

## 第四章 研究材料與統計方法

### 第一節 研究材料

本研究使用的人類肝細胞株 Chang liver 及 HepG2 購自美國菌種中心 ( American Type Culture Collection ) ( Rockville, MD ) Dulbecco's modified Eagle's medium ( DMEM ) 購自 Life Technologies。胎牛血清 ( Fetal bovine serum, FBS ) 購自 HyClone ( Logan, UT )。12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate ( TPA )、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide、0.1% SDS-HCl、dimethyl sulfoxide ( DMSO )、柔紅黴素 ( daunorubicin )、黃酮類化合物 ( flavonoids ) propidium iodide ( PI stain ) phosphate buffer saline ( PBS ) RNase 購自 Sigma Chemical Co. ( St. Louis, MO ) Luciferase Assay System 購自 Promega ( Madison, WI )。

### 第二節 細胞培養

本研究使用的細胞株皆培養在含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco's modified Eagle's medium , 並置於 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 保溫箱中。

### 第三節 建立 Chang liver/AP-1 和 HepG2/AP-1 重組細胞

將上游含有 AP-1 結合序列及 TATA box , 下游帶有 luciferase 為報導基因之質體 ( Taylor and Kingston, 1990 ) , 與帶有 Geneticin ( G418 ) 抗藥性基因之質體 pSV3 neo ( Southern and Berg, 1982 ) , 利用 Superfect ( QIAGEN ) 送進 Chang liver 和 HepG2 細胞 , 48 小時後 , 持續於細胞培養基中加入 400 μg/ml G418 進行篩選。最後藉由 luciferase assay 選出 luciferase 活性最強者為實驗細胞株 , 並重新命名為 Chang liver/AP-1 和 HepG2/AP-1 重組細胞。

#### 第四節 黃酮類藥物的製備

將購自 Sigma 的黃酮類藥物溶於乙醇或 DMSO 中，溶於乙醇的有—Kaempferol ( 100 mM ; m.w.=286.2 ) Morin ( 50 mM ; m.w.=302.2 ) Flavone ( 100 mM ; m.w.=222.2 ) Hesperidin ( 82 mM ; m.w.=610.57 ) (+)-Catechin ( 100 mM ; m.w.=290.3 ) 及 Gentisin ( 100 mM ; m.w.=270.2 ) 等，而溶於 DMSO 的藥物有—Quercetin ( 296 mM ; m.w.=338.2 ) Rutin ( 100 mM ; m.w.=610.5 ) Hyperin ( 100 mM ; m.w.=464.4 ) Galangin ( 100 mM ; m.w.=270.2 ) Silibinin ( 300 mM ; m.w.=482.4 ) 3-Hydroxyflavone ( 100 mM ; m.w.=238.3 ) Baicalein ( 308 mM ; m.w.=270.2 ) Baicalin ( 100 mM ; m.w.=446.4 ) Chrysin ( 100 mM ; m.w.=254.2 ) Luteolin ( 100 mM ; m.w.=286.2 ) Apigenin ( 100 mM ; m.w.=270.2 ) Hesperetin ( 500 mM ; m.w.=302.3 ) Eriocitrin ( 100 mM ; m.w.=596.5 ) Naringenin ( 500 mM ; m.w.=272.3 ) Naringin ( 500 mM ; m.w.=580.5 ) (-)-Epicatechin ( 100 mM ; m.w.=290.3 ) Puerarin ( 100 mM ; m.w.=416.4 ) 及 Formononetin ( 100 mM ; m.w.=268.3 ) 等。

#### 第五節 AP-1 活性分析

以不同藥物刺激重組細胞，測定細胞中 luciferase 的量，以瞭解細胞中 AP-1 的活性。按 Luciferase Assay System ( PromegaR ) 之說明，取得細胞萃取物後，以 FB15 luminometer 測量 luciferase 的活性，其結果以 relative light unit ( RLU ) 來表示。

#### 第六節 細胞存活率試驗

將細胞繼代到 96 孔培養盤中，在置入 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 保溫箱中 24 小時後，加入藥物刺激，再分別加入 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide 及 0.1% SDS-HCl，最後利用 570 nm 波長偵測吸光值量的變化。如果吸

光度愈高，表示細胞活性愈佳。

## 第七節 細胞週期分析

將細胞繼代到 24 孔培養盤中，在置入 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 保溫箱中隔夜後，加入藥物刺激，於 24 小時後收取細胞，並以 70%酒精加以固定後置入零下 4 °C 冰箱。至少靜置隔夜後，先以 propidium iodide 染色，再利用 fluorescence-activated cell sorter (FASC)分析細胞週期。

## 第八節 統計方法

本研究利用 Excel XP (MicrosoftR) 來計算多次重複實驗所得的數據的平均值及標準差，並在需要時將對照組設為 1，其他組別的數據則以相對於對照組的倍率的方式呈現。另外，我們也利用學生氏 *t* 檢定 (Student's *t* test) 來檢定同一實驗的各組濃度和對照組之間是否有顯著差異 (雙尾檢定,  $p < 0.05$ )。