

第五章 研究結果

第一節 柔紅黴素可以有效抑制由 TPA 所誘發的 AP-1 的活性

首先將細胞分成兩組，分別加入或不加入 TPA，並且加入不同濃度的柔紅黴素，培養 16 小時後，進行 AP-1 活性分析及細胞存活率試驗。結果發現，不論是 Chang liver/AP-1 或 HepG2/AP-1 細胞株其 AP-1 的活性均會被 TPA 所活化；而柔紅黴素也可有效抑制 TPA 所誘發的 AP-1 的活性。

對 Chang liver/AP-1 而言(圖 5-1A, B)，在未加入 TPA 的組別中，少量的柔紅黴素 (0.2-1 μM) 會使 AP-1 的活性上升；但在 5 μM 的濃度時，即可看見柔紅黴素對 AP-1 的活性有明顯的抑制，而且此時也開始產生細胞毒殺效應(表 5-1A)。根據實驗結果，我們也發現不論 AP-1 活性抑制或細胞毒殺效應皆呈現明顯的劑量關係，也就是劑量愈大，效果愈明顯。在加入 TPA 的組別中，則呈現典型的劑量關係；在 5 μM 的濃度時產生明顯的 AP-1 活性的抑制，在 25 μM 濃度時有明顯的細胞毒殺效應產生(表 5-1B)。

在 HepG2/AP-1 細胞中也有類似的現象(圖 5-1C, D) 我們可發現在未加入 TPA 的組別中，少量的柔紅黴素 (0.2-5 μM) 會使 AP-1 的活性上升；但在 10 μM 的濃度時，即可看見柔紅黴素對 AP-1 的活性有明顯的抑制，約在 25 μM 濃度時，開始有細胞毒殺效應產生(表 5-2A) 而加入 TPA 的組別中，則和 Chang liver/AP-1 細胞加入 TPA 之後的狀況一樣，呈現典型的劑量關係；在 10 μM 的濃度時有明顯的 AP-1 活性的抑制，同樣地，約在 25 μM 濃度時，開始有細胞毒殺效應產生(表 5-2B)。

第二節 柔紅黴素可使人類肝細胞株產生 G2-M arrest

將不同濃度的柔紅黴素加入 Chang liver/AP-1 及 HepG2/AP-1 細胞中培養 24 小時，再以流式細胞儀分析其細胞週期，我們發現不論是 Chang liver/AP-1 或是

HepG2/AP-1 細胞，只要 0.01 μM 的柔紅黴素濃度即可使其產生顯著的 G2-M arrest (表 5-3); 大約在 0.1 μM 達到最高的 G2-M arrest 效果; 於 1 μM 時 G2-M 期所佔的比例則有明顯的下降 (圖 5-2)。

第三節 Flavones 有較佳的 G2-M arrest 效果

在將我們所選取的 24 種黃酮類 (濃度均為 25 μM) 加入 Chang liver/AP-1 細胞中培養 24 小時，並分析其細胞週期的實驗中，在和 DMSO 組比較之後，我們發現有 18 種黃酮類的 G2-M 期所佔比例是下降的 (編號 1、2、3、4、5、6、7、8、9、14、15、18、19、20、21、22、23、24); 可使 G2-M 比例上升的有五種 (編號 10、11、12、13、16); 編號 17 則是持平。相較之下，Flavones (編號 9-14) 有較佳的 G2-M arrest 效果 (圖 5-3)。

接著，我們先在 24 種黃酮類 (濃度均為 25 μM) 中加入 0.01 μM 的柔紅黴素並混合均勻，再加入 Chang liver/AP-1 細胞中培養 24 小時然後做細胞週期分析，並將各組所得的結果和只有加入柔紅黴素的組別相較。結果發現只有兩組有些微的 G2-M 比例上升 (編號 2、3); 五種持平 (編號 4、7、16、20、21); 其他的黃酮類則對柔紅黴素所誘發的 G2-M arrest 產生抑制作用 (圖 5-4)。

第四節 高濃度的 apigenin 可使 G2-M 期所佔比例上升

將不同濃度的 apigenin 加入 Chang liver/AP-1 細胞中培養 24 小時後做細胞週期分析，我們發現低濃度 (0-25 μM) 的 apigenin 對 Chang liver/AP-1 的細胞週期影響並不顯著; 但高濃度 (50-100 μM) 的 apigenin 可使 Chang liver/AP-1 細胞的 G2-M 期所佔比例上升 (圖 5-5A)(表 5-4A)。

若將不同濃度的 apigenin 先與 0.01 μM 的柔紅黴素混合均勻，再加入 Chang liver/AP-1 細胞中培養 24 小時，然後做細胞週期分析。我們亦發現類似的結果，也就是低濃度 (0-25 μM) 的 apigenin 並無法顯著影響柔紅黴素對 Chang

liver/AP-1 細胞的作用；但若將apigenin 的濃度提高至 50-100 μ M, 則可見apigenin 對柔紅黴素的藥效有協同作用, 可使 Chang liver/AP-1 細胞的 G2-M 期所佔比例上升 (圖 5-5B)(表 5-4B)。

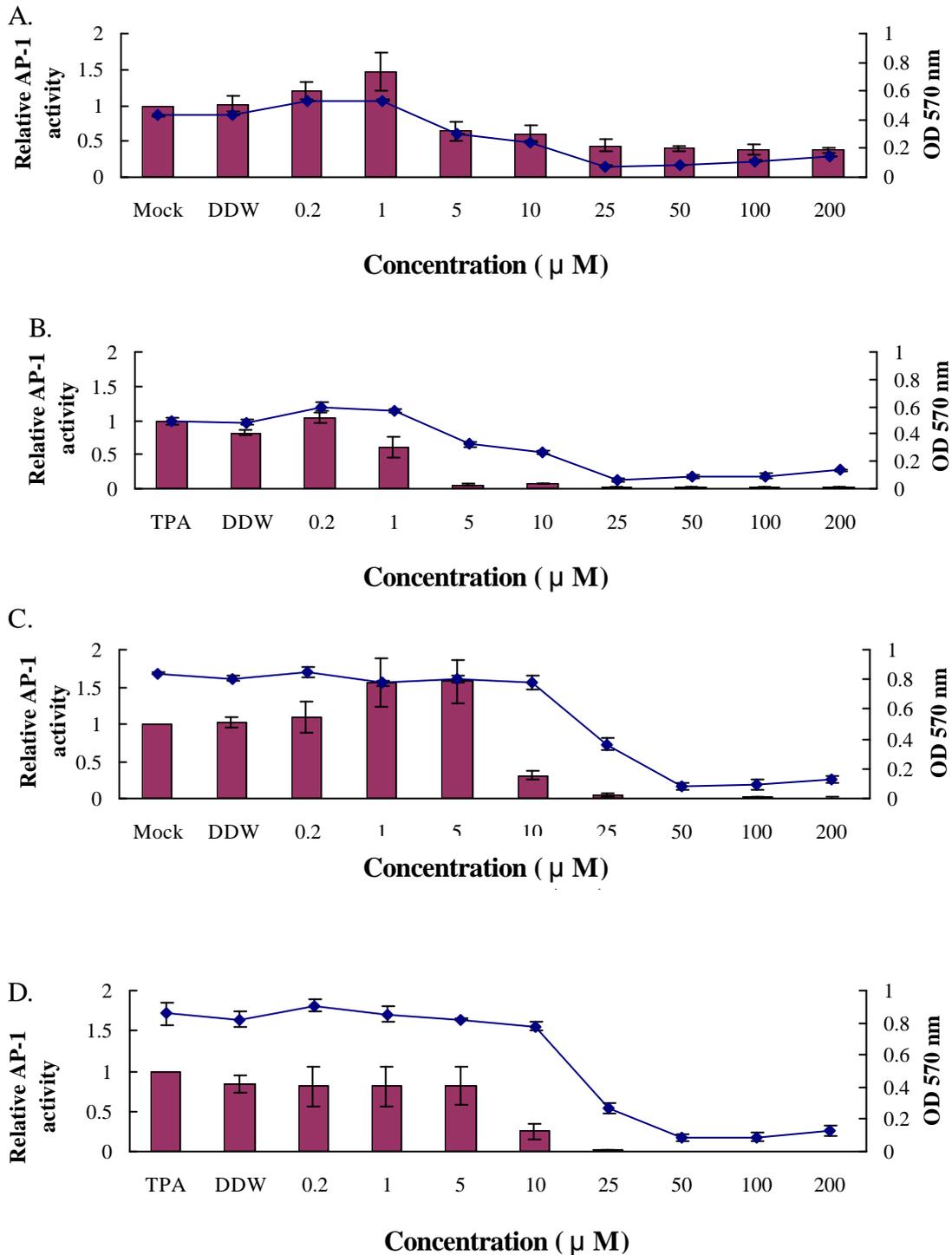


圖 5-1、柔紅黴素可影響由 TPA 所誘發 AP-1 的活性。

將八種不同濃度的柔紅黴素分別加入未含 TPA 的 Chang liver/AP-1 (A) 含 20 ng/ml TPA 的 Chang liver/AP-1 (B) 未含 TPA 的 HepG2/AP-1 (C) 含 20 ng/ml TPA 的 HepG2/AP-1 (D) 等四組不同細胞中，培養 16 小時後，測量其 AP-1 活性及細胞毒殺效應。AP-1 活性以柱狀圖表示，細胞毒殺效應以折線圖表示。其值為三次實驗的平均值 ± 標準差。

A-1. Luciferase Assay (concentration: μM)

	Mock	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	198	201	266	239	104	116	72	70	60	71
2 nd	149	136	168	222	93	109	77	62	59	62
3 rd	179	201	205	307	138	88	80	76	83	64
<i>P</i> value		0.886	0.325	0.070	0.032	0.020	0.018	0.013	0.006	0.014

A-2. MTT Assay (concentration: μM)

	Mock	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	0.422	0.431	0.53	0.524	0.301	0.24	0.075	0.087	0.108	0.141
2 nd	0.435	0.432	0.534	0.534	0.305	0.247	0.083	0.09	0.117	0.144
3 rd			0.53	0.539	0.301	0.252	0.076	0.085	0.109	0.139
<i>P</i> value		0.725	0.033	0.007	0.027	0.005	0.004	0.009	0.004	0.010

B-1. Luciferase Assay (concentration: μM)

	TPA (mock)	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	2575	2196	2839	1818	121	172	70	59	75	57
2 nd	2302	1819	2390	990	160	163	72	65	58	74
3 rd	2579	2093	2514	1721	131	164	56	71	76	61
<i>P</i> value		0.038	0.591	0.052	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001

B-2. MTT Assay (concentration: μM)

	TPA (mock)	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	0.523	0.472	0.556	0.553	0.301	0.259	0.062	0.082	0.094	0.133
2 nd	0.463	0.501	0.608	0.572	0.327	0.259	0.055	0.072	0.067	0.121
3 rd			0.637	0.586	0.341	0.285	0.084	0.112	0.113	0.145
<i>P</i> value		0.869	0.096	0.210	0.077	0.065	0.031	0.024	0.021	0.043

表 5-1、利用學生氏 *t* 檢定來驗證柔紅黴素對 Chang liver/AP-1 的影響。

將八種不同濃度的柔紅黴素分別加入未含 TPA 的 Chang liver/AP-1 (A)及含 20 ng/ml TPA 的 Chang liver/AP-1 (B)中，培養 16 小時後，測量其 AP-1 活性 (A-1, B-1) (計量單位：relative light unit) 及細胞毒殺效應 (A-2, B-2)，並利用學生氏 *t* 檢定，來驗證各組數值和對照組之間是否有顯著差異 ($p < 0.05$)。

A-1. Luciferase Assay (concentration: μM)

	Mock	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	6511	6211	8395	8335	9637	1762	141	71	58	72
2 nd	6221	6615	5371	9060	11757	2322	249	51	58	74
3 rd	5607	5915	6288	10760	7511	1613	425	52	137	55
<i>p</i> value		0.711	0.594	0.033	0.097	0.0003	0.001	0.002	0.002	0.002

A-2. MTT Assay (concentration: μM)

	Mock	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	0.847	0.792	0.83	0.757	0.778	0.723	0.366	0.099	0.114	0.143
2 nd	0.839	0.823	0.822	0.764	0.793	0.763	0.412	0.099	0.12	0.148
3 rd			0.902	0.805	0.833	0.837	0.315	0.048	0.048	0.088
<i>p</i> value		0.246	0.776	0.038	0.120	0.174	0.003	0.0002	0.001	0.0004

B-1. Luciferase Assay (concentration: μM)

	TPA (mock)	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	7589	6529	8176	8203	8223	2419	214	55	79	67
2 nd	9347	8701	5535	6140	6777	1333	90	61	54	78
3 rd	8728	6232	6686	5959	5649	2598	86	55	76	60
<i>p</i> value		0.218	0.140	0.121	0.148	0.001	0.004	0.004	0.004	0.004

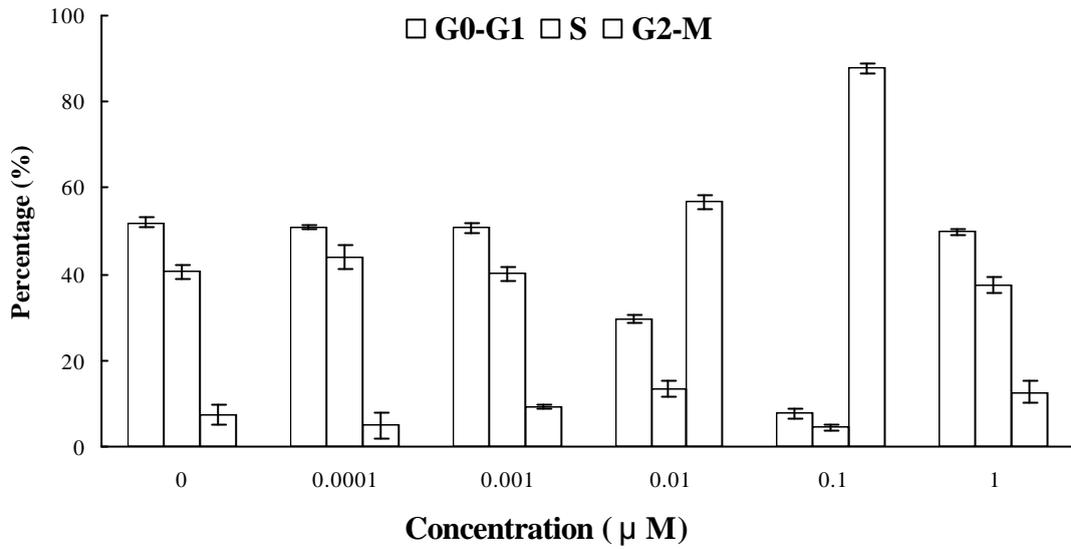
B-2. MTT Assay (concentration: μM)

	TPA (mock)	DDW	0.2	1	5	10	25	50	100	200
1 st	0.788	0.778	0.851	0.802	0.812	0.786	0.231	0.051	0.053	0.089
2 nd	0.93	0.866	0.921	0.842	0.823	0.803	0.315	0.102	0.09	0.147
3 rd			0.953	0.917	0.824	0.749	0.255	0.107	0.121	0.161
<i>p</i> value		0.708	0.613	0.954	0.678	0.458	0.051	0.046	0.044	0.044

表 5-2、利用學生氏 *t* 檢定來驗證柔紅黴素對 HepG2/AP-1 的影響。

將八種不同濃度的柔紅黴素分別加入未含 TPA 的 HepG2/AP-1 (A)及含 20 ng/ml TPA 的 HepG2/AP-1 (B)中，培養 16 小時後，測量其 AP-1 活性 (A-1, B-1) (計量單位: relative light unit) 及細胞毒殺效應 (A-2, B-2)，並利用學生氏 *t* 檢定，來驗證各組數值和對照組之間是否有顯著差異 ($p < 0.05$)。

A.



B.

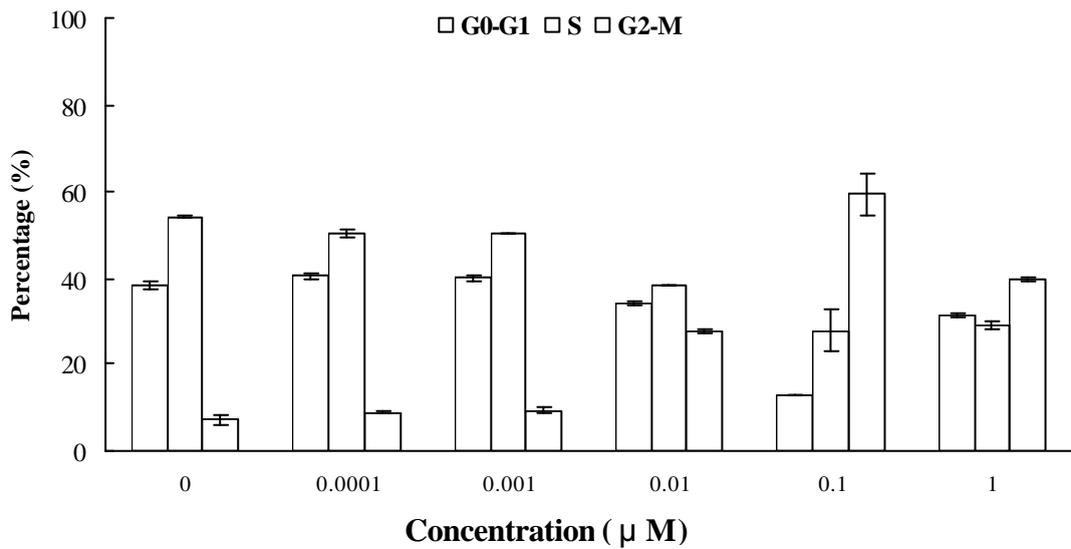


圖 5-2、柔紅黴素可使人類肝細胞株產生 G2-M arrest。

將六種不同濃度的柔紅黴素分別加入 Chang liver/AP-1 (A)及 HepG2/AP-1 (B)細胞中，培養 24 小時後，以流式細胞儀分析其細胞週期。X 軸為柔紅黴素的使用濃度，Y 軸為細胞週期中各期所佔的百分率，各柱形所代表的週期如圖例所示。其值為三次實驗的平均值 \pm 標準差(A)，及二次實驗的平均值 \pm 標準差(B)。

A. Chang liver/AP-1 (concentration: μM)						
	0 (mock)	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
1 st	6.95	0.63	8.54	57.23	86.38	12.35
2 nd	10.62	6.24	9.77	58.49	88.74	15.7
3 rd	4.87	7.81	9.04	54.72	88.44	9.48
<i>p</i> value		0.404	0.434	5.27×10^{-5}	5.42×10^{-5}	0.111

B. HepG2/AP-1 (concentration: μM)						
	0 (mock)	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
1 st	8.41	9.29	9.87	26.87	54.55	40.39
2 nd	5.83	8.53	8.55	28	64.35	39.6
<i>p</i> value		0.385	0.324	0.018	0.046	0.015

表 5-3、利用學生氏 *t* 檢定來驗證柔紅黴素對人類肝細胞株 G2-M arrest 的影響。

將六種不同濃度的柔紅黴素分別加入 Chang liver/AP-1 (A)及 HepG2/AP-1 (B)細胞中，培養 24 小時後，以流式細胞儀分析其細胞週期。本表只選取 G2-M 期所佔的百分率(%)，以學生氏 *t* 檢定驗證各組數值和對照組之間是否有顯著差異 ($p < 0.05$)。

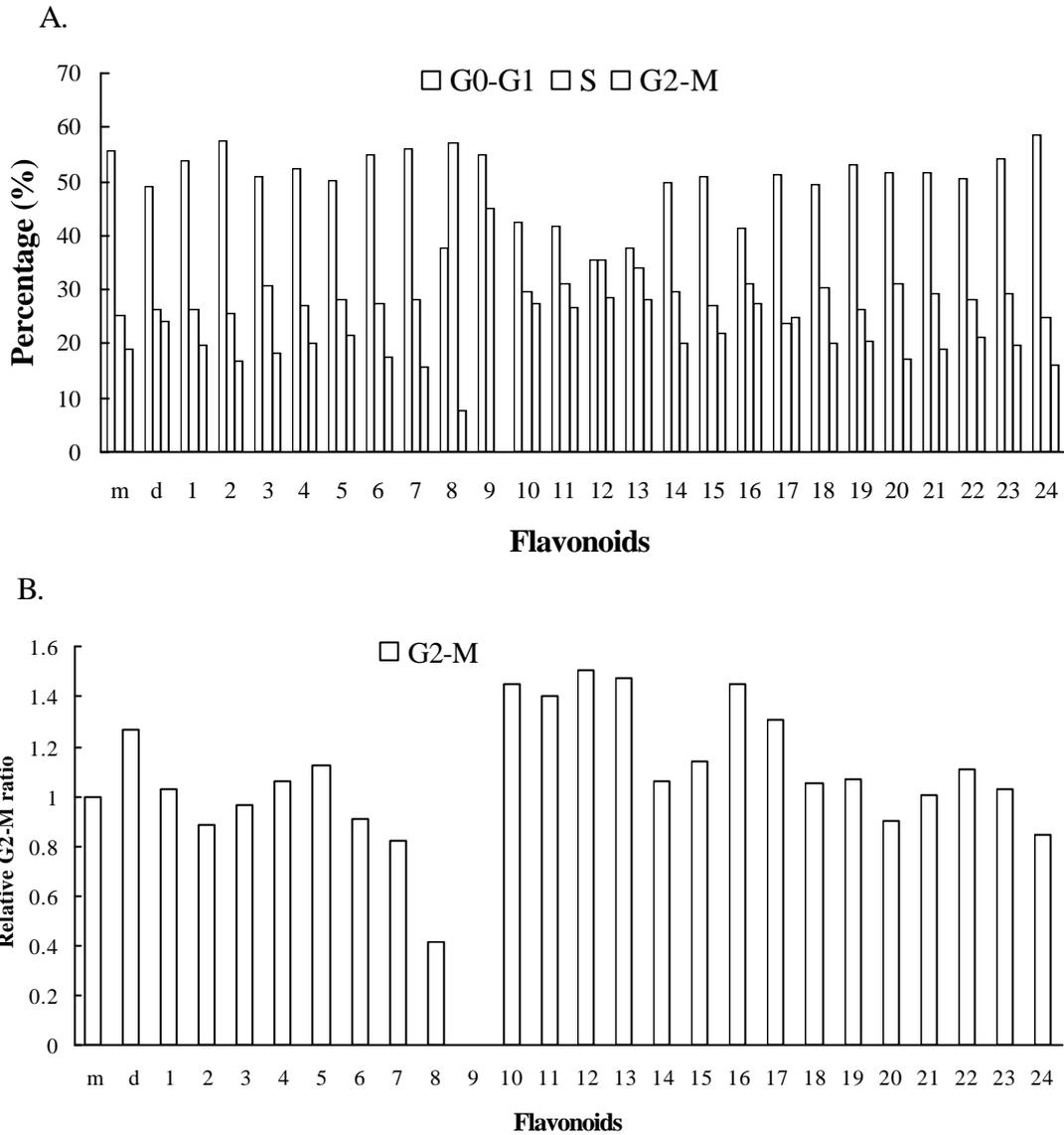


圖 5-3、黃酮類影響細胞週期的效應。

將 Chang liver/AP-1 重組細胞分別處理 25 μ M 共 24 種黃酮類，24 小時後，分析其細胞週期(A)，以藥物處理組相對於對照組之 G2-M 期比例表示(B)。m: Mock, d: DMSO, 1-8 屬於 flavonols(包括 quercetin、rutin、hyperin、kaempferol、morin、galangin、silibinin、3-hydroxyflavone), 9-14 屬於 flavones (包括 baicalein、baicalin、chrysin、luteolin、apigenin 及 flavone), 15-19 屬於 flavanones (包括 hesperetin、hesperidin、eriocitrin、naringenin、naringin), 20-21 屬於 flavanols (包括(+)-catechin、(-)-epicatechin), 22-24 屬於 isoflavones (包括 gentsin、puerarin、formononetin)。

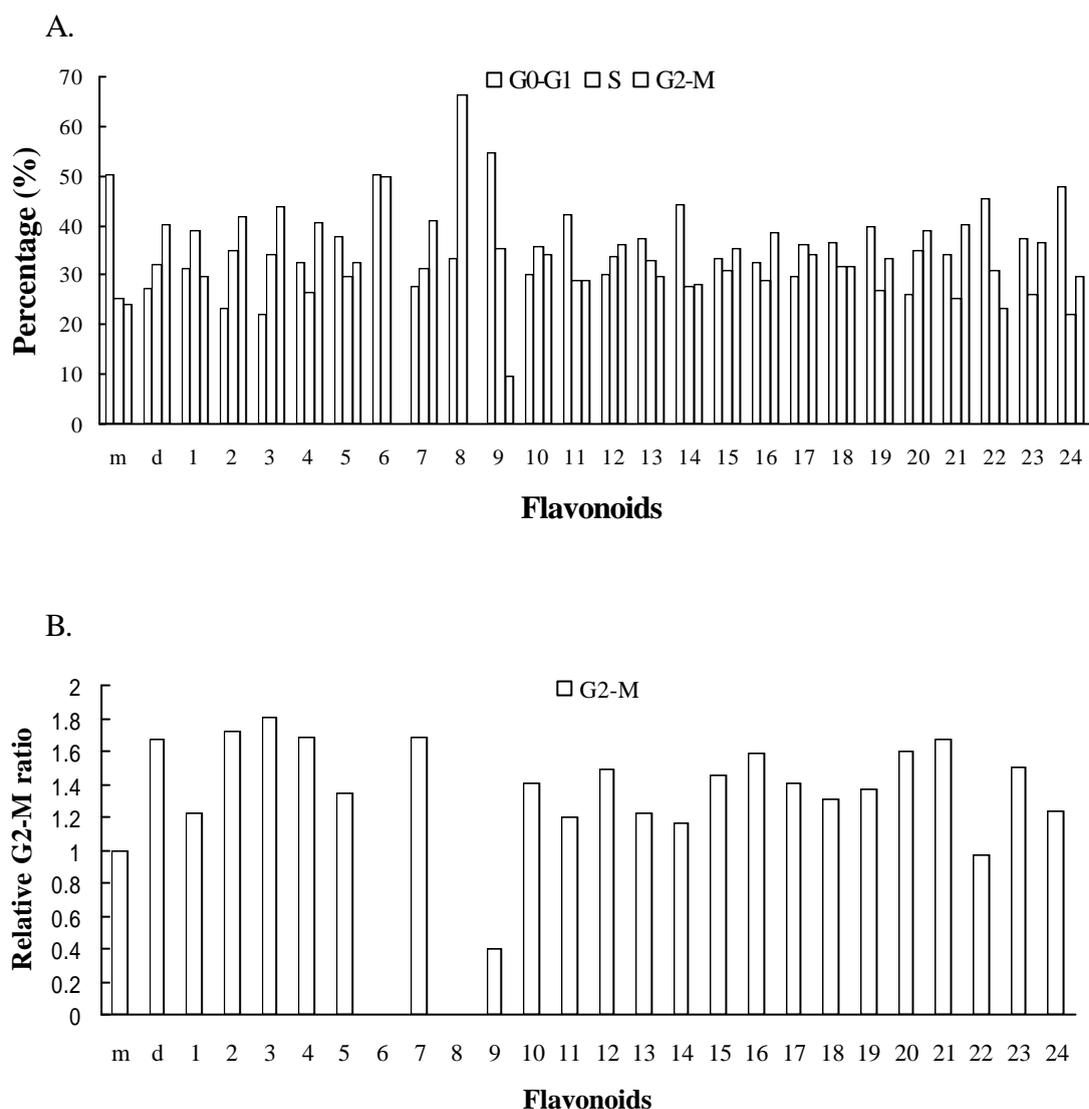


圖 5-4、黃酮類與柔紅黴素影響細胞週期的效應。

將 Chang liver/AP-1 重組細胞分別加入含 $0.01 \mu\text{M}$ 柔紅黴素及 $25 \mu\text{M}$ 黃酮類的混合液共 24 種，24 小時後，分析其細胞週期(A)，以藥物處理組相對於對照組之 G2-M 期比例表示(B)。m: Mock, d: Daunorubicin, 1-8 屬於 flavonols (包括 quercetin、rutin、hyperin、kaempferol、morin、galangin、silibinin、3-hydroxyflavone)，9-14 屬於 flavones (包括 baicalein、baicalin、chrysin、luteolin、apigenin 及 flavone)，15-19 屬於 flavanones(包括 hesperetin、hesperidin、eriocitrin、naringenin、naringin)，20-21 屬於 flavanols (包括(+)-catechin、(-)-epicatechin)，22-24 屬於 isoflavones (包括 gentisin、puerarin、formononetin)。

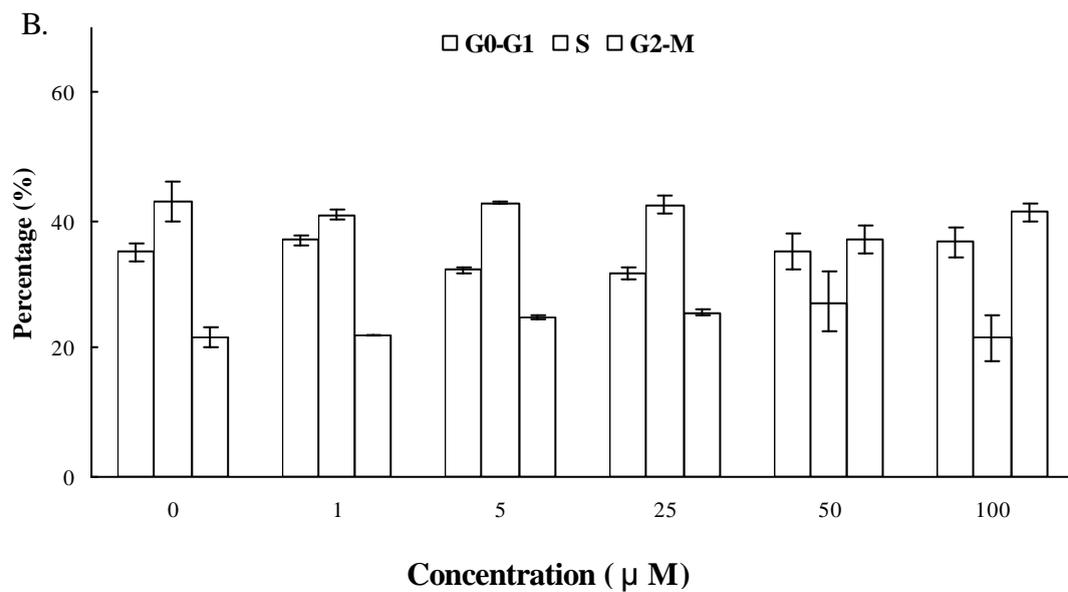
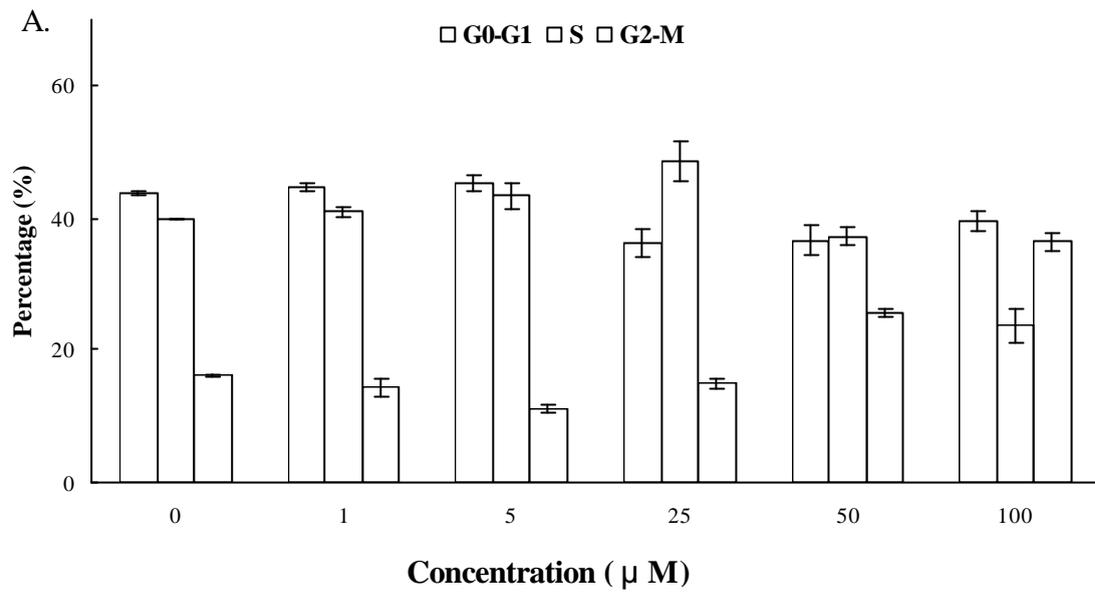


圖 5-5、Apigenin 影響細胞週期的效應。

將六種不同濃度的 apigenin 單獨(A)或是與 0.01 μ M 的柔紅黴素混合均勻(B)，再分別加入 Chang liver/AP-1 細胞中培養 24 小時並分析其細胞週期。其值為二重複實驗的平均值±標準差。

A. Apigenin only (concentration: μM)						
	0 (mock)	1	5	25	50	100
1 st	16.25	12.9	11.73	15.74	26.51	35.26
2 nd	15.95	15.66	10.57	14.17	24.95	37.82
<i>p</i> value		0.411	0.060	0.376	0.044	0.037

B. Apigenin and daunorubicin (concentration: μM)						
	0 (mock)	1	5	25	50	100
1 st	20.14	21.95	24.47	25.17	35.03	40.01
2 nd	23.31	22.09	25.02	26.18	39.46	42.81
<i>p</i> value		0.883	0.301	0.219	0.037	0.012

表 5-4、利用學生氏 *t* 檢定來驗證 Apigenin 影響細胞週期的效應。

將六種不同濃度的 apigenin 單獨(A)或是與 0.01 μM 的柔紅黴素混合均勻(B)，再分別加入 Chang liver/AP-1 細胞中培養 24 小時並分析其細胞週期。本表只選取 G2-M 期所佔的百分率 (%)，以學生氏 *t* 檢定驗證各組數值和對照組之間是否有顯著差異 ($p < 0.05$)。