摘要

*Anoectochilus formosanus* is a traditional folk herb that was thought to have effect on liver function protection. Previous studies showed that rat treated with water extracts of *A. formosanus* had better recovery of liver injury with reduction of the AST and ALT level.

To determine the anticancer activity of *A. formosanus* on hepatocellular carcinoma, HepG2 cells were treated with serial concentration of water extracts of *A. formosanus*. Significant decrease of HepG2 cell proliferation was found with treatment of *A. formosanus* at 10  $\mu\text{g/ml}$ .

The glutathione mRNA level and the NF $\kappa$ B-dependent transcriptional activity were both decreased at 24 hour after *A. formosanus* treatment, as revealed by the quantitative RT-PCR and luciferase reporter gene analysis.

Taken together, this study result indicated that *A. formosanus* may have the anticancer activity to hepatocellular carcinoma cell line and may elicit its effect through the free radical scavenger system..

## 誌 謝

本論文承蒙鄭如茜主任之殷切指導及不厭其煩的詳加批閱正，稿成復蒙陳偉德所長之悉心指正，謹致衷心謝忱。特別感謝高尚德所長對本研究全程的大力支持，以及林文川教授熱心提供台灣金線連水抽取物，有關研究才能得以進行；還有多虧張益銓老師的幫助，91 年度生物醫學聯合年會論文發表才能得以順利完成。

於此感謝宏真、貞穎對我的大力幫忙，還有 Ju lab 的長青、維洲、安旅、郁芬、景堂、建宇、志嶸、惠琳、鳳儀、翔之、小鄔、小利、若馨等各位既優秀又可愛的醫技系小朋友們的協助，由於你們不藏私的傳授實驗的經驗與心得，使我研究的相關實驗能得以順利進行；尤其在深夜中伴我螢窗苦讀、磨練思考邏輯的二位大朋友，裕聰老弟及美惠學妹，對於我研究生生涯在精神上及實質上的支持與鼓勵，謹此致上十二萬分的謝意。

最後，將此論文獻給默默支持我的家人及署立桃園醫院檢驗科朱主任與同事們，謝謝你們無止境的體諒及幫助；由於大家的照顧與支持，才能讓我順利的完成此論文！感激大家

# 目 錄

中文摘要	1
英文摘要	2
謝辭	3
目錄	4
圖目錄	8
符號與縮寫	
第一章 緒論	9
1.1. 台灣金線連之簡介	
1.2. 台灣金線連之成分與藥理作用之研究	
1.3. 自由基、活性氧分子與抗氧化酵素之介紹	
1.3.1. 自由基的形成原由和導致之細胞傷害	
1.3.2. 活性氧分子的種類和造成之毒性	
1.4. 體內抗氧化機制	
1.5 研究動機	
第二章 材料與方法	20
2.1. 細胞之處理	
2.2. 細胞毒性試驗	
2.3. 蛋白質抽取	

- 2.4. Glutathione assay
- 2.5. 以西方墨點法測定蛋白質的表現量
- 2.6. RNA 之抽取
- 2.7. 以 RT-PCR 來評估基因的表現
- 2.8. 超氧化歧化酵素活性分析 SOD activity assay
- 2.9. 過氧化氫酵素活性分析 catalase activity assay
- 2.10. 轉錄子活性分析 promoter assay
- 2.11. 超氧自由基分析 superoxide assay
- 2.12. 過氧化氫分析 hydrogen peroxidase assay
- 2.13. 外加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 實驗超氧自由基、過氧化氫分析

### 第三章 結果

30

- 3.1. 台灣金線連對各種不同肝癌細胞株的生長影響
  - 3.1.1. 台灣金線連對 HepG2 細胞株生長率影響之結果
  - 3.1.2. 台灣金線連對 Hep3B 細胞株生長率影響之結果
  - 3.1.3. 台灣金線連對 Mal 5 細胞株生長率影響之結果
  - 3.1.4. 台灣金線連對 SK 細胞株生長率影響之結果
- 3.2. 台灣金線連對 HepG2 細胞株之 GSH 變化量測定
- 3.3. 以西方墨點法測量 CuZn-SOD、 catalase 蛋白質表現情形
  - 3.3.1 以西方墨點法分析 CuZn-SOD 蛋白質表現量測定
  - 3.3.2 以西方墨點法分析 catalase 蛋白質表現量測定

3.4. 台灣金線連對 HepG2 細胞株中抗氧化酵素 mRNA 表現之測量	
3.4.1. RT-PCR 測量 GCS mRNA 的表現情形	
3.4.2. RT-PCR 測量 GPx mRNA 的表現情形	
3.4.3. RT-PCR 測量 SOD mRNA 的表現情形	
3.4.4 RT-PCR 測量 catalase mRNA 的表現情形	
3.5. 測量 SOD、 catalase 活性	
3.6. 台灣金線連對 HepG2 細胞株轉錄子活性分析	
3.7 台灣金線連處理 HepG2 細胞株後活性氧分子產量分析	
3.7.1 台灣金線連對 HepG2 細胞株處理後超氧自由基產量分析	
3.7.2 台灣金線連對 HepG2 細胞株處理後過氧化氫產量分析	
3.8 外加過氧化氫處理後 HepG2 細胞株活性氧分子產量分析	
3.8.1 HepG2 細胞株經外加 200 $\mu$ M 過氧化氫處理後活性氧分子產量測定	
3.8.2 HepG2 細胞株經外加 200 $\mu$ M 過氧化氫處理後再以台灣金線連處理活性氧分子產量測定	
3.8.3 HepG2 細胞株經以台灣金線連處理後再外加 200 $\mu$ M 過氧化氫活性氧分子產量測定	
第四章 討論	40
參考文獻	48

## 圖目錄

- 圖 1、台灣金線連對各種不同肝癌細胞株的生長影響
- 圖 2、台灣金線連對 HepG2 細胞株之 GSH 變化量測定
- 圖 3、以西方墨點法測量 CuZn-SOD、 catalase 蛋白質表現情形
- 圖 4、台灣金線連對 HepG2 細胞株中抗氧化酵素電泳分析比較
- 圖 5、GCS-heavy subunit 基因序列圖
- 圖 6、台灣金線連對 HepG2 細胞株轉錄子活性分析
- 圖 7、測量 SOD、 catalase 活性之測量統計圖
- 圖 8、台灣金線連對 HepG2 細胞株處理後超氧自由基產量分析
- 圖 9、台灣金線連對 HepG2 細胞株處理後過氧化氫產量分析
- 圖 10、外加過氧化氫處理一小時後 HepG2 細胞株活性氧分子產量分析
- 圖 11、外加過氧化氫處理二小時後 HepG2 細胞株活性氧分子產量分析
- 圖 12、外加過氧化氫處理四小時後 HepG2 細胞株活性氧分子產量分析

## 符號與縮寫

AFE	Anoectochilus Formosanus extract
BSA	bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECL	enhanced chemiluminescence
FBS	Fetal bovine serum
HCC	Human hepatocellular carcinoma
$\mu\text{M}$	micromolar
mM	Minimolar
O.D.	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
rpm	Round per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
Tris	Tris ( hydroxymethyl ) aminomethane

# 一、緒論：

## 1.1 台灣金線連之簡介

台灣位處於溫帶及亞熱帶地區，含沛豐富的雨量，蘊育出許多植物可供藥用。尤其在民間盛傳為藥虎(王)之一的金線連，更由於具廣泛的藥效，使得原本長在海拔1500公尺下之山地闊葉林中的金線連因遭濫採而日漸稀少。現今多產於嘉義縣吳鳳鄉、大埔鄉及南投縣仁愛鄉等地(青草集.豐年社 1987)。

金線連為多年生之蘭科 *Orchidaceae* 金線連屬 *Anoectochilus* 植物，在墨綠色的圓形葉面上鑲嵌銀色略黃的鮮亮網紋，背面呈淡紫紅色。台灣原產主要有二種：一、台灣金線連 *Anoectochilus Formosanus hayata* 花呈乳黃色，唇瓣中段帶有魚翅裂紋。二、高雄金線連 *Anoectochilus Koshunensis hayata* 花為乳白色，無魚翅狀裂紋，唇瓣兩側各三角裂片(甘偉松 1980; 吳進錫 1979; 劉國柱 1976)。

## 1.2 台灣金線連之成分與藥理作用之研究

金線連在藥理作用上包括：降血糖、鎮靜、鎮痛、利尿、抗發炎等生理活性，此外，亦有研究結果顯示金線連作用於流行性感冒病毒的基因轉譯過程，抑制血球凝集素之合成而影響其抗原(HA)的表現

(侯嘉隆 1993)。在以小白鼠做生理活性檢測的實驗結果中，發現台灣金線連效果優於高雄金線連(陳進榮 1988)。

體外研究指出，以肝臟灌流法分離之小白鼠肝細胞進行體外培養，用乙醯氨基酚 acetaminophen 誘發毒性，以乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取之金線連進行處理，其結果顯示金線連有強抗脂質過氧化、清除超氧離子自由基及肝細胞保護的效果(林俊清等 1999)。此研究亦證實其 EtOAc 之萃取物可降低肝細胞之 GOT、GPT 濃度，提升 glutathione 量，並降低肝細胞脂質過氧化產物 malondialdehyde (MDA) 之量，顯示金線連確實具有解毒及抑制肝細胞被過氧化的保肝效果 (林俊清等 1999)，然而在 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠肝纖維化的實驗中，台灣金線連之水粗萃取物對肝纖維化指標 hydroxyproline 有明顯的下降，而 MDA 卻沒有影響；因此，認為台灣金線連水粗萃取物，減輕 CCl<sub>4</sub> 誘發之肝纖維化的作用可能經由抑制自由基以外的途徑進行 (林文川等 1999)。

金線連可藉由不同溶劑，抽取不同活性且種類不一的萃取物成分。成分研究報告指出：一、用正己烷萃取可分離出六個化合物：(a) pheophytin a、(b) linoleic acid、(c) trans- $\beta$ -carotene、(d) 2-methoxy-4-vinylphenol (f) lutein；二、以乙酸乙酯粗萃取物分離出五個化合物：(a) pheophytin a (b) phytosterols (c) uracil (d) pheophytin

b、(e) anoectolide A；三、由甲醇粗提取物中分四個化合物：(a) phytosterols、(b) anoectolide A、(c) anoectolide B、(d) ethyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside。其中尤以 pheophytin a, linoleic acid, trans- $\beta$ -carotene 可能具有對多形核白血球和週邊的抗發炎活性 (林宗輝 2001)。此外,台灣金線連成分中更富含維生素 C 及 Ca、P、K、Na、Mg 等礦物質和 Fe、Mn、Zn、Cu 等諸多的微量金屬 (劉新裕等 1987)；其他尚含有許多維生素 B 維生素 E 及 nicotinic acid 成分 (Tang *et al.* 1996), 其中 linoleic acid、trans- $\beta$ -carotene、維生素 B、維生素 E 與抗氧化機制有關。

研究報告指出經由以 diethylnitrosamine (DEN) 誘發 SD rat 肝癌化的過程中  $\beta$ -carotene 可藉其抗氧化功用預防細胞膜 lipid peroxidation、RBC membrane protein damage 有預防肝癌化之效果。當有  $\beta$ -carotene 存在時, 其他 free radical scavenger 如 SOD、catalase 的活性亦同時隨之上升 (Sarkar *et al.* 1995)。

此外, 尤其當白蛋白攜帶不飽和必需脂肪酸(如: linoleic acid) 時, 其作用如同抗氧化物, 可清除自由基而且可避免細胞膜脂質過氧化。因而具有抗突變、抗菌、抗黴菌、抗病毒等特性 (Das *et al.* 1999), 更有人進一步指出治療癌症的化療、放療, 經由必需脂肪酸的 r-linoleic acid 合併治療後, 可有效的抑制 primary tumor proliferation

能調節並提高化療、放療的療效 ( Baronzio *et al.* 1995 )。此外，在 vitamin E 抗氧化的實驗中證實，vitamin E 扮演 free radical scavenger 的角色，可保護肝臟以抵抗氧化，並抑制 c-myc 癌基因的過度表現；藉由捕捉並降低 Reactive oxygen species ( ROS ) 的合成，能有效的抑制肝癌的發展 ( Factor *et al.* 2000 )。另外，在以 0.025 % ciprofibrate 連續 60 週，每週 5 天餵食雄性 F-344 rats 誘發肝癌化的實驗中，證實同時使用腹腔注射 Dimethylthiourea ( D.M.T.U. 屬於一種 hydroxyl radical scavenger ) 可以令自由基下降，避免肝細胞 DNA damage，抑制肝癌的發生 ( Rao *et al.* 1999 )。可見 free radical scavenger 藉由清除自由基 以避免細胞膜遭受 lipid peroxidation、DNA damage，進而抑制肝癌的發生。

### 1.3 自由基、活性氧分子與抗氧化酵素之介紹

自由基 ( free radical ) 是外圍電子軌道具有單一或多個未成對電子的分子、原子或離子，由於不成對電子在外圍軌道上呈現不穩定狀態，因而具有很高的活性；故易和細胞中之大分子物質如 DNA、蛋白質和脂質反應。被自由基攻擊過的分子，往往會形成另一個自由基分子，故產生連鎖式的破壞效應，造成人體更大的傷害。

### 1.3.1 自由基的形成原由和導致之細胞傷害

#### (一) 自由基的形成原由

1. 吞噬細胞：當吞噬細胞被活化以執行吞噬作用時，受到位於細胞膜上的 reductase, NADPH 催化後，會造成細胞大量地耗氧，並且將氧分子快速地還原為超氧自由基。
2. 粒線體中電子傳遞系統：粒線體內產生腺核三磷酸之電子傳遞系統中，氧分子進行不完全氧化形成超氧自由基。
3. 微粒體中電子傳遞系統：在內質網膜有一系列氧化酵素，其中主要的氧化外生性化學物質 (xenobiotics)，經單氧化酵素參與氧化過程中由 NADPH 提供一個電子，進而形成氧的還原態中間產物。
4. 可溶性氧化酵素：此類酵素可氧化內生性或外生性物質，如 xanthine oxidase 可直接與氧分子作用形成超氧自由基、過氧化氫，甚至於毒性更強氫氧自由基。
5. 內生性或外生性物質的自行氧化：如 dopamine 經氧化後可形成活性氧的化合物，與引起巴金森氏症疾病有關。
6. 過渡金屬：銅及鐵是最主要參與反應的金屬離子，如 DNA、蛋白質和脂質等大分子的電子轉移，此外亦可催化過氧化物分解造成組織傷害。

### 1.3.2、活性氧分子( reactive oxygen species, ROS ) 的種類和造成之毒性

ROS 的形成與心血管疾病、發炎及癌症等息息相關(Clemens 1991 ; Brigham 1991 ; Kukreja and Hess 1992 ; Prasad *et al.* 1993)。ROS 包括 oxygen radicals (  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  ) 和 non- radical derivatives of oxygen (  $H_2O_2$  和  $ONOO^-$  ) 為一群具有強氧化力的氧分子，因為具有很高的活性，可造成 DNA、蛋白質和脂質的傷害 ( Scandalios 1993 )。

人體中的自由基清除酵素 free radical scavengers，可防止體內過多的自由基產生，以維持氧化還原平衡。如果 ROS 的產生增加太多或抗氧化機制的的能力下降時，將導致平衡狀況的崩解，造成氧化壓力 oxidative stress，進一步令細胞產生氧化傷害 oxidative damage。

由於氧氣對於維繫生物體生命極為重要，而活性氧分子在細胞正常生長與代謝過程中皆會產生，所以活性氧分子可對生物體不時地造成威脅 ( Fridovich 1978 )。當生物邁入老化階段或生長環境不良時，粒腺體電子傳遞系統中的電子會被氧分子中途截獲而變成超氧自由基 superoxide radical (Pell and Steffen 1991)。如果超氧自由基與  $H_2O_2$  同時存在時，可經由  $Fe^{2+}$  催化 ( Haber-weiss 反應 ) 產生毒性更強的氫氧自由基 ( Bowler *et al.* 1992 )。此外其他化學系統刺激 ( 如游離輻射、銅、鐵及光等 ) 也可產生自由基。

而與人類疾病相關的自由基約可分為五大類：

- 1.超氧自由基：舉凡生物皆可產生  $O_2^{\cdot-}$  ( Fridovich 1975 ) 當吞噬細胞與外來抗原或是免疫複合物作用時也會造成超氧自由基  $O_2^{\cdot-}$  生。但由於  $O_2^{\cdot-}$  是通常最早形成的自由基且半衰期極短，減少直接造成傷害，可是過多的  $O_2^{\cdot-}$  可引起一連串反應，產生其他次級產物（如脂質自由基）對生物體造成嚴重地傷害。
- 2.過氧化氫：當巨噬細胞被活化以執行吞噬作用時、 $O_2^{\cdot-}$  經由 SOD 催化皆可形成  $H_2O_2$ 。由於  $H_2O_2$  可通過細胞膜和體內的銅及鐵發生 Fenton 反應 ( Walling 1982 )，進而產生破壞力強的  $\cdot OH$  氫氧自由基及  $HOCl$ 。
- 3.氫氧自由基： $\cdot OH$  氫氧自由基為最活躍的自由基之一，在體內可經由  $H_2O_2$  和體內的銅及鐵發生反應而產生；另外 X-ray 照射也會造成  $H_2O_2$  大量地形成，造成脂質過氧化而且與細胞內醣類、胺基酸、磷脂質、核糖體及有機酸反應引起細胞傷害。尤其  $H_2O_2$  可和 DNA 的 purine 及 pyrimidine 作用引起細胞突變或死亡。
- 4.單態氧：當接受紫外線照射時體內氧分子被激發成不穩定狀態，使電子逆轉而極易與氫反應，造成脂質過氧化以及其他自由基的形成。
- 5.過氧化脂質：過氧化脂質為體內最多的自由基反應物。當不飽和脂肪酸受到自由基氧化時會產生極多的自由基。並且經由過氧化脂質再

裂解成其他的自由基，以形成有害的醛類 (如 malondialdehyde MDA ) 或其他產物。若不飽和脂肪酸過氧化發生在細胞膜上，則會使細胞膜失去功能；過氧化脂質也可直接與蛋白質、酵素、核酸作用，引發細胞突變或死亡 ( Francisco 1996 )。

## 1.4 體內抗氧化機制

一般生物抗氧化機制含有酵素及非酵素二大防禦機轉，以減低活性氧分子造成的傷害 ( Jose' M *et al.* 1999)。人體中的酵素性抗氧化物 primary antioxidant enzymes 主要有三種：分別為(1)superoxide dismutase ( SOD )、(2) catalase ( CAT )及(3) glutathione peroxidase ( GPx )；人體中的非酵素性抗氧化物則以 glutathione reductive form ( GSH )為代表。

### 酵素性抗氧化物

**(1)superoxide dismutase: SOD** 除了具備一般生物酵素特性之外，也是唯一以  $O_2^{\cdot -}$  為受質的酵素，其結構與胺基酸排列有一定的特徵，和金屬離子 (  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ) 的輔助因子以螯合形式結合。依其蛋白結構與金屬離子種類不同又可分為 MnSOD、CuZnSOD 及 extracellular SOD ( ECSOD )。

**CuZnSOD** 存在細胞質內，是細胞內最主要的 SOD 同功酵

( Kanematsu and Asada 1989 )。其分子量約 32 kDa，由二個相同次單元所構成，每個次單元各有一個銅原子、鋅原子；銅原子的功能為參與氧化還原反應，而鋅原子則是與 SOD 蛋白質構形有關聯

( Tainer *et al.* 1983 )。

**MnSOD** 存在粒腺體基質內，其分子量約 40-90 kDa，由 2 或 4 條次單元所構成，每個分子含有 1-2 個錳原子；其活性與輔基中的  $Mn^{2+}$  有關，MnSOD 的組成中比 CuZnSOD 含有較多的酪胺酸及色胺酸，MnSOD 可轉換由電子傳遞系統所釋出的電子產生的 superoxide radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) 成為 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )，再藉由 GPx 及 catalase 去除 hydrogen peroxide，以避免 oxidative damage 的產生。

**(2)catalase:** 由血質素與四個相同次單元所構成，其分子量約 60 kDa，可不被任何濃度的  $H_2O_2$  所飽和為極有效率之酵素，因可將  $H_2O_2$  轉化成氧，而維持細胞內氧濃度以對抗氧化壓力。

**(3)glutathione peroxidase:** 由四個相同次單元所構成，其分子量約 80 kDa，可將二分子的 GSH 轉化成氧化態的 GSSG，再將  $H_2O_2$  轉化成氧，而維持細胞內氧濃度以對抗氧化壓力。

## 非酵素性抗氧化物

**glutathione reductive form (GSH):** 為帶有-SH基的 triple peptide，是人體內主要的可溶性抗氧化物質，富含於細胞質、核仁、粒線體之中，在肝細胞中負責執行許多解毒的功能。並可作為 glutathione peroxidase的受質，對過氧化氫進行分解作用，而且可與 vitamin E協同保護細胞膜避免受自由基的傷害。

### 1.5 研究動機

由過去的研究顯示不管是 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠肝纖維化的活體實驗或者以肝臟灌流法分離之大白鼠肝細胞進行體外培養，用乙醯氨基酚 acetaminophen 誘發毒性的體外研究，結果均指出金線連具有保肝作用，但是否具抗氧化功用則有待進一步探討。

在人類肝癌細胞中 hepatocellular carcinoma (HCC) 發現到與鄰近正常組織比較抗氧化酵素(antioxidative enzyme) 的活性或可抑制 lipid peroxidation 能力高；且經由自由基 free radical 測定，發現有增加的現象，可證實 free radical 和 HCC 具關聯性 (Iwagak H *et al.* 1995)。另外在人類肝癌細胞 HepG2 細胞培養中發現，證實當受到 NF- $\kappa$ B、AP-1 結合至 Glutamyl cysteine synthetase heavy subunit promoter 上游結合位時，GCS heavy subunit promoter，會促進 GSH

合成酵素（GCS）增加轉錄速率進而提升 GSH 的產量並促使 HepG2 細胞生長（Huang *et.al* 2001）。

我們希望藉由建立體外培養肝癌細胞的模式，探討台灣金線連的水萃取物對於肝癌細胞(HepG2,Hep3B,Mal5,SK)抑制生長之作用，並試圖找出可抑制肝癌細胞生長之有效劑量。此外，將進一步探討台灣金線連，是否經由自由基的改變而抑制肝癌細胞 HepG2 的生長；而此機制是否與 primary antioxidant enzymes 的活性或表現量改變相關，以試圖找出台灣金線連抑制肝癌細胞生長之可能作用機轉。

## 二.材料與方法:

### 2.1 細胞之處理：

HepG2 , Hep3B , Mal5 , SK 細胞在直徑 3.5 cm 培養皿中 , 以原始密度  $5 \times 10^5$ /ml 利用含 10% 胎牛血清的 Dulbecco's Modified Eagle Medium ( DMEM ) 培養基在  $37^\circ\text{C}$  , 5%  $\text{CO}_2$  培養細胞。將未知濃度台灣金線連水提取物經冷凍乾燥機 ( IWAKI FRD-50P ) 冷凍乾燥後 , 刮下冷凍乾燥結晶物 , 在無塵操作台稱取所需藥量 , 並以 DMEM ( Gibico ) 稀釋成 2.5, 5, 10, 50 mg  $\mu\text{l}$  不同濃度的台灣金線連 stocking solution 備用。

HepG2 細胞同時接受各種不同濃度 ( 最終濃度 2.5, 5, 10, 25  $\mu\text{g}$  /ml ) 的台灣金線連藥物處理過後 , 分別在  $37^\circ\text{C}$  , 5 %  $\text{CO}_2$  培養 12, 24, 48 小時後 , 收集細胞進行下一步實驗。

### 2.2 細胞毒性試驗:

Trypan blue exclusion test: 細胞懸浮液與Trypan blue各100  $\mu\text{l}$ 等量混合5分鐘後在計數盤中 , 計算細胞數目。由於活細胞因為具有將Trypan blue排出的功能 , 因此只有死細胞會被染上 , 由存活細胞數與死細胞數的比例 , 可以得到由不同濃度藥物造成之細胞毒性和存活率。

### 2.3 蛋白質抽取:

將所有分別在 37 °C 培養 12, 24, 48 小時後的細胞去除 DMEM 培養基, 以 cold phosphate buffer solution PBS 200  $\mu$ l 清洗2次。以含有 1mM PMSF、10 $\mu$ g/ml leupeptin、10 $\mu$ g/ml aprotinin、200  $\mu$ M sodium orthovanadate、10mM sodium fluoride以及 100  $\mu$ M EGTA 的 lysis buffer (Hepes pH7.5 sodium salt ; 150 mM NaCl ; 10% Glycerol ; 1% Triton X-100 ; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 200  $\mu$ l 加入細胞並置冰上作用45分, 將細胞膜溶解。將細胞刮下並收集在離心試管中, 以 10000 rpm 速度離心 10 分鐘後, 收取上清液。蛋白質濃度以蛋白質分析液 (Bradford ,Bio-Rad), 利用分光比色計( Beckman DU 650 ) 在 595 nm 的波長下定量。

### 2.4 Glutathione assay :

將藥物處理後之檢體以低速度離心取出 cell pellet , 加入 500  $\mu$ l 5% metaphosphoric acid 均質化, 並以 4 °C 3000 $\times$ g 離心 10 分鐘後; 取上清液 20~300  $\mu$ l 備用。用 glutathione assay kit ( Calbio Chem ) 方法, 先以 stock glutathione solution 依已知不同濃度 ( 0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ M ) 求出標準曲線。再用 Reagent 3 buffer ( Calbio Chem ) 利用分光比色計 ( Beckman DU 650 ) 以波長 400nm 先歸零。取上

清液20  $\mu$ l以Reagent 3 buffer ( Calbio Chem ) 稀釋至總體積為900  $\mu$ l待檢。加入可使所有含硫化物轉變成 thioethers 的 50  $\mu$ l Reagent 1 ( Calbio Chem ) , 接著加入當pH >13時可以單獨將GSH adduct 轉變成可辨識之發色thione的含30 % NaOH Reagent 2 ( Calbio Chem. ) 50  $\mu$ l; 在室溫下避光反應10分鐘。利用分光比色計 ( Beckman DU 650 ) 以 400 nm測OD值並內插求出 glutathione 值來。

## 2.5 以西方墨點法測定蛋白質的表現量：

將抽取出之蛋白質經由 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE 電泳後，於4  $^{\circ}$ C cooling system中以50V 200 mA 2小時轉漬到硝化纖維片上。並以pH 7.2 PBS緩衝液(0.137M NaCl ; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 2.68 mM KCl ; 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> )浸潤之，以含 5 % non-fat milk 之 PBS 於37  $^{\circ}$ C作用1小時。加入初級抗體於含1 % non-fat milk 之 PBS 中依照比例稀釋成反應濃度，37  $^{\circ}$ C 作用1小時，然後以含0.5 % Tween 20之 PBS 清洗1小時。加入2級抗體於含1 % non-fat milk 之 PBS 中依照比例稀釋成反應濃度，在 37  $^{\circ}$ C 作用1小時。然後以含 0.5 % Tween 20 之 PBS 清洗1小時，然後加上 ECL 偵測試劑(Amersham pharmacia)至膜上作用1分鐘，壓片後曝光顯影。

## 2.6 RNA之抽取：

將藥物處理過後的細胞，以每  $10^6$  加入 REzol Rg ( Protech ) 1 ml 的濃度使用，在室溫下作用5分鐘，使 nucleoprotein complex 被完全分解。接著依照每 1 ml Rezol 加入 0.2 ml chloroform 的比例，強烈振盪混合15秒並在室溫下作用2分鐘以後，在  $4^{\circ}\text{C}$  下以  $12000\times g$  離心 15 分。取出上清液，以 1:1 比例用異丙醇沉澱 RNA，在室溫下作用10 分鐘以後，在  $4^{\circ}\text{C}$  下以  $12000\times g$  離心 15 分。以 75% 酒精來沉澱 RNA pellet，在  $4^{\circ}\text{C}$  下以  $12000\times g$  離心 5 分，最後使之自然乾燥。抽取的 RNA 以二次水溶解，以 RNA gel 來確認是否有抽取出 RNA，並利用分光比色計( Beckman DU 650 )測定其 OD 值。將純化後的 RNA 放置在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中以待進一步實驗分析。

## 2.7 以 RT-PCR 來評估基因的表現：

取  $1\ \mu\text{g}$  RNA 當模版，在  $95^{\circ}\text{C}$  中置一分鐘後，再放冰上冷卻。加入  $4\ \mu\text{l}$  5X MMLV-RT First-Strand buffer ( 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$  ), 加  $8\ \mu\text{l}$  10 mM dNTP, 加  $1.5\ \mu\text{l}$  200 ng/ $\mu\text{l}$  random primer, 加  $0.5\ \mu\text{l}$  RNasin (40 U/ $\mu\text{l}$ ), 加  $1\ \mu\text{l}$  MMLV-RT (200 U/ $\mu\text{l}$ , Life Technologies), 加完後放入  $42^{\circ}\text{C}$  水浴 2 小時。再取  $5\ \mu\text{l}$  cDNA 中加入  $10\times$  buffer、40 U/ $\mu\text{l}$  RNasin, 加入 100 ng/ $\mu\text{l}$  的 primer

( 含 forward ,reverse primer ) 各 1.5  $\mu$ l , 再加入最終濃度 final concentration 1 mM dNTP, 再加入 Taq 聚合酵素 0.5  $\mu$ l, 進行 PCR 得到 RT-PCR DNA 產物。所得之 DNA 產物以電泳分析法配合數位影像分析儀來加以評估各種藥物處理對於相關基因表現量之改變。

實驗中亦包括一組 actin primer set 來做為內因性的對照組 , 以確定各組所用RNA 的量皆為一致。

## 2.8 轉錄子活性分析 promoter assay :

HepG2細胞經轉染含有 NF $\kappa$ B ,AP-1 結合區之報導基因 ( luciferase ) 載體後 , 經 48小時 , 以 1 $\times$ PBS 清洗細胞2次 , 用150  $\mu$ l cell lysis buffer ( 125 mM Tris , pH7.8 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ; 10 mM EDTA ; 10 mM DTT ; 50% Glycerol ; 5% Triton X-100 ) 將細胞溶解下來。再將溶解液移至微量離心管中 , 13000rpm 離心1分鐘 , 收集上清液。

以 Bio-Rad protein assay kit 方法 , 定量蛋白質濃度之後 , 將所有欲測之轉染細胞檢體各取 25  $\mu$ g 蛋白質 , 加cell lysis buffer 到 25  $\mu$ l, 依序放入96 孔平盤中, 以 TROPIX TR717 ( PERKIN ELMER ) 測定其冷光強度 , 換算成轉染後 luciferase 活性強度 , 藉以評估欲測基因轉錄活性的強度。

## 2.9 超氧化歧化酵素活性分析 SOD activity assay :

將藥物處理後之 HepG2 檢體以  $4 \times 3000 \times g$  離心 10 分鐘離心取出 cell pellet , 加入 200  $\mu$ l cold PBS , 並以以  $4 \times 3000 \times g$  離心 10 分鐘後去除上清液洗二次。加入 200  $\mu$ l PBS 在冰上超音波振盪 10 秒鐘三次 , 並以  $4 \times 12000$  rpm 離心 30 分鐘取上清液備用。

用 SOD assay kit ( RANDOX ) 方法 , 先以 stock solution 依已知不同濃度求出標準曲線。xanthine 與 250  $\mu$ l xanthine oxidase 反應後可形成超氧自由基 , 而超氧自由基與 1.7ml mixed substrate ( I.N.T. ) 反應後可轉變成 red formazan dye。再加入 5  $\mu$ l 檢體在 37 一起作用 , 若 SOD activity 高時形成 red formazan dye 即受大量抑制。利用分光比色計( Beckman DU 650 )以波長 505 nm 測 OD 值並內插即可求出 SOD activity 值。

## 2.10 過氧化氫酵素活性分析 catalase activity assay :

超音波振盪後取上清液 , 利用蛋白質分析液 ( Bradford ,Bio-Rad ) , 以分光比色( Beckman DU 650 ) 在 595nm 的波長下定量蛋白質濃度。取等量蛋白質在 Native-PAGE 上經電泳後 , 將膠片浸於 3.27 mM  $H_2O_2$  反應 5 分鐘。倒出反應液 , 以 dd  $H_2O$  清洗數次。將膠片浸於  $FeCl_3$  和  $K_3[Fe(CN)_6]$ 採 1:1 比例混合的染劑之

中，作用 10 分鐘。在膠片之上可以見到深藍色的背景之中，呈現出淺藍色的亮帶，此即是 catalase 活性所在。以二次水清洗染劑，並儘快定量以免退色影響到結果。

## 2.11 超氧自由基分析 Superoxide assay :

利用可與超氧自由基反應的 Dihydroethidine ( DHE ) 特異性等染料，具有自由通透細胞的功能，若遇上超氧自由基時會被氧化成 ethidium，並結合嵌在 DNA 雙股分子上的特性，經由流式細胞儀中激發光波長 488nm，可將其激化成 590nm 成紅色螢光，藉此發散的螢光值可以得知細胞內超氧自由基的濃度。

將 DHE ( Molecular Probes ) 以 Di-methylformamide DMF ( Sigma ) 溶解再以 PBS 稀釋泡製成 10 mM 濃度的 DHE 備用。將分別培養 24、48、72 小時的 HepG2 細胞株，以 trypsin 處理後，將細胞懸浮液以 800 rpm 離心 15 分鐘，倒去 DMEM，再以 cold PBS 重覆上述步驟清洗細胞 2 次後，再以 1ml PBS 小心的混合成細胞懸浮液待測。再以最終濃度 10  $\mu$ M/ml DHE 加入，在 37 反應 15 分鐘後以流式細胞儀測試其值，並比較加藥組與對照組之間，在不同時間點的細胞內超氧自由基產量。

## 2.12 過氧化氫分析 Hydroxy peroxidase assay :

利用脂溶性的 2',7'-dichlorofluorescein Diacetate (DCFH-DA) 特异性染料，可自由通過細胞內被水解成水溶性 DCFH 留滯於細胞內。若遇有  $H_2O_2$  則可被氧化成發前綠色螢光的 DCF 經由 COULTER FACs 流式細胞儀中激發光波長 488nm 激化成 535nm 綠色螢光，藉些發散的螢光值可反映出細胞中  $H_2O_2$  濃度。

首先取出 DCFH-DA (Molecular Probes) 以 DMF 溶解以 PBS 稀釋泡製成濃度 20 mM DCFH-DA 備用，將分別培養 24、48、72 小時的 HepG2 細胞株以 Trypsin 分離出培養皿。將細胞懸浮液以 800 rpm 離心 15 分鐘，倒去 DMEM，再以 cold PBS 重覆上述步驟清洗細胞 2 次之後，再以 1 ml PBS 小心的混合成細胞懸浮液待測；再以最後濃度 20  $\mu$ M/ml DCFH-DA 加入，37 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘後，以流式細胞儀測試其值，並比較加藥組與對照組間在不同的時間點的細胞  $H_2O_2$  的產量。

## 2.13 外加 $H_2O_2$ 實驗超氧自由基、過氧化氫分析 :

將最終濃度 200  $\mu$ M  $H_2O_2$  加入  $5 \times 10^5$ /ml HepG2 細胞懸浮液中，分別有 A.對照組只加入 200  $\mu$ M  $H_2O_2$  不加台灣金線連；B 先加

入 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30 分鐘後再加台灣金線連 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；C. 先加入台灣金線連 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  再加 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 。以流式細胞儀測量 1, 2, 4 小時 DHE 與  $\text{O}_2^-$  反應、DCFH-DA 與  $\text{H}_2\text{O}_2$  反應後，留滯於細胞內部的染料受到螢光激發而散發之螢光訊號，藉以比較出對照組與台灣金線連施藥實驗組  $\text{O}_2^-$  與  $\text{H}_2\text{O}_2$  產量的差異。

## 2.15 統計分析方法：

當樣本觀察值所來自之母群體不是近似於一常態分佈時，這些檢定可能會導致不正確的結論，在此情形下，我們可以使用觀察值的等級(ranks)而非觀察本身來計算假設說檢定的統計量，利用等級而不是實際之測量值可以保留對反應值之間相對大小的許多訊息，而不必對樣本所來自之母群體的分佈作任何假設，稱為無母(nonparametric) 或無分佈 (distribution free) 方法。無母數方法的檢力(power)是對應之有母數方法的百之九十五到九十六。所以，這些檢定的檢力可以從計算其對應之有母數檢定的檢力來估計之，當觀察值不是從態分佈之母群體抽出時，無母數方法不僅較為可靠，其檢力也較有母數方法來得大。

在生物醫學研究中受限於樣本數不大，而我們的選擇(有母數或無母數方法)常必須根據判斷及喜好，而非充足的證據。無母數方法

在數據是從常態母群體而來，其檢力達有母數之百分之九十五，且比數據不是從常態分佈而來時更可靠，在分析研究數據時應該假設愈少愈好，所以建議使用無母數方法。根據等級而非實際觀測值的方法，把實際之觀測值以他們的等級(rank)取代之，然後注意所有可能之等級的組合所形成的母體群。因為，所有的樣本其個體數均是有限的，我們可以很容易地列出這些個體所有可能之等級合，而得到檢定試驗無效果之檢定統計量。

使用 Mann-Whitney rank sum test 方法，計算雙尾數值 critical values T 臨界值(計算 T 值即較小之樣本的等級和，若兩樣本數相等時，可以任意計算較大或較小的樣本群)將此計算的 T 值與同樣本數之所養可能等級和形成的分佈相比較，若是檢定 T 臨界值落在雙尾數值之外時，代表檢定出假說無效。

## 三、結果

### 3.1 台灣金線連對各種不同肝癌細胞株的生長影響

為探討台灣金線連是否具有抑制肝癌細胞生長，我們選擇不同分化程的肝癌細胞 HepG2、Hep3B、Mal5、SK 進行細胞計數實驗。

#### 3.1.1 台灣金線連對 HepG2 細胞株生長率影響之結果

加入台灣金線連不同劑量的實驗組與不加藥處理的對照組在培養 24 小時後，計算其生長速率。經比較後得知在較低劑量 2.5  $\mu\text{g/ml}$  及 5  $\mu\text{g/ml}$  組與對照組相比，並無明顯的差異，而在較高劑量的 10  $\mu\text{g/ml}$  與 25  $\mu\text{g/ml}$  組，則有明顯的差異( $p<0.05$ )。相同的結果出現在 48 小時實驗中。在培養 72 小時後，以低劑量處理 2.5  $\mu\text{g/ml}$  組，並無明顯的差異，但在處理 5  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$  組與對照組相比較，出現明顯的差異( $p<0.05$ )，已有顯著控制生長率的效果，尤其在較高劑量的 25  $\mu\text{g/ml}$  組則有明顯的差異( $p<0.01$ )(圖一)。

#### 3.1.2 台灣金線連對 Hep3B 細胞株生長率影響之結果

加入台灣金線連不同劑量的實驗組與不加藥處理的對照組在培養 24 小時後，計算其生長速率。經比較後得知在較低劑量 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$  與 10  $\mu\text{g/ml}$  組，並無明顯的差異，而在高劑量的 25  $\mu\text{g/ml}$  組，則有明顯的差異( $p<0.05$ )。相同的結果出現在 48 小時實驗中。在培養 72 小時後，處理 2.5  $\mu\text{g/ml}$  與 5  $\mu\text{g/ml}$  及 10  $\mu\text{g/ml}$  組，並

無明顯的差異，沒有顯著控制生長率的效果；而在高劑量的 25  $\mu\text{g/ml}$  組則有明顯的差異( $p<0.01$ )(圖一)。

### 3.1.3 台灣金線連對 Mal5 細胞株生長率影響之結果

加入台灣金線連不同劑量的實驗組與不加藥處理的對照組在培養 24 小時後，計算其生長速率。經比較後得知在較低劑量 2.5  $\mu\text{g/ml}$  及 5  $\mu\text{g/ml}$ ，並無明顯的差異，而在高劑量的 10  $\mu\text{g/ml}$ 、25  $\mu\text{g/ml}$  組，則有明顯的差異( $p<0.05$ )。相同的結果出現在 48、72 小時實驗中。

### 3.1.4 台灣金線連對 SK 細胞株生長率影響之結果

加入台灣金線連不同劑量的實驗組與不加藥處理的對照組在培養 24 小時後，計算其生長速率。經比較後得知在較低劑量 2.5  $\mu\text{g/ml}$  及 5  $\mu\text{g/ml}$ ，並無明顯的差異，而在高劑量的 10  $\mu\text{g/ml}$ 、25  $\mu\text{g/ml}$  組，則有明顯的差異( $p<0.05$ )。相同的結果出現在 48、72 小時實驗中。

總結以上結果顯示台灣金線連水萃取物對於分化程度較差的惡性肝癌細胞株 Mal5 及 SK 抑制生長效果較不明顯，但特別在分化程度較好的良性肝癌細胞株 HepG2 抑制生長效果較為顯著，在 10  $\mu\text{g}$  ( $\text{IC}_{50}$ )劑量時即可有效抑制生長，所以我們選擇對於台灣金線連藥物感受性較好的 HepG2 肝癌細胞，以 10  $\mu\text{g}$  為固定劑量接著觀察在 24、48、72 小時不同時間點細胞內各種不同蛋白質的表現量。

### 3.2 台灣金線連對 HepG2 細胞株之 GSH 變化量測定

在 2001 年 Huang 等人首先發現在人類肝癌細胞中 GSH 以及 GSH 合成酵素表現量增加，並且藉由體外試驗 HepG2 細胞培養觀察得知當增加 GSH 表現量時可促進 HepG2 細胞生長，另外由 2/3 肝切除的動物實驗中證實 GSH 表現量增加為正常肝細胞再生時 DNA 合成所必需 (Huang *et al.* 2001)。所以我們接著以台灣金線連 10 µg/ml 為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後，在 24 小時、48 小時、72 小時觀察細胞生長受到抑制時，GSH 的表現量也是否隨之下降。

結果顯示在以台灣金線連 10 µg/ml 為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後，不管在 24 小時、48 小時、72 小時後，與未施藥的對照組比較下均  $P < 0.009$ ，在統計上有明顯的差異；顯示台灣金線連處理過 HepG2 細胞株後，有使細胞 GSH 量顯著下降的功能 (圖二)。

### 3.3 以西方墨點法測量 CuZn-SOD、 catalase 蛋白質表現情形

#### 3.3.1 以西方墨點法分析 CuZn-SOD 蛋白質表現量測定

以台灣金線連 10 µg/ml 為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後別在 24 小時，48 小時，72 小時後抽取蛋白，與未施藥的對照組比較。其

細胞內源性抗氧化酵素 CuZn-SOD 蛋白質量，在經由  $\beta$ -actin 修正後分析所得之數據顯示，台灣金線連施藥 24 小時後與正常組比較為 1.43 倍，台灣金線連施藥 48 小時後與正常組比較為 1.36 倍，台灣金線連施藥 72 小時後與正常組比較只有 1.02 倍，在統計學上沒有明顯的差異 (圖三)。

### 3.3.2 以西方墨點法分析 catalase 蛋白質表現量測定

以台灣金線連 10  $\mu$ g/ml 為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後，分別在 24 小時、48 小時、72 小時後抽取蛋白，與未施藥的對照組比較。其細胞內源性抗氧化酵素 catalase 蛋白質量在經由  $\beta$ -actin 修正後分析所得之數據顯示，台灣金線連施藥 24 小時後與正常組比較為 0.9 倍，台灣金線連施藥 48 小時後與正常組比較為 0.73 倍，台灣金線連施藥 72 小時後與正常組比較只有 0.82 倍。在統計學上並沒有明顯的差異 (圖三)。

總結以台灣金線連 10  $\mu$ g/ml 為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後，分別在 24 小時、48 小時、72 小時與未施藥的對照組比較其細胞內源性抗氧化酵素的表現量，並沒有明顯的差異。所以，我們想進一步以 RT-PCR 方法取代北方墨點法探討其相關酵素在 RNA level 上的表現。

### **3.4 台灣金線連對 HepG2 細胞株中抗氧化酵素 mRNA 表現之測量**

#### **3.4.1 RT-PCR 測量 GCS mRNA 的表現情形**

以軟體分析 RT-PCR 實驗所得之結果，24 小時實驗組與對照組比較之下顯示 GCS mRNA 的表現有明顯下降的差異( $P<0.05$ )。但在 48 小時、72 小時後其量變化均不明顯，無統計上之意義 (圖四、五)。

#### **3.4.2 RT-PCR 測量 GPx mRNA 的表現情形**

以分析軟體分析 RT-PCR 實驗所得之結果，實驗組與未施藥的對照組比較之下，在 24 小時、48 小時、72 小時皆有明顯之差異( $P<0.05$ ) (圖四)。

#### **3.4.3 RT-PCR 測量 SOD mRNA 的表現情形**

以分析軟體分析 RT-PCR 實驗所得之結果，實驗組與未施藥的對照組比較之下，在 24 小時、48 小時、72 小時皆無明顯之差異 (圖四)。

#### **3.4.4 RT-PCR 測量 catalase mRNA 的表現情形**

以分析軟體分析 RT-PCR 實驗所得之結果，實驗組與未施藥的對照組比較之下，在 24 小時、48 小時、72 小時( $P<0.05$ )皆有明顯之差異 (圖四)。

結果顯示在以台灣金線連處理 HepG2 細胞株之後，不管在 24

小時、48 小時、72 小時，與未施藥的對照組比較下 SOD mRNA level 無明顯之差異，catalase mRNA level 皆有明顯之差異；在蛋白質表現量上卻不明顯，因此，除了瞭解細胞內源性抗氧化酵素 mRNA level 變化之外，我們接著觀察 SOD、catalase 活性是否也有不同的改變。

### 3.5 測量 SOD、catalase 活性

以台灣金線連 10  $\mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後，分別在 24 小時、48 小時、72 小時後抽取蛋白與未施藥的對照組做比較。其細胞內源性抗氧化酵素 SOD 活性隨時間而增加，catalase 活性在 24 小時後，有相對減少的趨勢，在 48 小時後相對減少的量最多，在 72 小時後相對的減少量最少（圖七）。

由以上實驗結果可知以台灣金線連處理 HepG2 細胞株之後不管在 GSH level 的表現量或是 SOD、catalase 活性上都與未施藥的對照組有差異。

### 3.6 台灣金線連對 HepG2 細胞株轉錄子活性分析

在對照組中因載體不帶有 luciferase 之報導基因，所以不管加藥或不加藥測定冷光之激發量並無太大差異，顯示我們的品管信度可被接受。

經由軟體分析實驗所得之結果顯示，加藥組與對照組之比較轉染具有 NF- $\kappa$ B 結合位而影響轉錄子活性約下降 4.6 倍；轉染具有 AP-1 結合位而影響轉錄子活性約下降 6.1 倍。兩者均有明顯之差異 ( $P < 0.01$ )(圖六)。

結果顯示在以台灣金線連處理 HepG2 細胞株之後 promoter assay 不管在轉染具有 NF- $\kappa$ B 或 AP-1 結合位的載體之後，其報導基因轉錄出 luciferase activity 皆有明顯下降 (圖六)。

### 3.7 台灣金線連處理 HepG2 細胞株後活性氧分子產量分析

為瞭解在 HepG2 細胞株未施藥的對照組與以台灣金線連處理 HepG2 細胞株間活性氧分子實際產能情形的比較，以流式細胞儀分析以台灣金線連處理細胞後超氧自由基、過氧化氫產量之變化。

#### 3.7.1 台灣金線連對 HepG2 細胞株處理後超氧自由基產量分析

結果顯示在 24 小時對照組經 Coulter XL 軟體分析超氧自由基產量為  $46.9 \% \pm 3.1$ ，在以台灣金線連  $10 \mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後經 Coulter XL 軟體分析超氧自由基產量為  $36.3 \% \pm 2.7$ 。在 48 小時對照組經 Coulter XL 軟體分析超氧自由基產量為  $43.6 \% \pm 2.6$ ，在以台灣金線連  $10 \mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後經 Coulter XL 軟體分析超氧自由基產量為  $23.1 \% \pm 2.1$ 。在

72 小時對照組經 Coulter XL 軟體分析超氧自由基產量為  $27.5 \% \pm 2.4$ ，在以台灣金線連  $10 \mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後經 Coulter XL 軟體分析超氧自由基產量為  $15.5 \% \pm 1.9$  (圖八)。

### 3.7.2 台灣金線連 HepG2 細胞株處理後過氧化氫產量分析

結果顯示在 24 小時對照組經 Coulter XL 軟體分析過氧化氫產量為  $58.3 \% \pm 3.1$ ，在以台灣金線連  $10 \mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後經 Coulter XL 軟體分析過氧化氫產量為  $76.7 \% \pm 3.5$ 。在 48 小時對照組經 Coulter XL 軟體分析過氧化氫產量為  $70.7 \% \pm 3.4$ ，在以台灣金線連  $10 \mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後經 Coulter XL 軟體分析過氧化氫產量為  $77 \% \pm 2.8$ 。在 72 小時對照組經 Coulter XL 軟體分析過氧化氫產量為  $54.7 \% \pm 2.5$ ，在以台灣金線連  $10 \mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後經 Coulter XL 軟體分析過氧化氫產量為  $58.2 \% \pm 2.5$  (圖九)。

總結以台灣金線連  $10 \mu\text{g/ml}$  為固定劑量處理 HepG2 細胞株之後，結果顯示在以台灣金線連處理 HepG2 細胞株之後分別在 24 小時、48 小時、72 小時與未施藥的對照組比較超氧自由基產量皆呈現下降的趨勢，與台灣金線連處理 HepG2 細胞株之後 SOD level activity 上升結果相符。過氧化氫產量在 24 小時、48 小時、72 小時與未施藥的對照組比較皆呈現上升的趨勢，尤其在台灣金線連處理後

24 小時過氧化氫產量差異最大。所以，我們更進一步做外加  $H_2O_2$  試驗，希望能深入瞭解在以台灣金線連處理 HepG2 細胞株後對細胞內氧化壓力反應的影響如何。

### **3.8 外加過氧化氫處理後 HepG2 細胞株活性氧分子產量分析**

#### **3.8.1 HepG2 細胞株經外加 200 $\mu$ M 過氧化氫處理後超氧自由基、過氧化氫產量測定**

其超氧自由基產量在一小時為  $35.7\% \pm 0.98$ ，二小時為  $36\% \pm 2$ ，四小時為  $23.13\% \pm 5.8$ ；過氧化氫產量在一小時為  $65.38\% \pm 1.07$ ，二小時為  $52.13\% \pm 1.4$ ，四小時為  $31.6\% \pm 0.97$  (圖十、十一、十二)。

#### **3.8.2 HepG2 細胞株經外加 200 $\mu$ M 過氧化氫處理後再以台灣金線連處理超氧自由基、過氧化氫產量測定**

超氧自由基產量在一小時為  $41.38\% \pm 3.76$ ，二小時為  $41.8\% \pm 5.15$ ，四小時為  $29.43\% \pm 0.93$ ；過氧化氫產量在一小時為  $69.23\% \pm 0.92$ ，二小時為  $56.53\% \pm 5.29$ ，四小時為  $26.13\% \pm 1.19$  (圖十、十一、十二)。

### 3.8.3 HepG2 細胞株經以台灣金線連處理後再外加 200 $\mu$ M 活性氧分

#### 子、過氧化氫產量測定

超氧自由基產量在一小時為 28.28 %  $\pm$  5.8，二小時為 33.6 %  $\pm$  5.05，四小時為 14.69 %  $\pm$  3.01；過氧化氫產量在一小時為 55.98 %  $\pm$  5.09，二小時為 43.73 %  $\pm$  7.81，四小時為 26.13  $\pm$  2.15 (圖十、十一、十二)。

結果顯示先加台灣金線連有保護細胞抗氧化，清除超氧自由基、過氧化氫的功效。而先加過氧化氫再加台灣金線連則保護細胞抗氧化的效果較差，超氧自由基、過氧化氫的產量在一小時，二小時高於不加台灣金線連的對照組，但在四小時後清除超氧自由基的功效逐漸提昇、清除過氧化氫的能力趕上對照組。所以推測其加藥物時間點對於台灣金線連具備何種抗氧化能力有決定性的關係。

## 四、討論

根據衛生署 2001 年統計癌症現為國內十大死因，而肝癌又居前三名，所以目前治療肝癌已是刻不容緩的工作，因為傳統治療肝癌的化學療法多以出現抗藥性及產生副作用，因此開發新的輔助性療法為另一個可以嘗試的方向。我們選擇民間盛行具保肝作用有顯著功效的台灣金線連為研究題材，試著探討台灣金線連是否具有抑制癌細胞生長的能力。

以不同分化程度的肝癌細胞 HepG2、Hep3B、Mal5、SK 進行細胞生長抑制實驗，結果顯示以台灣金線連處理 Mal5 及 SK 等分化程度較差的惡性肝癌細胞株，除了在高劑量 25  $\mu$ g/ml 有較明顯的抑制生長效果外，對台灣金線連的感受性似乎不如分化程度較好的 HepG2 及 Hep3B。尤其在 HepG2 細胞株中對台灣金線連的感受性特別好，在 10  $\mu$ g/ml 濃度下即有抑制近 50 % 生長率的效果出現，顯示金線連對於分化程度較好的肝癌細胞有較明顯抑制生長的效果(圖一)。所以，我們以下接著的試驗皆採用 HepG2 細胞株以相同劑量 10  $\mu$ g/ml (IC<sub>50</sub>) 的台灣金線連處理，分別在 24、48、72 小時與未加藥的對照組做比較。

當細菌或病毒入侵時會形成 ROS，細胞會因此造成慢性傷害引

起細胞 DNA 損傷。例如慢性肝炎的病人，當有病毒感染，即可將原本輕微發炎的症狀惡化，造成肝細胞惡性增生甚至增加罹患肝癌的危險。因為，ROS 的形成可能造成 DNA 修護、校正系統出錯，以致 deamination, depurination 或 DNA polymerase errors 的錯誤訊息無法察覺，引起 DNA 突變而走向癌化 (Aimee L *et al.* 2001)。而體內存在有非酵素性、酵素性兩種抗氧化防禦機轉負責 ROS 減少 ROS 氧化傷害。其中非酵素性抗氧化物以 GSH 為代表，細胞內酵素性抗氧化物以 SOD、catalase、GPx 為代表 (Jose' M *et al.* 1999)。

本研究中藉由在抑制 HepG2 生長 IC50 的台灣金線連處理下測定非酵素性抗氧化物 GSH 的變化。在 24、48、72 小時，與對照組相比，金線連處理的實驗組皆有明顯下降的差異  $P < 0.01$  (圖一)，顯示抑制 HepG2 細胞生長的因素，可能與抑制 GSH 表現量相關，此結果與先前報告指出當 GSH 增加時可以有效的促進 HCC 生長的結果相符 (Huang *et al.* 2001)。可是在我們的實驗結果中顯示對照組 72 小時並未高於 48 小時而且下降與 24 小時的量相近，我們推測對照組因為細胞培養密度較高造成細胞與細胞間接觸性抑制，所以影響 GSH 的合成所致 (Carreero J. *et al.* 1999 ; Cai *et al.* 1995)。

一般認為 GSH 具有解毒及抗氧化功能，可將許多抗癌藥物分解使之療效減低。如果將 GSH 量減低時，可以有助提升其他抗癌藥物

的效果 ( Zhang K *et al.* 2001 )。但是有學者提出不一樣的說法，認為 GSH 具有雙重功能，其一，當硒 Se 存在時 GSH 的作用就像氧化前驅物(pro-oxidant)，可促進硒引起的氧化壓力；其二，GSH 也可當作抗氧化物，避免氧化壓力造成的傷害與細胞凋亡 ( Shen H *et al.* 2000, Zhang K *et al.* 2000)。有相關論文指出當 ROS 增加而 GSH 量不足時，會造成脂質過氧化、蛋白質氧化、膜電位喪失，接著細胞因而死亡。如果此時 catalase 也下降，會引起抗氧化能力受損因而產生過多的 ROS，解毒能力不夠而造成過氧化氫的累積 ( Mari M *et al.* 2001 )。還有研究指出當 GSH 耗損過多時會抑制細胞周期 S phase，並且影響周邊血液單核球的生長 ( Joseph PM *et al.* 1989 )。另外，在 2/3 肝切除的大鼠實驗中發現，GCS 活性增加時可以決定 GSH 的合成，並影響肝細胞使再生能力加強 ( Huang *et al.* 1998 )，證實 GCS mRNA 的合成可控制 GSH 的合成。但是也有報告指出增加 GCS 轉錄並非控制 GSH 合成的唯一因素( Jacques PP *et al.* 2002 )。本研究以 RT-PCR 偵測 GCS mRNA 表現量與 GSH 表現量 24 小時的結果相吻合(圖二)。至於 48、72 小時對照組 GCS RT-PCR 與 GSH 量的表現有所差異，是否與 glutathione synthetase (GS)相關，則有待進一步證實。

因此，本研究也進一步分析其他抗氧化酵素在金線連處理下可能扮演的角色。結果顯示在經金線連處理過的 HepG2 細胞其 SOD 的蛋

白質表現量皆較未施藥的對照組有增加的趨勢，但此改變未具統計學上的意義 (圖三)，進一步偵測 SOD 活性，對照組與以金線連處理的實驗組相比較出現漸強的顯著差異(圖七)。

此外在 catalase 蛋白質表現量上，經過台灣金線連處理過的實驗組相較於對照組，不論在 24 48 72 小時都有下降的趨勢。而 catalase 活性的測定表現量上，實驗組與對照組相比較，出現有逐漸減弱的顯著差異(圖七)。

有論文指出 SOD 活性在分化不良的 HCC 比分化較好的 HCC 要低 (Huang C, Wu M. 1990)，HCC 比鄰近正常組織 SOD 活性低引起脂質過氧化造成惡性 HCC (Huang CC. 1991)。有報告指出，當 SOD 活性增加時，因為金屬離子 (如錳、鐵、鈷、銅等) 會與 2-methylaminopyridine 形成複合物，而具有類似 SOD 活性，可以引起過氧化氫的形成，當 GSH 耗損過多，catalase、GPx、GSH-reductase 活性下降時，此時因為產生過多的過氧化氫，而可將癌細胞殺死 (Naggar *et al.* 1998)。有報告指出當 CuZnSOD 過度表現時，細胞內抗氧化酵素，包括 MnSOD、catalase、GPx 會被改變。在體外試驗中，CuZnSOD:GPx 活性比上升時，癌細胞生長速率會因此而減少，猜測，CuZnSOD 是一種抑制癌症基因 (Ying *et al.* 2002)，當 CuZnSOD 活性過度表現時，會造成過氧化氫累積，可能藉此機轉達成抑制癌症細

胞生長。此推論與本實驗經過台灣金線連處理過的細胞相較於對照組 CuZnSOD 活性有上升(圖七)，而在 catalase、GPx RT-PCR 的結果中顯示加藥組呈現下降，在過氧化氫的產量分析中發現過氧化氫有增多趨向，皆與上述之論點相符。

我們從先前的 Huang et al. 的研究中得知，GCS-HS 其啟動區上游具有 AP-1、NF $\kappa$ B 的結合位。如果細胞中 AP-1、NF $\kappa$ B 結合促使 GCS 轉錄而可令 GSH 的合成增加( Huang et al. 2001, Yan et. al 1990, Mulcahy et al. 1997 )，在本研究中以含有 NF $\kappa$ B, AP-1 結合位的報導質體進行轉染 HepG2 細胞由 promoter assay 的結果顯示，在以金線連處理 24 小時的 HepG2 細胞 NF $\kappa$ B 與對照組相較下降 4.6 倍，AP-1 則下降 6.1 倍(圖六)。由於進行 GCS-HS 啟動區選殖的實驗並不順利，因此，僅能推測金線連透過抑制 NF $\kappa$ B, AP-1 與 GCS-HS 啟動區結合造成 24 小時的 GCS-HS mRNA 合成減少，進而造成 GSH 表現量減少，因而使得 HepG2 細胞生長受到抑制( Huang et al. 2001 )。

從流式細胞儀測定超氧自由基產能的結果發現，金線連加藥組比對照組氧自由基減少而過氧化氫產能有稍微增加的趨勢，但我們卻看不到細胞凋亡 DNA ladder 的現象；由於有研究指出 reactive oxygen intermediates (ROI) 合併 NF $\kappa$ B 下降時會抑制肝細胞的凋亡( Jones BE et al. 2000 )，所以猜測是否因為 ROI 產生的原因所致。

當過氧化氫增加時會令 GCS-HS mRNA 轉錄增加，使 GSH 量也連帶增加，相反的當過氧化氫減少時會令 GCS-HS mRNA 轉錄減少使 GSH 量也連帶減少；推測金線連可能經由過氧化氫的影響，誘導 GCS-HS mRNA 轉錄 ( Mari M *et al.* 2000)。

經由 Vanadate 誘發 AP-1 活化的實驗結果顯示，AP-1 會受到超氧自由基、過氧化氫的活化，但不受氫氧自由基的誘導而活化 ( Ding *et al.* 1999 )。另外有關於骨骼肌細胞相關實驗報告指出，NF $\kappa$ B 在氧化壓力時，可有效調節 GPx、catalase 表現量的上升 ( Zhou LZ *et al.* 2001 )。還有論文指出過氧化氫改變時並不會影響 NF $\kappa$ B 對 DNA 的結合 ( Earner *et al.* 1996 )。

當 AP-1 與 DNA 結合能力下降時，此時外加 SOD 與 catalase 令 SOD 與 catalase 過度表現，可以使 GSH 下降；而且抑制 AP-1 mRNA 的形成與抑制 AP-1 與 DNA 結合能力( Ozolins TR *et al.* 1997 )。在因局部腦缺血的情形下所造成缺氧及自由基增加的實驗結果中，證實雖然在缺氧及自由基增加的情形下，但由於 ZnCu SOD 過度表現，仍會造成 AP-1 活性下降( Huang CY *et al.* 2001 )。其他報告指出當抑制 AP-1 活性、mitogen-activated protein kinase pathway 可以抑制細胞生長 ( Chung *et al.* 1999 )。

在本實驗中我們做了外加過氧化氫的實驗結果顯示，以台灣金線連先處理過 HepG2 細胞後加入過氧化氫處理的組別與不處理的對照組相比，對自由基、過氧化氫有比較強的清償能力，代表台灣金線連先加藥後能有效維持抗氧化能力；而在先加過氧化氫後加台灣金線連的組別在 1、2 小時對超氧自由基、過氧化氫都有產能較高的趨勢，在 4 小時後才恢復對過氧化氫的清償能力。我們推測可能之原因是，在先外加過氧化氫時會對細胞形成氧化壓力，先造成細胞內酵素性抗氧化物 catalase 與過氧化氫作用；然後加入台灣金線連時，會讓原先已耗損的 catalase 更加減少，致使有上述之情形發生。

雖然我們外加過氧化氫實驗祇有瞭解細胞內 1、2、4 小時之間的氧化還原狀態，但藉由此結果可證明台灣金線連具有清除過氧化氫與預防自由基形成的能力。

由於 AP-1 會受到超氧自由基、過氧化氫的活化 ( Ding M *et al.* 1999 )。從實驗結果中顯示，promoter assay 的結果顯示 AP-1 下降 6.1 倍(圖六)，而外加過氧化氫實驗中以台灣金線連先處理過 HepG2 細胞後加入過氧化氫處理的組別與不處理的對照組相比，對自由基超氧自由基有比較強的清償能力、過氧化氫有稍微增加。過氧化氫改變時並不會影響 NF $\kappa$ B 對 DNA 的結合( Earner *et al.* 1996 )，所以當台灣金線連處理過 HepG2 細胞後，雖過氧化氫有稍微增加，但此 redox status

不影響 NF $\kappa$ B 對 DNA 的結合，promoter assay 的結果顯示 NF $\kappa$ B 與對照組相較下降 4.6 倍，與本實驗結果並無衝突。經由外加過氧化氫的實驗結果顯示先加台灣金線連處理過 HepG2 的細胞對自由基、過氧化氫有比較強的清償能力，可有效維持抗氧化能力；所以推測當造成缺氧及自由基增加的情形下，由於 CuZn SOD 過度表現，會造成 AP-1 活性下降(Huang *et al.* 2001)，使 AP-1 與 DNA 結合能力下降，GSH 合成減少，而且抑制 AP-1 mRNA 的形成與抑制 AP-1 與 DNA 結合能力( Ozolins *et al.* 1997)。另外，抑制 AP-1 活性可以抑制細胞生長( Chung *et al.* 1999)是否與 GSH 合成減少而可能有協同抑制 HepG2 肝癌細胞生長的效果，有待我們進一步的實驗探討。

## 參考文獻

Abou Ghalia AH, Fouad IM. **Glutathione and its metabolizing enzymes in patients with different benign and malignant diseases.** *Clin Biochem* 2000;33(8):657-62

Ahmed S, Rahman A, Mathur M, Athar M, Sulatna S. **Anti-tumor promoting activity of Asteracantha longifolia against experimental hepatocarcinogenesis in rats.** *Food Chem Toxicol* 2001;39(1):19-28

Antonova TV, Nikolaenko SL, Bol'shakova AI **Characteristics viral hepatitis in addicts with consideration of lymphocyte membrane condition.** *Ter Arkh* 1998;70(11):21-4

Baronzio GF, Solbiati L, Ierace T, Barzaghi F, Suter F, Airolid M, Belloni G, Ravagnani F, Notti P, and Gramaglia A *et al.* **Adjuvant therapy with essential fatty acids (EFAs) for primary liver tumors: some hypotheses.** *Med Hypotheses* 1995;44(3):149-54

Bowler C, Van Montagu M and Inze D **Superoxide dismutase and stress tolerance.** *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol.* 1992 43:83-116.

Brigham KL **Oxygen radicals an important mediator of sepsis and septic shock.** *Klin Wochenschr* 1991 69:1004-8.

Cai J, Mao Z, Hwang JJ, and Lu SC **Differential expression of methionine adenosyltransferase genes influences the rate of growth of human hepatocellular carcinoma cells.** *Cancer research* 1998; 58: 1444-50

Canbolat O, Fandrey J, Jelkmann W. **Effects of modulators of the production and degradation of hydrogen peroxide on erythropoietin synthesis .** *Respir Physiol* 1998; 114(2): 175-83

Casari M, Gabrielli GS, Dusi S, Nicoli N, Bellisola G, Corrocher R. **Decreased activity of liver glutathione peroxidase in human hepatocellular carcinoma.** *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21(8):941-4

Carretero J, Obrador E, Anasagasti MJ, Martin JJ, Vidal-Vanaclocha F, Estrela JM. **Growth associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells.** *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(7):567-74

Cai J, Sun WM, and Lu SC **Hormonal and cell density regulation of hepatic  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene expression.** *Molecular Pharmacology* 1995;48:212-8

Clemens M.R. **Free radicals in chemical carcinogenesis.** *Klin Wochenschr* 1991 69:1123-34.

Das UN **Essential fatty acids in health and disease** *J Assoc Physicians India* 1999; 47(9):906-11

Ding M, Li JJ, Leonard SS, Ye JP, Shi X, Colburn NH, Castranova V, Vallyathan V. **Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species.** *Carcinogenesis* 1999;20(4):663-8

Elke R, Regine K. **Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide.** *Free radical biology & medicine* 1998;24(1):27-38

El-Naggar M.M., El-Waseef A.M., El-Halafawy K.M, El-Sayed I.H. **Antitumor activities of vanadium(IV), manganese(IV) iron(III), cobalt(II) and copper(II) complexes of 2-methylaminopyridine** *Cancer Letter* 1998;133:13371-6

Factor VM, Laskowski D, Jensen MR, Weitach JT, Popescu NC, Thorgeirsson SS **Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model** *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(5):2196-201

Francisco BM, Alicia S, Manuel DL and Francisco R **Lipid peroxidation products in human subretinal fluid.** *Free Radic Biol Med* 1996; 20:899-903.

Fridovich I. **Superoxide dismutases.** *Annu Rev Biochem* 1975;

44:147-59.

Fridovich I. **The biology of oxygen radicals.** *Science* 1978; 201: 875-80

Guidotti LG, McClary H, Loudis JM, Chisari FV **Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice** *J Exp Med* 2000;191(7):1247-52

Huang CC. **Impaired superoxide dismutase activity and decreased content of lipid peroxides in hepatocellular carcinoma tissue.** *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1991;29(3):195-7,207

Huang C, Wu M **Superoxide dismutase activity in tissues from 19 cases of hepatocellular carcinoma.** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1990;70(3):138-9,12

Huang CY, Fujimura M, Chang YY, Chan PH. **Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice.** *Stroke* 2001;32(3):741-7

Huang ZZ, Chen CJ, Zeng Z , YangH ,Jenny Oh , Chen L andLu SC. **Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration.** *FASEB* 2001; 15(1): 19-21

Huang ZZ, Li H, CaiJ, Kuhlenkamp J, Kaplowitz N and Lu S C **Changes in glutathione homeostasis during liver regeneration in the rat.** *Hepatology* 1998; 27(1): 147-53

Iwagaki H, Hamazaki K, Matsubara N, Hiramatsu M, Orita K, Mor A. **Lipid peroxidation in hepatocellular carcinoma.** *Acta med okayama* 1995;49(6):313-5

Jackson AL., Lawrence AL **The Contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer.** *Mutation Research* 2001; 477: 7-21

Jacques PP, Emmanuelle S, Olivier N and Fradelizi D. **Auto-protective redox buffering systems in stimulated Macrophages.** *BMC Immunology* 2002; 3:3

Jones BE, Chau RL, Liu H, Zehra P, Lydia G, Srinivasan A, Karen LV, and Mark JC **Role of caspases and NF- $\kappa$ B signaling in hydrogen peroxide and superoxide induced hepatocyte apoptosis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: 693-9

José MM and Francisca SJ **Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes.** *Frontiers in Bioscience* 1999;4:339-45

Joseph PM and David AL **Cell cycle progression of glutathione-depleted Human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase** *Journal of Immunology* 1989; 143(6):1974-81

Chung JY, Huang CS, Xiao FM, Dong Z and Chung SY **Inhibition of Activator Protein 1 activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras transformed cells.** *Cancer Research* 1999; 59:4610-17

Kuo ML, Jee SH, Chou MH Ueng TH **Involvement of oxidative stress in motorcycle exhaust particle induced DNA damage and inhibition of intercellular communication.** *Mutat Res* 1998; 413(2):143-50

Kanematsu S. and Asada K. **CuZn-superoxide dismutase in rice: occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non-photosynthetic tissues.** *Plant Cell Physiol* 1989; 30:381-91.

Lance BB, Terry L, Hoek V, Shao ZH, Li CQ, and Schumacker PT **Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion.** *AJP-heart and circulatory physiology* 1999; 277(6):2240-6

LaBrecque D **Liver regeneration: A picture emerges from the puzzle.**

*The American Journal of gastroenterology* 1994; 89(8):86-96

Lin CC, Huang PC, Lin JM. **Antioxidant and hepatoprotective effects Aneoctochilus formosanus and Gynistemma pentaphyllum.** *Am J Chin Med* 2000;28(1):87-96

Li J, Huang CY, Zheng RL, Cui KR, Li JF **Hydrogen peroxide induce apoptosis in human hepatoma cells and alters cell redox.** *Cell Biol Int* 2000;24(1):9-23

Lin JM, Lin CC, Chiu HF, Yang JJ, Lee SG **Evaluation of the anti-inflammatory and liver protective effects of Aneoctochilus formosanus, Ganoderma lucidum and Gynostemma pentaphyllum in rats.** *Am J Chin Med* 1993;21(1):59-69

Liu J, Shen HM, Ong CN **Salvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG(2) cells.** *Cancer letter* 2000; 153(1-2):85-93

Mari M, Cederbaum AI **CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase.** *J Biol Chem* 2000;275(20): 15563-71

Mari M, Bai J, and Cederbaum AI. **Toxicity by pyruvate in HepG2 cells depleted of glutathione: role of mitochondria.** *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32(1):73-83

Mair M, Cederbaum AI. **CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase.** *J Biol Chem* 2000; 275(20): 15563-71

Mulcahy RT, Wartman MA, Bailey HH, and Gipp JJ **Constitutive and  $\beta$ -Naphthoflavone induced expression of the human  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant responses element/TRE sequence.** *J Bio Chem* 1997; 272(11):7445-54

Nagao Y, French BA, Cai Y, French SW, Wan YJ. **Inhibition of PPAR alpha /RXR alpha-mediated direct hyperplasia pathways during griseofulvin-induced hepatocarcinogenesis.** *J Cell Biochem* 1998;69(2):189-200

Ozolins TR, Hales BF. **Oxidative stress regulates the expression and activity of transcription factor activator protein-1 in rat conceptus.** *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280 (2):1085-93

Pell EJ, Steffen KL. **Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism.** *In Current Topics in Plant Physiology:An American Society of Plant Physiologists series 1991 Vol.6.*

Pinheiro R., Belo I., Mota M. **Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58:842-7

Prasad K., Kalar J.and Bharadwaj L. **Cardiac depressant effects of oxygen free radicals.** *J Vasc Dis(1993) 44:257-69.*

Rao MS, Subbarao V **Inhibition of ciprofibrate-induced hepatocarcinogenesis in the rat by dimethylthiourea, a scavenger of hydroxyl radical.** *Oncl rep* 1999;6(6):1285-8

Sarkar A, Bishayee A, ChatterJM. **Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis.** *Cancer Biochem Biophys* 1995;15(2):111-25

Scandalios JG **Oxygen stress and superoxide dismutase.** *Plant Physiol* 1993;101:7-12.

Schiff R, Reddy P, Ahotupa M, Coronado HE, Grim M, Hilsenbeck SG, Lawrence R, Deneke S, Herrera R, Chamness GC, Fuqua SA, Brown PH, Osborne CK **Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen resistant breast tumors in vivo.** *J Natl Cancer Inst* 2000;92(23):1926-34

Seelig GF, Simonden RP, and Meister A **Reversible dissociation of  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase into two subunits.** *J Biol Chem* 1984;259(15): 9345-47

Shen H, Yang C, Liu J, Ong C. **Dual role of glutathione in selenite induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells.** *Free Radic Biol Med* 2000;28(7):1115-24

Shih CC , Wu YW ,Lin WC. **Ameliorative effects of Anoectochilus formosanus extract on osteopenia in ovariectomized rats.** *J Ethnopharmacol* 2001; 77(2-3);233-8

Singh N, Azmi S, Sheriff A, Dhawan D, Khanna N. **Differential sensitivity of murine myeloid FDC-P1 cells and apoptosis resistant mutant(s) to anticancer drugs.** *Mutat Rea* 2001;474 (1-2):105-12

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS and Richardson DC. **Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase.** *Nature* 1983; 306:284.

Tang QJ,Ding JY and Zhu LM **Tissue culture of Anoectochilus formosanus Hay. And nutritional constituent analysis of cultured seedlings.** *J Plant Resoures Environ* 1996; 5:23-7

Tsai WY, Chang WH , Chen CH , Lu J **Enhancing effect of patented whey protein isolate ( Immunocal ) on cytotoxicity of an anticancer drug.** *Nutr Cancer* 2000;38(2):200-8

Walling C. **In oxidase and related redox system.** *Pergamon Press,Oxford* 1982:85-97

Wang SY, Kuo YH, Chang HN, Kang PL,Tsay HS, Lin KF , Yang NS, Shyur LF. **Profiling and characterization antioxdant activities in Anoectochilus formosanus hayata.** *J Agric Food Chem* 2002; 50(7): 1859-65

Warner BB , Stuart L ,Gebb S,Wispe JR. **Redox regulation of**

**manganese superoxide dismutase.** *Am J Physiol* 1996; 271(1):150-8

Wenger F.A., Kilian M, Mautsch I, Jacobi CA, Steiert A, Peter FJ, Guski H., Schimke L., and Muller JM. **Influence of octreotide on liver metastasis and hepatic lipid peroxidation in BOP induced pancreatic cancer in Syrian hamsters.** *Pancreas* 2001;23(3):266-272

Yamanoi A, Nagasue N, Kohno H, Kimoto T , Nakamura T **Clinical and enzymatic investigation of oxygen free radicals by ischemia and reperfusion in human hepatocellular carcinoma and adjacent liver.** *HPB Surg* 1995;8(3): 193-9

Yang CF, Shen HM , Ong CN. **Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells.** *Biochem Pharmacol* 1999; 57(3):273-9

Yan N and Meister A **Amino acid sequence of rat kidney ?-Glutamylcysteine Synthetase.** *J Biol Chem* 1990;265(3):1588-92

Zhang Y, Zhao W, Zhang HJ, Domann FE and Oberley L W. **Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth.** *Cancer Research* 2002; 62:1205-12

Zhang K, Chew M , Yang EB , Wong KP , Mack P. **Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms.** *Mol pharmacol* 2001; 59(4):837-43

Zhang Y. **Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells.** *Carcinogenesis* 2000; 21(6): 1175-82

Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. **NF Kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells.** *Free Radic Boil Med* 2001;11(1):1405-16

Zhou W, Zhang Y, Wosch MS, Lang A ,Zwacka RM ,and Engelhardt JF **Subcellular site of superoxide dismutase expression differentially**

**controls AP-1 activity and injury in mouse liver following ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2001; 33(4):902-14**

林文川,施純青,吳岳文,陳臆如,張惠玲,許朝添 台灣金線蓮水粗萃取物對大鼠 90 天餵食毒性作用。 *J Chin Med* 2000; 11(1):19-29

林宗輝 台灣蘭科植物-石斛、連珠石斛與台灣金線蓮之化學成分及藥理活性研究，2001，P1-344，中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文

甘偉松 藥用植物學，1997，P470，647-58，國立中國醫藥研究所

吳進錫 台灣藥草譜，1977，P62-63，偉成出版社

青草集 1987，P57-65，豐年社

侯嘉隆 台灣金線蓮對 A 型流行性感冒病毒的影響，1993，P1-54，國立陽明醫學院傳統醫藥學研究所碩士論文

施純青,吳岳文,許朝添,林文川 台灣金線蓮水粗萃取物對四氯化碳誘發大鼠纖維化的影響，1999 中國藥學會年會暨藥學學術研討會論文

陳進榮 省產藥材之開發研究 金線蓮與大青，1988，P1-47，台北醫學院藥學研究所碩士論文

劉國柱、周正仁 台灣藥用植物之研討，1976，P279-280，國立中國醫藥研究所

劉新裕、蔡新聲、黃漢津、胡敏夫、葉長青 金線蓮大量繁殖與栽培後之生育性狀、種間比較及營養成分研究，中華農業研究，1987 (36)：357-66

顏銘宏,黃大峰,王芬郁,洪文俊,林俊清 台灣產生藥金線蓮之保肝、抗脂質過氧化及清除自由基之體外及體內活性研究，1999 中國藥學會年會暨藥學學術研討會論文