

第四章 結果

(一) 絞股藍皂? 對人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 和 HeLa) 中 NAT 活性的效應

A. 在胞質液內

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

在 Ca Ski 胞質液中，乙醯轉移酵素的活性是以 AF 為受質，加入不同濃度的絞股藍皂? 或不加入絞股藍皂?，結果以平均值加減標準差來表示，如表 4.1。結果顯示，絞股藍皂? 的濃度在 350 $\mu\text{g/ml}$ 以上，與控制組比較，達到統計學上的顯著，而且絞股藍皂? 的濃度愈高，對人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski) 胞質液中 NAT 活性的抑制就愈強，與濃度呈正相關。

表 4.1 Effects of gypenosides on human cervix tumor cells' cytosols (Ca Ski) NAT activity

Gypenosides treatment	AAF (nmol/min/mg protein)	F Value
Control	7.42 \pm 0.64	74.89*
200 $\mu\text{g/ml}$	6.69 \pm 0.58	
300 $\mu\text{g/ml}$	5.89 \pm 0.62	
350 $\mu\text{g/ml}$	4.72 \pm 0.43 ^a	
400 $\mu\text{g/ml}$	2.76 \pm 0.38 ^{ab}	
450 $\mu\text{g/ml}$	0.94 \pm 0.14 ^{abc}	

Note. Values are mean \pm SD of activity (nmol/min/mg protein); n=6. ANOVA analysis used for comparisons.

* $p < 0.001$

^aSignificantly different, at p level of 0.05, compared to control.

^bSignificantly different, at p level of 0.05, compared to 350 $\mu\text{g/ml}$.

^cSignificantly different, at p level of 0.05, compared to 400 $\mu\text{g/ml}$.

b. 絞股藍皂? (350 µg/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

在加入或不加入絞股藍皂? (350 µg/ml) Ca Ski 胞質液, 加入含特定不同濃度 AF 的 recycling mixture, 來決定胞質液內 NAT 的 K_m 與 V_{max} 。結果顯示, 在加入 350 µg/ml 絞股藍皂? 的實驗組, K_m 與 V_{max} 都有明顯的減少, 達到統計學上的顯著。(表 4.2)

表 4.2 Kinetic data for acetylation of AF in human cervix cancer cells' cytosol (Ca Ski)

	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)
Control	4.76 ± 0.83	21.12 ± 4.08
Gypenosides	^a 2.01 ± 0.42	^b 10.21 ± 2.86

Values are means \pm SD; $n=3$. The acetyl CoA and gypenosides concentrations were 0.5 mM and 350 µg/ml respectively, and the kinetic constants were calculated from the modified HYPER Program of Cleland.

^adiffers between 350 µg/ml gypenosides and control. $p<0.05$

^bdiffers between 350 µg/ml gypenosides and control. $p<0.05$

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

在加入 30 µM AF 的人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 及 HeLa) 細胞中, 再加入不同濃度的絞股藍皂? (200-450 µg/ml) 後, 乙醯化成 AAF 的百分比, 隨著絞股藍皂? 濃度的增加, 分別減少 18-84% 與 9-78%。與控制組比較, 當絞股藍皂? 的濃度在 350 µg/ml 以上時, 都達到統計學上的顯著。(圖 4.1、圖 4.2)

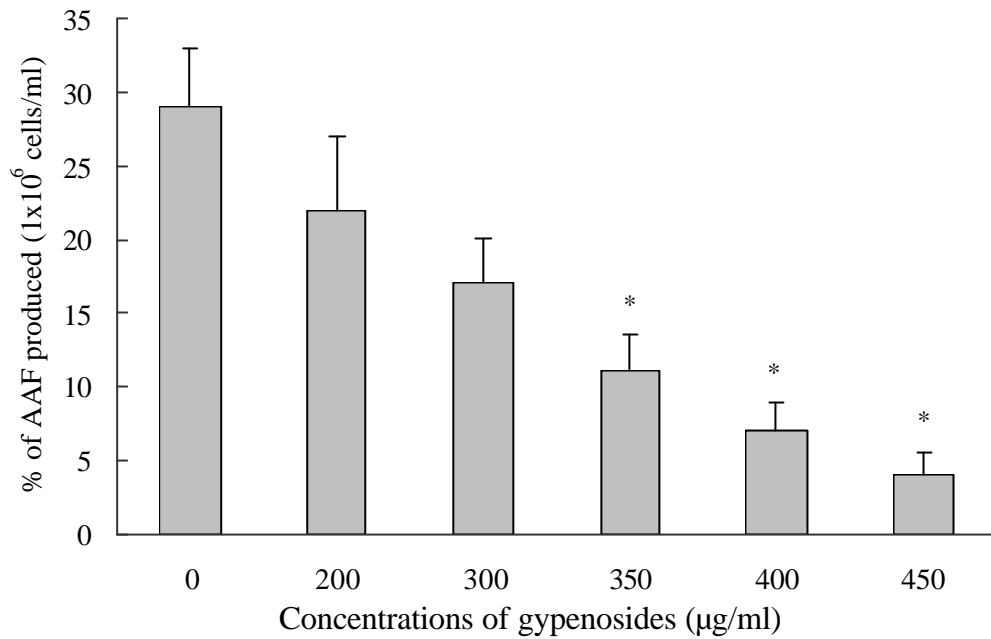


圖 4.1 Effect of various concentrations of gypenosides on AAF production by human cervix cancer cells (Ca Ski). * mean differs between gypenosides and control. $p < 0.05$.

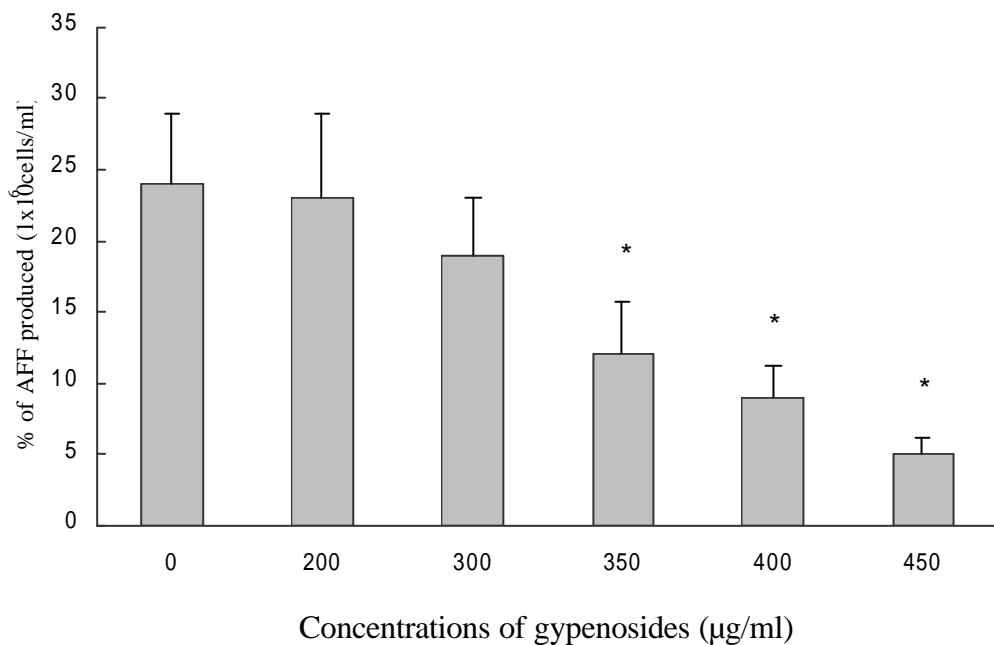


圖 4.2 Effect of various concentrations of gypenosides on AAF production by human cervix cancer cells (HeLa). * mean differs between gypenosides and control. $p < 0.05$.

b. 絞股藍皂? (350 $\mu\text{g/ml}$) 在不同時間對 AF 乙醃化的影響

當檢測絞股藍皂? 在不同時間對 AF 乙醃化的影響時, 在加入 30 μM AF 的人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa) 細胞中, 再加入絞股藍皂? (350 $\mu\text{g/ml}$), 於不同的時間 (6、12、24 和 48 小時) 後, 分析乙醃化成 AAF 的百分比。結果顯示, 隨著時間增加, 乙醃化成 AAF 的百分比也隨著增加, 但是, 加入 350 $\mu\text{g/ml}$ 絞股藍皂? 的實驗組與控制組比較, 在各時間點, 都有明顯的減少, 且達統計學上的顯著。(圖 4.3、圖 4.4)

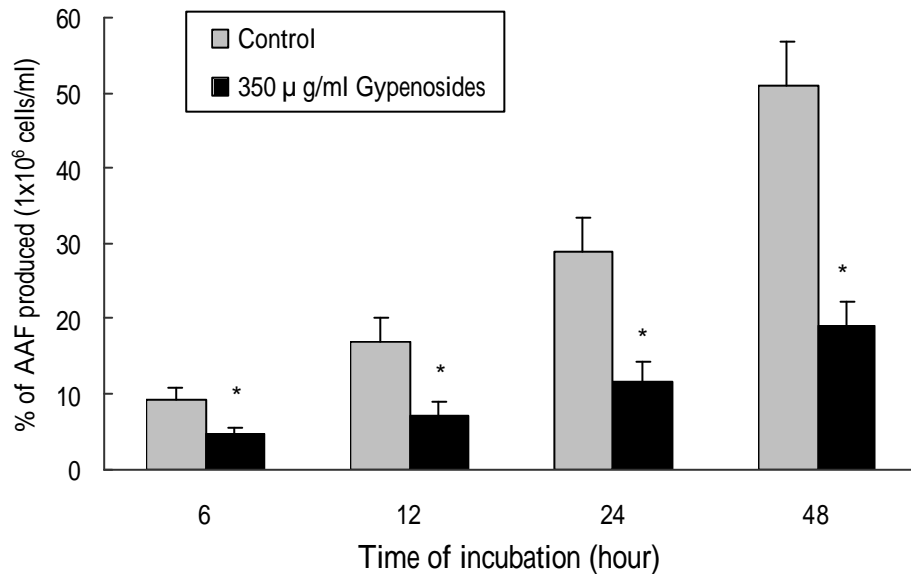


圖 4.3 Effects of incubation time on AAF production by human cervix cancer cells (Ca Ski). * mean differs between gypenosides and control. $p < 0.05$.

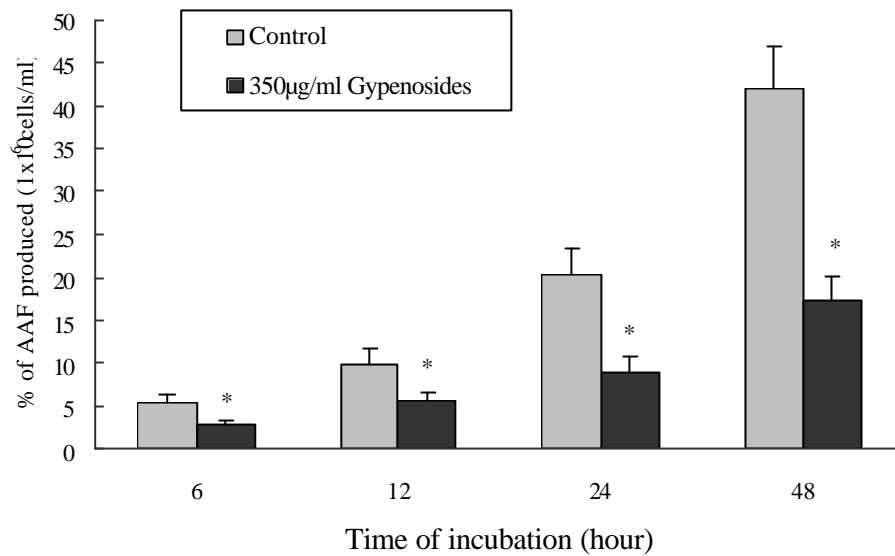
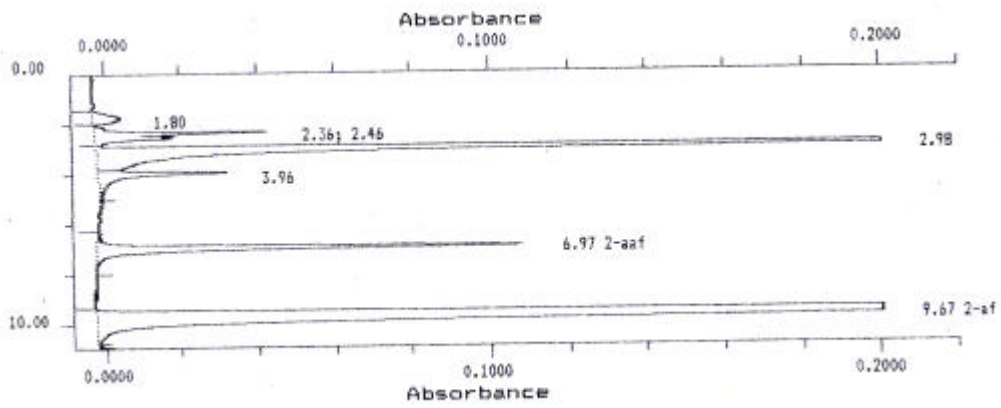


圖 4.4 Effects of incubation time on AAF production by human cervix cancer cells (HeLa). * mean differs between gypenosides and control. $p < 0.05$.

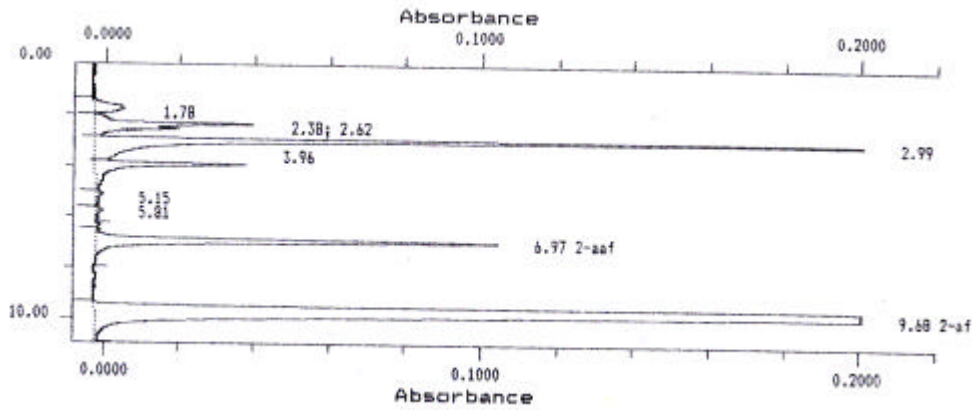
c. 不同濃度的絞股藍皂? 對 NAT 代謝產物之影響

在加入 30 µM AF 的人類子宮頸癌細胞株(Ca Ski 及 HeLa)細胞中, 再加入不同濃度的絞股藍皂? (200-450 µg/ml) 後, 分析 NAT 代謝的產物。結果顯示, 隨著絞股藍皂? 濃度的增加, 各細胞中 AF 乙醯化的量也隨著減少。(圖 4.5 (a-f) 與圖 4.6 (a-f))

a) Control



b) 200 $\mu\text{g/ml}$ Gypenosides



c) 300 $\mu\text{g/ml}$ Gypenosides

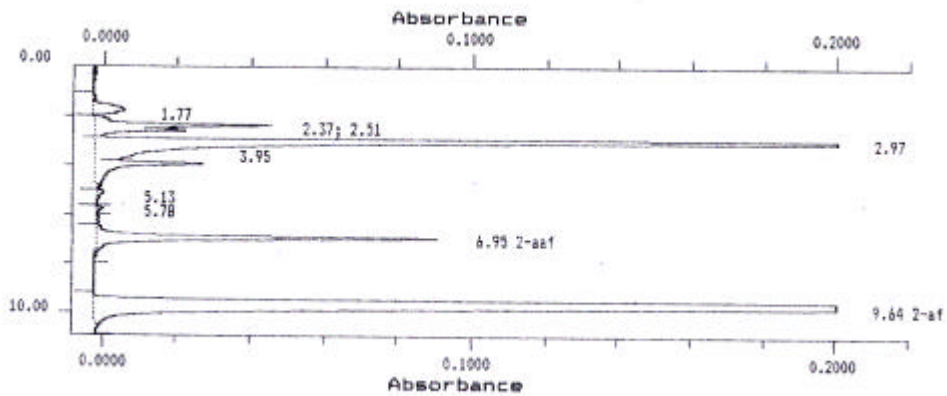
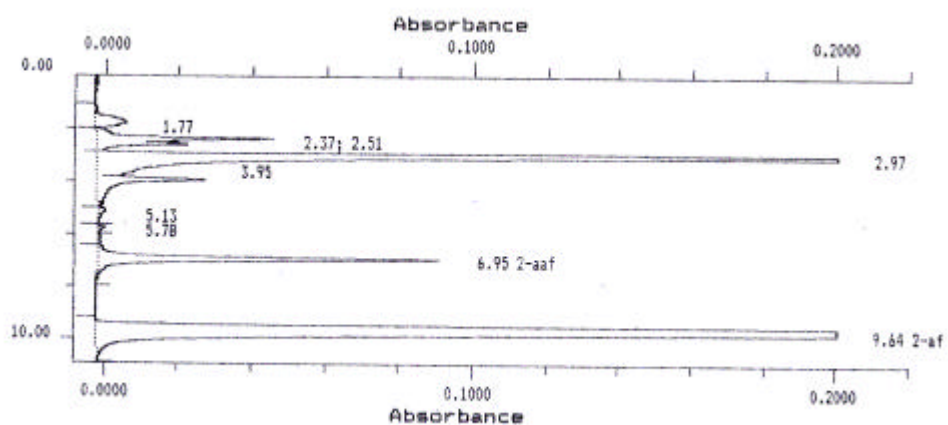
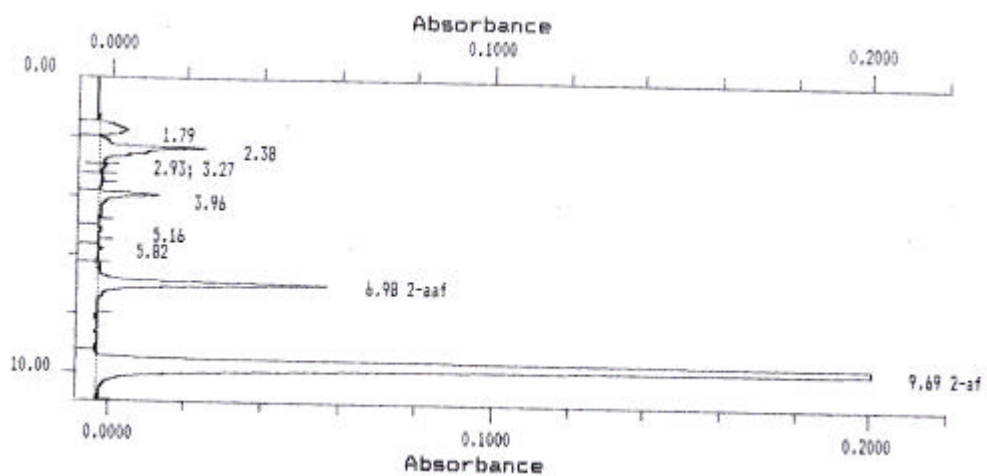


圖 4.5 (a-f) Effects of various concentrations of gypenosides on the HPLC profile of N-acetylation of AF by human cervix cancer cells (Ca Ski).

d) 350 µg/ml Gypenosides



e) 400 µg/ml Gypenosides



f) 450 µg/ml Gypenosides

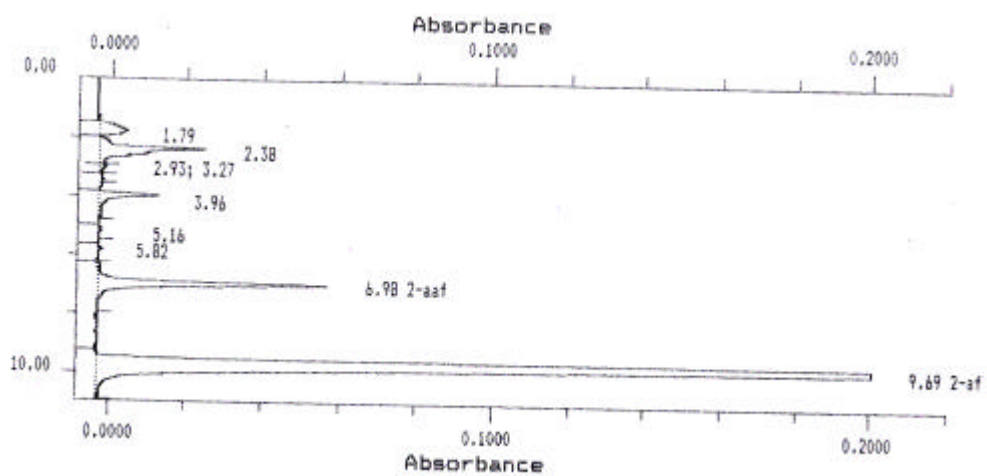
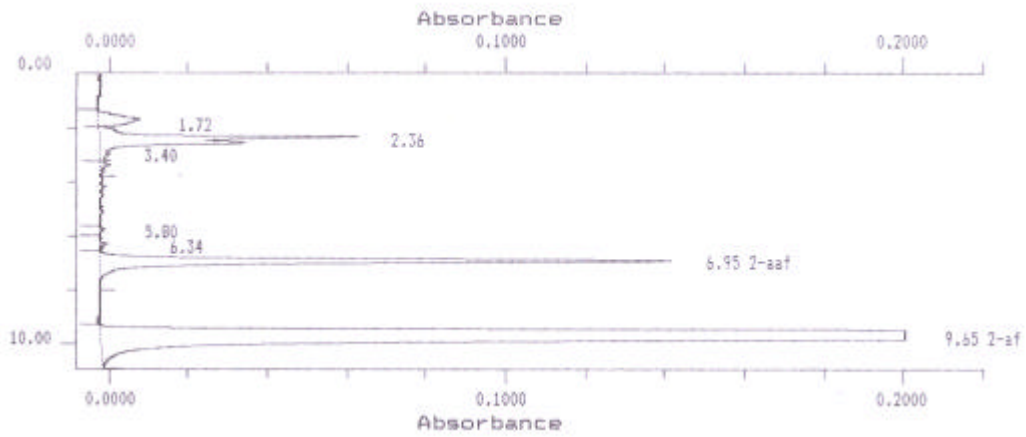
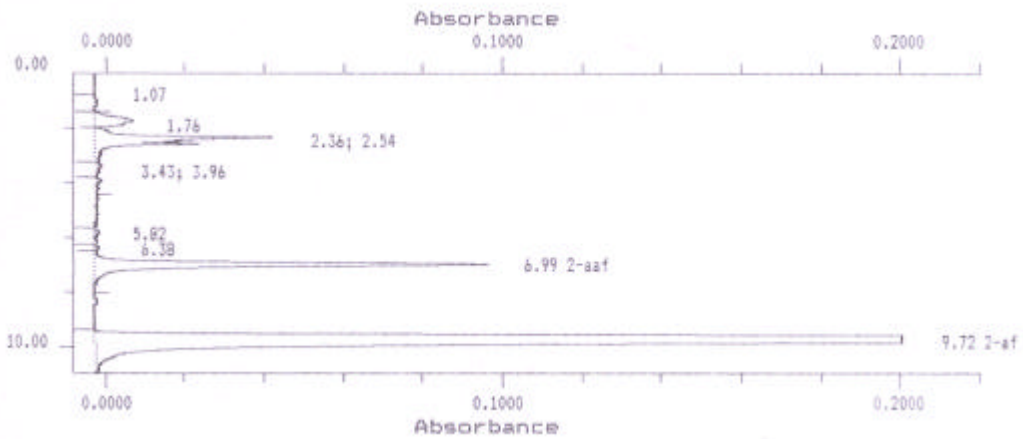


圖 4.5 (續)

a) Control



b) 200 µg/ml Gypenosides



c) 300 µg/ml Gypenosides

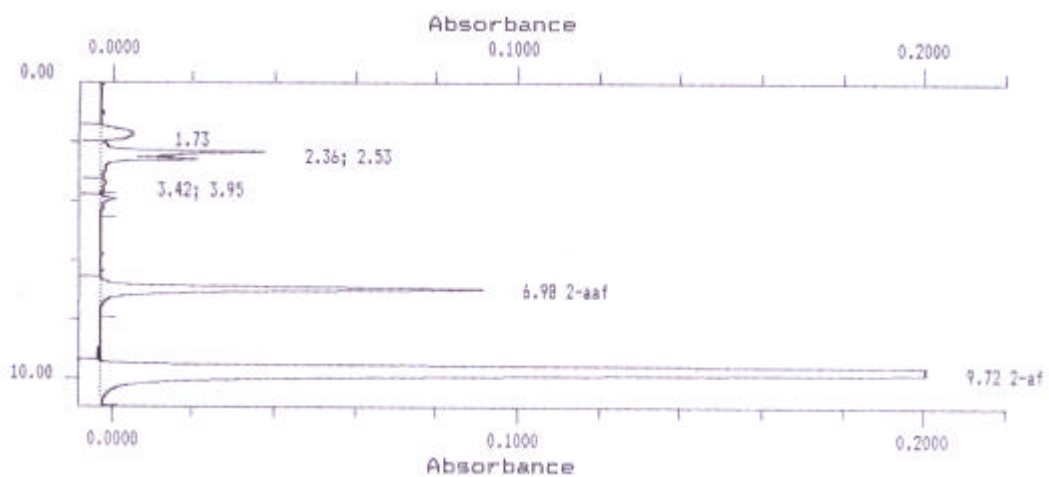
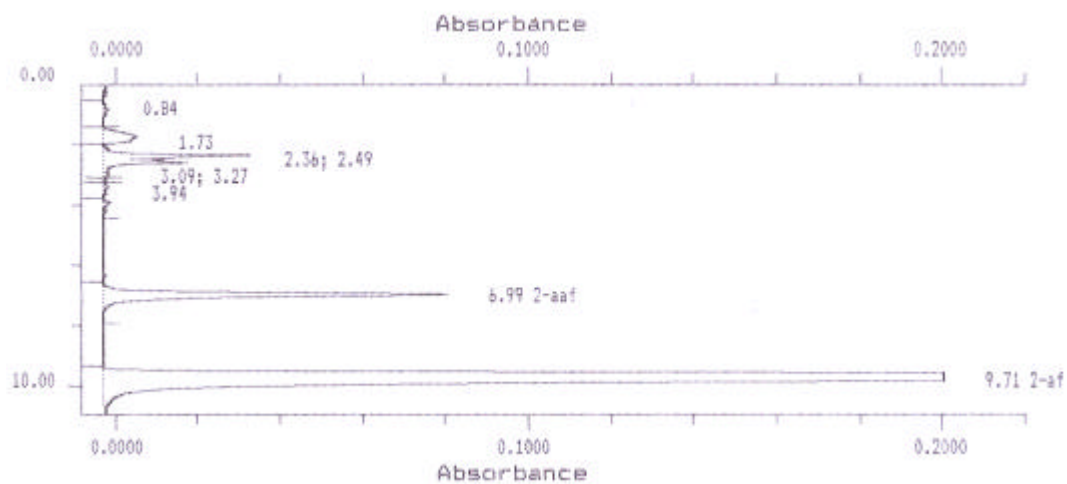
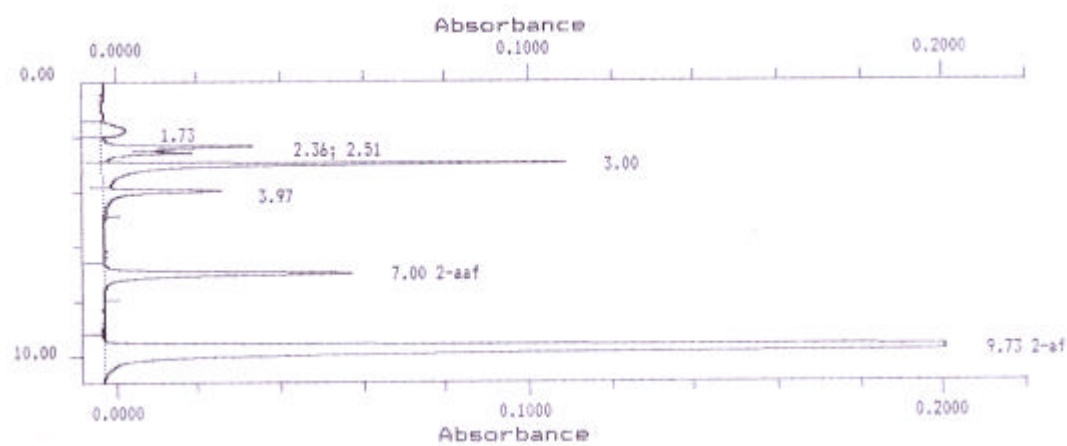


圖 4.6 (a-f) Effects of various concentrations of gypenosides on the HPLC profile of N-acetylation of AF by human cervix cancer cells (HeLa)

d) 350 $\mu\text{g/ml}$ Gypenosides



e) 400 $\mu\text{g/ml}$ Gypenosides



f) 450 $\mu\text{g/ml}$ Gypenosides

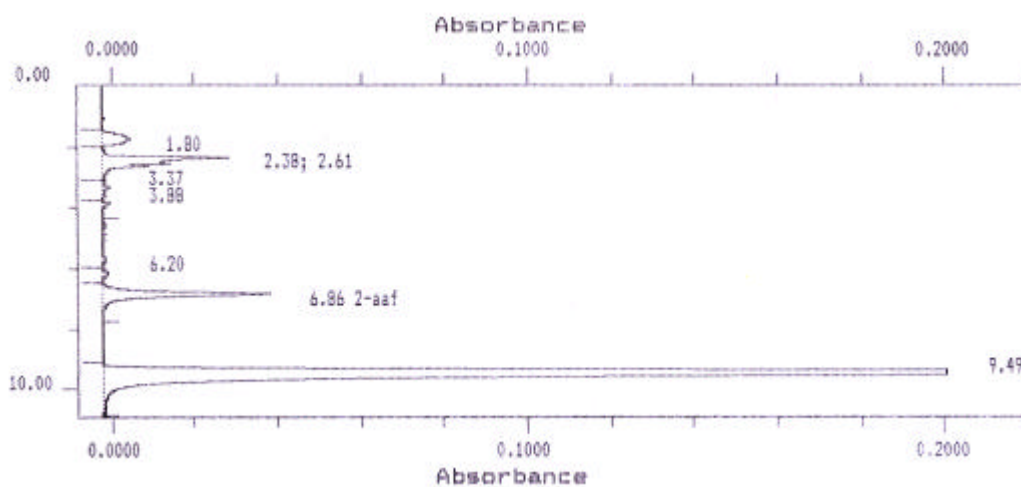


圖 4.6 (續)

(二) 絞股藍皂? (350 $\mu\text{g/ml}$) 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

在加入 AF (30 或 60 μM) 的人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa) 細胞中，再加入絞股藍皂? (350 $\mu\text{g/ml}$) 後，收取細胞分離 DNA，水解成核? 酸，以 butanol 萃取核? 酸附加物，再以 HPLC 分析。結果顯示，人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa) 能活化 AF，使其代謝成可與 DNA 結合的共價代謝物，並且顯示 350 $\mu\text{g/ml}$ 的絞股藍皂?，同時可以減少 DNA 附加物 (DNA-adducts) 的形成，與控制組比較，達統計學上顯著。(圖 4.7、圖 4.8)

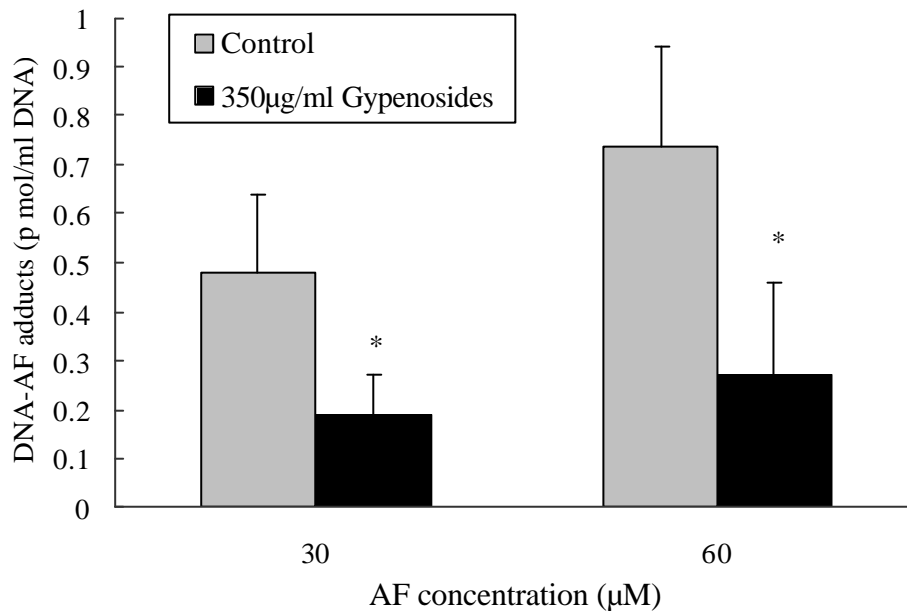


圖 4.7 Effects of gypenosides on DNA-AF adducts in human cervix cancer cells (Ca Ski). * mean differs between gypenosides and control. $p < 0.05$.

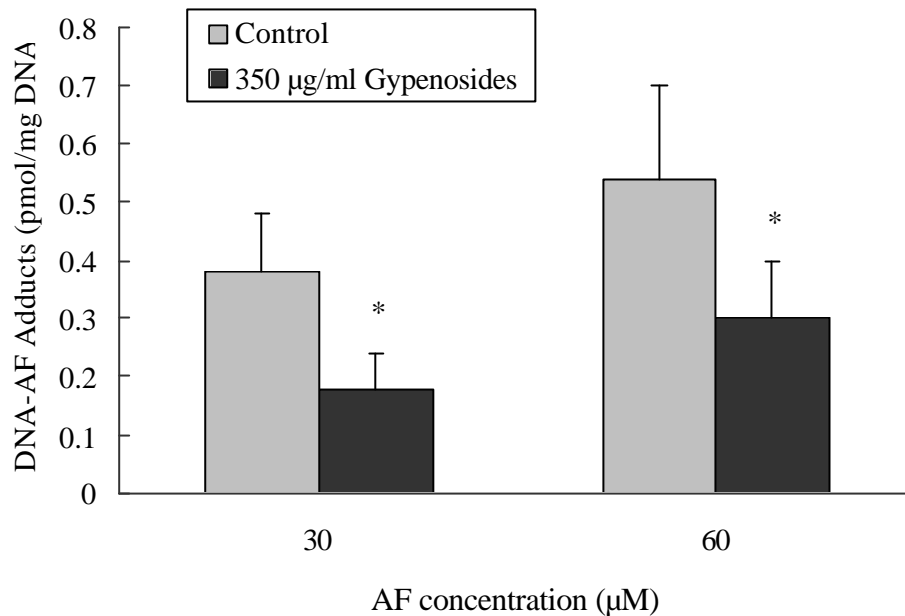
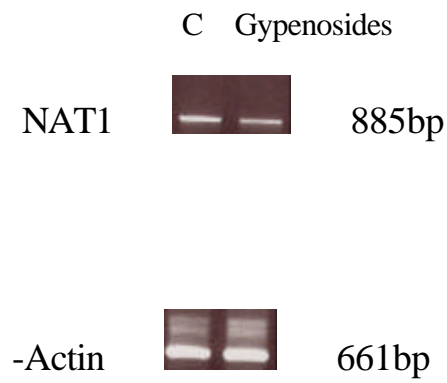


圖 4.8 Effects of gypenosides on DNA-AF adducts in human cervix cancer cells (HeLa). * mean differs between gypenosides and control. $p < 0.05$.

(三) 絞股藍皂? 對人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski 或 HeLa) 細胞中 NAT1 基因 (NAT mRNA) 表現的影響

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) 細胞中 NAT1 基因表現的影響, 結果顯示, 絞股藍皂? 可以抑制 NAT1 mRNA 的表現。(圖 4.9 a-b、圖 4.10 a-b)

a)



b)

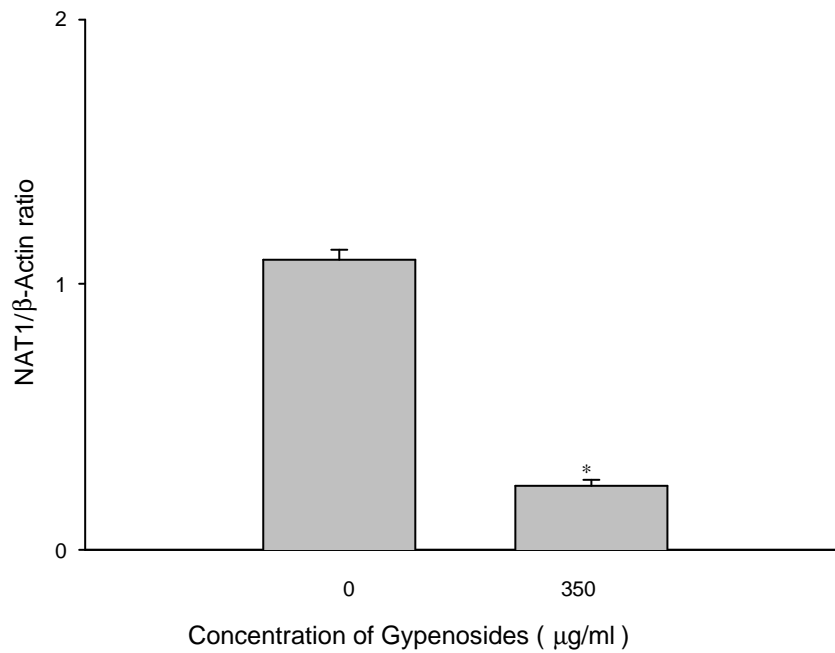
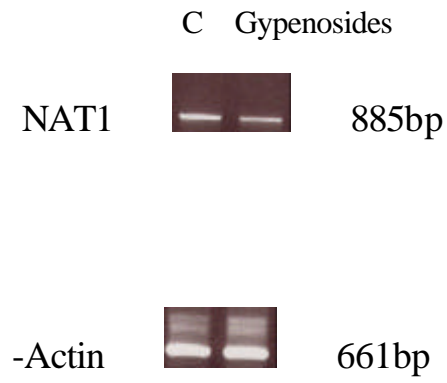


圖 4.9 a-b Effects of gypenosides on the expression of NAT mRNA in human cervix cancer cells (Ca Ski).

a)



b)

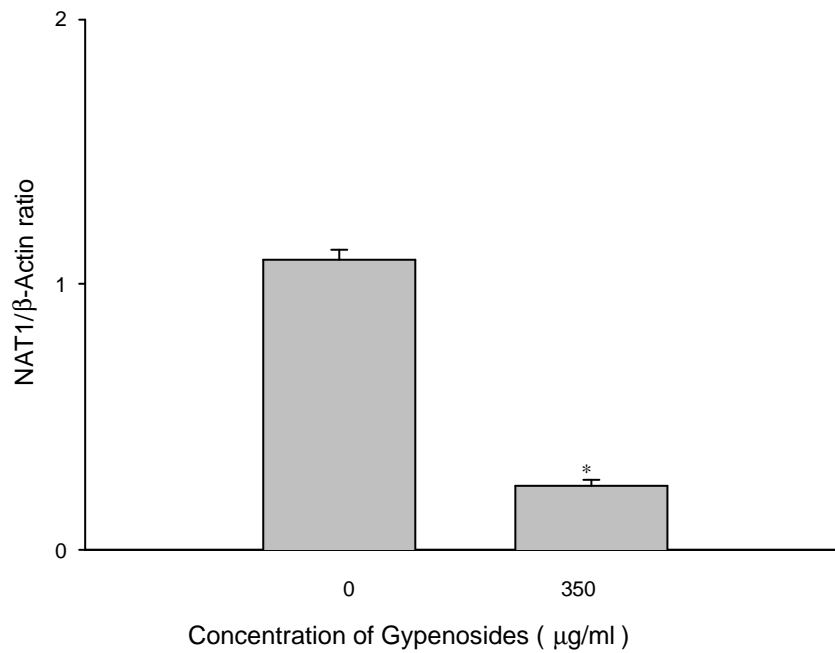


圖 4.10 a-b Effects of gypenosides on the expression of NAT mRNA in human cervix cancer cells (HeLa).

(四) 以 Microarray hybridization 檢測絞股藍皂? (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 對人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski) 之基因表現的影響

以 cDNA microarray 分析絞股藍皂? (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 對人類子宮頸癌細胞株 (Ca Ski) NAT1 基因 (NAT mRNA) 表現的抑制, 結果顯示, 為 down regulation, 如圖 4.11, 圈圈內之綠點為 NAT1 基因。

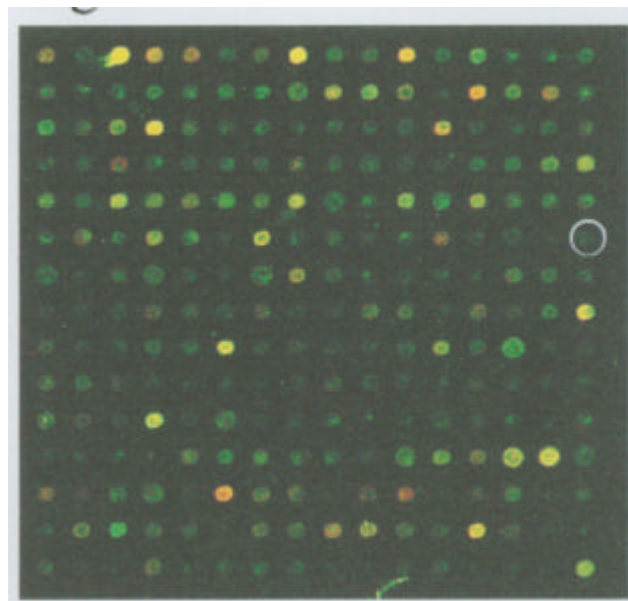


圖 4.11 Down-regulation of NAT gene in human cervix cancer cells treated with 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gypenosides, assayed by cDNA microarray. Red color spot represents up-regulation and green color spot down-regulation. Circle marks the NAT gene down-regulation.

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

取 1×10^8 細菌置於各試管中，再加入各種不同濃度的絞股藍皂? (200、300、350、400 和 450 $\mu\text{g/ml}$)，置於 37 °C，5% 二氧化碳中培養 24 小時後，以 Beckman Spectrophotometer 計算出抑制百分比。結果顯示，隨著絞股藍濃度的增加，對淋菌生長的抑制百分比也增加，當濃度達 450 $\mu\text{g/ml}$ 時，對淋菌生長的抑制百分比高達 88%。(表 4.3)

表 4.3 Effects of gypenosides on the growth of *N. gonorrhoeae*

Strains	Concentration of gypenosides ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	200	300	350	400	450
	(% inhibition)					
1	0	18	41	66	80	89
2	0	16	38	62	76	90
3	0	20	39	64	82	92
4	0	18	38	59	78	84
5	0	14	34	52	74	86
6	0	16	37	66	72	90
7 ^a	0	8	23	40	51	76
8 ^b	0	10	26	48	57	79

The percent of inhibition was determined under a spectrophotometer, and then the percent inhibition was calculated. All experiments and controls were run in triplicate.

7^a: *E. coli*.

8^b: *S. aureus*.

(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 活性的效應

在淋菌胞質液中，乙醯轉移酵素的活性是以 AAF 為受質，加入不同濃度的絞股藍皂?，結果以平均值加減標準差來表示，如表 4.4。結果顯示，絞股藍皂? 的濃度在 350 $\mu\text{g/ml}$ 以上，與控制組比較，達到統計學上的顯著，而且絞股藍皂? 的濃度愈高，對淋菌胞質液中 NAT 活性的抑制就愈強，與濃度呈正相關。

表 4.4 Effects of gypenosides on *N. gonorrhoeae* NAT activity in vitro

Concentrations of gypenosides ($\mu\text{g/ml}$)	AAF (nmol/min/mg protein)
Control	0.81 \pm 0.10
200	0.79 \pm 0.12
300	0.72 \pm 0.14
350	0.28 \pm 0.09 ^a
400	0.14 \pm 0.06 ^b
450	0.06 \pm 0.04 ^c

All experiments and control were run in triplicate. Values are mean \pm SD; n = 3.

^a differs between 350 $\mu\text{g/ml}$ gypenosides and control. $p < 0.05$

^b differs between 400 $\mu\text{g/ml}$ gypenosides and control. $p < 0.01$

^c differs between 450 $\mu\text{g/ml}$ gypenosides and control. $p < 0.005$

b. 絞股藍皂? (350 $\mu\text{g/ml}$)對淋菌胞質液中 NAT 之 kinetic constants (K_m , V_{max})的影響

在加入或不加入絞股藍皂? (350 $\mu\text{g/ml}$) 的淋菌胞質液，加入含特定不同濃度 AF 的 recycling mixture，來決定胞質液內 NAT 的 K_m 與 V_{max} 。結果顯示，在加入 350 $\mu\text{g/ml}$ 絞股藍皂? 的實驗組， K_m 與 V_{max} 都有明顯的減少，達到統計學上的顯著。(表 4.5)

表 4.5 Kinetic data for acetylase of 2-AF in *N. gonorrhoeae*

	In cytosol	
	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg)
Control	3.04 \pm 0.60	14.42 \pm 2.59
Gypenosides	^a 1.44 \pm 0.36	^b 7.32 \pm 1.46

Values are mean \pm SD; n = 3. The acetyl CoA and gypenosides concentrations were 0.1 mM and 350 $\mu\text{g/ml}$, and the kinetic constants were calculated from the modified HYPER Program of Cleland. All experiments and controls were run in triplicate.

^a differs between 350 $\mu\text{g/ml}$ gypenosides and control. $p < 0.05$

^b differs between 350 $\mu\text{g/ml}$ gypenosides and control. $p < 0.05$

B. 在完整菌體細胞 (intact bacteria) 內 , 不同濃度的絞股藍皂? 對 AF 乙醯化的影響

在加入 30 μ M AF 的淋菌中, 再加入不同濃度的絞股藍皂? (200-450 μ g/ml) 後, 乙醯化成 AAF 的百分比, 隨著絞股藍皂? 濃度的增加, 逐漸減少。與控制組比較, 當絞股藍皂? 的濃度在 300 μ g/ml 以上時, 都達到統計學上的顯著。(圖 4.12)

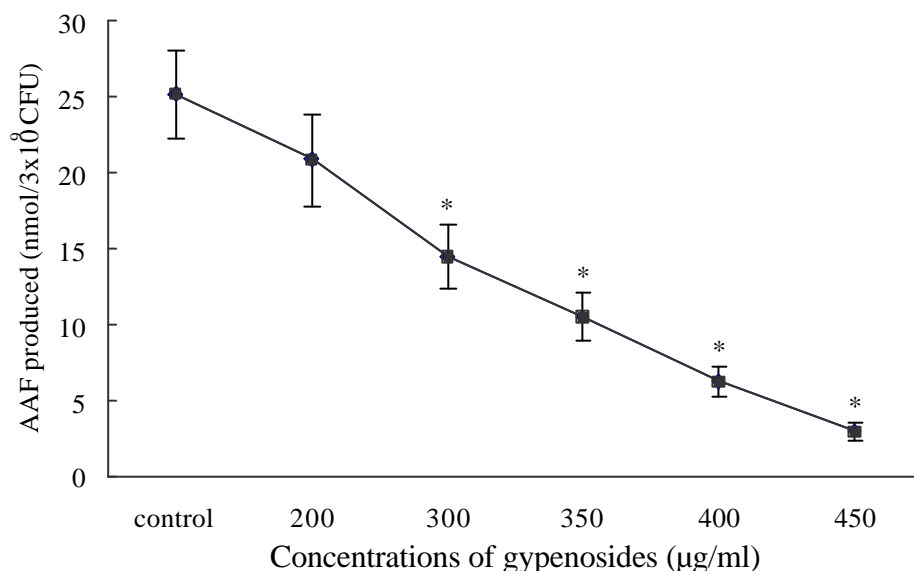


圖 4.12 Amount of acetylation of 2-AF by *N.gonorrhoeae* NAT with or without specific concentrations of gypenosides were calculated. Values are mean \pm SD; n = 3. All experiments and controls were run in triplicate.

* $p < 0.05$. pretreated and control animals. Values are mean \pm SD; n = 6.

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

A. 生物體外實驗：乙醯轉移酶 (NAT) 活性的影響

a. 在血液胞質液 (cytosol) 中的影響

在加入 30 μM AF 的大白鼠的血液與各器官胞質液中，再加入不同濃度的絞股藍皂? (200-450 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 後，分析 NAT 代謝的產物。結果顯示，隨著絞股藍皂? 濃度的增加，產生 AAF 的量也隨著減少。與控制組比較，當絞股藍皂? 的濃度在 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上時，都達到統計學上的顯著。(圖 4.13、表 4.6)

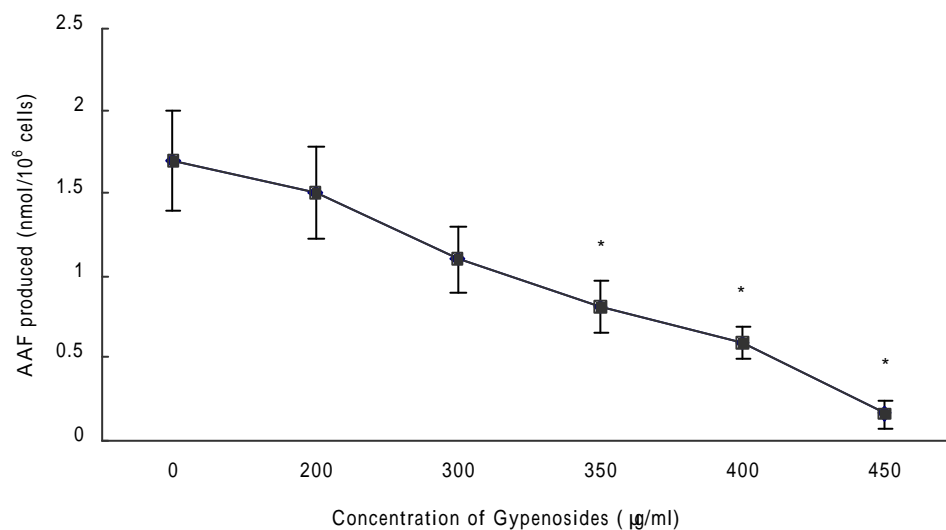


圖 4.13 Effects of various concentrations of gypenosides on AAF production by blood cytosol of SD rats in the presence of 30 mM AF after incubation for 18 hours. * mean differs between gypenosides and control. $p < 0.05$.