

## 第三章 材料和方法

### 一、實驗材料與儀器

#### (一) 實驗儀器

1. 高效液相層析儀 ( High performance liquid chromatography, HPLC )  
Beckman (Programmable Solvent Module 126; Diode Array Detector Module 168 )

本儀器係利用不同溶液為移動相，經由通過靜態相的管柱，藉著在移動相中之各檢品成分對於靜態相管柱結合時間上的不同，進而將其分離分析之操作。實驗先由已知濃度的標準品溶液，算出峰線面積，再求得檢體峰線面積，兩者比較後，進而算出檢體的含量。

測定 NAT 活性的條件：

- ( 1 ) C18 reversed-phase column ( spherisorb  $4.6 \times 250$  nm )
  - ( 2 ) Solvent system: 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( PH 4.5 ) /  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( 53 : 47 )
  - ( 3 ) Wavelength: 280 nm
  - ( 4 ) Retention time : AAF : 6.5 min , AF : 9.0 min
2. 倒立式相位差顯微鏡 ( Nikon Ellipse TE 300 )
  3. 高速離心機 ( Model 3200 Eppendoff / Brinkman )
  4. 製冰機 ( King-Seeley Thermos Co. USA )
  6. 紫外線燈 : Spectvoline model ENF-24
  7. Gene Amp PCR system 2400 ( Perkin Elmer )
  8. 組織研磨機 ( Polytrone PT 3000, Kinematica )
  9. 冷凍乾燥離心機 ( Labconco )
  10. RP 18 column ( Bischoff )

#### (二) 實驗材料

1. G-Nome DNA kit ( Bio 101, Inc )
2. anti-cyclin D1, D3, E antibody  
FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody  
Monoclonal Antibody to Poly (ADP-ribose) ( Blossom Biotech )

3. Complete Freund's adjuvant and Incomplete Freund's adjuvant
  - PCR kit
  - Antibiotics (Kanamycin, Penicilin, Streptomycin)
  - Glutamine
  - Fetal bovine serum
  - Hanks balanced salts
  - RPMI 1640 culture medium ( Gibco laboratories )
4. 2-aminofluorene
  - 2-acetylaminofluorene ( K and K Lab )
5. Acetonitrile
  - Ethyl acetate
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - KCl
  - Methanol
  - NaCl
  - $\text{Na}_2\text{PO}_4$
  - TE buffer ( Merck Co )
6. Ficoll-paque
  - GFX kit ( Phamacia Biotech )
7. Acetyl Coenzyme A ( P-L Biochemicals Inc, Milwaukee, USA )
8. Berberine
  - Bovine serum albumin (BSA)
  - Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
  - Adenosine 5-triphosphate (ATP)
  - Pristine
  - Carnitine acetyltransferase
  - Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
  - Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
  - Ethidium Bromide
  - Leupeptin

- Propidium Iodide (PI)
- Trichloroacetic acid
- Tris-HCl
- Triton-X 100
- Sodium azide
- Heparin
- P-aminobenzoic acid (PABA)
- N-acetyl-p-aminobenzoic acid (N-ac-PABA)
- 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- Formic acid (Ammonium salt)
- Trypsin
- Trypan blue
- Rinonuclease A (RNAse)
- Acetylcarnitine
- Tergitol NP-40 ( Sigma Chemical Co )
- 9. RNA kit ( Qiagen )
- 10. Ethylene glycol monoethylether
  - Trisodium citrate 2-hydrate ( FERAX, Berlin )

### (三) 絞股藍皂? ( Gypenosides ) 的製備

購自草藥店的絞股藍，經指導教授陳榮洲老師鑑定後，取莖葉 600 公克，加入 2 公升的水熬煮 1 小時，連續兩次，將熬汁過濾後，以 n-butanol 抽取，所得抽取物以 rotary vacuum evaporator (Eyela N-1, Rikakikai Co., LTD, Tokyo, Japan) 在 40 °C、減壓下濃縮，再以冷凍乾燥機( Dura-Top MP, microprocessor control bulk tray dryer, FTS system ) 在 -50 °C 冷凍乾燥，置於冰箱冷藏備用。

### (四) 溶液配製

#### 1. Acetyl CoA :

10 mM Acetyl Coenzyme A 50 µl + D.D. Water 170 µl

2. HPLC solvent :

20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 100% Acetonitrile (53 : 47)

3. Working lysing buffer solution

working solution ( PH 7.5, 4 , 20 mM Tris-HCl, 1 mM DDT, 1 mM EDTA ) 20 ml + 50 mM PMSF 20  $\mu\text{l}$  + 10  $\mu\text{M}$  Leupetin 20  $\mu\text{l}$

4. Medium

F12K Nutrient Mixture 440 ml + Fetal bovine serum 50 ml + 10000 unit/ml Penicillin 5 ml + 200 mM L-glutamin 5 ml

5. PBS :

NaCl 8 g + KCl 0.2 g +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.15 g +  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 g 加 DD water 至 1000 ml

6. Acetyl-CoA recycling mixture (RCM) :

50 mM Tris-HCl( PH 7.5) + 0.2 mM EDTA + 2 mM DDT + 15 mM acetylcarnitine + 2 u/ml carnitine acetyltransferase + aminofluorene (22.5  $\mu\text{M}$ )

7. Stain solution :

1X PBS 550  $\mu\text{l}$  + 100% Trition-X100 200  $\mu\text{l}$  + 0.03 mM PI 200  $\mu\text{l}$  + RNase 50  $\mu\text{l}$

### ( 五 ) 細胞株

人類子宮頸腫瘤細胞株 ( Human cervix epidermoid carcinoma cell: Ca Ski; Human cervix epithelioid carcinoma cell: HeLa ) 取自台灣新竹食品工業發展研究所

### ( 六 ) 細菌

淋菌 ( *Nisseria gonorrhoeae* ) : 取自中國醫藥學院附設醫院門診病人

### ( 七 ) 實驗動物

大白鼠 ( Spreque-Dawley rat, SD rat ) 購自國科會國家實驗動物繁殖及研究中心

## 二、實驗方法

### (一) 絞股藍皂? (Gypenosides) 對於人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski, HeLa) 的影響

#### A. 在胞質液 (cytosol) 內

##### a. 不同濃度的絞股藍皂? (Gypenosides) 對於人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski) 中 NAT 的活性效應：

將培養的人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski) 分別取  $5 \times 10^8$  cells 個細胞，各置於 2 ml 的 lysis buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5 at 4 °C, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 50  $\mu$ M PMSF and 10  $\mu$ M Leupeptin) 中，懸浮液先以 9000 g，離心 1 分鐘，取上層液，再用 10000 g，離心 60 分鐘。取上層液先製成胞質液，置於冰浴備用。利用 AF 作受質來決定 Acetyl-CoA 依賴的乙醯轉移酵素乙醯化 AF 的量。反應混合液組成總共體積 90  $\mu$ l：包括取 50  $\mu$ l Ca Ski 的胞質液，加入 20  $\mu$ l 的 Acetyl-Coenzyme A recycling mixture ((50 mM Tris-HCl, PH 7.5), 0.2 mM EDTA, 2 mM DTT, 15 mM acetyl carnitine, 2 u/ml carnitine acetyltransferase)，以 22.5  $\mu$ M 的 AF 當受質，最後加了 20  $\mu$ l 的 Acetyl-CoA 及 10  $\mu$ l 不同濃度的絞股藍皂? (200, 250, 300, 350, 400 and 450  $\mu$ g/ml) 後，反應起始。控制組不加 Acetyl-CoA，而加入蒸餾水，培育於 37 °C，10 分鐘，再加入 100  $\mu$ l acetonitrile 終止 AF 反應。再經由 HPLC 分析，實驗組及控制組均各作 3 次，得出人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski) 中絞股藍皂? (Gypenosides) 對 NAT 活性的測定，所得值為 mean  $\pm$  SD。流程圖如下：

#### NAT activity in Ca Ski cells cytosol

5x10<sup>8</sup> Ca Ski cells

?

2 ml lysis buffer

?

cytosol

?  
 +AF (22.5  $\mu$ M)  
 ?  
 + Gypenosides (200 - 450  $\mu$ g/ml)  
 ?  
 acetyl coenzyme A or distilled water (control)  
 ?  
 Incubated at 37 for 10 min  
 ?  
 100  $\mu$ l acetonitrile  
 ?  
 HPLC  
 ?

The amount of AF and AAF

b. 絞股藍皂? ( 350  $\mu$ g/ml) 對人類子宮頸癌細胞株 ( Ca Ski ) 細胞中 NAT 之 kinetic constants ( $K_m$ ,  $V_{max}$ )的影響 :

將培養的人類子宮頸癌細胞株 ( Ca Ski ) 取  $5 \times 10^8$  cells 個細胞 , 置於 2 ml 的 lysis buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5 at 4 , 1 mM DTT , 1 mM EDTA , 50  $\mu$ M PMSF and 10  $\mu$ M Leupeptin)中 , 懸浮液先以 9000 g , 離心 1分鐘 , 取上層液 , 再用 10000 g , 離心 60分鐘。取上層液先制成胞質液 , 置於冰浴備用。反應混合液組成總共體積 90  $\mu$ l: 包括取 50  $\mu$ l Ca Ski 的胞質液 , 加入 20  $\mu$ l 的 Acetyl-Coenzyme A recycling mixture((50 mM Tris-HCl, PH 7.5), 0.2 mM EDTA , 2 mM DTT , 15 mM acetyl carnitine , 2 u/ml carnitine acetyltransferase), 0.5 mM 的 Acetyl-CoA 及 10  $\mu$ l 絞股藍皂? ( 350  $\mu$ g/ml) , 控制組則不加 Acetyl-CoA 及絞股藍皂? , 而加入蒸餾水 , 實驗組與控制組各分別加入特定濃度的 AF ( 0.373, 0.435, 0.543, 0.745, 1.102 和 2.245 mM ) 作受質 , 來決定 Acetyl-CoA 依賴的乙醯轉移酵素的 kinetic constants ( modified HYPER Program of Cleland ) , 實驗組及控制組均各作 3 次 , 得出人類子宮頸癌細胞株 ( Ca Ski ) 胞質液中絞

股藍皂？（Gypenosides）對 NAT 活性的測定，所得值為 mean ± SD。  
流程圖如下：

### Kinetic constants of NAT in Ca Ski cell cytosol

5x10<sup>8</sup> Ca Ski cells  
?  
2 ml lysis buffer  
?  
cytosol  
?  
+ Gypenosides (0 or 350 µg/ml)  
?  
+ AF (0.373, 0.435, 0.543, 0.745, 1.102 and 2.245 mM)  
?  
0.5 mM acetyl coenzyme A or distilled water (control)  
?  
Incubated at 37 for 10 min  
?  
100 µl acetonitrile  
?  
Kinetic constants (Km, Vmax)

### B . 在完整細胞（intact cells）內

#### a. 不同濃度的絞股藍皂？對 AF 乙醯化的影響

將培養的人類子宮頸癌細胞株（CaSki 或 HeLa），每一格計數人類子宮頸癌細胞株（Ca Ski 或 HeLa）1x10<sup>6</sup> cells/ml 放入 24 well plate（含 1 ml RPMI 1640 培養基，2 mM L-glutamin 和 10% 胎牛血清）中，加入受質 AF 30 µM，再加入不同濃度絞股藍皂？（200-450 µg/ml）或不加入絞股藍皂？（控制組），一起在 37，95% 空氣，5% 二氧化碳下培養反應 18 小時，將細胞及培養基移取離心。上清液立即以 ethylacetate/

methanol (95 : 5) 萃取，等此溶液揮發乾燥後，再溶於 50  $\mu$ l methanol 中混合均勻，取 20  $\mu$ l 打入高效液相層析儀，再經由 HPLC 分析乙醯化受質 (AAF) 和未乙醯化 AF 的量，實驗組及控制組均作 3 次，得出不同濃度的絞股藍皂？對人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa) 完整細胞中乙醯轉移酵素 (NAT) 活性的影響。流程圖如下：

### NAT activity in intact Ca Ski or HeLa cells

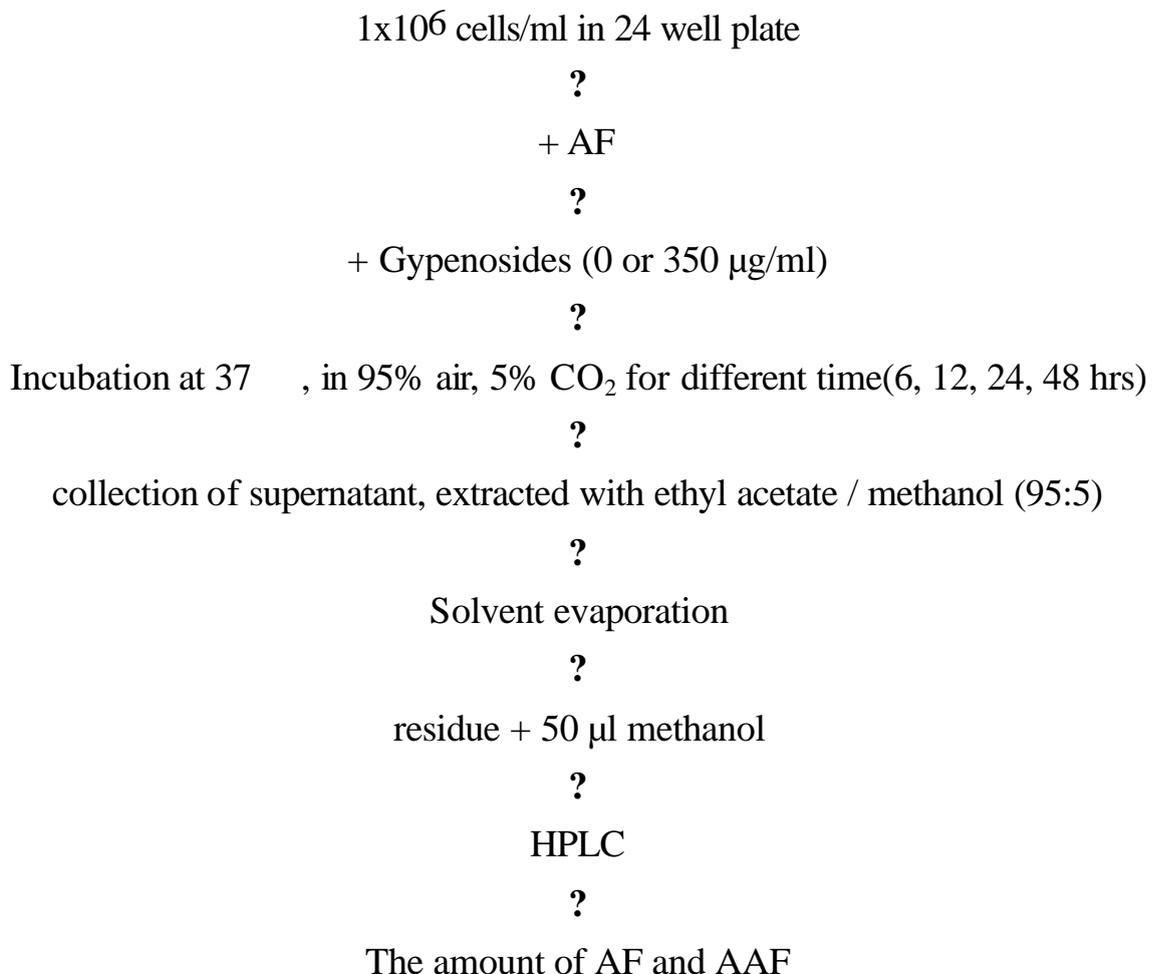
1x10<sup>6</sup> cells/ml in 24 well plate  
?  
+ AF 30  $\mu$ M  
?  
Gyenosides (0 or 200-450  $\mu$ g/ml)  
?  
Incubation at 37 , in 95% air, 5% CO<sub>2</sub> for 18 hrs  
?  
collect supernatant, extracted with ethyl acetate/methanol (95:5)  
?  
after solvent evaporated, the residue  
?  
+ 50  $\mu$ l methanol  
?  
HPLC  
?  
The amount of AF and AAF

b. 絞股藍皂？ (350  $\mu$ g/ml) 在不同時間對 AF 乙醯化的影響

將培養的人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa), 每一格計數人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa) 1x10<sup>6</sup> cells/ml 放入 24 well plate (含 1 ml RPMI 1640 培養基, 2 mM L-glutamine, 10% 胎牛血清) 中, 加入

受質 AF，再加入絞股藍皂？（350 µg/ml）或不加入絞股藍皂？（控制組）一起在 37 °C，95% 空氣，5% 二氧化碳下培養反應，經過不同的時間（分別為 6, 12, 24, 48 小時）反應終結，將細胞及培養基移取離心。上清液立即以 ethyl acetate / methanol (95 : 5) 萃取，等此溶液揮發乾燥後，再溶於 50 µl methanol 中混合均勻，取 20 µl 打入高效液相層析儀，分析乙醯化受質（AAF）和未乙醯化 AF 的量，實驗組及控制組均各作 3 次，得出絞股藍皂？在不同時間，對人類子宮頸癌細胞株（CaSki 或 HeLa）完整細胞中乙醯轉移酵素（NAT）活性的影響。流程圖如下：

### NAT activity in intact Ca Ski or HeLa cell



(二) 絞股藍皂? (350 µg/ml) 對人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa) 在不同濃度的 AF 中，產生 DNA-adducts 的影響

用 24 well plate，每個 well 置入  $5 \times 10^6$  Ca Ski or HeLa cells，並以不同濃度的 AF (30, 60 µM) 及有無加入絞股藍皂? (350 µg/ml) 來培養 24 小時後收集細胞，並以 G NOME DNA isolation kit protocol (BIO 101, La Jolla, CA, USA) 來抽取 DNA，接著再將已抽取的 DNA 溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)。取 5 µl TE buffer (含 5 µg 的 DNA) 與 5 µl 的 10x T4 polymerase buffer (0.33 M Tri acetate, 0.66 M potassium acetate, 0.10 M magnesium acetate, 5.0 mM DTT, pH 7.5) 及 40 µl H<sub>2</sub>O 混合。再加入 17 pmol 的  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol) 及 22 單位的 T4 DNA polymerase，並在 60°C 共同培養 60 分鐘。接著再以 10 µl 的 0.5 mM EDTA 來中和反應。以反應及未反應的同位素以 Sephadex G-50 chromatography 來分離，以標識的核糖酸附加物則以 Beckman HPLC 分析 (pump 168 and detector 126, 使用 Ultrasphere C18 reversed phase ion-pairing column 4.6x25 cm, 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0, 含有 10% CH<sub>3</sub>CN 流速 1.5 ml/min 灌流 10 分鐘，接著再以 90% 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0, 5 mM 的 tetrabutylammonium phosphate 及 50% CH<sub>3</sub>CN 灌流 65 分鐘。UV 使用 254 nm 最後樣本 (1 min=1.5 ml) 則以 scintillation spectrometry (Levy and Weber, 1989; Chung et al., 2000) 來收集及定量。DNA 添加物量的計算則經由特定同位素標定的 ATP 波峰 (peak) 放射性來度量之。DNA 添加物的單位則由 pmol adduct/mg DNA 來表示 (Levy and Weber, 1989; Levy et al., 1994; Chung, 1999; Chung et al., 2000)

**Detection and measurement DNA adducts in human cervix cancer cells**

$5 \times 10^6$  cells/well (Ca Ski or HeLa) in 24 well plate

?

different concentration of AF (30, 60 µM) and Gypenosides (0 or 350 µg/ml)

?

Incubate for 24 hrs  
?  
harvested cell  
?  
Isolation of DNA with G NOME DNA kit  
?  
digestion of DNA by nuclease  
?  
HPLC  
?  
DNA adducts

**(三) 利用 RT-PCR ( Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction ) 的方法來檢測絞股藍皂? 對人類子宮頸癌細胞株 ( Ca Ski 或 HeLa ) 細胞是否有影響 NAT1 基因 ( NAT mRNA ) 的表現**

用 12 well plate , 每個 well 置入  $5 \times 10^6$  人類子宮頸癌細胞株 ( Ca Ski 或 HeLa ), 分別有無加入絞股藍皂? ( 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ), 然後培養 24 小時 , 經由離心而收集細胞 , 再利用 Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen , inc , Valencia , CA , USA ) , 收集 total RNA , 然後將 total RNA (1.5  $\mu\text{g}$ ), 0.5  $\mu\text{g}$  of oligo-dT primer and DEPC (diethyl pyrocarbonate )-treated water 一起混合成 12.5  $\mu\text{l}$  , 然後倒入微量離心管中。將混合液在 70 加熱 10 分鐘然後在冰上冷卻 1 分鐘 , 接下來反轉錄步驟完全照操作指示 (First-strand cDNA synthesis kit, Inritrogen, San Diego, CA, U.S.A.)。從 total RNA 反轉錄的產物作為 PCR 的一個模板。當放大 target cDNA , 在 50  $\mu\text{l}$  的溶液中的組成如下 : ( 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM dNTP mix, 20 pmoles of each primer (B-MDIEA-NAT1 & VPKHGD-X-NAT1 for NAT1; FP1-NAT2 & RP1-NAT2 for NAT2; Act b1 & Act b2 for beta-actin) , cDNA 模板與從 50 ng total RNA 和 2 units of DyNAzyme DNA Polymerase 合成的量一致 , The sequence of primers were as follows:

B-MDIEA-NAT1, 5'-CACCCGGATCCGGGATCATGGACATTGAAGC-3',

nt 435-454, GenBank accession number X17059;  
VPKHGD-X-NAT1,  
5'-GGTCCTCGAGTCAATCACCATGTTTGGGCAC-3', nt 1295-1278,  
GenBank accession number X17059;  
FP1-NAT2, 5'-CTAGTTCCTGGTTGCTGGCC-3', nt 79-98, GenBank  
accession number NM-000015;  
RP1-NAT2, 5'-TAACGTGAGGGTAGAGAGGA-3', nt 1073-1054,  
GenBank accession number NM-000015;  
Act b1, 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3', nt 94-114, GenBank  
accession number NM-001101;  
Act b2, 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3', nt 446-422, GenBank  
accession number NM-001101.。 流程圖如下 :

### **NAT1 Gene expression**

5x10<sup>6</sup> cells/well (Ca Ski or HeLa) in 12 well plates

?

+ Gypenosides (0 or 350 µg/ml)

?

Incubation 24 hrs

?

Isolation of total RNA ( Qiagen RNeasy Mini Kit )

?

RT-PCR (cDNA)

?

Primer (NAT1, β-actin )

?

Gel electrophoresis

?

Get Picture

**(四) 以 Microarray hybridization 檢測絞股藍皂? ( 350 µg/ml ) 對人**

## 類子宮頸癌細胞株 ( Ca Ski ) 之基因表現的影響

用 12 well plate , 每個 well 置入  $5 \times 10^6$  人類子宮頸癌細胞株 ( Ca Ski ) , 分別有無加入絞股藍皂? (  $350 \mu\text{g/ml}$  ) , 然後培養 24 小時 , 經由離心而收集細胞 , 再利用 Qiagen RNeasy Mini Kit ( Qiagen , inc , Valencia , CA , USA ) , 收集 total RNA , 然後將 total RNA (  $1.5 \mu\text{g}$  ) ,  $0.5 \mu\text{g}$  of oligo-dT primer and DEPC ( diethyl pyrocarbonate )-treated water 一起混合成  $12.5 \mu\text{l}$  , 然後倒入微量離心管中。將混合液在  $70^\circ\text{C}$  加熱 10 分鐘然後在冰上冷卻 1 分鐘 , 接下來反轉錄步驟完全照操作指示 ( First-strand cDNA synthesis kit, Inritrogen, San Diego, CA, U.S.A. ) 。 從 total RNA 反轉錄的產物作為 PCR 的一個模板來合成 cDNA , 將此 cDNA 螢光標識 , 再以 microarray hybridization 來偵測與定量。

### Microarray hybridization analysis

$5 \times 10^6$  cells/well in 12 well plates of Ca Ski cells

?

+ Gypenosides ( 0 or  $350 \mu\text{g/ml}$  )

?

total RNA

?

生技公司 ( 百恩諾 )

?

cDNA Microarray

?

Gene Up or Down Regulation

( 五 ) 絞股藍皂? ( Gypenosides ) 對淋菌 ( *Nisseria gonorrhoeae* ) 生長的影響

由中國醫藥學院附設醫院六位門診病人分離出來之淋菌，以 API NH kit 辨識確認，置於 100 ml trypticase soy broth 中，35 °C 下，培養二天，然後在 4 °C 下，以 3500 g 離心 20 分鐘，沉澱團塊以 cold phosphate buffered saline (PBS) 洗滌兩次後，取  $1 \times 10^8$  細菌加 1ml trypticase soy broth 置於各試管中，再加入或不加入（控制組）各種不同濃度的絞股藍皂？（200, 300, 350, 400 和 450  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），置於 37 °C，5% 二氧化碳中培養 24 小時後，以 Beckman Spectrophotometer (DU 6401) 測 650 nm 下之濁度值，決定絞股藍皂對淋菌的影響<sup>(111)</sup>。各實驗組與控制組均各作三次。以下列算式計算出生長抑制百分比：

$$\left( 1 - \frac{\text{original OD} - \text{final OD (+Gypenosides)}}{\text{original OD}} \right) \times 100$$

### **Inhibition on growth of *N. gonorrhoeae***

1x10<sup>8</sup> bacteria + 1ml trypticase soy broth  
 ?  
 + Gypenosides (0 or 200-450  $\mu\text{g}/\text{m}$ )  
 ?  
 incubate at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 hrs  
 ?  
 OD 650nm

### **(六) 絞股藍皂？ (Gypenosides) 對淋菌 (*Nisseria gonorrhoeae*) 乙醯轉移酵素活性的影響**

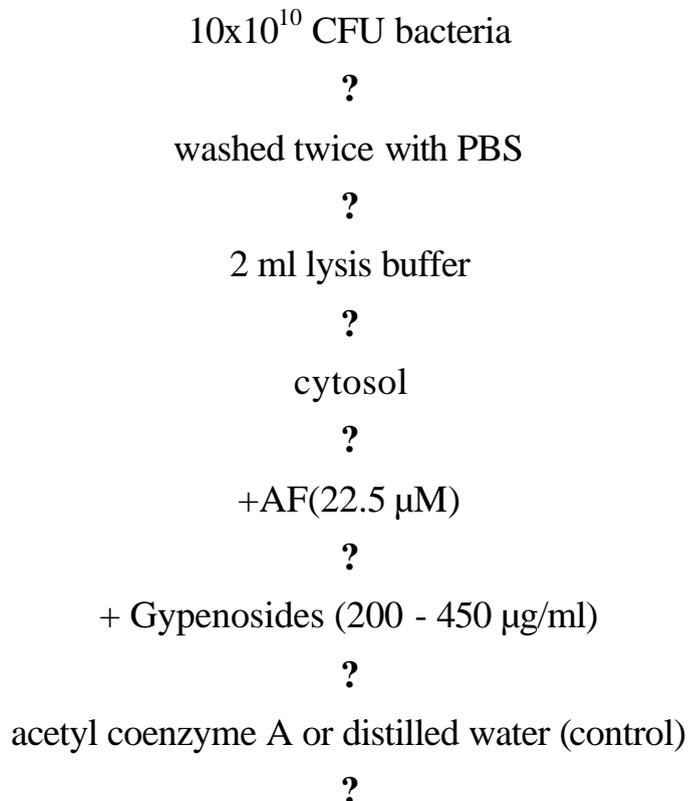
#### **A. 在胞質液 (cytosol) 內**

a. 不同濃度的絞股藍皂？ (Gypenosides) 對於淋菌中 NAT 的活性效應：

取  $10 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU) 的淋菌，以 cold phosphate buffered saline (PBS) 洗滌兩次，馬上放入 1ml lysis buffer (20 mM tris-HCl,

pH7.5 at 4 °C, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 50 mM PMSF and 10 mM leupeptin)中,再加入 sonicator (Hert System. Inc. Farmingdale, NY, USA), 並以 10000 g 離心 30 分鐘,取上層液先製成胞質液,置於冰浴備用。反應混合液組成包括:取 50 µl 的胞質液,加入 20 µl 的 Acetyl-Coenzyme A recycling mixture((50 mM Tris-HCl, PH 7.5), 0.2 mM EDTA, 2 mM DTT, 15 mM acetyl carnitine, 2 u/ml carnitine acetyltransferase),以 22.5 µM 的 AF 當受質,最後加了 20 µl 的 Acetyl-CoA 及 10 µl 不同濃度的絞股藍皂? (200, 250, 300, 350, 400 and 450 µg/ml) 後,反應起始。控制組不加 Acetyl-CoA,而加入蒸餾水,培育於 37 °C,10 分鐘,再加入 100 µl acetonitrile 終止 AF 反應。再經由 HPLC 分析,實驗組及控制組均各作 3 次,得出淋菌 (*N. Gonorrhoeae*) 中絞股藍皂? (Gypenosides) 對 NAT 活性的測定,所得值為 mean ± SD。流程圖如下:

### NAT activity in *N. gonorrhoeae* cytosol



Incubated at 37 for 10 min

?

100  $\mu$ l acetonitrile

?

HPLC

?

The amount of AF and AAF

- b. 絞股藍皂? ( 350  $\mu$ g/ml )對淋菌細胞中NAT 之 kinetic constants (Km, Vmax)的影響 :

取  $10 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU)的淋菌 , 以 cold phosphate buffered saline (PBS)洗滌兩次,馬上放入 1ml lysis buffer (20 mM tris-HCl, pH7.5 at 4 , 1mM DTT, 1mM EDTA, 50 mM PMSF and 10 mM leupeptin) 中,再加入 sonicator (Hert System. Inc. Farmingdale, NY, USA), 並以 10000 g 離心 30 分鐘 , 取上層液先制成胞質液 , 置於冰浴備用。反應混合液組成包括 : 取 50  $\mu$ l 淋菌的胞質液 , 加入 20  $\mu$ l 的 Acetyl-Coenzyme A recycling mixture((50 mM Tris-HCL , PH 7.5) , 0.2 mM EDTA , 2 mM DTT , 15 mM acetyl carnitine , 2 u/ml carnitine acetyltransferase) , 0.5 mM 的 Acetyl-CoA 及 10  $\mu$ l 絞股藍皂? ( 350  $\mu$ g/ml ) , 控制組則不加 Acetyl-CoA 及絞股藍皂? , 而加入蒸餾水 , 實驗組與控制組各分別加入特定濃度的 AF ( 5.625, 11.25, 22.5, 45 和 90  $\mu$ M ) 作受質 , 來決定 Acetyl-CoA 依賴的乙醯轉移酵素的 kinetic constants ( modified HYPER Program of Cleland ) , 實驗組及控制組均各作 3 次 , 得出淋菌胞質液中絞股藍皂? ( Gypenosides ) 對 NAT 活性的測定 , 所得值為 mean  $\pm$  SD。流程图如下 :

### **Kinetic constants of NAT in *N. gonorrhoeae* cytosol**

$10 \times 10^{10}$  CFU bacteria  
 ?  
 2 ml lysis buffer  
 ?  
 cytosol  
 ?  
 + Gypenosides (0 or 350  $\mu\text{g/ml}$ )  
 ?  
 + AF (5.625, 11.25, 22.5, 45 and 90  $\mu\text{M}$ )  
 ?  
 0.1 mM acetyl coenzyme A or distilled water (control)  
 ?  
 Incubated at 37 for 10 min  
 ?  
 100  $\mu\text{l}$  acetonitrile  
 ?  
 Kinetic constants ( $K_m$ ,  $V_{max}$ )

## B. 不同濃度的絞股藍皂？在完整細胞 (intact cell) 內對 AF 乙醯化的影響

取  $3 \times 10^9$  CFU 的淋菌，加入 1ml trypticase soy broth 與受質 AF 22.5  $\mu\text{M}$ ，再加入不同濃度絞股藍皂？(200-450  $\mu\text{g/ml}$ ) 或不加入絞股藍皂？(控制組)，一起在 37，95% 空氣，5% 二氧化碳下培養反應 24 小時，將細胞及培養基移取離心。上清液立即以 ethyl acetate / methanol (95 : 5) 萃取，等此溶液揮發乾燥後，再溶於 50  $\mu\text{l}$  methanol 中混合均勻，取 20  $\mu\text{l}$  打入高效液相層析儀，再經由 HPLC 分析乙醯化受質 (AAF) 和未乙醯化 AF 的量，實驗組及控制組均作 3 次，得出不同濃度的絞股藍皂？對淋菌完整細胞中乙醯轉移酵素 (NAT) 活性的影響。流程圖如下：

## NAT activity in intact *N. gonorrhoeae*

3x10<sup>9</sup> CFU bacteria

?

+ 1ml trypticase soy broth and AF 22.5 μM

?

Gypenosides (0 or 200-450 μg/ml)

?

Incubate at 37 °C, in 95% air, 5% CO<sub>2</sub> for 24 hrs

?

collect supernatant, extracted with ethyl acetate/methanol (95:5)

?

after solvent evaporated, the residue

?

+ 50 μl methanol

?

HPLC

?

The amount of AF and AAF

### (七) 絞股藍皂? (Gypenosides) 對大白鼠 (SD rat) 各器官乙醯轉移 酵素 (NAT) 活性與 2-AF 代謝的影響

#### A. 生物體外實驗：乙醯轉移酵素 (NAT) 活性的影響

##### a. 在血液與各器官胞質液 (cytosol) 中的影響

將大白鼠以乙醚麻醉後，從心臟抽血，並取出其肺臟、肝臟、膀胱、子宮與大腸。而本實驗為維持 NAT 活性，須於冰上操作。將離體的器官各約取 1g 重，血液則取 1 ml，分別加入 3 ml lysis buffer 及 3 μl PMSF 與 Leupeptin，以組織均質機將組織磨成細胞質液 (Cytosol)，並各取 50 μl

分別置於 12 個微量離心管中立刻加入 950  $\mu$ l lysis buffer (20 mM tris-HCl, pH7.5 at 4 , 1mM DTT, 1mM EDTA, 50 mM PMSF and 10 mM leupeptin) , 將 hemolysate 保存在冰上 ( 少於 30 分鐘 ) 備用。各取 50 $\mu$ l cytosol 分別置於 6 個微量離心管中 , 再分別加入 50  $\mu$ M AF、 20  $\mu$ l RCM、 20  $\mu$ l acetyl CoA 及配置好之五種不同濃度 Gyenosides (200, 300, 350, 400, 450  $\mu$ g/ml) 10  $\mu$ l , 而另一個微量離心管則加入 20  $\mu$ l D.D. water 作為對照組。以震盪器混合均勻後 , 置入 37 恆溫水槽反應 10 分鐘後 , 加入 50  $\mu$ l acetonitrite 停止 NAT 反應 , 再離心 9000 rpm , 2 分鐘 , 取上清液 20  $\mu$ l 注射入 HPLC 來分析 2-AF 代謝成 2-AAF 的量。此實驗各重複三次 , 並計算出平均值和標準差 ( mean  $\pm$ SD )。

### **N-acetyltransferase activity in SD rat's cytosol**

50  $\mu$ l whole blood (  $1 \times 10^6$  cells )  
?  
950  $\mu$ l lysis buffer  
?  
cytosol 50  $\mu$ l  
?  
+ AF(50  $\mu$ M) and Gyenosides(0-450  $\mu$ g/ml) 10  $\mu$ l  
?  
20  $\mu$ l DD water or acetyl coenzyme A  
?  
incubation at 37 for 10 minutes  
?  
AF and 2-AAF were measured by HPLC assay

b. 在白血球細胞 ( intact cells ) 中的影響  
大白鼠麻醉後 , 以含有肝素(Heparin)之空針進行無菌心臟抽血 , 將 2ml

血液沿管壁緩緩滑入裝有 1 ml Ficoll-Paque 之 15 ml 離心管，離心 1500 rpm，15 分鐘，4℃，將呈白霧狀之白血球取出，離心 1500rpm，10 分鐘，4℃，倒掉上清液可得白血球。於顯微鏡下計數後，將細胞培養於 24well 培養皿，每一 well 植入  $1 \times 10^6$  細胞，並入 1 ml 培養基。每一 well 各加入不同濃度的 AF ( 15, 30, 60, 90  $\mu\text{M}$ ) 10  $\mu\text{l}$ ，及加入或不加入 ( 控制組 )Gypenosides 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，再置於細胞培養箱中，保持 37℃，5%  $\text{CO}_2$  的條件下，反應 18 小時後取上層液，分別加入 2ml 萃取液，以震盪器充分混合後靜置 20 分鐘，離心 3000 rpm，10 分鐘，4℃，取上清液放入微量離心管，以冷凍乾燥離心機乾燥後，再加 50 $\mu\text{l}$  methanol 溶解，取 20  $\mu\text{l}$  注射入 HPLC 分析 AF 代謝產物的量。此實驗重複三次以上，並計算出平均值和標準差，再以 T 檢定來比較實驗組和控制組之統計差異。

### N-acetyltransferase in SD rat's intact leukocytes

$1 \times 10^6$  cells/ml in 24 well plates

?

+ AF (15, 30, 60 and 90  $\mu\text{M}$ ) and Gypenosides (0 or 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

?

incubation for 18 hours

?

centrifugation, supernatant

?

Freeze-drying

?

methanol extraction

?

AAF were measured by HPLC assay

c. 在各器官 ( cytosol ) 中的影響

將大白鼠以乙醚麻醉後，再從心臟抽血，並取出其肺臟、肝臟、膀

胱、子宮與大腸。而本實驗為維持 NAT 活性，須於冰上操作。將離體的器官各約取 1g 重，血液則取 1 ml，分別加入 3 ml lysis buffer 及 3  $\mu$ l PMSF 與 Leupeptin，以組織均質機將組織磨成細胞質液 (Cytosol)，並各取 50  $\mu$ l 分別置於 12 個微量離心管中，再分別加入 20  $\mu$ l RCM、20  $\mu$ l acetyl CoA 及加入 Gybenosides (350  $\mu$ g/ml) 10  $\mu$ l 為實驗組，或加入 10  $\mu$ l D.D. water 作為對照組。以震盪器混合均勻後，置入 37 恆溫水槽反應 10 分鐘後，加入 50  $\mu$ l acetonitrite 停止 NAT 反應，再離心 9000 rpm，2 分鐘，取上清液，以 modified HYPER Program Cleland 來計算 kinetic constants，並計算出平均值和標準差 (mean  $\pm$ SD)，再以 T 檢定來比較實驗組和控制組之統計差異。

#### d. 檢測各器官中 DNA-adducts 的含量

取 24 隻大白鼠，實驗組 12 隻各餵食 AF 60 mM 與絞股藍皂 3.5 mg 1 ml，控制組 12 隻各餵食 AF 60 mM 與 DD water 1 ml，於餵食後 12、24 小時，每組各取 6 隻大白鼠，將大白鼠以乙醚麻醉後，再從心臟抽血，並取出其肺臟、肝臟、膀胱、子宮與大腸。而本實驗為維持 NAT 活性，須於冰上操作。將離體的器官各約取 1g 重，血液則取 1 ml，分別加入 3 ml lysis buffer 及 3  $\mu$ l PMSF 與 Leupeptin，以組織均質機將組織磨成細胞質液 (Cytosol)，再加入 3-5  $\mu$ l 萃取液 (Ethyl acetate : methanol = 95:5)，震盪混合 1-2 分鐘後靜置 20 分鐘，離心 3000 rpm，10 分鐘，4℃，取上清液放入微量離心管，以冷凍乾燥離心機乾燥後，再加 50  $\mu$ l methanol 溶解，並以 G NOME DNA isolation kit protocol (BIO 101, La Jolla, CA, USA) 來抽取 DNA，接著再將已抽取的 DNA 溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)。取 5  $\mu$ l TE buffer (含 5  $\mu$ g 的 DNA) 與 5  $\mu$ l 的 10x T4 polymerase buffer (0.33 M Tri acetate, 0.66 M potassium acetate, 0.10 M magnesium acetate, 5.0 mM DTT, pH 7.5) 及 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 混合。再加入 17 pmol 的  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol) 及 22 單位的 T4 DNA polymerase，並在 60℃ 共同培養 60 分鐘 接著再以 10  $\mu$ l 的 0.5mM EDTA 來中和反應。以反應及未反應的同位素以 Sephadex G-50 chromatography 來分離，沒有同位素立即落入收集杯中，有同位素則析出時間退後，以

標識的核？酸附加物則以 Beckman HPLC 分析(pump 168 and detector 126) , 使用 Ultrasphere C18 reversed phase ion-pairing column 4.6x25 cm , 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , pH 6.0 , 含有 10% CH<sub>3</sub>CN 流速 1.5 ml/min 灌流 10 分鐘 , 接著再以 90% 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , pH 6.0 , 5 mM 的 tetrabutylammonium phosphate 及 50% CH<sub>3</sub>CN 灌流 65 分鐘。UV 使用 254 nm。最後樣本(1 min=1.5 ml) 則以 scintillation spectrometry (Levy and Weber , 1989; Chung et al., 2000) 來收集及定量。DNA 添加物量的計算則經由特定同位素標定的 ATP 波峰 (peak) 放射性來度量之。DNA 添加物的單位則以 pmol adduct/mg DNA 來表示。(Levy and Weber, 1989; Levy et al., 1994; Chung, 1999; Chung et al., 2000)。

## B. 生物體內實驗：AF 與 AF 代謝產物的檢測

### a. 絞股藍皂？對血清中 AF 與 AAF 量的影響

取 180-200 公克重的雌大白鼠 , 以每分鐘 0.5ml 的速度 , 給予餵食絞股藍皂？ 3.5 mg 或 1% DMSO( 控制組 ), 經過 24 小時後 , 用 halothane 將大白鼠麻醉 , 以每分鐘 0.5 ml 的速度 , 從鎖骨下靜脈打入 AF 60 mM 0.5 ml , 每隔 10 分鐘打一次 , 超過 60 分鐘打完 3 ml , 打完後開始計時 , 分別於 5、10、20、40、80、120、160 和 320 分鐘時 , 各抽血 200 $\mu$ l , 於 600 rpm 離心 10 分鐘 , 取得之血清以 HPLC 分析 AF 與 AAF 的量。

### The amount of AF and AAF

Female SD rats (180-200 g)

?

Gastric intubation of Gypenosides 3.5 mg or 1% DMSO

?

24 hours later

?

Infuse AF(60 mM) in a speed of 0.5 ml/min, in a interval of 10 min, over 60 minutes, total 3 ml  
(subclavicle vein)

?

Serial blood sampling 200  $\mu$ l (5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 and 320 min)

?

Centrifugation 600 g, 10 min for plasma

?

AF and AAF were measured by HPLC

b. 絞股藍皂? 對各器官中 AF 與 AAF 代謝物之量與分佈的影響  
將 18 隻約 6 週大的大白鼠分為三組, 第一組只灌食 2-AF 60 mM 作為控制組, 第二組同時灌食 Gypenosides 3.5 mg 和 2-AF 60 mM, 第三組先灌食 Gypenosides 3.5 mg, 經過 24 小時後再灌食 2-AF 60 mM, 將大白鼠飼養於代謝籠內並持續收集 24 小時尿液與糞便後, 再將其血液、肝臟、腎臟、胃、膀胱、子宮和大腸取出, 將組織及排泄物加入 Lysis buffer, 以組織均質機打成細胞質液(cytosol), 再加入 3-5 ml 萃取液(Ethylacetate : methanol=95:5), 震盪混合 1-2 分鐘後靜置 20 分鐘, 離心 3000rpm, 10 分鐘, 4℃, 取上清液放入微量離心管, 以冷凍乾燥離心機乾燥後, 再加 50-100  $\mu$ l methanol 溶解, 取 20  $\mu$ l 注射入 HPLC 分析 2-AF 代謝產物的量, 並計算出平均值和標準差, 再以 T 檢定來比較實驗組和控制組之統計差異。

#### (八) 統計分析

以 unpaired student's *t* test 和 ANOVA 作統計分析。