

中國醫藥大學 醫學研究所

碩士候選人學位考試

論文題目

小檗鹼誘導的二胺螢素的氮-乙醯化於人類乳癌細胞株(MCF-7)中，所牽涉到的氮-乙醯轉移酵素活性作用及基因表現

Effects of N-acetyltransferase activity and gene expression involved in berberine-induced N-acetylation of 2-aminofluorene in human breast cell line (MCF-7)

指導教授：鍾景光 教授

共同指導教授：陳師慶 副教授

研究生：陳豐仁

中華民國九十三年五月二十日

一、中文摘要

氮-乙醯轉移酵素已被證實是催化異環式芳香胺形成致癌物的主要酵素。二胺螢素是一種人工合成的生物鹼，在生物體內經過氮-乙醯轉移酵素的乙醯化反應，可被轉換成著名的致癌物 - 二乙醯胺螢素。

小檗鹼是一種生物鹼，存在於許多臨床上重要的藥草，包括北美黃連、野黃連、奧勒岡葡萄和小檗等。很多論文已證實小檗鹼可抑制氮-乙醯轉移酵素的活性，但尚未有關於小檗鹼對人類乳癌細胞中氮-乙醯轉移酵素活性的發表。因此，我們使用小檗鹼來探討對人類乳癌細胞中氮-乙醯轉移酵素的活性抑制作用。

藉由二乙醯胺螢素及殘餘二胺螢素的量，我們以高效液相層析 (HPLC) 來測試氮-乙醯轉移酵素的活性。氮-乙醯轉移酵素蛋白的量及基因表現有否受到小檗鹼的影響則分別利用西方墨點法 (Western blot) 及聚合酵素連鎖反應 (PCR) 來檢測。

我們的研究結果顯示：(1) 小檗鹼以時間及劑量的雙重依賴性抑制氮-乙醯轉移酵素活性及蛋白的量。(2) 小檗鹼是氮-乙醯轉移酵素的不競爭 (uncompetitive) 抑制劑，可同時降低平衡常數 (K_m) 及最大反應速率 (V_{max})。(3) 小檗鹼可抑制人類乳癌細胞株氮-乙醯轉移酵素 mRNA 的基因表現。

二、英文摘要

N-Acetyltransferase (NAT) has been shown to be a major enzyme that catalyzes the heterocyclic aromatic amines to form the active carcinogens. 2-Aminofluorene(2-AF) is a synthetic arylamine which can be converted by N-acetyltransferase to a well-known animal carcinogen, called 2-acetylaminofluorene (2-AAF) .

Berberine is an alkaloid present in a number of clinically important medicinal plants, including *Hydrastis canadensis* (goldenseal), *Coptis chinensis* (coptis or goldenthread), *Berberis aquifolium* (Oregon grape), and *Berberis vulgaris* (barberry). Many papers have shown that berberine can inhibit the activity of N-acetyltransferase but there are no available information addressing berberine effects on the NAT activity of human breast cancer cell. Thus, we used berberine to test its inhibition of NAT activity in human breast cancer cell line (MCF-7).

The NAT activity was measured by a high performance liquid chromatography assaying for the amounts of 2-AAF and the remaining 2-AF. The protein of NAT and NAT mRNA gene expression were evaluated by Western blotting and RT-PCR methods separately.

Our results demonstrated that (1) Berberine can inhibit the activity and protein level of NAT in a dose-dependent and time-dependent manner. (2)

Berberine is an uncompetitive inhibitor of NAT that berberine can decrease the value of K_m and V_{max} . (3) Berberine can decrease NAT mRNA gene expression.

三、誌謝辭

幸運的考上醫學研究所後，面臨另一個困擾，就是不知該找哪一位指導教授。正在徬徨之時，剛巧在一次和昔日同學黃瓊瑤的言談中，得知微免科的鍾景光教授是化學致癌物和癌症研究的專家。一聽到這消息，儘管心中仍忐忑不安，依舊馬上拜訪鍾教授。一直到鍾教授答應當我的指導教授時，我才真的有成為一位研究生的感覺。老實說，如果沒有鍾老師的諄諄教誨，就沒有這一篇論文。在此，再一次的謝謝鍾老師。

特別感謝實驗室內有許多伙伴，欣如、宜珊、信賢、瓊瑤、志宏，如果沒有你們的鼓勵及幫忙，這份論文很難完成。另外還有家裡的兩個小毛頭，可愛的亮宇和品璇，謝謝你們努力的抑制身上的頑皮細胞。當然，家裡的賢妻 - - 晨逸，如果不是那杯杯溫柔滿溢的愛心咖啡，相信我早已不支倒地。

僅將這份論文和所有關心過的師長及伙伴們一同分享。

四、目錄	
論文題目	----- p1
一、中文摘要	----- p2
二、英文摘要	----- p3
三、誌謝辭	----- p5
四、目錄	----- p6
五、論文正文	
第一章：前言	----- p8
第一節：研究緣起	----- p8
第二節：研究目的	----- p9
第二章：文獻探討	----- p11
第三章：研究架構與研究設計	
第一節：研究設計	----- p13
第二節：研究架構	----- p15
第三節：研究假說	----- p22
第四章：研究材料及統計方法	
第一節：研究材料及資料收集方法	----- p23
第二節：研究變項及操作型定義	----- p24
第三節：資料處理與分析方法	----- p25
第五章：研究結果	

第一節：描述性統計分析	-----	p26
第二節：推論性統計分析	-----	p45
第六章：討論研究		
第一節：結果討論	-----	p47
第二節：其他相關性討論	-----	p48
第三節：研究限制	-----	p53
第七章：結論與建議		
第一節：結論	-----	p54
第二節：建議	-----	p55
六、 參考文獻及附錄		
第一節：參考文獻	-----	p56
第二節：附錄（專有名詞對照）	-----	p65
七、 簡單自述	-----	p66

五、論文正文

第一章：前言

第一節：研究緣起

從事一般外科工作多年，常接觸到癌症的患者，雖然說目前癌症的治療，已不復以往般的令人沮喪，但仍有少數患者無法以手術來完全切除，而此時改以化學藥物治療，往往也不盡理想。因此開發療效更佳的藥物，是很多人心中的希望。在如此的想法的推動下，報考本校的醫學研究所。

目前乳癌在治療上仍存在一些瓶頸，關於乳癌的成因，也有很多種因素，例如：基因突變、酒精、輻射、遺傳、賀爾蒙以及飲食等。環境中存在的許多致癌物(carcinogens)，經由飲食等方式進入人體，在人體中導致癌症的產生。小檗鹼(Berberine)在研究上已經證實可以抑制癌症的生長，包括大腸癌、膀胱癌等。其中關於乳癌者，則付之闕如。透過小檗鹼的研究，也許可以就乳癌的治療上，提供另類的思考。

第二節：研究目的

根據台灣地區 91 年十大癌症死因比較表，乳癌佔 35%，居第四位，在女性也佔第四位，僅次於肺癌、肝癌及結腸直腸癌。而根據台灣地區民國 81 到 86 年的十大癌症死因年齡別發生率，我們可以發現乳癌和其他癌症最不同之處，在於它的年輕化。其最高峰在 45 歲左右，此時正是人生責任最重之時，正開始養兒育女。一旦遭逢巨變，影響的層面很大，多少家庭因之破碎。

目前關於乳癌的治療採取合併治療方式包括手術治療、賀爾蒙治療、放射線治療及化學治療等。五年存活率依乳癌的分期而定，零期乳癌為 99~100%，一期乳癌為 90%，二期乳癌為 70%，三期乳癌為 40%，到了第四期乳癌則只剩下 10%。雖然早期診斷及治療是提高存活率的不二法門，但臨床上仍有許多無法做到早期診斷及治療的案例，偶爾也會有治療失敗的情形。因此不拘泥於既有之治療方式，努力開發更新更好的方法，應該是所有醫界成員應努力的方向。

本研究以人類乳癌細胞株 (MCF-7) 為題、小檗鹼、二胺螢素【2-aminofluorene (2-AF)】為材料，分別以不同時間及不同濃度的小檗鹼和不同濃度的二胺螢素，藉由高效液相層析 (HPLC) 來研究小檗鹼如何影響掌控二胺螢素代謝成二乙醯胺螢素【2-acetylaminofluorene (2-AAF)】的氮-乙醯轉移酵素【N-acetyltransferase (NAT)】活性。並利用西方墨點法 (Western

blot) 及聚合酵素連鎖反應 (PCR), 分別檢測氮-乙醯轉移酵素蛋白的量及基因表現有否受到小檉鹼的影響。

第二章：文獻探討

早在西元 1775 年，英國的一位外科醫師 Percival Pott 發現煙囪清潔工人有較高的陰囊癌發生率 (19)。一百四十年後 (1915)，日本 Yamagiva 及 Ichikawa 將柏油塗在兔子身上，使兔子長出皮膚癌 (20)。1922 年，Passey 用乙醚抽出煤煙中的物質，並將之塗在小老鼠身上，結果小老鼠也長出皮膚癌 (21)。由上述幾位先賢的研究可知，對環境中致癌因子的研究，一直未曾間斷。

關於小檗鹼 (Berberine) 和癌症的關係 在以往的文獻中，以 PubMed 來搜尋人類 berberine 及 cancer，可以找到約 38 篇文章。我們可以發現小檗鹼已被用於研究人類的大腸癌 (1、5、9)、白血病 (2、8)、腦癌 (3)、肺癌 (4)、膀胱癌 (6)、肝癌 (7、10、12)、骨髓癌 (11)、畸胎癌 (13) 等。小檗鹼對於氮-乙醯轉移酵素的抑制作用，在下列癌症細胞中都具有劑量及時間的正相關性，包括人類大腸癌細胞株 (colo 205) (5)、人類白血病細胞株 (HL-60) (8)、人類腦瘤細胞株 (G9T/VGH and GBM 8401) (3)、人類膀胱癌細胞株 (T24) (6) 等。在酵素動力學方面，小檗鹼則已被發現在下列癌症細胞中都具有同時降低 K_m 和 V_{max} 的作用，包括人類大腸癌細胞株 (colo 205) (5)、人類白血病細胞株 (HL-60) (8)、人類腦瘤細胞株 (G9T/VGH and GBM

8401)(3)等。但尚未有人用小檗鹼來研究乳癌細胞氮-乙醯轉移酵素蛋白的活性及基因表現的抑制作用。

搜尋 berberine 及 breast cancer，則僅有兩篇。其中有一篇關於黃連的作用(14)，這是 Xiao-Kui Li 於西元 2000 年在紐約 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center 發表於 Molecular Pharmacology 的文章。根據其研究得知，黃連的主成分雖是小檗鹼，但作者所用的黃連萃取物中，小檗鹼也只佔二分之一，但黃連的細胞抑制作用卻遠高於小檗鹼，因此作者認為黃連應該還含有其他的成分，比小檗鹼更具腫瘤抑制作用，這可作為將來更進一步的研究題材。

第三章：研究架構與研究設計

第一節：研究設計

環境中的危險因子可引起人類約70 %的癌症(15)，其中約70~90 %和接觸化學致癌物質有關。本研究以化學致癌物中的芳香胺類化合物(arylamine)：二胺螢素(2-AF)為代表。二胺螢素是一種很強的化學致癌物，當其進入不同種的動物體內，會經由體內其他酵素代謝，最後形成活性很強的致癌物(ultimate carcinogen)，再和目標器官細胞內的DNA形成DNA 添加物(DNA adduct)，造成目標器官的癌化(16,17,18)。

本研究設計主要在檢測小檉鹼能否影響人類乳癌細胞氮-乙醯轉移酵素的活性及人類乳癌細胞胞質液中氮-乙醯轉移酵素的活性，來探討小檉鹼是否能經由氮-乙醯轉移酵素活性和基因表現的抑制，來達到治療及預防乳癌的目的。

我們利用不同濃度的小檉鹼試劑(0, 0.8, 8, 80, 160, 320 μM)，在相同的時間下，來研究二胺螢素及二乙醯胺螢素(2-AAF)如何受到不同濃度的小檉鹼調控。找出適當的濃度後，再固定濃度(160 μM)，使用不同的時間(6、12、18、24 hr)來找出小檉鹼作用和時間的關連性。

至於酵素動力學方面，則將濃度及時間兩變數固定(分別為160 μ

M及24 hr) , 利用不同濃度的二胺螢素(0.45、 0.90、 1.35、 1.80、 2.25及2.70 μM) , 用高效液相層析來算出二胺螢素乙醯化後 , 二胺螢素及二乙醯胺螢素兩者的量 , 利用速率及受質的倒數來做酵素反應的動能圖 , 再利用此動能圖來找出其間作用的模式。最後再分別固定濃度及時間兩變數 , 利用西方墨點法及聚合酵素連鎖反應 , 分別檢測氮-乙醯轉移酵素蛋白的量及基因表現有否直接的受到小檉鹼的影響。

第二節：研究架構

A. 小檗鹼對人類乳癌細胞 (MCF-7) 中氮-乙醯轉移酵素的活性效應的影響：

我們採用以下的步驟：

取出培養於 RPMI-1640 培養基(含 1 mL RPMI 培養基, glutamine, 10 %胎牛血清) 的人類乳癌細胞株(MCF-7), 接種於 24 well 盤中, 每一 well 含有 1×10^6 個細胞, 加入 11.25 μ M 的二胺螢素 (2-AF), 再分別加入不同濃度的 berberine 試劑, 包括 0.8、8、80、160 及 320 μ M 等不同的濃度, 另一組則加加等藥物體積的 DMSO 為 control 組。置於 37、5% CO₂ 的培養箱中培養, 培養 24 小時後, 收集全部細胞, trypsin 打下細胞, PBS 清洗 2 次後, 加入等量 PBS, 以離心機用 1500 轉離心 10 分鐘, 取出上清液, 以 95% ethyl acetate: 5 % methanol 萃取兩次, 用 speed vacuum 蒸乾, 將殘餘物再溶於 50 μ L 的 methanol, 取 20 μ L 注入 HPLC 來決定 2-AF 及 2-AAF 的量。實驗組及控制組均作 3 次。

B . 在活細胞中的時間效應，我們採用以下的步驟：

取出培養於 RPMI -1640 培養基(含 1 mL RPMI 培養基, glutamine, 10 %胎牛血清)的人類乳癌細胞株(MCF-7)，接種於 24 well 盤中，每一 well 含有 1×10^6 個細胞，加入 11.25 μ M 的二胺螢素 (2-AF)，再分別加入 160 μ M 的小檗鹼試劑，另一組則加加等藥物體積的 DMSO 為 control 組。置於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培養箱中培養，分別培養 6，12，18 及 24 小時後，收集全部細胞，trypsin 打下細胞，PBS 清洗 2 次後，加入等量 PBS，以離心機用 1500 轉離心 10 分鐘，取出上清液，以 95% ethyl acetate: 5 % methanol 萃取兩次，用 speed vacuum 蒸乾，將殘餘物再溶於 50 μ L 的 methanol，取 20 μ L 注入 HPLC 來決定 2-AF 及 2-AAF 的量。實驗組及控制組均作 3 次。

C. 不同濃度的二胺螢素下，小檗鹼對人類乳癌細胞中氮-乙醯轉移酶的活性效應的影響：

取出培養於 RPMI-1640 培養基(含 1 mL RPMI 培養基, glutamine, 10 %胎牛血清)的人類乳癌細胞株(MCF-7)，接種於 24 well 盤中，每一 well 含有 1×10^6 個細胞，分別加入 11.25、22.5 μM 及 45 μM 的二胺螢素 (2-AF)，再分別加入 160 μM 的小檗鹼試劑，另一組則加等藥物體積的 DMSO 為 control 組。置於 37 °C、5% CO_2 的培養箱中培養，培養 24 小時後，收集全部細胞，trypsin 打下細胞，PBS 清洗 2 次後，加入等量 PBS，以離心機用 1500 轉離心 10 分鐘，取出上清液，以 95% ethyl acetate: 5 % methanol 萃取兩次，用 speed vacuum 蒸乾，將殘餘物再溶於 50 μL 的 methanol，取 20 μL 注入 HPLC 來決定 2-AF 及 2-AAF 的量。實驗組及控制組均作 3 次。

D. 在人類乳癌細胞中，小檗鹼在酵素動力學方面，和氮-乙醯轉移酵素的作用關係為何？

我們採用以下的步驟：

取出培養於 RPMI -1640 培養基(含 1 mL RPMI 培養基, glutamine, 10 %胎牛血清)的人類乳癌細胞株(MCF-7)，接種於 12 well 盤中，每一 well 含有 1×10^6 個細胞，分別加入 2.70, 2.25, 1.80, 1.35, 0.90, 及 0.45 μM 的二胺螢素 (2-AF)，再分別加入 160 μM 的小檗鹼試劑，另一組則加等藥物體積的 DMSO 為 control 組。置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱中培養，培養 24 小時後，收集全部細胞，加 2ml 的 ethyl acetate: methanol (95% :5 %)，搖晃震盪後靜置 10 分鐘，收集上層溶液，用 speed vacuum 蒸乾，將殘餘物再溶於 50 μL 的 methanol，取 20 μL 注入 HPLC 來決定 2-AF 及 2-AAF 的量。實驗組及控制組均作 3 次。

E. 在人類乳癌細胞中，小檗鹼是否真的降低氮-乙醯轉移酵素的量，抑或是透過其他方式，來達到我們所見的結果？

我們採用西方墨點法，步驟如下：

取出培養於 RPMI-1640 培養基(含 1 mL RPMI 培養基, glutamine, 10 %胎牛血清)的人類乳癌細胞株(MCF-7)，培養至足夠細胞後(1×10^8 cells), 接種於 6 well 盤中, 每一 well 含有 2×10^6 個細胞, 加入 11.25 μ M 的二胺螢素 (2-AF), 再分別加入 0, 8, 80, 160 及 320 μ M 的小檗鹼試劑, 另一組則加等藥物體積的 DMSO 為 control 組。置於 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱中培養, 培養 24 小時後, 收集全部細胞, trypsin 打下細胞, PBS 清洗 2 次後, 加入等量 PBS, 以離心機用 1500 轉離心 10 分鐘, 加入 RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA), 1 mM ethylene glycol - bis (aminoethylether) - tetra-acetic acid (EGTA), 0.5 mM dithiothreitol, 1% NP-40, 0.3% deoxycholate, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))。劇烈震盪後, 置於冰上 30 分鐘處理樣品, 轉移至 1.5 mL 的 eppendorf, 再經離心 13,000 rpm 15 分鐘, 取上清液, 即為總蛋白質。跑 SDS page gel, 以 anti-NAT antibody 染色, 靜置至隔日, 以 0.05 % Tween/PBS 清洗, 加入 secondary antibody 染, 再壓片呈色。

F. 不同濃度的小檗鹼試劑能否影響人類乳癌細胞株中氮-乙醯轉移酵素 mRNA 的基因表現：

步驟如下：

取出人類乳癌細胞株，加不同濃度的小檗鹼（0、8、80、160 及 320 μM ），培養 24 小時，以 Qiagen RNeasy Mini Kit 萃取全部 RNA (Hsia 2002 and Cu 2003)。取 1.5 μg total RNA，加入 0.5 μg oligo-dT primer，再加入含 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 的水至 12.5 μl ，加熱至 70 $^{\circ}\text{C}$ ，持續 10 分鐘，置於冰上冷卻至少一分鐘，再加各 7.5 μL 的溶液(包括 2 μL 的 100mM DDT、1 μL 的 dNTP、0.5 μL RT、4 μL 的 5X buffer)，靜置於 42 $^{\circ}\text{C}$ ，一小時後，取 1 μL 的 cDNA，加 24 μL 的溶液(包括 19.05 μL 的 ddH₂O、2.5 μL 的 10X buffer、0.75 μL 的 MgCl₂、0.5 μL dNTP mix、0.5 μL 的 primer1 and 2、0.2 μL 的 Taq DNA polymerase)，置於冰上冷卻至少一分鐘，再放置於 94 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 分鐘，進行 PCR 的 35 個週期：(包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分鐘，95 $^{\circ}\text{C}$ 1 分鐘，55 $^{\circ}\text{C}$ 60 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 分鐘)，放置於 72 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 分鐘，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入 loading buffer 5 μL ，再跑 1.5% agarose electrophoresis，最後以 ethidium bromide 染色後，在 UV 燈下照相。

註：The sequence of primers as follows:

B-MDIEA-NAT1, 5' -CACCCGGATCCGGGATCATGGACATTGAAGC-3' ,
nt 435-454 GenBank accession number X17059;

VPKHGD-X-NAT1, 5' -GGTCCTCGAGTCAATCACCATGTTTGGGC-3', nt
1295-1278, GenBank accession number X17059;

FPI-NAT2, 5' -CTAGTTCCTGGTTGCTGGCC-3', nt 79-78, GenBank
accession number NM-000015;

RPI-NAT2, 5' -TAACGTGAGGGTAGAGAGGA-3', nt 1073-1054,
GenBank accession number NM-000015;

Act b1, 5' -GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3', nt 94-114, GenBank
accession number NM-001101;

Act b2, 5' -CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3', nt 446-422,
GenBank accession number NM-001101 (Blum et al.,
1990; Ebisawa and Deguchi, 1991; Ponte et al.,
1984)

第三節：研究假說

小檗鹼 (Berberine) 對於氮-乙醯轉移酵素 (N-acetyltransferase) 的抑制作用，在我們實驗室已由下列癌症細胞中得到證實，包括人類大腸癌細胞株 (colo 205)(5)、人類白血病細胞株 (HL-60)(8)、人類腦瘤細胞株 (G9T/VGH and GBM 8401)(3)、人類膀胱癌細胞株 (T24)(6) 等。因而我們推測在人類乳癌細胞 (MCF-7)，小檗鹼可能也具有類似的作用 (氮-乙醯轉移酵素的抑制作用)，進一步要證實小檗鹼直接降低氮-乙醯轉移酵素的蛋白質及 mRNA 的量方面，應該皆具有劑量及時間的正相關性，以及可能也是一種不競爭性抑制劑，可同時降低 K_m 和 V_{max} 。

第四章：研究材料及統計方法

第一節：研究材料及資料收集方法

實驗材料購自美國P-L Biochemical's Inc. (Milwaukee, WI) 公司者有Acetyl Co-A。購自美國K and K laboratories (Plainview, NY)者有2-Aminofluorene(2-AF)及2-acetylaminofluorene(2-AAF)。購自Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)者有Leupeptin、Tris-HCl、Tris-chloroacetic acid、Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、Bovine serum albumin(BSA)。購自美國Gibco laboratories (Grand Island, NY)公司者有RPMI 1640 culture medium、Fetal bovine serum、Hanks balanced salts、Antibiotics (Kanamycin, Penicillin, Streptomycin)、Glutamine。人類乳癌細胞株(MCF-7)則購自新竹食品科學研究所。

在實驗中使用的高效液相層析儀 (HPLC) Beckman (Programmable Solvent Module 126; Diode Array Detector Module 168)、西方墨點法購自汎泰儀器公司，聚合酵素連鎖反應則購自QIAGEN。

第二節：研究變項及操作型定義

本實驗的研究變項包括小檗鹼的濃度、時間，以及二胺螢素的濃度等。此三個變數，分別加予適當的控制(操縱一變因，固定一些變因保持不變，看看另一變因即反應的變因怎樣改變)時，才能得到可靠而有再現性的結果。

在實驗中使用高效液相層析儀 (HPLC) Beckman (Programmable Solvent Module 126 ; Diode Array Detector Module 168) , 實驗先由已知濃度的標準品溶液，算出峰線面積，再求得檢體峰線面積，兩者比較後，進而算出檢體的含量。測定NAT 活性的條件如下：1. C18 reversed - phase column (Spherisorb 4.6 , 250 mm) . 2. Solvent system : 20 mM KH₂PO₄ (PH4.5) / CH₃CN (53: 47) . 3. Wave1ength : 280 nm。

西方墨點法：類似三明治夾層的構造中，包括海綿片上放上3M濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF轉漬膜 (100 % 甲醇浸15秒、再於Transfer buffer浸1分鐘以上)、3M濾紙，最後再放上一片海棉墊片等。此時的條件設定為100 v、400 mA、1.5小時，進行蛋白質轉漬步驟。最後加入氮-乙醯轉移酵素的抗體，隔夜洗淨，再染有螢光的二次抗體，再呈色。

第三節：資料處理與分析方法

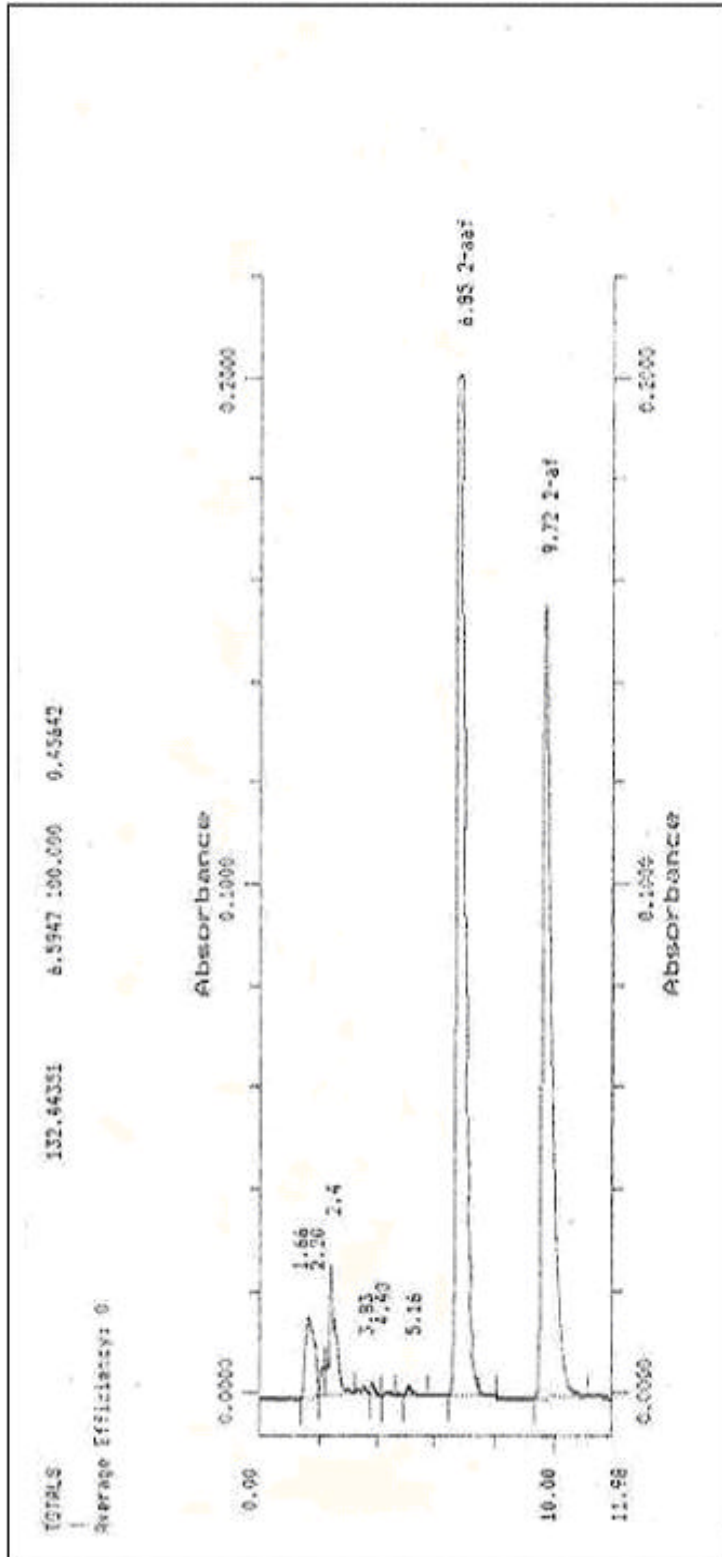
關於濃度及時間兩變數，我以 Unpaired Student t-test 來作分析。而酵素動力學方面則使用線性迴歸，做出 Lineweaver-Burk double reciprocal plot。所有統計及畫圖的工作，全使用統計軟體 SigmaPlot 2000。

第五章：研究結果

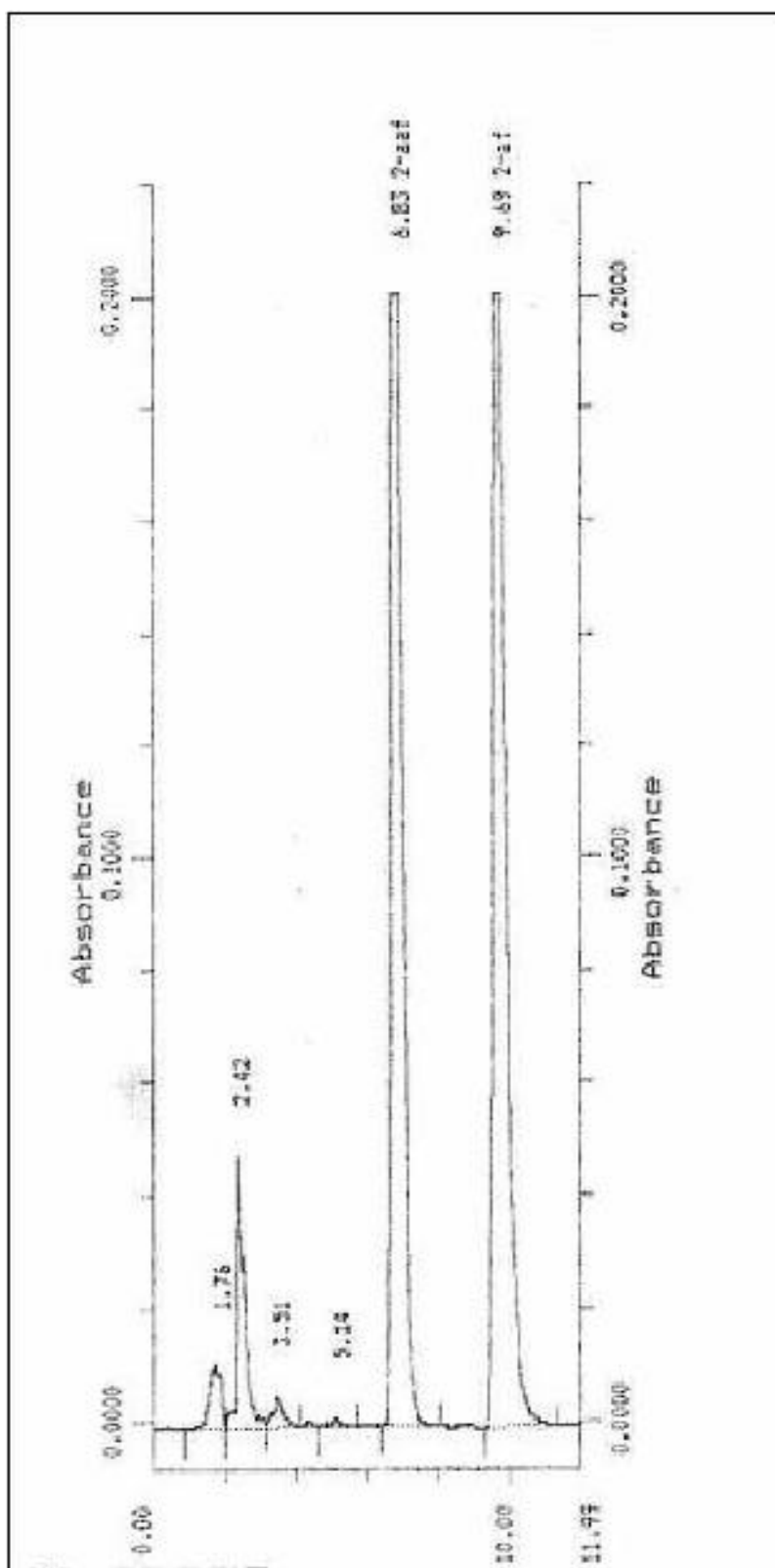
1. 第一節：描述性統計分析

對於小檗鹼在不同的濃度下，如何影響人類乳癌細胞(MCF-7)的氮-乙醯轉移酶的活性，我們可由圖 1 及圖 2 中看出。隨著小檗鹼濃度的增加，二胺螢素的氮 - 乙醯化作用也隨之降低。對照組 (berberine 濃度為 0) 所產生的二乙醯胺螢素濃度為 $9.45 \pm 1.74 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}$ ，由 $0.8 \mu\text{M}$ 到 $320 \mu\text{M}$ 的小檗鹼，二乙醯胺螢素濃度由 $8.76 \pm 1.14 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}$ 減少為 $0.96 \pm 0.20 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}$ ，二胺螢素的氮 - 乙醯化作用被抑制了 7 到 90%。

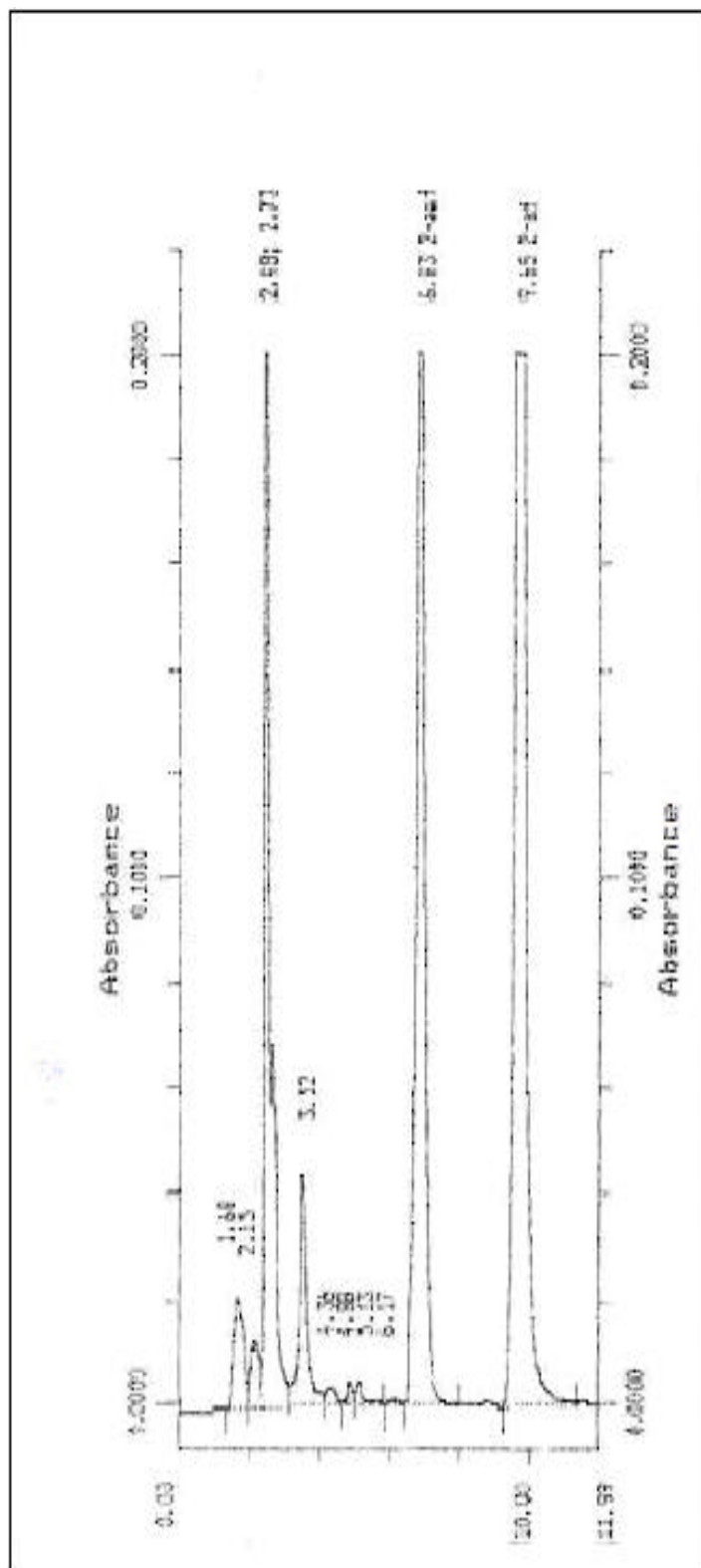
1 (a) 對照組



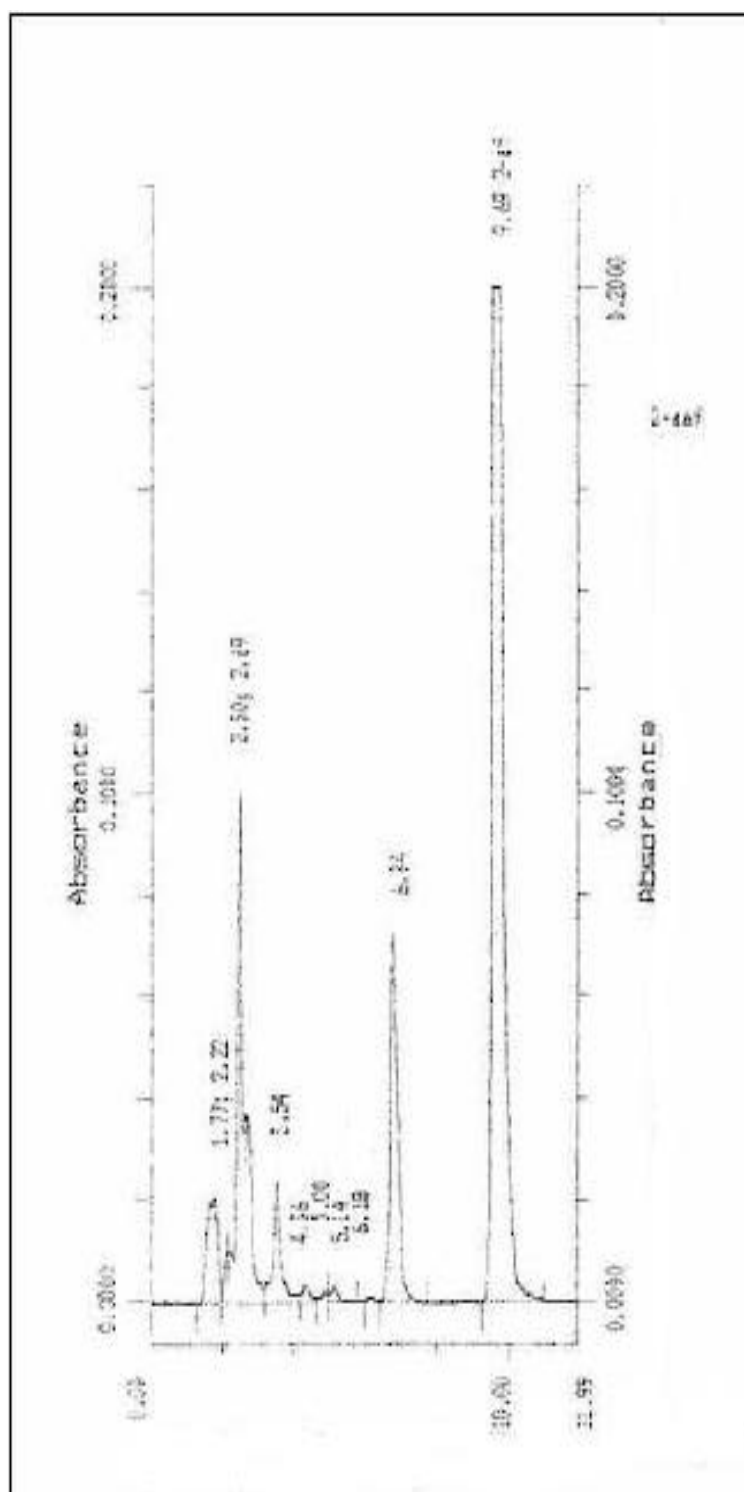
1 (b) . 0.8 μ M berberine



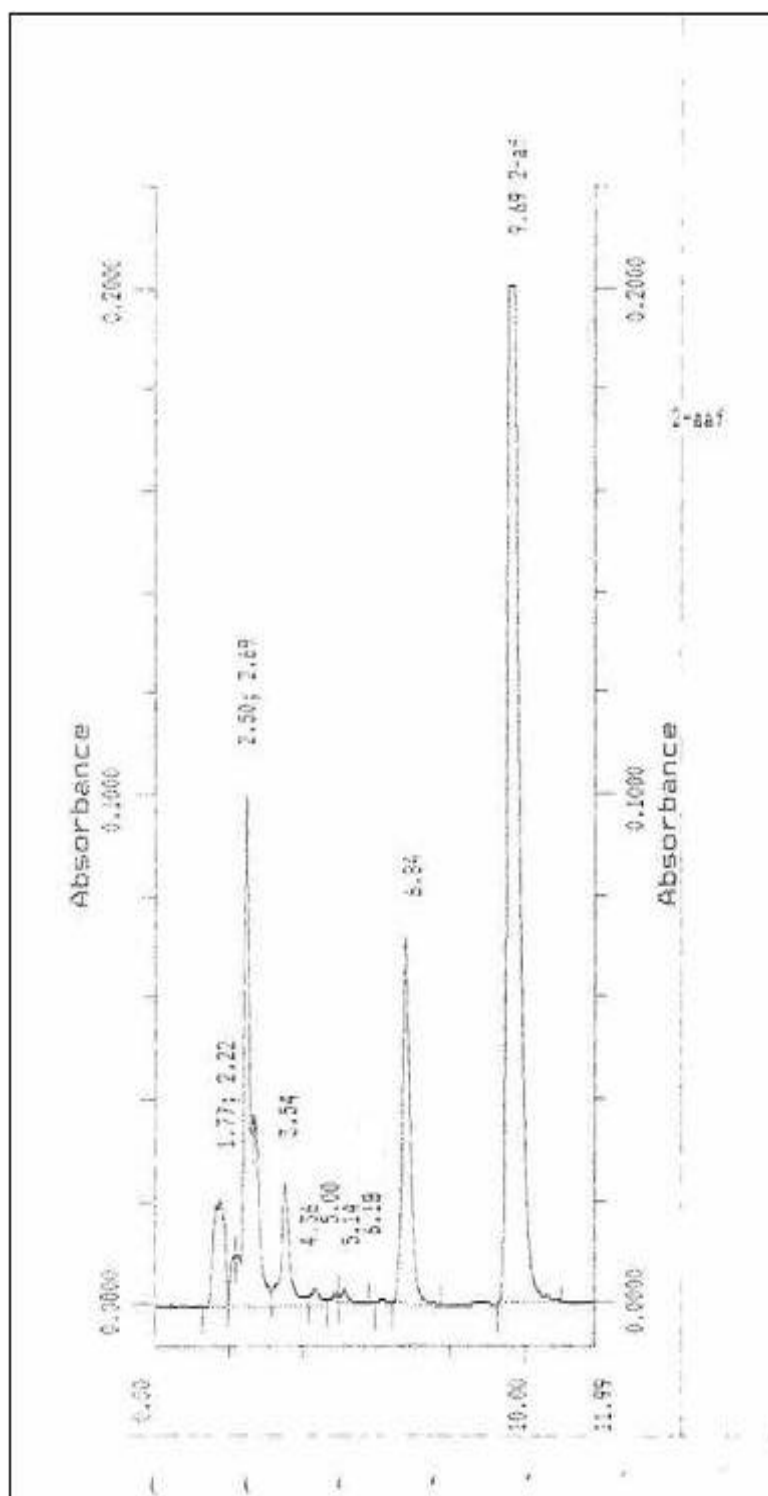
1 (c) . 8 μ M berberine



1 (d) . 80 μ M berberine



1 (e) . 160 μ M berberine



1 (f) . 320 μ M berberine

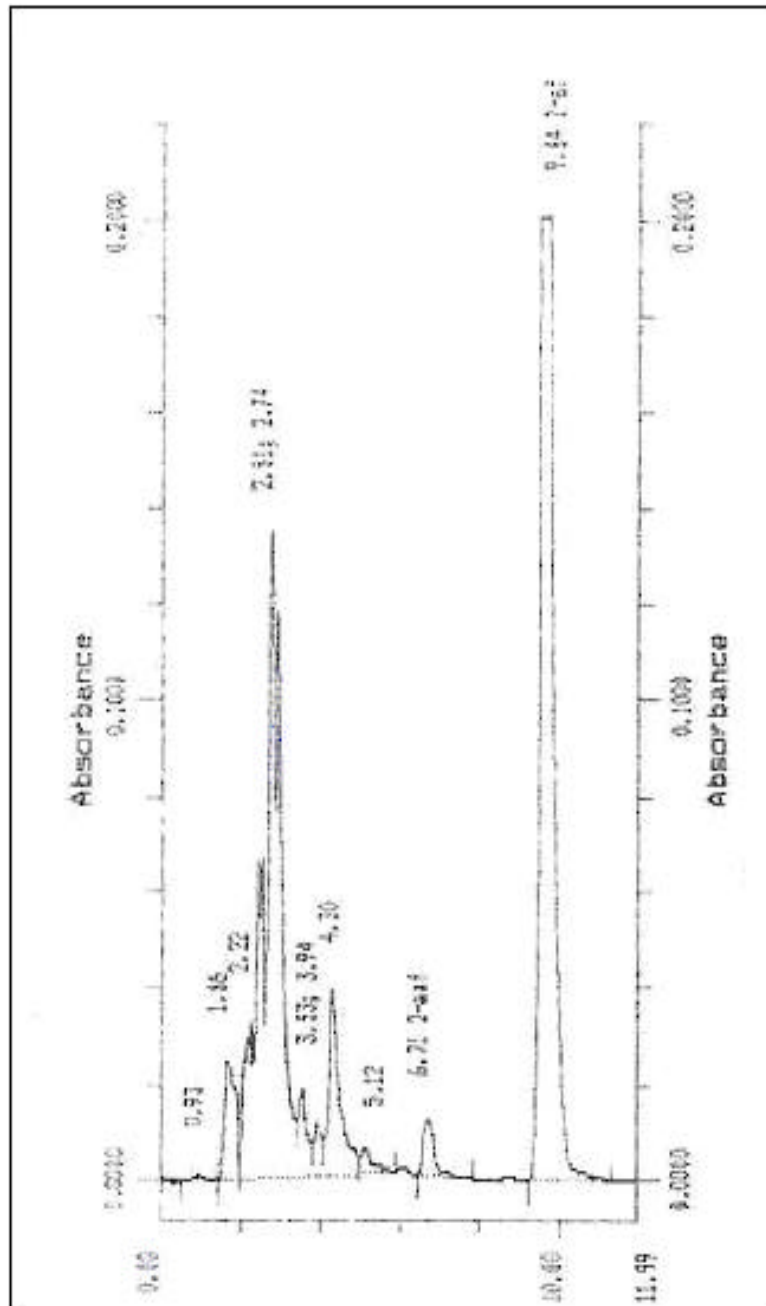


圖 1. 24 小時時，人類乳癌細胞 (MCF-7) 中，不同濃度的小檗鹼對二胺螢素乙醯化反應的影響。二胺螢素及其代謝物二乙醯胺螢素的量，皆以高效液相層析 (HPLC) 來測量。(1-a: control, 1-b: 0.8 μ M, 1-c: 8 μ M, 1-d: 80 μ M, 1-e: 160 μ M, 1-f: 320 μ M 小檗鹼) 圖形的點皆為三次測量的平均值。

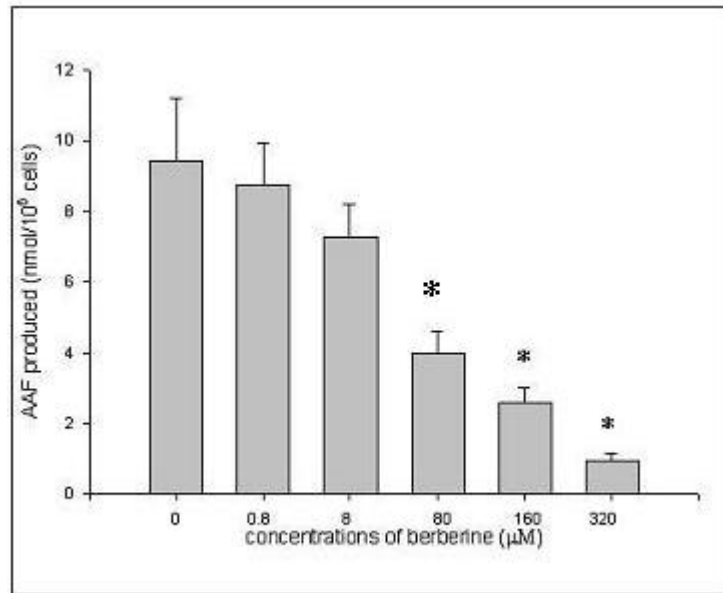


圖 2. 24 小時時，人類乳癌細胞(MCF-7)中，不同濃度的小檗鹼對二乙醯胺螢素產生反應的作用。二乙醯胺螢素的量以高效液相層析(HPLC)來測量。每一點皆為三次測量的平均值。數值以平均值 ± 標準差來表示 (n = 3)。* 代表 p 值 < 0.05。

在時間方面,由圖 3 可知,隨著時間的增加,二乙醯胺螢素(2-AAF)的濃度也一直增加,此作用一直持續至少 24 小時。在 6 到 24 小時這一段時間,我們發現 160 μ M 的 berberine 明顯造成 2-AAF 的氮乙醯化作用的抑制。在 6 小時時,2-AAF 濃度由 1.59 ± 0.27 nmol/ 10^6 cells 減少為 0.34 ± 0.09 nmol/ 10^6 cells;在 24 小時時,2-AAF 濃度由 9.47 ± 1.56 nmol/ 10^6 cells 減少為 2.86 ± 0.54 nmol/ 10^6 cells。由上述可知,2-AAF 的氮乙醯化作用被抑制了 70 到 79%。

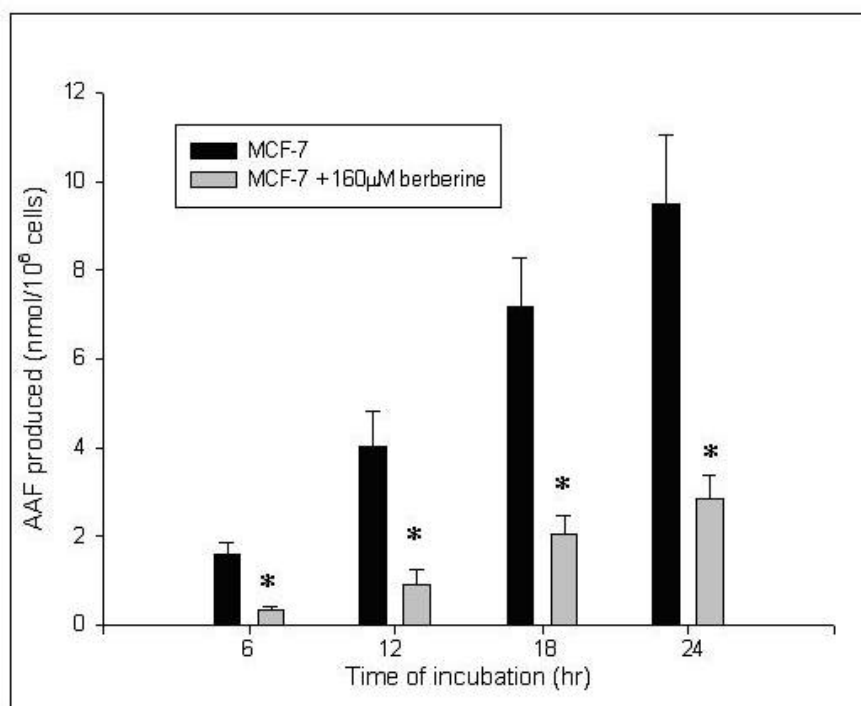


圖 3. 160 μ M 的小檗鹼，於人類乳癌細胞(MCF-7)中，在不同時間下，對產生二乙醯胺螢素的作用。二乙醯胺螢素的量以高效液相層析(HPLC)來測量。每一點皆為三次測量的平均值。數值以平均值 \pm 標準差來表示 (n = 3)。* 代表 p 值 < 0.05。

我們再以 160 μM 的 berberine (固定濃度), 24 小時的時間 (固定時間), 以不同濃度的 2-AF (11.25、22.5 及 45.0 μM) 來做, 由圖 4 我們發現 AAF 的產量分別減少了 56 %、59 % 及 59%。

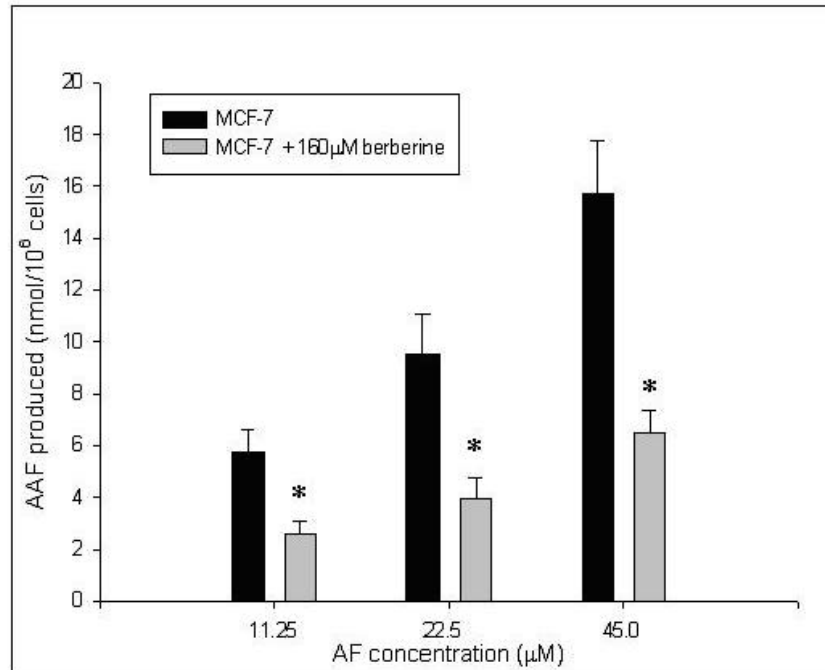


圖 4. 24 小時時，160 μM 的小檗鹼，於人類乳癌細胞(MCF-7)中，在不同濃度的二胺螢素下，對產生二乙醯胺螢素的作用。二乙醯胺螢素的量以 高效液相層析(HPLC)來測量。每一點皆為三次測量的平均值。數值以平均值 \pm 標準差來表示 ($n = 3$)。* 代表 p 值 < 0.05 。

酵素動力學的平衡常數方面(圖 5),不同濃度的 2-AF (2.70, 2.25, 1.80, 1.35, 0.90, 0.45 μM)被加入細胞質中,在小檉鹼及無小檉鹼 (160 μM)的情況下,我們發現,以 $1/\text{AF}$ 為 X 軸, $1/V$ 為 Y 軸做線性迴歸圖時,形成兩條平行線。當 160 μM 的小檉鹼被加入時, K_m 及 V_{max} 分別減少了 54% 到 50%。

Fig.5

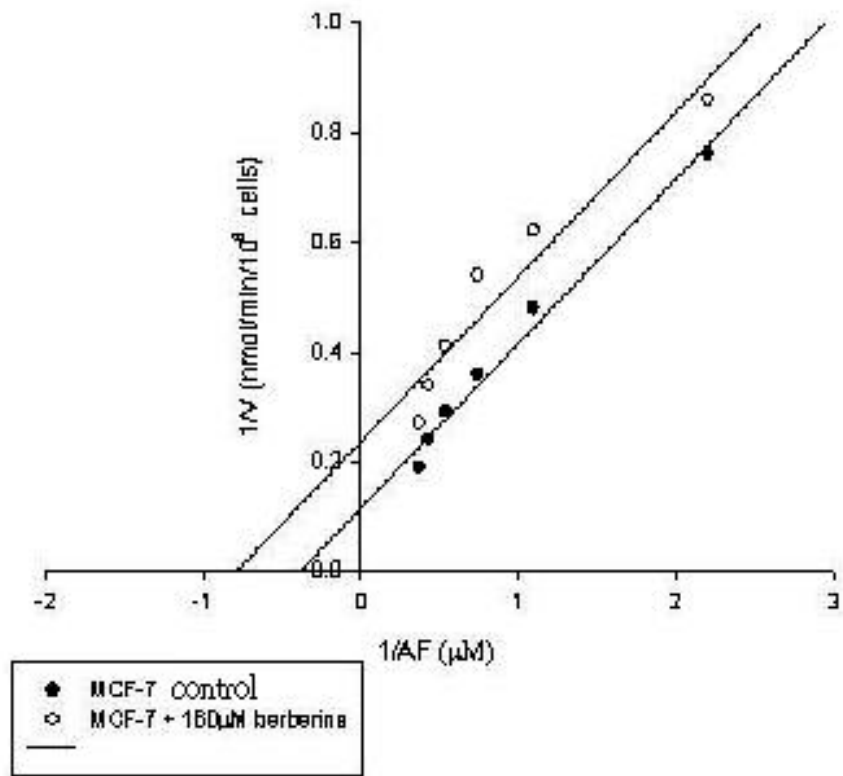


圖 5. 人類乳癌細胞(MCF-7)中，氮-乙醯轉移酵素的 Lineweaver-Burk 酵素動力線性迴歸圖。使用不同濃度的二胺螢素 (0.45, 0.90, 1.35, 1.80, 2.25 and 2.70 μM)的倒數為 x 軸，以反應速度的倒數為 y 軸畫出的線性迴歸圖。

氮-乙醯轉移酵素的量受到影響的程度是如何？我們由圖 6 的西方墨點法分析，發現氮-乙醯轉移酵素的量隨著小檗鹼濃度的增加，氮-乙醯轉移酵素的量也隨之降低。而由圖 7 我們發現，當 $160\ \mu\text{M}$ 的小檗鹼被加入時，隨著時間的增加，氮-乙醯轉移酵素的量也顯著隨之降低。

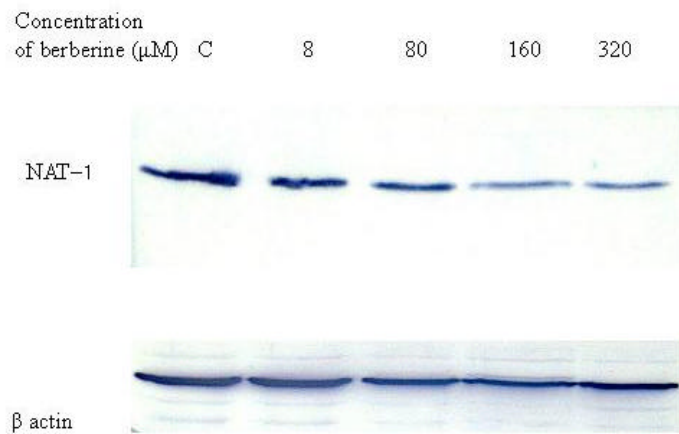


圖 6，人類乳癌細胞(MCF-7)中，加入不同濃度的小檗鹼，於 24 小時時，產生氮-乙醯轉移酵素的量的作用。

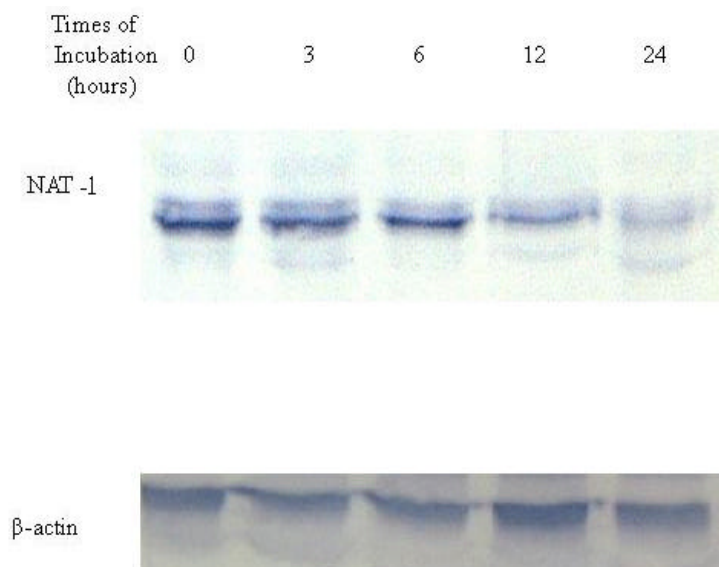


圖 7，人類乳癌細胞(MCF-7)中，加入 160 μ M 濃度的小檗鹼，於不同的時間下，產生氮-乙醯轉移酵素的量的作用。

由圖 8 的聚合酵素連鎖反應圖，我們發現氮-乙醯轉移酵素 mRNA 的基因表現，隨小檉鹼濃度的增加而依次降低，由 8、80、160 至 320 μM 的小檉鹼，氮-乙醯轉移酵素 mRNA 依次下降了 2 %、23 %、35 % 及 56%。

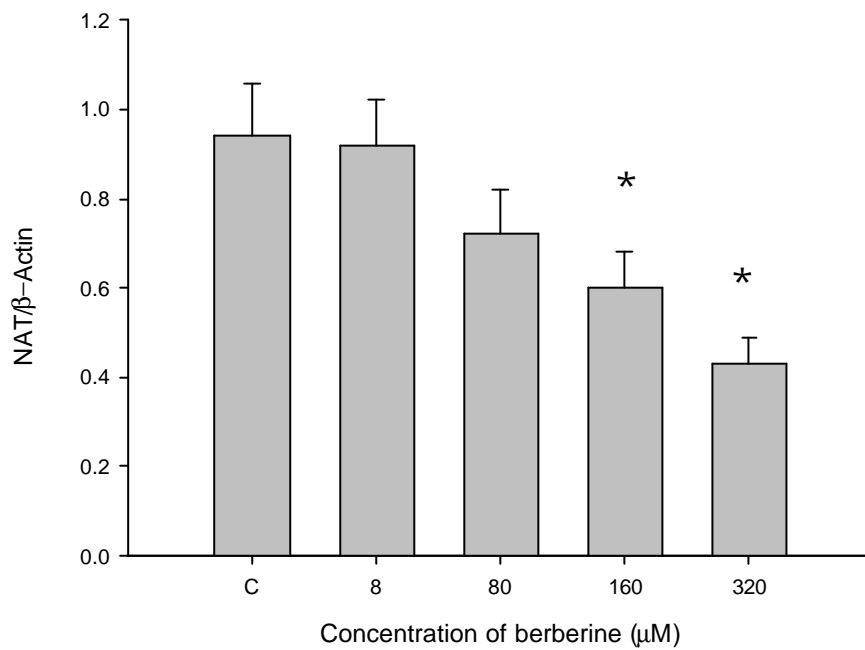
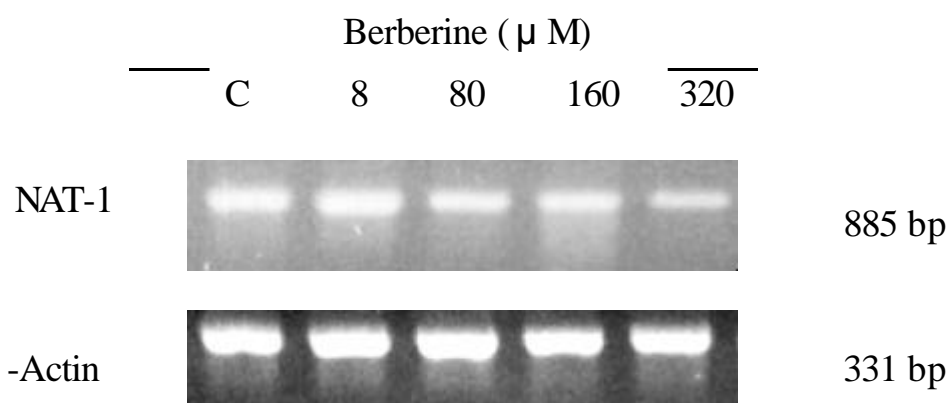


圖 8、聚合酵素連鎖反應圖：在人類乳癌細胞株，培養 24 小時，加不同濃度的小檗鹼，對 NAT-1 的量的作用。(* 表示 $p < 0.05$)

第二節：推論性統計分析

我們可由圖 1 及圖 2 中看出。隨著小檉鹼濃度的增加，二胺螢素的氮乙醯化作用也隨之降低，但使用 Unpaired Student t-test，我們發現只有 80、160 及 320 μM 的小檉鹼才具有統計學上的意義 ($p < 0.05$)。而低濃度 (0.8 及 8 μM) 的小檉鹼雖然似乎可以降低二胺螢素的氮乙醯化作用，但因 $p > 0.05$ ，故不具統計學上的意義。

另外，由圖 2 也可看出 160 μM 的小檉鹼可使二乙醯胺螢素的產量減少 50% 以上。因此，我們以 160 μM 的小檉鹼為標準 (固定濃度)，再研究不同的時間對二胺螢素的氮 - 乙醯化作用的影響 (圖 3)，結果 6、12、18 及 24 小時等四個時間，皆具有統計學上的意義 ($p < 0.05$)。這表示至少在 24 小時之內，160 μM 的小檉鹼顯著的降低二胺螢素的氮乙醯化作用。

我們再以 160 μM 的小檉鹼 (固定濃度)，24 小時的時間 (固定時間)，以不同濃度的二胺螢素 (11.25、22.5 及 45.0 μM) 來做，由圖 4 我們發現 AAF 的產量分別減少了 56%、59% 及 59%。此三項結果皆具有統計學上的意義 ($p < 0.05$)。這表示在小檉鹼固定濃度及時間 (24 小時)，其抑制二胺螢素的氮乙醯化作用並不因受質的濃度高低而影響。

由圖 8 的聚合酵素連鎖反應圖，我們發現氮-乙醯轉移酵素 mRNA 的基因表現，隨小檉鹼濃度的增加而依次降低，但經由統計分析，160 及 320 μM 的小檉鹼才具有統計學上的意義 ($p < 0.05$)。

第六章：討論研究

第一節：結果討論

在酵素動力學方面，小檉鹼可同時降低平衡常數 (K_m) 和反應最大速率 (V_{max})，因此，小檉鹼對氮-乙醯轉移酵素而言是一種不競爭性抑制劑。這表示當氮-乙醯轉移酵素和細胞結合時，反而可以促進小檉鹼和細胞結合，進而抑制了氮-乙醯轉移酵素的活性。

另外，經由西方墨點法，我們發現氮-乙醯轉移酵素的量也因小檉鹼的增加而減少，而且同樣具有時間及濃度的依賴性。

由圖 8 的聚合酵素連鎖反應圖，低濃度的小檉鹼 (8 及 80 μM) 降低氮-乙醯轉移酵素 mRNA 基因表現的效果並不顯著，高濃度的小檉鹼 (160 及 320 μM) 才有抑制的效果。

由上述幾點 我們可以簡單的說，小檉鹼不僅以不競爭性抑制劑的方式來抑制氮-乙醯轉移酵素的活性，更直接的降低氮-乙醯轉移酵素的量，兩者皆具有時間及濃度的依賴性，而降低氮-乙醯轉移酵素 mRNA 基因表現也同樣的具有濃度的依賴性。

第二節：其他相關性討論

遠在三千多年前，中國和印度便已使用富含小檗鹼的草藥，可說是一種源遠流傳的民俗療法。小檗鹼是一種生物鹼 (alkaloid)。所謂的生物鹼，一般指化合物中含有氮元素者，如小檗鹼及 pilocarpine 等(圖 8)，細分之，則有 indole, 啞 (carbazole) 及阿喏酮 (acridone) 等二十種以上的型式。

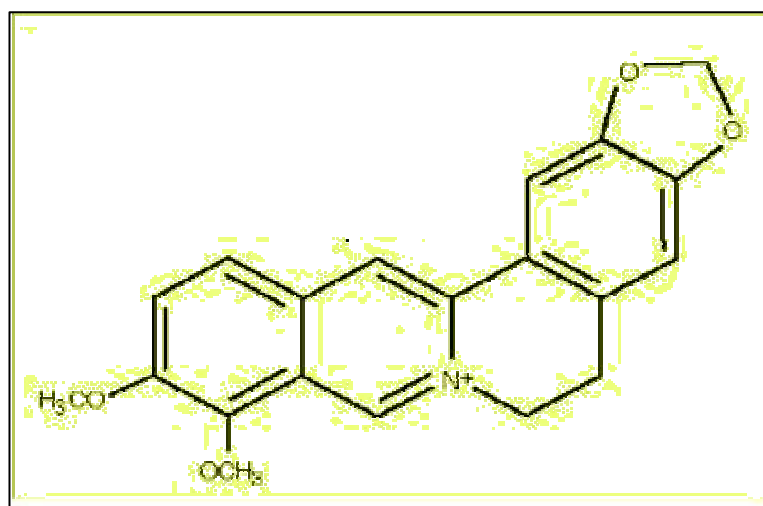


圖 8 berberine 的結構式

很多植物都含有小檗鹼，例如：北美黃連 (Hydrastis canadensis、goldenseal)、野黃連 (Coptis chinensis、coptis or goldenthread) 奧勒岡葡萄 (Berberis aquifolium、Oregon grape) 和小檗 (Berberis vulgaris、barberry) 等。在醫學研究方面，小檗鹼被發現具有拮抗霍亂弧菌及大腸桿菌熱穩定內毒素的作用 (23)，可

抑制腸道電解質的分泌（24、25、26）、抑制平滑肌肌肉的收縮（27、28、29）、抑制心室心搏過速（30、31）、降低發炎反應（32、33、34）、抗血小板凝集作用（35、36）、刺激膽汁分泌及膽紅素排出（37）以及抗腫瘤作用（1~13）等。

二胺螢素是一種人工合成的化合物（圖9），不存在於自然界中，主要用於實驗研究。長期暴露是否會造成人類不良的影響，目前則未有進一步的資料。

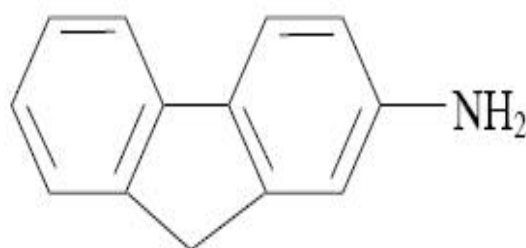


圖9 二胺螢素的結構式

二胺螢素是一種很強的化學致癌物，當其進入動物體內時，可先在胺基接一個氧原子，或者先經體內的胺基乙醯轉移酵素（N-acetyltransferase, NAT）的乙醯化【將Acetyl-CoA上的乙醯基接到受質（二胺螢素）的NH₂基上】，形成二乙醯胺螢素【2-acetyl-aminofluorene (2-AAF)】，再經由體內其他酵素代謝，最後形成活性很強的致癌物，再和目標器官細胞內DNA的Guanine結合，形成DNA添加物（DNA adduct），造成目標器官的癌化(16,17,18)。

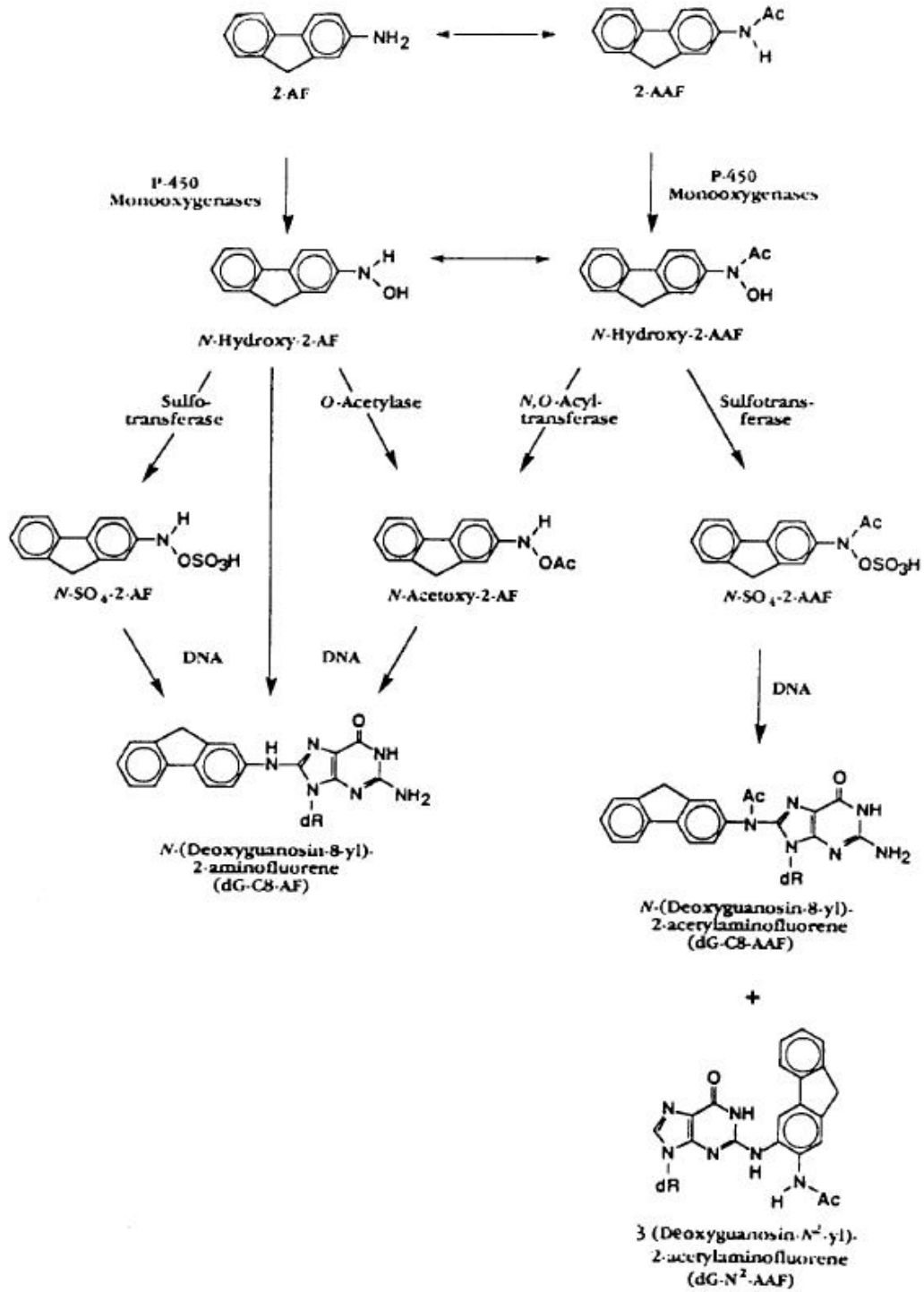


圖10. 二胺螢素(2-AF)和二乙醯胺螢素(2-AAF)活化過程(Taken from Heflich and Neft, 1994)

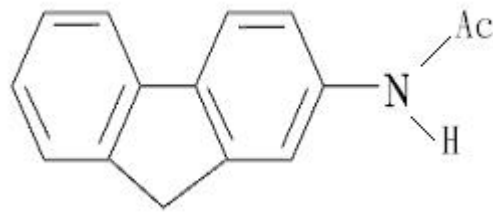


圖 11 二乙醯胺螢素的結構式

二乙醯胺螢素是二胺螢素是乙醯化的產物(圖11)，在動物方面，已有許多研究證實二乙醯胺螢素會在許多動物身上導致癌症，包括老鼠rat (38、39)、mice (40、41)、田鼠hamster (42)、兔子、鳥、蝙蝠、青蛙、狗和貓等(43)。2-AF也會導致許多癌症，兩者所造成的癌症，會因物種及性別的不同而有所差異(Miller et al. 1955)(46)。例如，二乙醯胺螢素不管在雄雌老鼠身上，皆會導致小腸的腺癌，但2-AF則只在雄性老鼠身上才導致小腸的腺癌。兩者在造成癌症的種類及劑量也有許多相似的地方(圖12)。因此，經由動物實驗發現，二乙醯胺螢素和二胺螢素在導致突變及致癌方面，可能有許多重疊的機轉，包括相似的關鍵代謝物和DNA添加物等。

圖12: Carcinogenic activities of 2-AAF and 2-AF in rats (at 10 months) (adapted from Miller *et al.*, 1955)

Treatment ^(a)	Sex	Number of animals on test	Number of rats with tumors (%)				
			liver	mammary gland	ear duct	small intestine	other sites
2-AF	M	9	9 (100%)	0	5 (56%)	4 (44%)	
	F	9	0	7 (78%)	5 (56%)	0	
2-AAF	M	26	24 (92%)	0	11 (42%)	13 (50%)	
	F	27	0	22 (81%)	19 (70%)	6 (22%)	1 ^(b)
Control	M	18	0	0	0	0	1 ^(c)
	F	20	0	1 ^(d)	0	0	

^(a) All compounds were fed at a level of 1.62 mM/kg of diet for 8 months.

^(b) Epidermoid cyst with basal- and squamous-cell elements on the roof of the mouth

^(c) Adenoma of the lung

^(d) Fibroadenoma

氮-乙醯轉移酵素在人體可分成氮-乙醯轉移酵素-1 及氮-乙醯轉移酵素-2 兩種，截至目前為止，乳癌被認為和兩者皆有關（44）。Adam（45）證實在 108 個乳癌病人的身上，氮-乙醯轉移酵素-1 的 mRNA 有過度表現的情形，並且氮-乙醯轉移酵素-1 和雌激素受器陽性表現有很強的關聯性（雌激素受器陽性的乳癌患者有較佳的預後），此外，氮-乙醯轉移酵素-1 也和 etoposide 抗癌藥的抗藥性有關。

已有文獻報導氮-乙醯轉移酵素活性改變與人類乳癌和膀胱癌的發生有相關聯（47）。當個體暴露於二胺螢素時，若提升氮-乙醯轉移酵素的活性，則會提高突變的機會。因而，本實驗結果顯示，小檗鹼能降低人類乳癌細胞株 (MCF-7) 氮-乙醯轉移酵素的活性及基因改變當更值得注意。

第三節：研究限制

本文關於小檗鹼對氮-乙醯轉移酵素的量的抑制作用，雖可見到時間的依賴性及劑量的依賴性 (time- and dose-dependent)，但其真正抑制的作用機轉，目前仍無法回答。關於小檗鹼抑制氮-乙醯轉移酵素的活化二胺螢素作用，可能要藉由氮-乙醯轉移酵素催化中心胺基序列的定位及定序 (例如哪一個胺基會受影響？)，才能確知小檗鹼抑制氮-乙醯轉移酵素的作用點。

第七章：結論與建議

第一節：結論

就人類的乳癌細胞 (MCF-7) 而言，

1. 二胺螢素的氮 - 乙醯化會被小檗鹼抑制，而且是以劑量和時間兩者皆正相關的方式。
2. 在小檗鹼抑制二胺螢素的氮-乙醯化作用並不因受質（二胺螢素）的濃度高低而影響。
3. 小檗鹼是氮-乙醯轉移酵素的一個不競爭（uncompetitive）抑制劑，可同時降低平衡常數（ K_m ）及最大反應速率（ V_{max} ）
4. 小檗鹼會直接減少氮-乙醯轉移酵素的數量。而小檗鹼的抑制效果，同樣是以劑量和時間兩者皆正相關的方式。
5. 由聚合酵素連鎖反應結果顯示，小檗鹼可抑制人類乳癌細胞株氮-乙醯轉移酵素 mRNA 的基因表現。

第二節：建議

目前並不能預測小檉鹼能治療或預防人類乳癌的產生，但確定小檉鹼可降低二胺螢素引起的乳癌。文獻已經報導，二胺螢素暴露的個體，會因氮-乙醯轉移酵素基因的差異導致氮-乙醯轉移酵素活性改變，進而引起不同的乳癌的發生機率。同時小檉鹼可降低氮-乙醯轉移酵素活性和基因相關蛋白質的量，因而可降低其致癌的機率。

六、參考文獻及附錄

A. 參考文獻

1. Tai WP, Luo HS: The inhibit effect of berberine on human colon cell line cyclooxygenase-2. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2003 Aug; 42(8):558-60 [Article in Chinese]
2. Jantova S, Cipak L, Cernakova M, Kost'alova D.: Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells. *J Pharm Pharmacol*. 2003 Aug; 55(8):1143-9.
3. Wang DY, Yeh CC, Lee JH, Hung CF, Chung JG.: Berberine inhibited arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression and DNA adduct formation in human malignant astrocytoma (G9T/VGH) and brain glioblastoma multiforms (GBM 8401) cells. *Neurochem Res*. 2002 Sep; 27(9):883-9.
4. Chen Q, Peng W, Xu A: Apoptosis of a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, PLA-801, induced by acutiaporberine, a novel bisalkaloid derived from *Thalictrum acutifolium* (Hand.-Mazz.) Boivin. *Biochem Pharmacol*. 2002 Apr 15; 63(8):1389-96.
5. Lin JG, Chung JG, Wu LT, Chen GW, Chang HL, Wang TF: Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity in

- human colon tumor cells. *Am J Chin Med.* 1999; 27(2):265-75.
6. Chung JG, Wu LT, Chu CB, Jan JY, Ho CC, Tsou MF, Lu HF, Chen GW, Lin JG, Wang TF: Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumour cells. *Food Chem. Toxicol.* 1999 Apr; 37(4):319-26.
 7. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H: Inhibition of activator protein 1 activity by berberine in human hepatoma cells. *Planta Med.* 1999 May; 65(4):381-3.
 8. Chung JG, Chen GW, Hung CF, Lee JH, Ho CC, Ho HC, Chang HL, Lin WC, Lin JG: Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity and 2-aminofluorene-DNA adduct formation in human leukemia cells. *Am J Chin Med.* 2000; 28(2):227-38.
 9. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H: Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 1999 Aug; 66(2):227-33.
 10. Lin HL, Liu TY, Lui WY, Chi CW: Up-regulation of multidrug resistance transporter expression by berberine in human and murine hepatoma cells. *Cancer.* 1999 May 1; 85(9):1937-42.

11. Wu SN, Yu HS, Jan CR, Li HF, Yu CL: Inhibitory effects of berberine on voltage- and calcium-activated potassium currents in human myeloma cells. *Life Sci.*1998; 62(25): 2283-94.
12. Chi CW, Chang YF, Chao TW, Chiang SH, P'eng FK, Lui WY, Liu TY: Flowcytometric analysis of the effect of berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* 1994; 54(26):2099-107.
13. Chang KS, Gao C, Wang LC: Berberine-induced morphologic differentiation and down-regulation of c-Ki-ras2 proto-oncogene expression in human teratocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 1990 Dec 3; 55(2):103-8.
14. Li XK, Motwani M, Tong W, Bornmann W, Schwartz GK: Huanglian, A Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2000 Dec; 58(6):1287-93.
15. 林松洲。食物與癌症。台北：豪峰出版社，1993:303
16. Levy GN, Chung JG, Weber WW : 2-Aminofluorene metabolism and DNA adduct formation by mononuclear leukocytes from rapid

- and slow acetylator mouse strains. *Carcinogenesis*. 1994 Feb; 15(2): 353-7.
17. Lower GM Jr : Concepts in causality: chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer*. 1982 Mar 1; 49(5):1056-66.
 18. Weber WW : Acetylation. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1990; 26(1):43-65.
 19. Pott, P. In "Chirurgical Observations" , Section on Cancer Scroti. Hawes, Clarke & Collins, London, 1775
 20. Yamagiwa, K. and Ichikawa, K. Experimentelle studie uber die pathogenese der epithelial-geschwilste. *Mitteilungen Med. Facultat Kaiserl, Univ.Tokyo* 15:295. 1915
 21. Passey, R.D. Experimental soot cancer. *Br. Med. J.* ii; 1112-1113, 1922
 22. Kennaway, E.C: The identification of a carcinogenic compound in coal-tar. *Br. Med. J.* 1955 Sep 24 ;(4942): 749-52.
 23. Sack RB, Froehlich JL.: Berberine inhibits intestinal secretory response of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins. *Infect Immun*. 1982 Feb; 35(2):471-5.
 24. Tai YH, Feser JF, Marnane WG, Desjeux JF. : Antisecretory effects of berberine in rat ileum. *Am J Physiol*. 1981 Sep;

241(3):G253-8.

25. Ofuji K, Hara H, Sukamoto T, Yamashita S. : Effects of an antidiarrhoeica containing an extract from geranium herb on astringent action and short-circuit current across jejunal mucosa. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1998 Apr; 111(4):265-75.
26. Swabb EA, Tai YH, Jordan L. : Reversal of cholera toxin-induced secretion in rat ileum by luminal berberine. *Am J Physiol*. 1981 Sep; 241(3):G248-52.
27. Kang DG, Sohn EJ, Kwon EK, Han JH, Oh H, Lee HS. : Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGMP system in vessels. *Vascul Pharmacol*. 2002 Dec; 39(6):281-6.
28. Lin WC, Chang HL. : Relaxant effects of berberine on the rat fundus. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1995 Dec; 90(3):333-46.
29. Huang W. : The role and mechanism of berberine on coronary arteries. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 1990 Aug;18(4):231-4, 254-5.
30. Sun AY, Li DX. : Antifibrillatory effect of tetrahydroberberine. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1993 Jul; 14(4):301-5.

31. Xu Z, Cao HY, Li Q. : Protective effects of berberine on spontaneous ventricular fibrillation in dogs after myocardial infarction. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1989 Jul; 10(4):320-4.
32. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. : The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 2004 Jan 20; 203(2):127-37.
33. Ivanovska N, Philipov S. : Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *Int J Immunopharmacol*. 1996 Oct; 18(10):553-61.
34. Zhang MF, Shen YQ. : Antidiarrheal and anti-inflammatory effects of berberine. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1989 Mar; 10(2):174-6.
35. Xuan B, Wang W, Li DX. : Inhibitory effect of tetrahydroberberine on platelet aggregation and thrombosis. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1994 Mar; 15(2):133-5.
36. Ko FN, Wu TS, Lu ST, Wu YC, Huang TF, Teng CM. : Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis tubers*. *Thromb Res*. 1989 Oct 15; 56(2):289-98.

37. Chan MY. : The effect of berberine on bilirubin excretion in the rat. *Comp Med East West*. 1977 Summer; 5(2):161-8.
- 38 Middleton PJ. : The histogenesis of mammary tumours induced in the rat by chemical carcinogens. *Br J Cancer*. 1965 Dec; 19(4):830-9.
- 39 Klohn PC, Soriano ME, Irwin W, Penzo D, Scorrano L, Bitsch A, Neumann HG, Bernardi P. : Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 19; 100(17):10014-9. Epub 2003 Aug 07.
- 40 Highman B, Frith CH, Littlefield NA. : Alkaline phosphatase activity in hyperplastic and neoplastic urinary bladder epithelium of mice fed 2-acetylaminofluorene. *J Natl Cancer Inst*. 1975 Jan; 54(1):257-61.
- 41 Cheo DL, Burns DK, Meira LB, Houle JF, Friedberg EC. : Mutational inactivation of the xeroderma pigmentosum group C gene confers predisposition to 2-acetylaminofluorene-induced liver and lung cancer and to spontaneous testicular cancer in Trp53-/- mice. *Cancer Res*.

1999 Feb 15; 59(4):771-5.

42 Oyasu R, Kitajima T, Hopp ML, Sumie H. : Induction of bladder cancer in hamsters by repeated intratracheal administrations of 2-acetylaminofluorene. J Natl Cancer Inst. 1973 Feb; 50(2):503-6.

43 Garner RC, Martin CN, Clayson DB (1984). Carcinogenic aromatic amines and related compounds, in Chemical carcinogens, Vol. 1 ” . Edited by Searle CE. American Chemical Society, Washington DC, pp 175-276.

44. Zheng W. et al. N-Acetyltransferase 1 (NAT1) genetic polymorphism, cigarette smoking, well-done meat intake, and breast cancer risk. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., 8: 233-239, 1999.

45. Adam PJ, et al. Arylamine N-acetyltransferase-1 is highly expressed in breast cancers and conveys enhanced growth and resistance to Etoposide in vitro. Mol Cancer Res. 2003 Sep; 1(11):826-35.

46. Miller JA, et al. The carcinogenicity of compounds related to 2-acetylaminofluorene. II. Variations in the bridges and the 2-substituent. Cancer Res 15:188-198. 1955

47. Einisto P, Watanabe M, Ishidate Jr. M, et al.. Mutagenicity of 30 chemicals in Salmonella tphimurium strains possessing different nitroreductase of O-acetyltransferase activities. Mutation Research 259:95-102. 1991

B. 附錄：專有名詞對照

Breast cancer：乳癌

2-AF：二胺螢素

2-AAF：二乙醯胺螢素

NAT (N-acetyltransferase)：氮-乙醯轉移酵素

MCF-7：人類乳癌細胞株

Berberine：小檗鹼

Carcinogens：致癌物

七、簡單自述

1987-1992：中國醫藥學院中醫系

1992：慈濟醫院見習醫師

1993：馬偕醫院實習醫師

1994-1997：馬偕醫院外科住院醫師

1998-1999：馬偕醫院一般外科總醫師

2002-2004：中國醫學院醫學研究所臨床醫學組碩士班

1999：澄清醫院一般外科主治醫師（至今2004）