

# 豬苓多糖及併用 WR-2721 對輻射與化學性遺傳損傷的 防護作用研究

吳琇卿

指導教授：江素瑛 博士  
中國醫藥學院 中國醫學研究所

## 目的：

本品為多孔菌科 Polyporaceae 的豬苓菌 *Polyporus umbellatus* Fries 寄生於椴樹、楓樹等植物根部的菌核，是一種常用於治療水腫泄瀉及泌尿系統感染的常用中藥；豬苓多糖 (polysaccharides of *Polyporus umbellatus* PUPs) 則是豬苓的主要有效成分之一；WR-2721 (amifostine) 是目前已知的具有輻射防護作用的藥物，但有藥效短暫、價錢昂貴、無法普及應用於臨床的缺點。本實驗的目的是探討豬苓多糖單獨及併用 WR-2721 對游離輻射與化療藥物 cyclophosphamide (CP) 所導致遺傳損傷的防護作用如何，以期 PUPs 可輔助或替代 WR-2721 在臨床的應用。

## 方法：

分為 3 部分：(1) 豬苓多糖單獨使用對輻射遺傳損傷之防護試驗：1 體外實驗使用人類淋巴胚母細胞株 (TK6)，取新鮮泡製 PUPs 30  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$  及 300  $\mu\text{g/ml}$ ，輻射前 30 分鐘給藥，以 1.5 Gy 的游離輻射照射後 48 小時，於螢光顯微鏡下計數染色體損傷微核的生成率 2 體內實驗以 6~8 週 ICR 公鼠，腹腔注射 50 mg/Kg 劑量 PUPs，於 0 分、15 分、30 分、45 分鐘後給予 6 Gy 的游離輻射照射，並於輻射後 48 小時採鼠尾血計數周邊網狀紅血球的微核生成率。

(2) 豬苓多糖單獨及併用 WR-2721 對輻射遺傳損傷之防護試驗：由微核試驗測量對輻射遺傳毒性之防護效果。1 - 1 體外實驗使用 TK6 細胞，取 300  $\mu\text{g/ml}$  之 PUPs 單獨或併用 300  $\mu\text{g/ml}$  之 WR-2721，輻射前 30 分鐘給

藥，於 1.5 Gy 的游離輻射照射後 48 小時，計數微核的生成率。<sup>1-2</sup> 測量細胞群落生成率(plating efficiency PE), 且看其相對存活率。<sup>1-3</sup> 看其 tk 基因之突變率如何。<sup>2</sup> 體內實驗以 6~8 週 ICR 公鼠，腹腔注射 PUPs 50 mg/Kg 劑量單獨或併用 200 mg/Kg 劑量的 WR-2721，給予 6 Gy 的游離輻射照射，並於輻射後 48 小時計數微核生成率。<sup>3</sup> 以<sup>2</sup> 項游離輻射照射後的老鼠肝臟，分別測量 DNA 鍵結物 8-OHdG 與脂質過氧化 Lipid Peroxidation (LPO)。

(3) 豬苓多糖單獨使用對化療藥物遺傳損傷之防護試驗：<sup>1</sup> 在體外實驗使用 TK6 細胞，投予 300 µg/ml PUPs，30 分鐘後再分別暴露於 80 µg/ml 或 120 µg/ml 劑量的 CP，經 30 分鐘去除 PUPs 及 CP，再培養 48 小時後，計數微核的生成率。<sup>2</sup> 體內實驗以 6~8 週 ICR 公鼠，腹腔注射 PUPs 4.0 mg/kg、12.5 mg/Kg 和 50 mg/Kg 的劑量，於 30 分鐘後給予 50mg/Kg 劑量的 CP，並於 CP 給藥後 48 小時採鼠尾血計數微核。

#### 結果：

實驗證明，不管體外、體內試驗，輻射與 CP 可使染色體損傷而導致微核、DNA 鍵結物 8-OHdG、LPO、tk 基因突變率的增加，經由豬苓多糖單獨及併用 WR-2721 事先投予，再暴露於輻射或 CP 後測定，結果顯示豬苓多糖和 WR-2721 於體外、體內試驗統計上均能有意義的降低輻射或 CP 誘發的實驗值，使我們更確定豬苓多糖和 WR-2721 對於輻射或 CP 所誘發的遺傳損傷具有保護能力，況且豬苓多糖抗輻射效果不比 WR-2721 差。

#### 結論：

體外、體內微核試驗、DNA 鍵結物 8-OHdG、Lipid Peroxidation (LPO) 及 tk 基因突變率測試結果顯示，豬苓多糖本身是個不具細胞毒性且有很好輻射與化學防護作用的中藥材成分。

**關鍵字：**豬苓多糖(polysaccharides of Polyporus umbellatus PUPs)、WR-2721、cyclophosphamide (CP)、微核 (Micronuclei)、Lipid Peroxidation (LPO)、DNA 鍵結物 8-OHdG、tk 基因

# 目 錄

第一章	前言-----	1
第二章	文獻探討-----	3
	第一節 豬苓之文獻探討-----	3
	第二節 WR-2721 之文獻探討-----	11
	第三節 抗輻射之文獻探討-----	14
	第四節 微核之文獻探討-----	17
	第五節 氧化 DNA 傷害與突變之文獻探討-----	20
	第六節 tk ( thymidine kinase ) 基因之文獻探討-----	22
第三章	材料與方法-----	23
	第一節 微核試驗(Micronuclei test) -----	23
	第二節 DNA 鍵結物( DNA adduct ) : 8-OHdG 之定量-----	24
	第三節 脂質過氧化物( LPO ) 之定量-----	25
	第四節 tk 基因突變率測試-----	26
	第五節 統計分析方法-----	27
第四章	結果-----	28
	第一節 豬苓多糖對輻射誘發 TK6 細胞微核之劑量反應關係-----	28
	第二節 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞微核之試驗-----	29
	第三節 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞的細胞毒性影響-----	30
	第四節 豬苓多糖對輻射誘發 TK6 細胞的 tk 基因突變率的影響-----	31
	第五節 豬苓多糖和 WR-2721 對老鼠的遺傳毒性試驗-----	32
	第六節 豬苓多糖給藥時間對輻射誘發老鼠周邊血微核之影響-----	32
	第七節 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發老鼠周邊血微核之試驗-----	33
	第八節 豬苓多糖對 CP 誘發 TK6 細胞的微核試驗-----	34
	第九節 豬苓多糖對 CP 誘發老鼠周邊血微核的試驗-----	35
	第十節 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發氧化 DNA 傷害的影響-----	36
	第十一節 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射老鼠脂質过氧化物的影響-----	37

第五章	討論-----	39
第六章	結論-----	46
	參考文獻-----	47
	附錄-----	66
	英文摘要-----	76
	謝辭-----	78

## 圖目錄

圖 2-1	豬苓及其切面圖-----	4
圖 4-1	豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞的 tk 基因突變率的影響-----	31
圖 4-2	豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發氧化 DNA 傷害的影響-----	37

## 表目錄

表 4-1	豬苓多糖對輻射誘發 TK6 細胞微核之劑量反應關係	28
表 4-2	豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞微核之試驗	29
表 4-3	豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞的細胞毒性影響	30
表 4-4	豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對老鼠的遺傳毒性試驗	32
表 4-5	豬苓多糖給藥時間對輻射誘發老鼠周邊血微核之影響	33
表 4-6	豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發老鼠周邊血微核之試驗	34
表 4-7	豬苓多糖對 CP 誘發 TK6 細胞的微核試驗	35
表 4-8	豬苓多糖對 CP 誘發老鼠周邊血微核的試驗	36
表 4-9	豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發老鼠脂質過氧化的影響	38

## 第一章 前言

我們知道在癌症的治療中，輻射治療及化療藥物雖然可殺滅癌組織，但對生物體危害也極大，其對人體的傷害主要是骨髓抑制、造血組織障礙和周邊白血球下降以及免疫功能降低，甚至可誘發第二原發癌(secondary cancer)的毒副作用；所以在癌症治療中如何保護正常細胞與殺滅癌組織是一樣重要，尋找提高正常組織對輻射及化療耐受性的藥物是此次實驗的主要目的。

當游離輻射碰到有機物質的大分子時，就會產生兩種不同的反應，一種為直接反應；另一種為間接反應。在直接反應上，會使 DNA 損傷；在間接反應上，當游離輻射接觸到生物體內的水分子或其它有機分子，就會產生自由基(free radicals)，這些自由基可進一步作用，引發結構及體內分子包括醣類、蛋白質與脂質的裂解，最後導致細胞溶解(cell lysis)，嚴重的甚至造成生物體死亡。(附圖 1)

Cyclophosphamide (CP) 是屬於烷化類化療製劑 (Mazur L,1994)，它在體外無活性，必須進入體內後經肝細胞 p450 活化才能與 DNA 大分子發生反應。目前，在臨床上作為第一線抗腫瘤藥物，化學治癌藥物雖可以殺傷癌細胞，但對正常組織的危害也極大，甚至可誘發第二原發癌；所以在化療治療中尋找防護正常組織的藥物也是此次實驗的目的。

目前已知的一些具有輻射防護作用的藥物，因多為含硫物質，毒性較大，其中以 WR-2721(amifostine)為代表，WR-2721 仍有低血壓、打噴嚏、面潮紅、噁心嘔吐等副作用 (Hospers,1999)，直接應用到臨床的機會較小，所以人們期待開發出毒性小，可用於臨床防治輻射及化療損傷的藥物，因此從具有活血、補血、提升白血球和增強免疫功能的天然藥物中著手，探討作用機轉不同、毒性不同的藥物，以獲得對正常組織的最佳保護和最低毒副作用。(Maisin, 1998)

我國醫學以扶正祛邪治則，辨證論治理論為基礎，在腫瘤病人治療中，觀察到中醫治則中常用一些真菌類藥物來協助治療，增強免疫力。豬苓 (*Polyporus umbellatus* Fries) 系寄生於椴樹、楓樹等植物根部的菌核，是一種常用來治療水腫泄瀉及泌尿系統感染的中藥；豬苓多糖 (polysaccharides of *Polyporus umbellatus* PUPs) 則是豬苓的主要有效成分之一，根據研究報告，多糖類會表現出抗輻射、抗誘變、抗癌、增強免疫活性、抗衰老等多種生理活性。(周寧那，1996)

最近的報告，豬苓多糖的研究多著重在肝癌 (You *et al.*, 1994)、慢性肝炎 (Liu *et al.*, 2001)、促進頭髮生長 (Inaoka *et al.*, 1994) 和免疫調整功能方面 (Zhang *et al.*, 1993)，對輻射防護只有增加老鼠存活力的報導，對於 DNA 損傷之防護則未見研究；而對 CP 毒副作用的防護則只見白血球效應的研究，在 DNA 遺傳損傷的防護則較少；我們試著由豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 由體外微核及體內微核之測試 *tk-gene* 之細胞群落生成率之試驗，氧化 DNA 傷害所產生之 8-OHdG、LPO 之定量，來探討豬苓多糖對於輻射及化學的遺傳損傷之防護能力及機轉，並且和 WR-2721 來比較，期能找到比 WR-2721 便宜又好用之中藥材，來參與輻射及化療防護的行列。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 豬苓之文獻探討

#### 一、豬苓之古籍探討

##### (一) 別名

豕零<庄子>，豨豬屎<本經>，豕囊（<庄子>司馬彪注），豨苓<韓昌黎集>，地烏桃<本草圖經>，野豬食<東北藥用植物志>，豬屎苓<四川中藥志>，豬茯苓<中國藥用真菌圖鑑>。

##### (二) 基原

本品為多孔菌科 *Polyporaceae* 的豬苓菌 *Polyporus umbellatus* Fries 寄生於椴樹、楓樹等植物根部的菌核。

##### (三) 語源

<本草經集注>：“（豬苓）是楓樹苓，其皮至黑，作塊似豬矢，故以名之。”<綱目>：“馬屎曰通，豬屎曰零（即苓字），其塊零落而下故也。”“苓”與“零”通。今按，“令”聲之字多有圓義，豬屎形圓，故名為“零”；豬苓似之，故亦名“苓”。地烏桃，亦以形、色而言。

*Polyporus*：Poly 多+Porus 孔，因含孢子之孢子囊體有多數之開口而來。

*Umbellatus*：傘狀的，繖形狀的。

##### (四) 品種考證

豬苓首載于<本經>，列入中品。<本草經集注>云：“是楓樹苓，其皮去黑作塊，似豬屎，故以名之，肉白而實者佳，用之削去黑皮乃秤之。”<本草圖經>云：“豬苓生衡山山谷及濟陰（今山東曹縣西北）冤句（山東荷澤），今蜀州（四川崇慶）眉州（今四川眉山）亦有之。舊說是楓木苓，今則不必楓根下乃有，生土底，皮黑作塊，似豬糞。”并附有龍州（四川江油）豬苓和施州（今湖北恩施）刺豬苓圖各一幅。根据古代本草對豬苓生境和形

態的描述，如生土底，皮黑作塊，肉白而實者佳等特徵，并參考〈本草圖經〉龍州豬苓和〈綱目〉豬苓附圖，證明古本草所載之豬苓即多孔菌科多孔菌屬豬苓之菌核。

考〈本草圖經〉所載：“今施州有一種刺豬苓，蔓生，春夏採根。”及施州刺豬苓附圖，所指應為高等植物百合科土茯苓，并非豬苓。而〈植物名實圖考〉豬苓附圖所繪為高等植物，可能是豬苓生長處的樹木圖，圖中沒有將豬苓繪出。

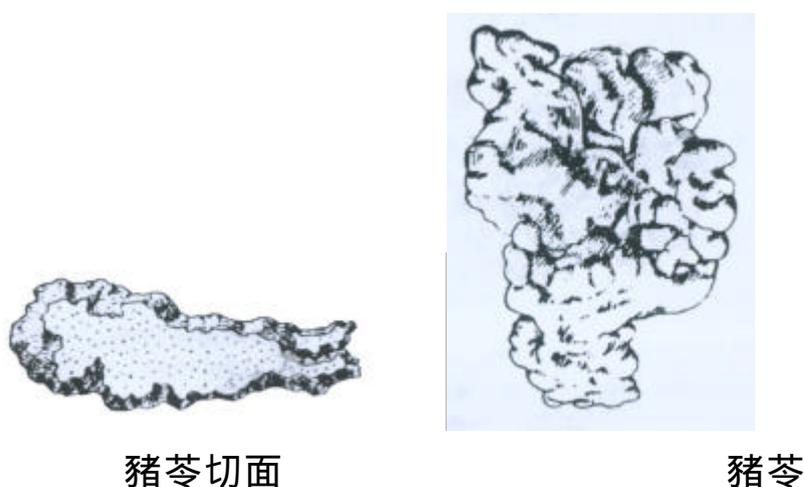


圖 2-1 豬苓及其切面圖

#### (五) 性狀

菌核形狀不規則，呈大小不一的團塊狀，堅實，表面紫黑色，有多數凹凸不平的皺紋，內部白色，大小一般為 3~5 cm × 3~20 cm。子實體從埋生于地下的菌核上發出，有柄並多次分枝，形成一叢菌蓋，總直徑可達 20 cm。菌蓋圓形，直徑 1~4 cm，中部臍狀，有淡黃色的纖維狀鱗片，近白色至淺褐色，無環紋，邊緣薄而銳，常內捲，肉質，乾後硬而脆。菌肉薄，白色。菌管長約 2 mm，與菌肉同色，下延。管口圓形至多角形，每 1 mm 間 3~4 個。孢子無色，光滑，圓筒形，一端圓形，一端有歪尖，7~10 μm × 3~4.2 μm (圖 2-1)。生于林中樹根旁地上或腐木樁旁。分布于黑龍江、吉林、遼寧、河北、山西、陝西、甘肅、河南、湖北、四川、貴州、雲南。

## (六) 藥材及產地

豬苓主產于陝西、雲南；河南、甘肅、山西、吉林、四川等地亦產。也有人工栽培，銷全國各地。

## (七) 藥材鑒別

### 1. 性狀鑒別

菌核呈不規則塊狀、條形、類圓形或扁塊狀，有的有分枝，長 5~25 cm，直徑 2~6 cm。表面黑色、灰黑色或棕黑色，皺縮或有瘤狀突起。體輕，質硬，斷面類白色或黃白色，略呈顆粒狀。氣微，味淡。以個大、外皮黑色、斷面色白、體較重者為佳。

### 2. 顯微鑒別

粉末黃白色。用斯氏液裝片可見散在的菌絲及粘結的菌絲團塊。菌絲細長，彎曲，有分枝，粗細不一，或有結節狀膨大部分，直徑 1.5~6 $\mu$ m，少數至 13 $\mu$ m，大多無色，少數黃棕色或暗棕色；棕色菌絲較粗，橫壁不明顯。草酸鈣方晶極多，大多呈正方八面體或規則的雙錐八面體，也有呈不規則多面形，直徑 3~60 $\mu$ m，長至 68 $\mu$ m，有時可見數個集結。粉末遇水合氯醛粘化成膠凍狀。

### 3. 理化鑒別

取粉末 1 g，加稀鹽酸 10 ml，置水浴上煮沸 15 min，攪拌，呈粘膠狀。另取本品粉末少量，加氫氧化鈉溶液適量，攪拌，呈懸浮狀。

## (八) 炮製

<金匱要略>：“去皮。” <雷公炮灸論>：“用銅刀削上粗皮一重，薄切，下東流水浸一夜，至明漉出，切細，以升麻葉對蒸一日出，去升麻葉，令淨，熬乾用。” <本草經集注>：“削去黑皮。” <小兒藥証直訣>：“去皮，銼。” <衛生家寶產科備要>：“剝去筋膜，洗淨。” <衛生寶鑒>：“搗，羅過用。”

< 醫宗粹言 >：“鋒刀削去黑皮，滾水泡透，用槌打實，切之成片。”現行，取原藥材，除去雜質，大小個分開，浸泡，剔淨泥沙。洗淨潤透，切厚片，乾燥。

飲片性狀：為不規則的厚片，表面類白色或黃白色，略呈顆粒狀。周邊皺縮，黑色、灰黑色或棕黑色，體輕，質韌，氣微，味淡。貯於乾燥容器內，置陰涼通風處。

### (九) 藥性

味甘、淡，性平。歸脾、腎，膀胱經。

1. < 本經 >：“味甘，平。”
2. < 吳普本草 >：“雷公：苦，無毒。”
3. < 藥性論 >：“微熱。”
4. < 珍珠囊 >：“甘、苦。陽中之陰。”
5. < 醫學啟源 >：“< 主治秘要 >云：氣味俱薄，升而微降。”
6. < 湯液本草 >：“甘苦而淡，甘重于苦。陽也。入足太陽經，少陰經。”
7. < 藥品化義 >：“入脾、膀胱二經。”
8. < 本草經解 >：“入手太陰肺經、足太陰脾經。”

### (十) 功能與主治

利水滲濕。主治小便不利，水腫脹滿，泄瀉，淋濁，帶下。

1. < 本經 >：“主痲癩，解毒，蠱疰不祥，利水道。久服輕身耐老。”

2. < 藥性論 >：“解傷寒溫疫大熱，發汗，主腫脹滿腹急痛。”
3. < 本草圖經 >：“治渴。”
4. < 珍珠囊 >：“滲泄，止渴。又治淋腫。”
5. < 醫學啟源 >：“大燥除濕。 < 主治秘要 > 云：去心中懊？。”
6. < 醫學入門·本草 >：“治中暑消渴。”
7. < 綱目 >：“開腠理，治淋、腫、腳氣，白濁，帶下，妊娠子淋，胎腫，小便不利。”
8. < 藥品化義 >：“治水瀉濕瀉。療黃疸。”

#### (十一) 應用與配伍

用于水濕諸証。豬苓之味甘淡，功專滲泄，善利小便，為治小便不利、水腫、泄瀉、淋濁、帶下所常用。治水濕內停，氣化失常，小便不利或水腫、腹水常與茯苓、澤瀉、桂枝等同用。以通陽化氣而利水，如 < 傷寒論 > 五苓散。若妊娠水腫，氣急腹脹，小便不利，常與紫蘇、木通同用，以行氣利水，如 < 聖惠方 > 豬苓散。若水熱互結，邪熱傷陰，小便不利，常與茯苓、滑石、阿膠等同用，以利水清熱養陰，如 < 傷寒論 > 豬苓湯。若濕熱下注，小便淋瀝澀痛，常與木通，梔子，車前子等同用，以清熱利濕，亦可單味應用。治濕勝泄瀉，常與茯苓、白朮、澤瀉同用，以健脾利濕，如 < 丹溪心法 > 四苓散。治溼熱下注帶下不止，常與茯苓、車前子、黃柏、茵陳同用，以清熱滲濕止帶。治形體肥實，痰濕下注，小便白濁者，常與半夏同用，以化痰利溼，如 < 丹溪心法 > 半夏丸。

#### (十二) 用法用量

內服：煎湯，10～15g；或入丸、散。

### (十三) 禁忌

無水濕者禁用，以免傷陰。

1. < 本草衍義 >：“久服必損腎氣，昏人目。”
2. < 醫學啟源 >：“比諸淡滲藥，大燥亡津液，無濕証勿服。”
3. < 醫學入門·本草 >：“有濕症而腎虛者忌。”
4. < 藥品化義 >：“凡脾虛甚者，恐泄元氣，慎之。”
5. < 藥論 >：“一曰汗多口渴者禁，以其小便長而津液之偏枯，久服喪明，多需戕腎。”

## 二、豬苓之主要成分

豬苓多糖則是豬苓的主要有效成分之一，其結構主要是以己醛糖-葡萄糖為基本單位連結的葡聚糖，連結形式含 1? 3 $\beta$ ，1? 4 $\beta$ ，1? 6 $\beta$  糖苷鍵，有較多歧鍵，支鍵點在 C3 和 C6 位上。（潘明繼，1985）

## 三、豬苓多糖之藥理作用

多糖是一類天然高分子化合物，它是由醛糖或酮糖通過甘鍵接連在一起的多聚物，多糖在自然界分布極廣，對動植物的生命極為重要，是構成生命的四大基本物質之一，而且具有多種生理活性。以前在藥物有效成分的抽取分離過程中，多糖都是作為雜質除去，沒有利用它的生理活性開發為藥品使用。

近年來，國內外對多糖的研究比較多，並與中醫藥理論相配合，有很大的進展。研究對象包括真菌類、地衣類、植物、花粉、動物，還包括多糖的分離純化、結構分析、理化性質、免疫學、藥理學以及治療應用等，特別引人注目的是多糖被認為是良好的生物效應調節物，它對各種細胞因子誘生的反應具有調節免疫功能的作用，其主要影響到網狀內皮系統、巨噬細胞、淋巴細胞、白血球以及 RNA、DNA、蛋白質的合成、cAMP 和 cGMP 的含量、抗

體的生成、補體的形成以及干擾素的誘生，還具有抗腫瘤、抗炎、抗凝血、抗病毒、抗放射、降血糖、降血脂等活性。(周寧那等，1996)

豬苓多糖之藥理作用歸納如下：(王林麗，2000)

#### 1. 利尿作用

豬苓煎劑相當於生藥 0.25 ~ 0.5 g/kg，靜脈注射或肌肉注射，對不麻醉犬具有比較明顯的利尿作用，並能促進鈉、氯、鉀等電解質的排出，可能是抑制了腎小管重吸收功能的結果。

#### 2. 抗腫瘤作用

豬苓多糖能明顯地抑制小鼠肉瘤 S180 的生長。豬苓多糖有使正常小鼠及荷瘤小鼠初期脾臟細胞的群落生成率增加的傾向。此一結果顯示豬苓多糖對正常和荷瘤初期小鼠骨髓幹細胞有保護或促進增殖的傾向，對實驗性膀胱腫瘤也有抑制作用。(新醫藥學雜誌，1979)

#### 3. 保肝作用

豬苓多糖能減輕 CCl<sub>4</sub> 對小鼠肝臟的損傷作用，呈現為肝組織病理損傷的減輕；GPT 活力下降，防止肝 6-磷酸葡萄糖磷酸酵素 (G-6-Pase) 和結合性酸性磷酸酵素活力的降低。豬苓多糖對 D-半乳糖胺誘變小鼠肝損傷也具有預防和治療效果。豬苓多糖對乳鼠肝臟生長和肝臟部分切除小鼠肝臟再生具促進作用。

#### 4. 對免疫系統的影響

豬苓水溶性抽取物及醇抽取物對小鼠的網狀內皮系統有明顯的增強作用。

#### 5. 抗輻射作用

豬苓多糖具有防治小鼠急性放射病的明顯效果。放射後給藥，不論口服或腹腔注射都有防護效價，預防的效果會比治療的效價高。豬苓多糖對於受過輻射照射小鼠的造血功能並無保護作用，不過對於輻射小鼠腎上腺皮質的應激機能確有明顯提高的現象，因此初步認為豬苓多糖的抗輻射作用可能是通過調節垂體-腎上腺系統的功能使激體處於應激狀態，從而增強了抗輻射損傷的能力。

#### 6. 抗誘變作用

張輝等利用豬苓多糖對環磷銑胺 (cyclophosphomidum cy) 誘發小鼠體內

骨髓紅細胞的微核試驗，結果顯示：豬苓多糖和 cy 同時投與所產生的微核有一定的抑制作用，能降低 cy 的致突變作用。（張輝，1993）

#### 7. 抗菌作用

豬苓的醇抽取液對金黃色葡萄球菌、大腸桿菌有抑制作用。

### 四、豬苓多糖之作用機轉

#### 1. 豬苓抑制膀胱腫瘤的機轉有以下幾種可能性：（楊德安，1991）

- (1) 提高抗體免疫力，發揮抗腫瘤作用。服用豬苓具有提高患者細胞免疫功能之效。
- (2) 豬苓能提高細胞內的 cAMP 的含量，進而抑制腫瘤的發生與發展。
- (3) 豬苓是傳統的利尿藥，尿液增多可使尿中致癌物質或促癌物質的濃度降低，並加速其排泄，進而降低膀胱腫瘤的發生率。致癌物質在腎盂、輸尿管內通過迅速，接觸時間相對較短，因而腫瘤發生的機會較少。

#### 2. Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞具有殺傷腫瘤細胞的作用，研究豬苓多糖對 LAK 細胞的誘導作用具有臨床意義。實驗結果顯示豬苓多糖可單獨誘導 LAK 細胞，因此，誘導 LAK 細胞活性，可能是豬苓多糖的重要的抑瘤機轉之一。（張昌菊，1996）

#### 3. 豬苓多糖被認為是優良的生物反應調節物，在藥物稱為生物反應調節物 (Biological Response Modifiers, BRMs) 者，其作用於免疫系統的環節有： (1) 激活巨噬細胞和嗜中性顆粒細胞 (2) 激活 natural killer (NK) 細胞 (3) 激活 T 淋巴細胞，調節 T helper (Th) 細胞和 T suppressor (Ts) 細胞的比例 (4) 提高 B 淋巴細胞的功能 (5) 誘發產生干擾素 (6) 促進產生某些細胞激活素如白血球介素。實驗證明豬苓多糖有明顯提高荷瘤小鼠抗體產生的能力，使其脾臟抗體形成細胞顯著增多，增強吞噬能力，提高荷瘤小鼠受抑制的皮膚型超敏反應，並且豬苓多糖對淋巴細胞的特化有促進作用。（王輝，1992）

### 五、豬苓之臨床應用（王林麗，2000）

#### 1. 慢性病毒性肝炎：用豬苓多糖注射液治療慢性病毒性肝炎，對改善自覺症狀 SGPT 恢復正常等驗證均有顯著性差異，對 B 型肝炎表面抗原 (HBs Ag)

及 B 型肝炎 e 抗原( HBe Ag)轉陰率達 35.4% ~38.6%。

2. 肺癌及食道癌：豬苓多糖能改善症狀、減輕化療引起的副作用，增強化療藥物的效果。
3. 尋常型銀屑病：豬苓多糖注射液治療尋常型銀屑病 59 例，結果：治療組 30 例中痊癒 5 例，顯效 8 例，有效 14 例，無效 3 例，總有效率 90%。
4. 膀胱癌：豬苓 30 g、沙苑子 15 g、山慈菇 15 g、桑寄生 30 g、白花蛇舌草 30 g，水煎服。治療膀胱癌 53 例，臨床治愈 2 例，顯效 33 例，有效 11 例，無效 7 例總有效率 86.8%，其中有效病例中有 37 例加用膀胱鏡電燒或電切。
5. 豬苓多糖與順鉑（cisplatin）配伍：王艷等研究了豬苓多糖與順鉑併用，能顯著增強順鉑對小鼠移植腫瘤 S180 肉瘤、Lewis 肺癌及 H22 肝癌的抑瘤率，與單用順鉑組比較有顯著差異，對順鉑所致小鼠白血球減少、免疫器官萎縮及巨噬細胞吞噬功能降低等副作用都有顯著效果。（王艷,1996）

## 第二節 WR-2721 之文獻探討

### 一、WR-2721 之源由

對正常組織保護的探索起源於對核子武器安全防護的需要，WR-2721(又名 amifostine 氨磷定  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{PO}_3\text{H}_2$ )為 1950 年由美國陸軍研發出來的，是用於戰場上來保護士兵的抗輻射藥物，氨基硫醇類 (sulfhydryl compounds)有四千多種，其中以 WR-2721 的毒性最小、效果最好 (Hospers,1999)。

### 二、輻射防護劑

(一) 對正常組織防護劑可分為：(陳克能與徐光燾，2000)

#### 1. 氨基硫醇類保護劑

這類化合物研究的最多也是迄今最好的保護劑，磷酸對-SH 基的覆蓋減弱了毒性，且具有選擇性保護正常組織的特點，其中又以 WR-2721 為主要代表。WR-2721 在鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 激化作用下脫去磷酸基

暴露-SH 基後產生的 WR-1065 是主要作用的成分（附圖 4）。放、化療前使用 WR-2721 可對抗胃腸壞死，腎臟、神經系統、心臟、肺臟、軟組織、肝臟及骨髓的毒性，減輕放射損傷及放射對組織的誘變和致癌作用，並且 WR-2721 也可降低化療毒性。

2. 非硫醇類保護劑，有以下數種：

- (1) 細胞因子- 白介素
- (2) 植物多糖
- (3) 前列腺素(PGE<sub>2</sub>)
- (4) 三氯乙烯碲酸鉍(AS101)
- (5) 氮氧化物
- (6) 抗氧化維生素類
- (7) 黃酮類化合物和其他植物酚類

## (二) WR-2721 之作用機轉

WR-2721 類化合物的主要作用機轉是對自由基的清除，放化療都可產生使細胞死亡、誘變、轉化和癌變的自由基。一般認為 WR-1065 的保護作用除了對 OH·自由基的清除外，Murley and Grdina (1995)認為 WR-2721 的結構和 polyamine 相似，可以穩定 DNA 損傷的部分，使其在細胞分裂前，可以有較長的時間來修復。其他的作用機轉尚包括降低氧張力，通過供氫和釋放谷胱甘月太 (glutathione, GSH) 修復損傷 DNA，WR-2721 可使小鼠骨髓細胞週期延遲以修復潛在的致死性損傷，GSH 在影響細胞對放化療敏感性方面有其重要作用。體內試驗已證明 WR-2721 的輻射保護作用與 GSH 的含量相關；WR-2721 另一作用機轉是低溫作用，給小鼠腹腔注射 525 mg/kg 的 WR-2721，30 min 後小鼠體溫從 37 降至 32，2.5 小時後降至 27，24 小時後方能恢復，而注射 200 mg/kg 的 WR-2721 時，體溫下降較小，最低至 34。(陳克能、徐光煒，2000)

WR-2721 和 WR-1065 抑制 DNA 與鉑結合而發揮作用，實驗證實正常組織可選擇性吸收 WR-2721，WR-2721 有效成分 WR-1065 在正常組織中的分布明顯高於腫瘤組織，正常組織有較多鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase)

的存在有利於 WR-2721 去磷酸化生成 WR-1065 ( 附圖 4)。另外，正常細胞對藥物的吸收是主動運輸過程，而藥物在腫瘤細胞中則是被動擴散，這些因素均能促進正常細胞對 WR-1065 的吸收；因此，WR-2721 可避免正常組織中因順鉑引起的 DNA 損傷而對腫瘤組織無此作用。( Paula *et al.*,1985、 1988 )

### 三、WR-2721 之臨床研究

WR-2721 在臨床上主要是保護正常器官以減少放療或化療引起的毒性作用，使病人得以完成療程，但對腫瘤則沒有治療防護的效果。癌症治療後誘發的第二原發癌已逐漸被重視，在治療中如何保護正常與殺滅癌組織是一樣重要，而限制癌症放、化療劑量的主要因素是正常組織對其耐受性如何。因而，尋找提高正常組織對放化療耐受的防護劑，是當今癌症研究的重要課題。

WR-2721 臨床報告頗多，例如 Liu ( 1992 )在 100 個直腸癌病人以輻射治療中，於 15 分鐘前先投予 WR-2721，以 105 天為指標分為急發型毒性反應和遲發型毒性反應，毒性反應主要看其黏膜、皮膚、腸胃道、膀胱諸器官，結果加有 WR-2721 者，對急發型毒性反應無效，對遲發型則能有意義的減少。在化療(如烷化劑類 鉑類 巨環類抗生素、紫杉醇等)前投以 WR-2721，對骨髓、腎臟、心臟、小腸和肺等很多正常組織具有保護作用且不降低抗腫瘤作用。Kemp *et al.*(1996)指出以 242 個卵巢癌病人給予 1000 mg/m<sup>2</sup> 的 cyclophosphamide 和 100 mg/m<sup>2</sup> 的 cisplatin 的療程，每 3 週 1 次，共 6 次，若前 20 分鐘給 910 mg/m<sup>2</sup> 的 WR-2721，雖然病人存活率相似( 31 個月)，卻可減低腎臟、血液、神經方面的毒性，顯示 WR-2721 對腫瘤細胞雖然沒有治療作用，但可使病人完成療程的人數增加，沒使用 WR-2721 組導致沒有繼續治療者占有 24%，使用 WR-2721 組則可降到 9%。

現 WR-2721 已在美國然正式獲准用於預防或減少以 cisplatin 治療非小細胞性肺癌、進行性卵巢癌和轉移性黑色素瘤所致腎毒性及頭頸部腫瘤患者因接受放療所致口腔乾燥症( 馬培奇，2001)。當然，有學者指出 WR-2721 是否對各種腫瘤的各種療法均有保護正常組織的作用尚待探討。

WR-2721 以注射劑使用，因 WR-2721 之水溶液不穩定，故以粉劑於 20-25 儲存，使用前以生理食鹽水新鮮配製，溶解後可於室溫放置 5 小時或於 2-8 放置 24 小時。WR-2721 在體內迅速代謝為 WR-1065，在輻射或化療投予前 30 分鐘以輸注的方式在 15 分鐘內完成，於注射後 6 分鐘內 90% 以上藥物即已由血液清除，很快被細胞組織吸收，代謝物由小便於 24 小時內排出，藥效短暫是其缺點。（Spencer and Goa,1995；耿寶琴，2000；陽莉，2001）

對一、二期癌症病人臨床試驗證明，放、化療前給予 WR-2721 其總體耐受性較好，但其一過性的副作用有噁心嘔吐、打噴嚏、面部發紅、嗜睡、低血壓、低血鈣及偶發的過敏反應，若低血壓嚴重時則需終止治療。此外，由於 WR-2721 本身的價格昂貴，使它的應用受到限制。（陳克能 徐光燁，2000）

#### 四、WR-2721 之聯合用藥

亦今尚無輻射保護作用超過 WR-2721 的藥物，因此，探討作用機轉不同、毒性不同的藥物聯用，以獲得對正常組織的最佳保護和最低毒副反應。Patchen *et al.*（1994）發現天然葡聚多糖的 DRF( drug reduction factor ) 僅為 1.2~1.3，與 WR-2721 ( 200 mg/kg ) 併用後 DRF 可達 1.5，加硒後 DRF 高達 1.64。該作者還證實給予顆粒細胞集落刺激因子 Granulocyte colony-stimulation factor (G-CSF) 後，小鼠脾臟和骨髓中被 WR-2721 保護的幹細胞和母細胞加速造血系統恢復。Ganasoundari *et al.* (1998) 發現藥用植物 *Ocimum Sanctum* 聖羅勒的葉子提取物在提高 WR-2721 對染色體保護作用的同時，避免了 WR-2721 本身對染色體的遲發型毒性。這說明某些雖然低效但無毒的保護劑與 WR-2721 併用可達到增效減毒的作用。（陳克能 徐光燁，2000）

### 第三節 抗輻射之文獻探討

#### 一、輻射的定義

放射線依其特性在生物個體之作用方式，主要可分為游離輻射(ionizing

radiation)和非游離輻射(non-ionizing radiation)兩種,前者包括 X-ray、 $\alpha$ -ray、 $\gamma$ -ray 及帶有質量的  $\beta$ -ray 與熱中子(thermoneutron)等;後者則有紫外線(UV light)、無線電波及微波,有時亦包括紅外線(infrared ray)。X-ray 及  $\gamma$ -ray 為極短的電磁波,為電磁(electromagnetic)輻射,是屬於低 LET 放射(low linear energy transfer);而  $\beta$ -ray 與熱中子,則為帶有質量的質點,為微粒性(particulate)輻射,是屬於高 LET 輻射,穿透力強。當離子化放射線碰到有機物質的大分子時,就會產生兩種不同的反應,一種為直接反應;另一種為間接反應。在直接反應上,會使核酸 DNA 分子螺旋(helix)的單股(single-strand)或雙股(double-strand)破壞(附圖 2),DNA 鹼基置換(base change)(附圖 3),二分子聚合作用(dimer formation),分子間或股間交叉鍵之形成(cross-linking)等;在間接反應上,當離子化接觸到生物體內的水分子或其它有機分子,就會產生自由基(free radicals),這些自由基可進一步作用,引發結構及體內分子包括醣類、蛋白質與脂質過氧化物的裂解,最後導致細胞溶解(cell lysis),嚴重的甚至造成生物體死亡。(Little, 2000)

## 二、抗輻射損傷之中醫機轉

從中醫的觀點,一般學者認為放射線損傷的病因主要為“熱毒過盛”,病機為熱毒蘊結陰分,脾腎造化不及,氣血受損。所採用的治法多為清熱解毒、健脾益腎和活血化癥等法:

1. 清熱解毒法:中醫認為急性放射病於變病初期表現的噁心嘔吐,倦怠、白血球一過性升高等症狀為熱毒熾盛引起,故對早期放射損傷採用清熱解毒類藥物進行治療且取得一定療效。
2. 補益氣血法:補益藥大都可以增強人體的免疫功能如淋巴細胞轉化率、白血球數量等。因此補益藥在治療放射損傷的中藥中佔有十分重要的地位。
3. 活血化癥法:放射損傷後生物體產生微循環障礙,血液濃縮黏滯性增加,血流緩慢並且周邊循環衰竭是發病的環節之一;因而用活血化癥藥來治療放射病,可改善局部及全身血液循環,減輕滲出及炎性反應。

而與之相應使用的藥物也大致為清熱解毒藥、補益藥和活血化癥藥三類。(柳紅芳, 1996)

### 三、抗輻射損傷之中藥機轉

學者們對中藥抗輻射作用的機轉一直不斷地進行研究,目前主要從以下三個方面進行：

#### 1. 對造血系統的保護：

例如人參對多種動物及人有減輕輻射損傷的作用，對造血系統有保護作用，能促進周邊血循恢復，促進造血系統功能，抑制出血傾向。

#### 2. 對免疫系統的保護作用：

例如人參抽取液能保護免疫系統，能明顯提高輻射小鼠巨噬細胞吞噬率、吞噬指數。

#### 3. 抗自由基作用：

游離輻射可使生物體產生內源性活性氧，通過間接作用產生自由基，引起強烈的脂質過氧化反應，損傷細胞的正常功能，導致嚴重的輻射傷害。許多中藥能對抗自由基的作用，如生地、南沙參多糖等。（劉青、李新芳，2001）

### 四、抗輻射有效成分與種類

每種中藥都含有十分複雜的成分，尋找中藥中的有效成分，開發適用於臨床的新藥是大家所期盼的，目前研究的有效成分有：（李翔，1999）（劉青、李新芳，2001）

#### 1. 多醣類：

從大量的實驗報告中證實：不論是植物、動物或微生物來源的多糖，都具有一定的抗輻射作用，如刺五加多糖、海帶多糖等可明顯對放射線引起的白血球降低具有提昇作用；豬苓多糖可明顯促進 Co60- $\gamma$  射線照射後細胞免疫功能的恢復，而且還可以提高輻射小鼠血漿皮質酮含量和體液免疫力。

#### 2. 香豆素類

香豆素作為輻射防護劑屬於新劑型，香豆素可以使體內 cAMP 濃度增加，

從而產生輻射防護作用；補骨脂素對輻射引起的白血球降低具有提昇作用，可以防止骨髓 DNA 的照射損傷。

### 3. 黃酮類

黃耆黃酮可以通過消除氧自由基而有抗輻射損傷的作用，能夠有效地防治輻射所致的組織細胞損傷，使照射後組織的 lipid peroxidation (LPO) 氧化產生的 malondialdehyde (MDA) 含量下降，superoxide dismutase (SOD) 的活性受到保護。

### 4. 皂類

人參皂甘是人參的主要藥理活性成分，對生物體的許多功能具有調節作用，同時也具有輻射防護功效。

### 5. 生物鹼類

駱駝蓬鹼對造血組織具有保護作用，可以顯著促進 Co<sup>60</sup>- $\gamma$  射線照射小鼠周邊血血小板 (PLT) 數和白血球 (WBC) 數的回升，可明顯提高輻射小鼠的存活率。

### 6. 多酚類

茶多酚有較強的抗氧化能力及消除自由基作用，可減輕 Co<sup>60</sup>- $\gamma$  射線輻射誘發體外細胞轉化程度，提高細胞存活率，增強細胞增殖能力。

### 7. 植物蛋白

藻藍蛋白有促進造血功能恢復的作用。

### 8. 膠原物質

鹿膠原對放射損傷所引起的骨髓抑制有保護作用和治療作用，具有調節骨髓造血功能的作用。

## 第四節 微核之文獻探討

### 一、微核 (micronuclei, MN) 之定義

微核測定是根據在細胞質內產生額外一個或多個小核的現象，來檢測理化因素誘導染色體異常的一種測試法。微核的大小約介於主核 1/5 ~ 1/20 之間，

產生的原因是在細胞有絲分裂過程中，因化學或物理性質等影響細胞核分裂，由於分裂細胞中染色體的無著絲粒斷片或環，在分裂後期停留落後下來，當有著絲粒的染色體在分裂末期有規律的進入主細胞形成主核時，落後的部分便在子細胞質內圍繞主核，形成一個或多個的微核。

微核內遺傳物質的多寡決定於染色體的分配 微核發生時細胞週期屬於何階段及微核內所包含的是染色體片段或是整條的染色體；如作用於紡錘體造成整條染色體掉落的則可以形成較大的微核，而高劑量的藥物作用也可能使染色體斷裂數增加而形成一較大的微核，因此掉落微核的大小與作用的物質不必然相關。（He *et al.*,2000；Stopper and Muller,1997 ；Matusoka *et al.*,1993 ；于慧敏，1994；薛開先，1995）

微核形成的重要性會依其形成的結果而定，若包含在微核中的染色質（chromatin）含有不活化的腫瘤抑制因子或是此微核遺失，則可能形成細胞的變性，這正是致癌基因形成的步驟；然而，若含有微核的細胞死亡或微核內的遺傳物質回復至原位置，或者是微核內的染色質有參與細胞轉錄，則微核形成的重要性即相對較小，致癌的機率減小。（Stopper and Muller,1997）。

微核和凋亡均是細胞受損傷的結果，具有不同的表現形式和結果，同時誘發凋亡與引起微核的機轉也有所不同，但在受到照射後，二者可發生在同一細胞，並都和 DNA 受損有關。當細胞發生 DNA 受損後，細胞可發生微核或凋亡，故二者必相互影響。除非照射後細胞繼續分裂，否則將不產生微核，如一旦凋亡發生，細胞將失去分裂的機會，也不會有微核形成。微核的數量會受到凋亡發生率的影響，反之亦然。（郭國禎等，2001）

## 二、輻射對微核的影響

在輻射損傷的生物學指標研究中，其生物終點歷經了遺傳和 DNA 標記的二個階段，前者主要包括淋巴細胞微核和染色體畸變等，後者則以產生於淋巴細胞 *hprt* 基因等。在動物實驗和臨床研究中，已提出許多檢測細胞的靈

敏的方法，其中微核檢測法是被廣泛應用的方法之一（彭勁松，2000）；也是目前較常用的哺乳類動物體內遺傳毒理學短期試驗。

紅血球微核可經脾臟或用其他方法從周邊血中清除，因此，以往一直認為微核不可能在小鼠等動物周邊血紅血球中聚集。1982年 Schlegel 等人證實化學誘變劑可引起周邊血紅血球微核的存在、增加和聚集。1993年 Chaubey 等人研究了 Co<sup>60</sup>- $\gamma$ 射線照射引起小鼠微核紅血球從骨髓向周邊血液遷移的規律，這為應用周邊紅血球微核研究體內遺傳損傷提供的了可能性。況且周邊網狀紅血（reticulocyte, RET）占正染紅細胞（normochromatic erythrocytes, NCE）總數的比例也可以反映外來化合物對骨髓細胞的毒性作用，與骨髓是以嗜多染紅細胞（polychromatic erythrocytes, PCE）占 NCE 之比例來觀察其毒性作用同樣甚至更靈敏。（楊占山等，2001）

### 三、微核試驗之優點

MN 法具有方法簡便、容易掌握、不受染色體數目影響等優點。並且許多研究和臨床觀察 MN 在一定範圍內能反映 chromosomal aberration (CA), 尤其在檢測輻射急性損傷時，較 CA 更為優越，而對化學誘變劑對於人群的早期監測和大量人群的篩查提供了可靠的手段。（于慧敏，1994）

近年來發展了周邊血 RET 和 NCE 的微核研究，優點是可重複採樣，自身對照，減少實驗動物數。在方法上除採樣時間適當推後 24 小時外其餘與骨髓 PCE 的微核試驗基本上相同。（The collaborative study group, 1992）

### 四、微核試驗之缺點

大多數誘癌劑可誘發微核已得到公認，微核率與患癌率有較好的相關性，但實驗數據重複性並不高，不同實驗室報導差別也大，是其缺點。

微核分析是預測細胞輻射敏感性的較好方法，但對微核分析能否預測所有細胞的輻射敏感性仍有爭論。實驗研究和臨床工作中將微核的形成是否與細

胞存活率成正相關作為判斷微核能否預測細胞輻射敏感性的標誌。有報導認為，在微核率和細胞存活率之間存在密切的定量關係，但也有相反的報導。(Crompton and Ozsahin,1997)

## 五、微核分析方法

在 1997 年於 Fourth International conference on Harmonisation (ICH4) 已通過可以採用周邊血為靶組織進行微核試驗 與周邊血 PCE 微核率再各自的峰值時點幾乎相等，只是周邊血微核率達最高值時間較骨髓晚 12-24 小時。(Tice,1990; Vanparys.1992; 宮麗崑等，2001)

在高倍顯微鏡下選擇細胞質清晰可見的範圍，微核顯定標準如下：(1)微核直徑小於或等於主核的三分之一，且與主核界線明顯 (2)微核的染色和折光性與主核相同 (3)微核一般成圓形或橢圓形。我們利用 acridine orange (AO) 來做為微核測試的染色劑，AO 是一種能與 DNA 和 RNA 特異結合的螢光染劑，它與 DNA 結合成 AO-DNA 複合物產生亮綠色螢光，與 RNA 結合成 AO-RNA 複合物產生橙紅色螢光, AO 染料所發生的螢光強度與 DNA 的含量成正比。血液中的正染紅血球 NCE 不含有任何 DNA 和 RNA 成分，因此 AO 不能與 NCE 反應，故不顯色，RET 中含有少量(約 0.5%) RNA 成分，因此 AO 能與 RET 反應，產生橙色。微核的主要成分是 DNA，AO 能與微核反應產生亮綠色螢光，這是確定微核的重要依據。所以，在 AO 染色後的血液標本中，RET 顯現出橙色，而含有微核的 RET 即是在橘色中出現綠色亮點。(附圖 6)

抑制率之計算：(The collaborative study group,1992; 王志萍等，2001)

抑制率=(陽性對照組微核數-試驗組微核數)/(陽性對照組微核數-陰性組微核數)×100%

## 第五節 氧化 DNA 傷害與突變之文獻探討

### 一、氧化 DNA 傷害簡介

大多數游離輻射或化療藥物進入體內,其本身或代謝活化成親電子的活性產物,能產生較多的 free radical 或脂質過氧化作用 (Lipid peroxidation, LPO),且與 DNA 進行共價結合生成 DNA 鍵結物(DNA adduct)。

DNA 鍵結物的形成被認為是致癌過程中最早出現的基因傷害。這種 DNA 鍵結物所造成的損傷如得不到及時修復或錯誤修復,就可能發生基因突變進而產生腫瘤。有研究指出化學物質與 DNA 鍵結的量與腫瘤發生有明顯相關(Lutz,1979),所以 DNA 鍵結物是化學物質致癌過程中的早期重要指標。

自由基可加入 DNA 的鹼基或者接受一個氫原子,而產生許多種 DNA 鹼基氧化產物。在這些 DNA 的氧化產物中,以 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)量最多(附圖 7),也因為最容易被偵測,故被研究的最多。8-OHdG 致突變性低,但如不被及時修復或修復後形成去鹼基核酸(abasic site),可能會誘發 G to T 的突變,這種突變常見於許多癌組織的致癌基因與抑制腫瘤基因(Calderon-Garciduenas *et al.*,1999; Hyun *et al.*,2000)。

脂質過氧化作用為生物體在氧化壓力產生自由基(free radical),以攻擊身體細胞上的不飽和脂肪酸(unsaturated fatty acid),因而引起連鎖性的自發性催化自由基反應(autocatalytic free radical process),而對生物體產生一種功能性的傷害細胞或組織,進一步的引起一連串的病理反應,脂質過氧化作用產物之一的丙二醛(malondialdehyde, MDA)與硫化巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)反應生成在波長 532 nm 處有最大吸收之 MDA-TBA 紅色複合物,由於 MDA 的量與吸收度成比例關係,故可由此定量來看對組織氧化傷害的程度。(附圖 8)

### 二、DNA 鍵結物研究的趨勢

現今 DNA 鍵結物研究的趨勢有(1)與醫學、生物學研究結合得日益緊密;(2)從動物或細胞體內外實驗逐漸轉向人群流行病學研究;(3)逐步從基礎

研究轉向應用研究；(4)不斷尋求測量方法的標準化和常規化，進一步提高靈敏度；(5)從外來化學物質形成鏈結物的檢測進展到對生物體內部產生自由基所致的 DNA 損傷的檢測。DNA 鏈結物除了與致突變、致畸、致癌有關外，也發現與神經系統疾病、老年病可能有關，這些發現拓寬了 DNA 鏈結物的研究領域(方清明與劉淑芬,1997)。

## 第六節 *tk* ( thymidine kinase ) 基因之文獻探討

### *tk* 基因

*tk* 基因位於體染色體上，因為突變位置不同，導致生長速度的表現也不同，第一種為 *tk* 基因突變後，細胞生長比較快之型態( *tk*-fast growing mutants ; *tk*-fast )，其所測得之突變率為點突變或小段基因缺失或嵌入；另一種 *tk* 基因突變會使 *tk* 基因的兩旁( flanking )造成缺失，使得細胞長的比較慢( *tk*-slow growing mutants ; *tk*-slow )，主要可以測得 DNA 大片段的缺失( deletion )。 *tk* 基因的突變很容易被 trifluorothymine deoxyriboside ( TFT ) 選擇性試劑所篩選。 *tk* 基因能夠測量非常廣泛的突變，包括點突變與嚴重的染色體改變或對偶基因的缺失( allele loss )，可以說是一個良好的基因指標( Honma *et al.*,1997)。(附圖 9、10)

## 第三章 材料與方法

### 第一節 微核試驗(Micronuclei test)

#### 一、體外微核試驗 (MN *in vitro*)

##### (一)材料

- 1 細胞：本實驗使用人類淋巴胚母細胞株 (human lymphoblastoid cell line ; TK6), 此細胞株購自新竹食品工業發展研究所菌種保存中心(CCRC 60107)
- 2 輻射之機型為 SL Series Linear Accelerator Operator Manual (PHILIPS UK), 由中國醫藥學院附設醫院腫瘤治療科提供, 使用條件為 6 MEV, 4 Gy/min, 標的物距離為 100 cm。
- 3 豬苓多糖：江蘇省連雲港正大天晴製藥有限公司。
- 4 WR-2721：Sigma
- 5 cyclophosphamide (CP)：Sigma

##### (二)方法：

將細胞數調到  $3 \times 10^5$ /ml, 取 4 ml 的細胞放於 6 well plate 中, 取適量的豬苓多糖溶液, 加至細胞中 30 分鐘後, 經 1.5 Gy 游離輻射或加入大鼠肝微粒體酵素代謝活化系統(S9)及適量的 CP 劑量, 暴露 30 分鐘後以 1100 rpm 轉速離心 5 分鐘, 將 PUPs 及 CP 除去後, 再加入 complete medium (8 % horse serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin /streptomycin, HEPES buffer 及 RPMI-1640), 放入 incubator 中培養 24 h 後, 將細胞數調整維持在  $2.5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ , 再經 24 小時, 計算各條件的細胞數, 將每一個 well 中的細胞以 1100 rpm 轉速離心 5 分鐘, 將離心沉澱後的細胞用 pipettment 吸取到乾淨的玻片上, 自然風乾, 再用甲醇固定 10 分鐘, 用 0.3 mg/ml 的 AO 試劑染色, 蓋上載玻片, 短時間內計數完微核。(Zhang LS, 1995), 計數片子採雙盲測試, 每次計數 2000 顆 RETs。

抑制率之計算：

抑制率=(陽性對照組微核數-試驗組微核數)/(陽性對照組微核數-陰性組微核數)×100%

## 二、體內微核分析 (MN *in vivo*)

### (一) 材料

動物以 ICR 公鼠，週齡 6~8 週，體重 28~36 g，由台大動物中心或國科會提供，其飼養條件為 12:12 小時的光亮與黑暗，飲用水為 Milli-Q 水，飲水及飼料皆在充足的情況下。

### (二) 游離輻射或 CP 給藥

將 ICR 公鼠隨機分配，採用一次腹腔注射 (沈其萍, 2000)，分別注射適量劑量的 PUPs，對照組由腹腔注射 Milli-Q 無菌水；30 分鐘後給予 6 Gy 的游離輻射或是適量的 CP，並於給藥後 48 小時採鼠尾血約 10 $\mu$ l 滴於覆有 AO 的玻片上，每隻老鼠重複採血兩片，放入 4℃，4 小時後再計數微核數 (Kondo and Ozawa, 1992)，計數片子採雙盲測試，每次計數 2000 顆 RETs。

## 第二節 DNA 鍵結物(DNA adduct)：8-OHdG 之定量

### (一) 材料

將輻射照射的老鼠於採血後犧牲，取肝臟放於-80℃ 保存。

### (二) DNA 的萃取

將每 1 g 組織平均磨碎於 10 ml phosphate-buffered saline (PBS) 中，以 4℃、3200 rpm 轉速離心 15 分鐘，可得到含有細胞核的 pellet，將 pellet 均勻溶於 10 ml 1x lysis buffer 【1% sodium dodecyl sulphate SDS、25 mM EDTA、10 mM Tris (pH8.0)、75 mM NaCl】，加入 5 mg (250  $\mu$ l) 蛋白質分解酵素 K，再加 50  $\mu$ l BHT 溶液 (butylated hydroxytoluene 20mg/ml 溶於異丙醇)，維持

在 37 °C 一晚上。加入等體積的酚：氯仿：異戊醇 = 25：24：1，萃取 3 分鐘，以 3200 rpm 的轉速離心 10 分鐘。重複前面萃取步驟，取上清液以等體積的氯仿再萃取 3 分鐘，以 3200 rpm 的轉速離心 10 分鐘。取上清液加入 0.1 倍體積的 3 M 醋酸鈉 (pH=5.5) 和 2 倍體積的 95% 冰乙醇，使核酸沈澱，保存在 -20 °C。用冰的 70% 乙醇洗去醋酸鈉並且 spool DNA 和清洗。使 DNA 均勻溶在 10 mM 的 Tris. HCl buffer (pH=7.4) 3 ml 中，反應一晚上。加入 300 μg (6 μl) RNase A 和 150 U (15 μl) RNase T<sub>1</sub>，且在 37 °C 下反應一小時。以等體積的氯仿萃取，除去 RNase A 和 RNase T<sub>1</sub>，離心 10 分鐘。收集上清液，且重複沉澱和洗清的步驟。將 DNA 放於 3 ml 的 HPLC 滅菌水中且保存於 -20 °C 的冰箱。

### (三) 高壓液相層析儀加電化偵測儀 (HPLC/ECD) 的測量

將萃取的 DNA，以高壓液相層析儀加電化偵測儀 (HPLC/ECD) 來分析 8-OHdG 之量。HPLC 先以 10% methanol water，以每分鐘 0.8 ml 的速率來洗脫，再換為 50 mM CH<sub>3</sub>COONa 為 mobile phase。取 1 pmole、2 pmole、6 pmole、18 pmole、54 pmole、108 pmole 的 50 μl 8-OHdG standard 和 10 nmole、25 nmole、50 nmole、100 nmole、250 nmole 的 dG standard，分別注射到 C18 5U column，畫出 8-OHdG standard curve 及 dG standard curve 檢量線圖。再分別取 50 μl 的 DNA 水解物注射到 C18 5U column，以 HPLC-ECD 及 UV detector 檢測，利用每 10<sup>6</sup> 個 dG 含多少 8-OHdG 來表示。

## 第三節 脂質過氧化物 (LPO) 的定量

### (一) 材料

將輻射照射的老鼠於採血後犧牲，取肝臟放於 -80 °C 保存。

### (二) 方法

取 liver 約 200 mg 加入 2 ml 的 1.15% KCl，在冰浴中平均磨碎，研磨 15 min，休息 15 min，共 5 次，以 4 °C、3000 rpm 轉速離心 5 分鐘，用 pipetment

沖吸均勻後再吸取上清液 0.2 ml，依順序加入 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) 0.2 ml H<sub>2</sub>O 0.6 ml Acetic acid (20%) 1.5 ml 0.8% thio-barbituric acid (TBA) 1.5 ml，調整體積至 4 ml，搖勻，於 100 °C 水浴反應 1 小時，沖水冷卻，加入 1 ml H<sub>2</sub>O 使體積至 5 ml，加入 4 ml n-butanol /pyridine (15:1)，調整體積至 9 ml，搖勻，以 2500、3000 rpm 轉速離心 15 分鐘，取上清液 1ml 放入拋棄式的測量管中，以分光光度儀測量 OD (532 nm)。

#### 第四節 *tk* 基因突變率測試

##### (一) 材料

1. 本實驗使用人類淋巴胚母細胞株 (human lymphoblastoid cell line ; TK6)
2. 豬苓多糖或WR-2721給藥：將30 µg/ml、100 µg/ml、300 µg/ml PUPs或300 µg/ml WR-2721加入 TK6 細胞中，經30分鐘後，以1.5 Gy之游離輻射照射，隨即離心去除PUP和WR-2721。

##### (二) 細胞群落生成率 (plating efficiency, PE)的計算法

將細胞轉植到96 well plate (2 cell/well/150µ細胞培養液)中，置於5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恆溫培養相中培養。經12-15 天培養，計算細胞生長結果，可以得到未添加TFT選擇性試劑之PE。

##### (三) 突變率 (mutant frequency, MF)的測試

將細胞接種到 96 well plate (20000 cell/well/150µl 細胞培養液)中，此細胞培養液中含有 1µg/ml trifluorothymidine (TFT)之選擇性試劑，可以有效篩選 *tk-fast* 基因突變率，將培養盤置於 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恆溫培養相中培養。經 10 天培養，計算細胞生長結果，利用 PE 的算法，可以得到添加 TFT 選擇性試劑之 PE，即可得到 *tk-fast* 基因的細胞突變率，經 10 天後，再加入 1µg/ml TFT 之選擇性試劑，即可得到 *tk-slow* 基因突變率。

#### (四) 計算公式

a. 細胞的群落生成率 (plating efficiency, PE)

PE =  $(-\ln[p(0)])$ /原先加入well內的細胞數

$p(0) = (\text{total well數} - \text{有細胞群落的well數})/\text{total well數}$

b. 細胞突變率 (mutant frequency, MF)

MF = PE in TFT/PE without TFT

PE in TFT : 有添加 TFT 的plate所計算出的PE

PE without TFT : 沒有添加 TFT 的plate所計算出的PE

### 第五節 統計分析方法

利用 Student *t*-test 方法來分析。Student *t*-test 主要是在分析兩組間的差異性，*p* 值小於 0.05 表示有統計上的意義。

## 第四章 結果

### 第一節 豬苓多糖對輻射誘發 TK6 細胞微核之劑量反應關係

豬苓多糖給藥劑量對於輻射後 TK6 細胞微核產生的影響，其結果見表 4-1 所示。本實驗使用人類淋巴胚母細胞株（human lymphoblastoid cell line；TK6），分別給予 300  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ 、30  $\mu\text{g/ml}$  劑量的 PUPs，30 分鐘後照射 1.5 Gy 的游離輻射，48 小時後製片、計數微核，其中 30  $\mu\text{g/ml}$  的 PUPs 劑量對陽性對照組微核率並無明顯下降，因此對細胞無明顯保護作用；100  $\mu\text{g/ml}$  的 PUPs 劑量經游離輻射後和陽性對照組比較微核生成率則有意義的下降，但以 300  $\mu\text{g/ml}$  的 PUPs 劑量對微核產生的抑制作用達到高峰，其抑制率達 46.2 %；三者對微核產生的抑制率並呈現劑量反應關係，從實驗可知 PUPs 在體外實驗對輻射有明顯的染色體保護作用。

表 4-1 豬苓多糖對輻射誘發 TK6 細胞微核之劑量反應關係

Group	MN/2000 cells	Inhibition ratio# (%)
(1) Control	8.3 $\pm$ 2.7	--
(2) 1.5 Gy	64.8 $\pm$ 13.2	0.0
(3) PUPs 300 $\mu\text{g/ml}$ + 1.5 Gy	38.7 $\pm$ 8.2*	46.2
(4) PUPs 100 $\mu\text{g/ml}$ + 1.5 Gy	51.4 $\pm$ 10.2*	23.7
(5) PUPs 30 $\mu\text{g/ml}$ + 1.5 Gy	58.1 $\pm$ 13.8	11.9

PUPs: *Polyporus umbellatus* polysaccharides; MN: micronuclei

\*Significantly different from 1.5 Gy (at  $p < 0.05$ )

#Inhibition ratio = (MN in irradiated group) - (MN in PUPs-pretreated irradiated group) / (MN in irradiated group) - (MN in control group)

n = 6~8 from three independent experiments.

## 第二節 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞微核之試驗

豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射細胞微核產生的影響，如表 4-2 所示。本實驗分成二個部分來看，首先觀察 PUPs 單獨或併用 WR-2721 對細胞的染色體損傷如何，微核數和陰性對照組比較稍微升高；單獨或併用 WR-2721，30 分鐘後照射 1.5 Gy 的游離輻射，48 小時後製片、計數微核，和陽性對照組比較，三者均有意義的降低微核生成率，可見 PUPs 和 WR-2721 對游離輻射的防護效果相當，惟兩者併用未能有相加效果。

表 4-2 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞微核之試驗

Group	MN/ 2000 cells	Inhibited ratio(%)
(1) Control	6.6 ± 0.9 <sup>2345678</sup>	--
(2) 1.5 Gy	67.9 ± 4.0 <sup>1345678</sup>	0.0
(3) PUPs 300µg/ml	15.5 ± 1.8 <sup>1245678</sup>	--
(4) WR-2721 300µg/ml	9.3 ± 0.6 <sup>1235678</sup>	--
(5) PUPs 300µg/ml+WR-2721 300µg/ml	11.8 ± 1.3 <sup>1234678</sup>	--
(6) PUPs 300µg/ml+1.5 Gy	40.0 ± 9.3 <sup>12345</sup>	45.5
(7) WR-2721 300µg/ml +1.5 Gy	44.4 ± 2.3 <sup>12345</sup>	38.3
(8) PUPs 300µg/ml + WR-2721 300µg/ml +1.5 Gy	44.9 ± 2.9 <sup>12345</sup>	37.5

Abbreviations for tables: PUPs, *Polyporus umbellatus* polysaccharides

Statistically significantly different (at p<0.05) from (1) group1, (2) group 2, (3) group 3, (4) group 4, (5) group 5, (6) group 6, (7) group 7, (8) group 8, differences within each group: statistically significantly different (at p< 0.05) from the value of TK6 cells, n= 3~6

### 第三節 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞的細胞毒性影響

豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發細胞毒性的影響，如表 4-3 所示。300  $\mu\text{g/ml}$  的 WR-2721 單獨或併用 300  $\mu\text{g/ml}$  劑量的 PUPs 由細胞群落生成率 (plating efficiency, PE) 來觀察，在統計上均有意義的拮抗輻射所造成的細胞毒性，然其差異不大；但是 PUPs 的 PE 和相對存活率並未增加，表示細胞受游離輻射前，雖然給予 PUPs 仍未能受到良好防護，因此 PUPs 對 TK6 細胞毒性的防護作用並不明顯，而 WR-2721 的 PE 值雖然上升，但對陽性對照組來說並不顯著，實驗流程如附圖 10。

表 4-3 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞的細胞毒性影響

Group	Plating efficiency(%)	Relative survival(%)
(1) Control	72.0 $\pm$ 7.3	100.0
(2) 1.5 Gy	6.8 $\pm$ 1.4	9.4
(3) PUPs 30 $\mu\text{g/ml}$ +1.5 Gy	6.1 $\pm$ 1.2	8.5
(4) PUPs 100 $\mu\text{g/ml}$ +1.5 Gy	6.2 $\pm$ 2.1	8.6
(5) PUPs 300 $\mu\text{g/ml}$ +1.5 Gy	6.9 $\pm$ 1.5	9.6
(6) WR-2721 300 $\mu\text{g/ml}$ +1.5 Gy	8.7 $\pm$ 1.7*	12.1
(7) PUPs 300 $\mu\text{g/ml}$ + WR-2721 300 $\mu\text{g/ml}$ +1.5 Gy	8.3 $\pm$ 1.5*	11.5

Abbreviations for tables: PUPs, *Polyporus umbellatus* polysaccharides

\*Statistically significantly difference (at  $P < 0.05$ ) from X-ray group. n= 7~10

#### 第四節 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞的 *tk* 基因突變率的影響

以 TK6 細胞依附圖 10 之實驗流程，取 30  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ 、300  $\mu\text{g/ml}$  的 PUPs 三種不同的劑量濃度和 300  $\mu\text{g/ml}$  的 WR-2721 比較，測試是否可以降低輻射所造成的基因傷害。在陰性對照組(純給水組)方面，其突變率為  $4.2 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ ，再給予輻射劑量 1.5 Gy 後，輻射組為  $25.7 \pm 2.5 \times 10^{-6}$ ，而投藥組 30  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ 、300  $\mu\text{g/ml}$  的 PUPs 突變率分別為  $18.9 \pm 4 \times 10^{-6}$ 、 $14.8 \pm 1.4 \times 10^{-6}$  和  $17.5 \pm 3.4 \times 10^{-6}$ ，因此從圖 4-1 中我們可以看出：在不同劑量下的豬苓多糖，都能有效地降低輻射所造成的基因傷害，然 WR-2721 則沒有保護效果。

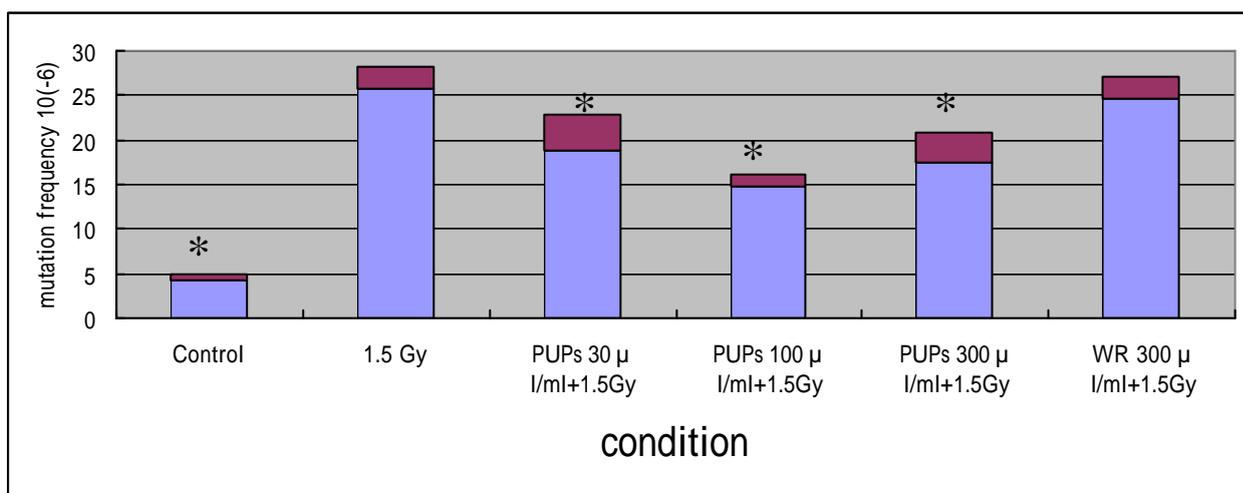


圖 4-1 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發 TK6 細胞的 *tk* 基因突變率的影響

\*Statistically significantly different (at  $p < 0.05$ ) from 1.5 Gy irradiated group,  $n = 3-5$  replicates from two independent experiments.

\*Abbreviations for tables: PUPs: *Polyporus umbellatus* polysaccharides ;WR: WR-2721

## 第五節 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對老鼠的遺傳毒性試驗

為了了解 PUPs 單獨或併用 WR-2721 本身對老鼠是否具有致突變性，我們分別給與老鼠 50 mg/Kg 及 250 mg/Kg 劑量的 PUPs 單獨或併用 200 mg/kg、400mg/kg 劑量的 WR-2721，48 小時後採血、製片、計數微核，和陰性對照組比較，並無明顯差異，表示兩者在此一劑量下無遺傳毒性。如表 4-4 所示。

表 4-4 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對老鼠的遺傳毒性試驗

Group	MNRET/1000RETs	RETs/NCEs
(1) Control	1.9 ± 0.9	7.0 ± 1.7
(2) 6 Gy	38.6 ± 8.7	0.6 ± 0.4
(3) PUPs 50 mg/kg	1.9 ± 0.8	5.9 ± 1.9
(4) PUPs 250 mg/kg	2.5 ± 1.4	7.9 ± 1.4
(5) WR-2721 200 mg/kg	2.4 ± 1.8	6.8 ± 1.0
(6) WR-2721 400 mg/kg	3.0 ± 0.7	5.4 ± 1.3
(7) PUPs 50 mg/kg+WR-2721 200 mg/kg	1.8 ± 1.6	5.7 ± 2.7

Abbreviations for table: PUPs, *Polyporus umbellatus* polysaccharides ; MNRETs: micronucleated reticulocytes ; RETs: reticulocytes ; NCEs: normochromatic erythrocytes.

n= 6 except WR-2721 400 mg/kg group.

## 第六節 豬苓多糖給藥時間對輻射誘發老鼠周邊血微核之影響

實驗小鼠於輻射後 24、48 及 72 小時採血，進行周邊血的微核測試，其結果發現在 48 小時微核產生率最高，因此使用 48 小時做為輻射後的時間點。

豬苓多糖給藥時間對於游離輻射後微核率的影響，其結果見表 4-5 所示。在豬苓多糖一次 ip 後再給予 6 Gy 的游離照射劑量，給藥後 0 分及 15 分鐘時，其微核率相對於陽性對照組並無明顯的下降，即對於微核的產生則較無明顯的抑制作用，若是輻射前 30 分鐘給藥，PUPs 對於微核產生的抑制作用達到高峰，於 45 分鐘時，微核率又從 30 分鐘時的 23.5/1000 RETs 漸漸上升為 30.4/1000 RETs，可見輻射前 30 分鐘給藥的時間點是抑制的高峰。PUPs 對於輻射誘發微核產生的抑制率也達到 41.1% 的能力，因此豬苓多糖對於游離輻射導致的染色體傷害有明顯的保護作用。

表 4-5 豬苓多糖給藥時間對輻射誘發老鼠周邊血微核之影響

Group	MNRET/1000RETs	Inhibition ratio# (%)	RETs/NCEs
(1) Control	1.9 ± 0.9 <sup>24567</sup>	--	7.0 ± 1.7
(2) 6 Gy	38.6 ± 8.7 <sup>13567</sup>	0.0	0.6 ± 0.4
(3) PUPs	1.9 ± 0.8 <sup>24567</sup>	--	5.9 ± 1.9
(4) PUPs-0min+ 6 Gy	35.2 ± 5.0 <sup>1367</sup>	9.3	0.6 ± 0.1
(5) PUPs-15min+ 6 Gy	32.7 ± 5.7 <sup>1236</sup>	16.1	0.6 ± 0.5
(6) PUPs-30min+ 6 Gy	23.5 ± 7.4 <sup>123457</sup>	41.1	0.5 ± 0.4
(7) PUPs-45min+ 6 Gy	30.4 ± 3.7 <sup>12346</sup>	22.3	0.3 ± 0.1

MNRETs: micronucleated reticulocytes; RETs: reticulocytes ; NCEs: normochromatic erythrocytes ; PUPs: 50 mg/kg of *Polyporus umbellatus* polysaccharides.

Differences within each group: significant different (at p<0.05) from (1) group 1, (2) group 2, (3) group 3, (4) group 4, (5) group 5, (6) group 6, (7) group 7

n= 6~8 from four independent experiments.

# Inhibition ratio = (MNRETs in irradiated group) – (MNRETs in PUPs-pretreated irradiated group) / (MNRETs in irradiated group) – (MNRETs in control group)

## 第七節 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發老鼠周邊血微核之試驗

將 PUPs 單獨或併用 WR-2721 在一次 ip 後再給予 6 Gy 的游離照射劑量，和陽性對照組比較，微核生成率則有意義的下降，其中以 PUPs 單獨使對微核的抑制作用效果最好，抑制率可達 47.1 %，且與 WR-2721 組相比較有統計上顯著的差異。如表 4-6 所示。

表 4-6 豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射誘發老鼠周邊血微核之試驗

Group	MNRET/1000RETs	Inhibited ratio(%)	RETs/NCEs
(1) Control	2.1 ± 0.5 <sup>2345</sup>	--	7.0 ± 0.7
(2) 6 Gy	59.4 ± 3.7 <sup>1345</sup>	0.0	0.6 ± 0.4
(3) PUPs 50 mg/kg+6 Gy	32.4 ± 9.7 <sup>124</sup>	47.1	0.6 ± 0.1
(4) WR-2721 200 mg/kg+ 6 Gy	47.1 ± 7.2 <sup>1235</sup>	21.5	0.6 ± 0.5
(5) PUPs 50 mg/kg+WR 200 mg/kg+6 Gy	38.3 ± 5.2 <sup>124</sup>	36.8	0.5 ± 0.4

Abbreviations for tables: PUPs, *Polyporus umbellatus* polysaccharides

Statistically significantly different (at p<0.05) from (1) group1, (2) group 2, (3) group 3, (4) group 4, (5) group 5, (6) group 6, (7) group 7, (8) group 8, differences within each group: statistically significantly different (at p< 0.05) from the value of peripheral blood, n= 8~10

## 第八節 豬苓多糖對 CP 誘發 TK6 細胞的微核試驗

實驗中均加入 S9，S9 為肝臟萃取物，可將 CP 活化，CP 雖為強的致突變劑，但須經肝細胞 p450 活化才能與 DNA 反應；實驗開始我們先作 CP 的劑量反應關係，以 80 $\mu$ g/ml 與 120  $\mu$ g/ml 的 CP 劑量引發的微核生成率與陰性對照組比較有明顯的差異，且 120 $\mu$ g/ml 明顯比 80 $\mu$ g/ml 誘發較高的微核。於表 4-2 結果得知 300  $\mu$ g/ml 的 PUPs 能有意義降低游離輻射誘發的微核生成率，所以將 PUPs 和 120  $\mu$ g/ml 劑量的 CP 合用，結果發現 PUPs 對化療藥物誘發的染色體的保護作用也良好，在統計上能有意義的降低微核數，其抑制率達 42.1 %。如表 4-7 所示。

表 4-7 豬苓多糖對 CP 誘發 TK6 細胞的微核試驗

Group	MN /2000 cells	Inhibited ratio(%)
(1) Control	7.3 $\pm$ 0.4	-
(2) CP 80 ug/ml +S9	10.8 $\pm$ 0.4	-
(3) CP 120 ug/ml +S9	22.0 $\pm$ 0.4	0.0
(4) PUPs 300g/ml+CP 120 ug/ml +S9	15.8 $\pm$ 0.8*	42.1

\*Statistically significantly different (at  $p < 0.05$ ) from CP group,  $n = 2-3$  replicates from two independent experiments.

Abbreviations for tables: PUPs: *Polyporus umbellatus* polysaccharides ;  
CP: cyclophosphamide

## 第九節 豬苓多糖對 CP 誘發老鼠周邊血微核的試驗

如表 4-8 所示。實驗結果和陰性對照組比較，50mg/Kg 的 CP 會使微核明顯增加，而 50mg/Kg 的 PUPs 由微核數知其無毒性；PUPs 分別給予 4.0 mg/Kg、12.5 mg/Kg、50 mg/Kg，再暴露於 50 mg/Kg CP 下，其中以 4.0 mg/Kg、12.5 mg/Kg 對 CP 所導致的微核增加並無降低作用，而 PUPs 50 mg/Kg 則能明顯有意義的降低微核數，且其抑制率可達 48.7%，可知 PUPs 對 CP 於老鼠體內誘發的染色體損傷仍具有良好的保護作用。

表 4-8 豬苓多糖對 CP 誘發老鼠周邊血微核的試驗

Group	MNRET/1000RETs	Inhibited ratio(%)	RETs/NCEs
(1) Control	2.1 ±0.7	--	6.8 ±2.3
(2) CP 50 mg/kg	30.0 ±5.7	0.0	2.3 ±0.7
(3) PUPs 50mg/kg	1.9 ±0.8	--	5.9 ±1.9
(4) PUPs 4mg/kg + CP 50 mg/kg	27.3 ±1.8	9.8	2.0 ±0.1
(5) PUPs 12.5mg/kg + CP 50 mg/kg	23.5 ±6.1	23.3	3.7 ±2.2
(6) PUPs 50mg/kg + CP 50 mg/kg	16.4 ±7.1*	48.7	1.6 ±0.7

Abbreviations for tables: PUPs, *Polyporus umbellatus* polysaccharides;  
CP, cyclophosphamide

\*Statistically significantly difference (at p<0.05) from CP group, n= 6~7 from four independent experiments.

## 第十節 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發氧化 DNA 傷害的影響

ICR 老鼠給以 50 mg/Kg 劑量的 PUPs 或 200 mg/kg 劑量的 WR-2721, 以 6 Gy 的游離輻射照射, 48 小時後犧牲老鼠取出肝臟, 抽取 DNA, 以 HPLC/ECD 來測量 8-OHdG 值, 如圖 4-2 所示。陽性對照組可誘發 8-OHdG 的增加, 而 PUPs 或 WR-2721 均能有意義的降低 8-OHdG 值, 由圖 4-2 看出 WR-2721 效果更好。

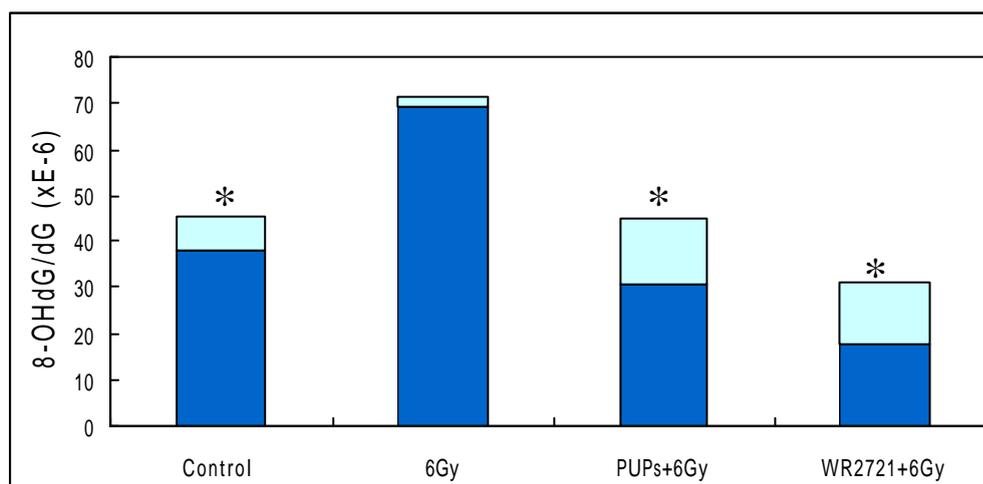


圖 4-2 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射誘發氧化 DNA 傷害的影響

\*Statistically significantly different (at  $p < 0.05$ ) from 6 Gy irradiated group,  $n = 3$  replicates from two independent experiments

Abbreviations: PUPs: *Polyporus umbellatus* polysaccharides; WR, WR-2721

## 第十一節 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射老鼠脂質过氧化物的影響

豬苓多糖和 WR-2721 對脂質过氧化物的影響，如表 4-9 所示。ICR 老鼠給以 50 mg/Kg 劑量的 PUPs 單獨或併用 200 mg/kg 劑量的 WR-2721, 以 6 Gy 的游離輻射照射，48 小時後犧牲老鼠取出肝臟，PUPs 和 WR-2721 對游離輻射後所誘發的脂質过氧化物的增加，和陽性對照組比較，均有下降的趨勢，尤其 PUPs 降低輻射誘發 LPO 作用非常明顯 ( $p < 0.005$ )，其降低脂質过氧化物的效果亦較 WR-2721 為佳，可見在抗脂質過氧化物產生的機轉上，PUPs 在統計上能非常有意義的抑制。

表 4-9 豬苓多糖和 WR-2721 對輻射老鼠脂質过氧化物的影響

Group	Liver peroxide level (nmol/g)
(1) Control	90.6 ± 17.4 <sup>2</sup>
(2) 6Gy	123.3 ± 23.1 <sup>134</sup>
(3) PUPs 50mg/kg+ 6Gy	78.7 ± 11.5 <sup>24</sup>
(4) WR-2721 200mg/kg+ 6Gy	95.8 ± 13.6 <sup>23</sup>

Abbreviations for tables: PUPs, *Polyporus umbellatus* polysaccharides

Statistically significantly different (at  $p < 0.05$ ) from (1) group1, (2) group 2, (3) group 3, (4) group 4, n= 4~7

## 第五章 討論

### 第一節 豬苓多糖之輻射防護作用

#### 一、WR-2721 之應用

於癌症病人以輻射或化療藥物治療中，加用防護劑來輔助，不只可以增進治療的成效，也可以降低輻射及化療所引起的副作用如突變和二次致癌的危險性，WR-2721 是大家熟悉的輻射防護劑，於第二次世界大戰時由美國陸軍研發出來為了保護戰場上的士兵，根據研究指出 WR-2721 可以保護正常組織免於輻射或化療藥物所導致的細胞毒害，但 WR-2721 有低血壓( 57% )、面潮紅( 39% )、打噴嚏( 29% )、噁心( 11% )和惡寒( 4% )的副作用；WR-2721 的給藥方式一般在輻射或化療投予前 30 分鐘以輸注的方式在 15 分鐘內完成，由此可知其藥效短暫，使用上也不方便( Hospers,1999 )，所以在臨床使用有一定的限制；目前已找出一些毒性較小的輻射防護劑 *Ocimum sanctum* ( Ganasoundari *et al.*,1998 )， $\beta$ -carotene ( El-Habit *et al.*,2000 )，Geniposide ( Hsu *et al.*,1997 )，flavonoids ( Shimoi *et al.*,1994 ) 和 polysaccharides ( Patchen *et al.*,1992 ) 等來輔助或替代 WR-2721 以減低病人的不適感，而豬苓多糖的著力點也在此。

WR-2721 在鹼性磷酸酵素( alkaline phosphatase ) 存在下產生去磷酸化作用而成游離硫羰基 ( thiol- ) 的活性成分 WR-1065，其防護作用機制如捕捉自由基、以氫離子的轉移來修補 DNA 上之 free radical、WR-2721 本身去磷酸產生 WR-1065，再經氧化作用形成雙硫化合物( disulfide ) ( 附圖 4 )，同時消耗掉氧( Trestses *et al.*,1991 )，而且雙硫化合物和 DNA 結合後可穩定 DNA 和抑制 DNA 的複製，藉此來延長 DNA 的修復時間( Geraldine *et al.*,1988 )，而豬苓多糖的作用機轉是否如此，則有待進一步的探討。

以  $^{35}\text{S}$  radiolabeled 之 WR-2721 來研究，知其在正常細胞中含量較高，由於(1)正常組織細胞膜表面有較多的的鹼性磷酸酵素(較癌細胞高 275 倍)；

(2)正常組織周圍的中性 pH 值有利於鹼性磷酸酵素發揮作用(腫瘤組織的 pH 值偏酸性); (3) WR-1065 能通過主動運輸進入正常細胞, 故知 WR-2721 可保護非腫瘤組織免於放療或化療的毒性作用, 由以上原因得知 WR-2721 不會影響治療的效果, 同時臨床試驗顯示類似的結果。(Washburn, 1974; Utley *et al.*, 1976; Geraldine *et al.*, 1988) 由 Kemp (1996)、Liu (1992) 之臨床實驗知 WR-2721 對腫瘤細胞雖沒有保護作用, 但可保護正常細胞減少輻射或化療產生之毒性, 例如腎毒性、神經方面的毒性等, 病人在治療過程之不適感和排斥感可以減低, 如此可以提高治療的意願, 使完成療程的人數得以增加, 換個角度來看, 這也是達到防護的目的, 豬苓在臨床防護上的作用似乎和 WR-2721 扮演著類似的角色。

WR-2721 在體內代謝為活性的 WR-1065, 具有防護作用, 根據報告 WR-2721 在體外實驗無論有無代謝活化系統 S9 存在, 其染色體損傷均在正常範圍內(辛力, 2001), 所以我們將 WR-2721 用於體外試驗是可行的。

研究報告得知 WR-2721 併用 glycan 或硒 (Se) 等有相加的效果 (additive effect); 而以 WR-2721 和 Prostaglandin E2 (PGE-2) 併用或 WR-2721 和 5-hydroxytryptamin (5-HT) 併用的效果最佳, 具有協同作用 (Synergistic effect) (Maisin, 1993)。目前的研究多從老鼠的腸粘膜 (Hanson, 1987)、頭髮損傷 (Malkinson *et al.*, 1993)、皮膚方面 (He and Lim, 1991) 之防護著手。本實驗是採用 WR-2721 常用的劑量和豬苓多糖單獨使用最有效的劑量合併使用, 雖然實驗結果如體外體內微核試驗與氧化傷害試驗數值均有意義的降低, 但是並不如預期有相加或更好的效果, 似乎應再探討不同劑量組合和併用時間點等的各種條件, 以找出理想的配對組合。

## 二、豬苓多糖之應

目前具抗輻射作用的中草藥如人參 (*panax ginseng*) (Kim *et al.*, 2001), 聖羅勒 (*Ocimum sanctum*) (Uma Devi, 2001), 靈芝 (*Ganoderma lucidum*) (Kim, 1999), 雲芝 (*Coriolus versicolor*) (Lin *et al.*, 1996), 枸杞 (*Lycium chinense*) (Hsu *et al.*, 1999), 桃仁 (*prunus persica*) (Kim *et al.*, 2000) 等雖見報導, 但多從存

活率著手,本實驗試著豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 由染色體損傷微核生成率之降低、*tk* 基因突變率之降低, 氧化 DNA 傷害所產生之 8-OHdG、LPO 之降低,來看豬苓對細胞的保護程度而推知其對輻射及化療之防護成效良好

關於臨床應用方面,豬苓多糖併用輻射治療肺癌等章榮烈教授的報告,均未為正式發表,報告指出其能使體重增加,血紅素維持正常,病人不致因放療後呈現白血球及血小板下降而中斷治療;也見豬苓多糖併用 CP 治療肺癌的病例,可使病人精神體力明顯好轉,食量增加,肺癌症狀如胸痛、咳嗽、發燒等症狀獲得不同程度的改善;食道癌病人以豬苓多糖併用 CP 治療,使病人胸骨後疼痛、進食後的嘔吐、進食時噎哽、體力衰弱的症狀改善;豬苓多糖併用輻射及化療的病例報告不多,在臨床上的療效評估也是一個可進行的目標。

另外,臨床上,豬苓多糖以肌肉注射使用在肝炎、肝癌、肺癌、膀胱癌、白血病等的報告居多,也有報導以豬苓提取物經口服給藥也可達一定效果;在台灣,臨床使用上以豬苓飲片為主,似乎可發展為使用豬苓多糖之提取物口服給藥,設計單獨使用或併用 WR-2721 對輻射和化療藥物的防護來評估其臨床效用如何,並和實驗結果來對照。我們的實驗均以豬苓多糖腹腔注射給藥,配合臨床也將進一步探討口服給藥的實驗結果。

如今知豬苓多糖其抗輻射作用不亞於 WR-2721,而 WR-2721 有其副作用,也有其禁忌證,如懷孕期間禁用、哺乳期若使用 WR-2721 應停止授乳,有腦血管病或心血管病、低血鈣症、低血壓、高血壓時應慎用(朱珠,1999),並且價格昂貴,藥效短暫;豬苓只有「無水濕者禁用,以免傷陰」之禁忌,沒有特別禁忌之報告,如此恰好可彌補 WR-2721 之缺點,將來兩者併用可考慮應用於臨床,況且,豬苓和 WR-2721 併用效果和 WR-2721 單獨使用相當,併用後可減少 WR-2721 的劑量及副作用,並可降低成本,讓醫者在輻射和化療藥物的防護領域中有更多的選擇。

### 三、實驗之討論

此次實驗中,微核試驗已被證實是個很方便的檢測輻射或化療引起的染色體毒性的生物指標。我們實驗結果顯示取周邊網狀紅血球來測試微核於輻射後 24、48、72 小時相比較,以輻射後 48 小時達到高峰(實驗數據未列出),此結果與先前之研究相符合,因許多研究也指出紅血球由骨髓移轉到周邊約需 24 小時的時間,剛好符合周邊網狀紅血球微核比骨髓紅血球微核晚約 24 小時顯現的結果。(The collaborative study group,1992)(宮麗崑,2001)

由於不同理化刺激所引起的周邊網狀紅血球(RET)微核率最高值出現的時間會有所不同,就算是同一種刺激,也會因為劑量和給藥途徑的不同,動物種屬的不同,造成微核率出現的最高值也不同。因此當藥物在體內的吸收後的血中最高濃度尚未確立前,給藥時間點的選取就更加重要了,從實驗結果我們可以看出來,豬苓多糖在體內吸收後的最佳濃度約為給藥後的 30 分鐘;在體內或體外微核試驗結果顯示,豬苓多糖的抗輻射效果和給藥的時間、濃度有關,當輻射前 30 分鐘給藥效果最好;體外 MN 以 100 $\mu$ g/ml 及 300 $\mu$ g/ml 的豬苓多糖的濃度均達到減低微核生成率的效果;體內微核試驗,以 50 mg/Kg 豬苓多糖單獨或併用 200 mg/Kg 的 WR-2721,游離輻射 30 分鐘前投予,也能有意義的降低微核的生成率;即使是體內給以 250mg/kg 的豬苓多糖也不會使微核數增加。由此可論定豬苓多糖是個毒性很低而且對輻射有很好防護作用的中藥成分。

對輻射誘發基因突變防護的研究大都是以體外實驗為主,較少有人研究體內基因突變防護作用與抗癌起始的關係。而在體內動物實驗方面,大都以抑制腫瘤生成為主,為了研究豬苓多糖或 WR-2721 在突變生成起始階段的作用;在實驗中我們探討豬苓多糖或 WR-2721 對輻射誘發老鼠體內 DNA 與染色體損傷的防護作用,以高壓液相層析儀加電化偵測儀(HPLC/ECD)來分析老鼠組織氧化 DNA 傷害 8-OHdG 的量和計數周邊網狀紅血球微核來看染色體損傷,結果發現豬苓多糖或 WR-2721 確能降低輻射所致老鼠肝組織 8-OHdG 的量與微核數。

本實驗中我們選擇在暴露輻射 48 小時後犧牲老鼠，測量 8-OHdG 的量，豬苓多糖或 WR-2721 組和陽性對照組比較均有意義的降低，尤其 WR-2721 效果更好，反過來豬苓多糖在防護氧化 DNA 傷害的作用似乎較弱。

利用 *tk* 基因突變率之測試，可以偵測到使細胞生長比較快的 *tk*-fast growing mutant 之突變，其為點突變及小段的基因缺失，也可以偵測到使細胞生長比較慢的 *tk*-slow growing mutants 之突變，其為 DNA 大片段缺失；先前結果顯示輻射主要會造成 DNA 大片段缺失，此次實驗以 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，三種不同劑量濃度和 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  WR-2721 比較，在不同劑量下的豬苓多糖，都能有效地降低輻射所造成的基因傷害。

脂質過氧化的上升，一般都被視為活性氧族群上升而與脂質產生連鎖反應的結果。在此實驗中，WR-2721 對脂質過氧化能有意義的降低。可喜的是，豬苓多糖效果甚至比 WR-2721 好。

## 第二節 豬苓多糖對化療藥物防護作用

CP 是烷化類的抗癌藥物，進入生物體後，會於肝臟活化成活性中間物，進而於靶器官與 DNA 或蛋白質反應，導致 DNA 與細胞傷害。CP 雖是常用化療藥物，但若長期使用，將可能會導致骨髓抑制、免疫低下，甚至引發白血病等第二原發癌，因此如何降低 CP 的副作用，進而提高其臨床療效是一重要課題。

此次實驗顯示不論是體外或體內實驗，CP 所導致染色體損傷的 MN 增加，均能被豬苓多糖有效地抑制，可知其具有保護化療藥物誘發染色體損傷的能力。在體外 TK6 細胞的數據表示對 CP 防護效果於 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的豬苓多糖 30 分鐘前投予，再暴露於 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  劑量的 CP，能有意義地降 CP 低微核的生成率；體內 ICR 老鼠的數據顯示以 50  $\text{mg}/\text{Kg}$  劑量的豬苓多糖投予，30 分鐘後給予 50  $\text{mg}/\text{Kg}$  劑量的 CP，也能有意義地降低微核的生成率，並且

豬苓多糖對 CP 微核抑制作用呈現劑量反應關係。豬苓多糖對正常細胞是否透過以下機轉，如：1.抑制 CP 的吸收；2.抑制 CP 之代謝活化；3.誘發 CP 解毒酵素的活性；4.提高 DNA 修復能力，則有待進一步的研究。

我們知道給予化療藥物的防護劑，可減少其誘發第二原發癌，在 CP 防護上，目前可見酵母菌 (Yeast) (Chorvatovicova *et al.*,1999)，葡萄籽和葡萄皮 (Grape seed and grape skin) (Erexson ,2003)，蜂膠 (Propolis) (王志萍,2001)，全甲洋參膠囊(Quanjia Yangshen capsule) (任連生,2001)，長春新鹼 (Vincristinine) (葉亞新,2001)，藍靛 (*Lonicera edulis*) (全成旭,2001)，靈芝多醣 (Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*) (陳建濟,2000)，香菇多醣 (Lentinan) (陳冠敏, 2000) 等報告，對 CP 所致染色體的損傷均有一定的保護作用；而豬苓多糖經實驗證明對 CP 所導致染色體損傷也有良好的防護能力。

### 第三節 總結

	MN ( <i>in vitro</i> )	MN ( <i>in vivo</i> )	MF ( <i>tk gene</i> )	8-OHdG	LPO
PUPs	1	1	1	2	1
WR-2721	2	3	2	1	2
PUPs+WR	3	2			

如表所示，總結以上實驗，防護效果程度好壞以 1.2.3.表示，1 為最好，2 次之。豬苓多糖不管由體外及體內染色體遺傳損傷微核 (MN) 試驗、老鼠脂質過氧化 (LPO) 試驗、體外細胞 *tk* 基因突變率，效果均比 WR-2721 好，而氧化 DNA 傷害 (8-OHdG) 則 WR-2721 較好。

中醫的治則是從辯證開始，中醫的證型多數是疾病發生的病理基礎和疾病發展導致的病理生理異常。據報導氣虛、陰虛的人容易發生腫瘤，同時腫瘤到了一定時期也會導致氣虛和陰虛，以輻射或化療又均可導致或加重陰虛(孫燕，2000)。豬苓是優良的生物調節物，和中醫的扶正理論有關，但是豬苓屬於本經中品，〈本經〉：“主痲癩，解毒，蠱疰不祥，利水道。久服輕身耐老。”，應也有解毒的作用，似乎也可從清熱解毒的角度切入。我們從染色體遺傳損傷，氧化 DNA 傷害和脂質過氧化作用著手，希望將豬苓多糖從分子生物學的角度闡明中醫的學說，雖然以上實驗未能具體將兩者相聯繫，但是已從中醫證型的分子生物學方面踏出一小步。

由豬苓的各種天然條件和實驗結果顯示頗符合理想的輻射防護和化療藥物防護的條件，諸如可以口服給藥，很快地被吸收，沒有特別毒性，便宜易取得，方便攜帶和儲存，使病人對輻射或化療有較好的耐受性，可以增加治療劑量，以增加病人的存活率等，況且豬苓在民間已普遍長久地被使用在泌尿系統等方面，若再加入對輻射和化療防護的新觀念，豬苓則是老藥新用的一個很有價值的中藥。

## 第六章 結論

此次實驗證實豬苓多糖不論在體內或體外對輻射和化學性引起的染色體損傷均具有防護作用。實驗主要分為三大部份，第一部份先由體外和體內微核測試豬苓多糖對輻射的防護能力如何，結果顯示效果良好。第二部分將豬苓多糖進一步和 WR-2721 比較，WR-2721 是世界對輻射防護作用的首選藥物，雖然在四千多種含硫醇類防護劑中選出，但仍有其副作用；我們試著由中藥材中找尋毒性小、防護力較佳的藥物如豬苓多糖藉由 MN、LPO、8-OHdG、*tk* gene 試驗來看豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射的防護效果如何，結果在統計上也都能有意義地降低實驗值，表示豬苓多糖單獨或併用 WR-2721 對輻射有防護作用，令人欣慰的是豬苓多糖呈現的效果比 WR-2721 好。第三部份，豬苓多糖既然對輻射有防護效果，對化療藥物 CP 的防護作用如何，實驗結果顯示，不管體外或體內微核測試，統計上均能有意義地降低微核生成率，表示在豬苓多糖對 CP 的防護上也有效果在。

豬苓自古以來即為常用的中藥，取得容易、價格便宜，如今知其可彌補 WR-2721 效力的短暫和價格的昂貴，兩者併用或豬苓多糖單獨使用均有推廣應用於臨床的可行性，另外豬苓多糖也可彌補 CP 對染色體損傷的毒副作用；如此提高正常組織對輻射或 CP 化療之耐受性，使病人在接受放療或化療的當時，減低不適的感覺，增加治療的意願，得以協助病患完成治療之療程，所以預期豬苓在輔助輻射和化學藥物的治療中扮演著非常重要的角色。

## 參考文獻

Abramsson-Zetterberg L, Zetterberg G, Grawe J. The time-course of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutation Research*.1996;350:349-358.

Abramsson-Zetterberg L, Zetterberg G, Grawe J. The time-course of micronucleus polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutation Research*. 1996;350:349-358.

Asano N, Katsuma Y, Tamura H, Higashikuni N, Hayashi M. An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridineorange supravivally stained peripheral blood cells. *Mutation Research*. 1998; 404:149-154.

Ayene SI, Srivastava PN. Effect of WR-2721 on radiation-induced lipid peroxidation and enzyme release in erythrocytes and microsomes. *International Journal of Radiation Biology*. 1989;56:265-75.

Bolaman Z, Koseoglu MH, Demir S, Atalay H, Akalin N, Hatip I, Aslan D. Effect of amifostine on lipid peroxidation caused by cisplatin in rat kidney. *Journal of Chemotherapy*.2001; 13:337-9.

Budiyanto A, Ahmed NU, Wu A, Bito T, Nikaido O, Osawa T, Ueda M, Ichihashi M. Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*. 2000;21(11):2085-90.

Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF, Smoluk GD, Fahey RC. Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: identification of the transported form of the drug. *Cancer Research*. 1998;48:3634-3640.

Calabro-Jones PM, Fahey RC, Smoluk GD and Ward JF. Alkaline phosphatase promotes radioprotection and accumulation of WR-1065 in V79-171 cells incubated in medium containing WR-2721. *International Journal of Radiation Biology*. 1985;47:23-27.

Calderon-Garciduenas L. Wen-Wang L. Zhang YJ. Rodriguez-Alcaraz A. Osnaya N. Villarreal-Calderon A. Santella RM. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environmental Health Perspectives*. 1999;107:469-74.

Casciano DA, Aidoo A, Chen T, Mittelstaedt RA, Manjanatha MG and Heflich RH. Hprt mutant frequency and molecular analysis of Hprt mutations in rats treated with mutagenic carcinogens. *Mutation Research*. 1999;431:389-395.

Chorvatovicova D, Machova E, Sandula J. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin –glucan by oral administration. *Mutation Research*. 1998;412:83-89.

Chorvatovicova D, Machova E, Sandula J, Kogan G. Protective effect of the yeast glucomannan against cyclophosphamide-induction mutagenicity. *Mutation Research*. 1999;444:117-122.

Conrad CC. Grabowski DT. Walter CA. Sabia M. Richardson A. Using MT(-/-) mice to study metallothionein and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000;28:447-62.

Crompton NE, Ozsahin M. A versatile and rapid assay of radiosensitivity of peripheral blood leukocytes based on DNA and surface –marker assessment of cytotoxicity . *Radiation Research*. 1997;147:55-60.

Dass SB, Ali SF, Heflich RH, Casciano DA. Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice. *Mutation Research*. 1997;381:105-110.

Devi PU, Ganasoundari A, Rao BSS and Srinivasan KK and Unnikrishnan MK. Radiation Protection by the Ocimum Flavonoids Orientin and Vicenin: Mechanisms of Action. *Radiation Research*. 2000; 154: 455-460.

Devi PU, Ganasoundari A, Rao BSS and Srinivasan KK. In Vivo Radioprotection by Ocimum Flavonoids: Survival of Mice. *Radiation Research*. 1999;151:74-78.

Domon OE, McGarrity LJ, Bishop M, Yoshioka M, Chen JJ, Morris SM. Evaluation of the genotoxicity of the phytoestrogen, coumestrol in AHH-1 TK<sup>±</sup>-human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*. 2001; 474: 129-137.

El-Habit OH, Saada HN, Azab KS, Abdel-Rahman M, El-Malah DF. The modifying effect of  $\beta$ -carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in male rats. *Mutation Research*. 2000; 466:179-186.

Erexson GL. Lack of in vivo clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. *Food and chemical Toxicity*. 2003;41:347-350.

Falck G, Catalan J, Norppa H. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. *Mutation Research*. 1997;392:71-79.

Fimognari C, Nusse M, Cesari R, Cantelli-forti G, Hrelia P. Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by

ursodeoxycholic acid in human lymphocytes. *Mutation Research*. 2001;495:1-9.

Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Loft S. Radiation-induced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis*. 1994;15:1609-12.

Fletcher BL, Dillard CJ, and Tappel AL. Measurement of Fluorescent Lipid peroxidation products in biological Systems and Tissues. *Analytical biochemistry*. 1973;52:1-9.

Ganasoundari A, Devi PU, Rao BBB. Enhancement of bone marrow radioprotection and reduction of WR-2721 toxicity by *Ocimum sanctum*. *Mutation Research*. 1998;397:303-312.

Gocke E, Muller L, Guzzie PJ, Brendler-Schwaab S, Bulera S, Chignell CF, Henderson LM, Jacobs A, Murli H, Snyder RD, and Tanaka N. Considerations on PHotochemical Genotoxicity: Report of the international Workshop on Genotoxicity test Procedures Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000; 35: 173-184.

Hanson WR. Radiation protection of murine intestine by WR-2721, 16,16-dimethyl prostaglandin E2, and the combination of both agents. *Radiation Research*. 1987;111:361-73.

Hara M, Nakagawa S, Fujioka E, Ayukawa E and Izushi T. Detection of micronuclei in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridineorange. *Mutation Research*. 1992;278:175-179.

Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T and Ishidate J. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridineorange-coated slides.

Mutation Research. 1990;245:245-249.

He D, Lim HW. Irradiation of protoporphyrin mice induces down-regulation of epidermal eicosanoid metabolism. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991;97:488-94.

He JL, Chen WL, Jin LF, Jin HY. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutation Research*. 2000;496:223-231.

Hendrikse AS, Hunter AJ, Keraan M, Blekkenhorst GH. Effects of low dose irradiation on TK6 and U937 cells: induction of p53 and its role in cell-cycle delay and the adaptive response. *International Journal of Radiation Biology*. 2000 ;76(1):11-21.

Hitotsumachi S, Kimura Y, Katoh M, Ishihara N, Hara T, Shibuya T. Micronucleus tests on N-ethyl-N-nitrosourea with mouse peripheral blood reticulocytes using acridineorange-coated slides. *Mutation Research*. 1992;278:113-115.

Hofer T, Moller L. Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chemical Research in Toxicology*. 1998;11:882-7.

Honma M, Hayashi M, and Sofuni T. Cytotoxic and mutagenic responses to X-rays and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*. 1997;374:89-98.

Honma M, Tadokoro S, Sakamoto H, Tanabe H, Sugimoto M, Furuichi Y, Satoh T, Sofuni T, Goto M, Hayashi M. Chromosomal instability in B-lymphoblastoid

cell lines from Werner and Bloom syndrome patients. *Mutation Research*. 2002;520:15-24.

Hospers GA, Eisenhauer EA, de Vries EG. The sulphhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio-and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. *British Journal of Cancer*. 1999;80:629-38.

Hsu HY, Yang JJ, Lin SY, Lin CC. Comparisons of geniposidic acid and geniposide on antitumor and radioprotection after sublethal irradiation. *Cancer Letters*. 1997;113:31-37.

Hsu HY, Yang JJ, Ho YH, Lin CC. Difference in the effects of radioprotection between aerial and root parts of *Lycium chinense*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999;64:101-8.

Inaoka Y, Shakuya A, Fukazawa H, Ishida H, Nukaya H, Tsuji K, Kuroda H, Okada M, Fukushima M, Kosuge T. Studies on active substances in herbs used for hair treatment. I. Effects of herb extracts on hair growth and isolation of an active substance *Polyporus umbellatus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1994; 42:530-3.

Iwakura K, Tamura H, Matsumoto A, Ajimi S, Ogura S, Kakimoto K, Matsumoto T and Hayashi M. The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes by acridineorange supravital staining with 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine. *Mutation Research*. 1992;278:131-137.

Kamat JP, Bolor KK, Devasagayam TPA, Venkatachlam SR. Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by  $\gamma$ -radiation in rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71:425-435.

Karbownik M, Reiter RJ, Qi W, Garcia JJ, Tan DX, Manchester LC, Vijahalexmi. Protective effects of melatonin against oxidation of quinone bases in DNA and decreased microsomal membrane fluidity in rat liver induced by whole body ionizing radiation. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 2000;211:137-44.

Kasahara Y, Wakata A, Nakai Y, Yuno K, Miura D, Yagi K, Hirabayashi K and Makita T. The micronucleus test using peripheral blood reticularcytes from methotrexate-treated mice. *Mutation Research*. 1992;278:145-151.

Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A and Tanooka H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*. 1986;7:1849-1851.

Kemp G, Rose P, Lurain J, *et al.* Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1996;14:2101-2112.

Kevekordes S, Spielberger J, Burghaus CM, Birkenkamp P, Zietz B, Paufler P, Diez M, Bolten C, and Dunkelberg H. Micronucleus Formation in Human Lymphocytes and in the Metabolically Competent Human Hepatoma Cell Line Hep-G2: Results with 15 Naturally Occurring Substance. *Anticancer Research*. 2001;21:461-470.

Kim KC. Kim IG. Ganoderma lucidum extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *International Journal of Molecular Medicine*. 1999;4:273-7.

Kim SH. Son CH. Nah SY. Jo SK. Jang JS. Shin DH. Modification of **radiation** response in mice by Panax ginseng and diethyldithiocarbamate. *In Vivo*.

2001;15:407-11.

Kim SH. Lee SE. Oh H. Kim SR. Yee ST. Yu YB. Byun MW. Jo SK. The radioprotective effects of bu-zhong-yi-qi-tang: a prescription of traditional Chinese medicine. *American Journal of Chinese Medicine*. 2002; 30:127-37.

Kim YH. Yang HE. Kim JH. Heo MY. Kim HP. Protection of the flowers of *Prunus persica* extract from ultraviolet B-induced damage of normal human keratinocytes. *Archives of Pharmacal Research*. 2000;23(4):396-400.

Kobus K. Turner J. Priestley B. Dreosti I. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine and micronucleus techniques for the assessment of X-ray and UV induced genotoxicity. *Research Communications in Chemical Pathology & PHarmacology*. 1993;80:249-52.

Kondo K and Ozawa S. Micronucleus test with ethyl methanesulfonate in mouse peripheral reticulocytes stained supravivally using acridine-orange slides. *Mutation Resaerch*. 1992;278:109-111.

Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. Antioxidant Vitamins C, E and  $\beta$ -carotene reduce DNA damage before as well as after  $\gamma$ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutation Research*. 2001;491:1-7.

Lin IH. Hau DM. Chang YH. Restorative effect of *Coriolus versicolor* polysaccharides against gamma-irradiation-induced spleen injury in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao/Acta Pharmacologica Sinica*. 1996;17:102-4.

Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000;21:397-404.

Liu T, Liu Y, He S, Zhang Z, and Kligerman MM. Use of radiation with or without WR-2721 in advanced rectal cancer. *CANCER*. 1992;69:2820-25.

Liu J, McIntosh H, Lin H. Chinese medicinal herbs for chronic hepatitis B: a system review. *Liver*. 2001; 21:280-6.

Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutation Research*. 1999;423:11-21.

Lutz WK. *In vivo* covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutation Research*. 1979;65:289.

Maisin JR. Chemical radioprotection: past, present and future prospects. *International Journal of Radiation Biology*. 1998;73:443-450.

Malkinson FD, Geng L, Hanson WR. Prostaglandins protect against murine hair injury produced by ionizing radiation or doxorubicin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1993;101:135-137.

Matusoka A, Yamazaki N, Suzuki T, Hayashi M, and Sofuni T. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutation Research*. 1993;272:223-236.

Mazur L. Anticlastogenic effect of S-2-(3-aminopropylamino)ethylphosphorothioic acid against X-rays in mice. *Physiological Research*. 1996;45:59-63.

Mazur L. Induction of micronucleated erythrocytes by MEA, AET, WR-2721 and X-rays. *Mutation Research*. 1995;334:317-322.

Mazur L. Radioprotective effects of the thiol GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. *Mutation Research*. 2000; 468: 27-33.

Mazur L. The modulatory effect aminothiols on the clastogenic activity of X-rays assayed by the vivo mouse micronucleus test. *Folia Biologica*. 1996;44:55-9.

Mazur L, Blawat A. Effects of GSH and WR-2721 on induction of micronuclei by cyclophosphamide. *Toxic Letters*. 1999,110:67-72.

Mazur L, Czyzewska A. Inhibition of the clastogenic effect of cyclophosphamide by WR-2721 in the bone marrow of mice. *Mutation Research*. 1994;309:219-223.

Mittal A, Pathania V, Agrawala Pk, Prasad J, Singh S, Goel HC. Influence of *Podophyllum hexandrum* on endogenous antioxidant defence system in mice: possible role in radioprotection. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;76:253-262.

Morales-Ramirez P, Vallarino-Kelly T. Pharmacokinetic parameters determined from the clastogenic activity of ethylnitrosourea and dimethylnitrosamine in mice in vivo. *Mutation Research*. 1998;412:315-322.

Muller WU, Rode A. The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15 Gy). *Mutation Research*. 2002;502:47-51.

Muller WU, Nusse M, Miller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutation Research*. 1996;366:163-169.

Murley JS and Grdina DJ. The effects of cycloheximide and WR-1065 on radiation-induced repair processes: a mechanism for chemoprevention. *Carcinogenesis*. 1995;16:2699-2705.

Mutlu-Turkoglu O, Erbil Y, Oztezcan S, Olgac V, Toker G and Uysai M. The

effect of Selenium and /or Vitamin E treatments on Radiation-Induced intestinal injury in rats. *Life Science*. 2000;66:1905-1913.

Nakajima M, Takeuchi T, Morimoto K. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis*. 1996;17:787-91.

Nakajima T, Yukawa O. Mechanism of radiation-induced diacylglycerol production in primary cultured rat hepatocytes. *Journal of Radiation Research*. 1999;40:135-44.

Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K. Assay for lipid peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979; 95: 351-358.

Park JW, Cundy KC, Ames BN. Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis*. 1989; 10:827-32.

Patchen ML, MacVittie TJ, Solberg BD, D'Alesandro MM and Brook I. Radioprotection by Polysaccharides alone and in combination with Amino thiols. *Advance Space Research*. 1992;12:233-248.

Patchen ML, MacVittie TJ. Granulocyte colony-stimulation factor and amifostine ( ethylol ) synerdize to enhance heimopoietic reconstitution and increase survival in irradiated animals. *Seminar Oncology*. 1994;21:26-32.

Schafer J, Bachtler J, Engling A, Little JB, Klaus-Josef W and Frederik W. Suppression of apoptosis and Clonogenic Survival in Irradiated Humna Lymphoblasts with Different TP53 Status. *Radiation Research*. 2002;158:699-706.

Schafer J, Bachtler J, EnglingA, Little JB, Weber KJ, Wenz F. Suppression of

apoptosis and clonogenic survival in irradiated human lymphoblasts with different TP53 status. *Radiation Research*. 2002 ;158:699-706.

Shimoi K, Masuda S, Shen B, Furugori M, Kinae N. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutation Research*. 1996;350:153-61.

Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S and Kinae N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in  $\gamma$ -ray irradiated mice. *Carcinogenesis*. 1994;15:2669-2672.

Shimoi K, Masuda S, Shen B, Furugori M, Kinae N. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutation Research*. 1996;350:153-161.

Smoluk GD, Fahey RC, Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF. Radioprotection of cells in culture by WR-2721 and derivatives: form of the drug responsible for protection. *Cancer Research*. 1988; 48:3641-7.

Spencer CM, Goa KL. Amifostine :a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drug*. 1995;50:1001-1031.

Stankiewicz A, Skrzydlewska E, Makiela M. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug Metabolism & Drug Interactions*. 2002; 19:67-82.

Stopper H and Muller SO. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicology in vitro*. 1997;11:661-667.

Stopper H, Lutz WK. Induction of micronuclei in human cell lines and primary cells by combination treatment with gamma-radiation and ethyl methanesulfonate. *Mutagenesis*. 2002;17:177-81.

Sun JT, Armstrong MJ, Galloway SM. Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure. *Mutation Research*. 1999;439:121-126.

Teixeira AJ, Ferreira MR, van Dijk WJ, van de Werken G, de Jong AP. Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat urine and liver DNA by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 1995;226:307-19.

The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Micronucleus test with mouse peripheral blood reticularcytes by acridineorange supravital staining: The summary report of the 5<sup>th</sup> collaborative study by CSGMT/ JEMS.MMS. *Mutation Research*. 1992;278:83-98.

Tice RR, Erexson GL, Hilliard CJ, *et al*. Effect of treatment protocol and sample time on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis*. 1990;5:313-321.

Tretter L, Ronai E, Szabados G, Hermann R, Ando A, Horvath I. The effect of the radioprotector WR-2721 and WR-1065 on mitochondrial lipid peroxidation. *International Journal of Radiation Biology*. 1990;57:467-78.

Uma Devi P. Radioprotective, anticarcinogenic and antioxidant properties of the Indian holy basil, *Ocimum sanctum* (Tulasi). [Review] [68 refs] *Indian Journal of Experimental Biology*. 2001;39:185-90.

Vallarino-Kelly T, MoralesRamirez P. Kinetics of micronucleus induction and

cytotoxic activity of colchicines in murine erythroblast in vivo. *Mutation Research*. 2001;495:51-59.

Vanparys P, Deknudt G, Vermeiren F, *et al.* Sampling times in micronucleus testing. *Mutation Research*. 1990;282:191-196.

Wang CM, Ohta S and Shinoda M. Studies on chemical protectors against Radiation. XXXV. Effects of Radioprotective Chinese Traditional Medicines on Radiation-Induced Lipid Peroxidation in Vivo and in Vitro. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1992;40:493-398.

Wang L, Eastmond DA. Catalytic inhibitors of topoisomerase II are DNA-damaging agents: induction of chromosomal damage by merberone and ICRF-187. *Environmental & Molecular Mutagenesis*. 2002;39:348-56.

Wei H. Cai Q. Rahn R. Zhang X. Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA. *Free Radical Biology & Medicine*. 1997;23:148-54.

Wei H. Zhang X. Zhao JF. Wang ZY. Bickers D. Lebowitz M. Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extracts from green and black teas. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26:1427-35.

Wilson VL. Taffe BG. Shields PG. Povey AC. Harris CC. Detection and quantification of 8-hydroxydeoxyguanosine adducts in peripheral blood of people exposed to ionizing radiation. *Environmental Health Perspectives*. 1993;99:261-3.

You JS, Hau DM, Chen KT, Huang HF. Combined effects of chuling ( *Polyporus*

umbellatus ) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. American Journal of Chinese Medicine. 1994; 2:19-28.

Zavodnik L, Zavodnik I, Ignatenkok, Bryszewska M, Buko V. Structural and functional transitions of the drugs-metabolising systems under oxidative injury. Experimental & Toxicologic Pathology. 1999;51:446-50.

Zhang J, Gao B, Cun C, Lu X, Wang H, Chen X, Tang L. Immunosuppression in murine brucellosis. Chinese Medical Sciences Journal. 1993; 8:134-8.

Zhang LS, Honma M, Hayashi M, Suzuki T, Matsuoka A, Sofuni T. A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test. Mutation Research. 1995; 347: 105-115.

全成旭、韓春姬、李連姬：藍靛果汁拮抗環磷？胺誘發小鼠骨髓細胞微核。Journal of Medical Science Yanbian University. 2001;24:87-89.

葉亞新：抗癌藥物長春新鹼的微核效應。Journal of Suzhon Railway Teachers College. 2001;18:53-55.

任連生、張蕪、湯瑩：全甲洋參膠囊對環磷？胺所致小鼠骨髓嗜多染紅細胞微核形成率和周邊血象的影響。中國中西醫結合雜誌 2001;21:445-447.

王志萍、韓連堂、張恒剛、邱玉剛、李佩賢、李新偉、張廣學：蜂膠對誘發小鼠染色體損傷的保護作用。濰坊醫學院學報 2001;23:269-271.

楊莉、耿寶琴：細胞保護劑氨磷汀。實用腫瘤雜誌 2001;16:213-215.

馬培奇：細胞保護劑氨磷汀及其臨床應用與展望。中國腫瘤 2001;10:471-472.

杜肖娜、王潤田、劉殿武、王惠芬、何宏濤：中藥豬苓多糖抑瘤作用機轉的初探。中華微生物學和免疫學雜誌 2001;21:296-297.

謝昶：氨磷汀對細胞保護作用的研究現狀。國外醫藥抗生素分冊 2001；22：84-89.

宮麗坤 屠曾宏：取樣時間對小鼠骨髓和周邊血嗜多染紅細胞微核率的影響。癌變 畸變 突變 2001；13：39-41.

郭國禎、林海、惠延平、張李艷、李豫蓉：應用凋亡和微核檢測法預測細胞射敏感性的可行性研究。2001；21：123-125.

彭勁松：關於輻射損傷的生物學指標研究進展。國外醫學遺傳學分冊 2000；23：197-200.

陳克能、徐光燁：癌症放化療中對正常組織保護的研究進展。中華放射醫學與防護雜誌 2000；20：366-368.

王林麗、吳寒寅、羅桂芳：豬苓的藥理作用及臨床應用。綜述報告 2000;9:58-59.

張代釗、郝迎旭、李佩文、董秀榮、余桂清：中醫藥防治研究放化療毒副反應 40 年。中國自然醫學雜誌 2000;2:114-117.

周本杰、陳蔚文、王建、張笑云：中醫藥防治腫瘤的基礎研究？展。新中醫

2000;32:58-59.

侯敢、黃迪南、祝其鋒：豬苓多糖對小鼠腹腔巨噬細胞一氧化氮生成的影響及其机理。中國老年學雜誌 2000;20:233-235.

王傳恩、方國源、李彩霞：豬苓多糖、硒及紅細胞對 LAK 細胞殺傷活性的影響。解剖學研究 2000;22:104-106.

石淑娟、李素民、胡玉錄、張勇、馬志民：豬苓多糖的不良反應與防治。現代中四醫結合雜誌 2000;9:535-536.

楊建文、夏同霞：中藥免疫調節劑的應用及發展趨勢。遵義醫學院學報 2000;23:364-365.

耿寶琴：廣譜細胞保護劑- 氨磷汀。國外醫藥- 合成藥 生化藥 製劑分冊 2000;21:278-280.

陳冠敏、林升清、黃宗鏞、陳紉雄、何玲、江瑞釵：香菇多糖膠囊抗突變作用的實驗研究。Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis. 2000;12:105-107.

陳建濟、張瑜、王秀敏、李克華、劉廣芬、王晴川、吳曉平、林斌輝：靈芝多糖的藥效學研究糖。Strait Pharmaceutical Journal. 2000;12:15-17.

孫燕：中西醫結合防治腫瘤的體會和展望。中國中西醫結合雜誌 2000 ; 20 ; 563-565.

施暢、廖明陽：環磷？胺與異環磷？胺對小鼠微核及胎肝微核率的影響。Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis. 2000;12:37-39.

沈其萍、楊萍、秦光和、唐慶國、何麗芳：環磷？胺誘發小鼠骨髓嗜多染紅

細胞微核方法的探討。中國食品衛生雜誌 2000;12:17-19.

朱珠：抗輻射藥- 氨磷汀。中國藥學雜誌 1999;34:58-59.

逯海燕、郭順星、林晨：真菌多糖等代謝產物的抗腫瘤藥理研究綜述。天然產物研究與開發 1999;12:74-78.

張勁松、樊華、李玉詳、潘迎杰、WernerReutter：幾種藥用真菌粗提物對多種人體腫瘤細胞株增殖的抑制作用。天然產物研究與開發 1998;12:27-31.

徐開林、潘秀英、姚仁南、陳世超：豬苓多糖和維生素 D3 衍生物聯合對白血病細胞的誘導分化作用。徐州醫學院學報. 1997;17:359-362.

方清明、劉淑芬：DNA 加合物的研究進展及其應用。國外醫學衛生學分冊 1997 ; 24 : 329-331.

李金鋒、郭靜文、黃信孚、林本耀：豬苓多糖、香菇多糖和分枝桿菌多糖對淋巴因子活化細胞活性增強作用的研究。中國中西醫結合雜誌 1996;16:224-226.

王艷、吳玉波、張永恆：豬苓多糖對順鉑增效作用及其毒性影響。中國醫藥研究 1996 ; 5 : 60-61.

張昌菊、郭秀：豬苓多糖和硒誘導 LAK 細胞的研究。中國實驗臨床免疫學雜誌 1996 ; 8 : 26-28.

周寧娜、梁曉原、李其光：中藥多糖的研究近況。雲南中醫學院學報 1996 ; 19 : 19-24.

薛開先：遺傳毒理學講座。1995 ; 7 : 73-76.

于慧敏、喬惠珍：職業性化學誘變劑對人體及通過胎盤的遺傳毒性研究。內蒙古醫學院學報 1994；16：73-76.

王輝：部份中草藥生物反應調節劑的研究現狀。實用中西醫結合雜誌 1992；5：90-91.

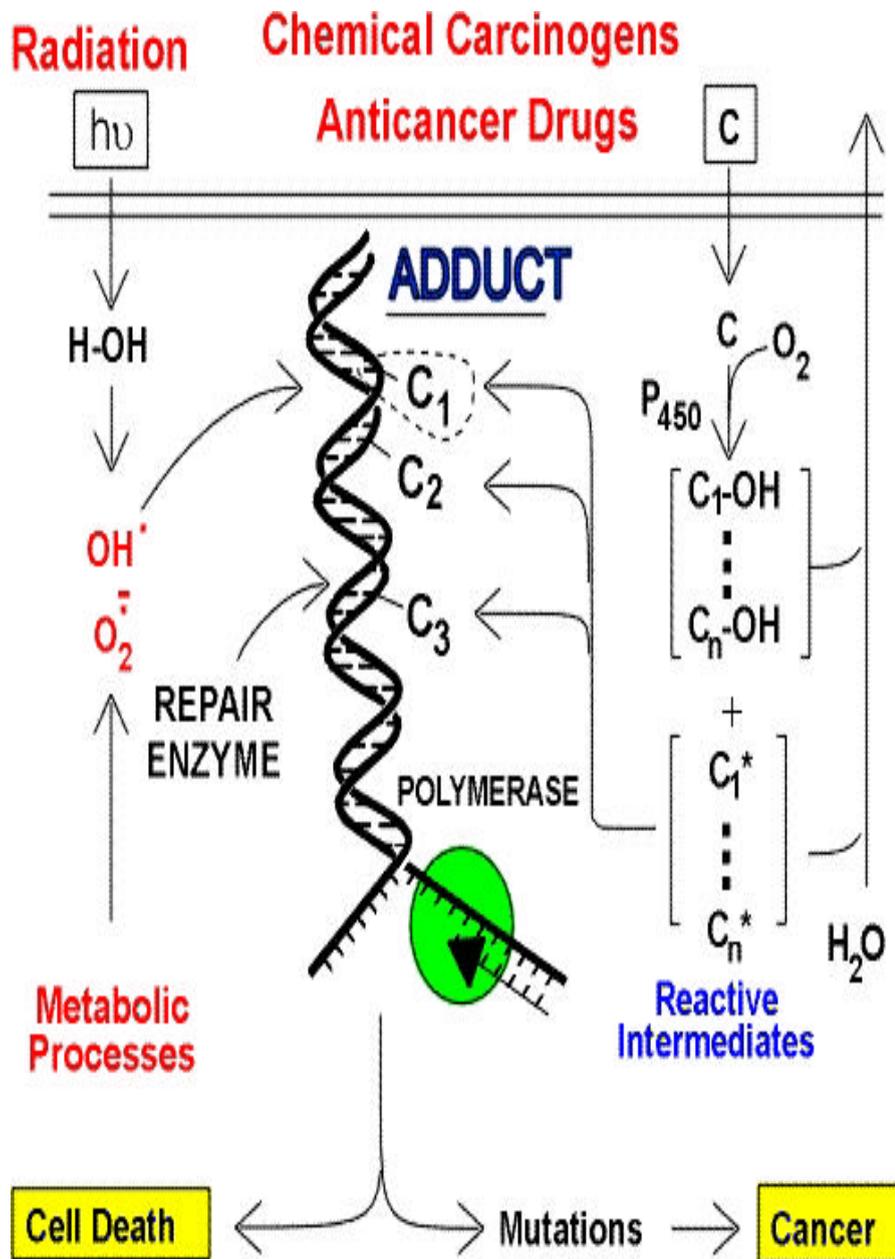
楊德安、李慎勤、石炳毅、王洪傳、劉少鵠：豬苓對膀胱腫瘤抑制作用的實驗與臨床研究。中華外科雜誌 1991；29：393-395.

徐雪瑩、余幸司、蔡喜修、連熙隆：Thiol對小白鼠輻射保護作用之研究。Kaohsiung Journal Medicine Science 1988;4:386-391.

潘明繼：真菌多糖抗腫瘤研究的概況。中西醫結合雜誌 1985；5：115-117.

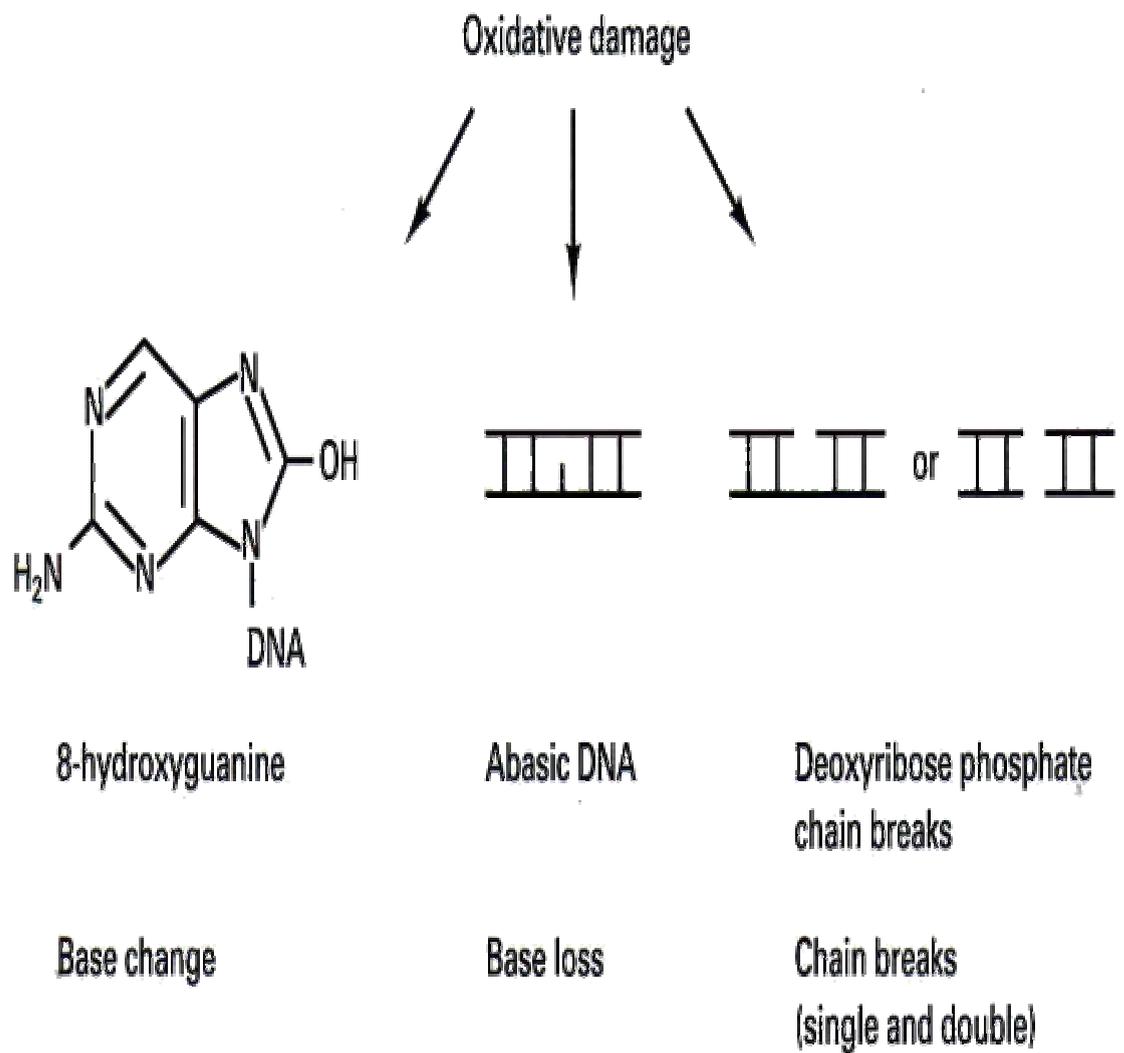
中醫研究院中藥研究組腫瘤組。新醫藥學雜誌 1979；2：15.

## 附 錄



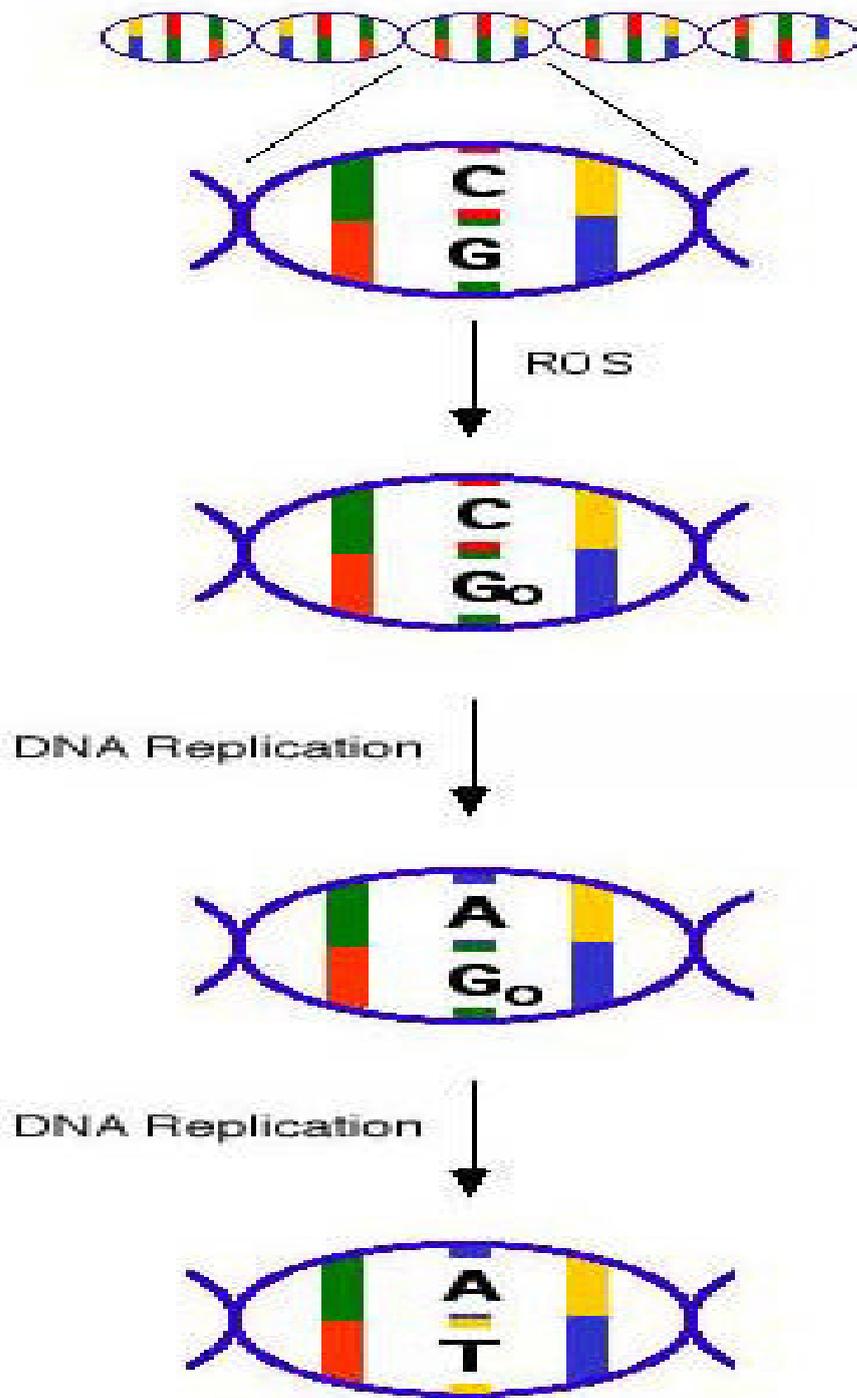
附圖 1. Oxidative DNA damage caused by Ionizing radiation

Reference : Postdoctoral Fellow, MIT, 1984 B.S., M.S., Univ. of Calcutta, 1971, 1973 PH.D., Wayne State University, 1984

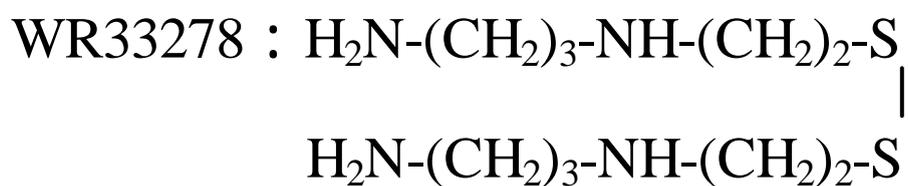
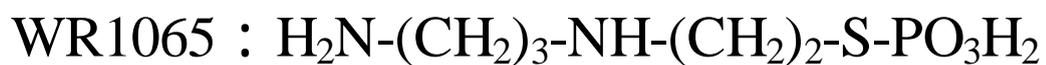
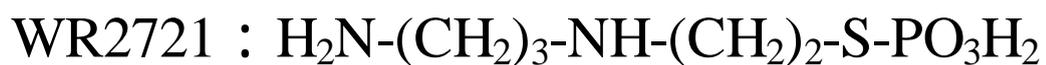


**附圖 2. Oxidative DNA damage caused by ionizing radiation**

**Reference: Roger JB KING. CANCER BIOLOGY 2nd 2000. Prentice Hall.**



附圖 3. Biological consequence of 8-OHdG



附圖 4. Reaction of WR-2721.

**Mice or Cells**

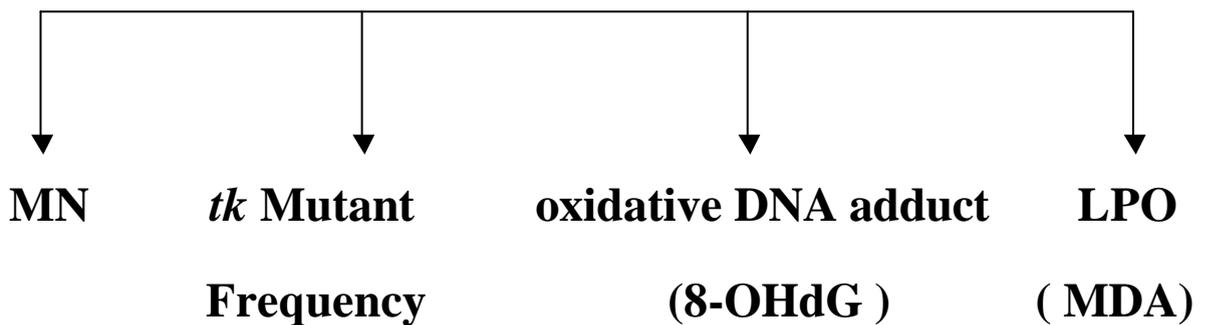
?

**PUPs and/ or WR-2721**

?

**Ionizing radiation  
carcinogens**

**Chemical**



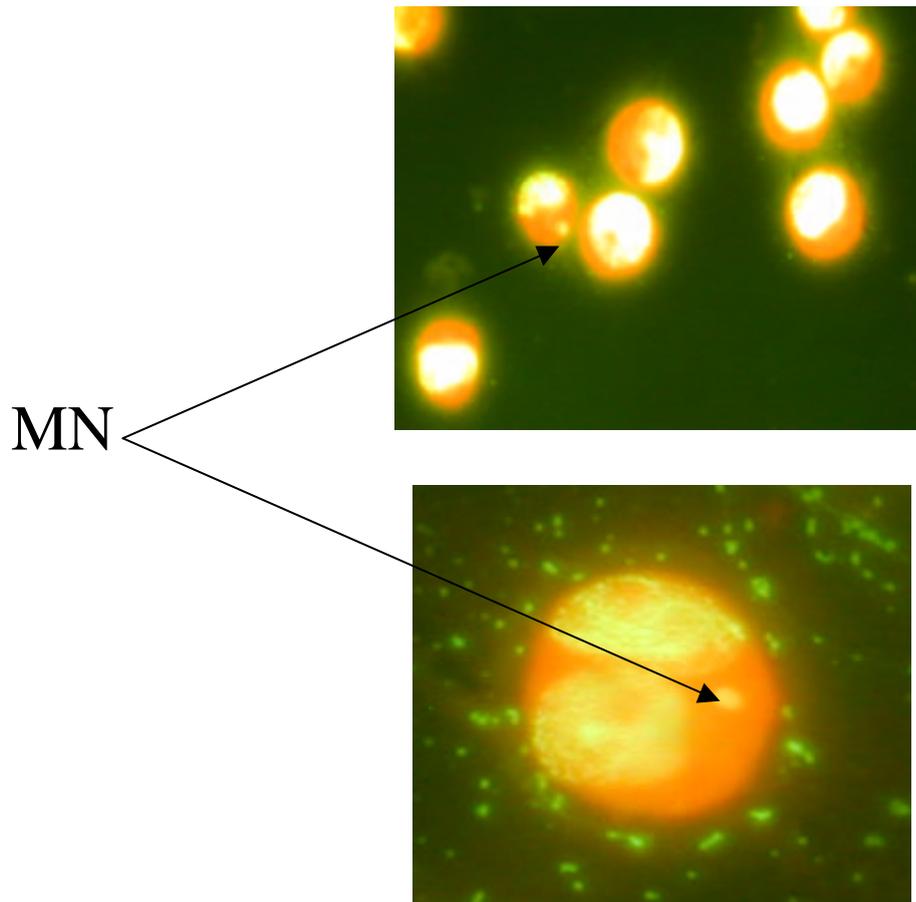
**MN : micronuclei**

**8-OHdG: 8-hydroxydeoxyguanosine**

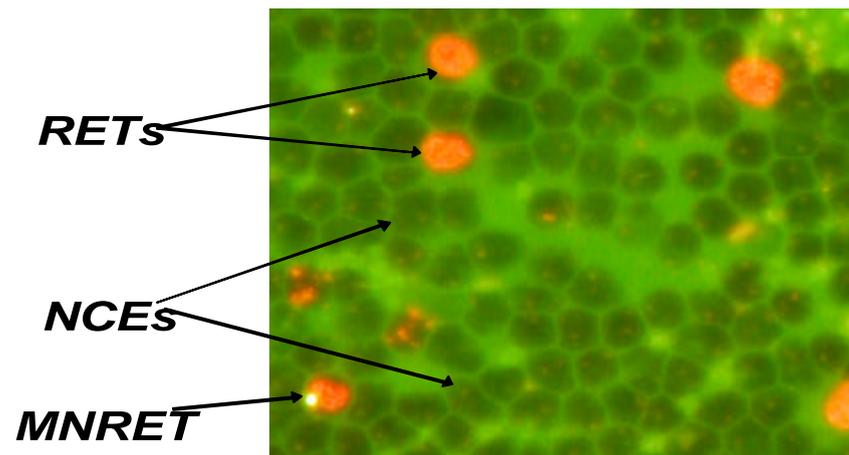
**MDA : malondialdehyde**

**附圖 5. Protocol of the experiments.**

## 1. MN in vitro

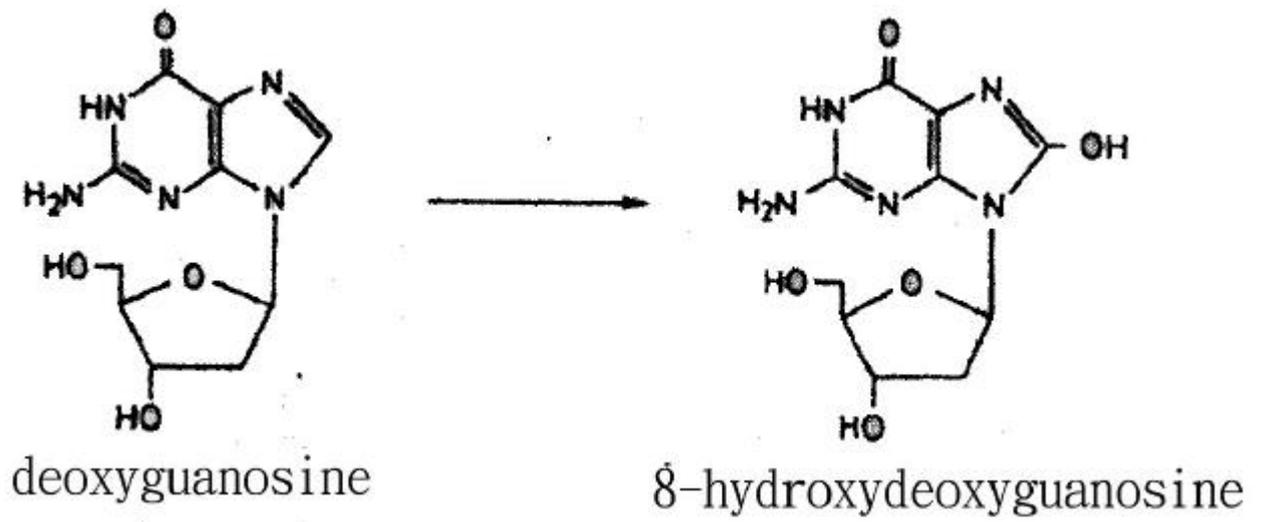


## 2. MN in vivo

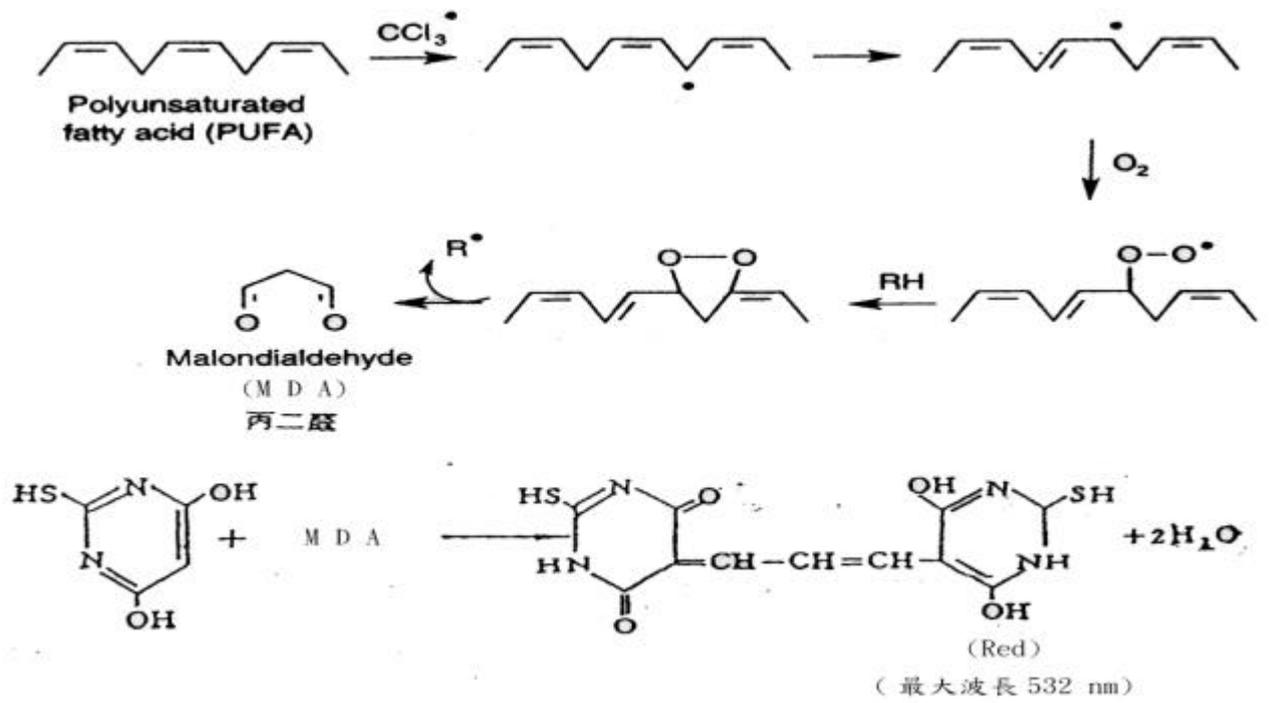


RET: Reticulocyte, MNRET: Micronucleated Reticulocyte  
NCE: Normochromatic erythrocyte

附圖 6. Micronuclei Test

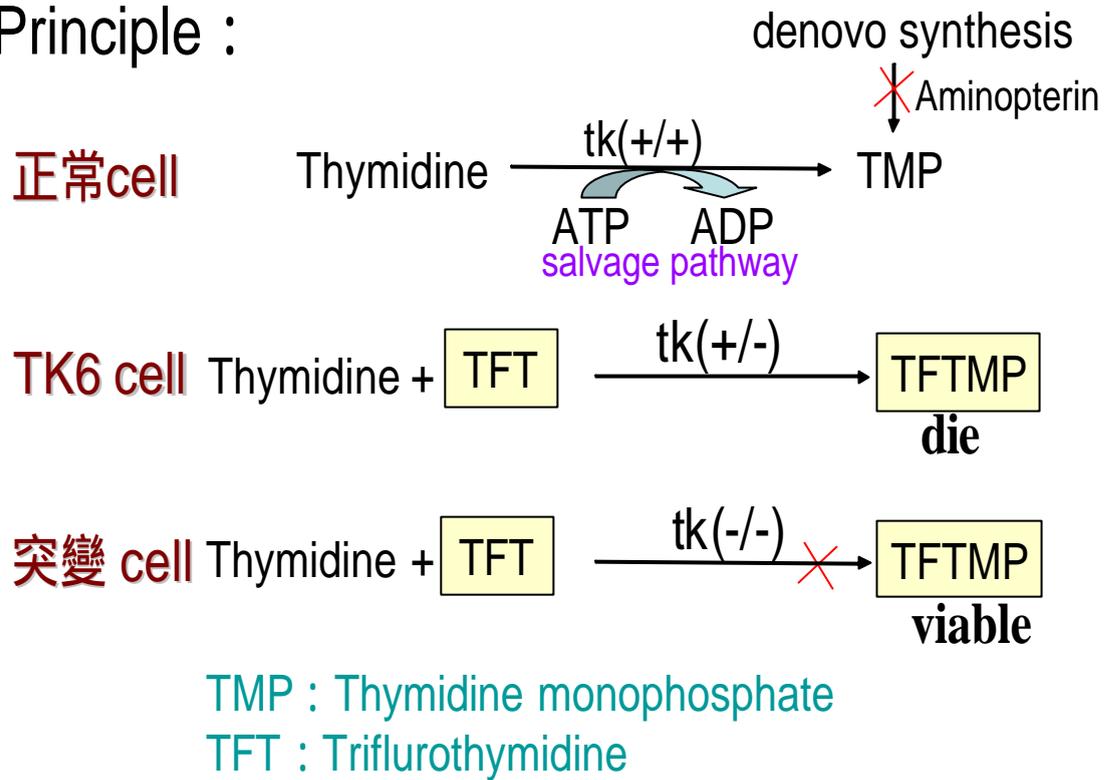


附圖 7. The DNA-adduct : 8-OHdG



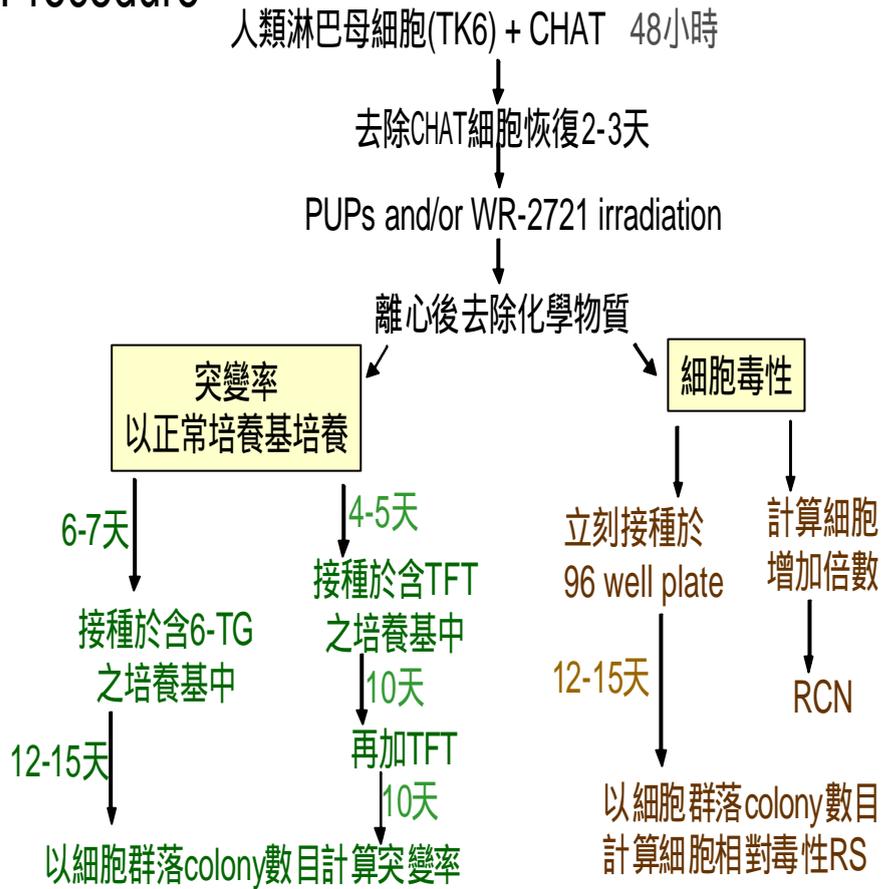
附圖 8. The Lipid peroxidation ( LPO )

Principle :



附圖 9. *tk* 基因突變率測試原理

# Procedure



附圖 10. 細胞毒性與突變率之實驗流程

# The radioprotective and chemopreventive effects of *Polyporus umbellatus* polysaccharides combined with WR-2721 in human lymphoblastoid cells and in mice

Hsiu-Ching Wu

Major Professor : Su-Yin Chiang

Institute of Chinese Medical Science, China Medical College

*Polyporus umbellatus* is one of the commonly used Traditional Chinese Medicines. In the present study the potential radioprotective and chemopreventive effect of polysaccharides of *Polyporus umbellatus* ( PUPs ) were investigated *in vitro* in human lymphoblastoid TK6 cells and *in vivo* in ICR mice. The results from micronucleus ( MN ) assay showed that pretreatment of PUPs at a dose of 100 µg/ml and 300 µg/ml 30 min before irradiation significantly reduced radiation-induced MN formation in TK6 cells.

The protective effects of PUPs were further examined by MN formation in the peripheral blood erythrocytes of whole body-irradiated mice. Marked increase of micronuclei frequency in the mouse peripheral blood erythrocytes was observed 48 h after exposure to 6 Gy radiation. Pretreatments of PUPs at a dose of 50 mg/Kg by i.p injection 30 min or 45 min before irradiation resulted in statistically significant decrease in the frequencies of X-ray-induced micronucleated reticulocytes. Treatment of PUPs even at the dose of 250 mg/Kg had no overt toxicity and did not induce a statistically significant increase in frequencies of micronucleated reticulocytes. These data suggests that PUPs possess the radioprotective effects with no observable cytotoxicity *in vivo*.

In the present, the sulphhydryl compound WR-2721 ( amifostine ) is the best choice of radioprotective agent. Comparative studies showed that the inhibition of radiation-induced MN formation by 50 mg/kg of PUPs was significant higher than that by 200 mg/kg of WR-2721 in irradiated mice, implying that PUPs is a better radioprotective agent than WR-2721.

To further understand the underlying mechanism of the radio- protective effects of PUPs, the oxidative DNA damage ( 8-hydroxy-2' - deoxyguanosine, 8-OHdG ) in the liver tissues was analyzed using High performance liquid chromatography/Electrochemical Detector ( HPLC/ECD ). The amounts of lipid peroxidation in mouse tissues were analyzed by TBAR method, respectively. Administration of PUPs at a dose of 50 mg/kg 30 min before irradiation significantly reduced the formation of 8-OHdG and lipid peroxidation in irradiated mouse liver, suggesting that its antioxidant potential may contribute to its radioprotective effect.

Furthermore, the effect of PUPs on the genotoxicity of cyclophosphamide was further examined both *in vitro* and *in vivo*. In TK6 cells with mouse-liver S9 mix, the addition of PUPs caused a dose-dependent inhibition of cyclophosphamide-induced MN. In ICR mice , pretreatment of PUPs significantly inhibited cyclophosphamide- nduction micronucleated reticulocytes in the peripheral blood

Since PUPs were relatively nontoxic natural components; these data suggest that PUPs might be a useful radioprotective agent and chemopreventive agent.

Key words: polysaccharides of *Polyporus umbellatus* ( PUPs ), WR-2721, micronuclei( MN ) 、 cyclophosphamide (CP ) lipid peroxidation ( LPO ), DNA adduct : 8-OHdG、 *tk*-gene

## 謝 辭

論文得以順利完成，首先感謝我的指導教授 江素瑛老師，在百忙中悉心指導，江老師待人非常客氣，但是做起實驗態度卻非常嚴謹，也因如此才能將實驗設計得完善，考慮得週到，將實驗誤差減到最低，可以說從她那兒學到了一個研究者應具有的實事求是的精神；也感謝林昭庚董事和共同指導教授高尚德、謝慶良、賴俊雄老師及吳焜裕、李采娟、李淑妃、林文川、陳忠川諸位教授，還有中醫藥委員會林主任委員宜信等從不同層面不同角度給予指正和支持。

我覺得當學生的好處是開始時他可以什麼都不懂，經過了一段時間的訓練，他可從老師那兒學習、了解、應用；在知識的領域從無到有，這是當學生最快樂的事了；年過半百，重回學生生活，幾年研究所生涯雖然辛苦，卻覺得當學生的感覺真好。

在江老師實驗團隊中，首先謝謝裴詩雨的聰明能幹大力幫忙；張儷齡的謹慎細心；楊承恩的超強英文；可晶晶的電腦製圖高手和廖偉全、梁秀蓮、施睿宏、陳巧倩等及中醫附設醫院放射科林芳仁主任及蘇經雄先生的協助，才能將好成果呈現給各位。

更要感謝我的父母，五十幾年來全靠他們的支持和鼓勵，如今才真心體會到「沒有他們就沒有今天的我」，謝謝爸爸、媽媽；也要將此成績獻給遠方的親人。最後以「經得起風霜洗練，才能為自己留下精彩的印記」和大家共勉之。

