

目 錄

封面	
謝詞	
目錄	I
圖次	II
表次	XI
略語表	XI
中文摘要	XIII
第一章 緒言	1
第二章 總論	3
1. 藥用植物學考察	3
2. 疼痛方面之探討	5
3. 發炎方面之探討	7
4. 炎症與癌症	8
5. 乙醯轉移酵素方面之探討	11
6. 癌症方面之探討	13
7. 生物晶片之簡介	16
第三章 材料及方法	18
1. 藥材之採集、萃取及製備	18
2. 急性毒性實驗	19
3. 廣東山葡萄抽取物對於鎮痛及抗發炎上之影響	20
4. 廣東山葡萄抽取物對於大鼠肝臟組織以及血液中芳香胺類化學物質乙醯轉移酵素 <i>N</i> -acetyltransferase (NAT)之影響	22
5. 廣東山葡萄抽取物對於人類血癌細胞株(HL-60)上之影響	26
第四章 結果	36
1. 藥材之萃取及製備	36

2. 急性毒性實驗.....	38
3. 廣東山葡萄抽取物對於鎮痛及抗發炎上之影響.....	39
4. 廣東山葡萄抽取物對於大鼠肝臟組織以及血液中芳香胺類化學物質乙醯轉移酵素 <i>N</i> -acetyltransferase (NAT)之影響.....	40
5. 廣東山葡萄抽取物對於人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60)上之影響.....	43
第五章 討論.....	115
第六章 結論.....	127
參考文獻.....	129
英文摘要.....	142

圖 次

Fig. 1. Original plant and slices of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	36
Fig. 2. Fractionation scheme of methanol extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	37
Fig. 3. The LD ₅₀ of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> in mice orally.	38
Fig. 4. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> or combination with MK-801 in formalin test.	46
Fig. 5. The effects of various extract layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> or combination with MK-801 in formalin test.	47
Fig. 6. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the carrageenin-induced hind-paw edema.	48
Fig. 7. The effects of various extract layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the carrageenin-induced hind-paw edema.	49
Fig. 8. The profile from HPLC indicated that the effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat's liver tissue cytosols.	50
Fig. 9. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat's liver tissue cytosols.	51
Fig. 10. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of PABA in rat's liver tissue cytosols.	51
Fig. 11. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in male rat's liver tissue cytosols.	52
Fig. 12. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in female rat's liver tissue cytosols.	52
Fig. 13. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat's blood cytosols.	53
Fig. 14. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of PABA in rat's blood cytosols.	53
Fig. 15. The effects of various extracted of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -	

acetylation of 2-AF in male rat' s liver tissue cytosols.....	54
Fig. 16. The effects of various extracted of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in female rat' s liver tissue cytosols.....	54
Fig. 17. The effects of various extracted of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of PABA in male rat' s liver tissue cytosols.....	55
Fig. 18. The effects of various extracted of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the <i>N</i> -acetylation of PABA in female rat' s liver tissue cytosols.....	55
Fig. 19. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered 24 hrs before 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat' s liver tissue cytosols.	57
Fig. 20. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered simultaneously with 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat' s liver tissue cytosols.....	57
Fig. 21. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered 24 hrs before 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat' s blood cytosols.....	58
Fig. 22. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered simultaneously with 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat' s blood cytosols.....	58
Fig. 23. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered 24 hrs before 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat' s kidney tissue cytosols.	59
Fig. 24. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered simultaneously with 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat' s kidney tissue cytosols.....	59
Fig. 25. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered 24 hrs before 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat' s urine.....	60

Fig. 26. The effects of crude and various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> administered simultaneously with 2-AF on the <i>N</i> -acetylation of 2-AF in rat's urine.....	60
Fig. 27. Viability of HL-60 cells after treatment with crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> for 24 hours.	61
Fig. 28. Viability of HL-60 cells after treatment with various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> for 24 hours.	62
Fig. 29. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the morphological appearance in HL-60 cells.....	63
Fig. 30. The effects of <i>n</i> -hexane layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the morphological appearance in HL-60 cells.	64
Fig. 31. The effects of chloroform layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the morphological appearance in HL-60 cells.	64
Fig. 32. The effects of <i>n</i> -butanol layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the morphological appearance in HL-60 cells.	65
Fig. 33. The effects of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the morphological appearance in HL-60 cells.	65
Fig. 34. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the DNA fragmentation in HL-60 cells.	66
Fig. 35. The effects of various extract layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the DNA fragmentation in HL-60 cells for 24 hours.	67
Fig. 36. The effects of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the apoptosis in HL-60 cells.	68
Fig. 37. The effects of <i>n</i> -hexane layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the apoptosis in HL-60 cells.	69
Fig. 38. The effects of chloroform layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the apoptosis in HL-60 cells.	70
Fig. 39. The effects of <i>n</i> -butanol layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the apoptosis in HL-60 cells.	71

Fig. 40. The effects of water layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the apoptosis in HL-60 cells.72

Fig. 41. Crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells which were examined by flow cytometry.73

Fig. 42. *n*-Hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells which were examined by flow cytometry:.....74

Fig. 43. Chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells which were examined by flow cytometry:.....75

Fig. 44. *n*-Butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells which were examined by flow cytometry:.....76

Fig. 45. Water layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells which were examined by flow cytometry:.....77

Fig. 46. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 6 hrs, and they were examined by flow cytometry.....78

Fig. 47. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 12 hrs, and they were examined by flow cytometry.....79

Fig. 48. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were examined by flow cytometry.80

Fig. 49. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 36 hrs, and they were examined by flow cytometry.....81

Fig. 50. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in

HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 48 hrs, and they were examined by flow cytometry.82

Fig. 51. The effects of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were examined by flow cytometry. 83

Fig. 52. The effects of chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were examined by flow cytometry. 84

Fig. 53. The effects of *n*-butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were examined by flow cytometry. 85

Fig. 54. The effects of water layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of water layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were examined by flow cytometry.86

Fig. 55. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells which were examined by flow cytometry.87

Fig. 56. The effects of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells which were examined by flow cytometry.88

Fig. 57. The effects of chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells which were examined by flow cytometry.89

Fig. 58. The effects of *n*-butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the

intracellular cyclins distribution in HL-60 cells which were examined by flow cytometry.....	90
Fig. 59. The effects of water layer extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells which were examined by flow cytometry.....	91
Fig. 60. RT-PCR analysis for intracellular cyclins distribution of HL-60 cells repressing in the presence of different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	92
Fig. 61. RT-PCR analysis of CDK ₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	93
Fig. 62. RT-PCR analysis of cyclin E and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	94
Fig. 63. RT-PCR analysis of cyclin A and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> :.....	95
Fig. 64. RT-PCR analysis of cyclin B and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	96
Fig. 65. RT-PCR analysis of NAT ₁ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	97
Fig. 66. RT-PCR analysis of NAT ₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	98
Fig. 67. RT-PCR analysis of cyclin D ₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	99
Fig. 68. RT-PCR analysis of cyclin D ₃ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> :.....	100
Fig. 69. RT-PCR analysis for intracellular cyclins distribution of HL-60 cells repressing in the presence of different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	101
Fig. 70. RT-PCR analysis of CDK ₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	102

Fig. 71. RT-PCR analysis of cyclin E and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	103
Fig. 72. RT-PCR analysis of cyclin A and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	104
Fig. 73. RT-PCR analysis of cyclin B and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	105
Fig. 74. RT-PCR analysis of NAT ₁ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	106
Fig. 75. RT-PCR analysis of NAT ₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	107
Fig. 76. RT-PCR analysis of cyclin D ₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	108
Fig. 77. RT-PCR analysis of cyclin D ₃ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	109
Fig. 78. RT-PCR analysis of caspase-3 in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of <i>Ampelopsis cantoniensis</i>	110
Fig. 79. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the caspase 3 and caspase 9 gene expression on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	110
Fig. 80. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the caspase5 and caspase 8 gene expression on theHL-60 cells by cDNA microarrays.	111
Fig. 81. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the cytochrome C and cytochrome C1 gene expression on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	111
Fig. 82. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the cyclin E and cyclin E2 gene expression on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	112
Fig. 83. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the cyclin D1 and cyclin D2 gene expression on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	112
Fig. 84. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the cyclin D3 and CDK2 gene expression on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	113
Fig. 85. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the cyclin A and Cyclin A1 gene expression	

on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	113
Fig. 86. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the cyclin B1 and Cyclin B2 gene expression on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	114
Fig. 87. <i>Ampelopsis cantoniensis</i> affects the E2F transcription factor gene expression on the HL-60 cells by cDNA microarrays.	114

表 次

Tab. 1. The inhibition (%) of various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on <i>N</i> -acetylation of 2-AF in male rat' s blood cytosols.	56
Tab. 2. The inhibition (%) of various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on <i>N</i> -acetylation of 2-AF in female rat' s blood cytosols.	56
Tab. 3. The inhibition (%) of various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on <i>N</i> -acetylation of PABA in male rat' s blood cytosols.	56
Tab. 4. The inhibition (%) of various extracted layers of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> on <i>N</i> -acetylation of PABA in female rat' s blood cytosols.	56

略 語 表

Ac: *Ampelopsis cantoniensis*

2-AF: 2-Aminofluorene

AAF: Acetyl-aminofluorene

Ac-PABA: Acetyl-para-aminobenzoic acid

CDK: Cyclin-dependent kinase

DNA: Deoxyribonucleic acid

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetate

FACS: Flow cytometry

FBS: Fetal bovine serum

HL-60: Human leukemia cell line

HPLC: High performance liquid chromatography

MPF: Maturation promoting factor

NAT: *N*-acetyltransferase

NMDA: *N*-methyl-D-aspartate

PABA: Para-aminobenzoic acid

PAF: Platelet-activating factor

PBS: Phosphate buffered saline

PGs: Prostaglandins

PI: Propidium iodine

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

RNA: Ribonucleic acid

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

廣東山葡萄之藥理學研究

— 對鎮痛、抗炎、乙醯轉移酵素及人類血癌細胞株方面之研究

博士 研究生 譚思濉

中國醫藥大學 中國藥學研究所

摘 要

廣東山葡萄〔*Ampelopsis cantoniensis* (Hook. et Arn.) Planch.〕屬於葡萄科 (Vitaceae)山葡萄屬(*Ampelopsis*) 植物，生於臺灣全境之山麓至低海拔山區的山坡灌叢或山谷叢林中；為一民間常用之藥材，然於藥理方面之研究則鮮有報導。本研究室針對廣東山葡萄以甲醇抽取、過濾、濃縮後，再以不同溶媒進行分配分離，所得正己烷層(*n*-hexane layer)、氯仿層(chloroform layer)、正丁醇層(*n*-butanol layer)及水層(water layer)，分別進行藥理實驗，所得結果如下。

廣東山葡萄粗抽物及各分層抽取物對於福馬林所誘發的鎮痛作用，在中樞及周邊，均可產生明顯抑制效果，此抑制作用與NMDA接受體有關；各分層中，以極性較大的正丁醇層及水層之抑制作用較明顯。於抗發炎實驗中，可抑制體內致炎物質的釋放，因而產生制炎的作用；各分層抽取物中，也以極性較大的正丁醇層及水層之抑制效果明顯。

廣東山葡萄粗抽物及各分層抽取物對於大鼠肝臟及血液胞質液中乙醯轉移酵素的活性，均產生明顯的抑制作用；而於活體動物實驗中，廣東山葡萄不論事先（預防）或是事後（治療）給與，對於芳香胺類化學物質於體內的乙醯化作用，會產生不同程度抑制。

廣東山葡萄粗抽物，對於人類血癌細胞株，使細胞生長週期終止於 G₀/G₁ phase，主要透過抑制細胞週期內 cyclin E、cyclin D1、cyclin D2、cyclin D3 以及 E2F 基因上的表現。再由基因晶片中顯示，藉由活化粒腺體中 cytochrome C 及 cytochrome C1，進一步活化 caspase 9，最後活化 caspase 3，引起細胞的凋亡。

第一章 緒 言

臨床上為突破某些重大疾病之治療，對於新藥之開發，各國均期望經由各種不同途徑去發現。長久以來，我國傳統醫藥中，雖然提供了豐富的醫療資源及臨床上的實証，但它的理論基礎，並不被一般西方醫學所認同。直到最近，不論是中藥、草藥、亦或是民間藥，才引起國內外學者全面性的進行著有系統及有組織的評估，因此，也逐漸為研究者以及臨床方面的使用者所認同。近年來，由於生物技術上突破性的發展，分子生物學也更加如火如荼蓬勃的展開，因此，一些基因學、分子學、以及免疫學上的治療方法，對於一些無法解決的病症，均投入相當的精力。在我國傳統的醫學中，均已提供了豐富的資源以及臨床上的實証，因此，對於地區性天然物的開發，更是大家不願放棄之重要資源。科技的日益精進與新資源上綿延不絕的開發，於目前雖無立竿見影之效，相信於不久的將來必有其突破的發展。

臺灣位屬於熱帶及亞熱帶地區，高山聳立、溪谷縱橫，到處蘊藏著珍貴的動物、植物與礦物，此些豐盛的自然資源，一直代代相傳的使用於民間。葡萄科 (Vitaceae)的植物廣泛分佈於台灣低海拔山區，其中山葡萄屬(*Ampelopsis*)植物在臺灣有兩種品種(species)，及各別有兩種變種⁽¹⁾：

1. 山葡萄 *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Traut.

山葡萄於臺灣另有兩種變種(varieties)：

- a. 毛山葡萄 *Ampelopsis brevipedunculata* var. *ciliata* (Nakai) Lu
- b. 漢氏山葡萄 *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* (Planch.) Rehder

2. 廣東山葡萄 *Ampelopsis cantoniensis* (Hook. et Arn.) Planch.

廣東山葡萄於臺灣也另有兩種變種(varieties)：

- a. 廣東山葡萄 *Ampelopsis cantoniensis* var. *cantoniensis*
- b. 大葉廣東山葡萄 *Ampelopsis cantoniensis* var. *lecooides* (Maxim.) Lu

山葡萄屬(*Ampelopsis*)的植物於民間，常用於消炎解毒、去瘀消腫、具利濕止痛、消暑熱之效⁽²⁾；許多學者指出：Momordin I, 山葡萄屬根之成分(a compound of *Ampelopsis Radix*)，抑制了 activator protein-1⁽³⁾；毛山葡萄 *Ampelopsis brevipedunculata*，抑制了四氯化碳所誘發小白鼠肝臟的損傷⁽⁴⁾、以及肝毒性⁽⁵⁾，同時還具有抗有機體的突變 (antimutagenic activity)⁽⁶⁾、及治療帶狀泡疹⁽⁷⁾；Japanese *Ampelopsis* 用於預防及治療肝臟細胞膠質纖維的形成⁽⁸⁾；廣東山葡萄 *Ampelopsis cantoniensis* 於中國大陸稱之為無刺根，又名藤婆茶，為傳統的民間用藥，現為大陸衛生部所批准“既是食品又是藥品”的中草藥之一。其所含之成分具有抗自由基氧化、防癌抗癌、抗菌防病毒、抗糖尿病併發症等多種生物活性⁽⁹⁻¹²⁾；於臺灣南部鄉間，更取其葉將其搗碎用以改善婦女乳炎。台灣一般的青草藥店亦常見其蹤跡，可見此類藥材於民間使用之廣泛。若能將此類藥材之藥理活性做一完整性、且有系統性的研究規劃，將有助於新藥方面的開發，以及民眾用藥安全上之保障。因此，本實驗針對廣東山葡萄在抗炎鎮痛、乙醯轉移酵素、及血癌細胞上影響，進行藥理方面的研究。

第二章 總 論

一、藥用植物學考察^(13, 14)

廣東山葡萄 *Ampelopsis cantoniensis* 於中國大陸稱之為無刺根。

【異名】赤枝山葡萄、牛牽絲、紅血龍〔中藥大辭典〕、山甜茶、白菇茶、牛勁須、辣梨茶〔全國中草藥匯編〕、獅子藤〔湖南藥物誌〕、須藤〔福建藥物誌〕、過山龍、骨疼搜、紅腦藤〔浙江藥用植物誌〕、藤茶、鐵甲將軍〔廣西藥用植物名錄〕、母豬精藤〔貴州中草藥名錄〕、田浦茶（廣東）、背帶藤（海南）。

【來源】為葡萄科植物廣東蛇葡萄的根或全株。

【原植物】廣東蛇葡萄 *Ampelopsis cantoniensis* (Hook. et Arn.) Planch.〔*Cissus cantoniensis* Hook. et Arn.〕又名：粵蛇葡萄〔廣東植物誌〕。

落葉性木質藤本，全株無毛，莖粗壯，小枝常帶赤紅色。葉互生，基部具相對粗壯捲鬚，一回羽狀複葉，小葉 3—5 片，偶近二回羽狀複葉。小葉卵形或矩圓形，大小不一，長 3—8cm 寬 2—6cm，3 至 4 回兩歧聚繖花序，花小形，長約 2 公分。花期 4—7 月，果期 5—8 月。生長於海拔 500—1,500 公尺的山區灌叢或密林中。分佈於安徽、浙江、江西、福建、台灣、湖南、廣東、海南、廣西、貴州、雲南等地。

【化學成分】全株與葉含楊梅樹皮素 (myricetin)、二氫楊梅樹皮素 (dihydromyricetin)。大陸文獻報導中指出⁽¹⁰⁾，由無刺根及炮製呂藤婆茶餅的熱水提取物中，用柱層分析法分離到兩種黃酮成分，經理化性質及光譜數據，分別鑑定為雙氫黃酮醇類化合物蛇葡萄素 (ampelopsin) 和黃酮醇化物楊梅素 (myricetin)。

【藥性】味辛、微苦、性涼。

1. 〔全國中草藥匯編〕：甘、微苦、涼。

2. [湖南藥物誌]: 甘、澀、涼。

3. [福建藥物誌]: 辛、微溫。

4. [浙江藥用植物誌]: 苦、涼。

【功能與主治】祛風化濕、清熱解毒。夏季感冒、風濕脾痛。

1. [全國中草藥匯編]: 清熱解毒、解暑。主治暑天感冒、皮膚濕疹。

2. [湖南藥物誌]: 清熱解毒、祛風鎮痛。主治風濕關節痛、坐骨神經痛、感冒風熱、咽喉腫痛、急性結膜炎。

3. [福建藥物誌]: 疏風解表。

4. [浙江藥用植物誌]: 清熱解毒。主治骨髓炎、急性淋巴結炎、急性乳腺炎、濕疹、丹毒、瘍腫、嗜鹽菌食物中毒。

【用法與用量】內服：煎湯，15—30 公克。外用：適量，煎水洗；搗碎或研成粉末調敷。

【附方】

1. 治感冒風熱，咽喉腫痛：(廣東蛇葡萄根、莖 15—60 公克，水煎含漱)。

2. 治風濕關節痛、坐骨神經痛：(廣東蛇葡萄根、莖 15—30 公克，水煎服)。

3. 治急性結膜炎：(廣東蛇葡萄全株，煎水燻洗)。

4. 治多發性囊腫：(廣東蛇葡萄根 15 公克，酒、水各半煎服)。

5. 治嗜鹽菌食物中毒：上腹絞痛、腹瀉、大便如洗肉水(生無刺根 45 公克、生姜 15 公克，加水 2 碗煎，一次或分次服用。小孩、老人家及輕症者，酌減)。

【現代臨床研究】治療葡萄球菌等引起的感染性疾病。

用廣東山葡萄煎劑、注射劑、片劑，治療葡萄球菌、綠膿桿菌等引起的感染性疾病(如骨髓炎、急性淋巴結炎、急性化膿性乳腺炎、蜂窩性組織炎、瘍腫、膿腫、濕疹、丹毒、急性喉頭炎及扁桃體炎、急性牙槽囊腫、化膿性中耳炎及乳突炎、急性腎炎)。

二、疼痛方面之探討

疼痛，是感覺及情緒上不愉快經驗的總合，並與組織傷害的訊息，息息相關。雖然，其無時無刻在困擾著人們，但卻是身體健康上的一種警訊。無論是內在或外在所引起之疼痛，都包含著許多複雜性的生理、及心理上的反應。長久以來，不論於基礎或是臨床方面，許多專家學者都由各種不同角度對於疼痛以及鎮痛方面的問題進行研究與剖析，因此，止痛劑雖不斷推陳出新，然臨床上目前仍以西藥治療為主，對於一些比較劇烈之疼痛（如癌症方面所引起的疼痛），就必須使用到成癮性麻醉鎮痛劑，雖其作用快速且又有很好的止痛效果，但其副作用往往造成諸多身體與精神方面的困擾。另外，一些非成癮性之鎮痛劑，亦有或多或少毒作用，如 acetaminophen 所導致肝臟方面毒性，水楊酸類的製劑所造成消化系統方面的不適。因此，如能篩選出於鎮痛方面具有相當大的抑制作用，且副作用又小之藥物，則對疼痛的治療上，不啻為一大福音。

福馬林試驗是由 Dubuisson 和 Dennis 於 1977 年提出⁽¹⁵⁾，利用福馬林溶液注射至動物之足蹠引起疼痛，使動物產生舔蹠及頓足之行為表現。此一動物實驗模式於 1984 年經由 Takahashi 等學者^(16,17)研究發現，其所產生舔蹠反應呈現雙相作用(biphase response)，即其舔蹠時間具兩個高峰期，0~5 分鐘，即早期反應(early phase)，主要是由神經所傳導，其機轉乃藉由直接刺激疼痛接受器(nociceptor)，致使 substance P 或 bradykinin 等致痛物質釋放出，此方面所引起的痛覺途徑是由中樞所媒介之；15~30 分鐘，稱為晚期反應(late phase)，主要是由福馬林溶液所引起的發炎現象，與 histamine、serotonin、 prostaglandin、 kinin 等化學傳遞物質的釋出有關^(16,17)。因此，利用此一實驗模式來評估鎮痛作用時，可區分鎮痛的途徑是來自於中樞抑或是周邊。

NMDA 是一種小分子興奮性氨基酸，其接受體的興奮性，會造成單價或雙價離子通透性增高⁽¹⁸⁾。在強烈的神經興奮時，它會使鈣離子的通透性增加，產生興奮性電位。其所形成的第二訊息進入細胞核，造成和疼痛有關蛋白質的合成，神經元會因為這些蛋白質的合成，改變其興奮性以及其表現。經由一個強烈

疼痛刺激或慢性疼痛的刺激以後，神經元會因為基因方面的改變，而完全變成另一種樣子，這就是造成神經可塑性的成因。興奮性胺基酸於神經傳導的途徑中扮演著相當重要的角色，尤其是 glutamate。其存在於突觸前神經元，而 NMDA 則位於突觸後神經元之受體。當一個傷害性的刺激經由了 Ad、C 末梢神經纖維傳入後，先會活化了初級傳入神經(primary afferent nerve)，此時，背角的中間神經元增加了 glutamate 的釋出⁽¹⁹⁾，進而活化 NMDA receptor，加強了疼痛訊息的傳遞^(20,21)。NMDA 接受體的拮抗劑，會抑制了 NMDA 接受體的活化，進而抑制了痛覺訊息的傳遞，降低疼痛行為上的表現⁽²²⁻²⁸⁾。

三、發炎方面的探討

炎症(inflammation)，係人體行自我防衛的一種生理反應，即本身對於傷害所採取的防衛措施之一。於外觀上所看到的徵候是紅、腫、熱、痛。炎症反應的過程相當複雜，一般都以急性炎症為例而區分為三個時期⁽²⁹⁾。第一期稱為微血管滲透性增進期，此期媒介參與的物質極多，其中較為重視的如 prostaglandins (PGs)、leukotrienes (LTs)、 histamine、 bradykinin、 serotonin and platelet-activating factor (PAF)⁽³⁰⁾，它們除了本身會刺激感覺神經來引起疼痛或搔癢外，也會造成血管擴張（以組織胺的作用最強），使水分滲出，而引起了浮腫。其次，於血管擴張下，血清蛋白也會浸出到血管外，而產生白血球浸潤的第二期炎症反應了。第二期又稱之為白血球浸出期。白血球係人體的主要防衛細胞，自血管滲透出來後，即向致炎部位遊走(chemotaxis)，大量的動員白血球，希望能將致炎物質吞噬(phagocytosis)，同時，也利用細胞內的溶解酵素(lysosomal enzyme)將之毀滅，以完成防衛的使命。第三期稱之為組織修復和增殖期。經過了兩期的戰鬥，人體的白血球戰勝或是藉由藥物而控制了炎症的話，體內組織即會再生與增殖，以修復受到炎症傷害的部位。輕微的話，則趨向於自然療癒的境界；嚴重時，傷害的部位會引起了膿瘍、潰瘍、壞死以及肉芽腫等病理變化，甚至於演變成慢性炎症的後果^(29,31)。

鹿角菜膠(carrageenin)係具有硫酸基的黏液多醣體，對組織具有刺激作用，通常在動物實驗研究時，可用來刺激動物的蹠部，以誘發炎症的反應；其次，注射 formalin、 capsaicin、 HCl 及 KCl 所引起的致炎反應，其成本較低，適用於實驗課時參考使用；至於加熱的燒傷或紫外線的照射亦可誘發炎症，也較接近自然的炎症反應，然而其發炎的程度並不明顯⁽²⁹⁾。

因此，本研究利用福馬林對實驗動物所引起之舔蹠疼痛模式，及鹿角菜膠(carrageenin)對實驗動物所誘發之炎症反應，以進行廣東山葡萄於此方面相關的研究，藉以了解其藥理之作用機轉。

四、炎症與癌症

“炎症”與“癌症”是否有任何相互關連，此為我們進一步要探討的問題。馬偕醫院於 1998 年提出“發生大腸直腸癌的危險因子有那些”的文章中提出，病患如有潰瘍性大腸炎或克隆氏大腸炎的病史者，發生大腸癌的機率偏高；中華藥訊（第 54,55 期）也指出，慢性發炎目前被視為癌症的一個危險因子，特別是上皮腫瘤的形成(Epithelial carcinogenesis)；中國大陸的報導中指出，子宮發炎與子宮頸上的糜爛皆有可能漸漸進行至癌症前期之變化；至於眾所皆知的肝癌患者中，90%曾經有 B 型肝炎的感染，而其帶原率也高達 70~80%，故 B 型肝炎與肝癌有密切的關係。

Shacter 指出⁽³²⁾，慢性的腸炎(chronic inflammatory bowel disease)，會增加了大腸癌(colon carcinoma)發生的機率。慢性發炎經由許多不同的因素，如細菌、濾過性病毒、以及寄生蟲的傳染；及化學上的刺激和體內一些無法分解的粒子(nondigestible particles)。持續性的發炎，確實為引起癌症的高危險群；Farrow 指出⁽³³⁾，胰臟癌，是一種非常不易預知的疾病，同時其細胞內的作用機轉也不十分清楚，針對遺傳上的(hereditary)以及偶發性的(sporadic form)慢性胰臟炎(chronic pancreatitis)而言，會增加了胰臟癌(pancreatic cancer)發生的比例。在一個發炎的胰臟中，增加了整組遺傳因子上的損傷(genomic damage)以及細胞上的增殖(cellular proliferation)，此兩者非常利於正常胰臟細胞上的惡性變異(malignant transformation)；另外，cytokines、reactive oxygen species 以及一些調節發炎的物質（如 NF-kappaB and COX-2），都會加速了細胞週期的進行，如此一來，腫瘤抑制的功能(tumor suppressor function)喪失了，接著，刺激了致癌基因的表現(oncogene expression)，因而導致了胰臟癌的產生。Quirk 指出⁽³⁴⁾，到目前為止，針對女性的上皮細胞卵巢癌(epithelial ovarian cancer)的病因學上還不是十分清楚，就女性的生殖系統(upper genital tract)而言，慢性的感染(chronic infection)、以及持續性的發炎 (persistent inflammation)，都與上皮細胞卵巢癌的發病有關；Schwartzburd⁽³⁵⁾也指出，慢性的發炎(chronic inflammation)有能力產生

一個強而有力的“vicious self-sustaining loop(s)”，此一有害且持續性小小的一個孔洞，進一步的形成了 pro-cancer microenvironment 的溫床，在這環境下，非常有利於腫瘤細胞的生存以及增殖。

“炎症”與“癌症”的關係，早於 1863 年 Virchow 即提出此一假說，癌症起源於慢性發炎的部位。當組織受了某些刺激，合併組織的損傷及持續性的發炎，這些現象會引起細胞的增殖(cell proliferation)。當然目前已瞭解只就單獨細胞上的增殖而言，並不會引發癌症的產生，然而針對了一個環境中含有大量的發炎細胞、生長因素(growth factors)、活化性的基質(activated stroma)、以及具有促使 DNA 損傷的物質存在時，這些原因都增加了腫瘤(neoplastic)的發生率⁽³⁶⁾。

Peyton Rous 首先提出了癌症是來自於“subthreshold neoplastic states”，主要是指濾過性病毒或是化學致癌物質所引起身體平衡上的失調^(37,38)。此即所謂之“initiation”，最初引起 DNA 上的改變(DNA alterations)，此為不可逆之；然後持續性的影響到其它正常組織，進而產生續發性的刺激，此稱為“促進作用(promotion)”。促進作用起因於初期的細胞(initiated cells)暴露於化學性的刺激物中，如 phorbol esters，於受傷的部位會有一些因子釋放出，特別是器官切除、賀爾蒙或是慢性的刺激以及發炎的現象。另外有許多的“促進因子(promoter)”，均會直接或間接的引起細胞上的增殖、恢復了發炎的細胞、增加了不活化的氧元素產生，接著引起 DNA 的氧化，減少 DNA 上的修復。長期性的發炎組織，會引起細胞的死亡亦或是修復。正常的發炎現象本身都有一“self-limiting”，因會產生 anti-inflammatory cytokines，接下來，pro-inflammatory cytokines 會關閉。因此，Cytokine 以及 chemokine 之間的平衡，與腫瘤的生成有密切的關係。

如今，發炎、先天性的免疫、與癌症之間的關係，也廣泛的為大家所接受了。然而，許多分子以及細胞上的機轉至今仍未能完全的瞭解，腫瘤細胞可能侵犯了一個主要的作用機轉，此即炎症與癌症的一個介面，進一步的再移植到此一宿主上。因此，免疫上的反應對於癌症的關係與發炎上的反應是息息相關之。

又，癌症的產生與基因上的突變有相當大的關連，基因上的突變可能改變

了細胞正常的分裂，進而於標的器官(target organs)上無法行使正常的功能，繼而引起組織上病變，終而導致致癌效應。基因上的突變與細胞分裂上的異常，與體內一些乙醯轉移酵素有特定的關係。乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase)簡稱 NAT，存於大多數動物體內。人體內的乙醯轉移酵素(NAT)，最基本的作用是乙醯化外來的藥物或化學物質。它可能活化了原先穩定且活性較低的化學有害物質，接下來再由體內一些其它酵素更進一步代謝成更具活性的代謝產物。此活性的代謝產物，可能干擾了細胞的週期、細胞的分裂、DNA 複製上的失敗(DNA 序列上的改變)、 mRNA 轉錄過程上的變異，因而引起了基因上的突變，導致了標的組織器官上癌症的產生。

五、乙醯轉移酵素方面之探討

近幾世紀以來，由於科學突飛猛進、工業上的快速發展，人們雖享有更舒適的生活品質，但伴隨而來的卻是更多對人類有害的化學物質，於此一大環境中，正逐年增加。目前已知約有 60,000 種的化學物質為世人所使用，然每年又有近 500 種新的化學物質被研發⁽³⁹⁾。此些化學物質，對人類而言，除了日常生活及職業的接觸外，已有愈來愈多的報告指出，人類食物中也存有許許多多此些化學物質；此類物質會導致癌症的特性已被確立，然更可觀的是人類癌症的來源，竟高達 70~90% 與此些化學物質有密切的關係⁽⁴⁰⁾。

1945 年 Lipmann's⁽⁴¹⁾ 提出有關乙醯轉移酵素(*N*-acetyltransferase; NAT)的報告後，陸陸續續於不同種系的動物及不同組織中，一一被證實⁽⁴²⁻⁴⁹⁾。近年來，宿主體內的乙醯轉移酵素(NAT)對於化學致癌物所引發的致癌作用中，被認為扮演著相當重要的角色。當 Arylamine 類的致癌物質進入到生物體後，首先由宿主體內的乙醯轉移酵素(NAT)將其乙醯化，然後再由其它的酵素(例如 glucuronyl transferase、deacetylase、sulfontransferase and cytochrome 450)進一步代謝成更具活性的代謝產物。此些活性的代謝產物，會與細胞中的一些大分子，如 DNA (deoxyribonucleic acid)形成了共價的 DNA 衍生物(DNA adducts)，致使 DNA 複製或轉錄成 RNA 時產生了變異，引起了錯誤蛋白質產生^(50,51)，進而導致基因上的突變⁽⁵²⁾。以上種種變異，可能大大改變了細胞正常的分裂，因而引起不同標的器官(target organs)無法行使正常功能，終而於一些特定組織中引發致癌的效應⁽⁵⁰⁾。

DNA-carcinogen adduct 的形成，已證實為 Arylamine 引發致癌效應之重要因子，而 DNA-arylamine carcinogens adducts 的形成，與這些致癌物質之致癌性、細胞毒性 cytotoxic、突變性 mutagenic 有關⁽⁴⁴⁾。近年來許多文獻指出，當小鼠暴露於含有 2-Aminofluorene (2-AF)的環境中，證實會引起肝臟、膀胱以及血液中 DNA-AF adducts⁽⁴⁷⁾。又於其它報告中指出，NATs 不只存於動物及人體的組織中，另外像是一些細菌(bacteria)、黴菌(fungi)⁽⁵³⁾、寄生蟲(parasite)⁽⁵⁴⁾、甚至於一

般水果蔬菜中也存有之。根據流行病學研究中指出，乙醯轉移酵素基因型的多型性與癌症的發展有關⁽⁵⁵⁾。當個體暴露於含有化學致癌物質（如芳香胺類化合物）的環境中，若個體的乙醯轉移酵素活性升高，則個體罹患癌症的機會也相對的增加。又當個體肝臟組織中乙醯轉移酵素活性改變時，則與不同癌症發生率亦有直接的關係^(56,57)。由人類與動物的實驗模式中已經證實，個體上的差異對於 acetylation capacity 及 drug toxicity 兩者間的相關性⁽⁵⁸⁾。因此對於人類標的器官及組織中 NAT 活性遺傳上的變異性，可視為個體暴露於致癌物 (arylamine-induced neoplasm) 產生風險上的指標。

人類控制乙醯轉移酵素的基因位於 8 號染色體上(8p22)，包括 NAT1、NAT2 Locus⁽⁵⁹⁾。又有學者於小白鼠體內發現了第三種 NAT 基因，稱之為 NAT3^(60,61)。NAT1 以及 NAT2 基因的種類截至目前為止已發現有 24 種不同的 NAT1 及 26 種不同的 NAT2 基因型^(62,63)，且不同的 NAT 基因型於種族間的分佈亦不同⁽⁶⁴⁾。人體組織中 NAT 的分佈並不均勻，NAT2 主要分佈於肝臟，NAT1 則分佈於肝以外的組織中⁽⁶⁵⁾。又依 NAT 酵素之乙醯化活性的速度，可將個體分為快和慢的乙醯轉移者⁽⁵¹⁾，由流行病學統計顯示，快速乙醯轉移者當暴露到芳香胺類化合物，如 2-aminofluorene 時，會有較高的危險得到大腸直腸癌⁽⁶⁶⁾；相對的慢速乙醯轉移者，較易得到膀胱癌⁽⁶⁷⁾。

綜合以上的學者指出，當提升了體內 NAT 酵素的活性時，會增加個體對各種芳香胺類致癌物的敏感性，因而增加了個體基因突變的機率，於是，各種病變產生的機率也相對的增加。因此，是否減少了 NAT 於體內對這些化學物質代謝的活性，也就可以減少了基因上的突變機率，相對的也減少了癌症的產生。此也為目前我們研究所追尋的目標。

六、癌症方面之探討

癌症，為目前群醫束手無策病症之一。此乃細胞不受抑制上的分裂而增殖^(68,69)，其不但沒有正常生長所應有的控制機轉，同時又具有侵犯正常組織與遠處轉移上的特性⁽⁷⁰⁾。目前於臨床上，均使用化學製劑，直接殺死癌細胞，在此同時，也傷害了正常的組織。相對於臨床上的治療，也受到種種限制。因此，目前一些學者的研究方向乃針對改變癌細胞生物學上的活性，使其喪失某些主要的特性，而中止癌細胞持續的發展，此為當前癌症研究上一發展的新趨勢⁽⁷¹⁾。

在正常情況下，身體內每個細胞都有一定的壽命，時間一到，細胞便會自然凋亡(apoptosis)，就像每年秋天一到，樹葉便會變色而脫落，這種細胞自戕行為也就是所謂程式化的細胞死亡(programmed cell death)。換言之，時時刻刻都有成千上萬的細胞走向死亡。一般而言，多元細胞生物的成長與生命維持，不僅需要新細胞的形成與生長，且當細胞變成多餘或紛亂無章時，能自行凋亡。但，癌細胞的產生就是因為逃脫了既定的自殺程序與機制。分子生物學家發現在染色體的末節有一段染色體終端(telomere)，負責維護 DNA 雙螺旋結構的完整性，每當細胞分裂一次，染色體終端便短少一些，於是變得越來越短，當細胞分裂到 100 次時，它就變得相當短小，無法再維繫 DNA 的正常分子結構，最後細胞便自戕。絕大多數細胞的分裂均受染色體終端所規範，只有精蟲與癌細胞例外，染色體終端減損並不會發生，因此這兩種細胞可進行分裂達幾千次以上。

正常人體細胞的 DNA 是雙套的(2N)，但是有些癌症細胞的 DNA 可能為不成套，也就是說其 DNA 含量較正常細胞多或少；因此測定癌細胞內 DNA 的含量可以做為一有價值的指標，即可求出癌細胞在 G_0/G_1 時期 DNA 的含量與正常細胞 G_0/G_1 DNA 含量上之差異。另外由 DNA 含量的分析，也可瞭解細胞週期分佈情況。於細胞週期中，一個細胞所在的時期可由 DNA 的含量來決定。 G_0/G_1 時期的細胞含有雙套染色體(2N)， G_2 與 M 時期的細胞含有 4 套染色質(4N)，S 時期的細胞是屬於 DNA 合成時期，其 DNA 的含量介於 G_0/G_1 與 G_2/S 之間⁽⁷²⁾。

藉此可了解藥物於 DNA 上的特性，更進一步得知藥物對於癌細胞 DNA 上所引起的損傷作用。

細胞週期(cell cycle)是指由一個細胞有絲分裂(mitosis)中心點開始，到分化後的子細胞(daughter cell)之中心點為止，代表著一次增殖的現象。細胞的增殖可分為以下幾個階段：(1) G₀ 期(休止期)，此時細胞於休息狀態下不再分裂增生，但可再進入週期內行細胞分裂；(2) G₁ 期（分裂後期），此時細胞開始分裂，為 DNA 的合成作準備；(3) S 期（DNA 合成期），細胞內 DNA 合成期間，進行染色體的複製；(4) G₂ 期（分裂前期），細胞內 DNA 合成結束到有絲分裂開始之準備；(5) M 期（有絲分裂期），此階段細胞進行有絲分裂(mitosis)，形成兩個子細胞⁽⁷²⁻⁷⁴⁾。正常細胞與癌症細胞皆經相同之生長週期，而兩種細胞之相異點在於生長週期中各階段的細胞數。細胞的分裂由非常複雜的機制所調控，以下是幾個重要的調控方式：(a) Cdk (cyclin dependent kinase，可將磷酸根加到蛋白質上) 與 cyclins 是控制細胞週期中細胞由一個狀態進入下一個狀態的主要物質，可使細胞由 G₁ phase 進入 S phase 或由 G₂ phase 進入 M phase。(b) MPF (Maturation Promoting Factor)，包括 Cdk 和 cyclins，是推動細胞週期進展的物質。(c) p53，是 DNA 受到損害時，可以阻止細胞週期向前推進的蛋白質。如果損害很嚴重，p53 可進行有計畫的細胞自我毀滅，也就是細胞的自殺(程式細胞死亡 apoptosis)。癌症就是由於細胞週期上的紊亂，細胞喪失了正常的行為與生長方式而產生的疾病。

癌症的生長也有固定的週期，Cyclin-dependent kinase (CDK)與 Cyclins 是推動細胞週期進展的物質，兩者需結合才可使細胞由 G₁ phase 進入到 S phase 或由 G₂ phase 進入到 M phase⁽⁷⁵⁾。其中 Cyclin D1、Cyclin D2 以及 Cyclin D3 結合了 CDK4 以及 CDK6，作用於 G₁ phase 中期至晚期之間；Cyclin E 和 CDK2 結合，作用於 G₁ phase 晚期；Cyclin A 和 CDK2 結合，作用於 S phase 至 G₂ phase 期；Cyclin A Cyclin B1 結合了 CDK1 作用於 G₂ phase 至 M phase 期 又，Cyclin-CDK 複合物受兩組抑制劑調控，一組是專一抑制 Cyclin D-CDK4/6 的 p15、p16、p18、

p19，另一組是可抑制多種 Cyclin-CDK 複合物的 p21、p27 以及 p59^(76,77)。已有學者發現，抗癌藥物 Silymarin 藉由抑制了 Cyclin D₁ 以及 Cyclin E 而使人類前列腺癌細胞株(human prostate carcinoma DU 145 cells)以及人類乳癌細胞株(human breast cancer cells MDA-MB 468)的細胞週期停止於 G₁ phase (G₁ arrest)^(78,79)；另外也有學者指出 Inostamysin 也是藉由抑制了 Cyclin D₁ 以及 Cyclin E 的表現，引起了正常細胞的細胞週期停止於 G₁ phase⁽⁸⁰⁾；Inostamysin 同時也會藉由抑制 Cyclin D₁ 而造成人類小細胞肺癌細胞的細胞週期停止於 G₁ phase⁽⁸¹⁾。因此，如果一些藥物能有效終止癌細胞於週期上的分裂，則對於抗癌藥物的開發，可能會有突破性的啟示^(71,72)。

七、生物晶片(Biochip)之簡介

高等動植物的染色體 DNA 位於細胞核內，所有的基因密碼都存放在 DNA 上無法移動。當細胞的外在環境改變而需要製造蛋白質或是酵素來作回應時，染色體的 DNA 開始將他的基因密碼複製到 mRNA 上面，因為 mRNA 一次只抄錄一個基因的密碼檔案，所以長度較短，可以自由的離開細胞核而進入到細胞質內。在細胞質內，核糖體會抓住 mRNA，然後從頭到尾讀取基因檔案，並同時根據密碼的順序，以相對應的胺基酸，合成蛋白質長鏈，新合成的蛋白質可以行使適當的功能。這個 DNA 經由 mRNA 到合成蛋白質的程序便稱為基因表現。當蛋白質需求量增加時，抄錄出來 mRNA 的量就會提高，因此，比較細胞在不同環境下，分析 mRNA 於量上的變化，是了解基因功能及細胞功能最佳的捷徑。

基因活性是甚麼？細胞會根據各個基因所攜帶的密碼，藉由 DNA→mRNA→解碼過程合成出相對應之蛋白質，此過程稱為基因表現。蛋白質，包括了攜帶氧氣的血紅素、負責催化無數生化反應的各種酵素、以及人體中含量最豐富之結構蛋白質如膠原蛋白等等，因此是掌控生命的主要物質。

由美國官方所支持的人類基因體計畫 (Human Genome Project) 花費了約三十億美金，完成解讀三十億鹼基的工作。公元 2000 年 6 月 23 日，美國總統柯林頓與英國首相布萊爾共同宣布完成人類基因圖譜的草圖。人類染色體總長度約為 30 億個鹼基對，其中約含有四萬個基因，這是生物學家首次以整體的方式研究人類的基因。也因此，醫藥的研究方針從此改觀，而正式進入後基因體時代。同時，也刺激了其他物種的研究，加速了各種基因體研究的進展，可謂是科學研究史上的一大里程碑。(以上摘錄自黃國華教授基因晶片與生物醫學)。

基因晶片的製造是將數千或數萬個單股 DNA 或 cDNA, 以高密度點陣固定在經表面化學塗布處理過的載體表面上，而這些單股 DNA 稱為探針(probe)。樣本中單股 DNA 稱為標的(target), 若 target 帶有與 probe 互補的序列，就會與 probe 雜交而固定在載體上的一點；再經過清洗將沒有雜交的樣本 DNA 去掉，這時因

為 target 帶有螢光染劑，就可以利用雷射激發螢光，記錄下有雜交反應點的位置。因此，只需要一次實驗，DNA 微點陣能夠檢測成千上萬個基因。

基因晶片具有快速診斷（4~12 小時）、特定性高、偵測範圍廣大（至少可同時偵測一萬個病原基因）及使用方便等優點，是其他方法所望塵莫及之。cDNA microarray 是人類基因體計畫衍生出革命性的分析技術，也就是將人類的 cDNA library（約一萬至三萬個），以大小約 2 公分乘 3 公分的玻璃或塑膠材質上固定後，再和細胞的 mRNA 作雜交，在極短時間即可得到數以萬計不同基因在細胞內表現的量^(82,83)。此技術應用於癌症及其他生物醫學之研究已造成了革命性的影響。cDNA microarray，從根本改變了分子生物學研究的觀念，以近萬倍加速研究的步調，來瞭解生物體內的奧秘，此也可謂生物醫學之另一波革命⁽⁸⁴⁻⁸⁸⁾。

基原鑑定晶片，也是基因體世紀的新概念。以基因晶片的快速診斷、特定性、偵測範圍、及方便性等優點，彌補了 RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) 先天上的限制，此又是結合中藥研究與基因體科技的新結晶。為了尋求天然物對於癌細胞之影響，既以 cDNA microarray 的技術為基礎，並且可以進一步指出其藥理機制以及可能產生的藥理作用⁽⁸⁹⁾。

生、老、病、死，永遠圍繞著這整個的世界上，然而醫藥開發的速度永遠無法完全控制疾病所引起的痛苦及死亡。長久以來，傳統的中醫藥材已用於治療人們的疾病，以及一些病症為人類所帶來的痛楚。然此一治療方式，全依賴著世代的相傳，以及經驗的累積，毫無學理上的證據。直至最近才對這些中醫藥材進行有系統性及有組織性之評估，因此，也逐漸為研究者及臨床上的治療所認同。目前本學科即利用此套實驗研究模式，從事於中藥藥材或民間常用藥上的研究。山葡萄屬植物中，雖常用於民間，但其藥理作用則鮮有報導。因此本研究乃針對廣東山葡萄進行藥理學方面之評估。

第三章 材料及方法

一、藥材之採集、萃取及製備

廣東山葡萄 [*Ampelopsis cantoniensis* (Hook. et Arn.) Planch.] 於 1997 年 5 月採集於台中大坑中興嶺山區。經中國醫藥大學中國藥學研究所邱年永技正鑑定為葡萄科(Vitaceae)山葡萄屬(*Ampelopsis*)植物。採新鮮品，取其莖切片，以甲醇萃取，再經減壓濃縮得粗抽物(簡稱 Ac)；此粗抽物再以正己烷(*n*-hexane)、氯仿(chloroform)、正丁醇(*n*-butanol)及水(water)進行分配分離。

實驗時，水(water layer)及正丁醇層(*n*-butanol layer)之產物，慢慢加入生理食鹽水以瑪瑙研鉢研磨均勻，調配至適當濃度；氯仿(chloroform layer)及正己烷層(*n*-hexane layer)，先加入一至兩滴Tween 80，以瑪瑙研鉢研磨均勻後再慢慢加入生理食鹽水，調配至適當濃度，以進行爾後的各項實驗。

針對廣東山葡萄粗抽物及其各不同分層抽取物，本實驗將以四個方向進行：

1. 急性毒性實驗
2. 鎮痛及抗炎實驗
3. 乙醯轉移酵素實驗
4. 人類血癌細胞株Human leukemia cell line (HL-60)實驗

二、急性毒性實驗

依Litchfield和Wilcoxon⁽⁹⁰⁾方法，選用體重18~25公克ICR系雄性小鼠。廣東山葡萄粗抽物經口服投與，連續觀察72小時，記錄其中毒及死亡情形，以求得小鼠半數致死劑量及其95%之可信度。

三、廣東山葡萄抽取物對於鎮痛及抗發炎上之影響

1. 廣東山葡萄抽取物對於福馬林致痛實驗(formalin test)之影響

a. 本實驗係採經Dubuisson及Dennis修飾後之福馬林致痛舔足蹠實驗的方法⁽¹⁵⁾。選用體重20~30公克ICR雄性小鼠，隨機分組。實驗組由腹腔給予不同濃度Ac粗抽物，50、100、250、500 mg/kg，對照組則給生理食鹽水；正對照組給與NMDA接受體拮抗劑MK-801 (0.075 mg/kg)。30分鐘後以微量注射器於小鼠右後足蹠背部皮下注射20 μ L 1% formalin，分別觀察其舔右後足蹠所須之時間。每五分記錄一次，總共紀錄40分鐘。其中0~5分鐘稱為前期(early phase)，15~40分鐘稱為後期(late phase)。又各不同分層抽取物實驗法與上同，選用的劑量為100 mg/kg。

b. 選用體重20~30公克ICR雄性小鼠，隨機分組。小鼠由腹腔給予不同濃度Ac粗抽物，50、100、250、500 mg/kg，對照組則給生理食鹽水。15分鐘後再由腹腔注射NMDA接受體拮抗劑MK-801 (0.075 mg/kg)，15分鐘後以微量注射器於小鼠右後足蹠背部皮下注射20 μ L 1% formalin，分別觀察其舔右後足蹠所須之時間。各不同分層抽取物實驗法與上同，選用的劑量為100 mg/kg。

2. 廣東山葡萄抽取物對於?-carrageenin所誘發大鼠足蹠浮腫實驗之影響

本實驗係採用Winter及Nuss (1962)⁽⁹¹⁾修飾之大鼠足蹠浮腫實驗的方法，選用200~250公克Wistar系雄性大鼠，隨機分組。於大鼠右後足跟劃一橫線以為記號，並以體積變動記錄儀(Plethysmometer, Ugo Basile 7150)記量給藥前之體積。而後，口服給予不同劑量Ac粗抽物，50、100、250、500 mg/kg，對照組給予生理食鹽水，而正對照組則給予indomethacin 4 mg/kg，30分鐘後於右後足掌皮下注射致炎劑1% ?-carrageenin，以誘發足蹠浮腫，再以體積變動記錄儀(Plethysmometer, Ugo Basile 7150)測量體積上的改變，每隔30分鐘測量一次，連續記量五小時，以比較給藥組及對照組組間的差異。各不同分層抽取物實驗法與上同，所用的劑量為100 mg/kg。浮腫率的計算如下：

浮 腫 率 (edema rate) = $B-A/A \times 100\%$

A: 注射前之排水量

B: 第 n 次後之排水量

3. 統計分析：

結果之數據以Unpaired Student's *t*-test方法統計，以分析各組組間差異之顯著性。凡p值小於0.05時，則認定其異差具有統計學上的意義。

四 廣東山葡萄提取物對於大鼠肝臟組織以及血液中芳香胺類化學物質乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 之影響

1. 高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography) 定量法

高效液相層析儀簡稱 HPLC，此乃利用靜態相的管柱，再通以不同的溶液為移動相，然後藉由檢品在移動相中對於靜態相管柱的結合時間不同，致使各成分通過層析管柱的時間也不同，進而將其分離。實驗前先利用已知濃度的標準品溶液，計算出峰線面積，再求得檢品峰線面積，最後計算出檢體的含量。本實驗中所使用的 HPLC 為 Waters 490E Detector 及 Pump PM-60，其靜態相使用 Beckman Silica-based 反轉相碳-18 (Reverse phase C-18, 4.6×250 mm, Spherisorb) 的分析管柱。

檢品中 Acetyl-aminofluorene (AAF) 的測定是利用 53% 20 mM Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 , pH4.5) 和 47% Acetonitrile 的混合液來當移動相，檢波儀波長定於 280 nm。檢測出 AAF 出現的時間為 7.84 分鐘，AF 出現的時間為 10.86 分鐘；另外，Acetyl-para-aminobenzoic acid (Ac-PABA) 測定的條件是利用 50 mM 86% Acetic acid 和 14% Acetonitrile 的混合液來當移動相，檢波儀波長定於 266 nm。檢測出 Ac-PABA 出現的時間為 6.40 分鐘，PABA 出現的時間為 4.67 分鐘。

2. 廣東山葡萄提取物對於大鼠組織乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 活性影響的測定

a. 廣東山葡萄提取物對於大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 活性影響的測定

SD 系雄、雌性大鼠 200~250 公克經乙醚麻醉後取出肝臟，剪碎，以 1:5 的比例加入 Working Lysing Buffer [pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM Ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 50 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ M Leupetin]，以組織均質機均質化後離心 (4、1500 \times g 10

分鐘) 取上清液, 此上清液稱為肝臟之胞質液(cytosols)。

Recycling mixture 簡稱 RCM, 其組成為 15 mM Acetyl carnitine, 2 units/mL carnitine acetyl-transferase, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 調整為 7.5。

反應於 4 °C 冰上進行。取胞質液(cytosols) 50 μ L, 加入每毫升 RCM 中含有 20 μ L 之受質 2-AF 或 PABA (22.5 mM), 及 10 μ L Carnitine acetyl-transferase, 然後再加入【不同濃度 Ac 粗抽物 0.05、0.5、5、50、500 mg/mL, 及各不同分層抽取物 3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL, 各 20 μ L (控制組只給予生理食鹽水)】, 及 20 μ L, 10 mM Acetyl CoA 混合均勻, 置於恆溫水槽 37 °C 反應 15 分鐘後, 加入終止溶液 (Stop solution) [若受質為 2-AF 則以 50 μ L Acetonitrile 終止反應; 若受質為 PABA 則以 50 μ L 20% Trichloroacetic acid (TCA) 終止反應]; 再於 8000xg 離心 2 分鐘, 取上清液 20 μ L 注於 HPLC 中, 求其 2-AF (或 PABA) 及 2-AAF (或 Ac-PABA) 產物的比例。同時利用已知濃度的 2-AF 或 PABA 來換算實驗的量。而 *N*-acetyltransferase (NAT) 酵素活性(acetylated 2-AF 或 PABA)的單位是以 n mole/min/mg protein 示之。

b. 廣東山葡萄抽取物對於大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 動力學常數影響的測定

Ac 粗抽物(50 mg/mL)於不同濃度的受質 2-AF (22.5、45.0、67.5、90.0、112.5、135.0 mM)中, 對於大鼠肝臟組織中的 NAT 乙醯化受質量的影響。結果也以 n mole/min/mg protein 示之。方法中, 除了廣東山葡萄的濃度固定, 2-AF 的濃度改變外, 其餘步驟如上述(2.a)之方法。

c. 廣東山葡萄抽取物對於大鼠血液中乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 活性影響的測定

SD 系雄、雌性大鼠 200~250 公克以乙醚麻醉由心臟採血, 以 1:4 的比例加

入 Working Lysing Buffer，混合均勻後此稱血液之胞質液(cytosols)。其餘步驟如上述(2.a)之方法。

d. 廣東山葡萄抽取物對於實驗大鼠體內 2-Aminofluorene 乙醯化和代謝的影響

S.D. 雄性大鼠 180~200 公克，24 隻隨意分成三組：

(a). 控制組：只給 2-AF (1 mL；1mL = 60 mM, 10.866 mg/mL)。

(b). 給藥組：動物事先給予 Ac 粗抽物(250 mg/kg)及各不同分層抽取物(100 mg/kg)，24 小時後再給予 1 mL 2-AF。

(c). 給藥組：動物同時給予 2-AF 及 Ac 粗抽物及各不同分層抽取物。

之後，動物個別置於代謝籠中，自由飲食及取水。收集尿液，24 小時後，動物麻醉，由心臟採血，犧牲動物，並分別取出動物部分的內臟器官進行分析。

(i). 尿液的分析：

尿液收集 24 小時後立即以 ethylacetate:methanol (95:5)萃取兩次，取上清液冷凍乾燥後，殘餘物以 methanol 溶解，再經由 HPLC 來分析。

(ii). 大鼠組織器官的分析：

取出動物的內臟器官（肝及腎臟），剪碎，以 1:5 的比例加入 Working Lysing Buffer [pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM Ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 50 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ M Leupetin]，以組織均質機均質化。加入萃取液 ethylacetate:methanol (95:5) 混合均勻。如此萃取兩次，取上清液，冷凍乾燥後，殘餘物以 methanol 溶解，再經由 HPLC 來分析。

(iii) 血液的分析：

收集之血液，以 1:4 的比例加入 Working Lysing Buffer，混合均勻後此稱血液之胞質液(cytosols)。加入萃取液 ethylacetate:methanol (95:5)混合均勻。如此萃

取兩次，取上清液冷凍乾燥後，殘餘物以 methanol 溶解，再經由 HPLC 來分析。

e. 實驗結果統計分析

NAT 活性的測定中，以 HPLC 得知 2-AF 及 2-AAF (或 PABA 及 Ac-PABA) 產率，再求取給藥組對 2-AF 或 PABA 代謝產物的抑制或促進的比例而換算，進而利用 Unpaired Student's *t*-test 來分析組間的差異。

五、廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株 (Human leukemia cell line; HL-60) 上之影響

1. 人類血癌細胞株 (HL-60) 的培養

取人類血癌細胞株 (HL-60)，密度 $2\sim 5\times 10^5$ cells/mL，置於 75 cm² 培養皿，加入 10 mL RPMI-1640 培養基〔內含 10% 胎牛血清及 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/ml penicillin 和 10 mg/mL streptomycin)〕，培養於 37℃，5% CO₂ 的培養箱中，視細胞的密度，培養基必須一至兩天更換一次，如此才可維持 HL-60 細胞正常的繁殖及增生。

2. 細胞數量的計算以及存活上的測試

細胞數量的計算使用血球計數盤 (hemocytometer plate)，此計數盤一般含有兩個 chambers，每個 chamber 中細刻 9 個 1 mm² 大正方形，其中四個角落的正方形再細刻 16 個小格，深度約 0.1 mm。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形的體積為 $1\text{ mm}^2\times 0.1\text{ mm}=1.0\times 10^{-4}$ mL。使用時，計數每個大正方形內的細胞數目，乘以稀釋的倍數，再乘以 10^4 ，此即每 mL 的細胞數目。

取 50 μ L 細胞懸浮液與 50 μ L trypan blue (or eosin bluish) 等體積，於 1.5 mL 小離心試管中混合均勻。取些許混合液 (約 15 μ L) 自血球計數盤 chamber 上方的凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍的倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色 (或紅色 eosin bluish)。計數四大方格活細胞的總數，除以 4 再乘以稀釋的倍數 (至少乘以 2，因與 trypan blue 等體積混合)，最後乘以 10^4 ，此即為每 mL 細胞懸浮液中之所含的細胞數。取適量的細胞以進行爾後的實驗。

細胞存活上測試之原理是利用染料 (dye)，活細胞因細胞膜完整，染料無法滲入而不會呈色；但死細胞由於細胞膜破裂，染料會滲入到細胞內而呈色。一般染料使用藍色 trypan blue，如果細胞不容易吸收 trypan blue，則可使用藍伊紅 eosin bluish。

3. 廣東山葡萄提取物對人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60)之存活率及型態學上之影響

細胞的死亡，無論經由了細胞上的壞死(necrosis)或是細胞上的凋亡(apoptosis)途徑，只要是死亡，細胞膜就會失去了完整性(integrity)。Propidium iodide (PI)是一個核酸的染劑，進行核酸染色時，若細胞死亡，細胞膜破裂，PI會進入細胞內和核酸結合；若細胞存活，細胞膜完整，PI則無法和細胞內的核酸結合。PI染色完成的細胞，經由流式細胞儀(flow cytometry) 488 nm 的雷射光激發後，死亡的細胞會有較高的紅色螢光，而存活的細胞則紅色的螢光較弱，接著再以 Cell Quest 軟體分析細胞的存活率。細胞的存活以下公式計算：(實驗組存活細胞數 ÷ 對照組存活細胞數) × 100%。

取 1×10^5 HL-60 cells 置於 6 孔培養皿(6 well plate)，於 37 °C，5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時後，分別加入不同濃度 Ac 粗抽物(25、50、75、150、300 mg/mL，每 mL 的培養基中加入 10 μL)及各不同分層抽物(3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL，每 mL 的培養基中加入 10 μL)，對照組加入溶媒。24 小時後收集細胞，分別進行細胞存活率的計算，以及型態學上的影響。

a. 每一培養孔(well)取 500 μL 的細胞培養基，置於 5 mL 流式細胞儀專用試管中，接著加入 5 μL 的 PI stock solution (400 μg/mL)，混合均勻後，進行流式細胞儀分析，固定計數秒數 (20 秒)，流速(35 μL/min.)，計數細胞的增殖亦或是抑制率。

b. 取出 6 孔培養皿(6 well plate)，直接由倒立顯微鏡觀察血癌細胞染色體上的破壞，以及細胞型態學上的改變。

4. 廣東山葡萄提取物對人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60) DNA 上之影響 (DNA damage)

a. DNA 的萃取

取 1×10^5 HL-60 cells 放入 6 孔培養皿(6 well plate)，置於 37 °C，5% CO₂ 培

養箱中培養 24 小時後，分別加入不同濃度的 Ac 粗抽物(25、50、75、150 300 mg/mL，每 mL 的培養基中加入 10 μ L)及各不同分層抽取物(3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL，每 mL 的培養基中加入 10 μ L)，對照組加入溶媒。24 小時後以無菌吸管吸至無菌試管中(15 mL test tube)，離心(4、1000xg、4 分鐘)，棄上清液，加入 1.85 mL Cell suspension solution，以手指輕輕拍試管管壁使其均勻混合(不可使用振盪器)，加入 50 μ L RNase Mixx，混合均勻，加入 100 μ L Cell Lysis/Denaturing Solution，混合均勻後置於 water bath (55)中 15 分鐘，然後加入 25 μ L Protease Mixx 混合均勻後置於 water bath (55)中 60~90 分鐘，再加入 500 μ L “Salt-Out” Mixture，此時以微量吸管吸至 2 mL 小離心試管內，置於冰箱中 10 分鐘，離心(4、10000xg 10 分鐘)，收集上清液，加 2 mL TE buffer (0.1M, 1 M Tris-HCl pH 7.5, 加入 0.2 mL, 0.05 M EDTA pH 7.5, 再加入 H₂O 9.7 mL，使總量成為 10 mL)，以及 8 mL ethanol (100%)。將試管旋緊瓶蓋，放平，小心上下慢慢轉動，此時可見有絮狀物，此即 DNA。接著離心(4、1000xg、4 分鐘)，慢慢倒掉上清液，試管倒置斜放於試管架上陰乾。此時試管下之沈澱物即為萃取出之 DNA，加入 50 μ L TE buffer 將 DNA 溶解。

b. 電泳跑膠法

Agarose 900 mg，加入 50 mL, 1×TAE buffer (Tris-acetate)，於微波爐中加熱 1 分鐘溶解，待稍冷卻後加入 4 μ L Ethyl bromide 混合均勻，然後小心慢慢將膠沿著電泳跑膠槽槽壁倒入電泳跑膠槽中(不可有氣泡產生)，放入 comb 蓋上槽蓋，靜置約 30 分鐘待膠凝固(不可觸動)。膠凝固後拔去 comb (可見有一一之小孔此處即為 sample 放置處)，此時即製成 1.8% 凝膠片。

將膠片置於電泳槽內 (Kodak BioMax QS710)，以 1×TAE buffer 溶液覆蓋過膠片。取 18 μ L 萃取出之 DNA sample 加入 2 μ L loading buffer 置於 1.5 mL 之 vial 中混合均勻，接著依序將各不同濃度 sample 以微量吸管加入到凝膠片的 comb 內，蓋上電泳蓋，開啟電源供應器 (E-C Apparatus Corporation, EC 3000-90)，

Voltage 調至 100，進行跑膠一小時。

實驗進行完成的膠片，置於電泳膠分析照相儀(Ever Gene Gel Analysis System)分析，以觀察藥物於 DNA 上的影響。

5. 廣東山葡萄提取物對人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60)細胞凋亡(apoptosis)的影響

a. 利用螢光顯微鏡觀察細胞凋亡情形

取 1×10^5 HL-60 cells 置於 24 孔培養皿中(24 well plate)，於 37°C ，5% CO_2 培養箱中培養 24 小時，分別加入不同濃度 Ac 粗抽物(25、50、75、150、300 mg/mL，每 mL 的培養基中加入 10 μL)及各不同分層抽取物(3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL，每 mL 的培養基中加入 10 μL)，對照組加入溶媒。24 小時後將細胞吸至 2 mL 的小離心試管中，離心(4 $^\circ\text{C}$ 、1000xg、4 分鐘)，棄上清液。加入已滅菌 200 μL ，1 \times PBS，以手指輕拍試管管壁，使細胞均勻分散。此時將細胞吸入到 96 孔培養皿中(96 well plate)，離心(4 $^\circ\text{C}$ 、1000xg、4 分鐘)，棄上清液，直接加入 200 μL ，3.7%的 formaldehyde 置於冰上 15 分鐘。然後加入已滅菌 100 μL ，1 \times PBS，離心(4 $^\circ\text{C}$ 、1000xg、4 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複一次】。加入 100 μL ，0.2% NP，避光靜置 15 分鐘。再加入 100 μL ，1 \times PBS，離心(4 $^\circ\text{C}$ 、1000xg、4 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複一次】。加入新鮮配製成之 5% 50 μL 脫脂鮮乳，避光置於冰上 1 小時後加入 100 μL ，1 \times PBS，離心(4 $^\circ\text{C}$ 、1000xg、4 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複一次】。加入一次抗體 Poly (ADP-ribose) 50 μL 【抗體原液以 5%鮮乳稀釋 100 倍 (即取 10 μL 抗體 + 990 μL 5%之鮮乳)】，以錫箔紙包好避光儲存於冰箱中隔夜。

第二天，取出 96 孔培養皿 (96 well plate)，直接加入 100 μL ，1 \times PBS，離心 (4 $^\circ\text{C}$ 、1000xg、4 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複一次】。加入二次抗體 50 μL 【抗體原液以 5%的鮮乳稀釋 100 倍 (即取 10 μL 抗體 + 990 μL 5%之鮮乳)】(Jackson 115-095-004 Goat Anti-mouse IgG FITC conjugates，此具螢光作用，因此

必須以錫箔紙包起避光儲存，以下步驟均需避光進行)。加入二次抗體後，於冰上靜置 30 分鐘。然後直接加入 100 μ L, 1 \times PBS，離心(4、1000xg、4 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複一次】。於螢光顯微鏡下觀察細胞凋亡之情形。

b. 利用流式細胞儀以 Cell Quest[®]的軟體來分析細胞凋亡的情形

取 1×10^5 HL-60 cells 置於 12 孔培養皿中(12 well plate)，於 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時後，分別加入不同濃度的 Ac 粗抽物(25、50、75、150 300 mg/mL，每 mL 的培養基中加入 10 μ L)及各不同分層抽取物(3.125、625、12.5、25、50 mg/mL，每 mL 培養基中加入 10 μ L)，對照組加入溶媒。24 小時後收集細胞。

收集之細胞分別置於 15 mL 離心試管中離心(4、1000xg、5 分鐘)，棄上清液，以手指輕拍試管管壁，使細胞均勻分散，加入 2 mL, 1 \times PBS 混合均勻後離心(4、1000xg、5 分鐘)，棄上清液。以手指輕拍試管管壁，使細胞均勻分散。然後將試管置於振盪器上(VORTEX-GENIE 2)，速度調至 3，一滴一滴慢慢的加入冰冷(ice-cold, 4 $^{\circ}$ C)的酒精(70%)以進行細胞固定。隨後將此試管置於-20 $^{\circ}$ C 冰箱存放。隔天取出樣品，分別利用 (a). Cell Quest[®]軟體，進行細胞凋亡數據的分析；以及(b). Modfit LT[®]軟體，進行細胞週期數據的分析。

a). 以 Cell Quest[®]軟體進行細胞凋亡數據分析

隔天取出樣品，離心(4、1000xg、5 分鐘)以去除酒精，加入 2 mL, 1 \times PBS 清洗細胞後，離心(4、1500 rpm、5 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複兩次】。於每個試管中加入 500 μ L Propidium iodine (PI)染色，避光反應 30 分鐘。取 1 mL 樣品，移至 FACS 專用試管，避光置於冰上，然後以流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)進行樣品分析。一秒細胞不超過 300 個，每一數據收集 12000 個細胞，數據以 Cell Quest[®]軟體進行數據分析。

b). 以 Modfit LT[®]軟體進行細胞週期上數據的分析

隔天取出樣品，離心(4 °、1000xg、5 分鐘)以去除酒精。加入 2 mL, 1×PBS 清洗細胞後，離心 (4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複兩次】。於每個試管中加入 500 μL Propidium iodine (PI)染色，避光反應 30 分鐘。取 1 mL 樣品，移至 FACS 專用試管，避光置於冰上，然後以流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)進行樣品分析。一秒細胞不超過 300 個，每一數據收集 12000 個細胞，數據以 Modfit LT[®]軟體進行數據分析。

6. 廣東山葡萄提取物對人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60)細胞內週期素(cyclins)的影響

取 1×10^5 HL-60 cells 置於 12 孔培養皿中(12 well plate)，於 37 °，5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時，然後分別加入 Ac 粗抽物(100 mg/mL，每 mL 培養基中加入 10μL)及各不同分層抽物(25 mg/mL，每 mL 培養基中加入 10μL)，對照組加入溶媒。培養 24 小時，收集細胞至無菌的試管中，離心(4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液。細胞以 1×PBS 清洗一次後離心(4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液。以手指輕拍試管管壁，使細胞均勻分散後，加入冰冷(ice-cold, 4 °) 100μL, 1×PBS，使細胞混合均勻。再將細胞轉移至 96 孔培養皿中(96 well plate)，離心(4 °、1000xg、5 分鐘)，小心棄上清液。加入冰冷(ice-cold, 4 °) 100μL, 1% formaldehyde 於冰上靜置 5 分鐘，再加入冰冷(ice-cold, 4 °) 100μL, 100% methanol 置於冰上 30 分鐘 (避光)，離心(4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液 (以去除 formaldehyde 以及 methanol)。以含有 0.1% BSA 之 PBS 清洗細胞後離心(4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複兩次】加入 100μL 含 0.1% Triton X-100 及 0.1% Sodium citrate 的 PBS 置於冰上反應 45 分鐘，離心(4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液。再以含有 0.1 % BSA 之 PBS 清洗細胞後，離心(4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液，【上之步驟重複兩次】。加入 100μL anti-cyclins 及 anti-CDK 單株抗體，並於室溫下反應 2.5 小時，離心 (4 °、1000xg、5 分鐘)，棄上清液。

並以含有 0.1% BSA 之 PBS 清洗後離心(4、1000xg、5 分鐘), 棄上清液,【上之步驟重複兩次】。加入 100 μ L 二次抗體(FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody), 於冰上避光反應 30 分鐘, 離心(4、1000xg、5 分鐘), 棄上清液。加入 100 μ L, 0.1% BSA 之 PBS 清洗細胞, 離心(4、1000xg、5 分鐘), 棄上清液,【上之步驟重複兩次】再以含有 0.1% BSA 之 PBS 清洗, 離心(4、1000xg、5 分鐘), 棄上清液。加入 100 μ L, 0.1% BSA 之 PBS 混合均勻後, 以流式細胞儀分析細胞內 cyclins 的變化。(實驗所使用的抗體均使用含有 0.1% FBS 及 0.1% sodium azide 的 PBS 稀釋液)。每個數據收集 10000 個細胞, 以 Cell Quest[®]軟體進行數據處理分析。

7. 廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60)相關細胞週期素基因的表現

a. 人類血癌細胞株(HL-60) RNA 的萃取(利用 RNeasy[®] Mini Kit)

取 1×10^5 HL-60 cells 置於 12 孔培養皿中(12 well plate), 於 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時後, 分別加入不同濃度 Ac 粗抽物(25、50、75、150、300 mg/mL, 每 mL 的培養基中加入 10 μ L)及水層分離物(3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL, 每 mL 的培養基中加入 10 μ L), 對照組加入溶媒。培養 24 小時, 收集細胞。

以無菌吸管將細胞吸至 15 mL 的無菌試管中, 離心(4、1000xg、5 分鐘), 以吸管小心的吸出上清液。再以 1 \times PBS 清洗細胞, 離心(4、1000xg、5 分鐘), 棄上清液,【上之步驟重複一次】。最後以吸管小心吸出上清液(盡量吸乾, 但不可觸及下之沈澱物), 加入 350 μ L Buffer RLT (細胞數量如果大於 5×10^6 的細胞數時, 則加入 600 μ L), 振盪 60 sec. (使用振盪器, 讓其完全混合均勻)。加入 350 μ L 70% ethanol 以吸管上下吸取使其混合均勻【如 Buffer RLT 加入 600 μ L, 此時 70% ethanol 也必須加入 600 μ L (如兩者都為 600 μ L 此時就要分兩次來離心)】。將總混合液 700 μ L 以吸管吸入至 RNeasy Mini Column, 離心(10000xg 15 秒; 當

離心機轉速到 10000xg 後 15 秒鐘，隨即關機)，棄下層液，加入 700 μL Buffer RW1，離心(10000xg、15 秒)，棄下層液。此時將 column 移至一個新的 2 mL 的收集管中(collection tube)，直接加入 500 μL Buffer RPE，離心(10000xg、15 秒)，棄下層液，再加入 500 μL Buffer RPE 離心(10000xg、2 分鐘)，丟掉下面的收集管(collection tube)，將上之 column 再移至一個新的 1.5 mL 的收集管中(collection tube)，加入 30 μL RNase-free water (由上方正中央加入)，離心(10000xg、1 分鐘)，此時下層即為我們所要的 RNA。此時於 260nm 下測 OD 值 (OD 值=1 時，DNA = 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，或 RNA = 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

b. 使用 Supere Script II 來合成 cDNA

取已經計算好 sample 的量(假設為 2 μL ，1 ng~5 μg total RNA)，置於已滅菌 20 μL 的小離心試管中，加入

- (a). 1 μL Oligo (dT 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- (b). 1 μL 10 mM dNPT Mix (10 mM dATP, dGTP, dCTP 及 dTTP 於 neutral pH)
- (c). 滅菌過的蒸餾水，使最後的總量為 12 μL 。

置於 65 恆溫槽 5 分鐘，然後迅速放在冰上幾秒鐘，再於離心機內稍微離心旋轉一下，然後加入 4 μL ，5 \times First-Standard Buffer, 2 μL 0.1 M DTT, 1 μL RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/ μL)混合均勻後於 42 培育 2 分鐘。加入 1 μL (200 units) SUPERScriptTM II RT，以微量吸管混合均勻，於 42 培育 50 分鐘，然後再於 70 培育 15 分鐘。此時所培育出來之即為 cDNA，置於冰箱(4)。

c. PCR reaction

首先將下列的 PCR 反應試劑加入已滅菌之 PCR 反應試管(PCR reaction tube)中，使最後之總量為 50 μL 。

- (a). 5 μL 10 \times PCR buffer [(200 mM Tris-HCl (pH8.4), 500 mM KCl)] .

- (b). 1.5 μ L mM MgCl₂.
- (c). 1 μ L 10 mM dNTP Mix.
- (d). 1 μ L amplification primer 1 (10 μ M).
- (e). 1 μ L amplification primer 2 (10 μ M).
- (f). 0.4 μ L *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l)
- (g). 2 μ L cDNA (from first-stand reaction).
- (h). 38.1 μ L 滅菌的蒸餾水

混合均勻後於液面上加入 1~2 滴的 silicone oil 蓋附於表面 (避免加溫時產生突沸的現象)。於 90 加熱反應 2 分鐘, 接著執行 PCR 15~40 cycles 的反應 (PERKIN ELMER Gene Amp PCR System 2400)。

Sample 依上述電泳跑膠法, 將膠片置於電泳膠分析照相儀(Ever Gene Gel Analysis System)觀察廣東山葡萄抽取物對於人類血癌細胞株(HL-60)相關細胞週期素基因表現的影響; 另以 Kodak Digital Science 120 來分析數據。

Primers 的序列如下: B-MDIEA-NAT1, 5'-CACCCGGATCCGGGATCAGGACATTGAAGC-3', NT 435-454, gENbANK accession number X17059; VPKHGD-X-NAT1, 5'GGTCCTCGAGTCAATCAATCACCATGTTT- GGGCA-3', nt 1295-1278, GenBank accession number X17059; FP1-NAT2, 5'-GTAGTTCCTGGTTGCTGGCC-3', nt 79-98, GenBank accession number NM-000015; RP1-NAT2, 5' TAACGTGAGGGTAGAGAGGA-3', nt 1073-1054, GenBank accession number NM-000015; Act b1, 5' GCTCGTCGT- CGACAACGGCTC3', nt 94-114, GenBank accession number NM-001101; Act b2, 5' CAAACATGATCTGGGTCATCTTTCTC-3', nt 446-442, GenBank accession number- 001101. Mmmmm.

8. 利用 cDNA 基因晶片來鑑定廣東山葡萄抽取物對人類血癌細胞株

(Human leukemia cell line; HL-60)基因表現上的影響

a. 人類血癌細胞株(HL-60) RNA 的萃取(利用 RNeasy[®] Mini Kit)

取 1×10^5 HL-60 cells 放入 12 孔培養皿中(12 well plate), 於 37 , 5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時, 然後加入 Ac 粗抽物(100 mg/mL, 10 μ l/mL), 對照組加入 溶媒, 培養 24 小時, 收集細胞。RNA 抽取方法與上同 [7. 1]。

b. 抽取出之 RNA 則交由生物科技公司進行基因晶片上的分析。

第四章 結 果

一、藥材之萃取及製備

A.



B.

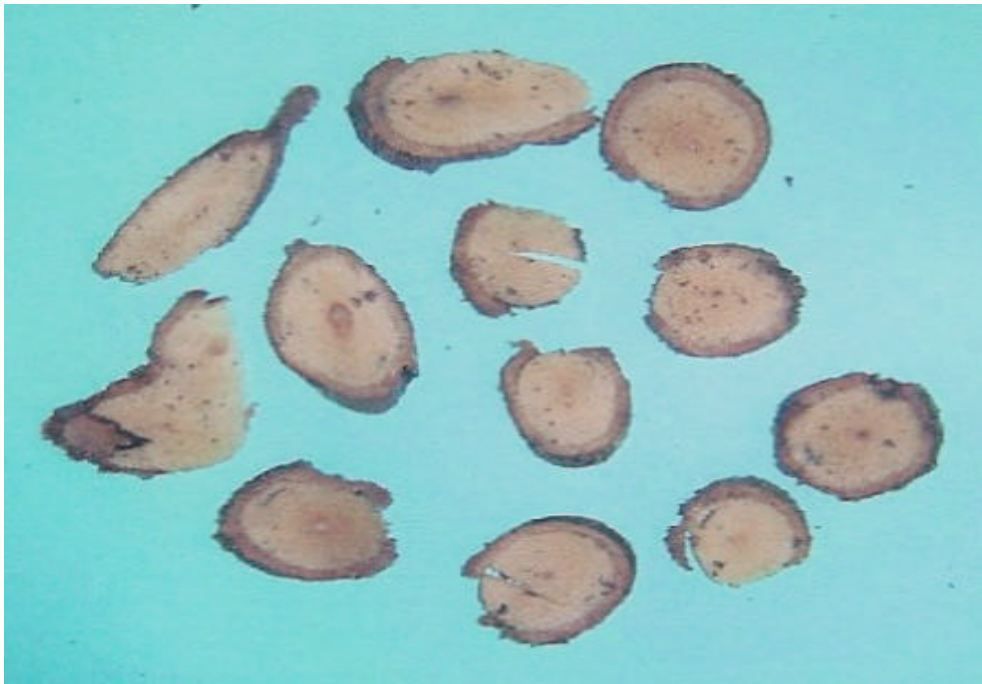


Fig. 1. Original plant (A) and slices (B) of *Ampelopsis cantoniensis*.

廣東山葡萄採新鮮莖 16 公斤，經甲醇萃取，再經減壓濃縮得粗抽物(1400 公克，產率 8.75 %；簡稱 Ac)。此粗抽物再以不同溶媒進行分配分離，所得各不同分層抽取物的產率分別為：正己烷層 24.5 公克(4.9 %)、氯仿層 6 公克(1.2 %)，正丁醇層 14.4 公克(2.88 %)，水層 241.5 公克(48.3 %) (Fig. 2)。

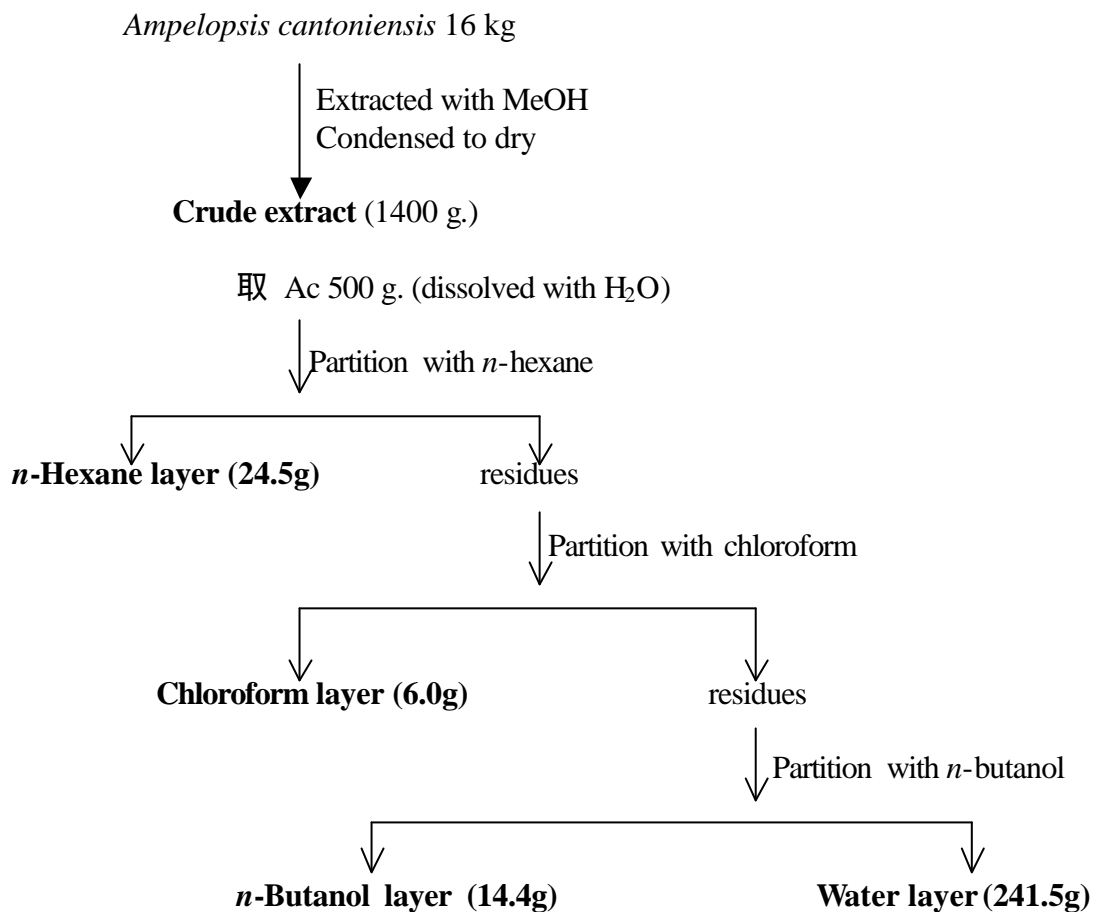


Fig. 2. Fractionation scheme of methanol extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

二、急性毒性實驗

ICR雄性小鼠，經口服給予Ac粗抽物，得其半數致死劑量為629.6 mg/kg，其95%可信度為534.7 - 741.4 mg/kg (Fig. 3)。

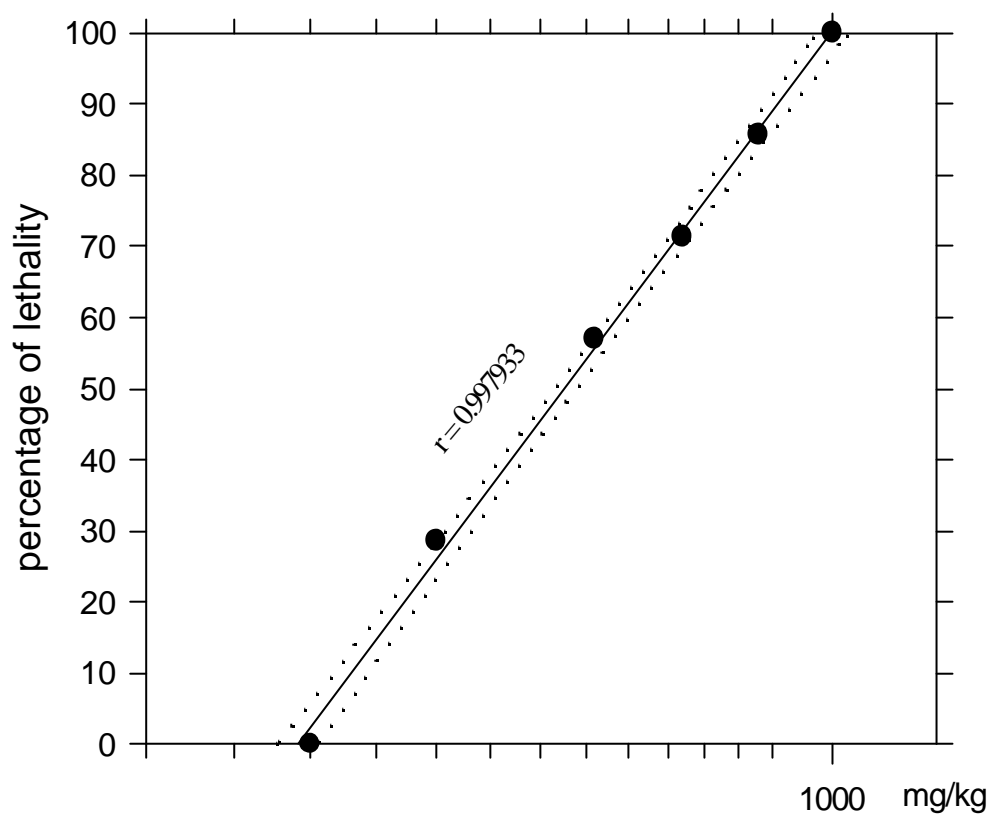


Fig. 3. The LD₅₀ of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* in mice orally.

三、廣東山葡萄抽取物對於鎮痛及抗發炎上之影響

1. 廣東山葡萄抽取物對於福馬林致痛實驗(formalin test)之影響

Ac粗抽物，對於福馬林誘發鼠舔足蹠之前期及後期的反應時間，均呈現劑量依存性的抑制作用；NMDA接受體拮抗劑MK-801，同樣的也抑制了此一反應時間；若合併兩者的使用，此抑制作用會加強(Fig. 4. A, B)。

各不同分層抽取物對於福馬林誘發舔足蹠反應中，正己烷層沒有任何的影響；氯仿層抑制作用較弱，但仍具統計學上之異差；至於以水層及正丁醇層，不論於前、後期，均呈現明顯的抑制作用。如合併使用MK-801，除*n*-hexane層於後期外，其餘各層均加強了此抑制效果(Fig. 5. A, B)。

2. 廣東山葡萄抽取物對於 β -carrageenin所誘發大鼠足蹠浮腫實驗之影響

Ac粗抽物對 β -carrageenin 所誘發浮腫反應，於100 mg/kg，1小時後即產生明顯的抑制作用，時間可持續5小時。劑量愈高抑制作用愈顯著 (Fig. 6)。

各不同分層抽取物於100 mg/kg劑量下，以水層的抑制作用最強，正丁醇層次之(Fig. 7)。

四、廣東山葡萄提取物對於大鼠肝臟組織以及血液中芳香胺類化學物質乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 之影響

1. 廣東山葡萄提取物對於大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 活性的影響

以 2-AF 為受質時，Ac 粗抽物對於雄性及雌性大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素的活性均呈現明顯劑量依存性(dose-dependent)的抑制作用。高濃度時(500 mg/mL)完全抑制了雌性大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素的活性，而雄性大鼠約產生 80% 的抑制效果(Fig. 8, 9)。

當以 PABA 為受質時，雄性大鼠抑制作用較強，且呈劑量依存性；雌性大鼠雖亦具抑制作用，但當劑量到 50 mg/mL 後，其最大抑制率只達 40% (Fig. 10)。

2. 廣東山葡萄提取物對於大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 動力學常數的影響

利用一定濃度 Ac 粗抽物(50 mg/mL)，來分析肝臟組織中的 NAT 對於不同濃度 2-AF 乙醯化的影響。結果顯示雄性及雌性大鼠肝臟組織中 NAT 的活性，會隨著 2-AF 濃度上升而上升，Ac 粗抽物則明顯的抑制肝臟組織中 NAT 的活性 (Fig. 11,12)。

3. 廣東山葡萄提取物對於大鼠血液中乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT) 活性的影響

以 2-AF 為受質時，Ac 粗抽物對於雄性及雌性大鼠血液中乙醯轉移酵素的活性，均呈現劑量依存性(dose-dependent)的抑制作用，雄性大鼠的抑制作用大於雌性大鼠。當濃度於 500 mg/mL 時，則不論雄或雌性大鼠，均可產生 100% 的抑制作用(Fig. 13)。

至於以 PABA 為受質時，Ac 粗抽物濃度於(500 mg/mL)時，雄性大鼠產生約 51%、雌性大鼠產生約 57% 的抑制效果，低劑量下似乎還有些許的促進作用 (Fig. 14)。

4. 廣東山葡萄各不同分層抽取物對於大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT)活性的影響

當以 2-AF 為受質時，廣東山葡萄各不同分層抽取物，對於雄性及雌性大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素的活性，均產生抑制的作用，其中以正丁醇層(*n*-butanol layer)作用最強，高濃度時(50 mg/mL)，對雄性及雌性大鼠乙醯轉移酵素的活性會產生 82%的抑制作用，且呈劑量依存性(dose-dependent)。正己烷層(*n*-hexane layer)、氯仿層(chloroform layer)以及水層(water layer)的抑制效果較弱，於高濃度中(50 mg/mL)抑制率不及 45% (Fig. 15, 16)。

當以 PABA 為受質時，雖各不同分層抽取物對於雄性及雌性大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素的活性均產生劑量依存性(dose-dependent)的抑制作用，但仍以正丁醇層(*n*-butanol layer)作用較強，水層(water layer)次之，正己烷層(*n*-hexane layer)及氯仿層(chloroform layer)作用較弱 (Fig. 17, 18)。

5. 廣東山葡萄各不同分層抽取物對大鼠血液中乙醯轉移酵素 *N*-acetyltransferase (NAT)活性的影響

廣東山葡萄各不同分層抽取物對於雄性及雌性大鼠血液中乙醯轉移酵素活性的影響，有較明顯的差異。以 2-AF 為受質時，正丁醇層(*n*-butanol layer)抑制作用最強，低濃度時(3.125 mg/mL)對雄性及雌性大鼠血液中乙醯轉移酵素的活性即產生了 36%及 71%的抑制作用；正己烷層(*n*-hexane layer)不論對雄性或雌性大鼠血液中乙醯轉移酵素的活性，均呈現劑量依存性的抑制作用，但雌性大鼠於低劑量時(3.125 mg/mL)，卻呈現了促進的現象；至於氯仿層(chloroform layer)，對雄性大鼠於低至中劑量時(3.125~12.5 mg/mL)均呈現促進的現象，但於雌性大鼠，則呈現明顯劑量依存性的抑制作用；最後水層(water layer)，不論於雄性或雌性大鼠均呈現明顯劑量依存性的抑制作用，低劑量時(3.125 mg/mL)，會有些許的促進效果(Table. 1, 2)。

若以 PABA 為受質時，各不同分層抽取物對於雄、雌兩性大鼠血液乙醯轉移酵素的活性，均產生劑量依存性(dose-dependent)抑制作用。但仍以正丁醇層(*n*-butanol layer)及水層(water layer)的抑制作用較明顯；正己烷層(*n*-hexane layer)及氯仿層(chloroform layer)作用較弱(Table 3, 4)。

6. 廣東山葡萄提取物對於實驗大鼠體內 2-Aminofluorene 乙醯化和代謝的影響

實驗大鼠如事先口服 Ac 粗抽物(250 mg/kg)及各不同分層抽取物(100 mg/kg)，24 小時後再給與 2-AF (60 mM)。結果可見，於動物肝臟組織、血液、腎臟組織及尿液中，對於 2-AF 的乙醯化作用，均呈現抑制的作用，其中又以血液及腎臟組織中的抑制效果較強(Fig. 19, 21, 23, 25)。

實驗大鼠如事先口服 2-AF (60 mM)後，再立即給與 Ac 粗抽物(250 mg/kg)及各不同分層抽取物(100 mg/kg)，其結果可見，不論對於動物肝臟組織、血液、腎臟組織或尿液中的 2-AF 乙醯化作用，雖產生了部分的抑制現象，但作用均較前者為弱(Fig. 20, 22, 24, 26)。

五、廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60)上之影響

1. 利用流式細胞儀評估廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(HL-60)細胞的存活率

Ac 粗抽物對於人類血癌細胞株(HL-60)的增殖，呈現明顯的劑量依存的抑制作用，高濃度時(300 mg/mL)幾乎完全抑制細胞的增殖(Fig. 27)。

各不同分層提取物中，正己烷(*n*-hexane layer)於低濃度時(3.125~12.5 mg/mL)，會產生些許促進增殖的作用，但當濃度增加時(25~50 mg/mL)，才顯示出明顯的抑制作用；氯仿層(chloroform layer)會產生些許促進增生的作用，只於最高濃度時(50 mg/mL)才產生些許的抑制；至於正丁醇層(*n*-butanol layer)以及水層(water layer)，則呈現劑量依存性的抑制作用，水層的抑制作用大於正丁醇層(Fig. 28)。

2. 廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(HL-60)細胞形態學之影響

Ac 粗抽物對於人類血癌細胞株(HL-60)培養 24 小時後，再經由倒立式顯微鏡上的觀察，發現血癌細胞株(HL-60)引起了形態學上的改變，此包含了：細胞縮小、細胞膜上的變異以及細胞核上的破裂。50 mg/mL 即產生形態學上的變化，300 mg/mL 幾乎影響了所有的細胞(Fig. 29)。

至於各不同分層提取物中的作用與粗抽物相似，於低濃度時(6.25 mg/mL)，會引起了形態學上的變異，50 mg/mL 則影響到大多數的細胞(Fig. 30, 31, 32, 33)。

3. 廣東山葡萄提取物對人類血癌細胞株(HL-60) DNA 上之影響 (DNA damage)

Ac 粗抽物會引起人類血癌細胞株(HL-60) DNA 成梯狀斷裂的片段(DNA ladder)，因而引起細胞的凋亡(apoptosis)。Ac 粗抽物事先給與 12 小時後，於高濃度(300 mg/mL)即可見此 DNA ladder；24 小時後，此一梯狀斷裂的片段更加明顯(Fig. 34)。

至於各不同分層提取物中，作用均與粗抽物相似，然此一梯狀斷裂的片段似乎較粗抽物更加明顯(Fig. 35)。

4. 廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(HL-60)細胞凋亡 Apoptosis之影響

a. 利用 poly (ADP-ribose) fluorescence stain 染色，再於螢光顯微鏡下觀察，死亡細胞則呈現螢光反應。Ac 粗抽物於(50 mg/mL)濃度中會引起血癌細胞的凋亡，濃度越高，作用越明顯(Fig. 36)。

至於各不同分層提取物中，與粗抽物的結果相似，6.25 mg/mL 的濃度中，會引起細胞的凋亡；藥物的濃度越高，作用也越明顯(Fig. 37, 38, 39, 40)。

b. 利用流式細胞儀以 Cell Quest[®]軟體來分析細胞的凋亡。核酸的染劑 propidium iodide (PI)，會針對死亡的血癌細胞株(HL-60)行染色作用。最後再以流式細胞儀(Flow cytometry: FACS)進行樣品分析。Ac 粗抽物對血癌細胞呈現了凋亡(apoptosis)現象，濃度愈高，作用愈明顯，且呈劑量依存性(Fig. 41 A, & B)。各不同分層提取物中，與粗抽物的結果相似，於(25 mg/mL)的濃度中，引起血癌細胞株的凋亡。各分層間抑制效果的差異不大(Fig. 42, 43, 44, 45; A, & B)。

5. 廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(HL-60)細胞週期之影響

Ac 粗抽物對人類血癌細胞株(HL-60)，培養 6 小時後於高濃度(300 mg/mL)中，會引起 G₀/G₁ phase 的細胞增生，S phase 的細胞減少(Fig. 46 A, B)；隨著培養時間上的延長，此一作用更趨明顯(Fig. 47-50; A, B)。因此，Ac 粗抽物會使人類血癌細胞株(HL-60)的細胞週期終止於 G₀/G₁ phase (G₀/G₁ phase arrest)。

各不同分層提取物與粗抽物的結果相似，均引起 G₀/G₁ phase 的細胞增生，S phase 細胞減少(Fig. 51-54; A, B)。因此，同樣會使人類血癌細胞株(HL-60)的細胞週期終止於 G₀/G₁ phase (G₀/G₁ phase arrest)。

6. 廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(HL-60)細胞週期素(Cyclin)的影響

Ac 粗抽物會使 Cyclin E 含量的比率減少，CDK2 會增加；至於 Cyclin A 以及 Cyclin B，並無有意義的影響(Fig. 55)。

各不同分層提取物與粗抽物的結果相似，均會使 Cyclin E 含量的比率減少，CDK2 會增加；但，氯仿 (chloroform layer)及水層(water layer)，cyclin B 含量的比率則有些許的增加 (Fig. 56-59)。

7. 廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60) 相關細胞週期素基因的表現

Ac 粗提取物對於調節細胞週期 G_0/G_1 期的細胞週期素 CDK2、Cyclin E、Cyclin D2、以及 Cyclin D3 會引起基因表現上的改變。CDK2 基因的表現增強；Cyclin E、Cyclin D2、以及 Cyclin D3 基因的表現均引起抑制作用。至於 NAT1 以及 NAT2 的影響不大；但 Cyclin A 以及 Cyclin B 也有些許的抑制現象(Fig. 60-68)。

至於水層提取物中，CDK2 基因的表現增加，Cyclin E、Cyclin D2 基因的表現下降，其餘的表現變化不大。(Fig. 69-77)。

8. 廣東山葡萄提取物對於人類血癌細胞株(HL-60) caspase-3 表現的影響

Ac 粗提取物對於人類血癌細胞株(HL-60)經由 24 小時培養後，並不會增加了 pro-caspase-3 之表現；但，phosphorylation of caspase-3 的表現卻增加(Fig. 78)。

9. 利用 cDNA 基因晶片來鑑定廣東山葡萄提取物對人類血癌細胞株(Human leukemia cell line; HL-60)基因表現上的影響

經由 cDNA 基因晶片鑑定，發現 Ac 粗提取物對於人類血癌細胞株(HL-60)其基因上的表現顯示：Caspase 3、Caspase 9 引起 Up-regulation (Fig. 79)；Caspase 5、caspase 8 引起 Down-regulation (Fig. 80)；Cytochrome C、Cytochrome C1 引起 Up-regulation (Fig. 81)；Cyclin E 引起 Down-regulation、Cyclin E2 不受影響(Fig. 82)；Cyclin D1、Cyclin D2、Cyclin D3 引起 Down-regulation (Fig. 83,84)；CDK2 引起 Up-regulation (Fig. 84)；Cyclin A 不受影響、Cyclin A1 引起 Up-regulation (Fig. 85)；Cyclin B1、Cyclin B2 則不受影響(Fig. 86)；E2F transcription factor 引起 Down-regulation (Fig. 87)。

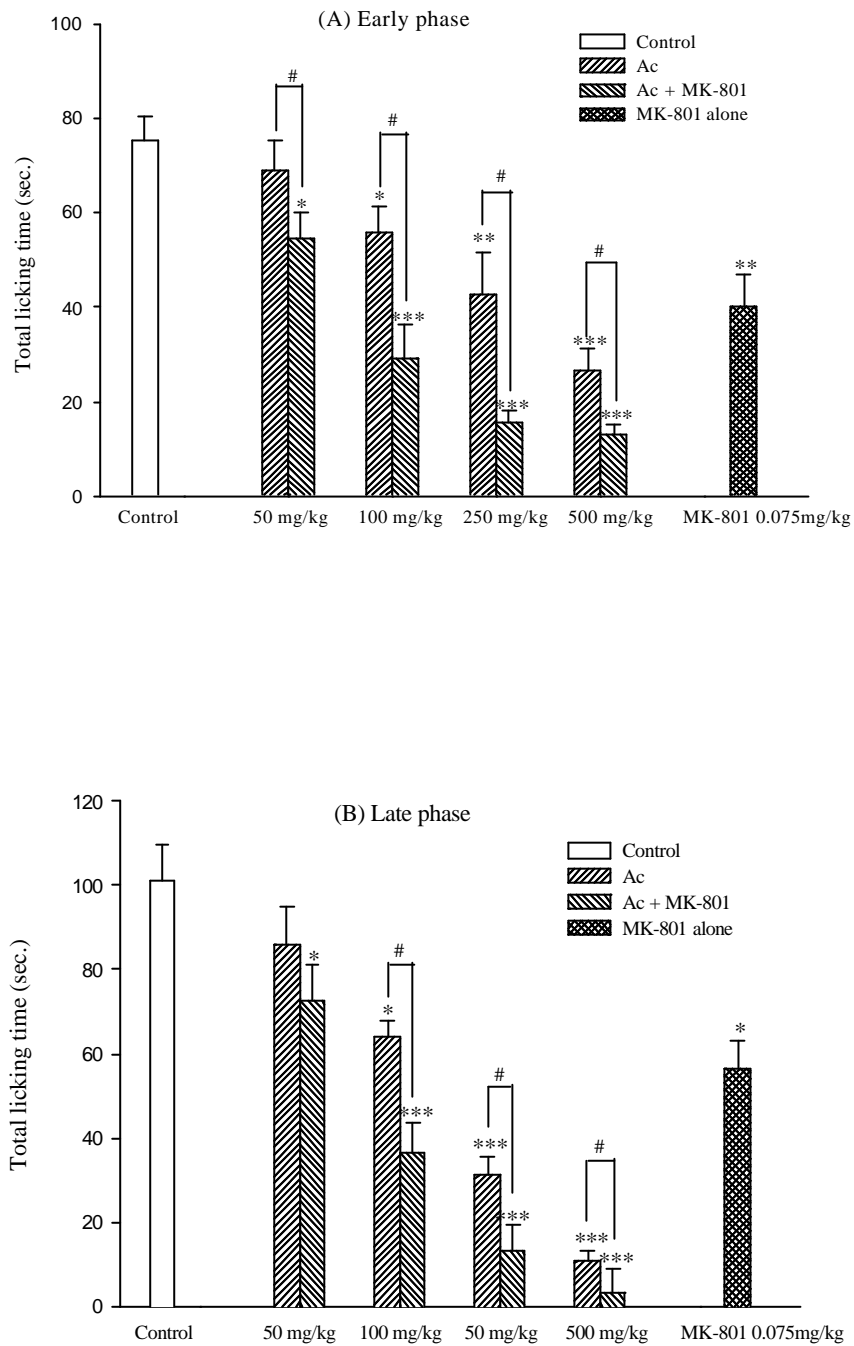


Fig. 4. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* or combination with MK-801 in formalin test. (A) Early phase. (B) Late phase. Data are shown as mean \pm S.E. (n = 9) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. compared with control group. #p < 0.05. Ac + MK-801 compared with Ac group.

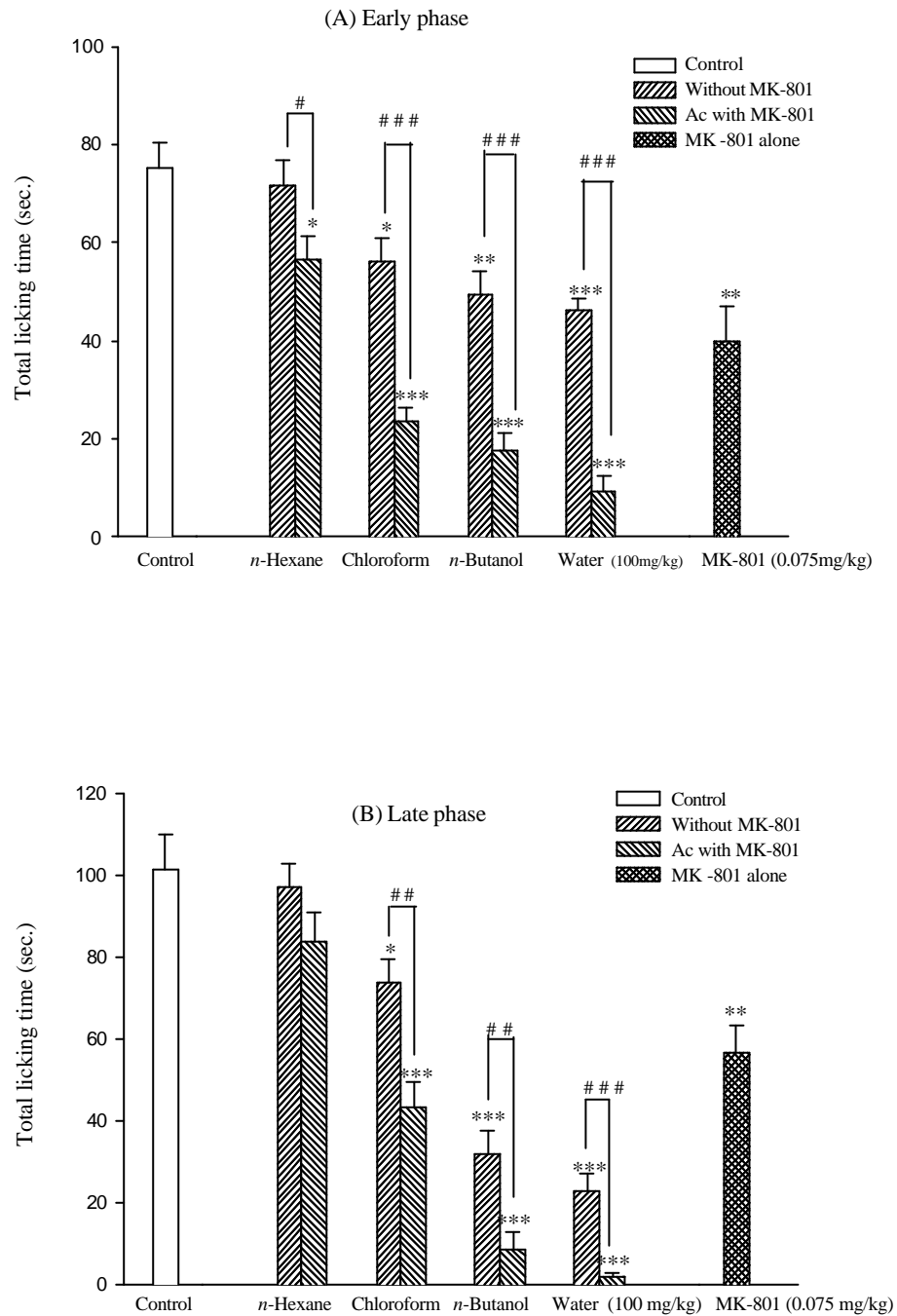


Fig. 5. The effects of various extract layers of *Ampelopsis cantoniensis* or combination with MK-801 in formalin test. (A) Early phase. (B) Late phase.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 9)

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. compared with control group.

#p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001. various extract layers of Ac + MK-801 compared with various extract layers of Ac group.

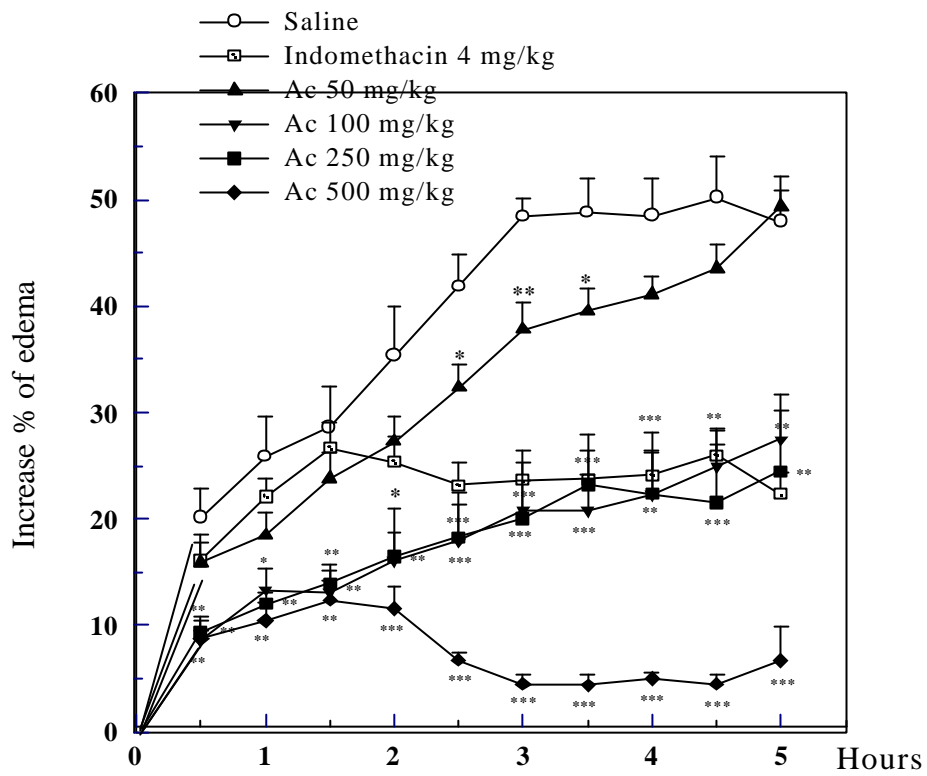


Fig. 6. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the carrageenin-induced hind-paw edema.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 8)

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. compared with saline group.

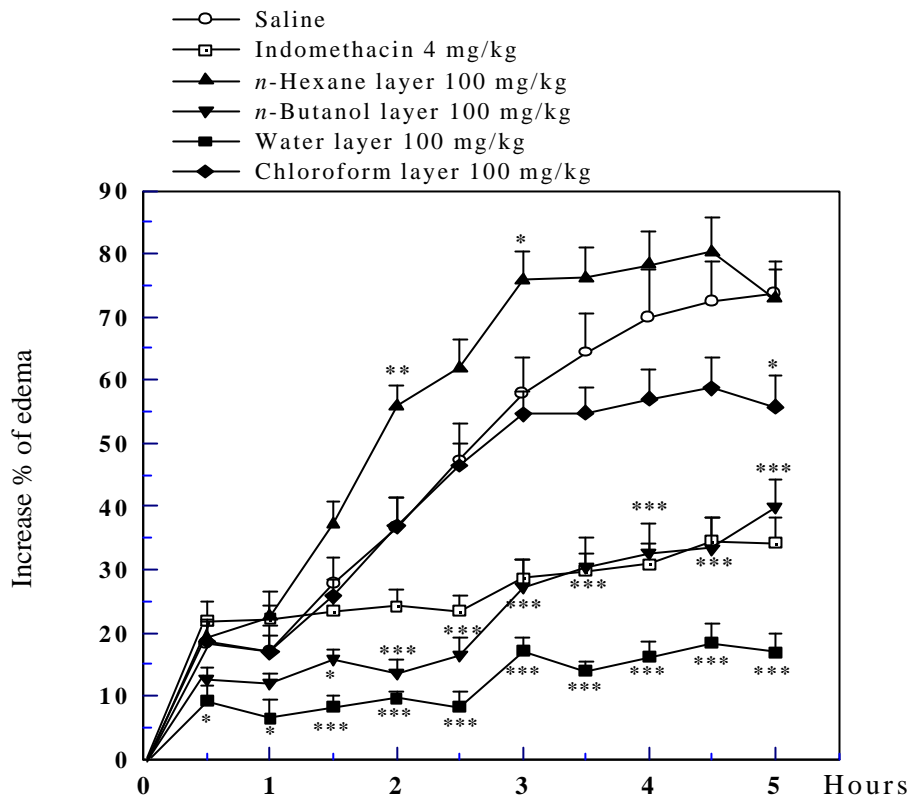
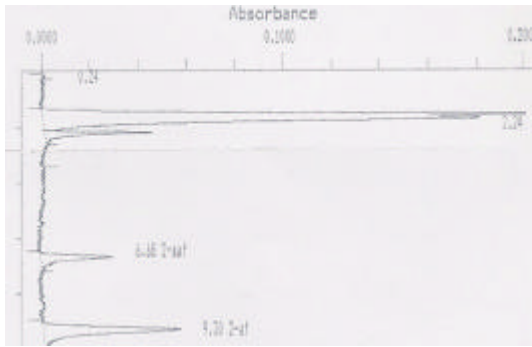


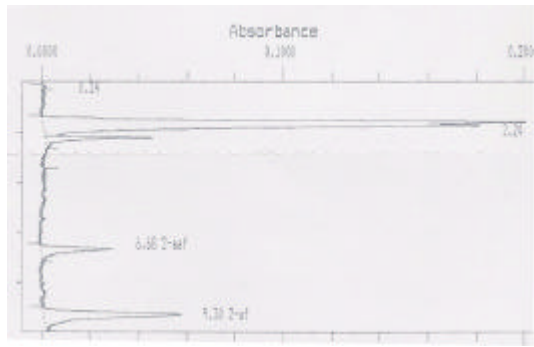
Fig. 7. The effects of various extract layers of *Ampelopsis cantoniensis* on the carrageenin-induced hind-paw edema.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 8)

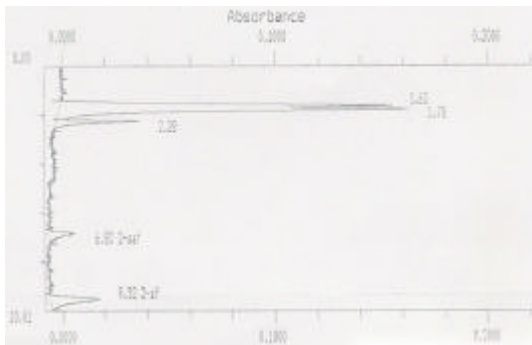
*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. compared with saline group.



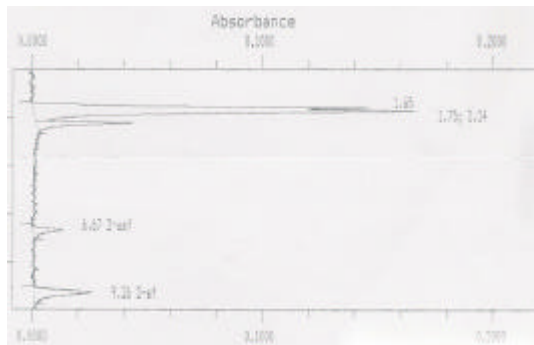
Standard



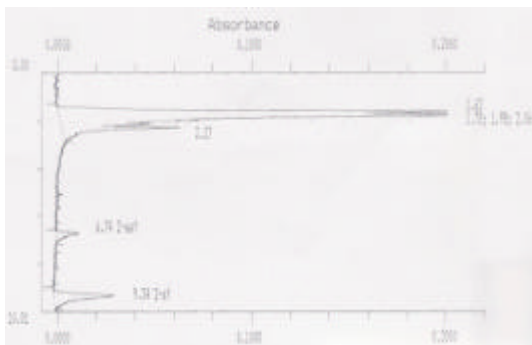
Control



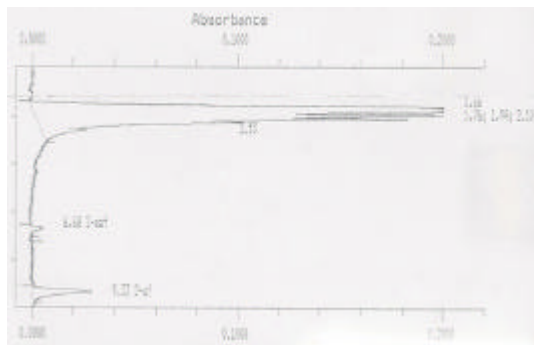
0.05 mg/ml



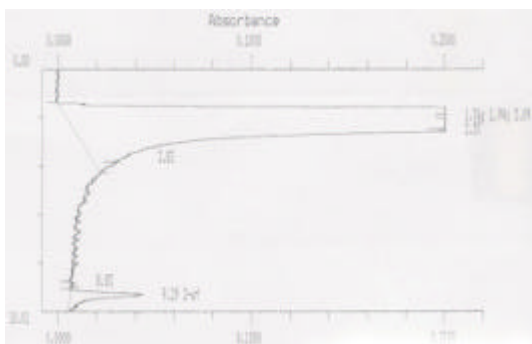
0.5 mg/ml



5 mg/ml



50 mg/ml



500 mg/ml

Fig. 8. The profile from HPLC indicated that the effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's liver tissue cytosols.

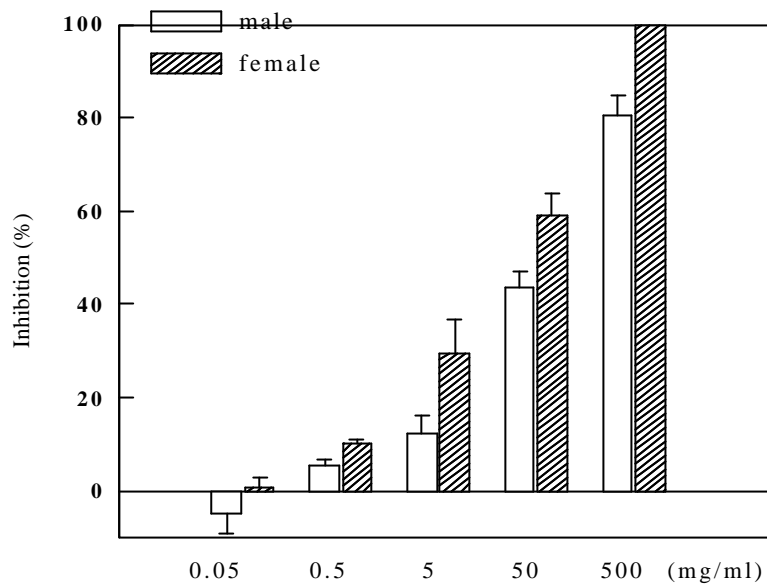


Fig. 9. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of 2-AF in rat' s liver tissue cytosols. Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3).

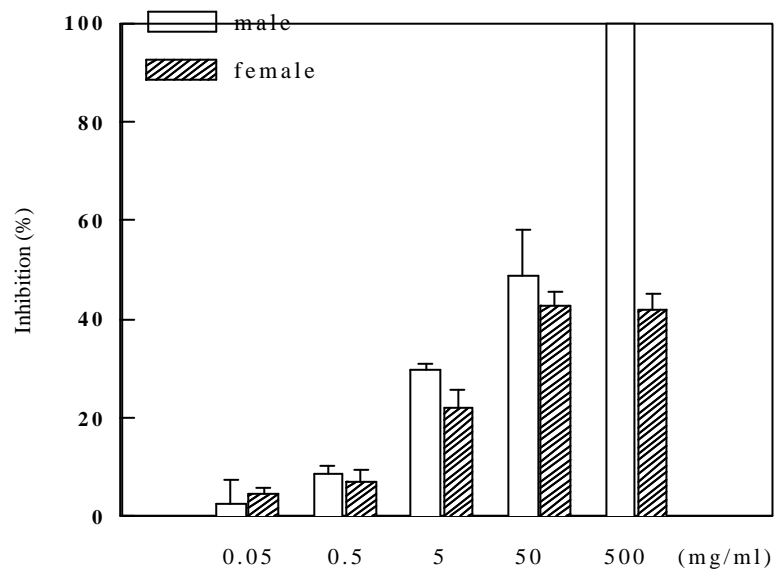


Fig. 10. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of PABA in rat' s liver tissue cytosols. Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3).

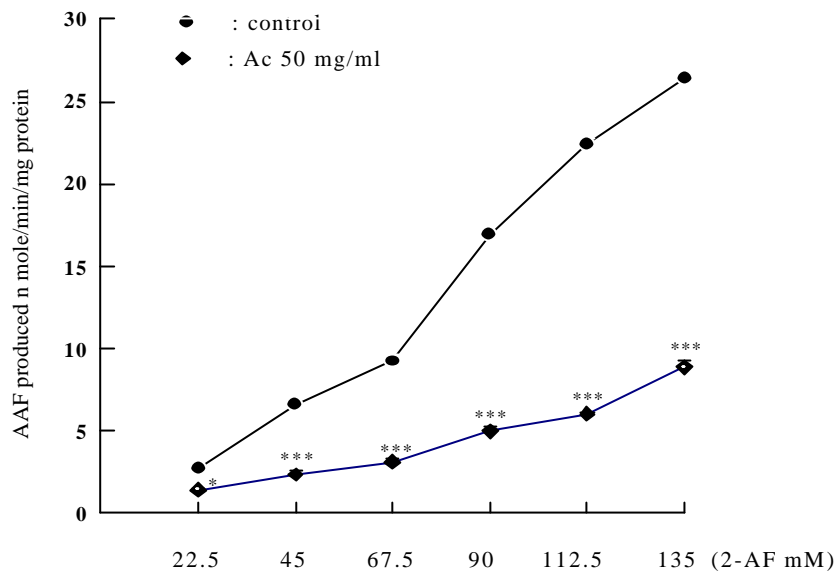


Fig. 11. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of 2-AF in male rat's liver tissue cytosols. Values are expressed as mean \pm S.E. (n = 3).

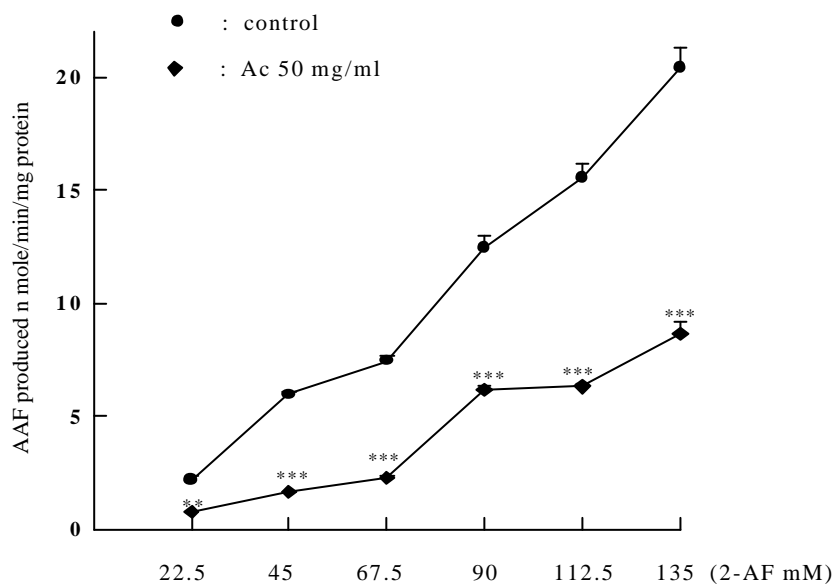


Fig. 12. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of 2-AF in female rat's liver tissue cytosols. Values are expressed as mean \pm S.E. (n = 3)

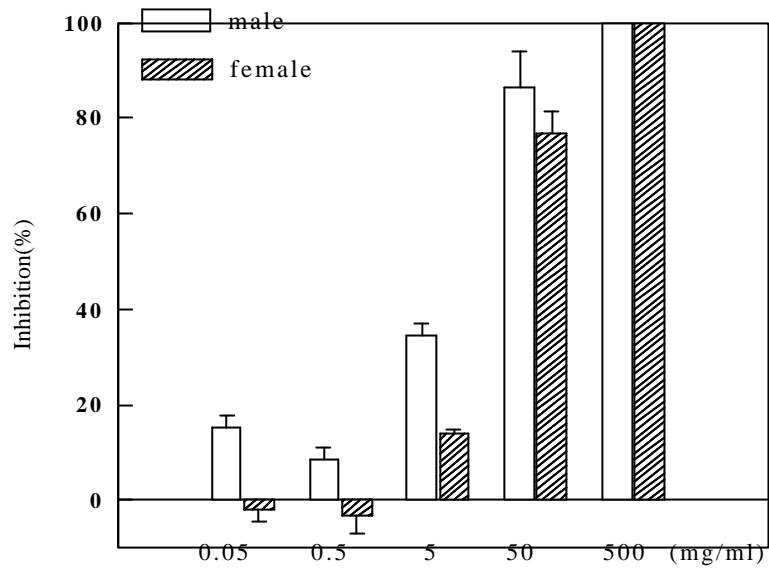


Fig. 13. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's blood cytosols. Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3).

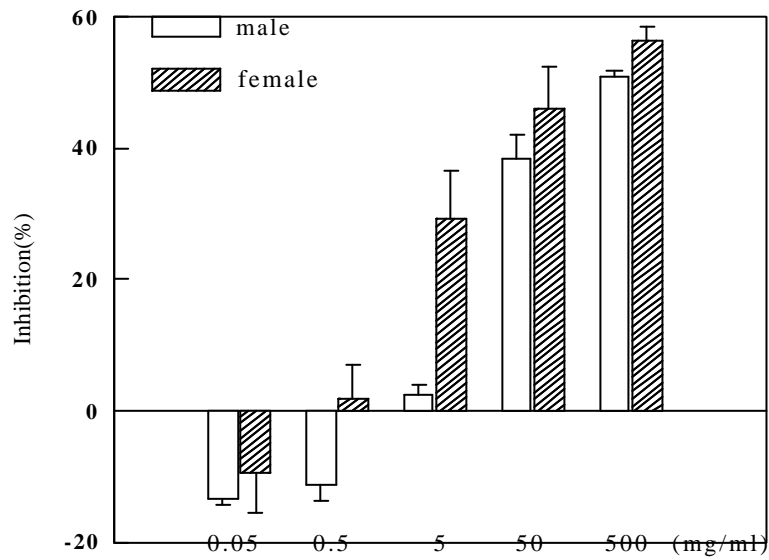


Fig. 14. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of PABA in rat's blood cytosols. Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3).

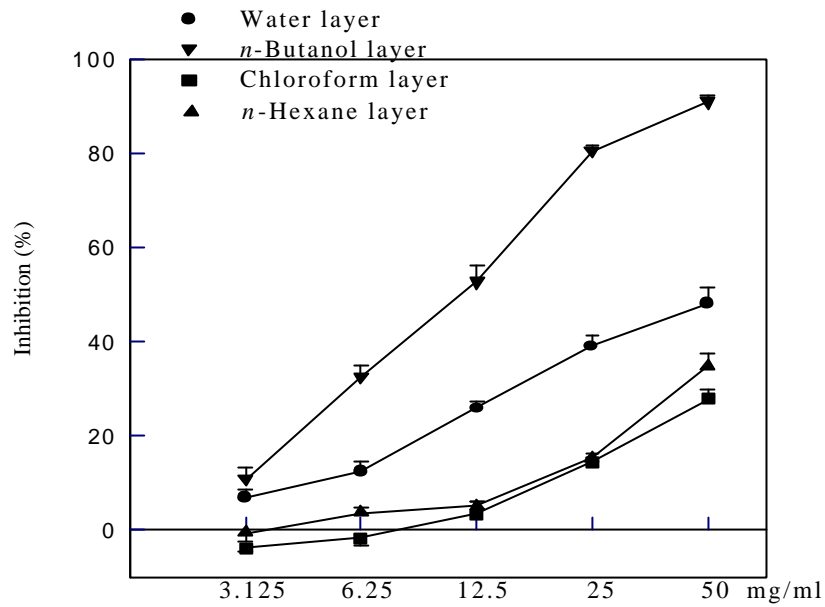


Fig. 15. The effects of various extracted of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of 2-AF in male rat' s liver tissue cytosols. Values are expressed as mean \pm S.E. (n = 3).

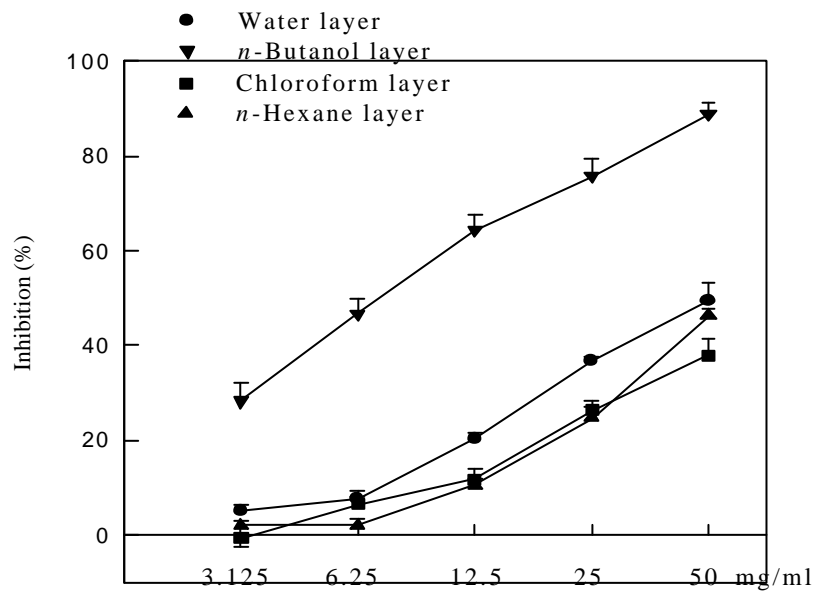


Fig. 16. The effects of various extracted of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of 2-AF in female rat' s liver tissue cytosols. Values are expressed as mean \pm S.E. (n = 3).

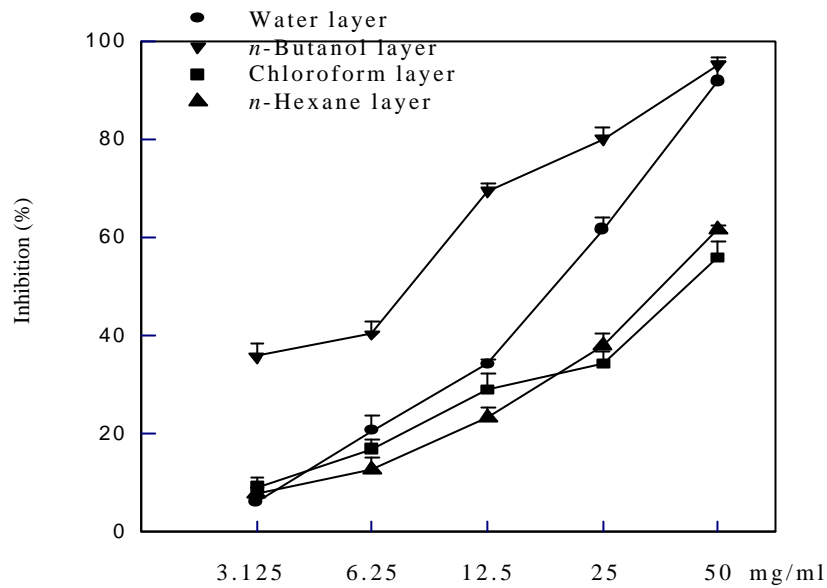


Fig. 17. The effects of various extracted of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of PABA in male rat's liver tissue cytosols. Values are expressed as mean \pm S.E. (n = 3).

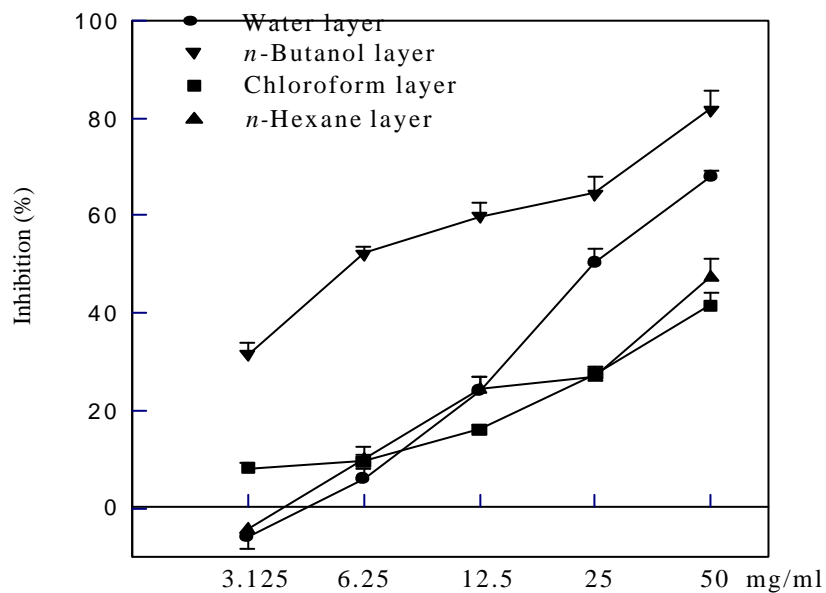


Fig. 18. The effects of various extracted of *Ampelopsis cantoniensis* on the *N*-acetylation of PABA in female rat's liver tissue cytosols. Values are expressed as mean \pm S.E. (n = 3)

Tab. 1. The inhibition (%) of various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* on *N*-acetylation of 2-AF in male rat' s blood cytosols.

Conc. / Group	3.125 mg/ml	6.25 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
<i>n</i> -hexane layer	14.7057±2.3121	22.2105±1.9887	36.3411±2.4348	59.7861±2.2851	82.1868±3.1954
chloroform layer	-37.0363±0.933	-27.3030±1.575	-7.0305±2.8033	26.0837±1.3641	46.8398±8.0828
<i>n</i> -butanol layer	36.2231±3.8501	72.1885±3.6910	86.1299±3.5411	97.0317±2.9683	100±0
water layer	-8.6332±2.9905	5.2121±1.4850	30.6829±4.8872	48.3333±3.7825	87.5483±2.6411

Values are mean ± SE of percentage inhibition from 6 individual experiments (n = 6).

Tab. 2. The inhibition (%) of various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* on *N*-acetylation of 2-AF in female rat' s blood cytosols.

Conc. / Group	3.125 mg/ml	6.25 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
<i>n</i> -hexane layer	-23.4886±2.968	7.8276±2.9933	49.3200±2.8318	67.3352±4.9943	88.4440±3.6783
chloroform layer	1.4442±2.4244	15.4257±2.4402	44.3351±3.6021	67.7132±4.5135	85.8357±3.5146
<i>n</i> -butanol layer	71.0083±3.3700	85.5005±6.5269	94.6878±3.3271	100±0	100±0
water layer	-7.7358±2.2558	20.7093±1.5106	45.1612±2.8385	63.7077±2.4657	89.5042±3.6879

Values are mean ± SE of percentage inhibition from 6 individual experiments (n = 6).

Tab. 3. The inhibition (%) of various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* on *N*-acetylation of PABA in male rat' s blood cytosols.

Conc. / Group	3.125 mg/ml	6.25 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
<i>n</i> -hexane layer	3.9891±2.2528	11.0640±1.8711	13.6269±2.4778	33.7001±2.2976	44.4097±0.6132
chloroform layer	6.3251±2.3507	10.1643±1.5667	15.2128±1.8984	19.3758±1.9624	23.5865±1.6601
<i>n</i> -butanol layer	10.1455±1.8701	37.5696±1.7313	48.5435±3.7546	49.4378±2.7574	53.2777±3.2525
water layer	-2.7038±2.6489	5.6522±3.1382	20.3593±2.5756	47.9482±1.7668	91.5785±4.8399

Values are mean ± SE of percentage inhibition from 6 individual experiments (n = 6).

Tab. 4. The inhibition (%) of various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* on *N*-acetylation of PABA in female rat' s blood cytosols.

Conc. / Group	3.125 mg/ml	6.25 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
<i>n</i> -hexane layer	25.0098±4.3594	28.8592±4.0553	32.4014±3.9752	36.3255±3.8668	44.4673±2.5323
chloroform layer	6.9109±2.7010	13.5177±1.6476	13.6626±2.7233	20.1236±2.7909	24.8269±1.3564
<i>n</i> -butanol layer	30.8917±3.7023	54.4006±3.3003	95.7543±1.9104	96.9116±1.9104	100±0
water layer	-0.4714±2.3983	13.2452±2.8681	34.7352±3.3744	61.7138±4.9400	85.4892±4.7648

Values are mean \pm SE of percentage inhibition from 6 individual experiments (n = 6).

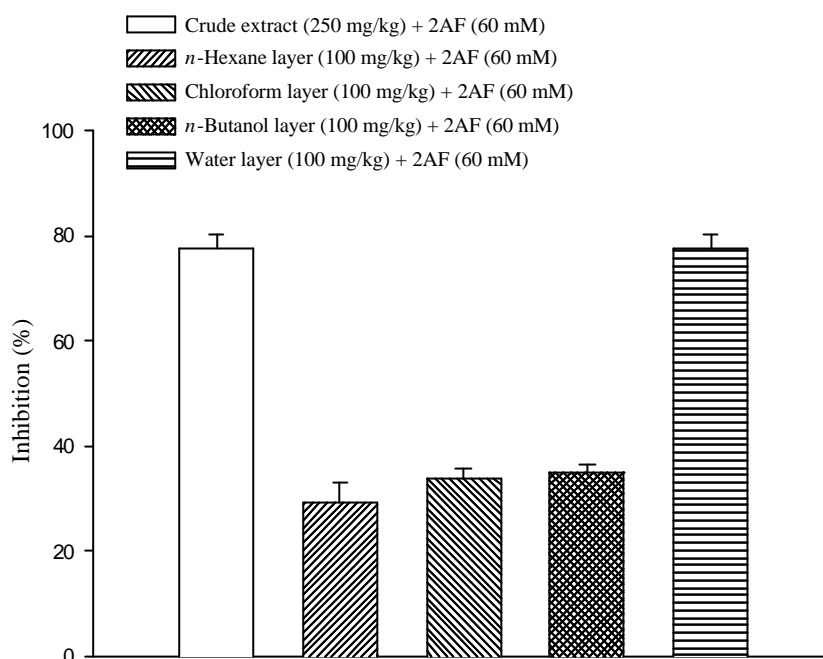


Fig. 19. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered 24 hrs before 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's liver tissue cytosols. (n = 7)

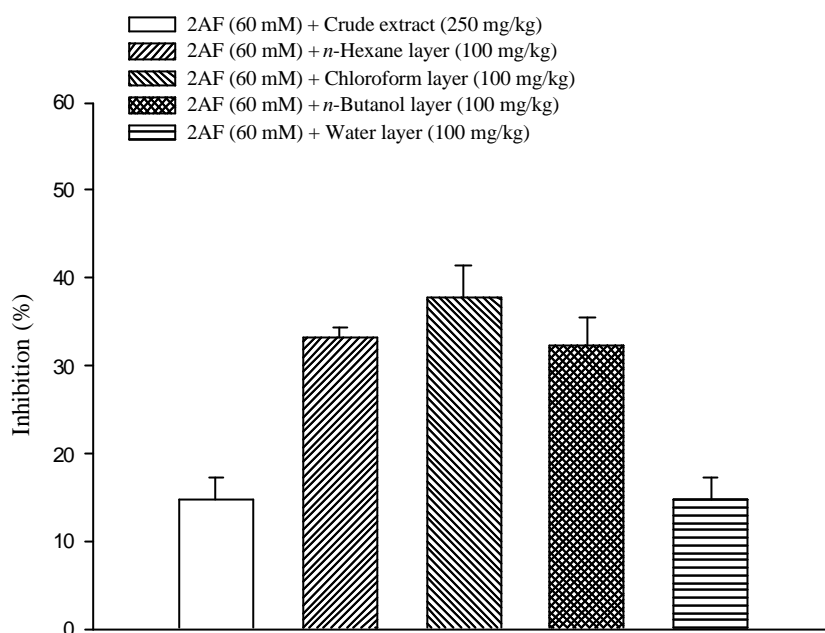


Fig. 20. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered simultaneously with 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's liver tissue cytosols. (n = 7)

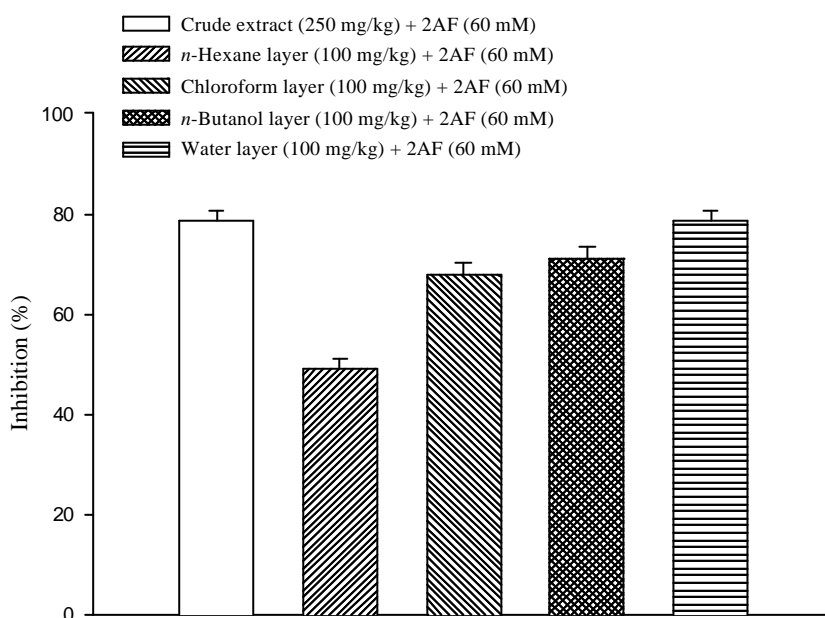


Fig. 21. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered 24 hrs before 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's blood cytosols. (n = 7)

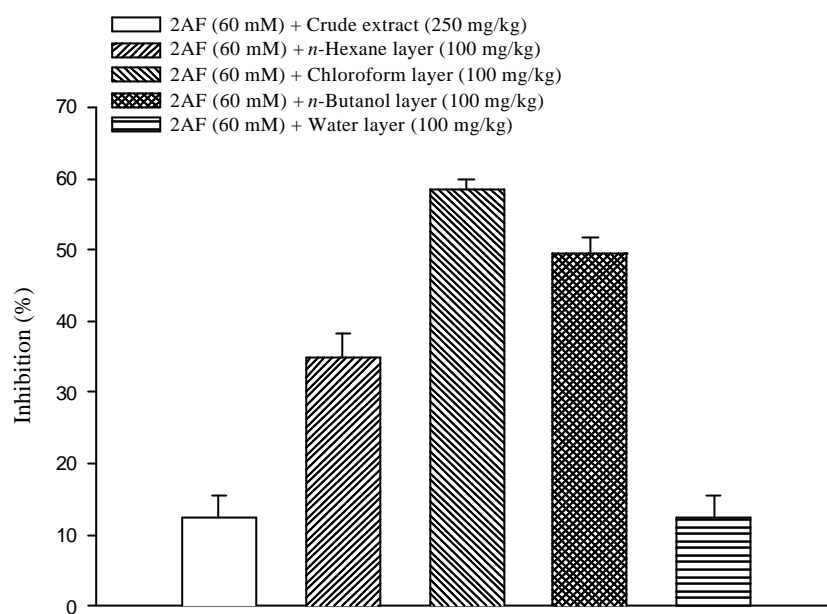


Fig. 22. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered simultaneously with 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's blood cytosols. (n = 7)

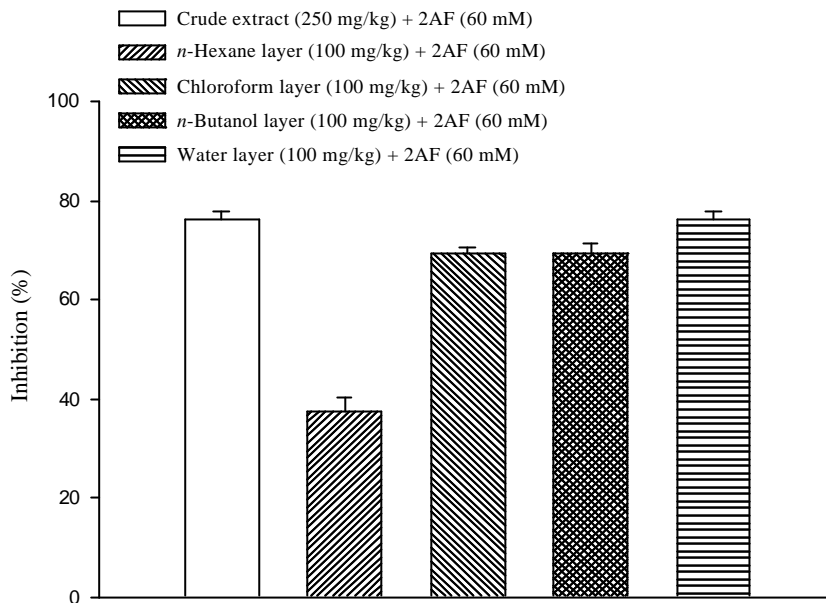


Fig. 23. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered 24 hrs before 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's kidney tissue cytosols. (n = 7)

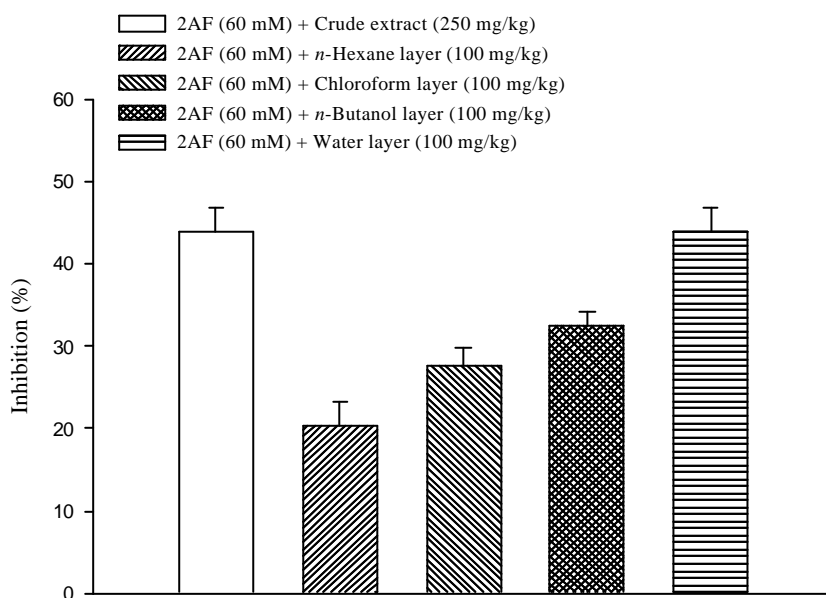


Fig. 24. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered simultaneously with 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's kidney tissue cytosols. (n = 7)

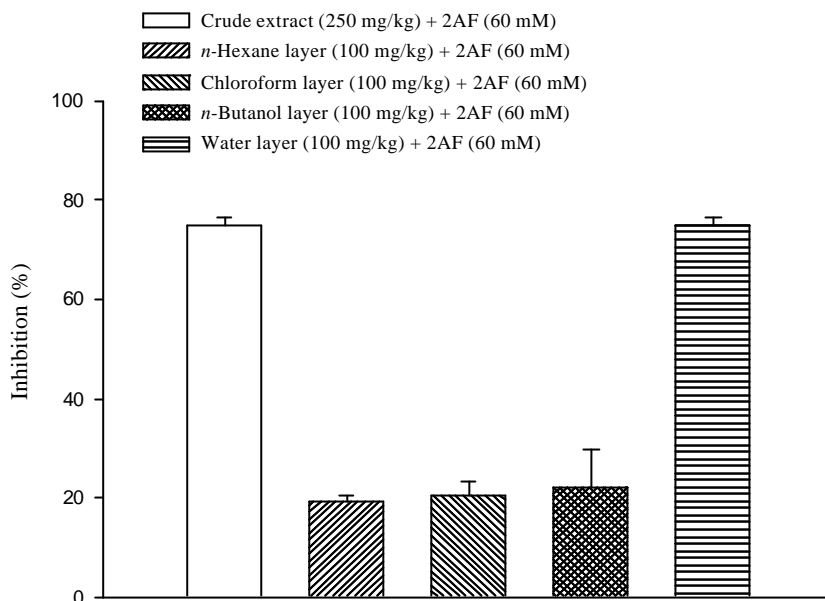


Fig. 25. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered 24 hrs before 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's urine. (n = 7)

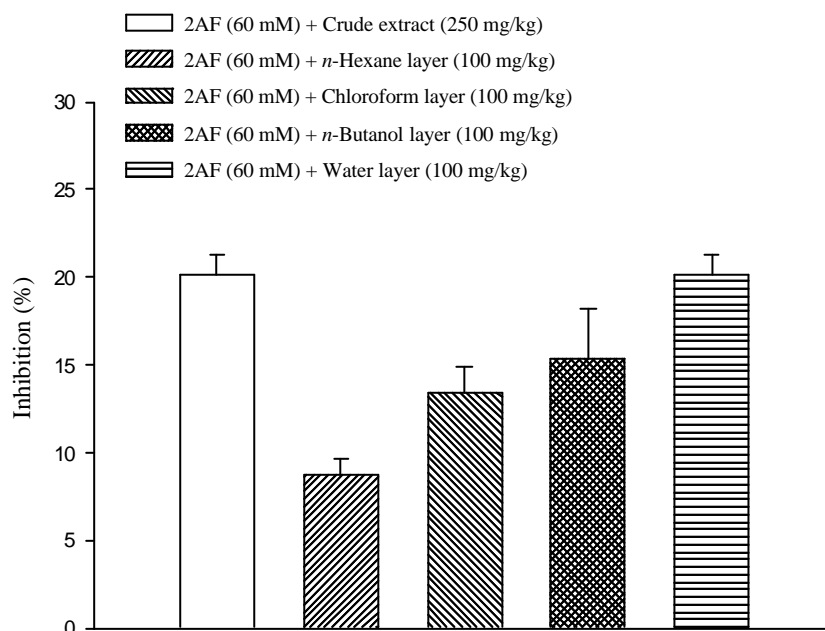


Fig. 26. The effects of crude and various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* administered simultaneously with 2-AF on the *N*-acetylation of 2-AF in rat's urine. (n = 7)

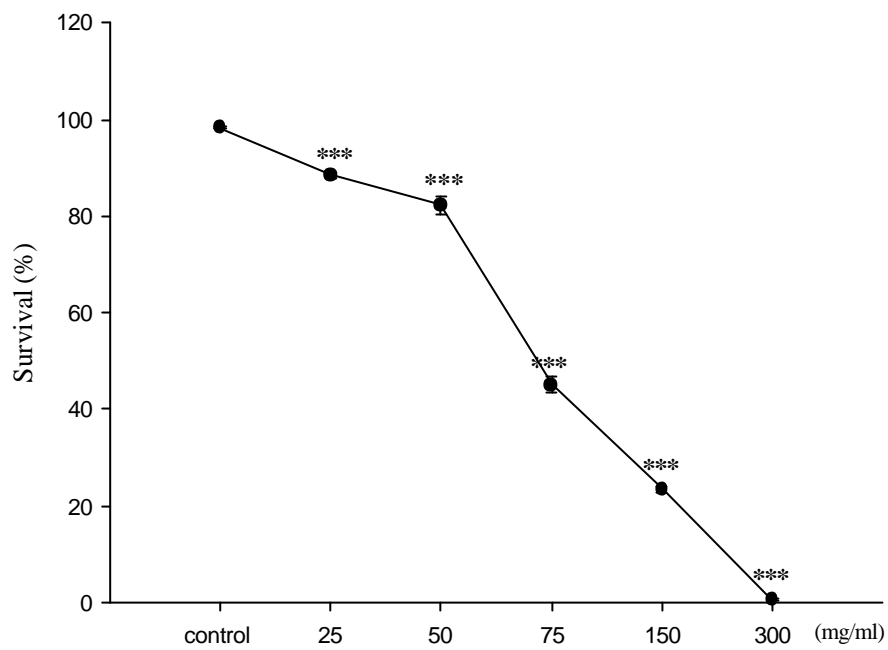


Fig. 27. Viability of HL-60 cells after treatment with crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hours.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

***p<0.001. compared with control group.

layer \ mg/ml	control	3.125	6.25	12.5	25	50
<i>n</i> -Hexane	91.80 ± 0.31	96.50 ± 0.44	96.35 ± 0.73	92.38 ± 1.55	69.44 ± 4.03***	18.64 ± 1.67***
Chloroform	90.85 ± 0.69	95.53 ± 0.19	96.15 ± 0.19	94.88 ± 0.33	93.19 ± 0.51	82.96 ± 1.10***
<i>n</i> -Butanol	90.35 ± 0.58	87.11 ± 0.61**	82.92 ± 0.45***	76.52 ± 1.70***	71.68 ± 0.71***	70.16 ± 1.51***
Water	91.87 ± 0.34	85.90 ± 0.56***	84.64 ± 0.61***	81.83 ± 2.09***	54.77 ± 1.19***	44.78 ± 1.19***

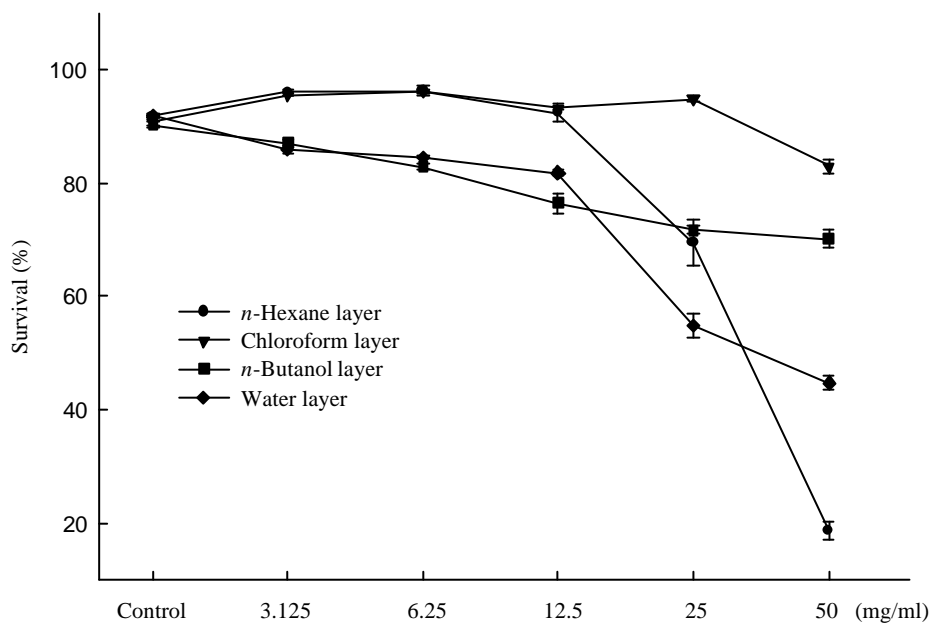


Fig. 28. Viability of HL-60 cells after treatment with various extracted layers of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hours.

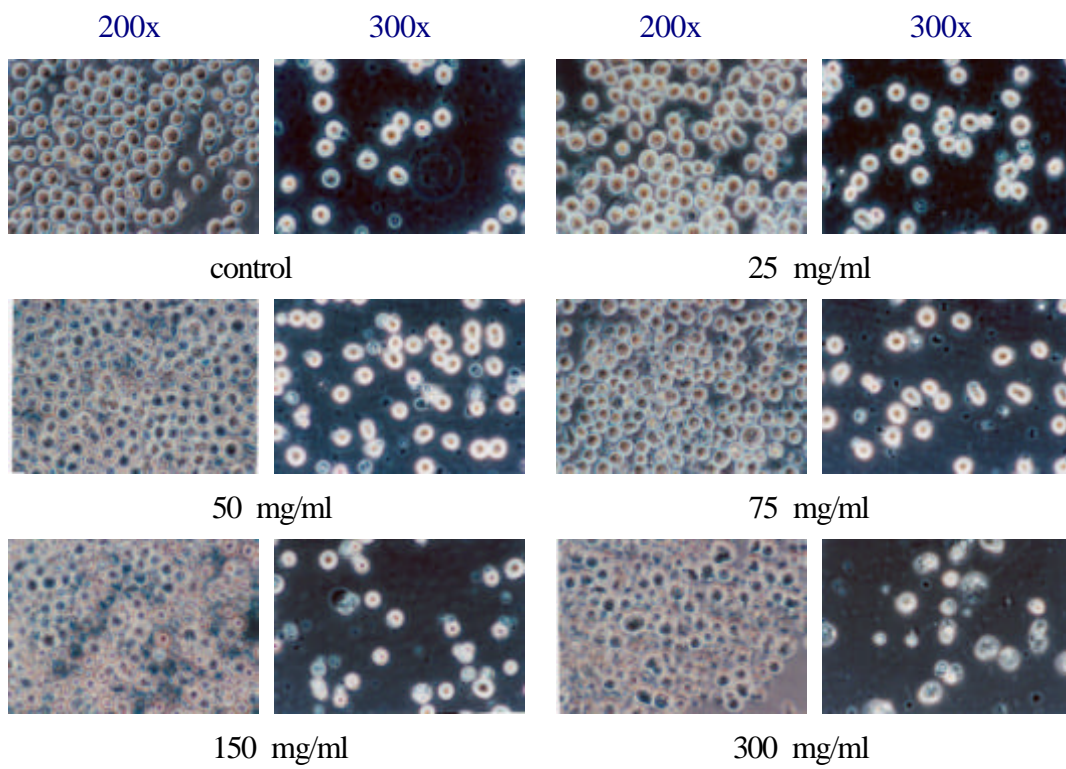


Fig. 29. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the morphological appearance in HL-60 cells.

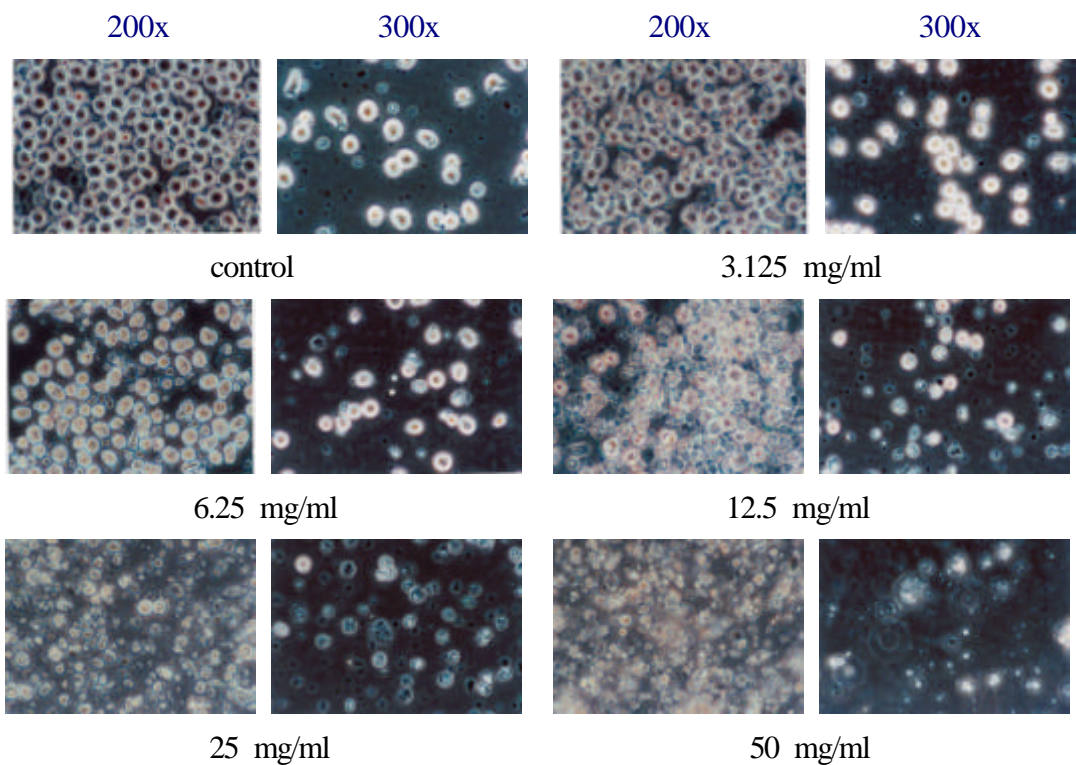


Fig. 30. The effects of *n*-hexane layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the morphological appearance in HL-60 cells.

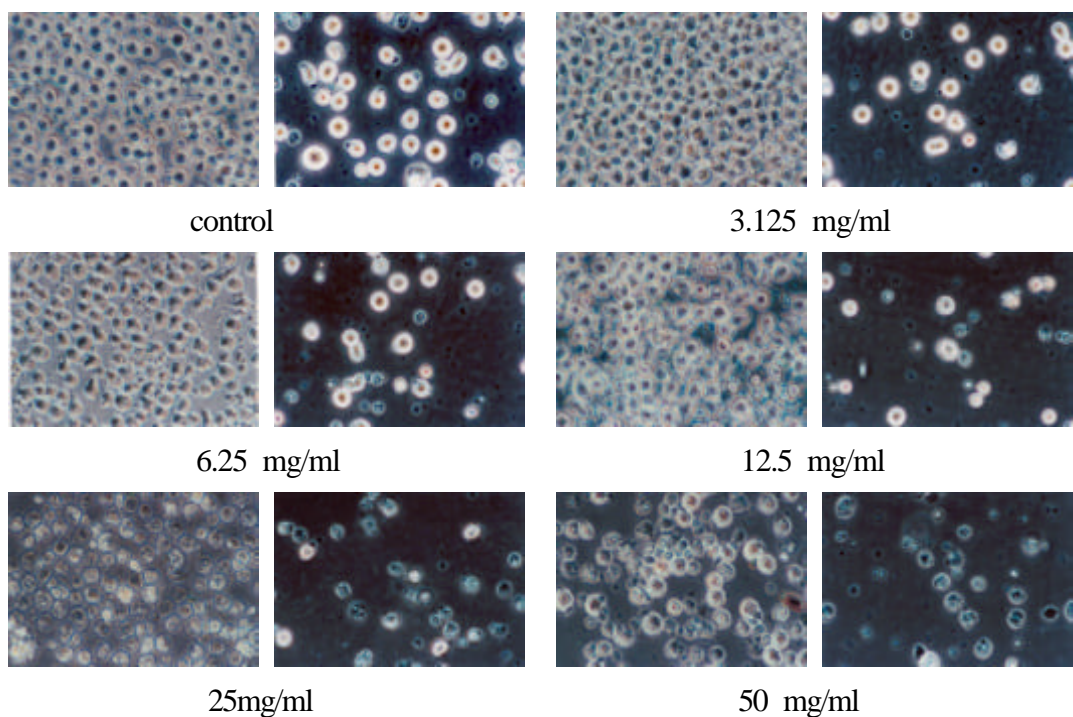


Fig. 31. The effects of chloroform layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the morphological appearance in HL-60 cells.

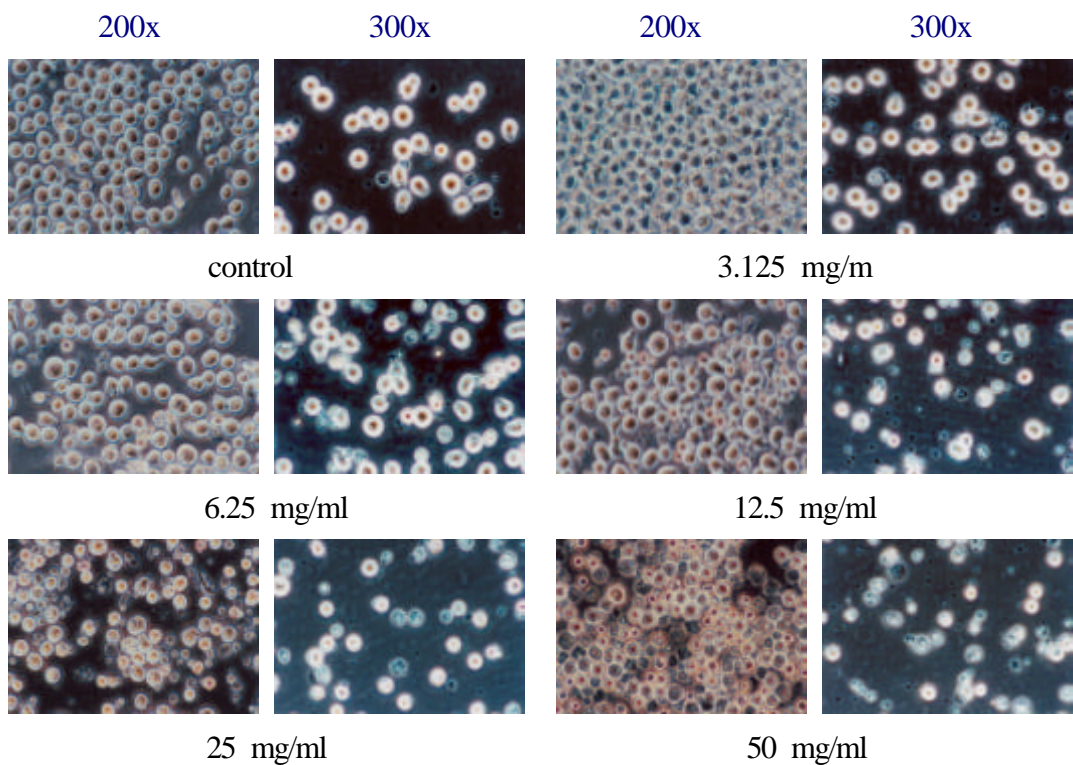


Fig. 32. The effects of *n*-butanol layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the morphological appearance in HL-60 cells.

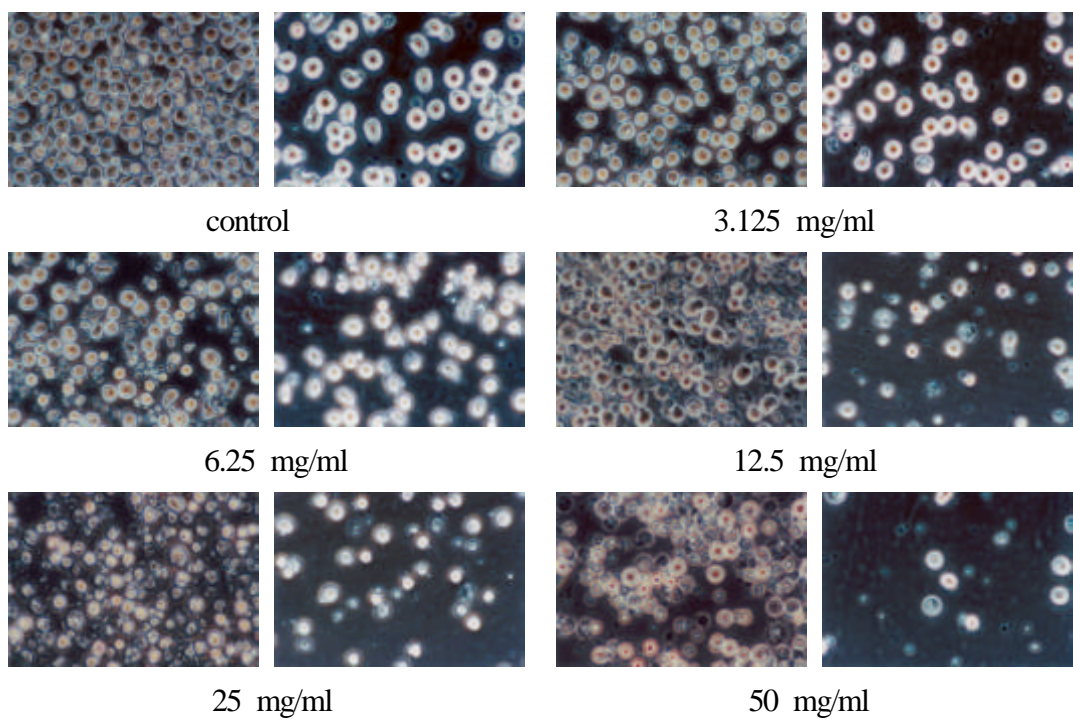


Fig. 33. The effects of water layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the morphological appearance in HL-60 cells.

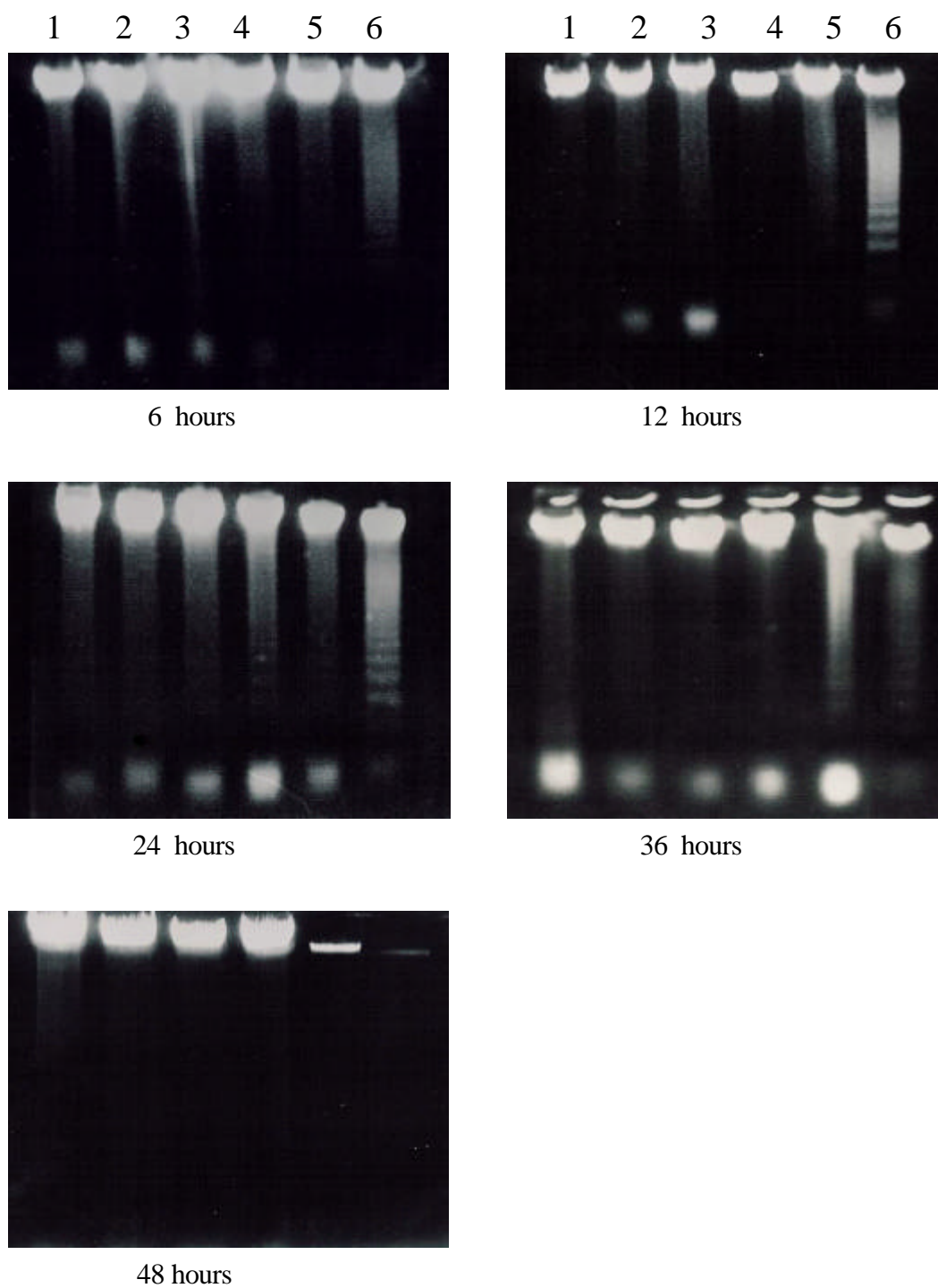


Fig. 34. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the DNA fragmentation in HL-60 cells.

Line 1: control; Line 2-6: 25, 50, 75, 150, 300 mg/ml of *Ampelopsis cantoniensis*, respectively.

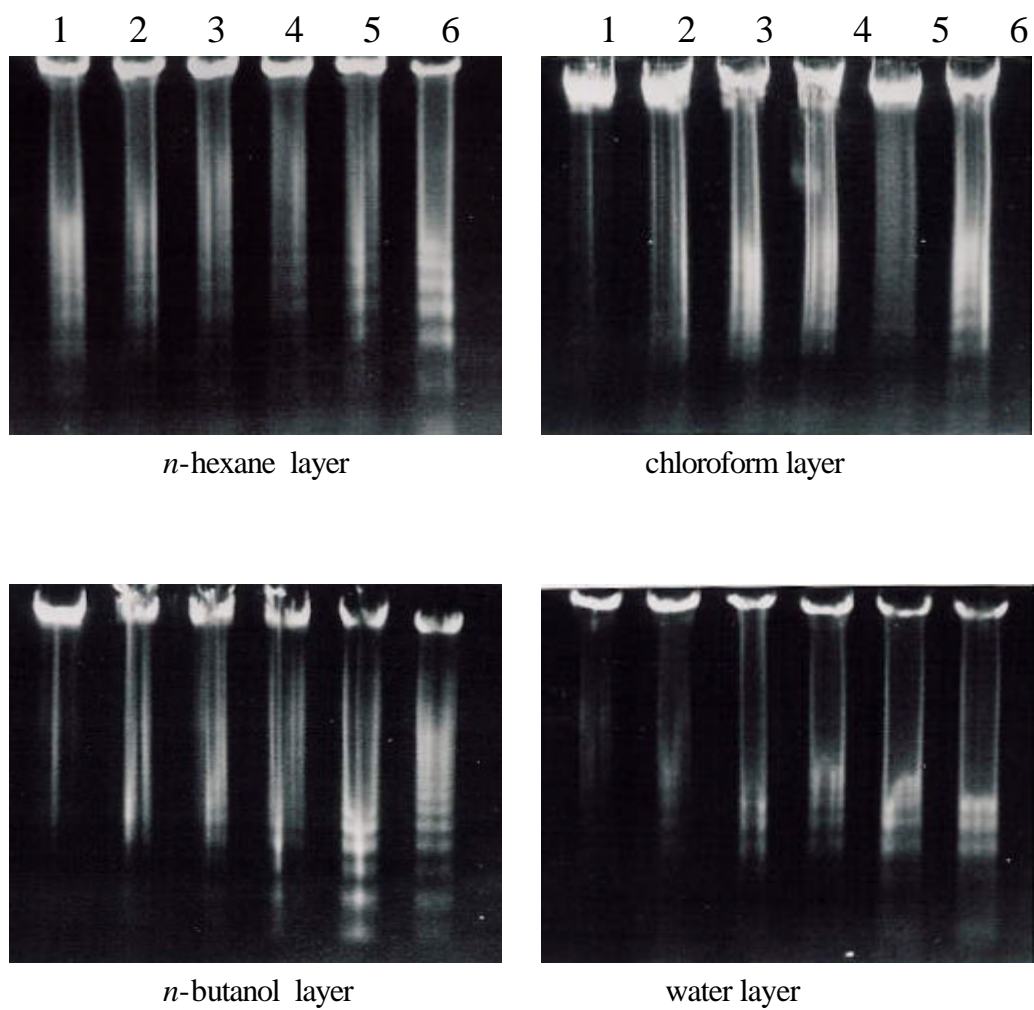


Fig. 35. The effects of various extract layers of *Ampelopsis cantoniensis* on the DNA fragmentation in HL-60 cells for 24 hours.

Line 1: control; Line 2-6: 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/ml of various extract layers of *Ampelopsis cantoniensis*.

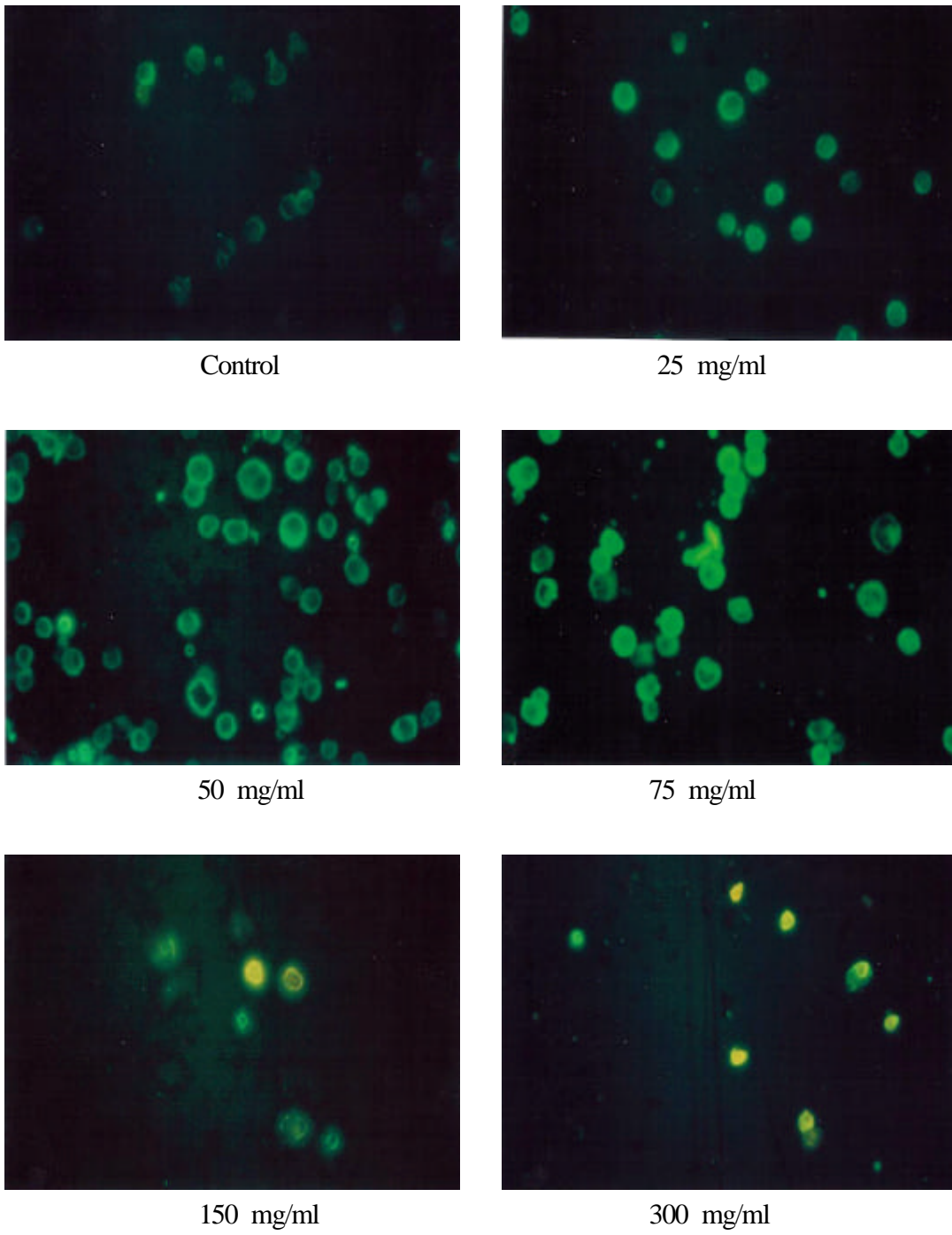


Fig. 36. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the apoptosis in HL-60 cells.

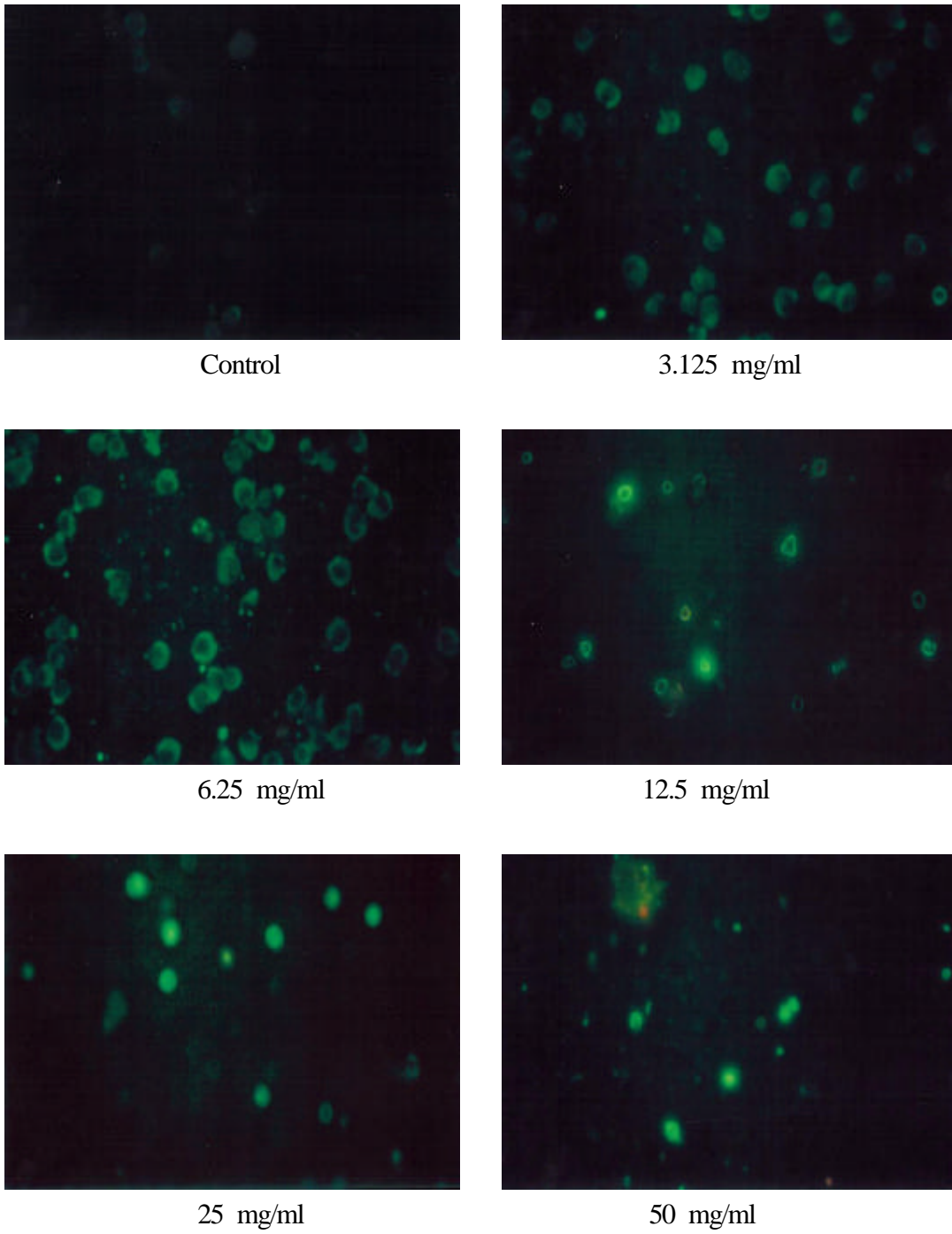


Fig. 37 The effects of *n*-hexane layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the apoptosis in HL-60 cells.

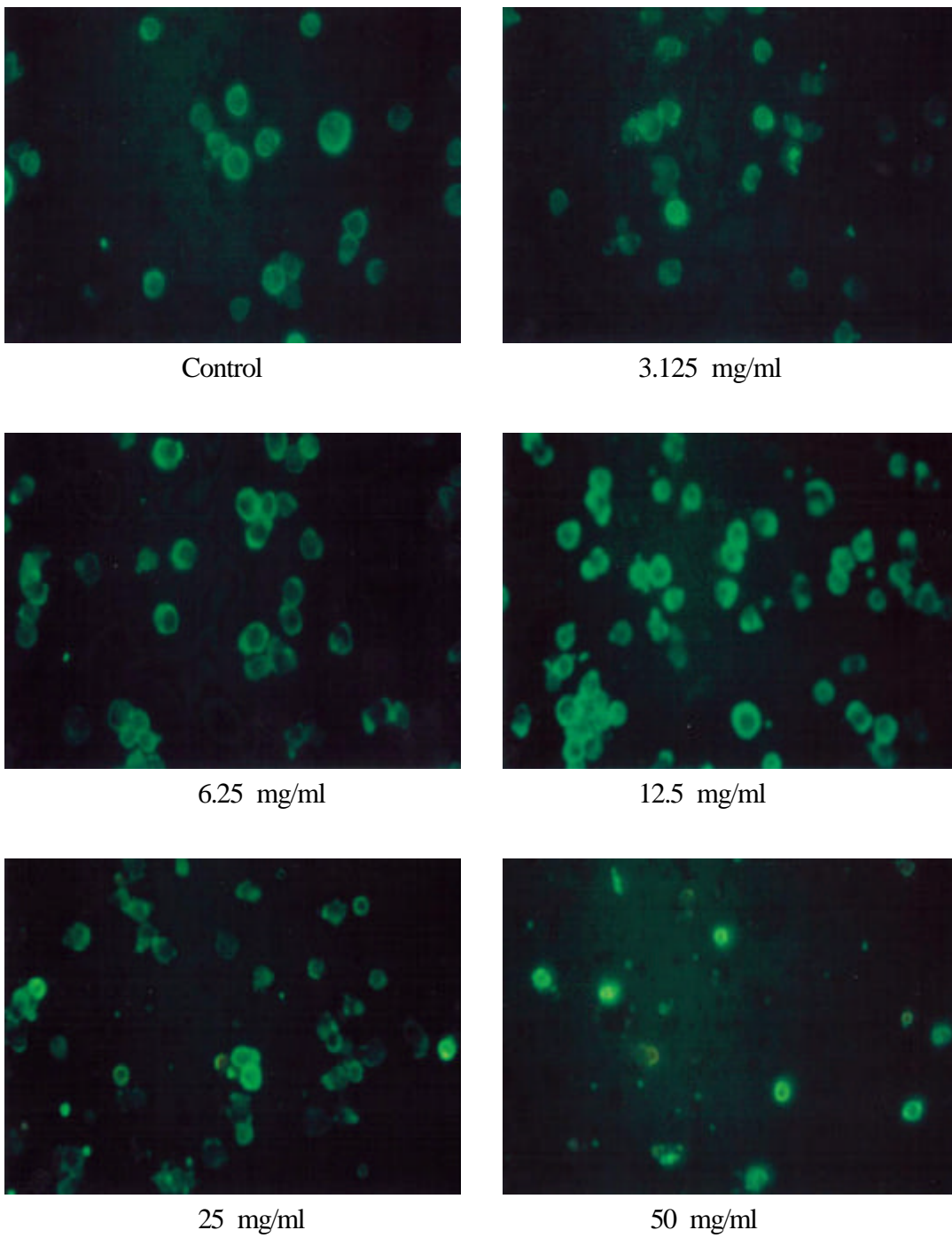


Fig. 38. The effects of chloroform layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the apoptosis in HL-60 cells.

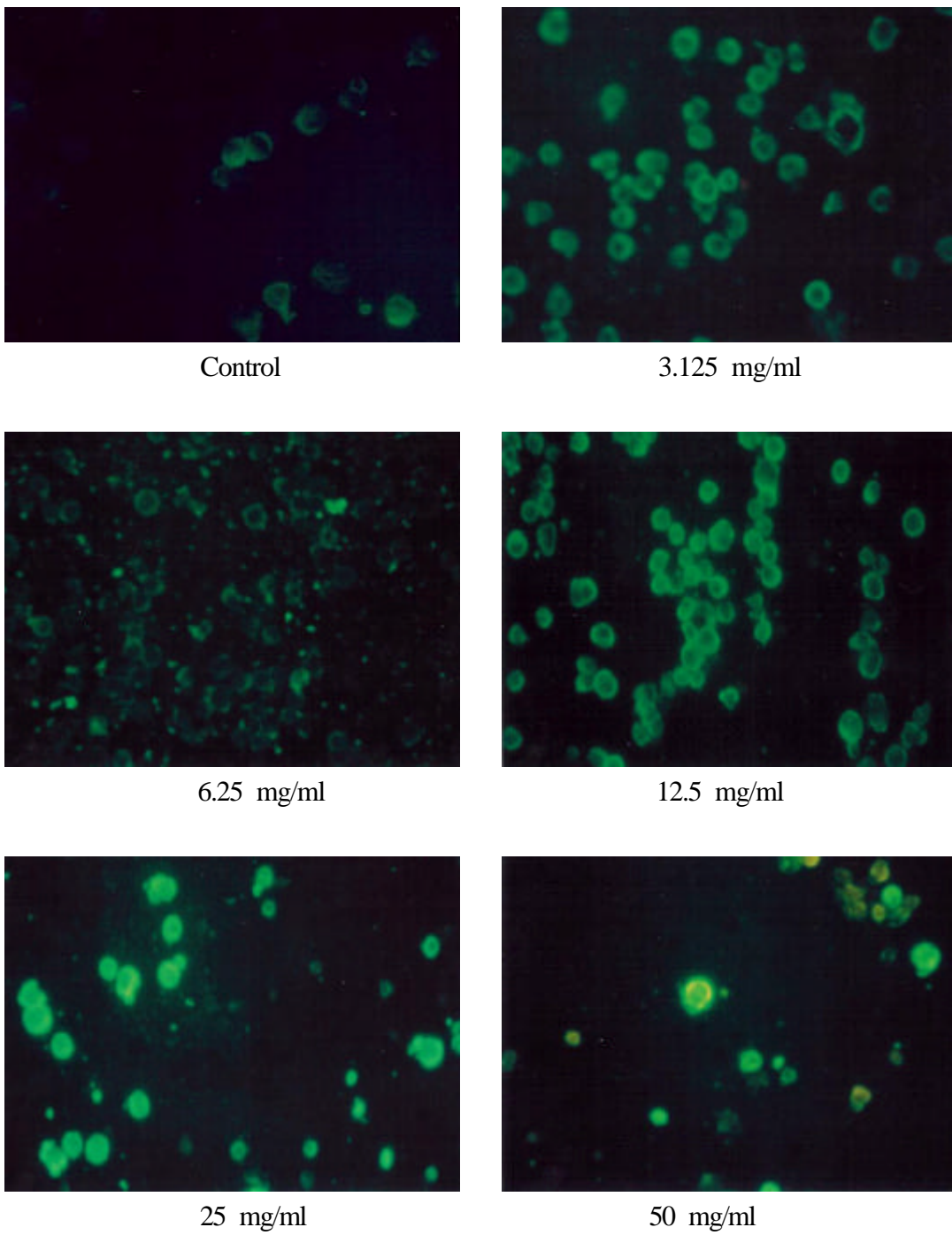


Fig. 39. The effects of *n*-butanol layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the apoptosis in HL-60 cells.

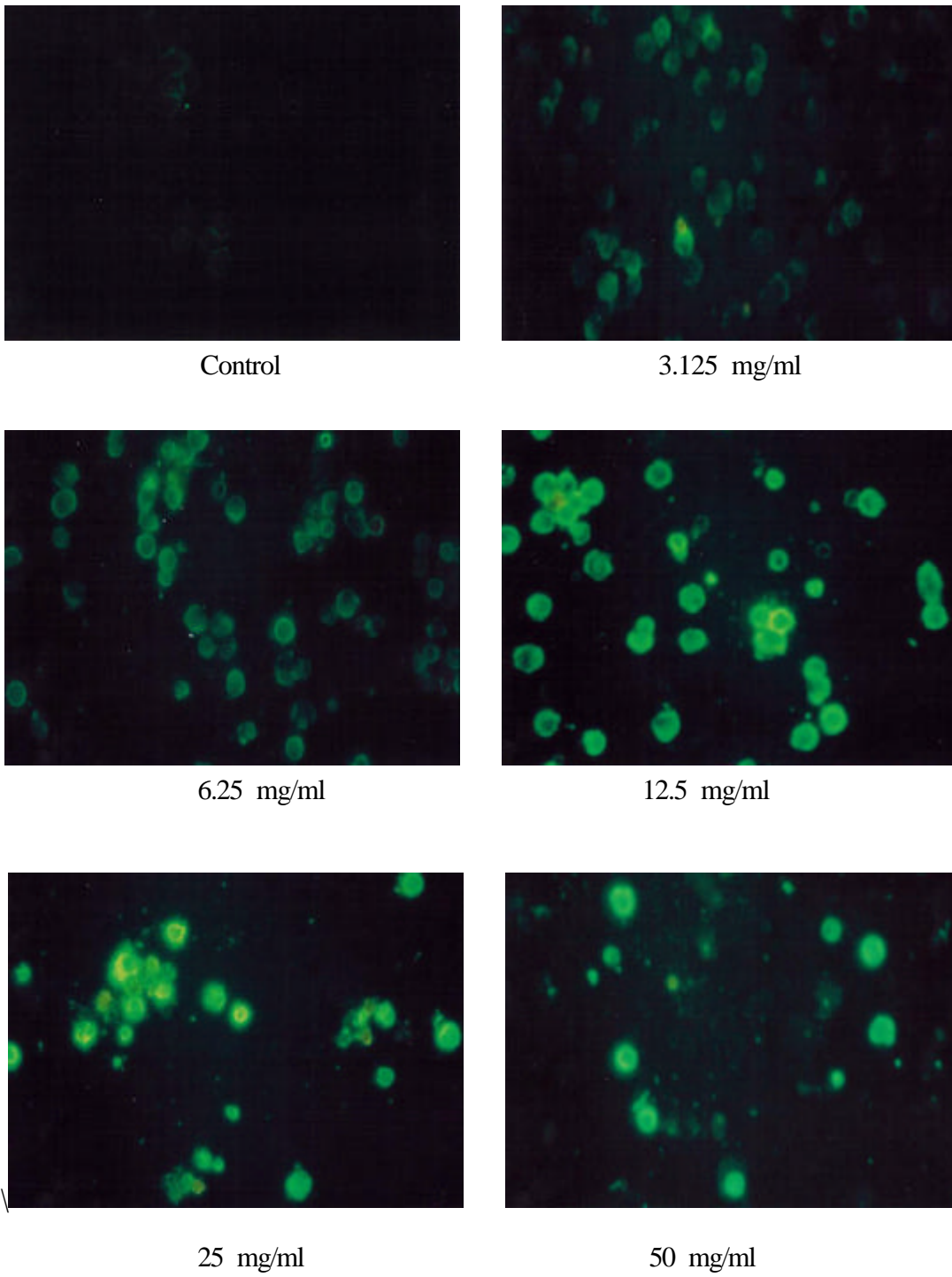
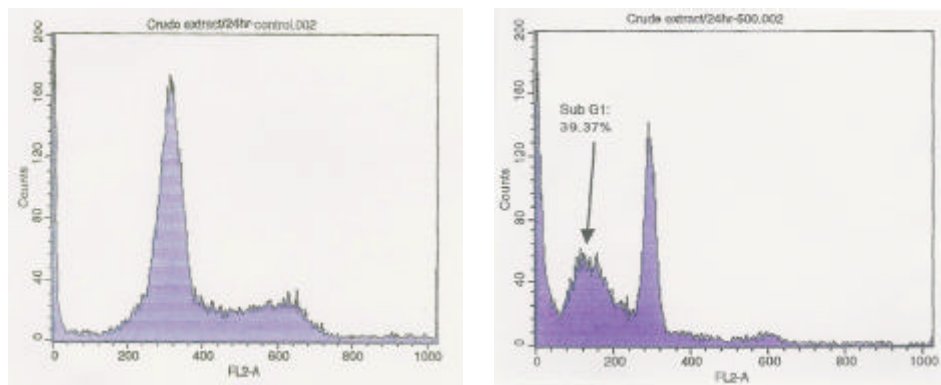


Fig. 40. The effects of water layer of *Ampelopsis cantoniensis* on the apoptosis in HL-60 cells.

A.



B.

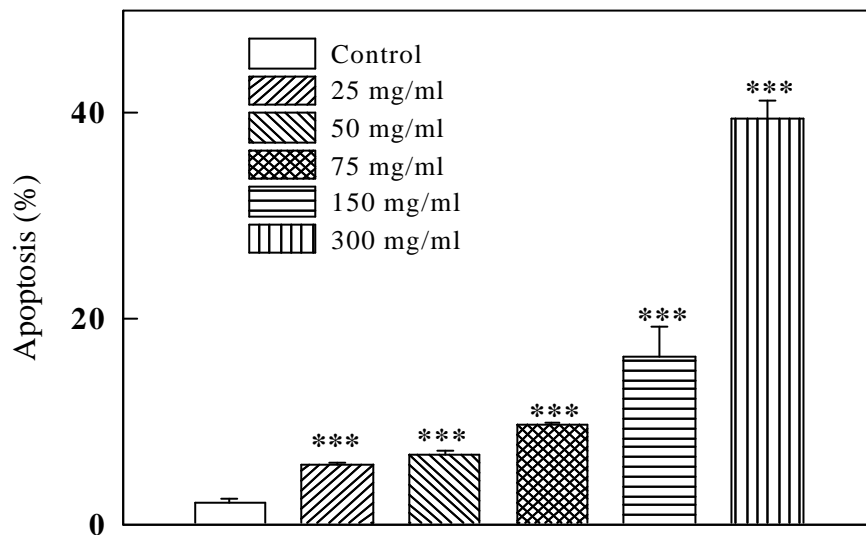
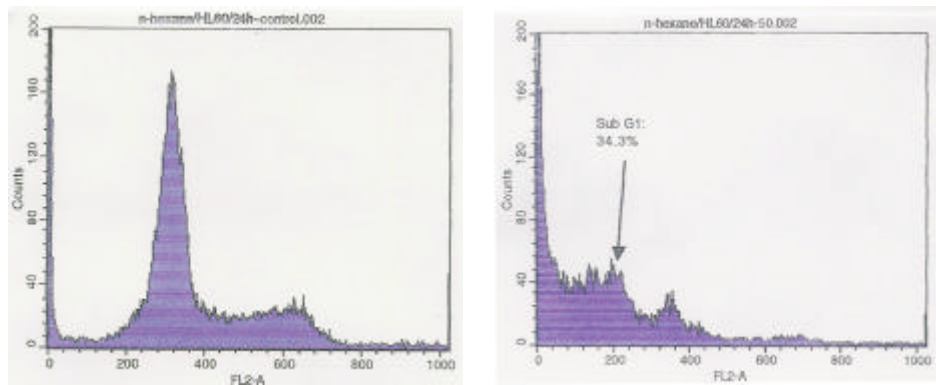


Fig. 41. Crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

***p<0.001, compared with control group.

A.



B.

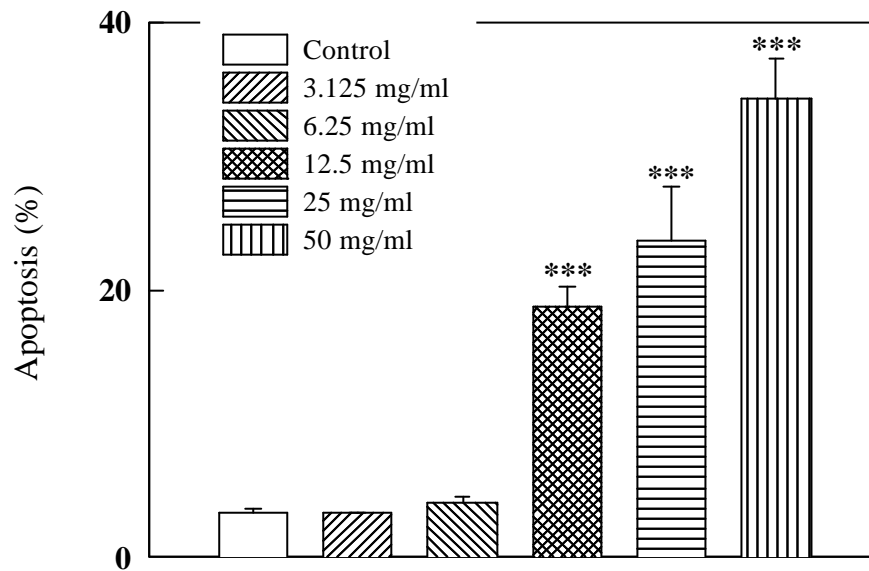
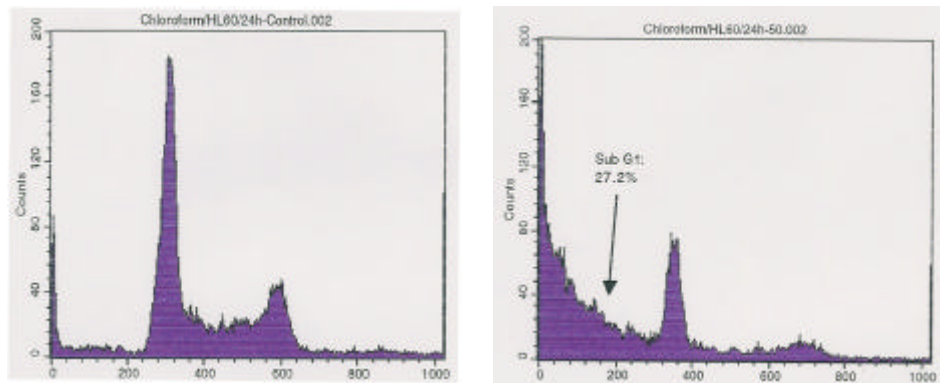


Fig. 42. *n*-Hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

***p<0.001, compared with control group.

A.



B.

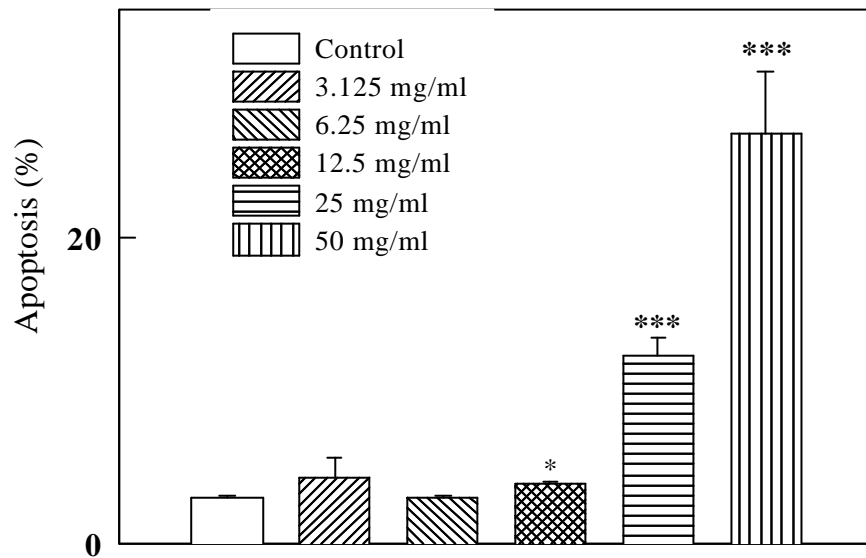
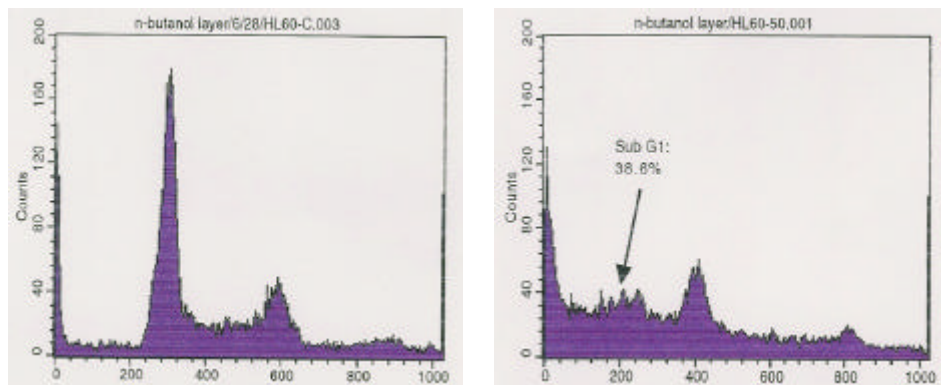


Fig. 43. Chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, compared with control group.

A.



B.

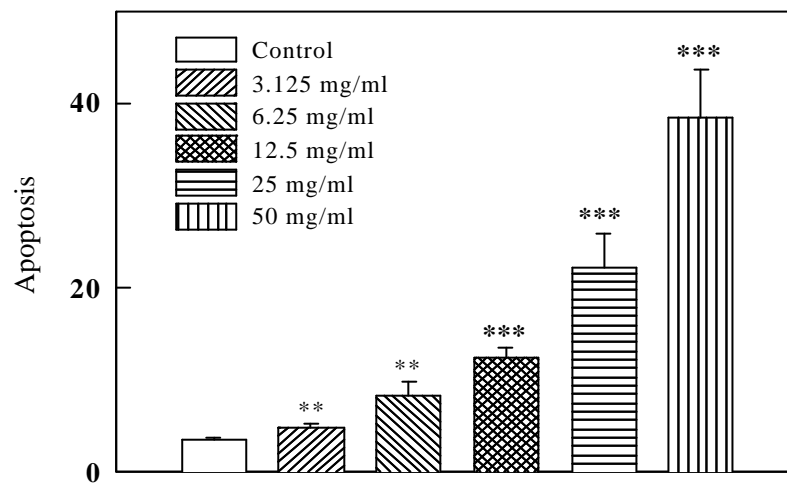
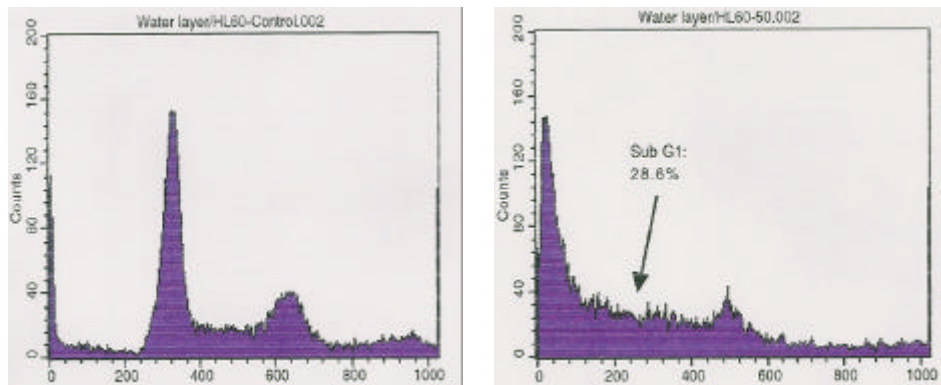


Fig. 44. *n*-Butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

p<0.01, *p<0.001, compared with control group.

A.



B.

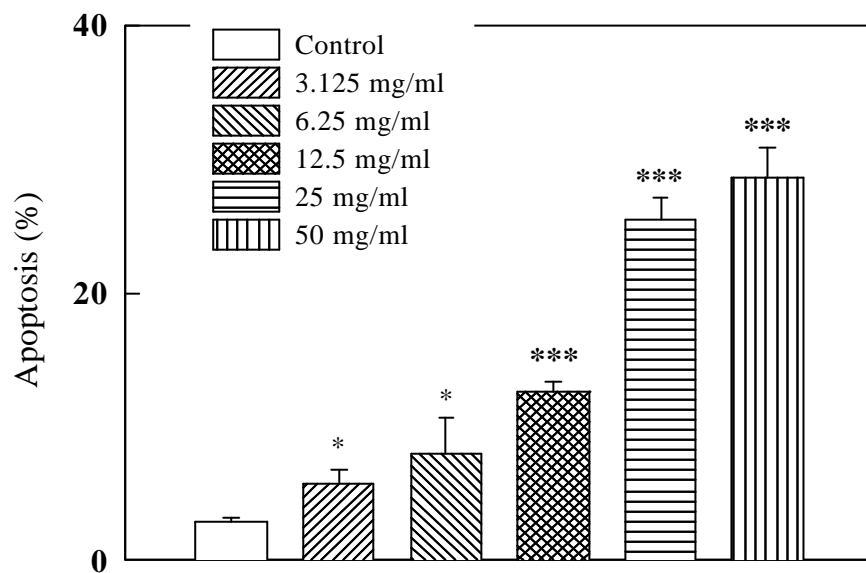
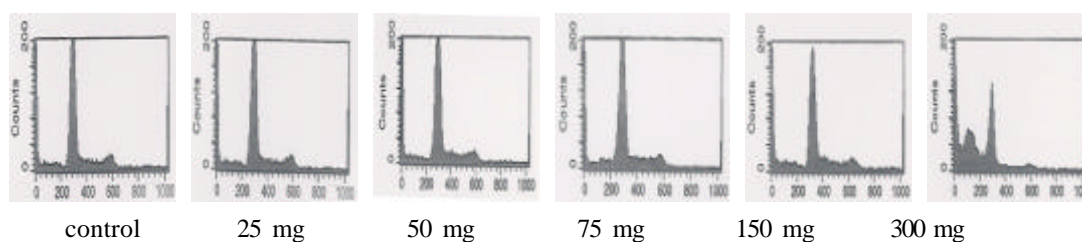


Fig. 45. Water layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* induced apoptosis of HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of water layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods.

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, compared with control group.

A.



B.

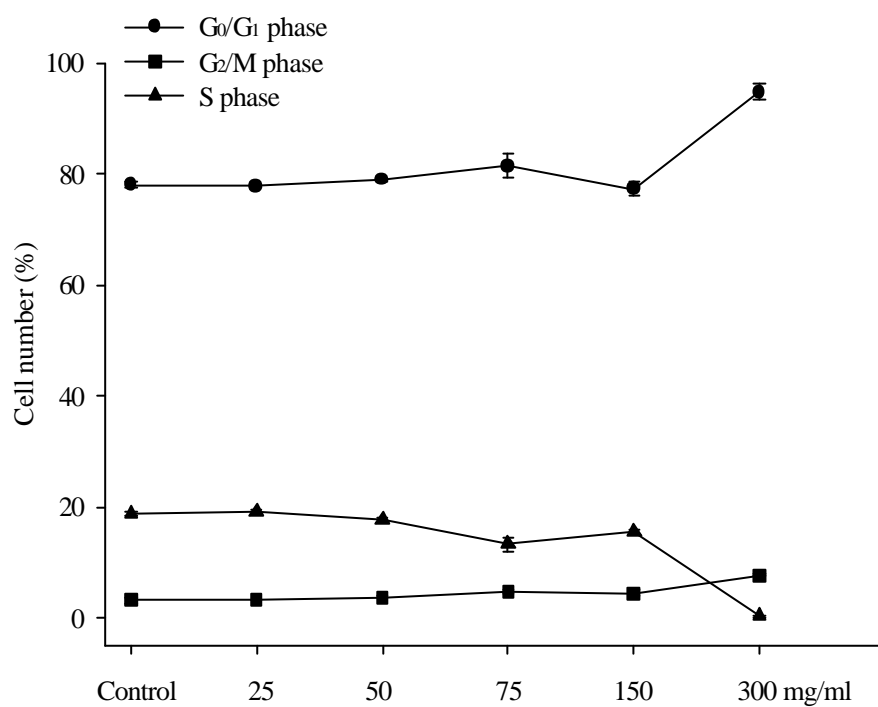
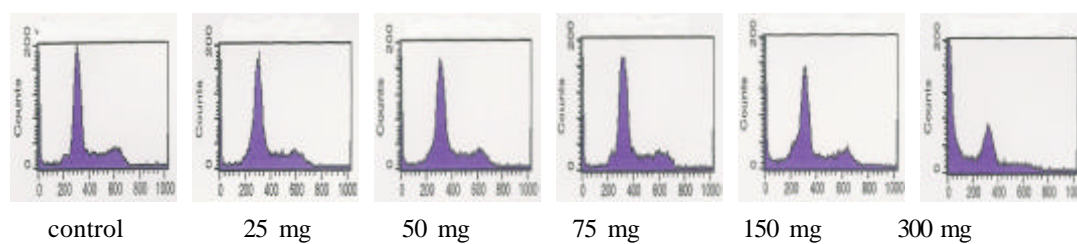


Fig. 46. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 6 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

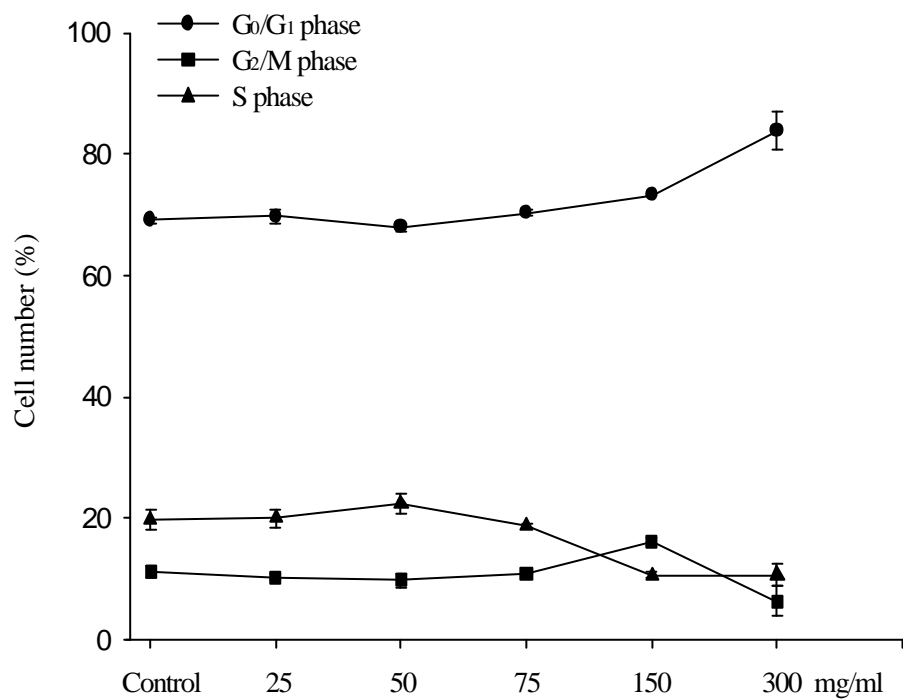
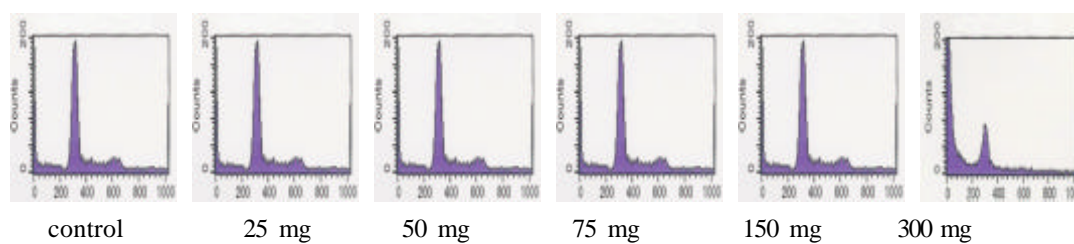


Fig. 47. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 12 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

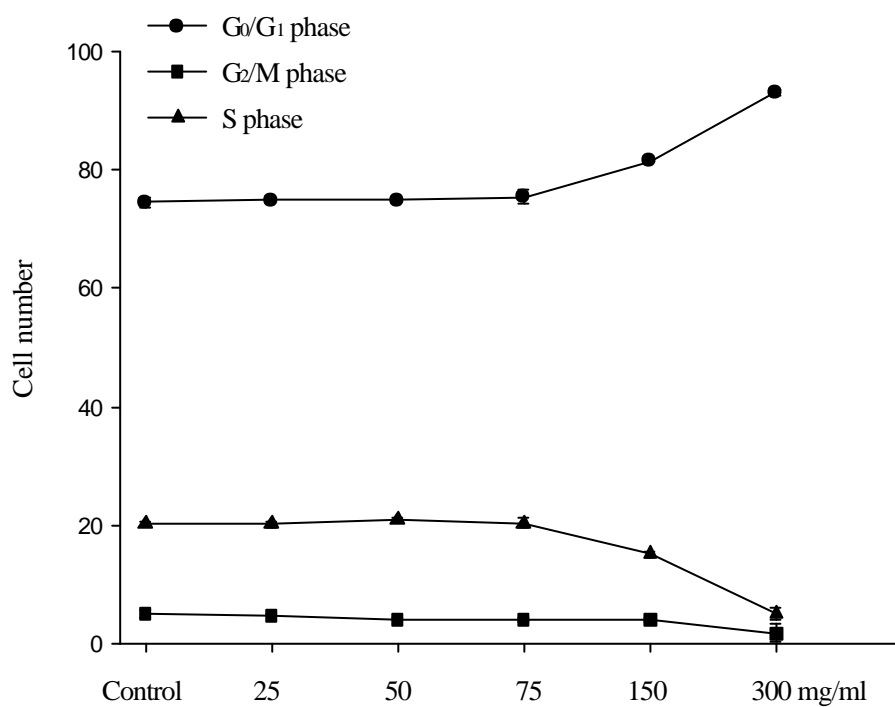
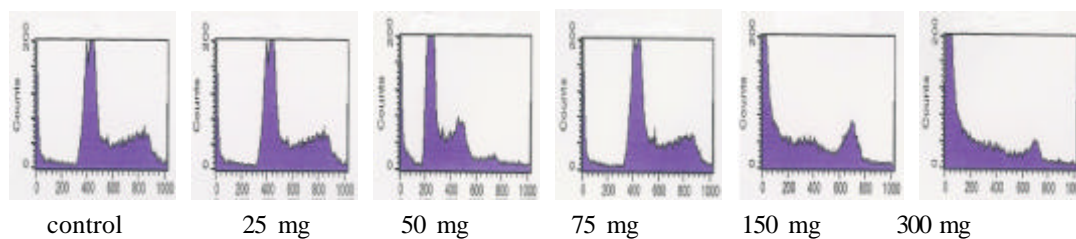


Fig. 48. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

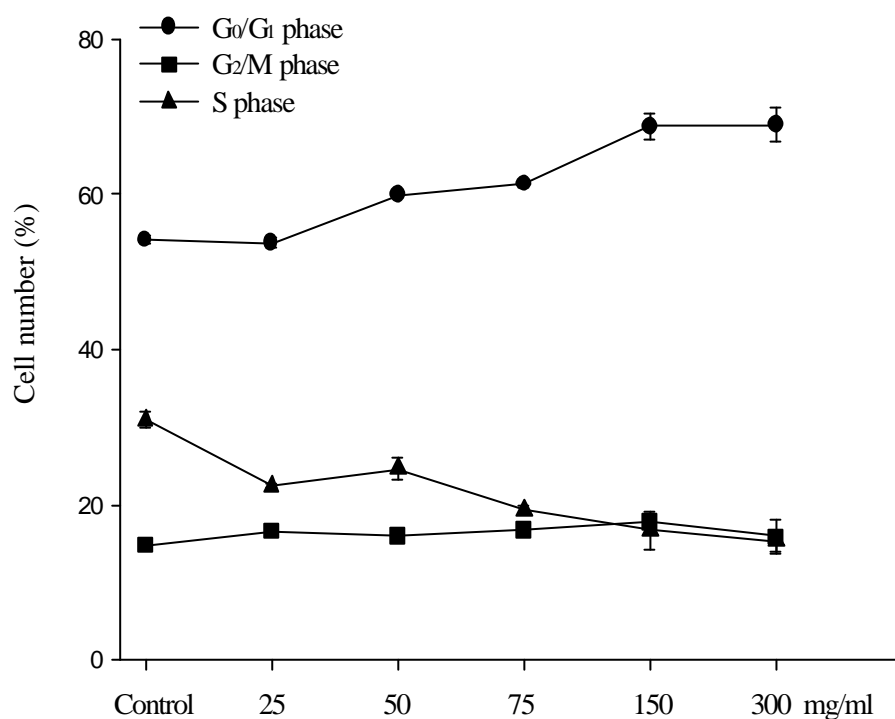
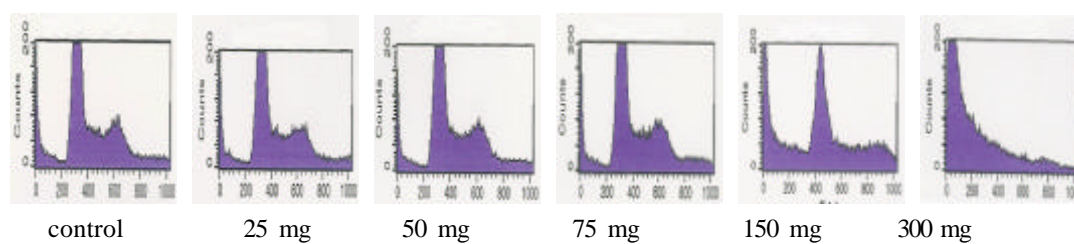


Fig. 49. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 36 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

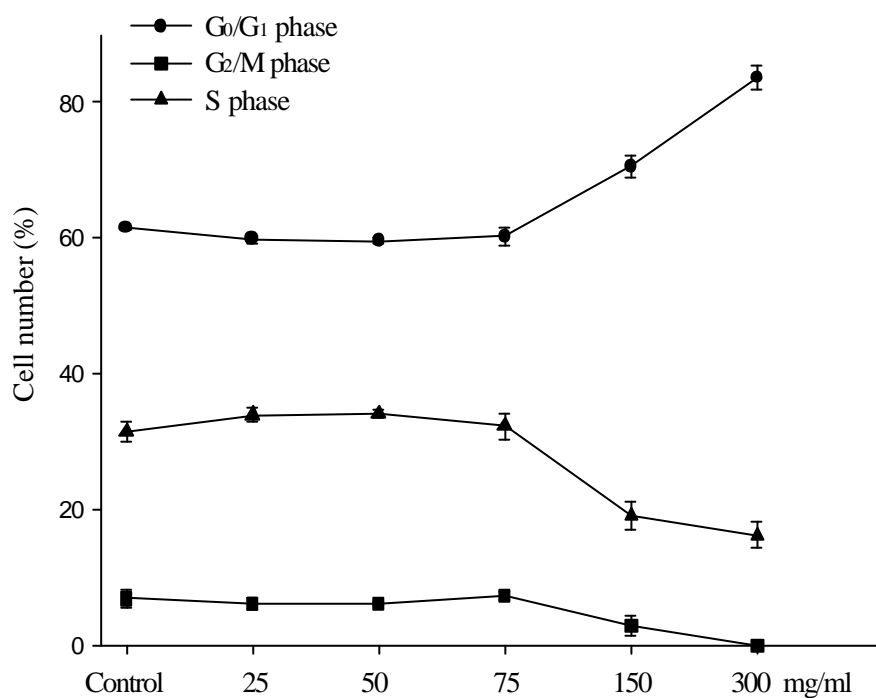
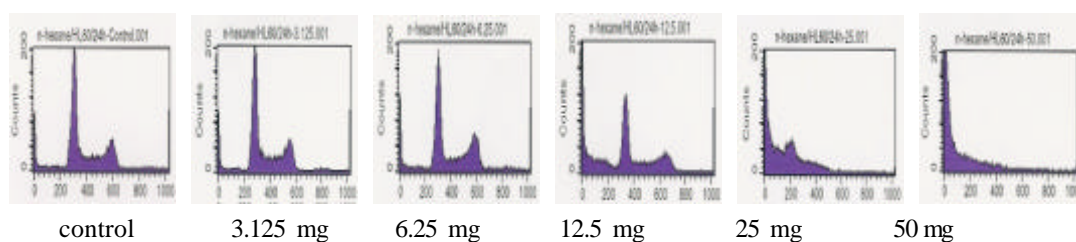


Fig. 50. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 48 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

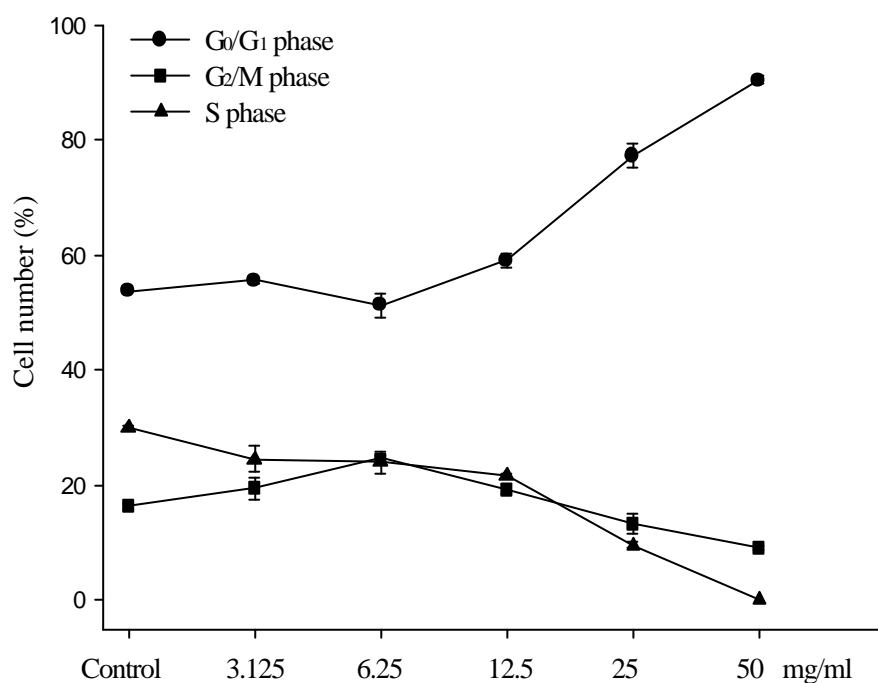
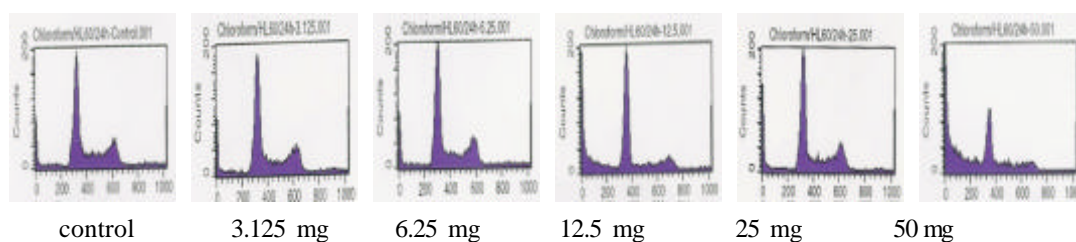


Fig. 51. The effects of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

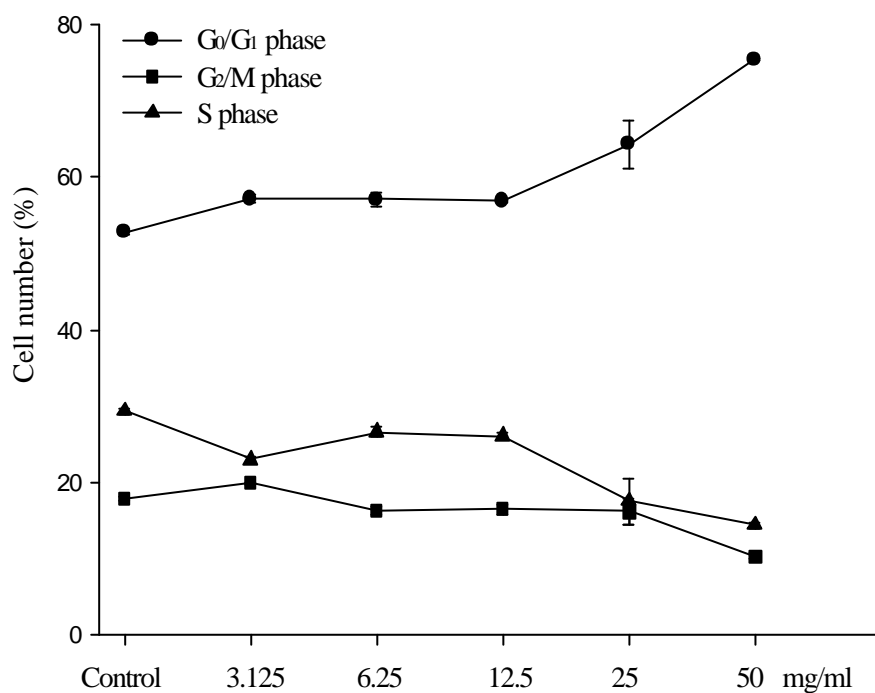
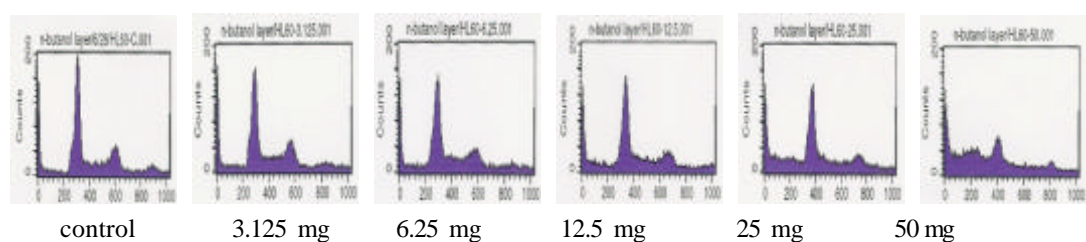


Fig. 52. The effects of chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

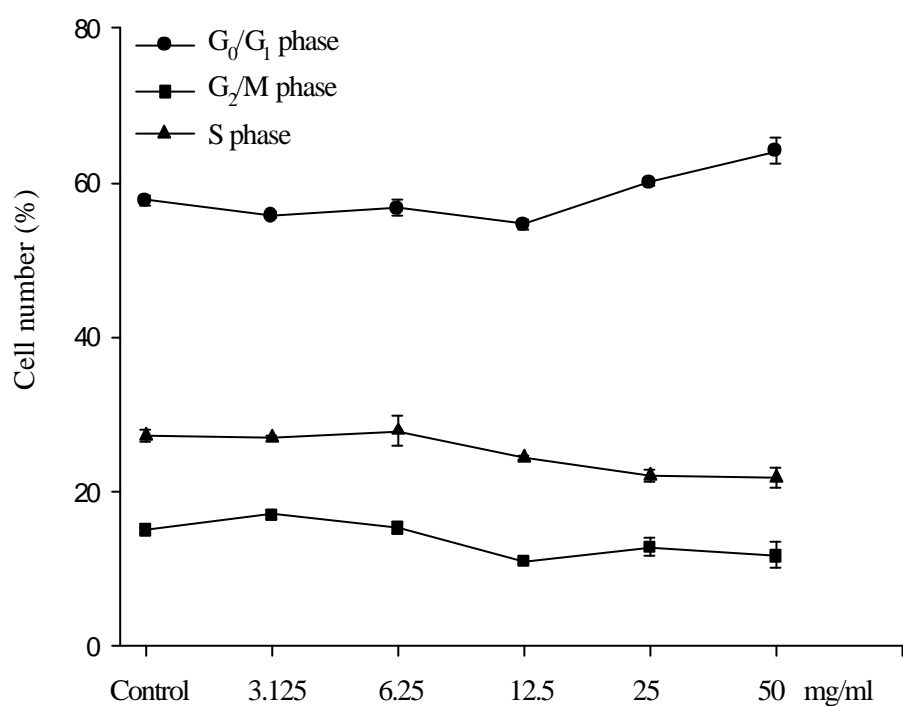
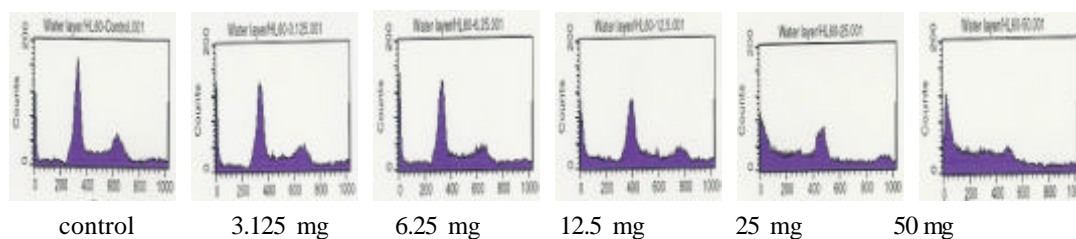


Fig. 53. The effects of *n*-butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

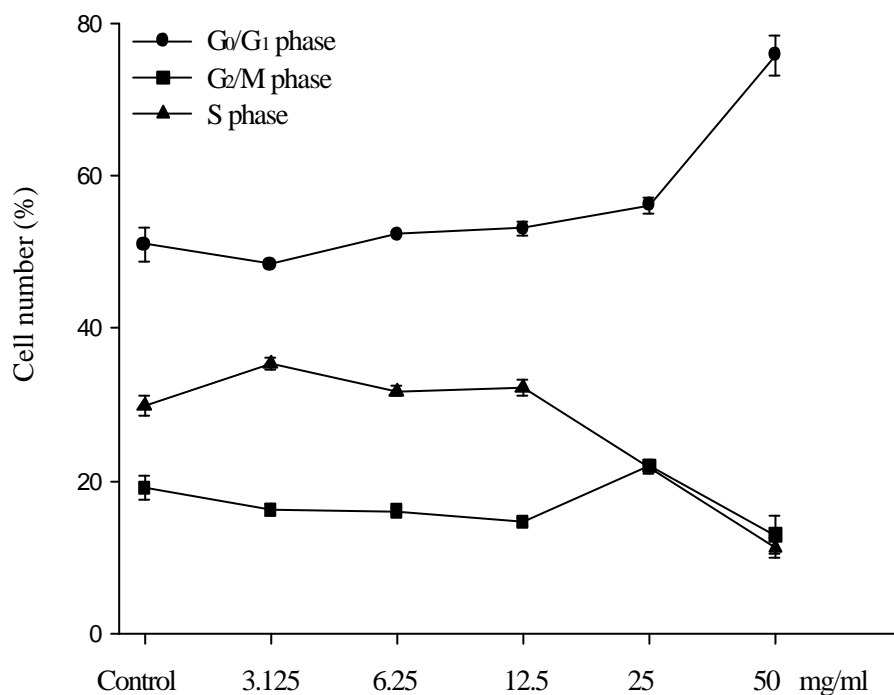
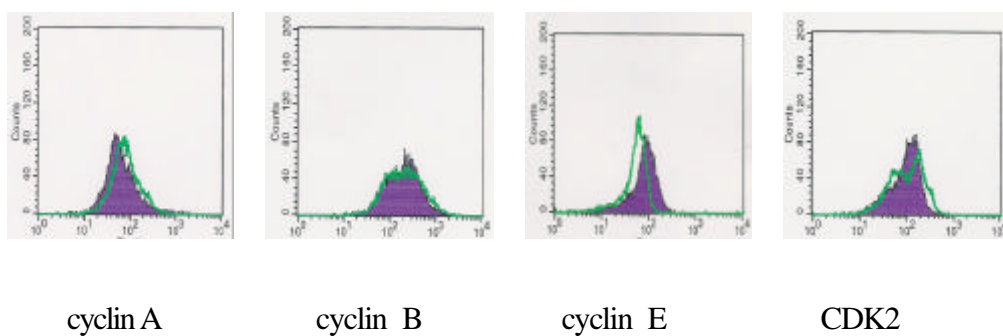


Fig. 54. The effects of water layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the cell cycle in HL-60 cells. The HL-60 cells were incubated with various concentrations of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* for 24 hrs, and they were harvested and were analysed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B) as described in Materials and Methods. (n = 3)

A.



B.

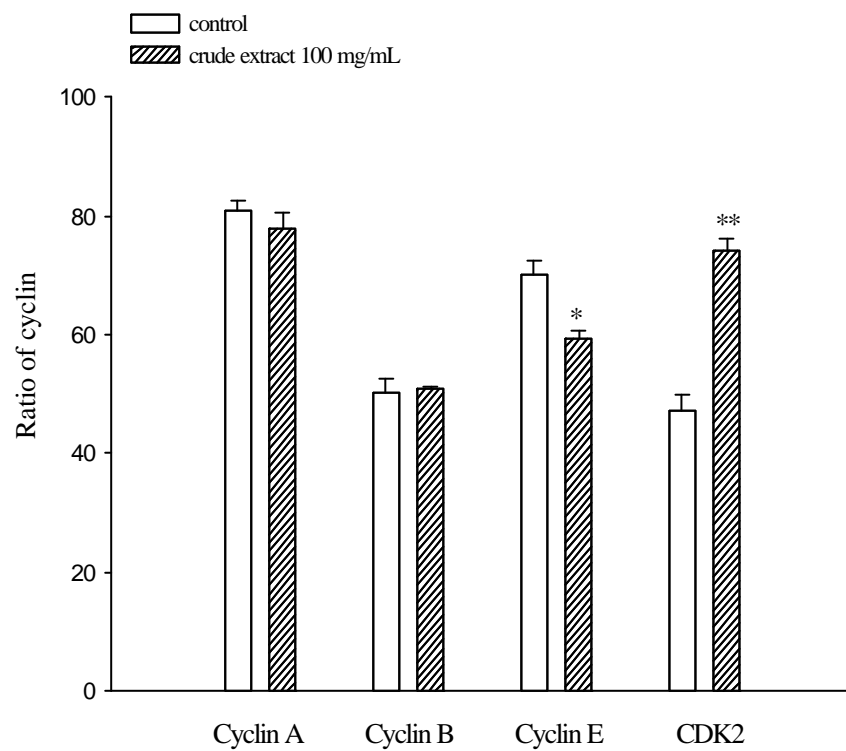
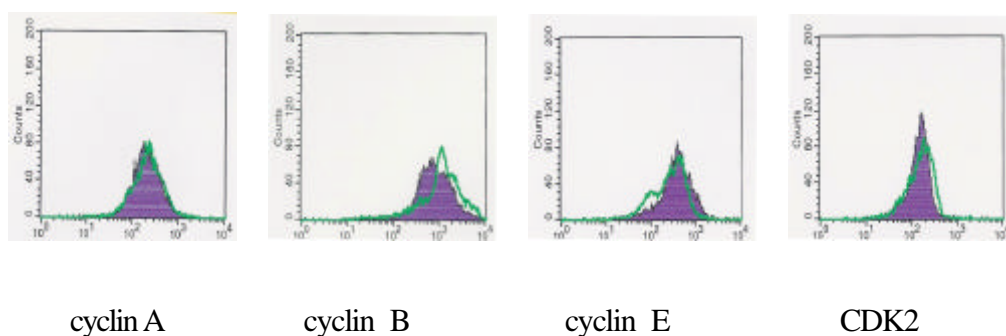


Fig. 55. The effects of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells. The cell cyclins were analyzed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B).

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

*p<0.05, **p<0.01. compared with control group.

A.



B.

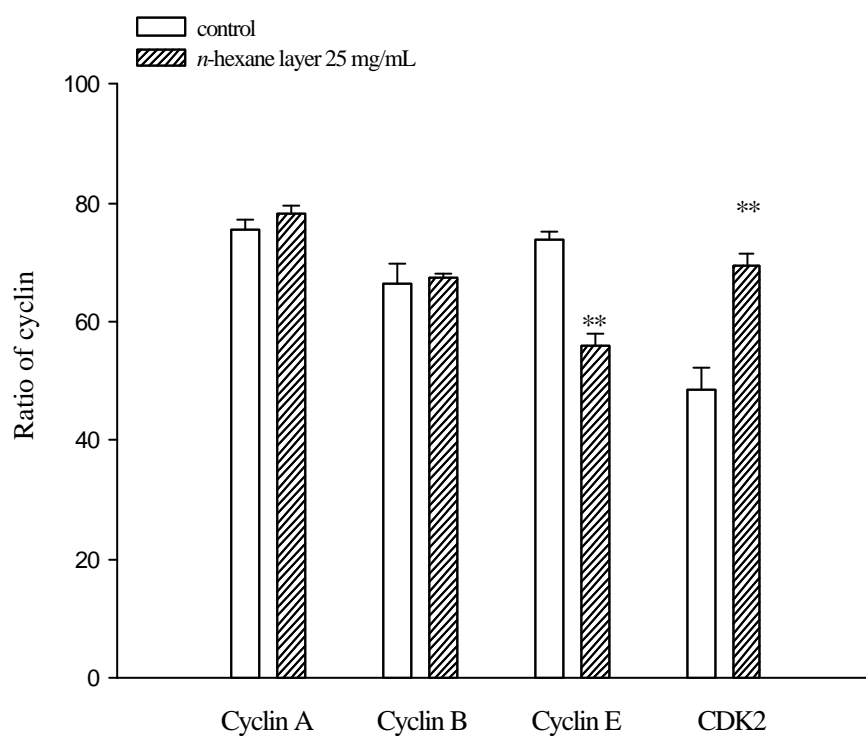
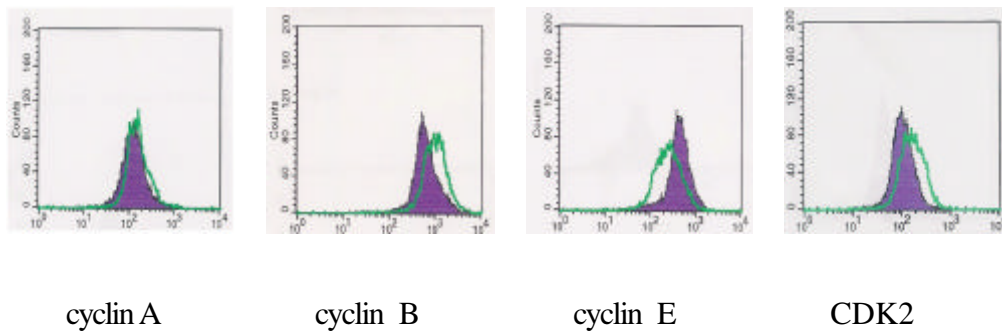


Fig. 56. The effects of *n*-hexane layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells. The cell cyclins were analyzed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B).

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

**p<0.01. compared with control group.

A.



B.

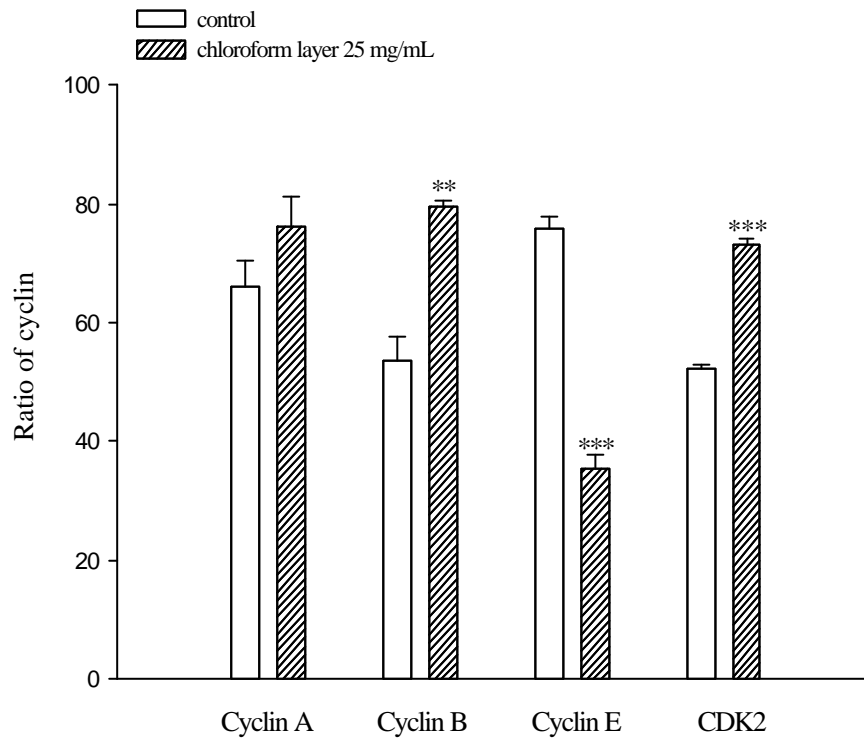
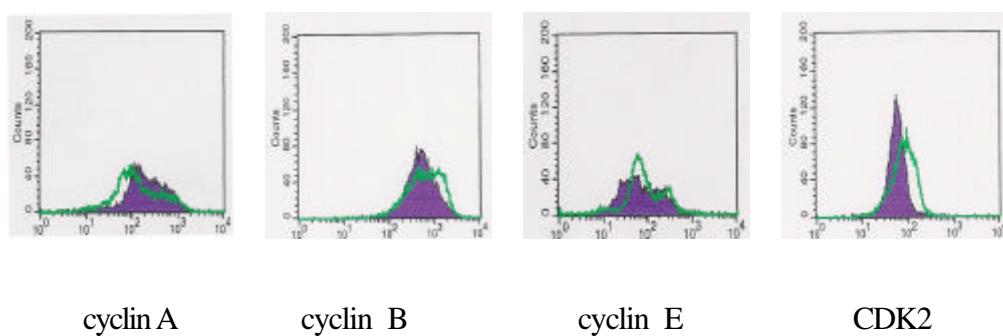


Fig.57. The effects of chloroform layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells. The cell cyclins were analyzed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B).

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

p<0.01, *p < 0.001. compared with control group.

A.



B.

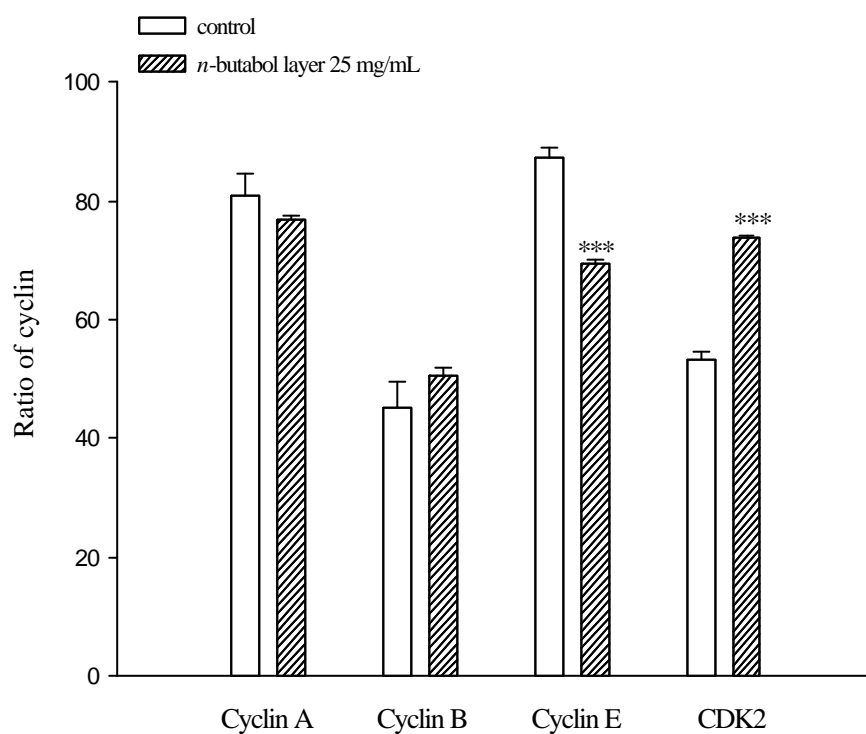
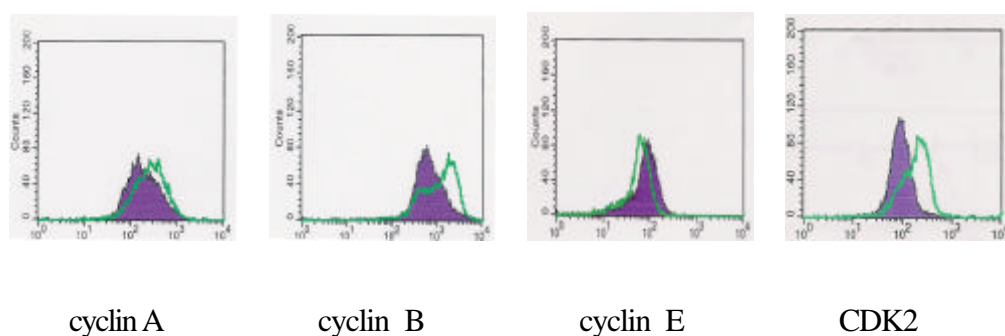


Fig. 58. The effects of *n*-butanol layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells. The cell cyclins were analyzed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B).

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

p<0.01, *p < 0.001. compared with control group.

A.



B.

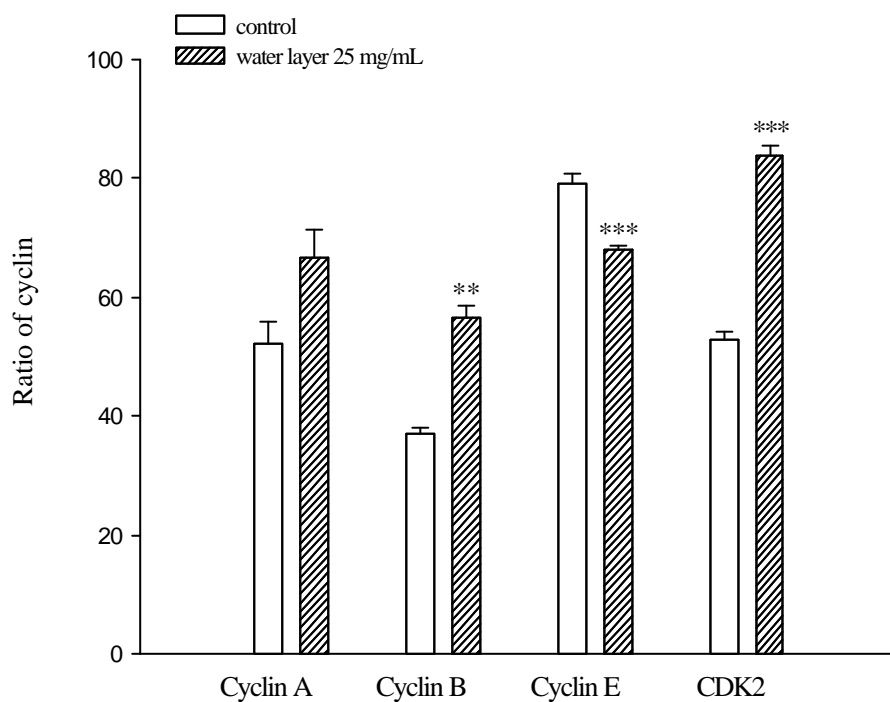


Fig. 59. The effects of water layer extract of *Ampelopsis cantoniensis* on the intracellular cyclins distribution in HL-60 cells. The cell cyclins were analyzed by flow cytometry (Panel A) and the data was plotted (Panel B).

Data are shown as mean \pm S.E. (n = 3)

p<0.01, *p < 0.001. compared with control group.

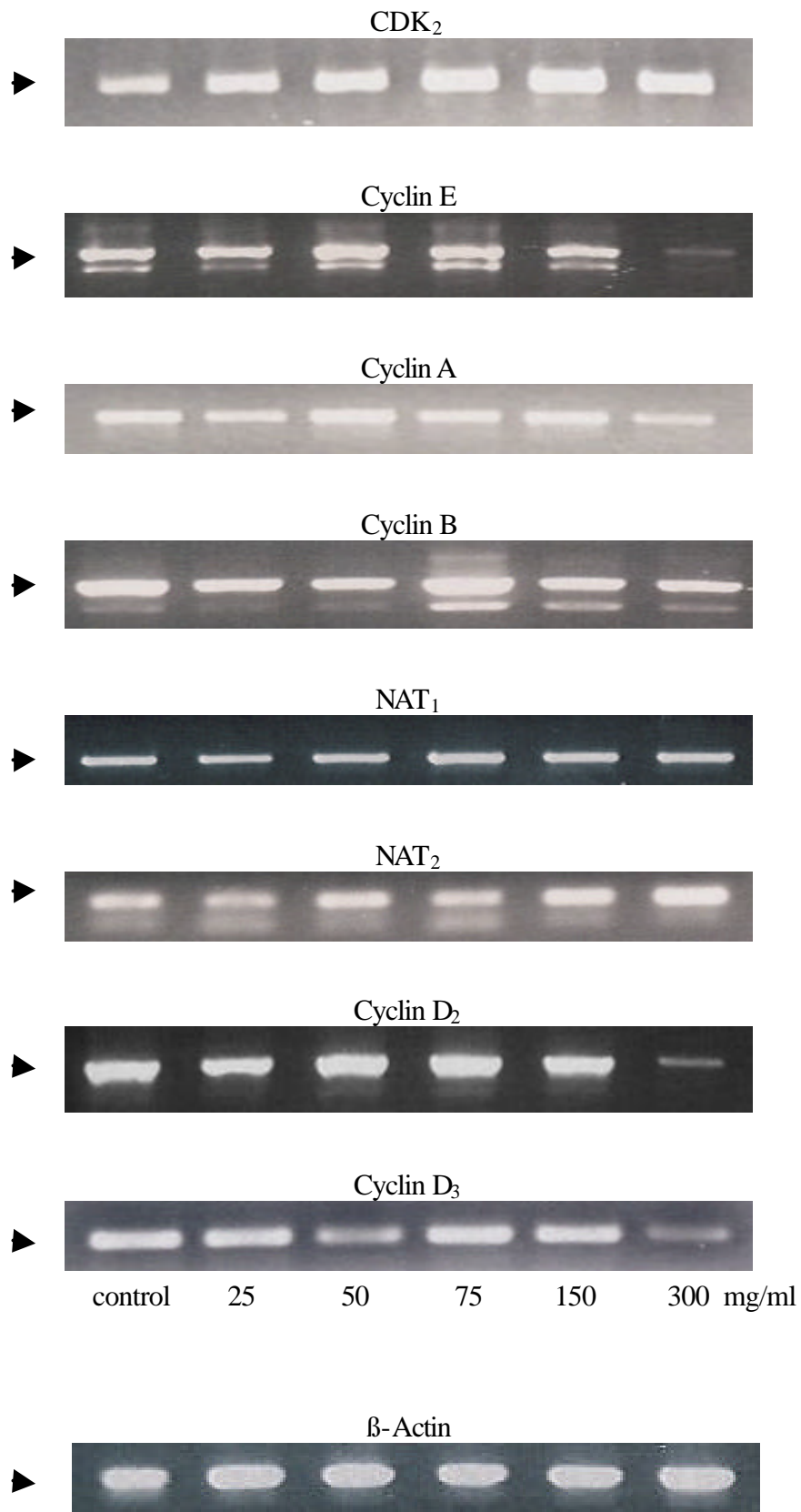
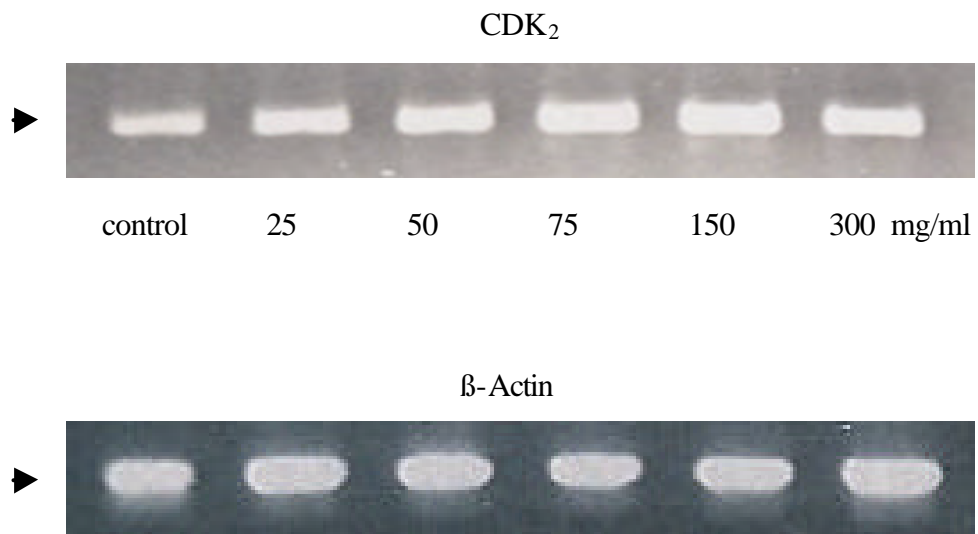


Fig. 60. RT-PCR analysis for intracellular cyclins distribution of HL-60 cells repressing in the presence of different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A.



B.

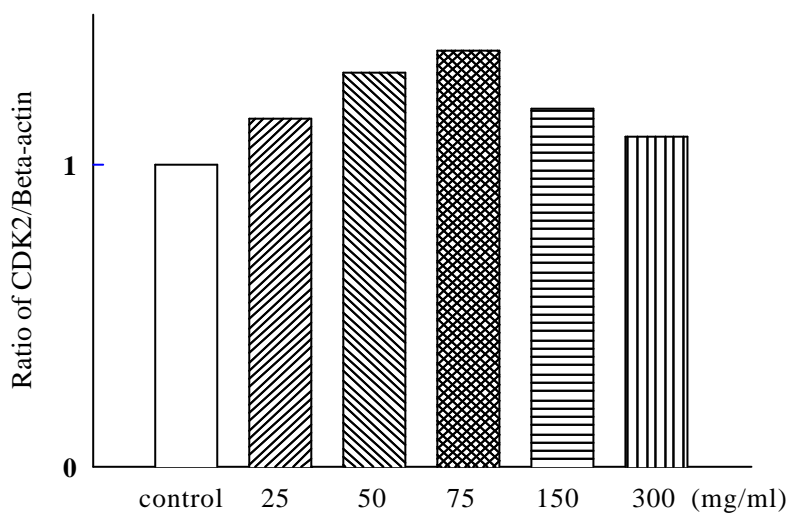
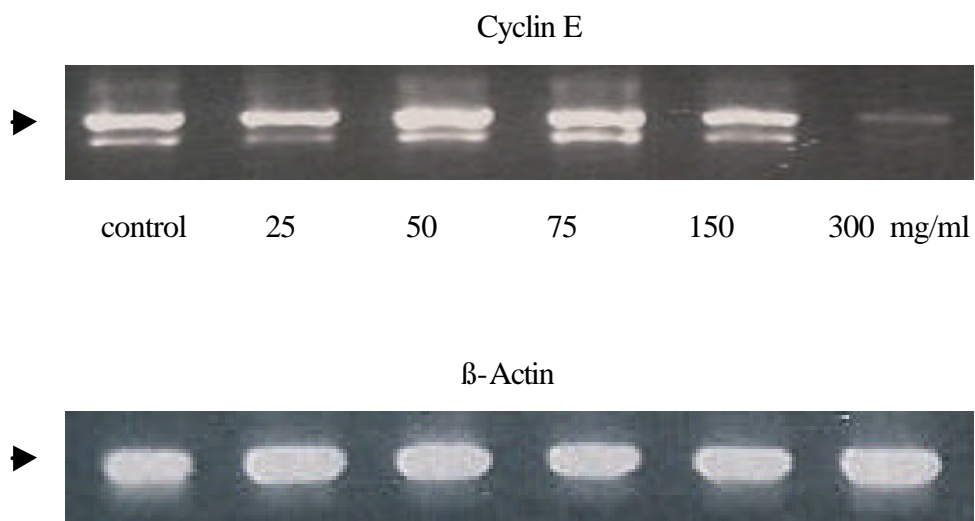


Fig. 61. RT-PCR analysis of CDK₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of CDK₂ mRNA levels.

A.



B.

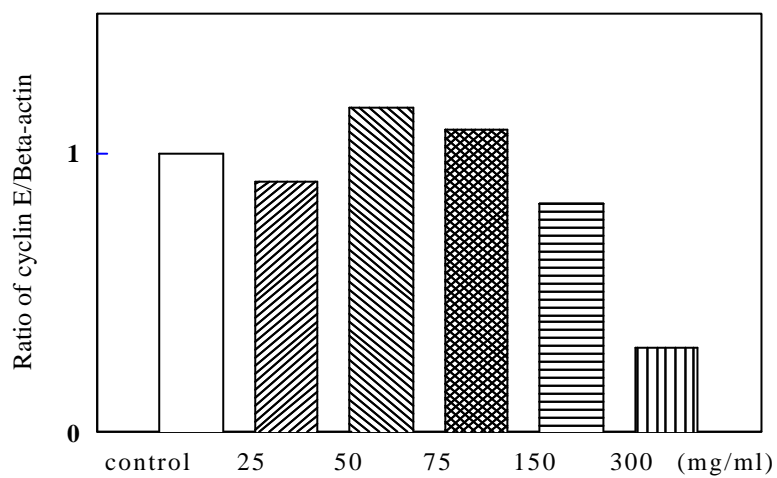
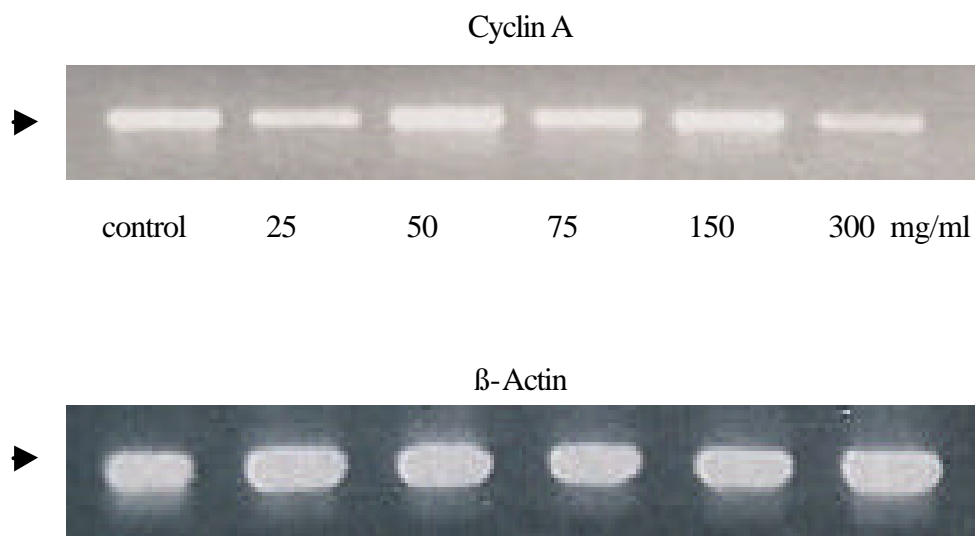


Fig. 62. RT-PCR analysis of cyclin E and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin E mRNA levels.

A.



B.

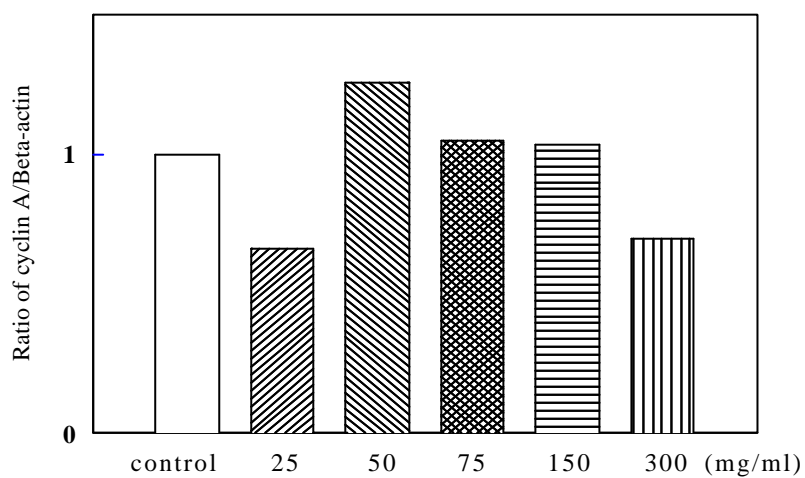
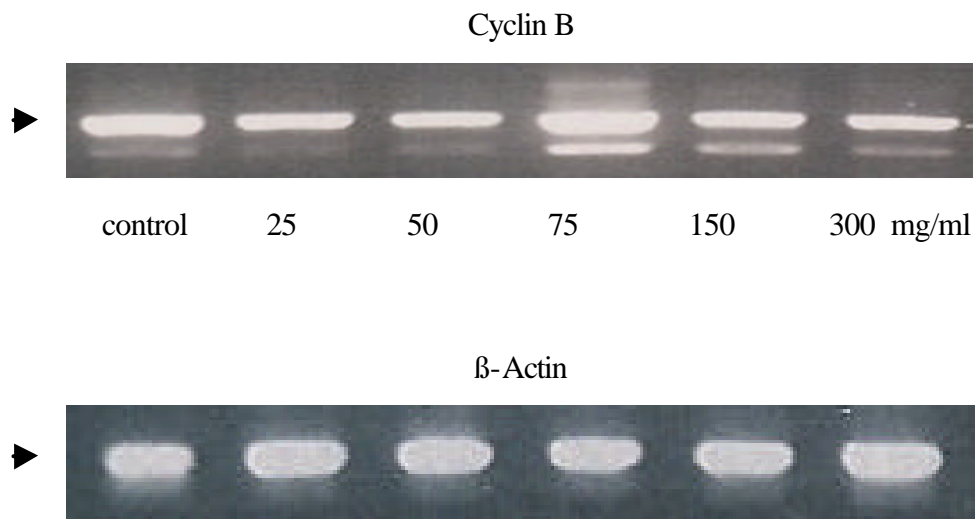


Fig. 63. RT-PCR analysis of cyclin A and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin A mRNA levels.

A.



B.

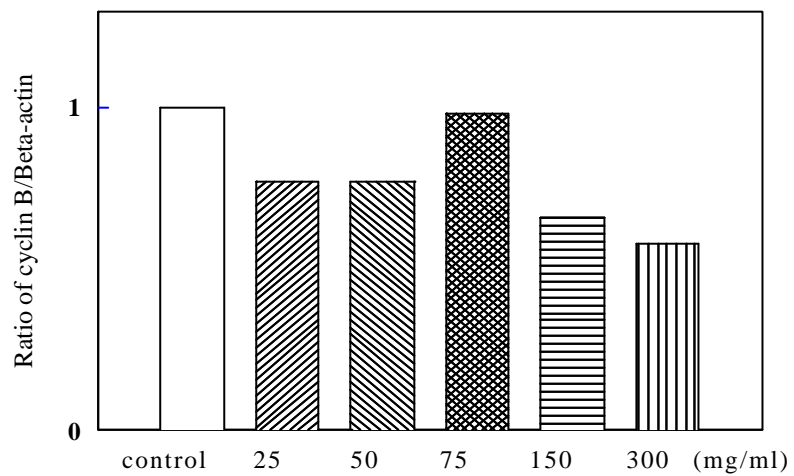
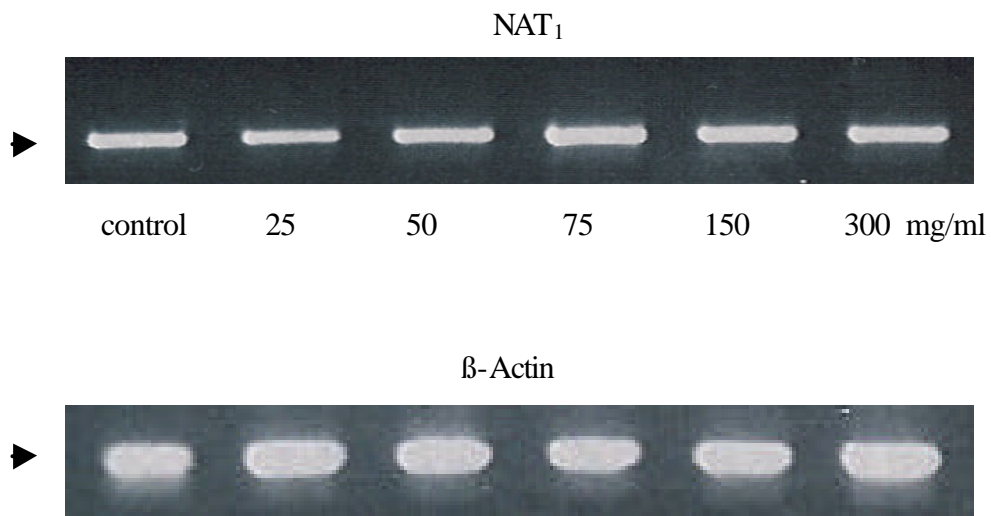


Fig. 64. RT-PCR analysis of cyclin B and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin B mRNA levels.

A.



B.

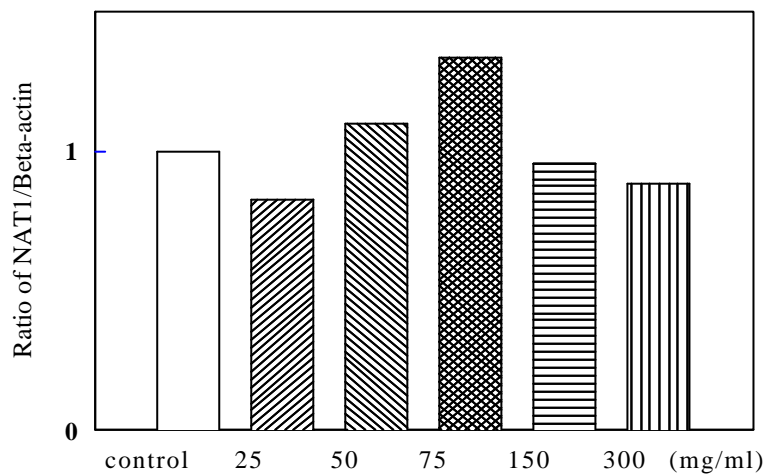
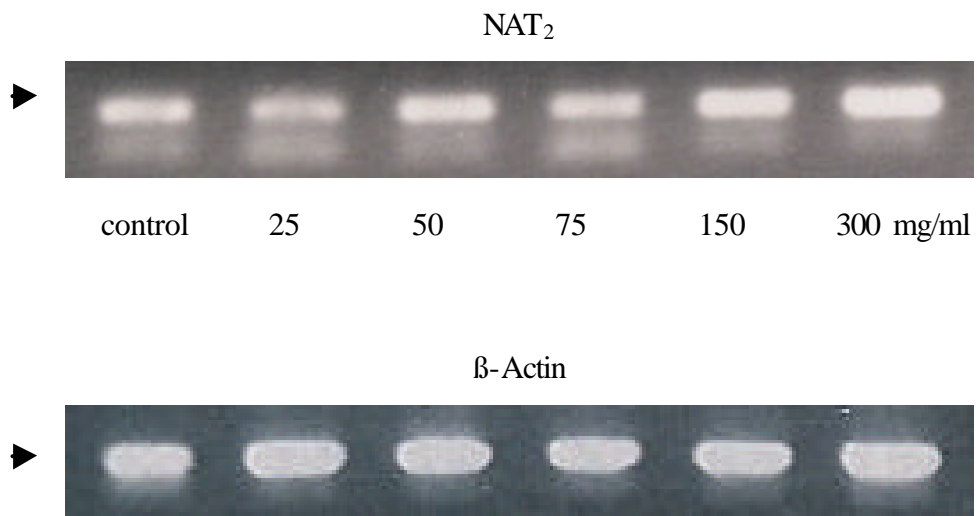


Fig. 65. RT-PCR analysis of NAT₁ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of NAT₁ mRNA levels.

A.



B.

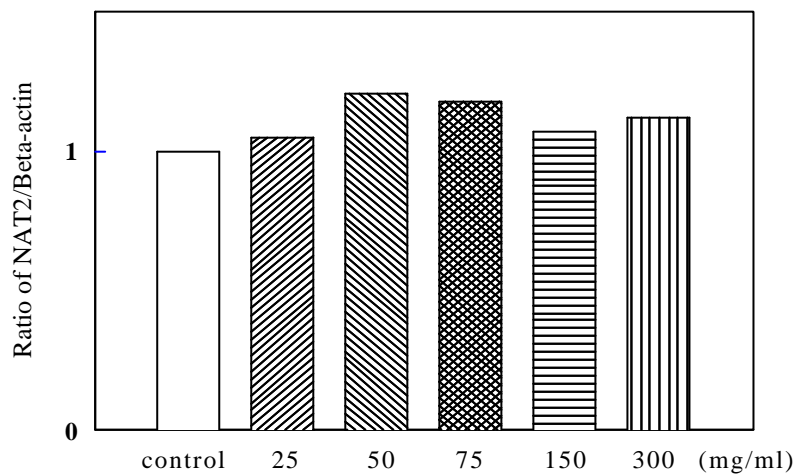
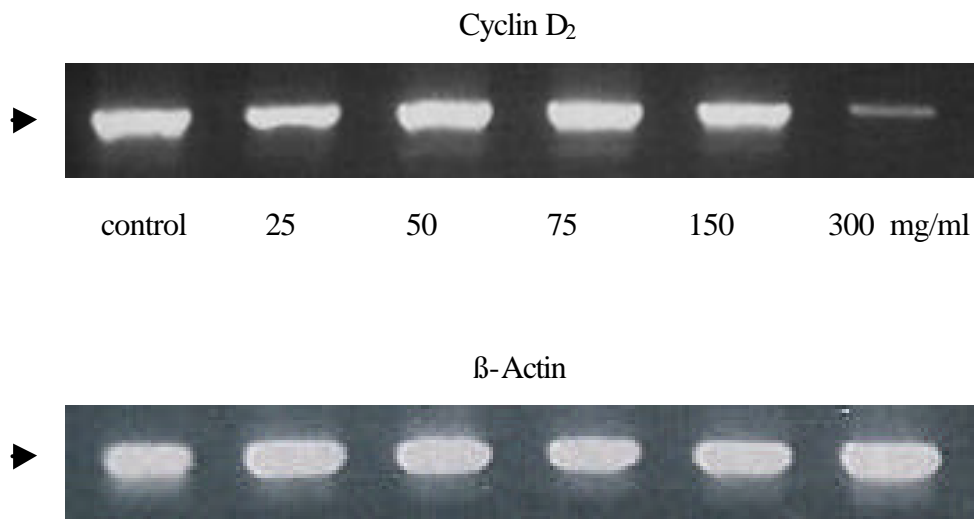


Fig. 66. RT-PCR analysis of NAT₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of NAT₂ mRNA levels.

A.



B.

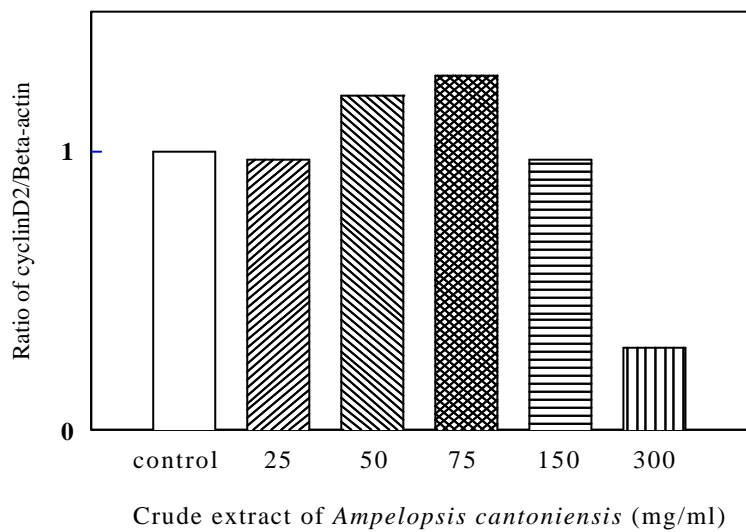
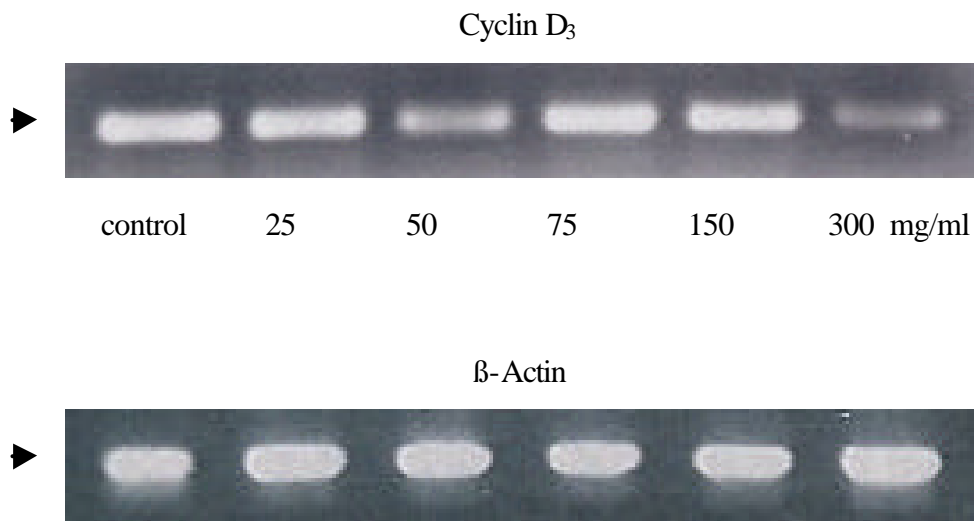


Fig. 67. RT-PCR analysis of cyclin D₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin D₂ mRNA levels.

A.



B.

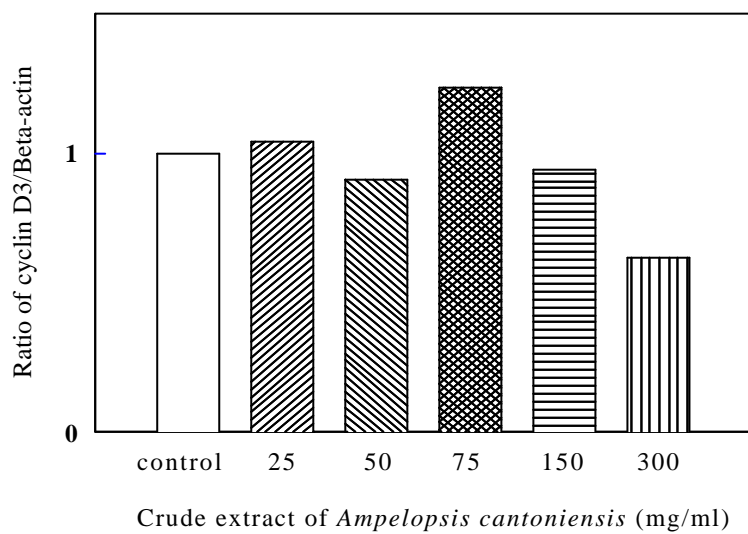


Fig. 68. RT-PCR analysis of cyclin D₃ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin D₃ mRNA levels.

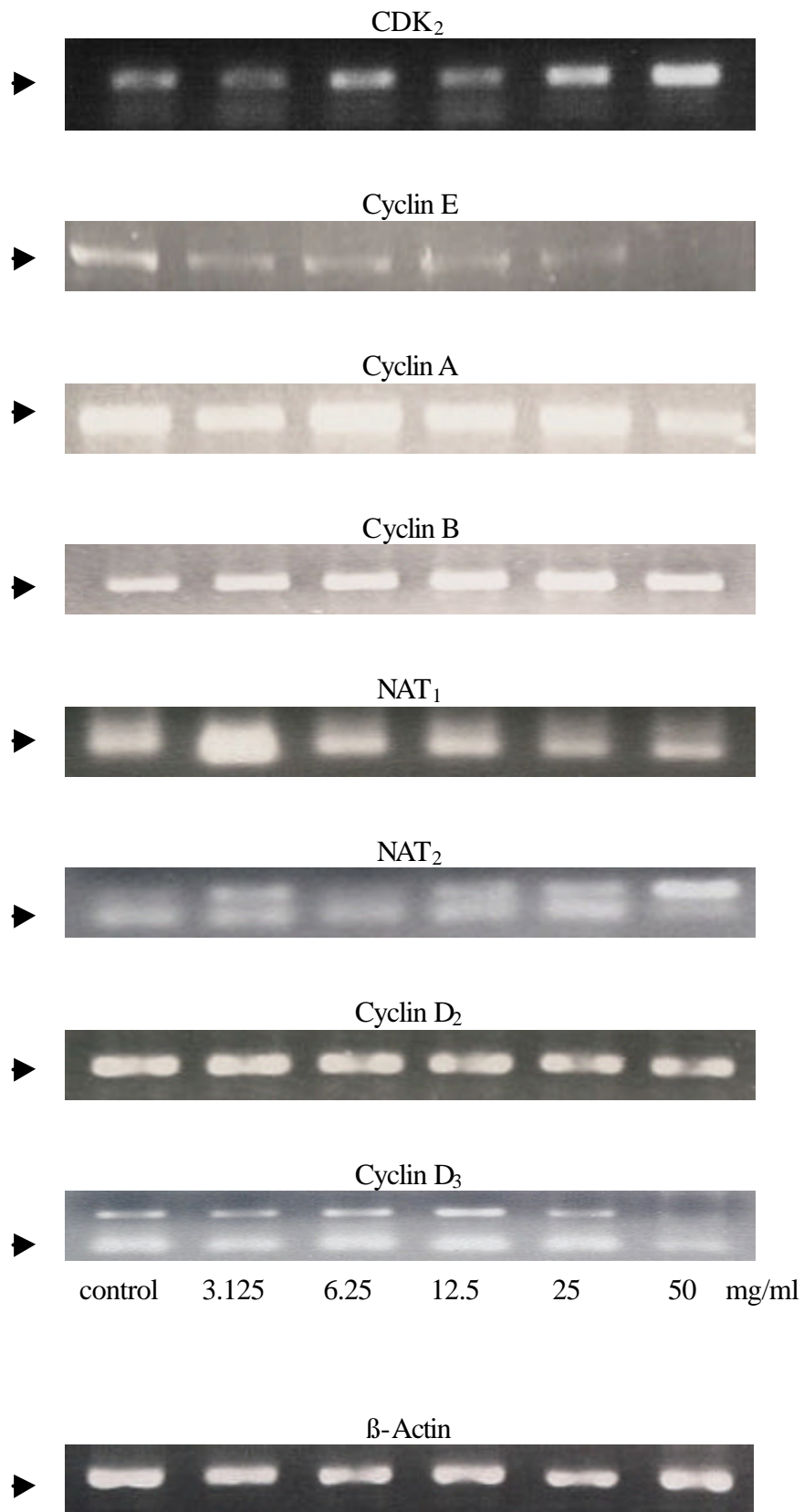
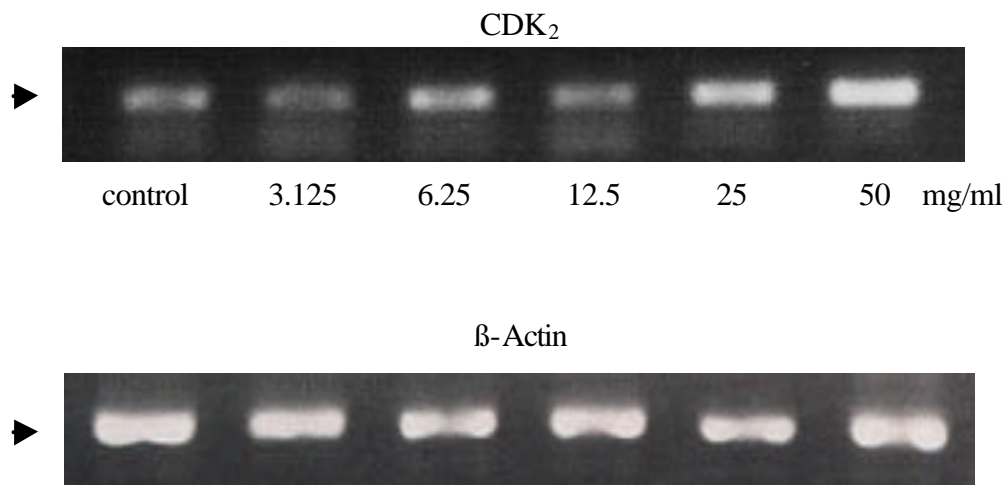


Fig. 69. RT-PCR analysis for intracellular cyclins distribution of HL-60 cells repressing in the presence of different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A.



B.

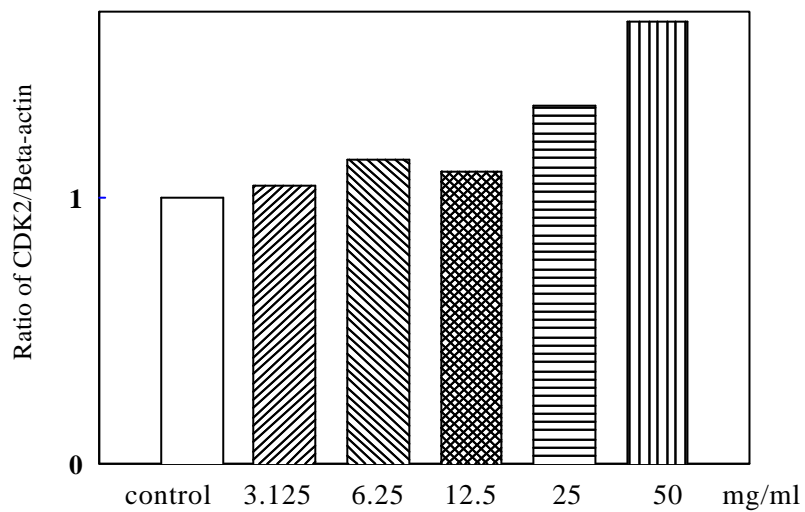
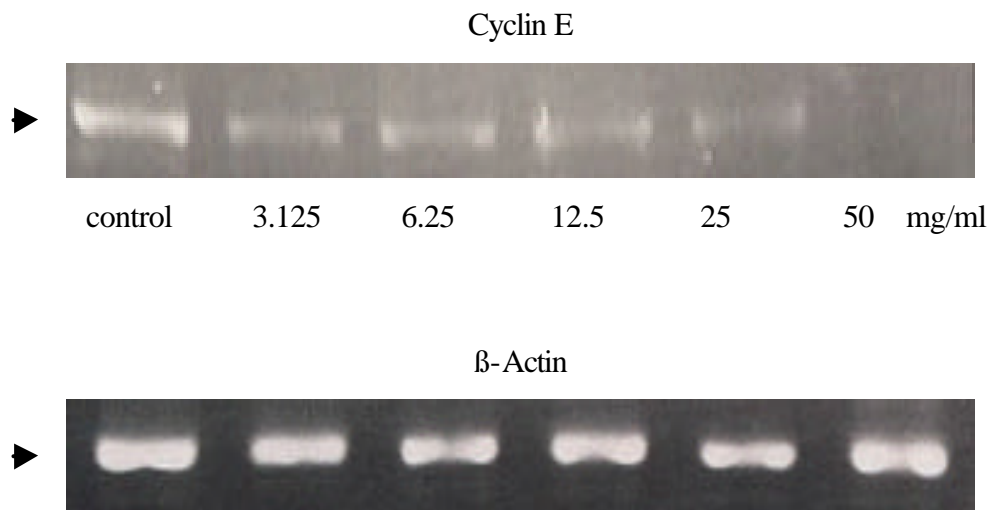


Fig. 70. RT-PCR analysis of CDK₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of CDK₂ mRNA levels.

A.



B.

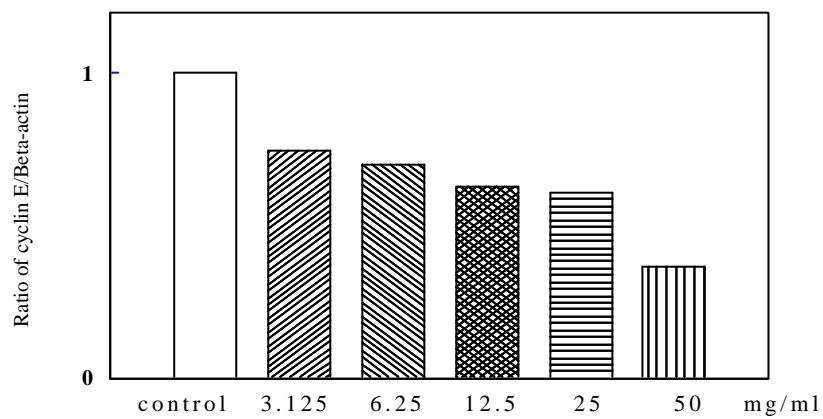
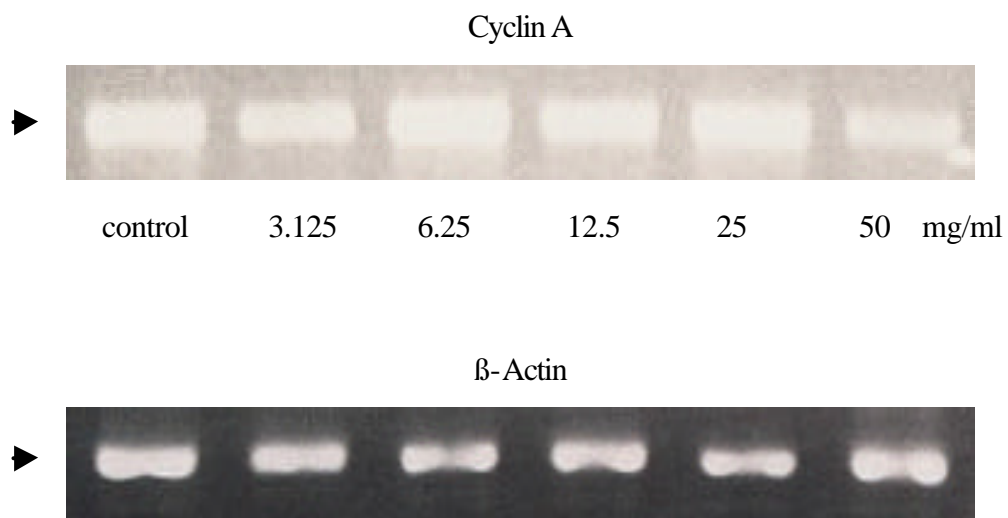


Fig. 71. RT-PCR analysis of cyclin E and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin E mRNA levels.

A.



B.

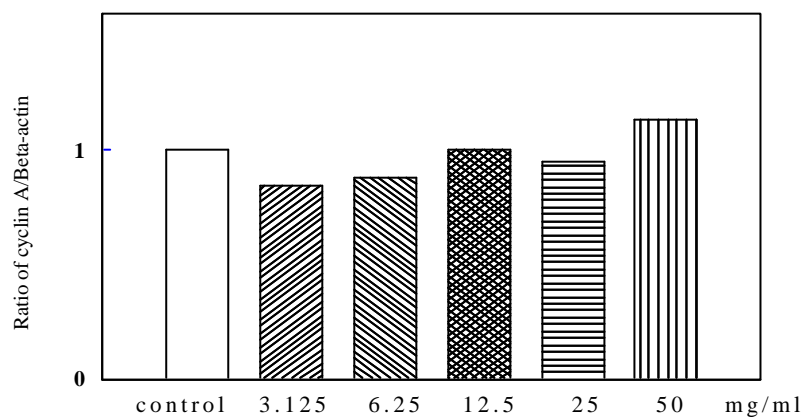
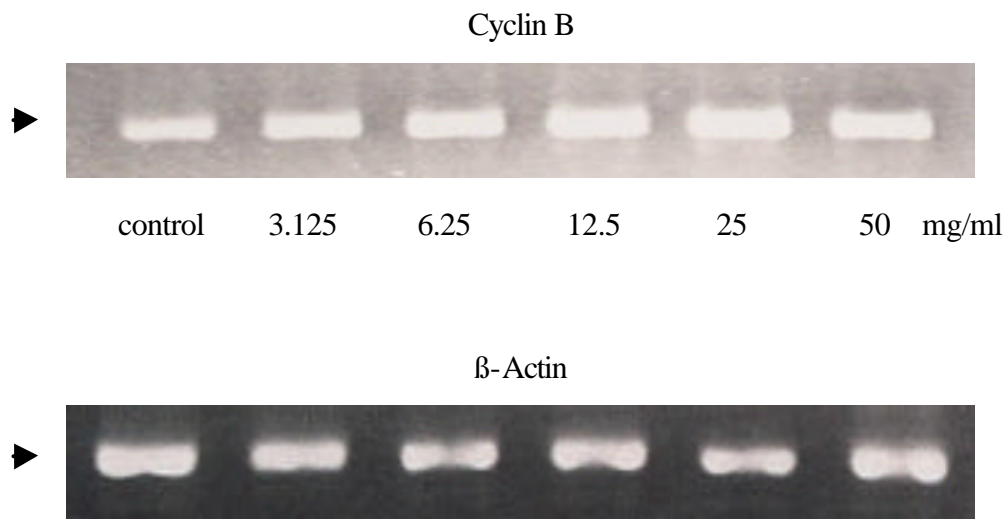


Fig. 72. RT-PCR analysis of cyclin A and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin A mRNA levels.

A.



B.

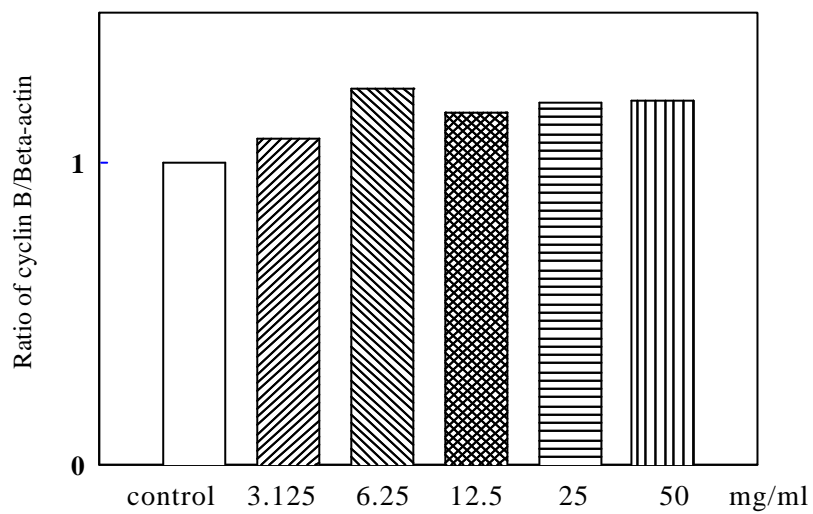
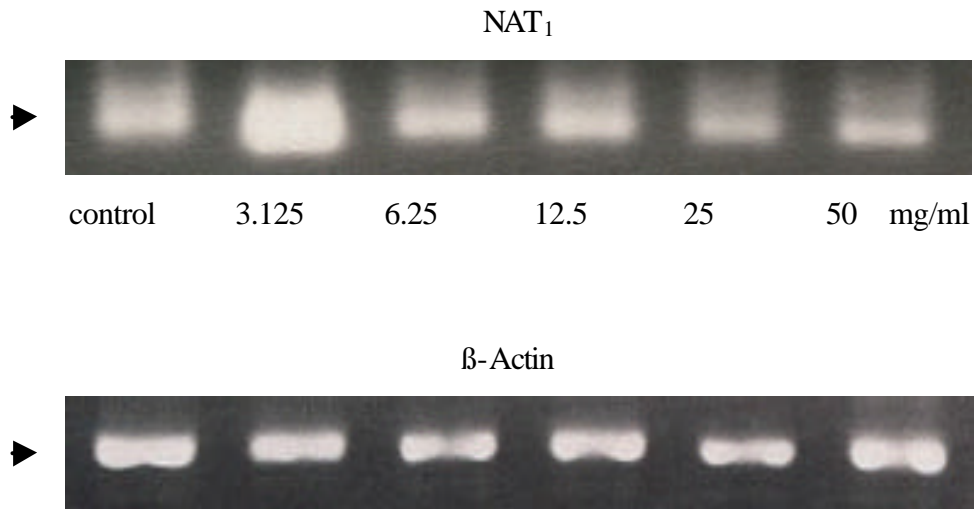


Fig. 73. RT-PCR analysis of cyclin B and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin B mRNA levels.

A.



B.

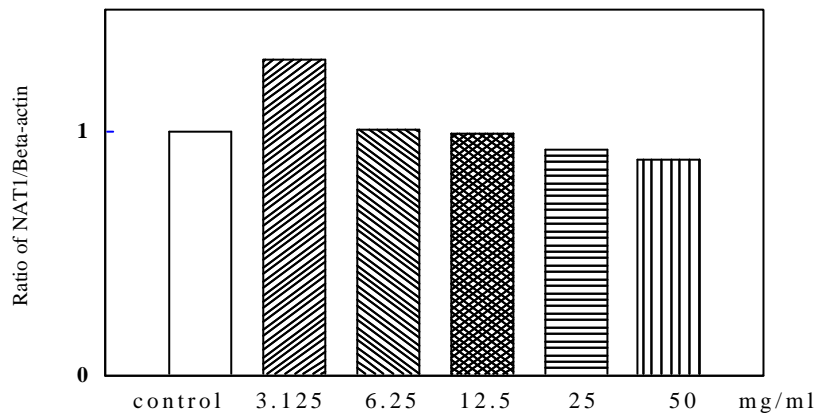
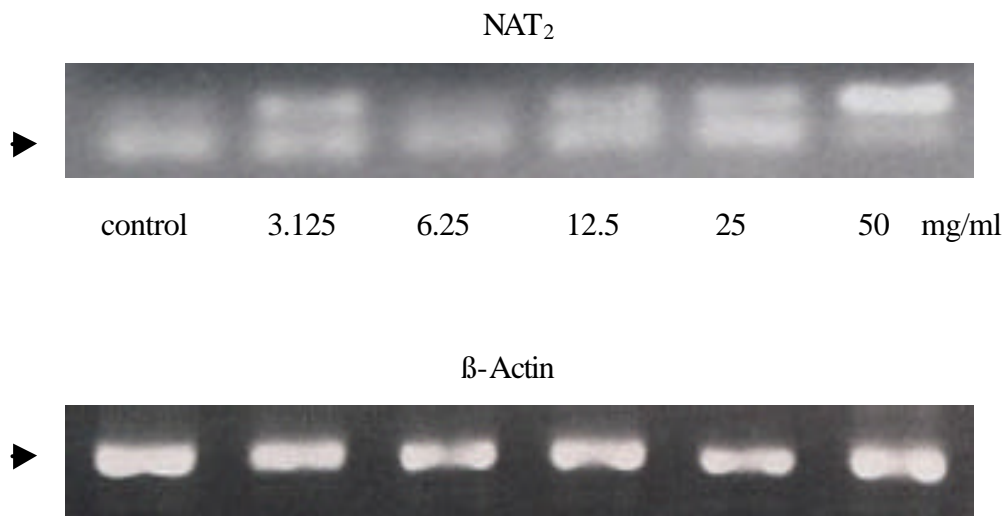


Fig. 74. RT-PCR analysis of NAT₁ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of NAT₁ mRNA levels.

A.



B.

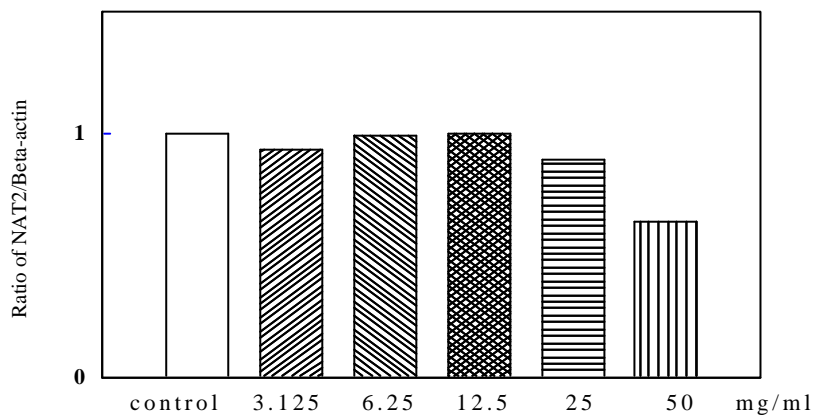
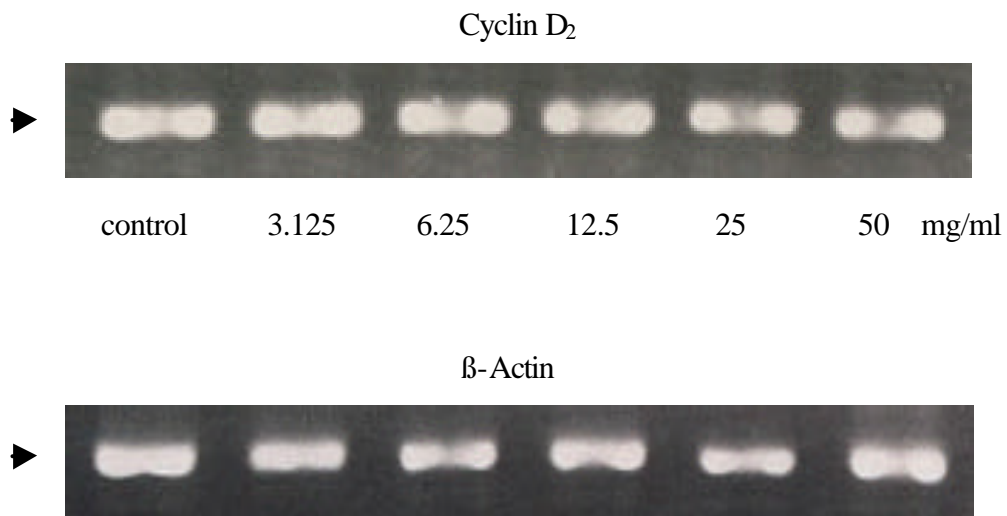


Fig. 75. RT-PCR analysis of NAT₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of NAT₂ mRNA levels.

A.



B.

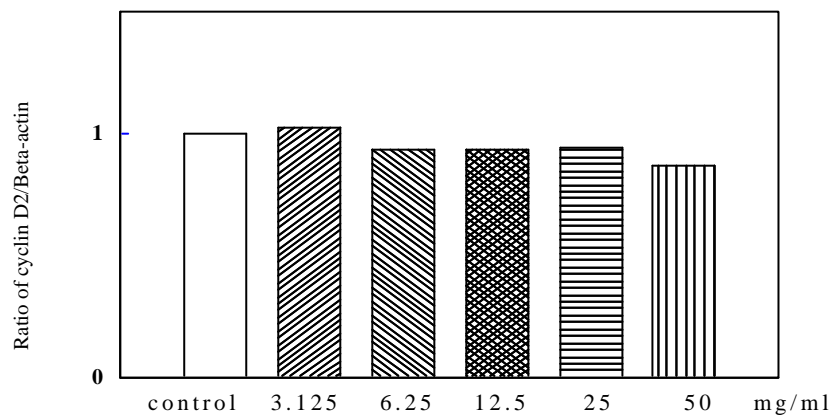
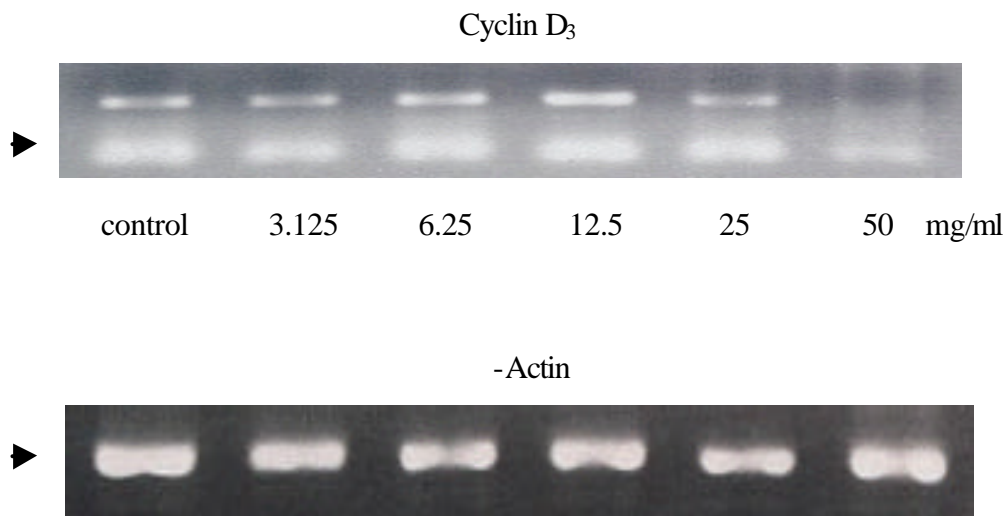


Fig. 76. RT-PCR analysis of cyclin D₂ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis*.

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin D₂ mRNA levels.

A.



B.

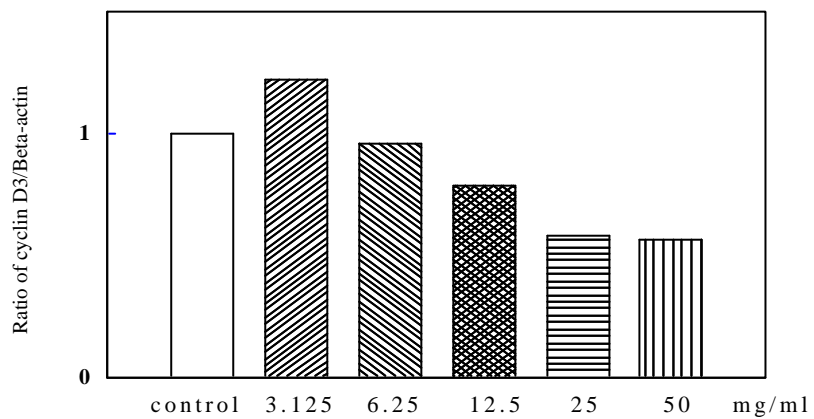


Fig.77. RT-PCR analysis of cyclin D₃ and beta-actin in the HL-60 cells for treatment with different dose of water layer of *Ampelopsis cantoniensis* .

A. Gel electrophoresis.

B. The statistic figure of cyclin D₃ mRNA levels.

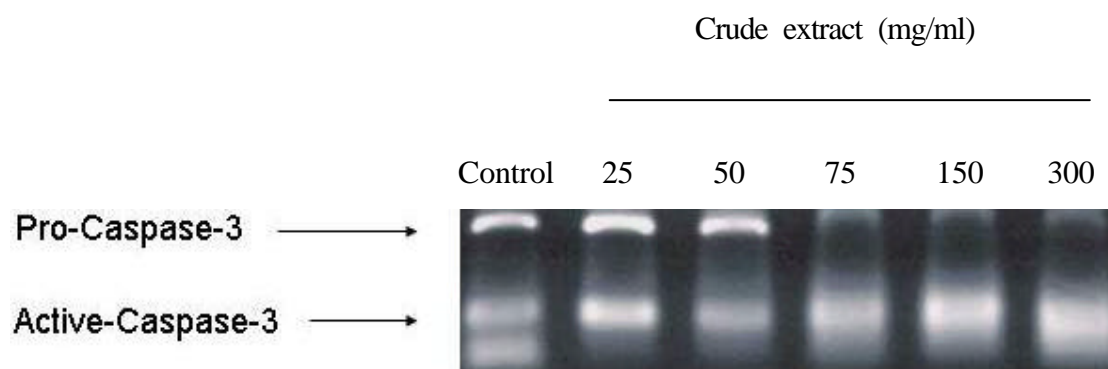


Fig. 78. RT-PCR analysis of caspase-3 in the HL-60 cells for treatment with different dose of crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.

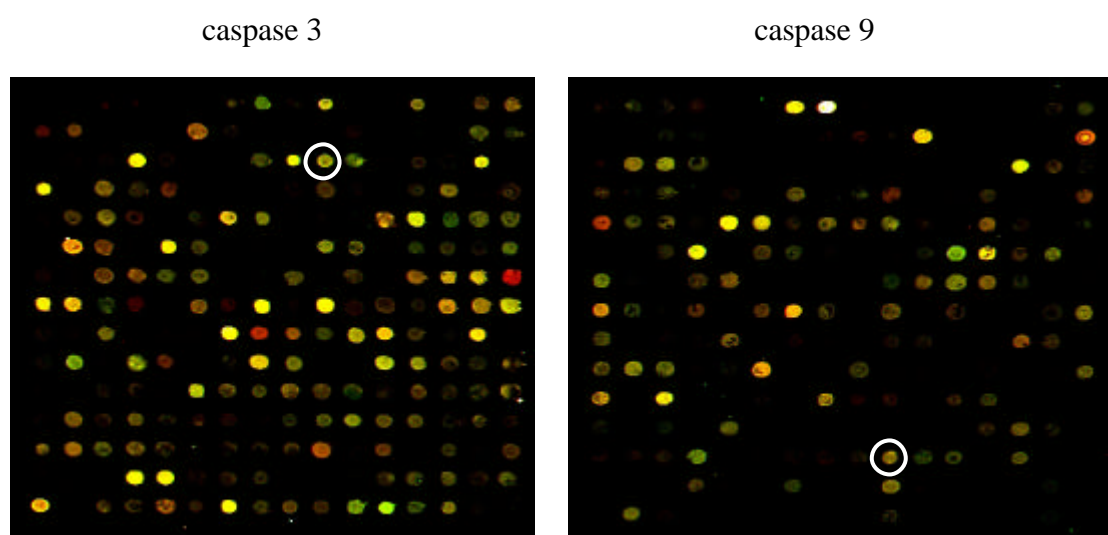


Fig. 79. *Ampelopsis cantoniensis* affects the caspase 3 and caspase 9 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Caspase 3 and caspase 9 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: down regulation; Black color: No effect.

Caspase 5

Caspase 8

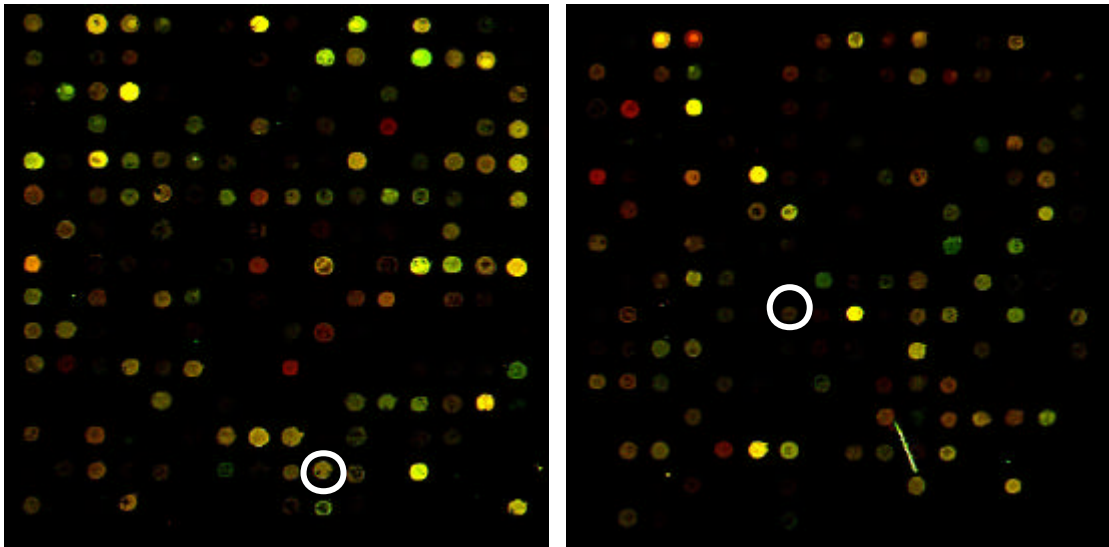


Fig. 80. *Ampelopsis cantoniensis* affects the caspase 5 and caspase 8 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Caspase 5 and caspase 8 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation; Black color: No effect.

Cytochrome C

Cytochrome C1

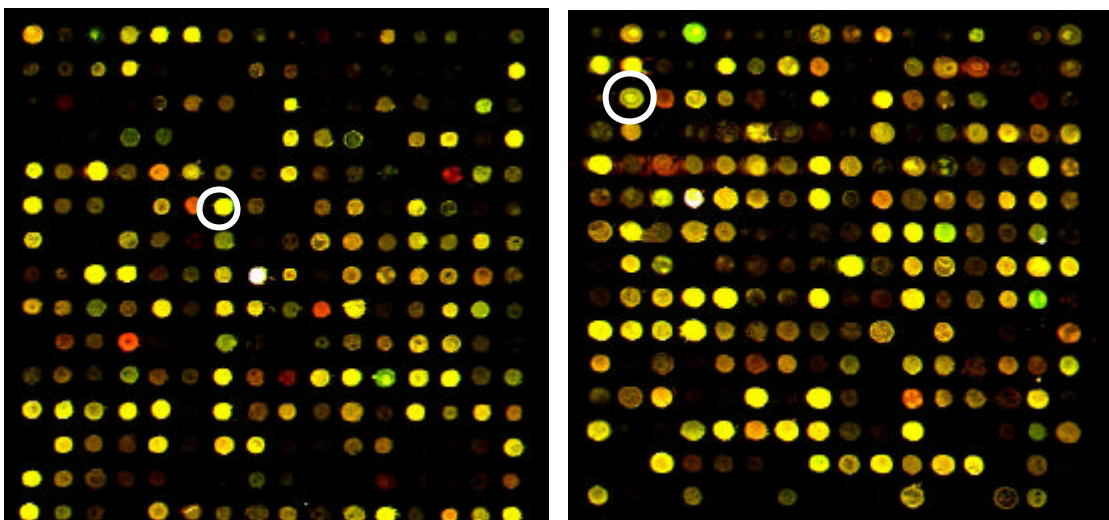


Fig. 81. *Ampelopsis cantoniensis* affects the cytochrome C and cytochrome C1 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Cytochrome C and cytochrome C1 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation; Black color: No effect.

Cyclin E

Cyclin E2

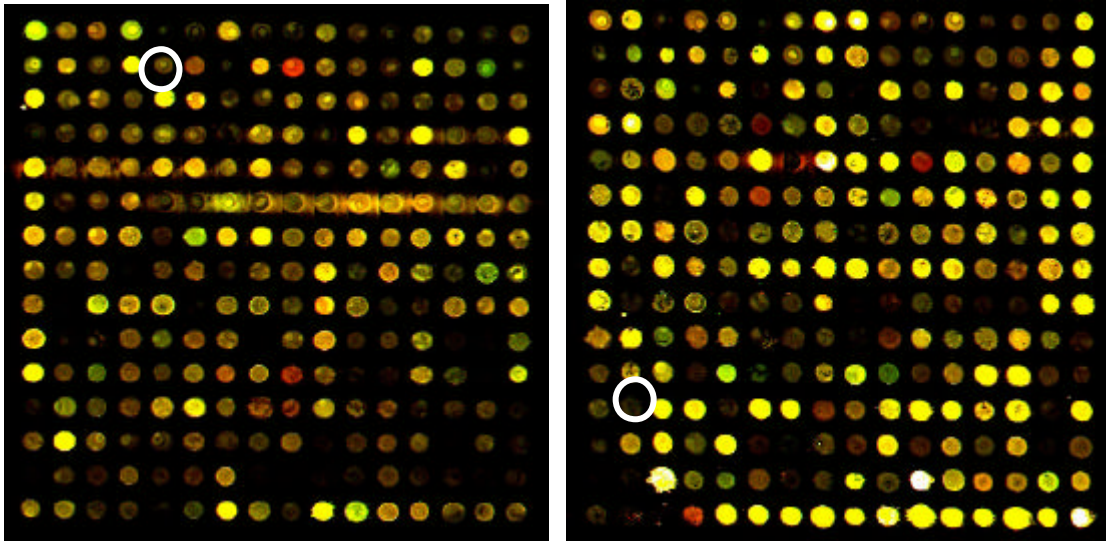


Fig. 82. *Ampelopsis cantoniensis* affects the cyclin E and cyclin E2 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Cyclin E and cyclin E2 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation; Black color: No effect.

Cyclin D1

Cyclin D2

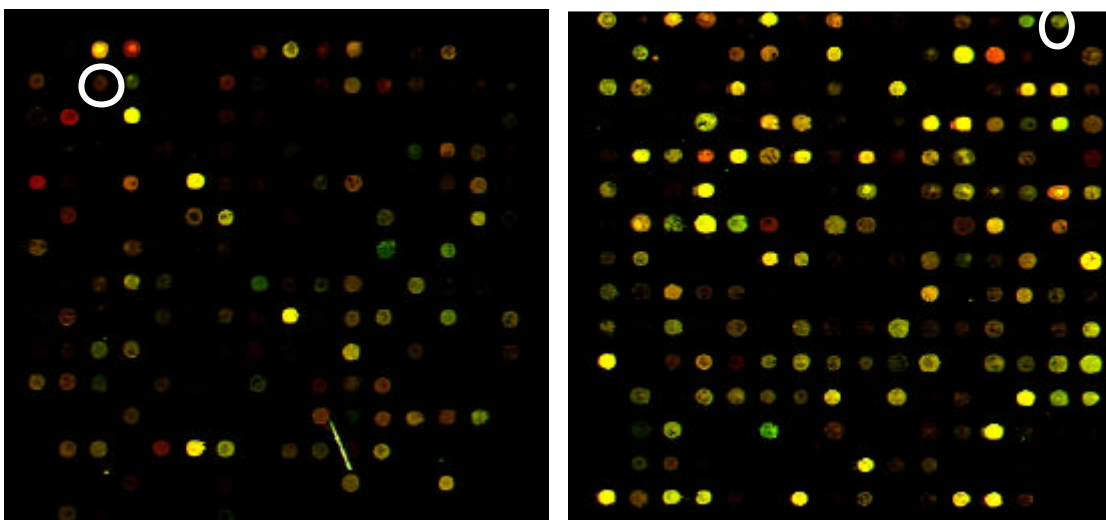


Fig. 83. *Ampelopsis cantoniensis* affects the cyclin D1 and cyclin D2 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Cyclin D1 and cyclin D2 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation; Black color: No effect.

Cyclin D3

CDK2

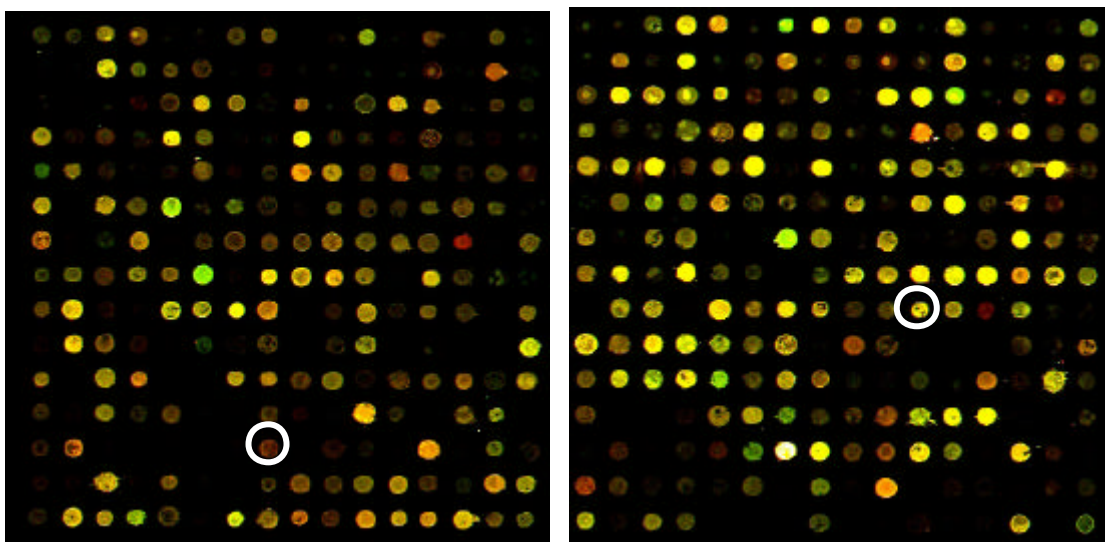


Fig. 84. *Ampelopsis cantoniensis* affects the cyclin D3 and CDK2 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Cyclin D3 and CDK2 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation; Black color: No effect.

Cyclin A

Cyclin A1

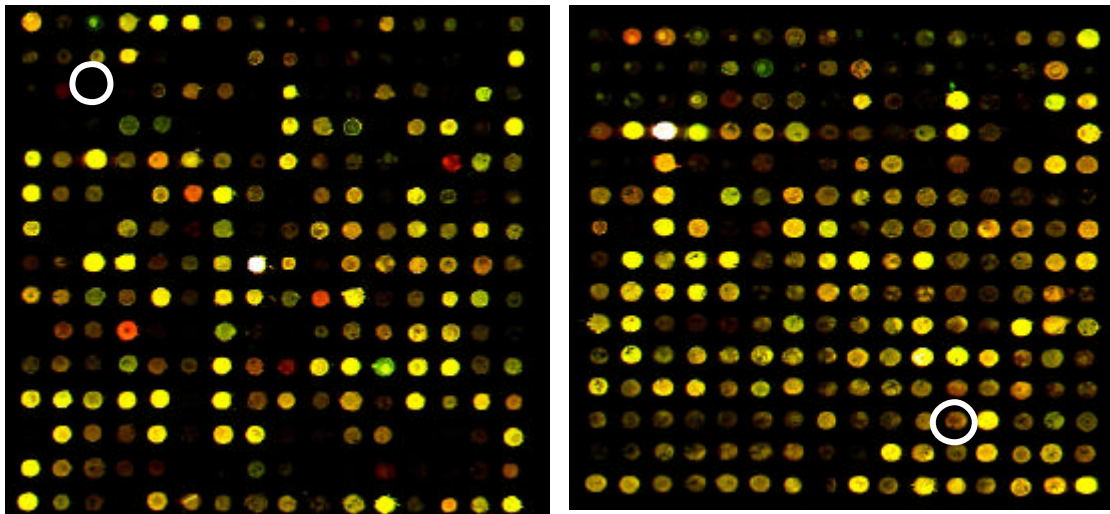


Fig. 85. *Ampelopsis cantoniensis* affects the cyclin A and Cyclin A1 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Cyclin A and cyclin A1 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation; Black color: No effect.

Cyclin B1

Cyclin B2

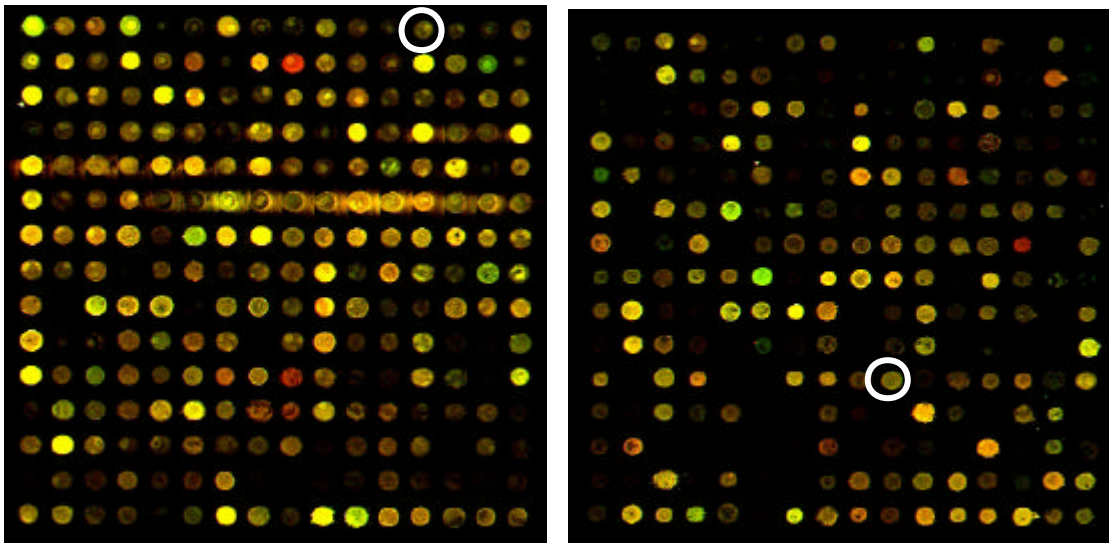


Fig. 86. *Ampelopsis cantoniensis* affects the cyclin B1 and Cyclin B2 gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

Cyclin B1 and cyclin B2 gene expression were showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation; Black color: No effect.

E2F

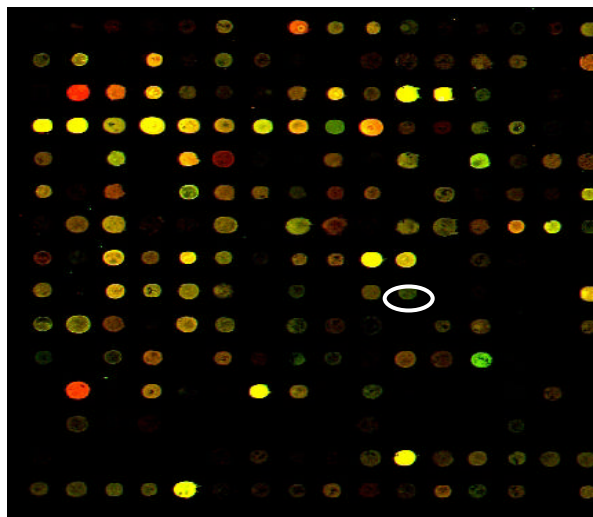


Fig. 87. *Ampelopsis cantoniensis* affects the E2F transcription factor gene expression on the human leukemia cell line (HL-60 cells) by cDNA microarrays.

E2F transcription factor gene expression was showed in cycles.

Note: Yellow to orange color: Up-regulation; Green color: Down-regulation;

第五章 討 論

近年來，生物科技上的迅速發展、工商經濟方面的激烈競爭，原本的社會型態架構，也起了急遽的改變。即使是再富裕的人生、即使是再高物質方面的享樂，然，終究無法避免，生、老、病、死為人類所帶來的痛楚；再精進的科技與醫療，也抵擋不了病魔的摧殘。自古以來，人類即使用各種方式來對抗病魔、來解決病痛、來延續生命。因而，於初期的社會其醫藥制度尚未開發之初，個個國度之間都有其傳統的醫藥資源（諸如：巫術、占星、風水、五行，動物、植物、礦物等的使用），中國具有五千年悠久的歷史，雖也保有一套尊貴的醫藥寶典（其中所記載的漢方，也是目前我們所謂之中藥、草藥、亦或是民間用藥），然此寶典多為經驗上的累積，缺乏了實際機理上之探討。如今，隨著生物科技上的進步，許多科技精進方面之技術已陸續且廣泛的被應用於中醫藥方面，也使傳統中醫藥的研究更有系統性、規律性、以及再現性。因此，本研究乃選擇了民間常用的藥材（廣東山葡萄），融合了現代精進的科技技術，以印證其於藥理方面的作用機理。

一、鎮痛及抗炎方面的探討

一般引起鎮痛反應的刺激種類可分為熱、電、機械或化學上的刺激。鎮痛物質對動物實驗上之評估，也常依上述的模式。福馬林舔足蹠實驗反應乃 Dubuissou 及 Dennis 於 1977 年提出⁽¹⁵⁾，將福馬林溶液注射於動物的足蹠背部，觀察動物行為上的變化，以評估化學性的傷害所造成持續上疼痛的反應。接著，越來越多的學者將福馬林實驗，當作動物疼痛實驗一典型的模式⁽¹⁶⁾，並認為福馬林造成舔足蹠反應，是誘導疼痛方面一個比較理想的指標，且可有效評估鎮痛藥物可能的藥理作用機制^(92,93)。於 1989 年，Shibata⁽⁹⁴⁾等一些學者又對福馬林實驗提出了一些修正，他們認為於鼯鼠足蹠背部注射福馬林溶液後會引起雙向的痛

覺反應(biphasic pain response)，即有所謂的早期(early phase)和晚期(late phase)。早期，出現於注射福馬林 0~5 分鐘之間，晚期，則出現於注射福馬林 15~30 分鐘間。早期所誘發的疼痛，主要是 substance P 和 bradykinin 等神經傳導物質的釋放，直接刺激了痛覺接受體(nociceptor)，再經由 Ad 及 C-神經纖維，將痛覺傳入中樞，此期應屬於中樞神經性引起的痛覺反應⁽⁹⁵⁾；晚期所誘發的疼痛則是 histamine、prostaglandins、serotonin 等周邊化學物質的釋放，此期應屬於炎症所誘發的痛覺反應⁽⁹⁶⁾。另外，福馬林舔足蹠反應，與福馬林濃度有密切的關係。Rosland⁽⁹⁷⁾等學者於 1990 年建議，若僅探討中樞方面的反應時，可使用 0.05~0.2%福馬林溶液，以減少動物本身的傷害；如果也希望觀察到晚期周邊的反應時，則需使用到 1%或更高濃度的福馬林溶液；但福馬林濃度如達 5%時，則會引起急性炎症產生，甚至引起顆粒球的腫脹及破壞。至於實驗場所周遭的環境，也必須嚴加控制。聲響，會干擾了動物的注意力，而引起實驗的誤差；室溫，也是先決條件之一。Rosland⁽⁹⁸⁾於 1991 年提出，環境中的溫度會影響了福馬林的實驗結果，尤其於晚期；Helo 和 Tjolsen⁽⁹⁹⁾於 1993 補充說明，動物飼養環境及實驗室溫度不宜過低，否則晚期的基準線會下降；又，當實驗的藥物如果會改變動物皮膚上的溫度時，則也會影響了晚期的反應。因此，本實驗使用的麩鼠，飼養及實驗的環境均維持於一恆溫狀態(24)，且絕對避免外界干擾。實驗中使用 1%的福馬林溶液，以誘導出兩相的疼痛反應，其結果發現，Ac 粗抽物對於福馬林誘發前後期舔足蹠反應時間，均產生劑量依存性的抑制作用；至於各不同分層抽取物，也產生了相同的結果，但以水層及正丁醇層抑制作用較強。此結果也顯示極性越高的分層萃取物，其抑制作用相對的也較強。另外，NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 也會降低福馬林誘發的前後期反應，但若兩者合併使用，不論於早期亦或是晚期的反應，其抑制程度則更加明顯，且呈劑量依存性。本實驗結果與先前一些學者指出，MK-801 於福馬林實驗上會產生抑制的作用相互吻合^(22,100)。因此，廣東山葡萄不論是粗抽物、亦或是各不同分層抽取物，對於福馬林所誘發的疼痛反應，不論於中樞亦或是周邊，均產生了明顯的抑制作用，此抑制作用應與 NMDA 接受體有

關。

炎症，於外觀上所觀察到的徵候是紅、腫、熱、痛^(29,30)。然而炎症乃身體對於傷害所採取的防禦措施之一。通常於炎症主要的反應過程中，必先有其因，也就是所謂的刺激；而後有其果，即引起組織上的傷害。最初，是血管內皮細胞上的變化，此時引起血管擴張，血管通透性的亢進，此也所謂之初期；接著白血球的溶出、白血球的沾黏、及白血球的浸潤，此又所謂之中期；最後，纖維芽細胞增生、肉芽形成、及血管或組織的再生，此也所謂的末期⁽²⁹⁾。

用於評估抗炎藥物的許多篩選方法中，常以致炎劑促使大鼠後足蹠浮腫後，而能抑制此一浮腫能力，為一廣泛使用的模式。一般最常使用的致炎劑為鹿角菜膠(carrageenin)⁽²⁹⁾。1962年Winter等學者首先使用0.05 mL 1% β -carrageenin注射大白鼠後足蹠引起腫脹，並於注射後連續測量3小時內浮腫的體積；接著又於次年使用此方法來分析indomethacin之抗炎作用。因此，此實驗方式遂成為普遍研究抗炎活性藥物篩選的最佳模式。事實上，據文獻指出，carrageenin所引起足蹠浮腫反應，其過程可出現明顯雙相性的反應⁽¹⁰¹⁾，即當 β -carrageenin注射於大白鼠後足蹠後，在不同的時段，會引起不同致炎化學媒介物質釋放，因而引起發炎的徵兆。在90分鐘內，主要是histamine、serotonin、及PAF (platelet activating factor)等致炎化學媒介物質釋放；90~150分鐘則為kinin類；150分鐘後，則為prostaglandin和leukotriens⁽¹⁰²⁾等神經傳導物質的釋出。本實驗結果顯示，Ac粗抽物對於 β -carrageenin所誘發大鼠足蹠浮腫，呈現劑量依存性的抑制作用，於100 mg/kg~500mg/kg劑量中，1小時內即產生了明顯的抑制作用，且作用時間可長達5小時。因此，Ac粗抽物對於 β -carrageenin所誘發之發炎反應，與抑制了所有引起致炎物質的釋放均有關；至於各不同分層抽取物中，抑制強度依序為水層(water layer)，正丁醇層(*n*-butanol layer)，以及氯仿層(chloroform layer)，正己烷層(*n*-hexane layer)並不會抑制 β -carrageenin所誘發之發炎反應，且似乎還有些許增強的作用；氯仿層於3.5小時後雖有些許的抑制，但也只在於第5小時，產生了有意義的抑制作用，此作用與阻止了prostaglandin和

leukotriens致炎物質的釋放有關；至於水層及正丁醇層，於1.5小時後就開始有明顯的抑制效果，作用時間亦可長達5小時。因此，正丁醇層及水層對於?-carrageenin所誘發之發炎反應，與抑制prostaglandin和leukotriens等神經傳導物質的釋放有關，而與histamine、serotonin和PAF等致炎物之釋放的相關性較低。由以上實驗得知，各不同分層抽取物中的抗浮腫有效成分應存在於極性較高的正丁醇層及水層中。

綜合以上實驗結果顯示，廣東山葡萄抽取物對於福馬林所引起的鎮痛作用，不論於中樞亦或是周邊，均產生了明顯的抑制作用，此抑制作用與NMDA接受體有關；至於各不同分層抽取物中，又以極性較大的分層（正丁醇層及水層）抑制作用較明顯。另外，Ac粗抽物對於抗炎實驗中所產生的抑制作用，與抑制了體內致炎物質的釋放有關。至於各不同分層抽取物中，也是以極性較大的分層（正丁醇層及水層）抑制作用較明顯。因此，其藥理活性成分，應存於正丁醇層及水層中。

二、乙醯轉移酵素方面的探討

科學之發展雖日益精進，環保的意識亦日漸抬頭，然，許許多多對人類有害的化學物質，正逐年增加中。當人們暴露於此些有害化學物質的機率日趨嚴重下，罹患癌症的年齡層也因而正逐年降低。因此，對於芳香胺類化學致癌物質，於動物體內進行乙醯轉移酵素(*N*-acetyltransferase)活性方面的研究，近年來也越受到了重視^(103,104)。

芳香胺類(arylamine)化學物質，為一典型化學致癌物，2-Aminofluorene (2-AF)即屬其中之一類，雖其廣泛存於我們周遭環境以及食物中，但其本身卻為一穩定性極高的物質。然，一旦進入體內，會經由體內的乙醯轉移酵素(*N*-acetyltransferase)乙醯化成 *N*-Acetyl-aminofluorene (AAF)，隨即變為一活性強之中間代謝產物，再經由其它酵素代謝後之最終代謝產物，一方面會與細胞內DNA之Guanine的C-8位置結合形成DNA adducts，繼而引起基因上的突變

(mutation)⁽⁵⁰⁾；另一方面或與 RNA 中的鹼基結合，造成轉譯過程的錯誤，因而產生錯誤的蛋白質⁽⁴⁹⁾。此種種變異可能改變了細胞週期正常的分裂，進而引起不同標的器官(target organs)無法行使正常功能，終而引發病變產生。乙醯轉移酵素 (*N*-acetyltransferase；簡稱 NAT)廣泛分佈於身體各個組織器官中，主要作用為藥物或化學物質於體內的代謝，以及內生性化合物的合成及去活化性。當含有 amino、hydroxyl 及 sulfhydryl 等基團的化合物進入人體後，必先經由體內的 NAT 乙醯化後，再轉化或代謝為親電性強的代謝物質，此代謝物質會與 DNA 結合形成 DNA-adduct，進一步於 DNA 複製時，導致基因的突變，終而引發病症產生。因此，乙醯化的過程，為芳香胺類化合物及一些藥物必經之代謝途徑之一。當個體如果具有較高 NAT 活性時，一旦暴露於致癌物的環境中，則引發癌症的機率也相對增加；又當個體組織器官（如肝臟）NAT 活性改變時，與不同癌症的發生率亦有直接關聯，就如目前所報導的乳癌及膀胱癌。而芳香胺類化合物直接或間接引發的致癌作用亦已經證實了^(57,58)。

老鼠的血液、肝臟早已證實含有 NAT 酵素⁽¹⁰⁴⁾，肝臟，是藥物進行生物轉化 (biotransformation)、以及一些化學物質主要的代謝和解毒中心。且文獻中也指出，肝是 2-AF 的目標器官，又肝臟組織中所含 NAT 的活性較強，也較容易測得，因此也是最早被研究的器官⁽¹⁰⁵⁾。目前所研究的動物中，也都以肝臟組織內 NAT 活性的大小來決定個體快和慢的乙醯轉移酵素之區別，而且許多文獻也以肝臟組織中的 NAT 做為氨基酸序列排列上的分析，再進一步的推測調控此酵素遺傳 DNA 上的排列。血液，可經由循環系統運送身體所需的養分至各個組織器官中，當然，它也運送了經由肝臟組織所代謝藥物或是化學物質的代謝產物，此些物質極可能的包括了些許的致癌物質，因而也會隨著血流運送至各不同標的器官中。循環中的白血球具有活化 2-AF 的能力，同樣也會與循環中的代謝物質產生乙醯化作用，並且形成 DNA-adduct，然後於白血球中產生了最終的致癌物質，繼而引起血液上的病變；抑或是將此最終致癌物，隨著循環而運送到身體各個不同組織器官中，進而引發了致癌的危險性⁽⁵⁰⁾。

大鼠具有二種不同 NAT 酵素(NAT1 及 NAT2), 2-aminofluorene (2-AF) 是 NAT1 及 NAT2 共同的受質, 而 *p*-aminobenzoic acid (PABA) 則隸屬於 NAT1 的受質 (48,106,107)。實驗中, 我們使用了 2-AF 以及 PABA 兩種化學物質。由實驗結果顯示當以 2-AF 為受質時, Ac 粗抽物對於雄性及雌性大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素活性均呈現明顯劑量依存性(dose-dependent)的抑制作用。高濃度中 (500 mg/mL) 則完全抑制雌性大鼠肝臟組織中乙醯轉移酵素的活性; 雄性大鼠, 約產生 80%的抑制效果; 以 PABA 為受質時, 對雄性大鼠肝臟組織中乙醯轉移酵素活性的抑制作用較強, 呈劑量依存性; 雌性大鼠雖亦具抑制作用, 但當 Ac 劑量高至 50~500mg/mL 只產生 40%抑制效果。其次, 利用一定濃度 Ac (50 mg/mL), 來分析肝臟組織中乙醯轉移酵素(NAT)對於不同濃度 2-AF 乙醯化的影響。結果顯示, Ac 粗抽物對於雄性及雌性大鼠肝臟組織中乙醯轉移酵素(NAT)活性, 會隨著 2-AF 濃度上升而呈現明顯抑制作用。

至於各不同分層抽取物, 當以 2-AF 為受質時, 對於雄性及雌性大鼠肝臟組織乙醯轉移酵素活性, 均呈現劑量依存性(dose-dependent)的抑制作用。其中以正丁醇層(*n*-butanol layer)作用最強, 高濃度時 (50 mg/mL) 對雄性及雌性大鼠乙醯轉移酵素活性, 產生 82%的抑制作用; 水層(water layer)、氯仿層(chloroform layer)及正己烷層(*n*-hexane layer), 於高濃度時(50 mg/mL)抑制效果均不及 45%。如以 PABA 為受質時, 各不同分層抽取物對於雄性及雌性大鼠肝臟組織中乙醯轉移酵素活性, 均呈現劑量依存性(dose-dependent)的抑制作用, 但仍以正丁醇層 (*n*-butanol layer)作用較強。

血液中也含有乙醯轉移酵素(NAT), 因此對於環境中的有害物質同樣具有乙醯化的能力。因此, 血液會將循環中所殘餘的化學物質, 或經由肝臟所代謝的代謝產物, 進一步的乙醯化成更具活性的有害物質, 再經循環系統, 帶至各個組織, 進而引起組織器官方面的病變產生。由本實驗結果顯示, 當以 2-AF 為受質時, Ac 粗抽物對於雄性及雌性大鼠血液中乙醯轉移酵素的活性均呈現抑制作用, 高濃度時 (500 mg/mL) 抑制作用較為明顯, 可達 100%。又當以 PABA 為

受質時，Ac 粗抽物於高濃度中（500 mg/mL）不論雄或雌性大鼠只產生 50% 的抑制作用，低劑量下似乎呈現些許促進效果。

至於各不同分層抽取物，當以 2-AF 為受質時，對於雄性及雌性大鼠血液中乙醯轉移酵素活性的影響，有較明顯的差異。正己烷層(*n*-hexane layer)於低濃度時(3.125 mg/mL)，對雌性大鼠血液中乙醯轉移酵素的活性產生 23% 的促進作用；氯仿層(chloroform layer)於低濃度時（3.125 mg/mL）對雄性大鼠產生約 37% 的促進現象；同樣的水層(water layer)於低濃度時（3.125 mg/mL）對雄性及雌性大鼠也引起些許促進作用。至於各分層於其它濃度中，還是呈現劑量依存性的抑制作用；其中仍以正丁醇層(*n*-butanol layer)抑制作用最強。若以 PABA 為受質時，各不同分層抽取物對於雄、雌兩性大鼠血液乙醯轉移酵素活性，均呈現劑量依存性(dose-dependent)抑制作用。

又當實驗大鼠如事先口服 Ac 粗抽物(250 mg/kg)，及各不同分層抽取物(100 mg/kg)，24 小時後再給與 2-AF(60 mM)，結果可見，於動物肝臟組織、血液、腎臟組織及尿液中，對於 2-AF 的乙醯化均呈現抑制作用，其中又以對血液及腎臟組織中的乙醯轉移酵素活性抑制效果較強。但，如實驗大鼠先給與 2-AF (60 mM)，再立即口服 Ac 粗抽物(250 mg/kg)及各不同分層抽取物(100 mg/kg)，其結果，不論對於動物肝臟組織、血液、腎臟組織或尿液中的 2-AF 乙醯化也產生部分抑制現象，但仍以對血液及腎臟組織中乙醯轉移酵素活性抑制效果較強。

由以上實驗結果評估，Ac粗抽物及各不同分層抽取物，對於大鼠肝臟以及血液胞質液中乙醯轉移酵素活性，產生明顯抑制作用；又於活體實驗動物中，Ac粗抽物及各不同分層抽取物不論事先（預防）或是事後（治療）的給與，均抑制了體內部分組織器官中，芳香胺類化學物質的乙醯化作用。如此，進入到體內芳香氨類化學致癌物，其乙醯化作用被抑制了，相對於體內毒素(或致癌物質)的產生也被抑制。又，經由血流分佈到各組織器官的有害物質也減少了。如此，體內自身免疫功能增強，細胞可行正常週期上的運作、正常的分裂，自然也就抑制了組織細胞中基因的突變(mutation)。因此，廣東山葡萄抽取物，不但減緩此

類致癌物質乙醯化作用，也減緩了有害毒素的產生；進而增強自身免疫功能，對身體具保健之效。

三、人類血癌細胞株(HL-60)的探討

肝臟，是人體內進行生物轉化(biotransformation)的主要器官。血液，則可將體內的養分及一些代謝物質，傳送到各個組織器官中。本實驗初曾就肝癌與血癌細胞上進行初步的篩選，發覺廣東山葡萄對於人類血癌細胞株(HL-60)的抑制作用較強，因此本實驗選取人類血癌細胞株(HL-60)進行藥理學上的研究。

白血球可分為顆粒球、單核球、淋巴球等。這些血球在骨髓中最原始的型態稱為幹細胞(stem cell)，此種母細胞，可以向著具有不同功能以及不同型態的細胞分化發展，因此又稱為多功能造血幹細胞。由這幹細胞分化成血球母細胞，在骨髓內進一步分化為成熟的白血球，此時才會進入到血管的血流中。而未成熟的血球則不會出現於血管內。白血病，是骨髓中白血球於生長過程中，年輕的白血球無法正常分化為成熟的白血球，因而導致了造血組織異常增生，進而侵襲各個組織器官，最終，引起組織器官功能的失調與衰竭。正常的白血球如果減少，易感染各種病原體；紅血球減少，會造成貧血；血小板減少，則易造成出血。因此白血病是一種造血系統上的病變，又稱血癌。血癌，也是致命癌症之一。當前，化學製劑的治療，是阻止血癌進展有效方法之一，然，始終無一能治癒或根治的製劑。

1. 廣東山葡萄對於人類血癌細胞株(HL-60)細胞的毒性作用

研究中指出，Ac 粗抽物對於人類血癌細胞株(HL-60)的存活率呈現明顯劑量依存性的抑制作用。高劑量中 (300 mg/mL)幾乎完全抑制細胞的存活。又於各不同分層抽取物中，正己烷層(*n*-hexane layer)以及氯仿層(chloroform layer)於低濃度時，反而具有些許促進增生的作用，當濃度增加時才產生抑制效果；至於正丁醇層(*n*-butanol layer)以及水層(water layer)則呈現劑量依存性的抑制作用，水層的抑

制作用大於正丁醇層。其次再由型態學、以及螢光顯微鏡觀察的結果顯示，Ac 粗抽物於 50 mg/mL，即可對細胞的型態引起破壞（細胞膜、細胞核的破裂），劑量越高作用越明顯；至於各不同分層抽取物，於 12.5 mg/mL 時，即產生了與粗抽物相似的結果。再於 DNA 形成梯狀物的斷裂(DNA ladder)中顯示，Ac 粗抽物培養 12 小時，於高濃度可見明顯的 DNA ladder；各不同分層抽取物中，於 12.5 mg/mL 也產生了 DNA ladder。最後經由流式細胞儀(flow cytometry)的分析，Ac 粗抽物對於血癌細胞會引起劑量依存性的凋亡現象(apoptosis)；各不同分層抽取物雖也呈現相似的作用，其中，以正丁醇層及水層的抑制作用較明顯。由以上實驗結果，均證實了 Ac 粗抽物及各不同分層抽取物，對於人類血癌細胞株(HL-60)，會引起明顯的細胞毒性(cytotoxic)以及細胞凋亡(apoptosis)的作用。

2. 廣東山葡萄對於人類血癌細胞株(HL-60)細胞週期的抑制作用

細胞的週期(cell cycle)是指由一個細胞的有絲分裂(mitosis)中心點開始，到分化後的子細胞(daughter cell)之中心點為止，代表著一次增殖現象。細胞藉由細胞週期進行複製，而複製的細胞其複製品質必須靠監視系統進行確認。複製中的細胞一旦受到任何損傷，則一些活化細胞週期的相關基因會終止細胞週期的前進⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾，進而進行 DNA 的修復。無法修復的細胞，則選擇了細胞的凋亡(apoptosis)，以結束自我。細胞週期在調節 DNA 的複製以及 DNA 修補的平衡上非常重要，一旦平衡崩潰，細胞最後只能步上致癌之路。正常細胞與癌症細胞皆經由相同之生長週期，此兩種細胞之相異點在於生長週期中各階段的細胞數，以及癌細胞於週期的分裂上並無 G₀ phase。因此，目前於新藥的開發，均傾向於終止癌細胞於某一週期上的分裂過程，如此一來，也會減少對正常細胞的傷害。

本實驗結果顯示，於流式細胞儀(flow cytometry)細胞週期分析中，發現 Ac 粗抽物對於人類血癌細胞株(HL-60)培養 6、12、24、36、48 小時，G₀/G₁ phase 的細胞數增加，S phase 細胞數則明顯下降；於各不同分層抽取物中，對於人類血癌細胞株(HL-60)經培養 24 小時後，與粗抽物相同，G₀/G₁ phase 的細胞數增加，

S phase 細胞數會明顯的減少。因此，由實驗結果顯示，Ac 粗抽物以及其各不同分層抽取物，會使人類血癌細胞株(HL-60)的細胞週期終止於 G_0/G_1 期(G_0/G_1 phase arrest)。

3. 廣東山葡萄抽取物對人類血癌細胞株(HL-60)相關細胞週期素(cyclins)基因的表現

細胞的週期我們都知其分成四個階段，從一個階段移至下一個階段，需要一個稱之為細胞週期調節蛋白質(cyclins)的許可，因此，每個主要的階段都有一個調節的蛋白質。細胞週期的調節蛋白質其所扮演的角色好比安全檢查站的守衛，他們檢測環境以及確定細胞週期的上一個階段已經完成而可以進行下一個步驟⁽¹¹⁰⁾。細胞週期受控於相關調節蛋白質，此稱之為細胞週期調節蛋白激酶(cyclin dependent kinase；或簡稱 CDK 蛋白質)。當負責細胞週期特定步驟的細胞週期調節蛋白決定開始進行反應時，它會與其特定的 CDK 蛋白質結合，此一動作活化了 CDK，然後將磷酸基加到負責細胞分裂整個系列的蛋白質上。這些蛋白質處於備用的狀態，一直到它們被磷酸基活化。因此，細胞週期是由 cyclin 和 cyclin-dependent kinase (CDKs)形成複合體，進一步活化細胞週期中的相關蛋白質以控制細胞增殖⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾。而這些相關蛋白質大都是位於 G_1 phase 的致癌基因與腫瘤抑制基因。因此，細胞週期的進行，必須具有協同作用才能順利的完成⁽⁷²⁾。先前已提及，許多的藥物會抑制了細胞週期素的 cyclin D1 以及 cyclin E 而使細胞的週期停止於 G_1 phase⁽⁷⁸⁻⁸¹⁾。

由本實驗結果顯示，Ac 粗抽物會使人類血癌細胞株(HL-60)的胞週期終止於 G_0/G_1 phase。於細胞週期、PT-PCR、以及基因晶片的結果顯示，主要抑制細胞週期內 cyclin E, cyclin D1, cyclin D2 以及 cyclin D3 基因的表現；同樣的，Ac 水層抽取物對於人類血癌細胞株(HL-60)的胞週期也終止於 G_0/G_1 phase，於 PT-PCR 的結果中顯示，主要也是抑制細胞週期內 cyclin E, cyclin D2 以及 cyclin D3 基因的表現。因此，Ac 粗抽物亦或是水層抽取物，對於人類血癌細胞株的細胞週期

是終止於 G₀/G₁ phase，又於細胞週期素上，抑制了 cyclin E, cyclin D1, cyclin D2 以及 cyclin D3，此與先前學者所研究之結果相互印證⁽⁷⁸⁻⁸¹⁾。

由文獻指出，粒腺體中 cytochrome C 的釋出，會引起 caspase 的活化因而誘發細胞的凋亡⁽¹¹²⁾。又由另外一群研究者指出，抗細胞凋亡蛋白質家族中的 Bcl-2 及 Bcl-x1 大量的表現可以抑制粒腺體中 cytochrome C 的釋出，因此無法引起 caspase 的活化，當然也無法造成細胞的凋亡⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾。也有其他學者認為，促進細胞凋亡的蛋白質與抗細胞凋亡的蛋白質的比例，對於細胞的凋亡則有一定的影響^(115,116)。Galvesen 等學者於 1999 年曾提出，caspase 3 的活化，可以誘發 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)的分解、染色體 DNA 的裂解，接著引起了細胞的凋亡⁽¹¹⁷⁾；另一方面，Inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)a 會抑制了抗細胞凋亡轉譯因子 Nuclear factor (NF)- κ B 的作用，(I κ B)a 也需要 caspase 3 的活化，使其與 NF κ B 結合的區域露出，抑制抗細胞凋亡的作用^(118,119)。由本研究結果發現，Ac 粗提取物，活化了粒腺體中 cytochrome C 以及 cytochrome C1，進一步活化了 caspase 9，最後活化了 caspase 3。因此 Ac 對於抑制人類血癌細胞株細胞上的增生，以及細胞上的凋亡，主要的機轉是活化了粒腺體中 cytochrome C 及 cytochrome C1，接著活化 caspase 9，最後活化了 caspase 3，而使細胞的週期終止於 G₀/G₁ phase。

由以上實驗結果得知：

於鎮痛及抗炎實驗中：廣東山葡萄粗抽物及其各分層抽提取物，對於福馬林所誘發的疼痛反應，在中樞及周邊，均產生明顯的抑制作用，此作用應與 NMDA 受體有關；於抗發炎實驗中，與抑制發炎物質的釋放有關；至於各分層抽提取物中，仍以極性較大的分層抑制作用較強。

於乙醯轉移酵素實驗中：廣東山葡萄粗抽物及各分層抽提取物，對於大鼠肝臟及血液胞質液中乙醯轉移酵素的活性，產生明顯的抑制作用；又於活體動物實驗中，廣東山葡萄粗抽物及各分層抽提取物，不論事先（預防）或是事後（治療）

給與，均抑制了體內部分組織器官中，芳香胺類化學物質的乙醯化作用。因此，廣東山葡萄提取物，不僅可以減緩致癌物質於體內的乙醯化作用，同時，也減緩了組織器官中有害的毒素產生。

於人類血癌細胞株的實驗中：廣東山葡萄粗抽物及各分層提取物，對於人類血癌細胞株，可使細胞生長週期終止於 G_0/G_1 phase。主要透過抑制細胞週期中 cyclin E, cyclin D1, cyclin D2、cyclin D3 以及 E2F 基因的表現。再經由基因晶片實驗中顯示，廣東山葡萄粗提取物，可活化了粒腺體中的 cytochrome C 及 cytochrome C1，進一步活化 caspase 9，最後活化 caspase 3，而使細胞週期終止於 G_0/G_1 phase，引起細胞的凋亡。

第六章 結 論

醫藥上雖快速蓬勃發展，卻始終抵擋不住病痛對人體所造成的痛楚：日新月異更精進的科技，也無法阻止病魔為人類所帶來的摧殘。阻擋病魔的侵襲、延續病患的生命，為世界醫藥界所積極追尋的目標。目前，隨著世界潮流的趨勢，又逐漸的走向了一股復古的風範，醫藥界也不例外，因此，許許多多的古方，又再度有了新的詮釋。當於黔驢技窮之際，即使是再精進的科技、再文明現代的社會，許許多多的民間用藥，又再度流傳於坊間，廣東山葡萄即為其中之一。故本實驗即針對廣東山葡萄的藥理作用進行研究，所得結果如下。

於鎮痛及抗炎實驗中，廣東山葡萄粗抽物及其各分層抽取物，對於福馬林所誘發之小鼠前後期舔足蹠反應中，均產生明顯劑量依存性的抑制作用，各分層抽取物中，以極性較大的分層抑制作用較強。顯示廣東山葡萄對於福馬林所誘發的疼痛反應，在中樞及周邊，均產生明顯的抑制作用，此作用應與 NMDA 的接受體有關；另於抗發炎實驗中，廣東山葡萄粗抽物對於 β -carrageenin 所誘發之發炎反應，呈現劑量依存性的抑制作用，此一作用與抑制致炎物質的釋出有關；至於各分層抽取物中除正己烷層外，仍以極性較大的分層抑制作用較強。

廣東山葡萄粗抽物對於大鼠肝臟組織、或是血液的胞質液(cytosols)，均抑制外來芳香胺類化學致癌物質之乙醯轉移酵素的活性；至於各分層抽取物中，仍以極性較大的分層抑制作用較強；又於整體動物實驗中，當實驗大鼠事先口服廣東山葡萄粗抽物，及各分層抽取物，24 小時後再給與芳香胺類化學致癌物質，結果可見，於動物肝臟組織、血液、腎臟組織及尿液中，對於芳香胺類化學致癌物質的乙醯化作用，均呈現抑制效果；另外，當實驗大鼠事先給與芳香胺類化學致癌物質，再立即口服廣東山葡萄粗抽物，及各分層抽取物，結果顯示，對於動物肝臟組織、血液、腎臟組織及尿液中，對於芳香胺類化學致癌物質的乙醯化作用，也會產生部分的抑制效果。

對於人類血癌細胞株方面，藉由探討細胞的增生、細胞週期的變化、細胞

的凋亡等機制，以評估廣東山葡萄對於人類血癌細胞株方面所扮演的角色。結果顯示，廣東山葡萄粗抽物及各分層抽取物，均可抑制人類血癌細胞株細胞的增殖、使細胞生長週期終止於 G₀/G₁ phase、促使細胞 DNA 的斷裂、最後誘發細胞的凋亡。再由細胞內週期素(cyclins)的含量，以及相關細胞週期素基因表現 [Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)] 方面的分析，廣東山葡萄粗抽物，主要透過抑制細胞週期內的 cyclin E, cyclin D1, cyclin D2 及 cyclin D3 基因的表現；而水層抽取物也是抑制細胞週期內 cyclin E, cyclin D2 及 cyclin D3 基因的表現。再由基因晶片中顯示，廣東山葡萄粗抽取物，可活化粒腺體中 cytochrome C 以及 cytochrome C1，活化了 caspase 9，活化了 caspase 3。因此廣東山葡萄粗抽取物對人類血癌細胞株，主要是活化了粒腺體中 cytochrome C 及 cytochrome C1，進一步活化 caspase 9，最後活化 caspase 3，而使細胞週期終止於 G₀/G₁ phase，引起細胞的凋亡。

由以上實驗結果得知，廣東山葡萄粗抽物及其各不同分層抽取物，對於 (1). 福馬林所誘發的疼痛反應，在中樞及周邊，均產生明顯的抑制作用，此作用應與 NMDA 接受體有關；於抗發炎實驗中，與抑制致炎物質的釋放有關；而於各分層抽取物中，以極性較大的分層抑制作用較強。(2). 不論於組織的胞質液，或於活體動物實驗中，均抑制了芳香胺類化學物質於體內的乙醯化作用。因此，不但可減緩此類致癌物質於體內的乙醯化作用，也減少體內致命的毒素產生。(3). 人類血癌細胞株方面：主要經由活化粒腺體中 cytochrome C 及 cytochrome C1，進一步活化 caspase 9，最後活化 caspase 3，而使細胞週期終止於 G₀/G₁ phase，引起細胞的凋亡。

參 考 文 獻

1. 台灣植物誌第二版編輯委員會 編輯：台灣植物誌 第二版 第三卷。台灣植物誌第二版編輯委員會 出版 台北 1993;pp696-9.
2. 邱年永 張光雄：原色台灣藥用植物圖鑑(3)。台北南天書局發行 1998;pp131.
3. Park S, Lee DK, Whang YH, Yang CH. Momordin I, a compound of *Ampelopsis Radix*, inhibits AP-1 activation induced by phorbol ester. *Cancer Letters* 2000;152:1-8.
4. Yabe N, Matsui H. *Ampelopsis brevipedunculata* (Vitaceae) extract inhibits a progression of carbon tetrachloride-induced hepatic injury in the mice. *Phytomedicine* 2000;7:493-8.
5. Yang LL, Yen KY, Kiso Y, Hikino H. Antihepatotoxic actions of Formosan plant drugs. *Journal of Ethnopharmacology* 1987;19:103-10.
6. Lee H, Lin JY. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutation Research* 1988;204:229-34.
7. Sun X, Guan YX, Luo XL, Yu YA, Gao HZ. Observation of the efficacy of *Ampelopsis brevipedunculata* Trautv. In the treatment of *Herpes zoster*. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 1986;6:17-8.
8. Katsuta H, Takaoka T. An attempt in tissue culture at preventing and treating the collagen fiber formation of liver cells. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 1980;50:275-82.
9. 陳纘光、王玫馨、蔡沛祥、陳孝君：無次根中蛇葡萄素和楊梅素的含量測定。《中藥材》1997;20:23-5,.
10. 王玫馨 黃愛東：無刺根黃酮類成分的分離和鑑定。《中藥材》1989;12:28-9.
11. 王玫馨 周愛群：無刺根炮制品的質量研究。《中藥材》1989;12:31-3.
12. 鄭宏強、劉德育：蛇葡萄素抗黑色素瘤侵襲和轉移的作用。《癌症

- 2003;22:363-7.
13. 國家中醫藥管理局〔中華本草〕編委會：中華本草 第五卷。上海科學技術出版社 上海 1999;pp4227-8.
 14. 江蘇新醫學院編：中藥大辭典 上冊。上海科學技術出版社 上海 1985;pp342.
 15. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161-74.
 16. Takahashi M, Tokuyama S, Kaneto H. Implication of endogenous opioid mechanism in the production of the antinociceptive effect induced by psychological stress in mice. *Japanese Journal of Pharmacology* 1987;44:283-91.
 17. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38:347-53.
 18. Danysz W, Parsons AC. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacologic Reviews* 1998;50:597-664.
 19. Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neuroscience Letters* 1995;197:25-8.
 20. Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Research* 1990;518:218-26.
 21. Masuyama T, Shimizu T. Antinociceptive involvement of substance P in the spinal cord of mice: does effects of substance P on the behavior elicited by intrathecally administered NMDA. *Brain Research* 1997;759:241-6.

22. Lutfy K, Shen KZ, Woodward RM, Weber E. Inhibition of morphine tolerance by NMDA receptor antagonists in the formalin test. *Brain Research* 1996;731:171-81.
23. Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport* 1997;8:941-6.
24. Davidson EM, Carlton SM. Intraplantar injection of dextrophan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. *Brain Research* 1998; 785:136-42.
25. Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Nakayama Y, Hazama K, Namiki A. Activation of peripheral NMDA-nitric oxide cascade in formalin test. *Anesthesiology* 2000;93:173-8.
26. Berrino L, Oliva P, Rossi F, Palazzo E, Nobili B, Maione S. Interaction between metabotropic and NMDA glutamate receptors in the periaqueductal grey pain modulatory system. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2001;364:437-43.
27. Yashpal K, Fisher K, Chabot JG,Coderre TJ. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. *Pain* 2001;94:17-29.
28. Berrino L, Oliva P, Massimo F, Aurilio C, Maione S, Grella A, Rossi F. Antinociceptive effect in mice of intraperitoneal N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the formalin test. *European Journal of Pain* 2003;7:131-7.
29. 鄭瑞棠 陳文旭：藥理學。華杏出版股份有限公司 台北 1991;pp407-27.
30. Vane J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB Journal* 1987;1:89-96.

31. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic pathology. Saunder 1997;Sixth edition. pp25-46.
32. Shacter E. Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Huntington)* 2002;16:217-26, 229; discussion 230-2.
33. Farrow B. Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surgical Oncology* 2002;10:153-69.
34. Quirk JT. Kupinski JM. Chronic infection, inflammation, and epithelial ovarian cancer. *Medical Hypotheses* 2001;57:426-8.
35. Schwartsburd PM. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer & Metastasis Reviews* 2003;22:95-102.
36. Coussens LM. Werb Z. *Inflammation and cancer. Nature* 2002;420:860-7.
37. Rous P & Kidd J. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states: a study of the tar tumors of rabbits. *Journal of Experimental Medicine* 1941;73,365-89.
38. Mackenzie IC & Rous P. The experimental disclosure of latent neoplastic changes in tarred skin. *Journal of Experimental Medicine* 1941;73,391-415.
39. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. International Edition 2001;Eighth edition. pp987-1010.
40. Chambers RW. Chemical carcinogenesis: a biochemical overview. *Clinical Biochemistry* 1985;18:158-68.
41. Lipmann F. Acetylation of sulfanilamide by liver homogenates and extracts. *The Journal of Biological Chemistry* 1945;160:173-90.
42. Glowinski IB, Weber WW. Genetic regulation of aromatic amine N-acetylation in inbred mice. *Journal of Biological Chemistry* 1982;257:1424-30.
43. Hein DW, Omichinski JG, Brewer JA, Weber WW. A unique pharmacogenetic

- expression of the N-acetylation polymorphism in the inbred hamster. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1982;220:8-15.
44. Levy GN, Weber WW. 2-Aminofluorene-DNA adduct formation in acetylator congenic lines. *Carcinogenesis* 1989;10:705-9.
 45. Gandet SJ, Chader GJ. Partial purification and characterization of arylamine N-acetyltransferase in bovine retina. *Current Eye Research* 1992;11:1185-92.
 46. Hein DW, Rustan TD, Martin WJ, Bucher KD, Miller LS, Fyrman EJ. Acetylator genotype-dependent N-acetylation of arylamines *in vivo* and *in vitro* by hepatic and extrahepatic organ cytosols of Syrian hamsters congenic at the polymorphic acetyltransferase locus. *Archives of Toxicology* 1992;66:112-7.
 47. Levy GN, Weber WW. 2-Aminofluorene-DNA adducts in mouse urinary bladder: effect of age, sex and acetylator phenotype. *Carcinogenesis* 1992;13:159-64.
 48. Chung JG, Levy GN, Weber WW. Distribution of 2-aminofluorene and p-aminobenzoic acid N-acetyltransferase activity in tissues of C57BL/6J rapid and B6.A-NatS slow acetylator congenic mice. *Drug Metabolism & Disposition* 1993;21:1057-63.
 49. Kelly SL, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase in Balb/c mice: identification of a mouse isoenzyme by cloning and expression *in vitro*. *Biochemical Journal* 1994;302:347-53.
 50. Weber WW, Hein DW. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacological Reviews* 1985;37:25-79.
 51. Hein DW. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1988;948:37-66.
 52. Levy GN. DNA-carcinogen adducts in circulating leukocytes as indicators of arylamine carcinogen exposure. *Fundamental & Applied Toxicology* 1993;21:23-30.

53. Fang SH. Chung JG. Chang WC. Chang SS. Evidence for arylamine N-acetyltransferase activity in the fungi *Candida albicans*. *Toxicology Letters* 1997;92:109-16.
54. Chung JG. Kuo HM. Lin TH. Ho CC. Lee JH. Lai JM. Levy GN. Weber WW. Evidence for arylamine N-acetyltransferase in the nematode *Anisakis simplex* *Cancer Letters* 1996;106:1-8.
55. Hein DW. Doll MA. Fretland AJ. Leff MA. Webb SJ. Xiao GH. Devanaboyina US. Nangju NA. Feng Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000;9:29-42.
56. Agundez JA. Ladero JM. Olivera M. Abildua R. Roman JM. Benitez J. Genetic analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in breast cancer patients. *Oncology* 1995;52:7-11.
57. Risch A. Wallace DM. Bathers S. Sim E. Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Human Molecular Genetics* 1995;4:231-6.
58. Coroneos E. Sim E. Arylamine N-acetyltransferase activity in human cultured cell lines. *Biochemical Journal* 1993;294:481-6.
59. Hickman D. Risch A. Buckle V. Spurr NK. Jeremiah SJ. McCarthy A. Sim E. Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochemical Journal* 1994;297:441-5.
60. Kelly SL. Sim E. Arylamine N-acetyltransferase in Balb/c mice: identification of a novel mouse isoenzyme by cloning and expression in vitro. *Biochemical Journal* 1994;302:347-53.
61. Fretland AJ. Doll MA. Gray K. Feng Y. Hein DW. Cloning, sequencing, and recombinant expression of NAT1, NAT2, and NAT3 derived from the C3H/HeJ

- (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: functional characterization of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens. *Toxicology & Applied Pharmacology* 1997;142:360-6.
62. Hein DW. N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Toxicology Letters* 2000;112-113:349-56.
 63. Hein DW. Doll MA. Fretland AJ. Leff MA. Webb SJ. Xiao GH. Devanaboyina US. Nangju NA. Feng Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000;9:29-42.
 64. Cascorbi I. Brockmoller J. Mrozikiewicz PM. Müller A. Roots I. Arylamine N-acetyltransferase activity in man. *Drug Metabolism Reviews* 1999;31:489-502.
 65. Pacifici GM. Bencini C. Rane A. Acetyltransferase in humans: development and tissue distribution. *Pharmacology* 1986;32:283-91.
 66. Minchin RF. Kadlubar FF. Ilett KF. Role of acetylation in colorectal cancer. *Mutation Research* 1993;290:35-42.
 67. Badawi AF. Hirvonen A. Bell DA. Lang NP. Kadlubar FF. Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Research* 1995;55:5230-7.
 68. Ford HL. Pardee AB. Cancer and the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999;Suppl 32-33:166-72.
 69. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic pathology. Saunder 1997;Sixth edition n. pp132-75.
 70. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
 71. Buolamwini JK. Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery.

Current Pharmaceutical Design 2000;6:379-92.

72. Norman RI, Lodwick D. Medical cell biological. Churchill Livingstone 1999;pp148-68.
73. 鄭瑞棠 陳文旭：藥理學。華杏出版股份有限公司 台北 1991;pp1171-1245.
74. Calrk DP, Russell LD. Molecular Biology-made simple and fun. Cache River press 2000;pp25-46.
75. Leake R. The cell cycle and regulation of cancer cell growth. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996;784:252-62.
76. Koepp DM. Harper JW. Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 1999;97:431-4.
77. Wynford-Thomas D. Cellular senescence and cancer. *Journal of Pathology* 1999; 187:100-11.
78. Zi X. Grasso AW. Kung HJ. Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Research* 1998;58:1920-9.
79. Zi X. Feyes DK. Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clinical Cancer Research* 1998;4:1055-64.
80. Deguchi A. Imoto M. Umezawa K. Inhibition of G1 cyclin expression in normal rat kidney cells by inostamycin, a phosphatidylinositol synthesis inhibitor. *Journal of Biochemistry* 1996;120:1118-22.
81. Imoto M. Tanabe K. Simizu S. Tashiro E. Takada M. Umezawa K. Inhibition of cyclin D1 expression and induction of apoptosis by inostamycin in small cell

- lung carcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research* 1998;89:315-22.
82. Ghazizadeh M. Kawanami O. Araki T. Assessment of gene expression profile by cDNA microarray analysis. *Journal of Nippon Medical School = Nihon Ika Daigaku Zasshi* 2001;68:460-1.
83. Hegde P. Qi R. Abernathy K. Gay C. Dharap S. Gaspard R. Hughes JE. Snestrud E. Lee N. Quackenbush J. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 2000;29:548-50, 552-4, 556 passim..
84. Chen HW. Chen JJ. Tzeng CR. Li HN. Chang SJ. Cheng YF. Chang CW. Wang RS. Yang PC. Lee YT. Global analysis of differentially expressed genes in early gestational decidua and chorionic villi using a 9600 human cDNA microarray. *Molecular Human Reproduction* 2002;8:475-84.
85. Ko J. Na DS. Lee YH. Shin SY. Kim JH. Hwang BG. Min BI. Park DS. cDNA microarray analysis of the differential gene expression in the neuropathic pain and electroacupuncture treatment models. *Journal of Biochemistry & Molecular Biology* 2002;35:420-7.
86. Rho J. Altmann CR. Socci ND. Merkov L. Kim N. So H. Lee O. Takami M. Brivanlou AH. Choi Y. Gene expression profiling of osteoclast differentiation by combined suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray analysis. *DNA & Cell Biology* 2002;21:541-9.
87. Takagaki K. Katsuma S. Horio T. Kaminishi Y. Hada Y. Tanaka T. Ohgi T. Yano J. cDNA microarray analysis of altered gene expression in Ara-C-treated leukemia cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 2003;309:351-8.
88. Schofield D. Triche TJ. cDNA microarray analysis of global gene expression in sarcomas. *Current Opinion in Oncology* 2002;14:406-11.
89. Afshari CA. Nuwaysir EF. Barrett JC. Application of complementary DNA

- microarray technology to carcinogen identification, toxicology, and drug safety evaluation. *Cancer Research* 1999;59:4759-60.
90. Litchfield LT, Wilcoxon F: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1949; 113:99-118.
 91. Winter CA, Risley EA, Nuss GW: Carrageenin-induced edema in hindpaw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Antiinflammatory assay* 1962;111:544-47.
 92. Hunskaar S. Berge OG. Hole K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain* 1986;25:125-32.
 93. Hunskaar S. Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30:103-14.
 94. Shibata M. Ohkubo T. Takahashi H. Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38:347-52.
 95. Tjolsen A. Berge OG. Hunskaar S. Rosland JH. Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51:5-17.
 96. Vaccarino AL. Marek P. Liebeskind JC. Stress-induced analgesia prevents the development of the tonic, late phase of pain produced by subcutaneous formalin. *Brain Research* 1992;572:250-2.
 97. Rosland JH. Tjolsen A. Maehle B. Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 1990;42:235-42.
 98. 1. Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain* 1991;45:211-6.
 99. Hole K. Tjolsen A. The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor. *Pain* 1993;53:247-54.

100. Coderre TJ. Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *Journal of Neuroscience* 1992;12:3665-70.
101. Vinegar R. Schreiber W. Hugo R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1969;166:96-103.
102. Vinegar R. Truax JF. Selph JL. Johnston PR. Venable AL. McKenzie KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Federation Proceedings* 1987;46:118-26.
103. Hubbard AL. Moyes C. Wyllie AH. Smith CA. Harrison DJ. N-acetyl transferase 1: two polymorphisms in coding sequence identified in colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer* 1998;77:913-6.
104. Wick MJ. Hanna PE. Bioactivation of N-arylhydroxamic acids by rat hepatic N-acetyltransferase. Detection of multiple enzyme forms by mechanism-based inactivation. *Biochemical Pharmacology* 1990;39:991-1003.
105. Hein DW. Rustan TD. Bucher KD. Martin WJ. Furman EJ. Acetylator phenotype-dependent and -independent expression of arylamine N-acetyltransferase isozymes in rapid and slow acetylator inbred rat liver. *Drug Metabolism & Disposition* 1991;19:933-7.
106. Grant DM. Blum M. Beer M. Meyer UA. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Molecular Pharmacology* 1991;39:184-91.
107. Weber WW. Acetylation. *Birth Defects: Original Article Series* 1990;26(1):43-65.
108. Donaldson KL. Goolsby GL. Kiener PA. Wahl AF. Activation of p34cdc2

- coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth & Differentiation* 1994; 5:1041-50.
109. Calrk DP, Russell LD. Molecular Biology-made simple and fun. Cache River Press 2000;pp192-216.
 110. Fischer PM. Endicott J. Meijer L. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Progress in Cell Cycle Research* 2003;5:235-48,.
 111. Roy KK. Sausville EA. Early development of cyclin dependent kinase modulators. *Current Pharmaceutical Design* 2001;7:1669-87.
 112. Desagher S. Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 2000;10:369-77.
 113. Gross A. McDonnell JM. Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 1999;13:1899-911.
 114. Budihardjo I. Oliver H. Lutter M. Luo X. Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 1999;15:269-90.
 115. Zhang L. Yu J. Park BH. Kinzler KW. Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000;290:989-92.
 116. Vander Heiden MG. Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?. *Nature Cell Biology* 1999;1:E209-16.
 117. Salvesen GS. Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:10964-7.
 118. Barkett M. Xue D. Horvitz HR. Gilmore TD. Phosphorylation of IkappaBalpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:29419-22.
 119. Reuther JY. Baldwin AS Jr. Apoptosis promotes a caspase-induced

amino-terminal truncation of IkappaBalpha that functions as a stable inhibitor of NF-kappaB. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:20664-70.

Pharmacological studies of *Ampelopsis cantoniensis*

— An approach on antinociceptor, anti-inflammation,

N-acetyltransferase and HL-60 Cell Line

Tzu-Wei Tan

Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences

China Medical University

Ampelopsis cantoniensis (Hook. et Arn.) Planch. is a plant of *Ampelopsis* of Vitaceae. It grows in bushes or luxuriant forests mainly in low altitude zone of mountains throughout Taiwan. It has been often used as anti-inflammatory and analgesic drug in folk medicine, but there are few reports to address its pharmacological mechanisms. The crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* was partitioned with various solvents into *n*-hexane layer, chloroform layer, *n*-butanol layer and water layer. We attempted to explore the effect of *Ampelopsis cantoniensis* on its pharmacological properties.

In the formalin test, the crude extract and partitioned extract of *Ampelopsis cantoniensis* could significantly inhibited the licking response both on the central and peripheral response. It might be related to NMDA receptor. In the anti-inflammatory experiments, the crude extract and partitioned extract of *Ampelopsis cantoniensis* inhibited the release of inflammatory substances. The partitioned extract from larger polar layers (*n*-butanol and water layers) had much more significant inhibition (both on the formalin test and on anti-inflammatory experiment) than that of other layers.

The crude extract and partitioned extract of *Ampelopsis cantoniensis* significantly inhibited the activation of acetyltransferase both on the liver tissue and

blood cytosols of rats. In vivo experiments, *Ampelopsis cantoniensis* inhibited the acetylation of arylamines by administration either pretreated or post-treated with arylamines.

The crude extract of *Ampelopsis cantoniensis* arrested the G₀/G₁ phase of cell cycle on HL-60 cells. It inhibited the gene expression of cyclin E, cyclin D1, cyclin D2 and cyclin D3 on cell cycle HL-60. Based on the results from PCR and cDNA microarray, the cell apoptosis of HL-60 might be attributed to the activation of cytochrome C and cytochrome C1 in mitochondria, caspase 9, followed by activating caspase 3 after treatment with the crude extract of *Ampelopsis cantoniensis*.