

中國醫藥大學中醫學系博士班博士論文

指導教授：江素瑛 博士

共同指導教授：侯庭鏞 博士

鍾景光 博士

高尚德 博士

論文題目

以微陣列技術探討馬兜鈴科中草藥

主要成分之藥理與毒理作用機轉

Using microarray analysis to study the pharmacological
and toxicological effects of the major active components
in the family Aristolochiaceae

研究生：陳雅吟

中華民國九十九年六月

目錄

| | |
|-----------------------|----|
| 第一章 前言 | 1 |
| 第二章 文獻探討 | 4 |
| 第一節 馬兜鈴科中藥 | 4 |
| 壹、典籍記載 | 4 |
| 1. 木通(非屬馬兜鈴科中藥) | 4 |
| 2. 防己 | 5 |
| 3. 細辛 | 6 |
| 4. 馬兜鈴 | 7 |
| 5. 青木香 | 7 |
| 6. 天仙藤 | 8 |
| 貳、臨床應用及藥理研究 | 9 |
| 第二節 馬兜鈴酸 | 19 |
| 壹、藥理研究 | 19 |
| 貳、毒理研究 | 21 |
| 1. 馬兜鈴酸腎病變 | 21 |
| 2. 馬兜鈴酸之毒性作用 | 27 |
| 第三節 微陣列技術 | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 第三章 材料與方法 | 36 |
| 第一節 材料 | 37 |
| 壹、細胞來源 | 37 |
| 貳、藥物和試劑套組來源 | 37 |
| 第二節 方法 | 37 |
| 壹、細胞培養 | 38 |
| 貳、藥物處理 | 38 |
| 參、MTT存活率測試 | 38 |
| 肆、Total RNA萃取 | 39 |
| 伍、基因微陣列分析 | 40 |
| 陸、定量反轉錄聚合酶連鎖反應(qRT-PCR) | 42 |
| 柒、免疫染色(NF- κ B p65) / 共軛焦顯微鏡法 | 42 |
| 捌、NF- κ B/luciferase報導基因分析 | 44 |
| 玖、彗星試驗 | 44 |
| 拾、8-OHdG免疫染色法分析 | 45 |
| 拾壹、西方墨點法分析 | 46 |
| 拾貳、微核試驗分析 | 47 |
| 拾參、實驗統計分析 | 48 |
| 第四章 結果 | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 第一節 馬兜鈴酸對HK-2 細胞生長影響的時間及劑量反應關係..... | 49 |
| 第二節 馬兜鈴酸在HK-2 細胞的基因表現圖譜分析..... | 50 |
| 第三節 馬兜鈴酸的抗發炎作用可能來自於抑制NF-κB..... | 51 |
| 壹、路徑分析(pathway analysis)..... | 51 |
| 貳、網路分析(network analysis)..... | 52 |
| 參、利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析NF-κB相關基因的表現..... | 56 |
| 肆、馬兜鈴酸對HK-2 細胞NF-κB轉位(translocation)的影響..... | 57 |
| 伍、馬兜鈴酸對HK-2 細胞NF-κB活性的影響..... | 57 |
| 第四節 馬兜鈴酸的基因毒性可能來自於抑制DNA修補..... | 59 |
| 壹、馬兜鈴酸調控HK-2 細胞DNA傷害及修補相關基因的表現..... | 59 |
| 貳、馬兜鈴酸在HK-2 細胞誘發DNA股斷裂的增加..... | 67 |
| 參、馬兜鈴酸在HK-2 細胞誘發氧化DNA的傷害..... | 67 |
| 肆、馬兜鈴酸暴露HK-2 細胞後對蛋白質表現的影響..... | 68 |
| 伍、馬兜鈴酸在HK-2 細胞誘發微核率的增加..... | 70 |
| 第五章 討論..... | 72 |
| 第一節 馬兜鈴酸抑制NF-κB之訊息傳遞路徑..... | 72 |
| 第二節 馬兜鈴酸抑制DNA修補作用並誘發氧化DNA傷害..... | 76 |
| 第六章 結論..... | 85 |
| 參考文獻..... | 87 |

英文摘要.....100

謝辭.....105



圖目錄

| | |
|--|----|
| 圖 2.1 馬兜鈴酸I (左圖)與馬兜鈴酸II (右圖)的化學結構式..... | 23 |
| 圖 2.2 馬兜鈴酸的可能活化機轉與DNA共價鍵結物 | 31 |
| 圖 2.3 馬兜鈴酸的可能致癌機轉 | 32 |
| 圖 2.4 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)之形成..... | 33 |
| 圖 3.1 實驗設計與流程 | 36 |
| 圖 4.1 馬兜鈴酸在HK-2 細胞對其存活率影響的劑量及時間反應關係..50 | |
| 圖 4.2 馬兜鈴酸在HK-2 細胞的基因表現圖譜之網路分析..... | 53 |
| 圖 4.3 qRT-PCR確認馬兜鈴酸調控NF- κ B相關基因的表現..... | 56 |
| 圖 4.4 馬兜鈴酸在HK-2 細胞抑制NF- κ B轉位..... | 58 |
| 圖 4.5 馬兜鈴酸在HK-2 細胞抑制NF- κ B活性表現..... | 59 |
| 圖 4.6 qRT-PCR確認馬兜鈴酸調控DNA修補、氧化傷害相關基因表現的劑量反應關係 | 65 |
| 圖 4.7 qRT-PCR確認馬兜鈴酸調控DNA修補、氧化傷害相關基因表現的時間反應關係 | 66 |
| 圖 4.8 馬兜鈴酸在HK-2 細胞誘發DNA股斷裂的增加 | 68 |
| 圖 4.9 馬兜鈴酸在HK-2 細胞誘發氧化DNA傷害的增加 | 69 |
| 圖 4.10 馬兜鈴酸暴露HK-2 細胞後Ogg1、p21、c-Fos、Caspase-3 和Bax蛋白質表現的變化 | 70 |

圖 4.11 馬兜鈴酸在HK-2 細胞誘發微核率的增加.....71

圖 6.1 馬兜鈴酸在HK-2 細胞之藥理、毒理作用機轉簡圖.....86



表目錄

| | |
|--|----|
| 表 3.1 qRT-PCR實驗的正向(F)和反向(R)引子序列..... | 43 |
| 表 4.1 馬兜鈴酸在HK-2 細胞的基因表現圖譜之集群分析..... | 51 |
| 表 4.2 馬兜鈴酸在HK-2 細胞的基因表現圖譜之路徑分析..... | 52 |
| 表 4.3 馬兜鈴酸在HK-2 細胞調控NF- κ B相關基因的表現..... | 54 |
| 表 4.4 qRT-PCR確認馬兜鈴酸調控NF- κ B相關基因的表現..... | 56 |
| 表 4.5 馬兜鈴酸在HK-2 細胞調控壓力反應、細胞週期、凋亡、纖維化 反應、生物轉化及氧化酵素相關基因的表現圖譜..... | 60 |
| 表 4.6 馬兜鈴酸在HK-2 細胞調控DNA修補相關基因的表現圖譜..... | 63 |
| 表 4.7 qRT-PCR確認馬兜鈴酸調控DNA修補、氧化傷害相關基因表現的 劑量反應關係..... | 66 |
| 表 4.8 qRT-PCR確認馬兜鈴酸調控DNA修補、氧化傷害相關基因表現的 時間反應關係..... | 67 |

以微陣列技術探討馬兜鈴科中草藥

主要成分之藥理與毒理作用機轉


研究生：陳雅吟

指導教授：江素瑛 博士

共同指導教授：侯庭鏞 博士

鍾景光 博士

高尚德 博士



馬兜鈴科植物長久以來即在世界各地被當作民族藥物使用，例如於印度、南非、地中海地區，被用來調經、催產、逐蟲，和治療關節炎、癌症、毒蛇咬傷等。在台灣、中國大陸等地也有很多馬兜鈴科中藥的複方如疏經活血湯、川芎茶調散、小青龍湯等，被用來治療關節痛、頭痛、氣喘等。除此之外，馬兜鈴科單味藥物也常被臨床使用，例如防己用於治療風濕水腫，細辛用來止牙痛等。雖然馬兜鈴科植物已在世界各地被當作傳統藥物使用好幾世紀，但其療效作用機轉尚不清楚，因此，我們以馬兜鈴科中草藥的主要活性成分馬兜鈴酸 I 及馬兜鈴酸 II 鈉鹽的混合物(以下簡稱馬兜鈴酸)作為材料，以人類近端腎小管 HK-2 細胞作為實

驗模型，利用微陣列分析法來探討其可能的藥理與毒理的作用機轉。

HK-2 細胞經不同劑量(10、30、90 μM)馬兜鈴酸及 30 μM 馬兜鈴酸不同時間(1, 3, 6, 12,和 24 小時)暴露後，發現馬兜鈴酸對 HK-2 的細胞生長的影响呈現劑量及時間反應關係；收集細胞並抽取其核糖核苷酸(RNA)進行微陣列分析，得到的馬兜鈴酸基因表現圖譜利用集群分析法(Cluster analysis)分析，發現馬兜鈴酸可以調控的基因表現圖譜中包含：DNA 傷害反應、DNA 修補、細胞凋亡等相關基因，進一步探討後發現馬兜鈴酸可明顯調控九種免疫調節相關的生物路徑(例如 TNF signaling pathway、Interleukin signaling pathway 等)會明顯受到馬兜鈴酸影響，此顯示馬兜鈴酸可能參予免疫調控相關基因的表現，於是經由網路分析(network analysis)發現發炎轉譯因子 NF- κ B 扮演很重要的角色。馬兜鈴酸顯著地調控許多 NF- κ B 相關基因(例如 CCL20、CD68、IL8 等)的表現，經 qRT-PCR 確認 NF- κ B 相關基因的表現情形，與微陣列基因表現圖譜有很好的一致性；並以帶有 NF- κ B/luciferase 基因轉殖的 HK-2 細胞確認馬兜鈴酸可以有效抑制 NF- κ B 的活性，且以共軛焦顯微鏡/免疫染色方法確認馬兜鈴酸可以抑制 NF- κ B p65 由細胞質轉位進到細胞核。綜合以上結果顯示，馬兜鈴酸可以有效抑制 NF- κ B 活性，此發現提供了馬兜鈴科植物被當作抗發炎藥物的分子作用基礎。

由於含馬兜鈴酸的中草藥曾在比利時馬兜鈴酸腎病變事件中被報

導可以造成馬兜鈴酸腎病變及泌尿道癌，所以我們同時探討馬兜鈴酸可能的毒理作用機轉。我們分析馬兜鈴酸在 HK-2 細胞的基因表現圖譜，發現 DNA 修補路徑是被最顯著調控的，並以 qRT-PCR 確認 DNA 修補相關基因被馬兜鈴酸下調的情形。除此之外，DNA 傷害反應、細胞凋亡及抗氧化酵素(例如 superoxide dismutase、glutathione reductase 和 glutathione peroxidase)等相關基因的表現也顯著地被馬兜鈴酸所調控。以彗星試驗法檢測 DNA 傷害，發現馬兜鈴酸可增加 DNA 股斷裂，以微核測試法檢測染色體傷害，發現馬兜鈴酸可顯著誘發微核率的增加，以免疫染色法發現馬兜鈴酸可以增加常見氧化 DNA 傷害指標 8-OHdG 染色的細胞數，並進一步確認馬兜鈴酸可以減少 OGG1 的蛋白質表現量，綜合以上結果顯示馬兜鈴酸可透過抑制 DNA 修補相關基因與抗氧化酵素的表現，進而造成 DNA 股斷裂、氧化 DNA 傷害與染色體傷害的增加，此結果對馬兜鈴酸致基因毒性提供了新的證據。

我們以微陣列分析探討馬兜鈴科中草藥之主要成分馬兜鈴酸混合物誘發的基因反應圖譜，發現馬兜鈴酸抗發炎機轉可能經由抑制 NF- κ B 之訊息傳遞路徑來展現，另外馬兜鈴酸會抑制 DNA 修補作用並誘發 DNA 股斷裂、氧化 DNA 傷害與染色體傷害，以上結果對含馬兜鈴酸中草藥可能的療效分子機轉或病理機轉提供新的證據，可以提供中醫師臨床用藥作為參考。

關鍵字：馬兜鈴酸、微陣列分析法、人類近端腎小管 HK-2 細胞、
發炎轉譯因子 NF- κ B、DNA 修補



第一章 前言

很多馬兜鈴科植物長久以來即在世界各地被用來當作傳統民俗藥物。舉例來說，在台灣、中國內地、日本和新加坡有很多傳統中藥的複方，皆含有不同種類的馬兜鈴科植物^[1]。除了東亞外，在印度、地中海地區和南非，有許多不同種類的馬兜鈴科植物被用來治療月經不調、催產、驅逐寄生蟲、鎮痛，和治療關節炎、癌症，腹瀉、和毒蛇咬傷等^[2-4]。

在馬兜鈴科中草藥的臨床應用中，最常見的是細辛、廣防己、馬兜鈴、天仙藤、青木香。另外，關木通亦屬馬兜鈴科植物一員，過去一百多年來在大陸被當作木通的替代藥品^[5]，因此也在此篇論述範圍，但在古代典籍並無記載^[6]，因此僅有木通典籍之摘述，及在臨床應用方面敘述關木通的臨床使用緣由及相關減毒研究。臨床上，木通性味苦寒，被用來降火利水、通乳，可以治療口舌生瘡、失眠、小便澀痛、乳汁稀少等。廣防己性味大苦辛寒，臨床用於治療水腳氣，風濕痺痛等。細辛性味辛溫，有祛風散寒，止痛通竅，溫肺化飲，止咳平喘，通利血脈的功效。馬兜鈴、青木香、天仙藤則為同一種植物馬兜鈴的不同部位，馬兜鈴為果實，青木香為根，天仙藤為莖葉。馬兜鈴性味苦、微辛、寒，臨床可用來清肺止咳、降氣平喘；青木香性味苦、微辛、寒，功能順氣止痛，解毒消食；天仙藤性味苦溫，有活血通絡，化濕消腫的功效。

我國衛生署曾於 2003 年 11 月 4 日公布禁用五種含馬兜鈴酸的藥材(廣防己、青木香、關木通、馬兜鈴、天仙藤)，但是馬兜鈴科的細辛並未被禁止使用。在過去數千年的傳統中醫藥應用中，馬兜鈴科中草藥可以拿來消腫止痛、清熱解毒、止咳祛痰、降血壓、利尿、止皮膚癢、治蛇咬傷、抗癌等^[7-8]，雖然含馬兜鈴酸的中草藥曾在比利時馬兜鈴酸腎病變事件中被報導可以致病，但其罹患馬兜鈴酸腎病變的比例^[9]明顯高於台灣、中國大陸等地，因此儘管部份馬兜鈴科中草藥已在市場上被多國禁止使用，但其過去被應用的藥理作用及近代出現的毒理表現仍值得進一步探究。

DNA 微陣列分析技術(Microarray)又稱為基因晶片技術，其特點是可以大量、並行化蒐集生物資訊，例如對樣本中的核酸序列資訊進行快速、高通量和低成本測量分析，在近代被認為如同微型實驗室，因此被廣泛應用於疾病關聯性基因檢測、藥物動力學、毒理基因體學等。微陣列分析技術除了在臨床上可以應用於標的藥物的開發(target-based drug discovery)、生物標記(biomarker)的發現、病原體基因檢測及疾病的預後測試(prognostic tests)等，還可以在人類已知基因組上進行藥物或毒物基因表達的比較、基因突變分析，可在分子水平上評估藥物或毒物的作用^[10]。因此我們欲藉著微陣列技術，在分子層面上探討中草藥有效成分馬兜鈴酸的作用機轉。由於細辛是目前馬兜鈴科植物中仍被允許臨床

使用的中藥，而馬兜鈴酸I (Aristolochic Acid I) 及馬兜鈴酸II (Aristolochic Acid II) 是馬兜鈴科中草藥的主要活性物質，因此本研究以馬兜鈴酸I與馬兜鈴酸II之混合物為材料，使用微陣列技術探討馬兜鈴酸混合物對人類近端腎小管 (HK-2 cells) 細胞基因表現圖譜的影響，進而探討馬兜鈴酸在人類腎細胞可能的抗發炎藥理或基因毒性的毒理作用機轉。



第二章 文獻探討

在傳統中醫藥中，馬兜鈴科中藥的臨床應用有很多，最常見的是廣防己、細辛、馬兜鈴、青木香、天仙藤，較少使用的是朱砂蓮、尋骨風、南木香等。張賢哲等根據歷代中醫名方一萬七千方電子資料庫、北京「中醫藥文獻資料庫(1943-2006)」、《中華醫典》電子資料庫及中國醫藥大學附設醫院中藥材用量統計(1983-1993)等資料，將使用量從高量至低量分為A、B、C、D、E等類，結果統計出細辛為66種A類最常用藥之一，木通、防己屬於B類60種常用藥物之列，青木香、馬兜鈴列於150種C類通用藥物之中，天仙藤則屬於100種D類罕用藥物之一^[11]。

馬兜鈴科植物被用來當作傳統中醫藥來治療疾病已有數百年的歷史，有許多的古籍記載收錄其作用及臨床應用，茲舉其常用者節錄分述如下：

第一節 馬兜鈴科中藥

壹、典籍記載

1. 木通(非屬馬兜鈴科中藥)

《神農本草經》：氣味辛平無毒，主除脾胃寒熱，通利九竅血脈關節，令人不忘，去惡蟲^[12]。

《本草綱目》：木通，手厥心包、手足太陽小腸膀胱之藥也。故上能通

心清肺，治頭痛、利九竅；下能泄濕熱，利小便，通大腸，治遍身拘痛。

《本經》及《別錄》皆不言其利小便之功治淋之功，甄權、日華子輩好發揚之。蓋其能泄丙丁之火，則肺不受邪，能通水道，水源既清，則津液自化，而諸經之濕與熱，皆由小便泄去。故古方導赤散用之，亦瀉南補北、扶西抑東之意^[13]。

《本草備要》：古名通草，輕通行水，瀉小腸火。甘淡輕虛。上通心包，降心火，清肺熱，心火降，則肺熱清矣。化津液，肺為水源，肺熱清，則津液化，水道通。下通大小腸膀胱，導諸濕熱由小便出，故導赤散用之。...。木通能入大腸，兼通大便。通利九竅，血脉關節。治胸中煩熱，遍身拘痛...。除煩退熱，止痛排膿，破血催生，行經下乳。火不亢于內，氣順血行，故經調有準，乳汁循常。汗多者禁用^[7]。

在宋朝以前，如《神農本草經》、《新修本草》、《備急千金要方》僅見通草之名，未見木通。需注意以上歷代本草所提的木通為木通科木通(*Akebia quinata* (Thunb.) Decne.)^[14]。

2. 防己

《神農本草經》：味辛，平。主風寒，濕癰，熱氣，諸癰，除邪，利大小便^[12]。

《名醫別錄》：味苦，溫，無毒。主治水腫，風腫，去膀胱熱，傷寒，

寒熱邪氣，中風，手脚攣急，止泄，散癰腫，惡結，諸蝸疥癬，蟲瘡，通腠理，利九竅^[15]。

《本草備要》：通，行水，瀉下焦血分濕熱。大苦大寒^[7]。

《本經逢原》：防己辛寒純陰，主下焦血分之病，性劣不純，善走不行，長于除濕。以辛能走散，兼之氣悍，故主風寒溫瘧，熱氣諸病，除邪，利大小便，此《本經》主治也。...如飲食勞倦，陰虛內熱，以防己泄大便，則重亡其血，其不可用一也；大渴引飲，及久病津液不行，上焦濕熱等證，防己乃下焦血藥，其不可用二也；外感邪傳肺經，氣分濕熱，而小便黃赤，此上焦氣病，其不可用三也。大抵上焦濕熱，皆不可用，即下焦濕熱，又當審其二便不通利者，方可用之^[16]。

3. 細辛

《神農本草經》：味辛，溫。主治咳逆。頭痛，腦動，百節拘攣，風濕痺痛，死肌^[12]。

《名醫別錄》：無毒。主溫中，下氣，破痰，利水道，開胸中，除喉痺，艱鼻，風癰癩疾，下乳結，汗不出，血不行，安五臟，益肝膽，通精氣^[15]。

《本草綱目》：治口舌生瘡，大便燥結，起目中倒睫。...。辛溫能散，故諸風寒、風濕頭痛、痰飲、胸中滯氣、驚癇者宜用之^[17]。

《本草備要》：宣，散風濕，補肝，潤腎。辛溫散風邪，故諸風痺痛，咳嗽上氣，頭痛脊强者宜之。專治少陰頭痛，獨活為使。辛散浮熱，故口瘡喉痹……。然味厚性烈，不可過用。不可過一錢，多則氣不通，悶絕而死^[7]。

4. 馬兜鈴

《本草品彙精要》：馬兜鈴主肺熱，咳嗽痰結，喘促，血痔瘻瘡^[18]。

《本草備要》：瀉肺下氣。體輕而虛，熟則四開象肺，故入肺。寒能清肺熱，苦辛能降肺氣。時珍曰：錢乙補肺阿膠湯用之，非取其補肺，取其清熱降氣，則肺自安也。其中阿膠、糯米乃補肺之正藥^[7]。

《本經逢原》：諸藥之性輕浮者，皆能入肺散氣，燈心、馬勃之屬皆然。諸家言其性寒，專于劫痰定喘，不知其苦中帶辛，寒中帶散，是以肺熱痰喘，聲音不清者宜之。錢氏補肺阿膠散用之，取其清熱降氣，邪去則肺安矣。性善湧泄，故《纂要》治蛇蠱毒，一味濃煎，服之探吐，其毒即解。嬰兒麻疹內陷，喘滿聲音者，宜加用之。若肺冷金寒，喘嗽失音者禁用^[16]。

5. 青木香

《本草品彙精要》：青木香主婦人血氣刺心，痛不可忍，九種心痛，積

年冷氣，痲痺癥塊脹痛，逐諸壅氣上衝煩悶，霍亂吐瀉，心腹枵刺^[18]。

《本經逢原》：青木香即馬兜鈴根。青木香苦寒香細，入足少陰，善降陰氣上逆，故治風濕蕨蕤湯用之，並治癰腫痰結氣凝諸痛。《唐本》治熱腫蛇毒，水磨敷之。《肘後》治蠱毒，酒水和煎服之，毒從小便出。昔人言多服令人吐利，肺寒咳嗽，寒痰作喘，胃虛畏食人勿服，以其辛香走竄也^[16]。

6. 天仙藤

《本草綱目》：流氣活血，治心腹痛^[13]。

《本草求真》：天仙藤，觀書所論主治，止屬妊娠子腫及腹痛風癆等症，而于他症則未及焉。即其所治之理，亦不過因味苦主于疏泄，性溫得以通活，故能活血通道，而使水無不利，風無不除，血無不活，痛與腫均無不治故也^[19]。

《本草備要》：治風勞腹痛，妊娠水腫。^[7]

以上是有關馬兜鈴科中藥及木通的典籍摘述，根據其記載，大部分的馬兜鈴科中藥多具有相當於現代藥理的去水腫、止痛作用。從古代典籍記載中，可以發現除了對藥物的療效敘述，還指出了一些禁忌狀況及用藥劑量限制(例如防己、細辛)，足見古人在藥物使用上有其縝密的體

察及經驗傳承的價值。

貳、臨床應用及藥理研究

1. 木通及關木通的誤用沿革及關木通的減毒研究

木通作為臨床藥物已有上千年歷史，在《神農本草經》中已有記錄，但不是以木通為名，而是以通草之名來記載^[12]，根據考證，在《唐本草》以前稱木通為通草^[14]，至《藥性論》才有木通之名，但至明代《本草品匯精要》才清楚正名木通，在通脫木條以“通草”為名，在木通條以“木通”為正名^[20-21]，《本草綱目》言：「有細細孔，兩者皆通，故名通草，即今所謂木通也，今之通草，乃古之通脫木也^[13]。」《本草備要》也在木通條下註明：「古名通草，輕通行水，瀉小腸火」^[7]。謝宗方對此進行本草考證，認為在宋朝以前的木通是指木通科五葉木通(*Akebia quinata* (Thunb.) Decne.)^[14]，而宋《證類本草》所記載的木通除了木通科木通外，還有毛茛科(*Ranunculaceae*)鐵線蓮屬(*Clematis* L.)的植物，清《植物名時圖考》則記載鐵線蓮屬 (*Clematis* L.)的幾種木通^[6]。歷代本草皆未出現過關木通的名稱，直到《東北藥用植物志》才有記載^[21]，關木通以其來自關東地區而名之，為東北地區用藥，清代逐漸傳至關內，至 1954 年任紅安調查發現當時木通商品主要來源為東北馬兜鈴 *Aristolochia manshuriensis* Kom.，於 1963 年被收錄《中國藥典》，自此

開始關木通的合法使用^[6]。1963年《中國藥典》並同時收錄了木通科木通屬五葉木通(*Akebia quinata* (Thunb.)、毛茛科鐵線蓮屬川木通，但因木通科木通藥源短缺，以後各版藥典僅收錄關木通及川木通^[21]，直至2000年版再將木通科木通重新收錄。在20世紀50至70年代大陸市場上木通的來源主要為馬兜鈴 *Aristolochia*屬關木通，木通科木通極少，僅能在江浙產地自產自銷，而關木通在東北地區因產量大且價格便宜，故能發展推銷至全中國大陸，甚至出口^[21]。1990年版《中國藥典》所收載龍膽瀉肝湯中，將原方木通改為關木通，隨之相關文獻、教材也多將木通改為關木通，關木通便代替了傳統的木通藥材^[22]而被使用。

關木通為馬兜鈴科(*Aristolochiaceae*) 木通馬兜鈴屬(*Aristolochia manshuriensis* Kom.) 植物，於2000年版《中華人民共和國藥典》及2002年增補版與川木通，即毛茛科小木通 (*Clematis armandii*)或繡球藤 (*Clematis montana* Buch ham)、木通科五葉木通(*Akebia quinata* (Thunb.) Decne.)、三葉木通(*A. trifoliata* (Thunb.) Koidz.)或白木通(*A. trifoliata* (Thunb.) Koidz. Var. *australis* (Diels) Rehd.) 共同被收載記錄。但因關木通迭有不良反應的報導，中國大陸國家食品監督管理局於2003年4月取消了關木通用藥標準^[22]，而於2005年版《中華人民共和國藥典》將關木通刪除藥用，只收載川木通和木通^[6]，自此關木通被禁止使用。

木通來源複雜，一般認為木通科木通性味微辛苦平、無毒，歸心包、

肺、小腸、膀胱經等，臨床用來一切實邪所致的經脈不通，有通心清肺、宣通氣血的功效。毛茛科川木通性味淡、微苦寒、有小毒，歸心、肺、小腸、膀胱經，臨床適用於溼熱瘀血所致的經脈不通等證。關木通性味苦寒，歸心、小腸、膀胱經，臨床用來降火利水、通乳，可以治療口舌生瘡、失眠、小便澀痛、乳汁稀少等^[21]。常用含木通的方劑有八正散、疏鑿飲子、龍膽瀉肝湯、八味帶下方、甘露消毒丹、消風散、辛夷散、當歸四逆湯、過期飲、橘核丸等。由於關木通近數十年代替木通大量使用，在 1964 年開始有病例的報告^[23]，之後陸續有報導例如因用來下乳而導致腎衰的情形等，但未受到太大的注意，直到比利時腎病變事件發生後，關木通的毒副作用才受到關注研究。

首先被關注的是，為何在比利時產生的腎病變比率那麼高？根據統計研究，在比利時因服用含馬兜鈴酸之減肥藥約有 3-5% 比例的患者產生腎病變，其中七成需要進行透析治療或腎移植^[9, 24]，除了藥物的累積攝取量較大以致於容易造成腎病變外，藥物的服用劑型、方式，及傳統中藥的炮製、配伍使用可能有減毒增效的作用，值得我們進一步探究。

在服用劑型方面，在臺灣多使用科學中藥或水煎飲片，科學中藥的製程也是通過水煎萃取而成，而比利時的減肥中草藥是直接藥物磨成粗粉，因此食入的馬兜鈴酸含量就有很大的差異。中國大陸曾有用關木通來探討不同入藥形式對中藥有毒成份含量的影響，經比較水煎液、水煎

後 70% 甲醇提取、和 70% 甲醇提取三者馬兜鈴酸的含量後，發現水煎液提取的馬兜鈴酸 I 含量並不高，約為 70% 甲醇提取的一半，53.4%(水煎/醇提)而已^[25]。另有研究鑑定兩種易混中藥，白英 (*Herba Solani Lyrati*) 和尋骨風 (*Herba Aristolochiae Mollissimae*)，這兩種中藥為不同科的植物，然而外觀相似，因此容易被誤用；白英不具有毒性，然而尋骨風內含致腎病變物質馬兜鈴酸，研究者利用 liquid chromatography-mass spectrometry(LC/MS) 分析白英和尋骨風裡含的馬兜鈴酸 I 成分時，發現使用水和甲醇兩種不同萃取方法，甲醇(279.25 $\mu\text{g/g}$)所萃出的馬兜鈴酸 I 含量遠遠超過於水(103.88 $\mu\text{g/g}$)萃出的含量，且只有在尋骨風內發現馬兜鈴酸 I 的存在，白英並未發含馬兜鈴酸 I 的存在^[26]。另有兩項有關細辛的研究，皆探討細辛不同部位馬兜鈴酸的含量，並且比較水萃取與醇萃取的差異，結果皆發現水萃取的確能減少馬兜鈴酸 I 的含量；且在根部的部份，水萃取的馬兜鈴酸 I 含量與醇萃取的馬兜鈴酸 I 含量相比分別為 0.08 $\mu\text{g/g}$ vs 0.32 $\mu\text{g/g}$ ^[27]及 0.33 $\mu\text{g/g}$ vs 1.23 $\mu\text{g/g}$ ^[28]。足見藥物的攝取途徑，水煎、醇萃取及直接磨粉服用，其毒性(或有效)成分的攝取量有很大的差異。

另外，傳統中醫藥為了減少藥物的毒性，而有炮製減毒及方劑藥物配伍的方法。在中藥炮製方面，有研究對關木通去除馬兜鈴酸 I 的炮製方法進行研究^[29-30]，發現炮製後的關木通製品，對腎臟的毒性明顯低

於同等劑量的關木通生品，炮製品可以達到減毒的目的。除此之外，也發現利用鹼製法後再醋製能夠達到降解毒性的作用，可以將馬兜鈴酸A(即馬兜鈴酸I)的含量降到 0.35-0.60 mg/g，還發現馬兜鈴酸有部分是以鹽的形式存在藥材中，同時炮製過程中溫度對去除毒性成分率影響比較大^[31]。另外有研究同樣證實關木通的炮製品可以達到減毒的目的；盧歡等人曾以高效液相色譜法(HPLC)檢測關木通藥材及其炮製品中馬兜鈴酸A的含量變化，以清煮法、甘草汁煮、及小蘇打水煮這 3 種方法，發現這三種方法皆能夠降低馬兜鈴酸A的含量變化，且以小蘇打水煮後的炮製品降低馬兜鈴酸A的含量最高^[32]；另有研究以同樣的檢測法觀察關木通藥材及其炮製品中馬兜鈴酸A的含量變化，結果得知炒焦、滑石粉炒、麩炒 3 種炮製品中的馬兜鈴酸A含量均較生品有所降低，並且滑石粉炒後的炮製品降低率最高，這 3 種炮制法皆能降低關木通中馬兜鈴酸A的含量，進而達到了降低毒性的目的^[33]。

在配伍方面，傳統中醫利用中藥有相畏、相殺的情形，即是以一種藥物與另一種藥物共同作用後，透過交互作用來達到減輕或消除此一藥物的毒性或副作用，此即是所謂的配伍減毒作用。在 2002 年，本所蘇奕彰博士指導的研究生就透過關木通與生甘草的配伍，來探討生甘草對關木通所誘發的急性腎毒性是否有保護作用，結果證實生甘草可以減輕關木通對大白鼠的急性腎臟傷害以及胃部傷害。另外，有研究比較關木

通配伍不同滋陰養血中藥(當歸、生地、玄參、麥冬)後，馬兜鈴酸A的變化趨勢，發現與關木通組相比，各配伍組馬兜鈴酸A含量均有降低；其中配伍當歸組，以3:1比例配伍馬兜鈴酸A含量最低^[34]。因此研究者認為在方劑配伍理論指導下，通過合理配伍降低關木通的毒性是可行的。另有研究對導赤散的傳統複方配伍及拆方煎煮的藥液與單味關木通煎煮的藥液中馬兜鈴酸A溶出量近行測定，結果發現複方導赤散藥液中馬兜鈴酸A溶出量明顯低於單味關木通藥液達41%，而淡竹葉與關木通配伍的馬兜鈴酸A溶出量最低，較單味關木通藥液溶出量減少62%^[35]。另外，另有小薊飲子的拆方配伍研究，其中對君(生地)、臣(小薊、藕節、蒲黃)、佐(滑石、淡竹葉、山梔、當歸)、使(炙甘草)與關木通配伍的煎液進行馬兜鈴酸A含量測定，發現君藥、臣藥與關木通配伍的馬兜鈴酸A含量明顯少於單獨關木通組^[36]，足見通過藥物配伍可以達到減毒的功效。另外，尚有研究如滋陰補腎丸^[37]、腦靈片^[34]與關木通共煎後使用HPLC法測定馬兜鈴酸A含量，皆發現可以顯著降低關木通中馬兜鈴酸A的含量，進而達到減毒的目的。

2.防己

防己在臨床上的使用有防己科粉防己(又稱漢防己)或馬兜鈴科(*Aristolochiaceae*)廣防己(又稱木防己)，性味大苦辛寒，歸膀胱、腎、脾經。可用於治療水腫、腹腫、腳氣、風濕痺痛等，能祛風濕、止關節疼

痛、瀉下焦血分溼熱。一般來說，粉防己及廣防己皆具利尿效果，但粉防己祛濕利水的效果優於廣防己；而廣防己祛風通絡、止關節疼痛的效果優於粉防己^[38]，所以若著重於利尿消腫的療效會使用粉防己，若要加強去風濕止痛的效果會使用廣防己。比利時減肥藥事件就是原本處方欲用粉防己來加強利尿減重的效果，但因誤用馬兜鈴科的廣防己，以致於發生後續的馬兜鈴酸腎病變。防己在中醫臨床上常放在方劑內使用，常用含防己的方劑有防己黃耆湯、防己茯苓湯、防己加茯苓芒硝湯、己椒瀝黃湯、三物防己湯等。

另有研究利用以生地與廣防己進行減毒作用最佳配伍比例之探討，發現加入不同比例的生地後，廣防己中的馬兜鈴酸A含量均有降低現象，且以廣防己：生地=2：1的比例最為明顯^[39]。

3. 細辛

細辛為馬兜鈴科(*Aristolochiaceae*) 細辛屬(*Asarum*) 植物，2005 年版《中華人民共和國藥典》收載細辛正品為馬兜鈴科植物北細辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.，漢城細辛 *Asarum sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai (此二者又名遼細辛)或華細辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的干燥根及根莖，在上述細辛中，以北細辛(*Asarum heterotropoides*) 在臺灣的使用量最多^[40]。細辛味辛，性溫，有祛風散寒，止痛通竅，溫肺化飲，止咳平喘，通利血脈的功效。中醫臨床用於治療

風寒感冒，咳逆上氣，痰飲咳喘，關節疼痛，頭痛，牙痛等。

在細辛的現代藥理研究方面，有研究發現細辛等可以有效的減少脂質的過氧化作用，另外也能提高超氧歧化酶SOD (Superoxide Dismutase) 的活性，增強身體清除自由基的能力，減少自由基對身體的傷害^[41]。日本的研究則發現細辛的萃取物有抗膚過敏的作用^[42]。另外有研究證明細辛可增強體外培養乳鼠心肌細胞的搏動頻率，但對心肌細胞的搏動振幅無明顯變化，提示了細辛對心肌細胞的作用主要是增加心率，這提供了臨床應用細辛治療慢性心律失常的佐證。除此之外，還發現細辛對缺糖缺氧性損傷心肌細胞釋放到培養液中的乳酸脫氫酵素LDH (Lactic dehydrogenase)減少，提示細辛對缺糖缺氧性損傷心肌細胞的細胞膜有直接的保護作用^[43]。

在臨床上，細辛的用量及使用部位素有爭議。《傷寒論》與《金匱要略》細辛用量約相當於于現代的3~10 g，明代李時珍《本草綱目》認為：“不可過一錢，多則氣悶塞，不通者死”。大陸醫家根據古今醫者的臨床經驗與現代藥理研究，認為“細辛不可過錢(3g)”應有三個條件：一是使用單味藥物；二是使用散劑劑型；三是使用根部；如果是使用細辛的全草並加入複方湯劑中，則不必受“細辛不過錢”的限制^[44]。而使用部位，《本草備要》主張：「細辛產華陰者真，揀去雙葉者用」，《雷公炮炙論》：「使細辛切去頭子，以流水浸一宿，至明漉出，曝乾用，需

揀去雙葉者，服之害人」。大陸《中國藥典》中細辛使用部位則為乾燥全草。在臺灣，有研究^[40]使用液相層析大氣壓化學電離串聯質譜儀(LC/(+)APCI/MS/MS)分析九種細辛的馬兜鈴酸I含量，發現有3.3 ng/mg (Asarum sieboldii)到 3376.9 ng/mg (Asarum crispulatum)的差距，當中最常用的北細辛(Asarum heterotropoides) 馬兜鈴酸I含量為42.2 ng/mg，約為廣防己馬兜鈴酸含量的1/40到1/100。另外於2003年藥物食品檢驗局的調查研究年報中^[45]，分別對細辛的根與根莖醇萃取液、葉之醇萃取液進行薄層色層分析(TLC)，結果發現兩者均沒有檢出馬兜鈴酸（最低檢出量為0.2µg/ml），不過仍然建議依據文獻記載使用部位為根與根莖。衛生署則於2004年2月27日(署授藥字第0930000756號)公布細辛藥用部位由全草改用根部，製程以水煎煮方式製造；成品則依廠內既定之HPLC檢驗方法檢驗馬兜鈴酸含量合格後始得販售。

在中醫健保處方藥及方劑中，包含細辛單味藥，及內含細辛之複方如：獨活寄生湯、川芎茶調散、辛夷散、九味羌活湯、三痺湯、大秦芫湯、小青龍湯、再造散、苓甘薑味辛夏湯、射干麻黃湯、烏梅丸、當歸四逆湯、麻黃附子細辛湯、當歸四逆加吳茱萸湯等共 14 種方劑。根據1997至2001年全民健保中醫門診使用馬兜鈴酸相關方劑處方狀況的研究^[46]，發現在細辛、廣防己、木香，關木通、馬兜鈴、天仙藤等六類可能含馬兜鈴酸的六類方劑中，以細辛類的使用率最高，且以15歲以下

患者使用最多。有研究使用回溯追蹤法(retrospective follow-up study)研究六年(1997 至 2002 年) 計二十萬例健保病例使用中藥分析，發現細辛累積劑量甚至到 200 克以上仍沒有造成慢性腎病(chronic kidney disease, CKD)的風險^[47]。

4.馬兜鈴

馬兜鈴性味苦、微辛、寒，為北馬兜鈴的果實，臨床可用來清肺止咳、降氣平喘，屬鎮咳祛痰藥，臨床上常用含馬兜鈴的方劑有補肺阿膠散，功能滋陰補肺、寧嗽止血。

5.天仙藤

天仙藤為馬兜鈴的莖部，性味苦溫，有活血通絡，化濕消腫的功效，臨床上用於脘腹脹痛，妊娠水腫，皮膚癰腫、蛇蟲咬傷等。有研究以天仙藤湯劑治療特發性水腫 12 例，觀察用藥前後血漿腎素(plasma renin activity)、血管緊張素 II(angiotension II)的變化。於使用天仙藤散劑治療 2 週後，發現血漿腎素、血管緊張素 II 均有顯著的降低現象，且追蹤 3-6 個月，發現有 10 例病患水腫消失^[48]。除此之外，也有病例報導使用天仙藤治療卵巢囊腫 2 例，效果佳且未再復發^[49]。

6.青木香

青木香性味苦、微辛、寒，為科植物馬兜鈴及北馬兜鈴的根部，歸肝、胃經。功能順氣止痛，解毒消食，臨床可用於氣滯胸脅、脘腹脹痛，

腸炎、消化不良、蛇咬、癰腫、皮膚濕爛等。有實驗使用青木香(*Aristolochia debilis*)萃取物進行初步臨床試驗，證明青木香萃取物具有增強淋巴細胞吞噬功能、增強機體免疫功能的作用^[50]。

其它馬兜鈴科馬兜鈴屬植物如綿毛馬兜鈴，藥材名為尋骨風，為全草入藥，可祛風濕通經絡、治療筋骨疼痛等病。有實驗證明綿毛馬兜鈴油對蛋白性、甲醛性關節腫和二甲苯引起的小鼠耳殼發炎症狀和棉球肉芽組織增生均有抑制作用，因此推論綿毛馬兜鈴油具有抗發炎的功效^[51]。除此之外，從馬兜鈴屬植物尋骨風(*Aristolochia mollisstma Hance*)的莖葉中分離的10種結晶性成份，經動物試驗發現馬兜鈴酸A具有明顯的抗早孕作用^[52]。還有，從尋骨風中萃取的馬兜鈴酸A對小鼠具有顯著的抗著床和抗早孕活性，羊膜囊注射此藥可終止犬和大鼠的中期妊娠^[53]。

第二節 馬兜鈴酸

壹、藥理研究

馬兜鈴酸(*aristolochic acid*)是馬兜鈴科植物中所含的主要活性成分，最早於1943年在*Aristolochia clematitidis*中發現^[54]。以往的文獻指出，馬兜鈴酸在很多生物實驗系統中，被發現可以抵禦感染和發炎，包括人類在內。例如AA-I可以抑制細菌(*E. coli*, *Ps. Aeruginosa*, *S. faecalis*, *S.*

aureus, and *S. epidermidis*) 的生長^[4]；持續3-10天給予健康受試者馬兜鈴酸(0.9 mg/day)的雙盲試驗中，結果顯示馬兜鈴酸會提高周邊白血球細胞的吞噬作用^[55]。另外還有許多研究證實馬兜鈴酸有抗發炎的作用，而此作用與抑制phospholipase A₂ (PLA₂)有關：Vishwanath發現肌肉注射或腹腔注射Vipera russelli蛇毒的PLA₂所引起小鼠腳掌水腫，可被馬兜鈴酸所抑制^[56]；Marshall同樣發現馬兜鈴酸可以抑制蛇毒PLA₂引起的小鼠腳掌水腫^[57]；Vishwanath將純化自人類關節滑液(human synovial fluid, HSF)的calcium-dependent neutral active phospholipase A₂ 注射於小鼠腳掌誘發水腫後，若把馬兜鈴酸與HSF-PLA₂ 混合注射小鼠腳掌，同樣發現水腫會被馬兜鈴酸抑制且呈劑量反應關係^[58]。而在體外試驗中，馬兜鈴酸亦被證實可以抑制多種來源的PLA₂ (HSF、*N. naja*、porcine pancreas、human platelet)引起的磷脂質水解作用；Rosenthal亦同樣發現馬兜鈴酸可以抑制由人類中性白血球而來的calcium-dependent neutral active phospholipase A₂ 活性^[59]。Lindahl 發現Group I及 Group II PLA₂ 存在敗血性休克的病人血清中，而馬兜鈴酸與indomethacin 對Group II PLA₂的抑制效果3-4倍於對Group I PLA₂^[60]。在不同發炎模式當中，皆發現馬兜鈴酸有抗發炎的功效^[57-61]，因而促進內含馬兜鈴酸的藥物使用，含馬兜鈴酸的配方用來治療關節炎、風濕病、痛風和慢性皮膚發炎疾病^[62-63]曾經盛行於1960年代的德國。

馬兜鈴酸除了有抗感染和抗發炎的藥理作用外，其止痛作用也可能與抑制phospholipase A₂ 有關。Denson研究phospholipase A₂ 在全身麻醉所扮演的可能角色，發現全身麻醉劑在臨床使用劑量下，會抑制calcium-activated potassium channels (“big” K⁺ or BK channels)，而此作用是藉由破壞phospholipase A₂—arachidonic acid 的訊息傳遞系統來達成，馬兜鈴酸I (250 μM)會抑制BK channels 達47%^[64]。另外，還有有研究顯示馬兜鈴酸可以阻礙雙氧水誘導的血小板聚集，而馬兜鈴酸也可以經由抑制arachidonic acid訊息傳遞路徑來降低羥自由基誘導的血小板活化^[65-66]。

貳、毒理研究

1. 馬兜鈴酸腎病變

1.1 馬兜鈴酸與中草藥腎病變的緣由

1992年比利時Vanherweghem^[67] 等人，發現兩名婦女發生快速進行性腎間質纖維化(rapidly progressive interstitial renal fibrosis)且近乎末期腎衰竭的情形，另外還有7名婦女曾服用同一家減肥診所藥物，也分別在1991年及1992年進行腎臟透析治療，此9人當中的8人曾經接受腎臟病理切片，病理檢查皆顯示廣泛的間質纖維化而無腎絲球病灶(extensive interstitial fibrosis without glomerular lesion) ，這些患者不是立即開始透

析治療，就是在3個月內腎功能急速惡化。於是Vanherweghem等人進行流行病學調查，發現在此一減肥診所在過去15年從未發生問題，直至1990年5月更換處方加入含有二味中藥：粉防己(*Stephania tetrandra*) 和厚朴(*Magnolia officinalis*) 的處方籤後，於1992年6月隨機抽樣25名從1990年開始服用新處方籤至少3個月的患者，結果有3位患者腎功能有減退的情形，在排除已知毒物的可能影響因素後，Vanherweghem等人在1993年發表論文指出這些病例的腎間質纖維化與可能與中草藥有關，隨後於1994年 Vanhaelen^[68] 等人以薄層色層分析法 (thin-layer chromatography, TLC) 檢查比利時進口12批所謂粉防己(*Stephania tetrandra*)的中藥材，發現其中11批誤用廣防己(*Aristolochia fangchi*)的情形，而廣防己因與使用中草藥有關，隨後遂有學者將此病變命名為中草藥腎病變(Chinese herb nephropathy, CHN)。之後1996年Schmeiser 和2000年 Nortier^[69-70] 在患者的病理腎臟組織標本中偵測得較高量的馬兜鈴酸與去氧核糖核酸(DNA)共價鍵結物，認為可能與馬兜鈴酸致突變與致癌作用有相關，進一步確認處方中含馬兜鈴酸之中草藥可能是導致中草藥腎病變的主要原因，於是將之正名為馬兜鈴酸腎病變 (Aristolochic Acid Nephropathy, AAN) 並被定義為此類腎病之名稱。

自1993年Vanherweghem 等提出有關中草藥腎病變的報導後，陸續有相同或相似的病例被提出與研究：例如英國2例^[71-72]，日本2例^[73]，

台灣 19 例^[74-75]等，由於馬兜鈴酸是引起中草藥腎病變的主因，因而含馬兜鈴酸的馬兜鈴科植物被聯合國所屬國際癌症研究署(IARC)認定為已知的人類致癌物，因此各國政府開始管制含馬兜鈴酸中藥的使用與進口。我國衛生署亦於 2003 年 11 月 4 日公布禁用五種含馬兜鈴酸的藥材(廣防己、青木香、關木通、馬兜鈴、天仙藤)。

馬兜鈴酸為馬兜鈴屬植物的主要成分，其基本化學結構為 3,4-methylenedioxy-10-nitro-phenanthrenic-1-acid，如圖 2.1 所示；其中馬兜鈴酸 I 是最主要的活性成分，馬兜鈴酸 II 次之。

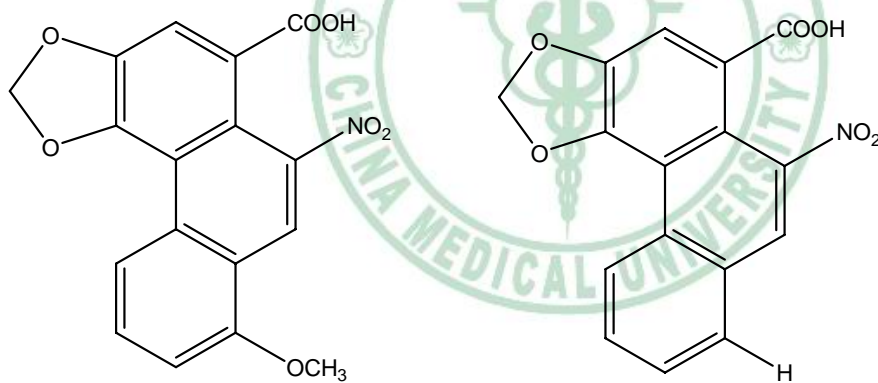


圖 2.1 馬兜鈴酸 I (左圖)與馬兜鈴酸 II (右圖)的化學結構式

1.2 馬兜鈴酸腎病變 (AAN)

在比利時發現標示為粉防己的中藥被廣防己替代誤用^[68]，因而造成所謂的中草藥腎病變，即現在確認的馬兜鈴酸腎病變。在比利時布魯塞

爾的馬兜鈴酸腎病變的病人剛開始血壓正常、早期有嚴重貧血現象，並有噁心、嘔吐、腹痛、頻尿、少尿或血尿等症狀；尿液檢查呈現 beta 2-microglobulin、cystatin C、Clara cell protein、retinal-binding protein、alpha 1-microglobulin 五種低分子量蛋白 (low molecular weight protein, LMWP) 增加^[76]及 neutral endopeptidase (NEP) 減少^[77]，伴有紅血球、白血球增加，血中尿素氮 (blood urine nitrogen)、肌酸酐 (creatinine) 上升，最後演變成快速進行性腎間質纖維化，這變化可以在幾個月到兩年之間發生^[78]。在其他地區則有因服用含馬兜鈴酸而導致腎小管壞死 (tubular necrosis) 以致呈現 Fanconi 症候群或急性腎衰竭^[79-81]。中國大陸的病例因使用含馬兜鈴酸的中藥 (關木通、廣防己) 單次劑量、累積劑量不同，而有較多元的臨床表現^[82]，若是在短期 (甚至一次) 大量服用含馬兜鈴酸中藥，則呈現急性馬兜鈴酸腎病變，可見到急性腎小管壞死，接著發展成急性腎衰竭。患者若是持續或間斷小量服用含馬兜鈴酸藥物後出現症狀，則呈現慢性馬兜鈴酸腎病變，可見到慢性腎小管間質腎炎，進展到慢性腎衰竭或快速進行性腎間質纖維化，臨床表現為夜尿增多、尿量正常或增多，水腫不明顯，早期出現嚴重且與腎功能不一致之貧血^[83]。若是患者間斷小量服含馬兜鈴酸藥物後數月出現症狀，則呈現腎小管功能障礙，而出現腎小管酸中毒和 (或) Fanconi 症候群。

另有一項研究從馬兜鈴酸造成的 Fanconic syndrome 的患者尿液分

析中發現，尿中的脯氨酸(proline)升高，而甘氨酸(glycine)數值正常，因腎臟近端腎小管刷狀緣的低親和性運輸系統(low-affinity transport system)及高親和性運輸系統(high-affinity transport system)共同分泌脯氨酸，而高親和性運輸系統分泌甘氨酸，因而推測馬兜鈴酸可能主要作用於腎臟近端腎小管刷狀緣的低親和性運輸系統^[81]。

馬兜鈴酸腎病變的主要病理特徵為在腎臟皮質淺層有廣泛性寡細胞腎間質纖維化(extensive hypocellular interstitial fibrosis)，伴隨著腎小管壞死及萎縮(tubular atrophy)，腎絲球相對較完整，但多見到微血管塌陷、基底膜出現皺摺及鮑氏囊(Bowman's capsule)變厚的情形；因內皮細胞水腫，使得腎小葉間動脈及入球小動脈壁變厚，故Depierreux等人推測馬兜鈴酸造成的病理變化是血管壁為最初病灶，接著形成缺血及腎間質纖維化，破壞部位由皮質部近端腎小管逐漸延伸至遠端腎小管，最後導致腎絲球硬化(global glomerular sclerosis)而造成腎衰竭^[84]。

1.3 馬兜鈴酸與泌尿道上皮細胞癌

在臨床上，馬兜鈴酸腎病變多有併發泌尿系統上皮細胞癌的病例報告^[71-72, 85-86]。在1994年Cosyns最先提出報告三名中草藥腎病變患者在接受腎移植手術時，在他們同時切除腎臟及輸尿管的標本裡發現有泌尿道上皮細胞不典型分化的情形，其中一人手術後其殘餘的輸尿管很快就有

移行細胞癌 (Transitional cell carcinoma, TCC) 發生^[87]。Schmeiser 等人從中草藥腎病變患者的腎摘除標本發現馬兜鈴酸代謝物的DNA鍵結物 (adducts)，這種馬兜鈴酸DNA鍵結物代表馬兜鈴酸暴露的特殊標記，而且與馬兜鈴酸的致突變性和致癌作用有關^[88]。1999年，Cosyns 等人進一步發現在10名中草藥腎病變患者的19個腎摘除標本裡，全部都有泌尿上皮細胞不典型分化的現象，其中4人有移行細胞癌；另外還發現這些病例的不典型分化泌尿道上皮細胞都有p53過度表現的情形^[86]。p53是一種腫瘤抑制基因，根據統計人類腫瘤超過50%都與p53的突變有關^[89]，上述觀察顯示中草藥腎病變患者的泌尿系統癌症與p53突變有關。接著於2000年，有研究統計分析曾經服用比利時布魯塞爾診所減肥藥物的105位病患的後續追蹤，其中共有43位需要接受透析治療或腎臟移植，而其中共有39位患者曾經接受病理組織學檢查，其中18位病患 (46.1%) 有泌尿道上皮細胞癌 (urothelial carcinoma)，19位病患 (48.7%) 的泌尿道上皮細胞呈現輕中度的分化變異 (dysplasia)，僅有兩位患者呈現正常組織細胞^[70]。

除了比利時的研究報告，回顧國人罹患疑似馬兜鈴酸腎病變合併泌尿道癌的文獻報告，其中新光醫院收集了20位病例(1994至1998年)，國泰醫院收集了12位病例(1995至1998年)，此32為病例共有的特點為臨床出現不知原因及快速進行的腎衰竭，但其用藥史中並沒有能得到他們服

用具有腎毒性藥物的資訊。這些患者的病理切片檢查特徵呈現腎小管上皮萎縮及間質性纖維化，但腎絲球尚完整，類似中草藥腎病變的病理組織變化，而這32人中有二人在幾年後發展出膀胱癌^[74-75]。臺北馬偕醫院則有一病例報告為懷疑因服用含馬兜鈴酸 (AA-I 7 μg/g)的中藥二個月而導致近端腎小管病變 (Fanconi's syndrome)及低血鉀症^[90]。台中榮總發現有一10歲男孩因服用含馬兜鈴酸的中藥而導致嚴重貧血、Fanconi's syndrome及進行性腎衰竭^[91]。有臨床研究也提出，比利時馬兜鈴酸腎病變的病人持續食入馬兜鈴屬藥物(>200克)為罹患膀胱癌的顯著危險因子^[70, 87]。

2. 馬兜鈴酸之毒性作用

馬兜鈴酸於1982年被報導對*Salmonella typhimurium*可以直接誘發突變^[92]。1983年起Mengs陸續發表馬兜鈴酸對大鼠、小鼠具有致癌性，可誘發胃癌(adenocarcinomas)、淋巴癌(malignant lymphomas)、腎臟癌(aednomas)、肺癌(alveologenic carcinomas)，並且對腎臟的損害存在著劑量反應關係^[93-95]。在1991年，Schmeiser等人以馬兜鈴酸誘導小鼠及大鼠產生腫瘤，然後觀察這些腫瘤組織與鄰近正常組織的基因變化。結果發現這些腫瘤組織的c-Ha-ras codon 61被馬兜鈴酸鍵結，並產生AT→TA transversion突變，進而引發癌症，但這些鄰近正常組織則無這樣的突變。

正常情況下，DNA複製時adenine會優先和dTTP形成氫鍵鍵結，而guanine優先和和dCTP形成氫鍵鍵結。Broschard等人發現，被馬兜鈴酸結合的adenine位置可以和dTTP及dTTP機會平均地鍵結，而被鍵結的guanine位置則如常地先和dCTP結合，所以馬兜鈴酸會誘發較高機率的AT→TA transversion 點突變^[96]。1995年Broschard等人進一步發現dA-AA-I, dG-AA-I and dA-AA-II會嚴重影響DNA的複製，而AA-adenine鍵結物比AA-guanine鍵結物具有更高的致突變性^[97]。馬兜鈴酸的致突變性研究在λ/lac Z 基因轉植鼠(MutaTM Mouse)同樣獲得證實，Kohara等人以每日每公斤 15 毫克馬兜鈴酸的劑量，一週一次經胃管餵食λ/lac Z 基因轉植鼠，共餵食四周。然後觀察轉植基因lac Z基因和c II基因的在十個器官的突變率(mutant frequency, MF)，結果發現在標靶器官前胃、腎臟和膀胱的突變率顯著高於控制組，進一步分析標靶器官在c II基因序列的變化，發現AT→TA transversion的突變率增加^[98]。

馬兜鈴酸的致癌作用，被認為是和DNA形成鍵結物相關，Schmeiser等人於1988年利用放射性同位素³²P後標定方法 (³²P-postlabelling assay) 在體外(in vitro)及動物(Wistar rats)體內測得AA-DNA鍵結物^[99]，接著用同樣的方法在Sprague-Dawley rats的前胃亦測得AA-DNA鍵結物^[100]。馬兜鈴酸會和DNA鍵結，deoxyadenosine是主要被修飾的地方，其次是deoxyguanine。在比利時的馬兜鈴酸腎病變病人的腎臟組織可被偵測到

AA-DNA鍵結物^[88, 101]，Schmeiser等人利用放射性同位素³²P後標定方法測定5位兜鈴酸腎病變病人及6位其它原因導致腎病的病人，結果發現AA-DNA鍵結物(dA-AA-I adduct) 僅出現在這5位馬兜鈴酸腎病變病人的腎臟組織裏^[88]。Bieler 在兩位馬兜鈴酸腎病變病人的腎臟及泌尿道組織測定並定量AA-DNA鍵結物，發現dA-AA-I adduct 的量遠比dG-AA-I adduct 及dA-AA-II adduct來的多，而此現象與大鼠單一口服AA-I所產生的結果類似，因此推論馬兜鈴酸對動物的致癌及致突變作用機轉與馬兜鈴酸腎病變病人對人類產生泌尿道癌機制類似^[101]。

馬兜鈴酸的活性代謝物可以激活原致癌基因ras 基因與抑制抑癌基因p53基因^[102-103]，因此，研究馬兜鈴酸的代謝活性與研究DNA鍵結物的形成關係十分重要。不管是在體外或是在體內實驗研究都指出，AA-I和AA-II會在體內經酵素還原代謝成具有活性的中間產物(馬兜鈴酸醯胺化合物 aristolactam)，其形成為一親電子的活性代謝物 aristolactam nitrenium ion 會與體內大分子反應，進而形成馬兜鈴酸-DNA鍵結物^[69, 99]。Schmeiser等人^[99]首先在體外利用大鼠肝臟萃取物(S9)作為酵素系統，來活化AA-I和AA-II進而形成DNA鍵結物，S9內的還原酵素經由硝基還原(nitroreduction)可以活化代謝馬兜鈴酸^[104]，證實nitroreduction為馬兜鈴酸代謝活性的重要步驟。其團隊假設馬兜鈴酸代謝成N-hydroxyaristolactam，其可能進一步還原成 aristolactams 或通過

Bamberger 重新排列 (Bamberger rearrangement) 而被重新排位成 7-hydroxyaristolactams^[105] , 如圖2.2。之後的研究發現肝臟微粒體對於馬兜鈴酸的活化代謝能力取決於cytochrome P450 (CYP) 1A1、CYP1A2 及NADPH:CYP還原酶^[106-107] , 人類的腎臟的微粒體同樣地可以還原活化馬兜鈴酸形成DNA 鍵結物^[107-108] , 其中肝臟微粒體酵素CYP1A2及腎臟的微粒體酵素NADPH:CYP還原酶對AA-I的還原活化力最強。另外, NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) 、 xanthine oxidase (XO)^[109]、DT-diaphorase、cytosolic nitroreductase、prostaglandin H synthase (PHS)^[110]同樣可以還原活化AA, 進而與DNA作用形成DNA鍵結物。

許多關於馬兜鈴酸致突變性和致癌性在齧齒類的研究現已被作為人類情況的模型。AA-DNA鍵結物是偵測馬兜鈴酸暴露很好的的生物指標, 同時DNA鍵結物在馬兜鈴酸腎病變的病人停藥幾年後仍可被測量到^[111], 在馬兜鈴酸腎病變的病人的腎臟和泌尿道組織, 馬兜鈴酸三個專一的鍵結物, 其中最主要的是dA-AA- I , 次要的兩個是dG-AA- I 和dA-AA- II 已被確認出來, 而這些相同的DNA鍵結物也在大鼠暴露馬兜鈴酸的組織中被偵測到^[112]。p53是腫瘤抑制基因, 在許多的腫瘤可以發現p53基因的突變, 超過50%的人類腫瘤都與p53基因突變相關^[89]。

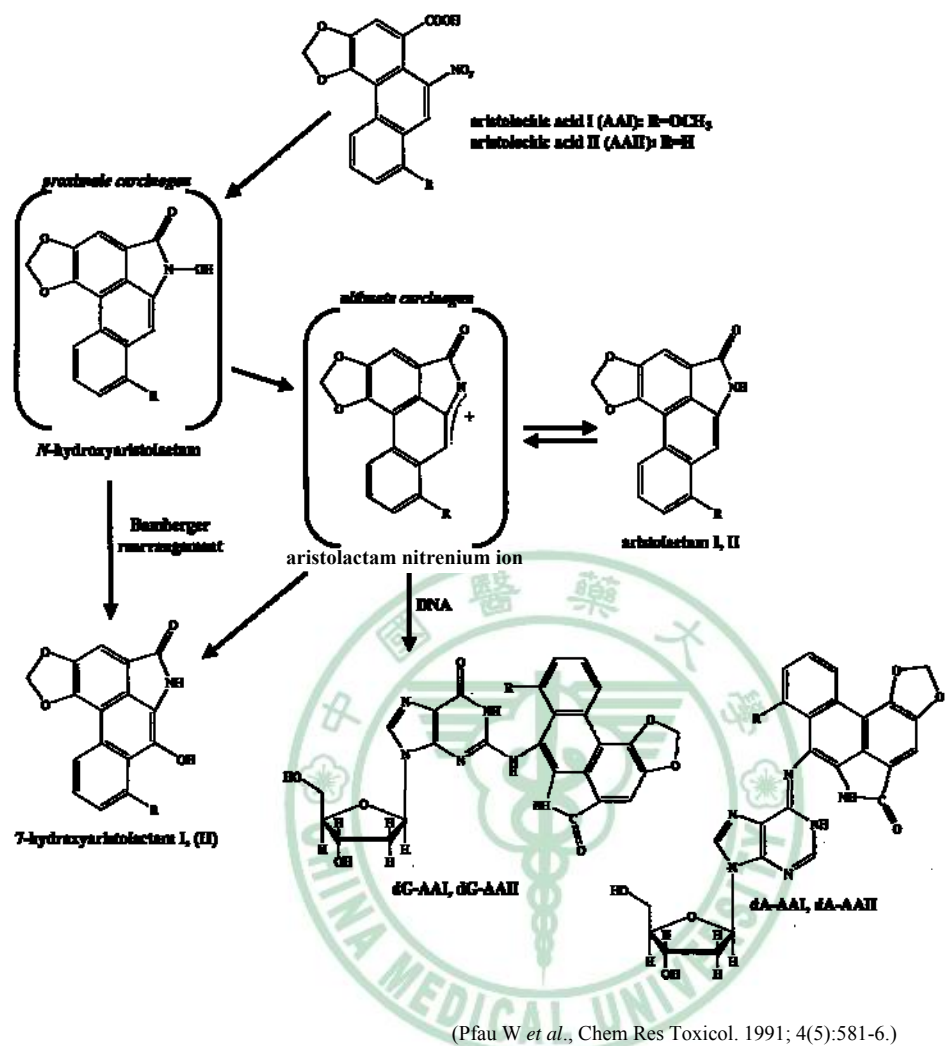
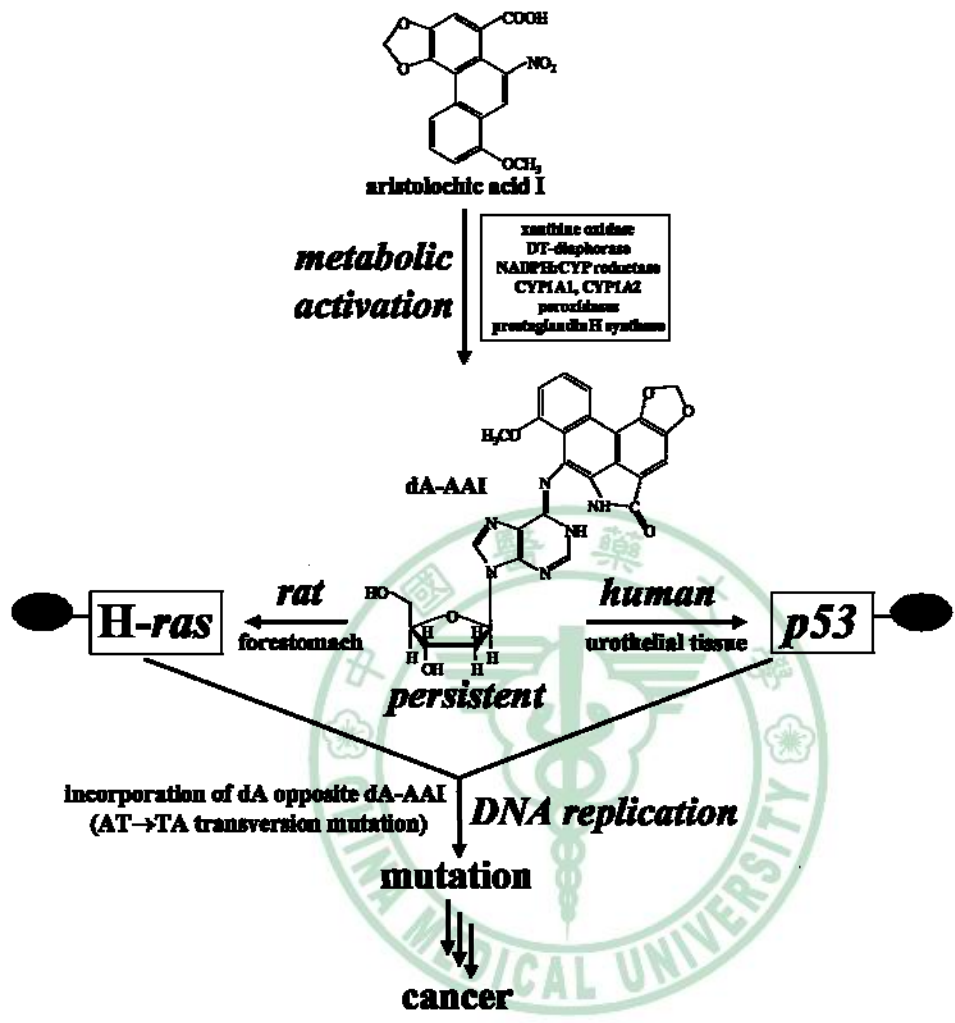


圖 2.2 馬兜鈴酸的可能活化機轉與 DNA 共價鍵結物

Cosyns 在 AAN 病患的泌尿道上皮細胞發現有不典型分化的情況，而且這些泌尿道上皮細胞不典型分化都有 P53 蛋白過度表現的情況，顯示 p53 的突變可能和馬兜鈴酸腎病變病患的泌尿道上皮癌相關^[86]。Arlt 等人綜合上述觀點，對馬兜鈴酸的致癌機轉提出了假說^[85, 113]，如圖 2.3。

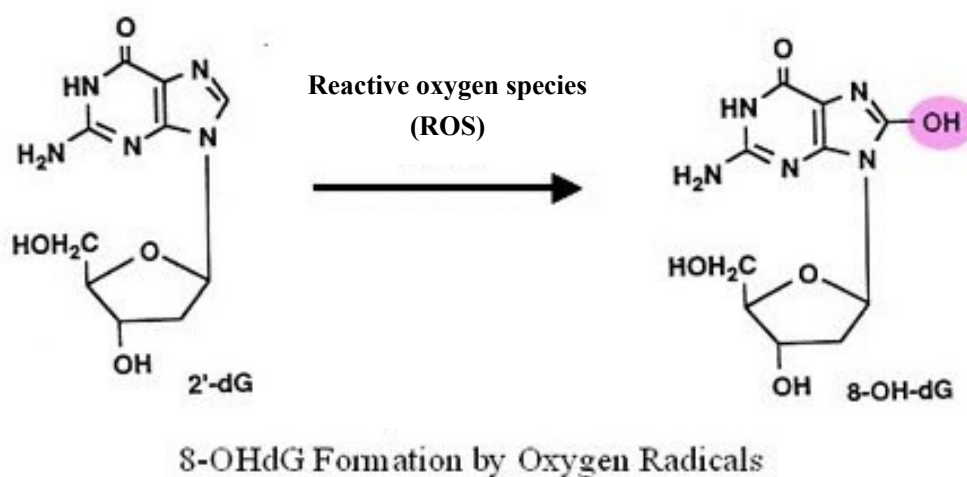


(Arlt VM *et al.*, Mutagenesis. 2002 ; 17(4):265-77.)

圖 2.3 馬兜鈴酸的可能致癌機轉

2.1 馬兜鈴酸致氧化 DNA 傷害

許多研究證實活性氧族群(reactive oxygen species, ROS) 會使DNA單股斷裂或產生修飾性鹼基而導致氧化DNA傷害，而DNA發生氧化性傷害與年老、癌症有關^[114-115]。8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)被認為是一個主要的氧化DNA的損傷指標，8-OHdG為一guanosine鍵結物，鍵結在ROS 的氫氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 上， deoxyuganosine (dG)是DNA的組成之一，當細胞內DNA鹼基guanine的第八個位置被氧化後，便形成8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)^[116]，如圖 2.4 示，8-OHdG可以被OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase)切除修復^[117-120]。



(Kasai H *et al.*, Environmental Mutagen Research. 1988; p73-8)

圖 2.4 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)之形成

馬兜鈴酸被發現對肝癌細胞也會導致氧化DNA傷害。有研究利用微

核試驗 (micronucleus test, MN)來測試馬兜鈴酸對染色體的傷害，發現在 12.5 μM 至 50 μM 間的馬兜鈴酸濃度，微核有明顯的增加。在觀測DNA傷害方面，則利用螢光的變化來偵測一氧化氮 (2,3-diaminonaphthalene (DAN) assay)和 8-OHdG免疫細胞染色，發現馬兜鈴酸的濃度大於 50 μM 會導致一氧化氮和 8-OHdG有明顯的增加^[121]。

第三節 微陣列技術

DNA 微陣列晶片分析技術(Microarray)又稱為基因晶片技術，最早是從 Southern blotting 發展而來；其原理是在固體基因表面上集成已知序列的基因探針，被測生物細胞或組織中大量標記的核酸序列與上述探針陣列進行雜交(Hybridization)，通過檢測雜交探針的位置，實現基因資訊的快速檢測。由於 DNA 為雙股螺旋結構，具有互補的專一特性，因而檢體中的標地核酸，會雜交固定在 cDNA 微陣序列探針的基因晶片上，因此基因晶片技術能夠對樣本中的核酸序列資訊進行快速、並行、高通量和低成本測量分析，特別是其大量並行化蒐集生物資訊的特點是目前其他分析技術所無法比擬的。DNA微陣列晶片分析技術，為觀察藥物對細胞整個基因組表達變化提供了可能^[122]；使用微陣列技術探討基因的改變情形，在 1987年首次被提出，並被用來探討哪些基因會受interferon的影響^[123]，

而利用微陣列基因晶片分析技術來分析基因的表現^[122]，則是於1995年首次被 Patrick O. Brown等提出；在一微陣列內含有完整的真核基因(*Saccharomyces cerevisiae*)組，則是在1997年被報導出來^[124]。以往傳統的藥理及毒理學研究往往是通過大量的動物實驗來進行，由於慢性或長期作用難以在短時間內觀察出來，特別是毒性反應及副作用，而由於藥理及毒理機制不僅涉及一個或幾個基因的改變，而是許多基因相互作用的結果，因此藉用微陣列分析技術來觀察藥物的作用機轉，其原理是利用藥物與細胞基因的相互作用，細胞會引起一系列基因表達的改變，這種變化會發生於細胞改變前，因此具有高靈敏度和短檢測時間的特點。



第三章 材料與方法

實驗設計與流程請見圖 3.1。

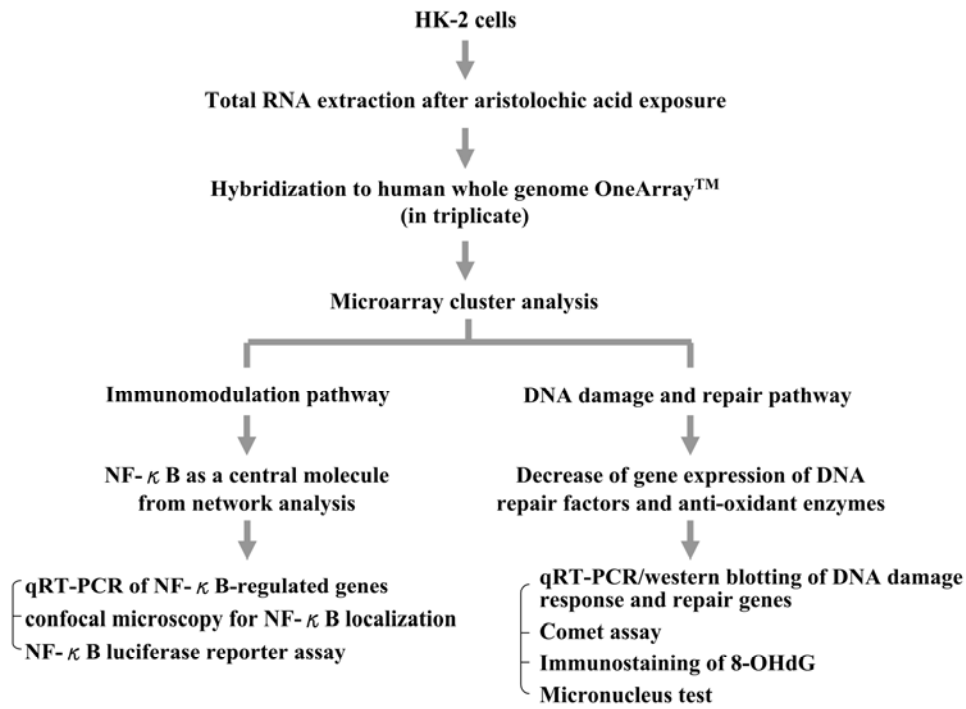


圖 3.1 實驗設計與流程

第一節 材料

壹、細胞來源

人類正常腎臟近端小管上皮細胞株(HK-2, BCRC 60097), 購自新竹食品工業發展研究所。

貳、藥物和試劑套組來源

馬兜鈴酸鈉鹽(AA-I : AA-II = 41% : 56%)購自Sigma。MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 購自Sigma。HK-2 細胞培養液 keratinocyte serum-free basal medium 購自Gibco。RNeasy Mini kit 購自Qiagen, Valencia, CA。p65 subunit of NF- κ B rabbit polyclonal antibody (ab7970) 購自Abcam。SuperFect[®] transfection reagent 購自Qiagen, Valencia, CA, USA。Anti-8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) monoclonal antibody (N45.1) 購自Fukuroi, Japan。Novolink Polymer Detection System 購自Novocastra。OGG1 購自Novus Biologicals, Littleton, CO。p21, c-fos, caspase-3, Bax, and α -tubulin 購自Santa Cruz Biotechnology。

第二節 方法

壹、細胞培養

人類正常腎臟近端小管上皮細胞株(HK-2, BCRC 60097), 購自新竹食品工業發展研究所。HK-2 培養在keratinocyte serum-free basal medium (Gibco)中, 含有 5 ng/ml的重組表皮生長因子, 和 50 µg/ml的胎牛腦下垂體萃取物, 不含抗生素, 在 37°C和 5% CO₂的培養箱中培養。

貳、藥物處理

馬兜鈴酸鈉鹽(AA-I (41%)和 AA-II (56%))購自 Sigma, 並溶在滅菌過的二次水中, 儲存在-30°C。HK-2 細胞種在不同培養器皿中(75T、25T、6孔盤、24孔盤, 或 96孔盤)培養 24 小時, 加入不同濃度的馬兜鈴酸(10、30 或 90 µM), 並再培養 24 小時; 或者是加入 30 µM 的馬兜鈴酸, 再培養 1、3、6、12 和 24 小時。離心去除含馬兜鈴酸的細胞培養上清液後, 細胞用 PBS 清洗兩次, 進行下面實驗。

參、MTT 存活率測試

MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)購自Sigma並溶在phosphate buffered (PBS)中, 細胞存活率測試藉由MTT來分析。將HK-2 細胞種在 96孔盤或 75T當中, 經過 24 小時的培養, 加入不同濃度的馬兜鈴酸(10、30 或 90 µM), 並再培養 24 小時; 或者是加入

30 μ M的馬兜鈴酸，再培養 1、3、6、12 和 24 小時。離心去除含馬兜鈴酸的細胞培養液後，並用PBS清洗兩次，再加入含有 0.5 mg/ml MTT的細胞培養液。經過 4 小時的反應，MTT會和細胞中的琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase)反應形成藍色結晶(formazen)，再利用 10% SDS/0.1N HCl溶解藍色結晶。利用microplate reader測 570 nm和 650 nm的吸光值，650 nm波長當作背景值。細胞的相對存活率公式計算為：經由馬兜鈴酸處理的細胞吸光值/只加入等量水處理的細胞吸光值)*100%。數據以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，實驗的重複次數為三次。

肆、Total RNA 萃取

將細胞種在 75T當中，翌日加入不同濃度的馬兜鈴酸(10、30 或 90 μ M)，培養 24 小時；或者是加入 30 μ M的馬兜鈴酸，再培養 1、3、6、12 和 24 小時。離心去除含馬兜鈴酸的細胞培養液後，並用PBS清洗兩次。利用RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA)進行細胞total RNA的萃取。接著利用Beckman DU800 分光光度計(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)進行total RNA的定量。對於 A_{260}/A_{280} 比值大於 1.8 的樣品，進一步利用Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)評估其total RNA品質。只有當樣品的RNA integrity number高於 8.0

時，才會用於下述的基因微陣列實驗分析。

伍、基因微陣列分析

將 5 μ g total RNA 利用 MessageAmpTM aRNA kit (Ambion) 經由試管外轉錄步驟來增加樣品量。增量後的 RNA (amplified RNA, aRNA) 再和螢光物質 Cy5 (Amersham pharmacia) 進行標定。然後和 Phalanx 公司所提供的雜合反應緩衝劑，將螢光標定的 aRNA 與 Mouse Whole Genome OneArrayTM 晶片 (Phalanx Biotech group) 進行雜合反應，於 50°C 作用一夜。在接後續的清洗處理步驟，將非專一性結合的標的物由晶片上移除。再將晶片以離心方式乾燥，並利用掃瞄器 Axon 4000 Scanner (Molecular Device) 進行螢光強度的掃瞄。微陣基因分析實驗的重覆數為 3 次。

再利用 Genepix 4.1 版 (Molecular Device) 分析軟體進行螢光強度分析，每一點的訊號經由扣除周圍背景值的方式來校正其強度，並刪除作為內在控制的探針，或是訊號雜訊比值小於零的點。剩餘通過此門檻的點則藉由 Limma 進行 Normalization^[125]，得到的資料在使用 Gene Expression Pattern Analysis Suite v. 3.1 軟體計算兩組實驗是否有統計上有意義差異的基因^[126]。我們已將原始的基因微陣列數據提交到 Gene Expression Omnibus (GEO)，系列號碼為 GSE18243。系列包含空白組與

處理組兩個樣品。樣品的號碼為GSM455880 (處理組)，and GSM455881 (空白組)。

利用Limma裡面的GeneSetTest功能，來探討在HK-2 細胞中，哪些生物路徑會受馬兜鈴酸調控。基因選擇要件如下:需基因變化倍率(積分)正負大於 2.7 倍，才進入下列路徑分析，路徑分析以ArrayTrack為主，ArrayTrack包括KEGG路徑和PathArt 路徑(Jubilant Biosys)，總共有 352 路 徑 進 入 分 析 。 ArrayTrack (<http://www.fda.gov/nctr/science/centers/toxicoinformatics/ArrayTrack/>)，PathArt路徑(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。

此外，我們也利用BiblioSphere Pathway Edition軟體(Genomatrix Applications, <http://www.genomatix.de/index.html>)分析fold changes >2.0 和false discovery rates < 0.05 的基因之間交互網路圖譜，BiblioSphere Pathway Edition軟體是以知識庫分析為基礎來進行分析^[127]。最後，以Cytoscape軟體來構築馬兜鈴酸調控的基因之間的交互網路圖譜，包含NF- κ B相關基因的交互網路^[128]。

陸、定量反轉錄聚合酶連鎖反應(qRT-PCR)

NF- κ B和DNA修補路徑相關基因表現，進一步利用qRT-PCR確認其表現量。將HK-2 細胞種在 75T當中，經過 24 小時的培養，加入不同濃度的馬兜鈴酸(10、30 或 90 μ M)，並再培養 24 小時；或者是加入 30 μ M 的馬兜鈴酸，再培養 1、3、6、12 和 24 小時。抽取total RNA，利用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit反式轉錄RNA。在定量反轉錄聚合酶連鎖反應實驗中，使用 1 μ l的cDNA和 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)進行反應。條件為 95°C、10 分鐘後，進行 40 個循環的 95°C、10 秒，60°C、1 分鐘。相對mRNA的量計算方式是用comparative C_t方法。每一個反應是應用生物系統公司的 7300 Real-time PCR系統。實驗用的正向(F)和反向(R)引子序列於表 3.1 中。實驗的重覆數為 3 次。

柒、免疫染色(NF- κ B p65) /共軛焦顯微鏡法

將細胞種在含有蓋玻片的 24 孔盤當中，經過 24 小時的培養，加入不同濃度的馬兜鈴酸(10 和 30 μ M)，並再培養 24 小時，去除含有馬兜鈴酸的上清液，以 PBS 清洗兩次。再加入冰的丙酮置於 4°C 冰箱進行固定 30 分鐘。接著加入一級抗體 p65 subunit of NF- κ B rabbit polyclonal

antibody (ab7970, abcam)在 4°C 作用一夜。接著加入二級抗體 Alexa

Fluor® 488- conjugated secondary goat anti-rabbit antibody 在室溫作用 1

表 3.1 qRT-PCR 實驗的正向(F)和反向(R)引子序列

| Gene | primer sequence |
|---------|--|
| CCL20 | sense: 5'- GCTCCTGGCTGCTTTGATGT-3' antisense: 5'- GAATACGGTCTGTGTATCCAAGACA-3' |
| CD68 | sense: 5'- TCTGCCACCCAGAACCA-3' antisense: 5'- CACAGGGCTGGGAACCATT-3' |
| CYP1A1 | sense: 5'- ATGGGCAAGCGGAAGTGTAT-3' antisense: 5'- CCAGTGGCACGCTGAATTC-3' |
| ERCC1 | sense: 5'- TCTCCCGGGTGAATGT-3' antisense: 5'- GCGATGAGCTGTTCCAGAGAT-3' |
| ERCC2 | sense: 5'- GGCAAAGTGTCCGAGGGAAT-3' antisense: 5'- CCTTGAGAATGCGGCTCTGT-3' |
| GADD45B | sense: 5'- TGTACGAGTCGGCCAAGTTG-3' antisense: 5'- ATTTGCAGGGCGATGTCATC-3' |
| IGFBP3 | sense: 5'-CAGCGCTACAAAGTTGACTACGA-3' antisense: 5'-ATTTCTCTACGGCAGGGACCAT-3' |
| IL8 | sense: 5'-FCTTTCCACCCCAAATTTATCAAAG-3' antisense: 5'-RAGAGCTCTCTTCCATCAGAAAGCT-3' |
| LTB | sense: 5'-ACTTCTCTGGTGACCTTGTTGCT-3 antisense: 5'- AGCTTCTGAAACCCCAGTCCTT-3 |
| MGMT | sense: 5'- CCTGGCTGAATGCCTATTTCC-3' antisense: 5'- TGTCTGGTGAACGACTCTTGCT-3' |
| NAIP | sense: 5'- CTGGATGCTGTCCCCTGTTAA-3' antisense: 5'- AGGAGCTGGTCACAGATGATACTG-3' |
| OGG1 | sense: 5'- TTCCAAGAGGTGGCTCAGAAAT-3' antisense: 5'- CGATGTTGTTGTTGGAGGAACA-3' |
| PARP | sense: 5'- GGAGTCGGCGATCTTGGA-3' antisense: 5'- AGTAATAGGCATCGCTCTTGAAGAC-3' |
| SAA2 | sense: 5'-CCGATCAGGCTGCCAATAAA-3 antisense: 5'-GCAGAGTGAAGAGGAAGCTCAGT-3 |
| TNFRSF9 | sense: 5'-TGCGAGAGAGCCAGGACACT-3'-3 antisense: 5'-GAAACGGAGCGTGAGGAAGA-3' |
| TP53 | sense: 5'- GGGTTAGTTTACAATCAGCCACATT-3' antisense: 5'- GGGCCTTGAAGTTAGAGAAAATTCA-3' |

小時。在 NF- κ B 染色後，加入 propidium iodide 染劑，在室溫作用 15 分鐘進行細胞核的染色。利用雷射掃瞄共軛焦顯微鏡(TCS SP2 system, Leica)取得螢光影像。

捌、NF- κ B/luciferase 報導基因分析

將細胞種在 24 孔盤當中，經過 24 小時的培養後，進行基因轉染，利用 SuperFect[®] transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA)轉入 5 μ g 的 NF- κ B 質體，或是轉入空的質體(pcDNA 3.1)。經過一夜的培養後，加入 10 μ M 的馬兜鈴酸，再培養 24 小時。接著利用冰的 PBS 清洗兩次，再加入 350 μ l 的細胞裂解液 Triton lysis buffer (50 mM Tris-HCl、1% Triton X-100、1 mM dithiothreitol, pH 7.8)，利用刮削器將細胞收集起來。加入 luciferin 進行反應，測試 luciferase 的活性。單位以 relative luciferase unit (RLU) 表示，活化倍率的計算方式為處理馬兜鈴酸的 RLU 除以未經處理馬兜鈴酸的 RLU 來呈現。

玖、彗星試驗

將 HK-2 細胞種在 6 孔盤當中，經過 24 小時的培養，加入不同濃度的馬兜鈴酸(10、30、90 和 150 μ M)，並再培養 3 或 24 小時，去除含有馬兜鈴酸的上清液，以 PBS 清洗兩次。將處理過藥物的細胞收集下來，

以 PBS 清洗一次，並且加入 1X PBS (稀釋成 10 μ l 內含 10000 個細胞)。
將上膠與下膠以微波方式溶解後放在熱水中，避免凝固。在磨砂載玻片
上以鉛筆標上樣品代號，置入 70 μ l 下膠(0.5 g LMA + 0.5 g NMA)於載玻
片上，蓋上蓋玻片，凝固後拿下蓋玻片，完成第一層膠：接著取 10 μ l
細胞液加上 60 μ l 上膠(0.5 g LMA)，加在第一層膠上，蓋上蓋玻片，凝
固後拿下蓋玻片(放置於冰上)。將含膠的載玻片置入染缸中，染缸中放
置 Lysis Buffer (2.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl、100 mM EDTA、1% Triton
X-100)中，靜置約一小時(放置於冰上)，再將含膠的載玻片移至含預冷
過 Alkaline buffer 之電泳槽靜置 20 分。將電泳槽置於冰上，以 Alkaline
buffer 為電泳液跑 30 min (固定 25 V;約為 300 mA)。將含膠的載玻片移
至置入含 0.4 M Tris Buffer (pH=7.5)染缸中，靜置中和 15 分鐘(放置於冰
上)，再置入 Methanol 的染缸，靜置脫水 5-10 分鐘。取出玻片加入 40 μ l
PI (5 μ g/ml)蓋滿膠體，反應 5-10 分鐘，以螢光顯微鏡觀察細胞脫尾現
象，照相後以 CometScore 軟體分析 DNA 脫尾程度。

拾、8-OHdG 免疫染色法分析

將細胞種在含有蓋玻片的 24 孔盤當中，經過 24 小時的培養，加入
不同濃度的馬兜鈴酸(10、30 或 90 μ M)，並再培養 24 小時，去除含有馬
兜鈴酸的上清液，以 PBS 清洗兩次。再加入冰的丙酮置於 -20°C 冰箱進行

固定 10 分鐘，固定完後將蓋玻片晾乾。染色之前，先利用 PBS 進行再水合作用，接著加入 RNase A (100 µg/ml) 在 37°C 作用 50 分鐘，去除 RNA，以 PBS 清洗三次。接著加入 proteinase K (1 µg/ml) 在室溫中作用 7 分鐘，以 PBS 清洗三次。為使 DNA 變性，加入 4 N HCl 作用 5 分鐘，再用 50 mM Tris-base 進行中和 4 分鐘，再以 PBS 清洗三次。用 3% H₂O₂ (溶於甲醇中) 反應 15 分鐘減低內生性的過氧化氫酶反應。接著使用 Novolink Polymer Detection System (Novocastra) 進行免疫染色。加入 protein block (RE7166, 0.4% Casein in phosphate-buffered saline) 在室溫中作用 30 分鐘，減少非專一性的鍵結。接著加入一級抗體 anti-8-hydroxydeoxyguanosine (anti-8-OHdG) monoclonal antibody N45.1 (Fukuroi, Japan, 1:200 dilution) 在 4 °C 作用一夜，以 PBS 清洗三次。再加入 post primary block (RE7167, 10 % animal serum) 在室溫下作用 30 分鐘，以 PBS 清洗三次。最後加入 NovoLink™ polymer (RE7168, anti-mouse/rabbit IgG-Poly-HRP) 在室溫下作用 30 分鐘，以 PBS 清洗三次。利用 diaminobenzidine (DAB) 進行呈色反應。再將蓋玻片封片，以光學顯微鏡觀察 8-OHdG 染色的細胞數目。

拾壹、西方墨點法分析

將處理過馬兜鈴酸的細胞，以 PBS 清洗兩次，加入 SDS sample buffer 並利用刮削器收集細胞。將收集下的細胞以 10,000 rpm 離心 5 分鐘，收

集上清液，利用 Bradford 方法進行蛋白質定量。將定量完的蛋白質加熱 95°C 長達 5 分鐘，進行蛋白質變性。取 45 μg 的蛋白質以 10% SDS-PAGE 做蛋白質電泳。再將膠體上的蛋白質轉漬到硝酸纖維薄膜(nitrocellulose membranes)。利用 5%的脫脂奶粉進行 blocking 長達 1 小時，減少非專一的鍵結。接著加入一級多株抗體 OGG1 (Novus Biologicals, Littleton, CO)、c-fos 和 Bax (Santa Cruz Biotechnology)；一級單株抗體 p21、caspase-3 和 α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology)，稀釋倍數為 1:1000 在 4°C 作用一夜。接著利用 TBS-Tween 清洗三次，每次十分鐘。再加入二級抗體(goat anti-mouse 和 goat anti-rabbit)，稀釋倍數為 1:10000 在室溫作用 1 小時，再利用 TBS-Tween 清洗三次，每次十分鐘。最後以 ECL 顯影。

拾貳、微核試驗分析

HK-2 細胞種在蓋玻片上，處理不同濃度的馬兜鈴酸，進行 24 小時的培養後，去除含有馬兜鈴酸的上清液，以 PBS 清洗兩次。為了獲得雙核細胞，加入 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 cytochalasin B 作用 16-24 小時。接著去除含有 cytochalasin B 的細胞培養液，以 PBS 清洗兩次後，利用甲醇在 4°C 中進行固定 30 分鐘。將蓋玻片加入 0.1 mg/ml 的 acridine orange 在黑暗中進行染色 10 分鐘，接著進行封片。利用螢光顯微鏡觀察微核現象，計

數雙核細胞細胞質含有直徑介於 1/3-1/20 細胞核大小的小核為微核，每次實驗計數兩片玻片共 1000 顆雙核細胞。

拾參、實驗統計分析

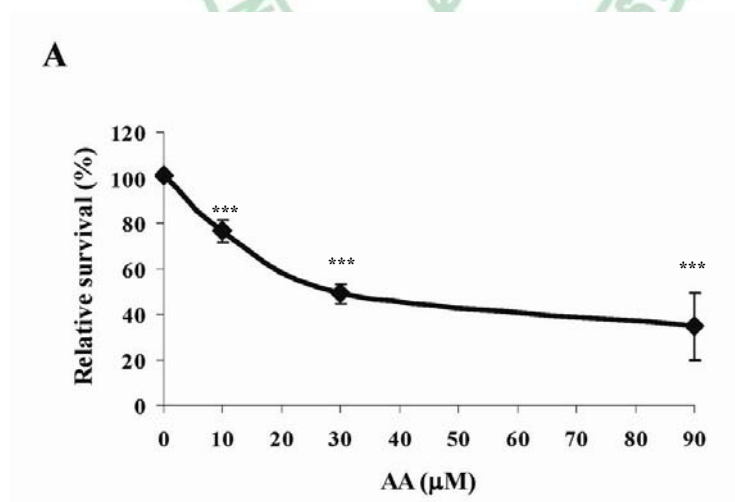
相關數據資料以平均值±標準差(mean ± SD)表示，並應用 Student's t-test 及 one-way analysis of variance (ANOVA)進行統計分析。p <0.05 判定為具有統計上顯著意義。



第四章 結果

第一節 馬兜鈴酸對 HK-2 細胞生長影響的時間及劑量反應關係

將 HK-2 細胞細胞種在 75T 或 25T，翌日加入不同濃度的馬兜鈴酸 (10、30 或 90 μM)，培養 24 小時(圖 4.1A)；或者是處理 30 μM 馬兜鈴酸，培養 1、3、6、12 和 24 小時(圖 4.1B)，利用 MTT 測試其存活率，發現存在劑量和時間反應關係。如圖 4.1A 所示，隨著馬兜鈴酸濃度越高，存活率越低，分別為 $81.9 \pm 4.6\%$ 、 $55.2 \pm 3.7\%$ 和 $45.2 \pm 1.9\%$ 。如圖 4.1B 所示，隨著暴露時間越長，存活率越低，分別為 101.1 ± 0.9 、 104.0 ± 0.8 、 99.8 ± 1.0 、 77.9 ± 0.4 和 50.0 ± 0.2 。此為三次實驗的平均值，*** $P < 0.001$ 表示有顯著差異。



三次實驗的數據以 one way ANOVA 進行檢測， $p < 0.001$ ***，表示有顯著差異。

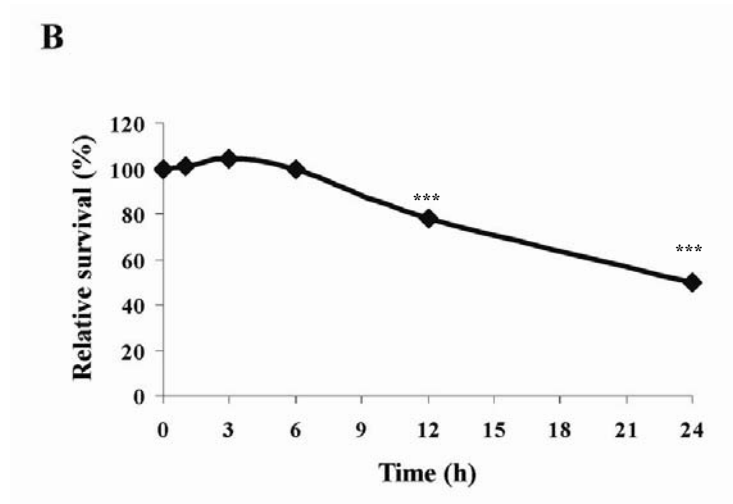


圖 4.1 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞對其存活率影響的劑量及時間反應關係

三次實驗的數據以 oneway ANOVA 進行檢測， $p < 0.001^{***}$ ，表示有顯著差異。

第二節 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞的基因表現圖譜分析

馬兜鈴酸處理 HK-2 細胞後，抽取 RNA，進行螢光標定，再和晶片進行雜合反應。我們利用 Limma package 裡面的 GeneSetTest，分析探討 HK-2 細胞被 10、30 和 90 μM 三種不同濃度馬兜鈴酸處理後的基因群組。結果如表 4.1 所示，DNA repair、response to DNA damage stimulus、macromolecule metabolic process 和 carbohydrate metabolic process 等相關生物路徑的基因，皆明顯受不同濃度的馬兜鈴酸所調控。

表 4.1 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞的基因表現圖譜之集群分析

| Biological processes | Genes | P-values | | |
|---|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 10 μ M AA | 30 μ M AA | 90 μ M AA |
| Apoptosis | 295 | 4.00×10^{-4} | 1.60×10^{-3} | 1.19×10^{-5} |
| Carbohydrate metabolic process | 205 | 4.90×10^{-5} | 4.00×10^{-4} | 6.17×10^{-5} |
| Cell cycle | 169 | 2.40×10^{-3} | 3.04×10^{-2} | 8.30×10^{-6} |
| DNA-dependent DNA replication | 42 | 2.10×10^{-3} | 1.00×10^{-3} | 2.29×10^{-2} |
| DNA metabolic process | 236 | 1.00×10^{-4} | 3.70×10^{-3} | 7.43×10^{-7} |
| DNA repair | 166 | 3.15×10^{-7} | 7.70×10^{-5} | 1.75×10^{-7} |
| Extracellular matrix organization and biogenesis | 17 | 1.80×10^{-3} | 9.43×10^{-6} | 8.21×10^{-2} |
| Extracellular structure organization and biogenesis | 13 | 4.30×10^{-3} | 1.31×10^{-2} | 3.40×10^{-1} |
| Lipid metabolic process | 195 | 3.00×10^{-4} | 2.00×10^{-1} | 1.90×10^{-3} |
| Macromolecule metabolic process | 202 | 4.07×10^{-6} | 3.00×10^{-4} | 3.18×10^{-6} |
| Mitochondrial transport | 28 | 1.00×10^{-4} | 3.50×10^{-3} | 1.99×10^{-2} |
| Negative regulation of cell proliferation | 116 | 1.09×10^{-2} | 1.93×10^{-1} | 2.33×10^{-2} |
| Regulation of cell cycle | 181 | 1.27×10^{-2} | 2.33×10^{-2} | 8.71×10^{-6} |
| Response to DNA damage stimulus | 122 | 5.40×10^{-7} | 2.00×10^{-4} | 2.20×10^{-6} |
| Transcription | 148 | 5.40×10^{-3} | 3.80×10^{-3} | 2.20×10^{-5} |

利用 Limma package 的 GeneSetTest 功能，來觀察馬兜鈴酸調控 HK-2 細胞的生物路徑。 p 值愈小，表示越顯著受到調控。

第三節 馬兜鈴酸的抗發炎作用可能來自於抑制 NF- κ B

壹、路徑分析(pathway analysis)

進一步利用 GeneSetTest 探討哪些生物路徑會被馬兜鈴酸所調控。

我們使用 P value < 0.001 (scores > 2.7 or < -2.7)來界定 HK-2 細胞經馬兜鈴酸處理後有顯著被調控的生物路徑。結果如表 4.2 所示，有九種不同的生物路徑會明顯受馬兜鈴酸影響。而此九種不同的生物路徑，大部分

與免疫功能相關，這個結果顯示馬兜鈴酸可能參予調控免疫相關基因表現。

表 4.2 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞的基因表現圖譜之路徑分析

| Pathway | 10 μ M_p | 30 μ M_p | 90 μ M_p | 10 μ M_s | 30 μ M_s | 90 μ M_s |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Cytokine-cytokine receptor interaction | $< 2.20 \times 10^{-16}$ | $< 2.20 \times 10^{-16}$ | $< 2.20 \times 10^{-16}$ | < -15.66 | < -15.66 | < -15.66 |
| TNF Signaling Pathway | 2.00×10^{-7} | 5.70×10^{-5} | $< 2.20 \times 10^{-16}$ | -6.40 | -3.94 | < -15.66 |
| Interleukin Signaling Pathway | 4.05×10^{-5} | 1.37×10^{-4} | $< 2.20 \times 10^{-16}$ | -4.09 | -3.56 | < -15.66 |
| Hematopoietic cell lineage | 3.45×10^{-5} | 3.10×10^{-6} | 4.30×10^{-5} | -4.16 | -5.21 | -4.07 |
| Cell adhesion molecules (CAMs) | 3.75×10^{-4} | 7.20×10^{-6} | 4.40×10^{-6} | -3.13 | -4.84 | -5.06 |
| Insulin Signaling Pathway | 3.13×10^{-4} | 2.00×10^{-6} | 6.84×10^{-5} | -3.20 | -5.40 | -3.86 |
| IFN Signaling Pathway | 5.44×10^{-5} | 4.03×10^{-4} | 2.80×10^{-6} | -3.96 | -3.09 | -5.25 |
| Long-term depression | 5.73×10^{-4} | 3.24×10^{-5} | 1.95×10^{-5} | -2.94 | -4.19 | -4.41 |
| IL2 Signaling Pathway | 3.04×10^{-4} | 3.19×10^{-5} | 3.64×10^{-4} | -3.22 | -4.20 | -3.14 |

此結果為三次實驗的結果。“p”代表 p 值，“s”代表積分，“-”代表下調。

貳、網路分析(network analysis)

為了進一步探討馬兜鈴酸對HK-2 細胞作用藥理和分子機制，我們首先選用subtoxic dose (10 μ M)去詮釋基因之間的交互網路圖譜。應用 Pathway Edition software分析經由 10 μ M馬兜鈴酸處理後的HK-2 細胞 (fold changes >2.0 和false discovery rates <0.05)的基因之間交互網路圖譜。進一步利用Cytoscape軟體，連接NF- κ B和受 10 μ M馬兜鈴酸所調控的相關基因。調控的基因和NF κ B1 的表現皆根據他們的log₂表現值，而以顏色為代碼(紅色和綠色分別顯示上調或下調的基因)。如圖 4.2 所示，很多基因的表現都和NF- κ B分子相關，且NF- κ B在交互網路圖譜中扮演核心的角色。處理不同濃度的馬兜鈴酸(10、30 或 90 μ M)後，將NF- κ B

相關的基因，fold changes >2.0 和 false discovery rates <0.05 的基因列於表

4.3。上調者為：AOC3、CYP1A1、CYP2E1、DHX9、LTB4R、

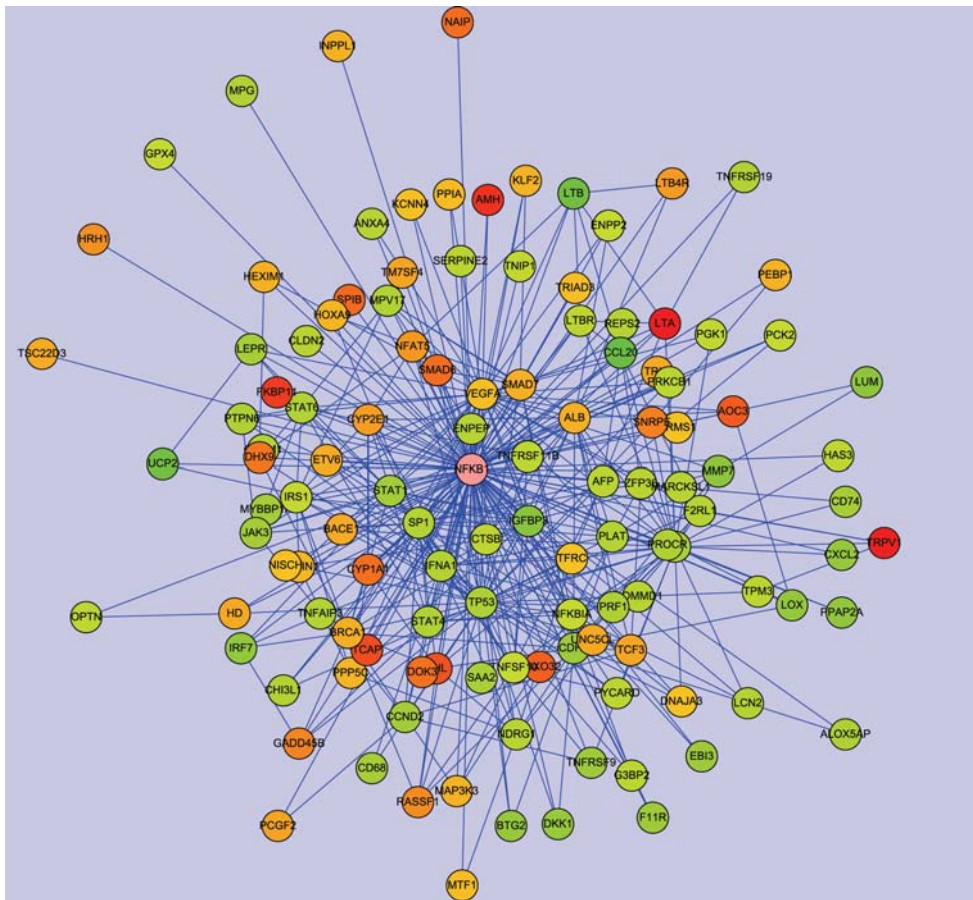


圖 4.2 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞的基因表現圖譜之網路分析

應用Pathway Edition software分析經由 10 μ M馬兜鈴酸處理後的HK-2 細胞(fold changes >2.0 和 false discovery rates <0.05)的基因之間交互網路圖譜。調控的基因和NF κ B1 的表現皆根據他們的log₂表現值，而以顏色為代碼(紅色和綠色分別顯示上調或下調的基因)。如圖所示 NF- κ B在交互網路圖譜中扮演核心的角色。

RASSF1、SPIB、TCF3、TRPV1 和 VHL。下調者為 CCL20、CCND2、CD68、CD74、CDH1、CXCL2、EBI3、IGFBP3、IKIP、IL8、LTB、MMP7、PPAP2A、SAA2、STAT1、TNFRSF9 和 UCP2。

表 4.3 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞調控 NF- κ B 相關基因表現

| Symbol | Description | 10 μ M AA | | 30 μ M AA | | 90 μ M AA | |
|--------|---|------------------|----------|------------------|----------|------------------|----------|
| | | FC \pm SD | p value | FC \pm SD | p value | FC \pm SD | p value |
| AOC3 | amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1) | 3.8 \pm 0.53 | 1.54E-02 | 10.16 \pm 1.55 | 5.94E-03 | 10.25 \pm 1.66 | 4.46E-03 |
| CCL20 | chemokine (C-C motif) ligand 20 | -11.46 \pm 2.2 | 2.15E-03 | -11.4 \pm 1.04 | 4.31E-04 | -17.4 \pm 4.26 | 5.29E-04 |
| CCND2 | cyclin D2 | -2.24 \pm 0.13 | 8.18E-03 | -2.89 \pm 0.16 | 2.70E-03 | -5.71 \pm 0.84 | 1.35E-03 |
| CD68 | CD68 antigen | -2.16 \pm 0.34 | 2.24E-02 | 1.21 \pm 0.24 | 2.98E-01 | 1.46 \pm 0.22 | 4.76E-02 |
| CD74 | CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain | -2.18 \pm 0.50 | 4.56E-02 | -2.33 \pm 0.69 | 2.54E-02 | -2.37 \pm 0.57 | 1.54E-02 |
| CDH1 | cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) | -2.42 \pm 0.67 | 3.31E-02 | -3.97 \pm 0.72 | 6.01E-03 | -4.78 \pm 0.94 | 3.42E-03 |
| CXCL2 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | -2.71 \pm 0.47 | 1.30E-02 | -3.07 \pm 0.50 | 4.42E-03 | -2.74 \pm 0.20 | 1.99E-03 |
| CYP1A1 | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 | 3.21 \pm 0.82 | 2.17E-02 | 4.9 \pm 1.43 | 1.43E-02 | 4.85 \pm 1.24 | 4.53E-03 |
| CYP2E1 | cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 | 2.15 \pm 0.33 | 1.77E-02 | 4.21 \pm 0.78 | 7.35E-03 | 4.3 \pm 0.68 | 2.02E-03 |
| DHX9 | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9 | 3.05 \pm 0.65 | 1.78E-02 | 2.45 \pm 0.66 | 3.27E-02 | 4.59 \pm 0.92 | 1.49E-03 |
| EBI3 | Epstein-Barr virus induced gene 3 | -2.37 \pm 0.22 | 1.66E-02 | -2.8 \pm 0.40 | 6.80E-03 | -1.77 \pm 0.31 | 1.73E-02 |
| IGFBP3 | insulin-like growth factor binding protein 3 | -3.19 \pm 0.41 | 1.09E-02 | -3.36 \pm 0.92 | 7.05E-03 | -3.77 \pm 1.06 | 3.95E-03 |
| IKIP | IKK interacting protein | -1.39 \pm 0.04 | 4.49E-03 | -1.8 \pm 0.17 | 2.51E-02 | -5.2 \pm 0.06 | 1.94E-05 |
| IL8 | interleukin 8 | -2.04 \pm 0.29 | 1.94E-02 | -1.35 \pm 0.23 | 7.96E-02 | -6.66 \pm 0.66 | 1.40E-03 |

以 t-test 進行統計分析，表中列出的基因為 $p < 0.05$ 。” +” 代表上調；” -” 代表下調。

表 4.3 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞調控 NF-κB 相關基因的表現(續)

| | | | | | | | |
|---------|--|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| LTB | lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) | -5.15±1.69 | 1.88E-02 | -9.95±2.42 | 5.90E-03 | -5.07±1.12 | 4.87E-03 |
| LTB4R | leukotriene B4 receptor | 2.21±0.55 | 3.37E-02 | 2.74±0.64 | 5.75E-03 | 4.8±1.16 | 2.00E-03 |
| MMP7 | matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) | -2.97±0.23 | 4.19E-03 | -2.93±0.35 | 2.70E-03 | -4.23±0.22 | 8.69E-04 |
| PPAP2A | phosphatidic acid phosphatase type 2A | -2.81±0.89 | 4.39E-02 | -2.51±0.44 | 1.83E-02 | -3.21±0.61 | 1.05E-02 |
| RASSF1 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1 | 2.49±0.34 | 1.35E-02 | 4.24±0.84 | 1.19E-02 | 4.81±1.38 | 2.51E-02 |
| SAA2 | serum amyloid A2 | -2.08±0.34 | 2.25E-02 | -4.48±0.77 | 3.66E-03 | -7.18±.86 | 1.86E-03 |
| SPIB | Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related) | 3.34±0.80 | 2.12E-02 | 6.82±1.67 | 6.33E-03 | 6.95±1.86 | 6.94E-03 |
| STAT1 | signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa | -2.28±0.24 | 1.88E-02 | -3.34±0.63 | 6.61E-03 | -4.21±0.42 | 2.86E-03 |
| TCF3 | transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47) | 2.01±0.14 | 8.79E-03 | 2.24±0.33 | 1.65E-02 | 1.61±0.11 | 3.94E-03 |
| TNFRSF9 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 | -2.45±0.37 | 9.97E-03 | -3.76±0.16 | 8.99E-04 | -6.05±0.58 | 6.01E-04 |
| TRPV1 | transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 | 7.62±1.46 | 8.18E-03 | 10.86±1.96 | 1.53E-03 | 13.12±2.94 | 4.50E-03 |
| UCP2 | uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) | -4.75±0.63 | 1.35E-02 | -5.04±1.08 | 6.01E-03 | -2.91±0.51 | 6.07E-03 |
| VHL | von Hippel-Lindau tumor suppressor | 4.19±0.54 | 7.12E-03 | 2.49±0.62 | 3.96E-02 | 4.12±0.71 | 5.83E-03 |

參、利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析 NF-κB 相關基因的表現

為了做進一步的確認，我們選擇 NF-κB 相關的 8 個基因(下調者：CCL20、CD68、IGFBP3、IL8、TNFRSF9、LTB 和 SAA2；上調者：CYP1A1)，利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析，結果如圖 4.3 及表 4.4 所示，圖 4.3 顯示 10 及 30 μM 馬兜鈴酸對 NF-κB 相關基因表現的平均值及 SD，表 4.4 顯示此八個基因被調控的情形與基因微陣列結果相似。

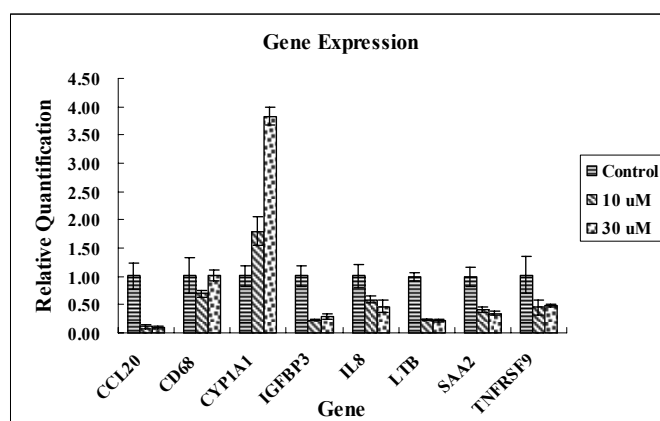


圖 4.3 qRT-PCR 確認馬兜鈴酸調控 NF-κB 相關基因的表現

表 4.4 qRT-PCR 確認馬兜鈴酸調控 NF-κB 相關基因的表現

| Gene | qRT-PCR (Fold changes) | | Microarray (Fold changes) | |
|---------|------------------------|------------|---------------------------|----------------|
| | 10 μM AA | 30 μM AA | 10 μM AA | 30 μM AA |
| CCL20 | -9.09±2.81 | -9.09±1.96 | -11.46±2.20** | -11.40±1.04*** |
| CD68 | -1.45±0.12 | 1.01±0.10 | -2.16±0.34* | 1.21±0.24 |
| CYP1A1 | 1.79±0.25 | 3.83±0.16 | 3.21±0.82* | 4.90±1.43* |
| IGFBP3 | -4.55±0.29 | -3.57±0.62 | -3.19±0.41* | -3.36±0.92** |
| IL8 | -1.69±0.16 | -2.17±0.46 | -2.04±0.29* | -1.35±0.23 |
| LTB | -4.17±0.27 | -4.17±0.59 | -5.15±1.69* | -9.95±2.42** |
| SAA2 | -2.38±0.25 | -3.23±0.23 | -2.08±0.34* | -4.48±0.77** |
| TNFRSF9 | -2.22±0.68 | -2.08±0.12 | -2.45±0.37** | -3.76±0.16*** |

SD 為標準差，*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較其基因表現有顯著差異。”+”代表上調；”-”代表下調。

肆、馬兜鈴酸對 HK-2 細胞 NF- κ B 轉位(translocation)的影響

為了探討馬兜鈴酸是否會影響 HK-2 細胞 NF- κ B p65 由細胞質轉位進到細胞核，我們利用共軛焦顯微鏡/免疫染色方法進行確認。綠色(圖 4.4 D-F)代表細胞質染上 NF- κ B p65 的部分；紅色(圖 4.4 G-I)代表細胞核染上 propidium iodide 的部分。當處理馬兜鈴酸(10 和 30 μ M)後，NF- κ B 在核中的分布，明顯比未經處理馬兜鈴酸組的細胞少。而 NF- κ B 在細胞質中的分布，明顯比未經處理馬兜鈴酸組的細胞多(圖 4.4 A-F)。結果顯示，馬兜鈴酸可以抑制 NF- κ B p65 由細胞質轉位進到細胞核。

伍、馬兜鈴酸對 HK-2 細胞 NF- κ B 活性的影響

為了進一步確認，馬兜鈴酸是否可以影響 HK-2 細胞 NF- κ B 的活性，我們利用 NF- κ B/luciferase 的基因轉殖細胞確認馬兜鈴酸是否可有效抑制 luciferase 的活性。因為 10 μ M 的馬兜鈴酸對 HK-2 細胞的存活率為 81.9% \pm 4.6%；30 μ M 的馬兜鈴酸對 HK-2 細胞的存活率為 55.2% \pm 3.7%，我們選擇 subtoxic dose 來探討馬兜鈴酸是否可以有效抑制 HK-2 細胞 NF- κ B 的活性。實驗結果如圖 4.5 顯示，轉殖空質體的細胞(pcDNA 3.1)和沒有做任何處理的細胞，其冷光活性值相似。轉殖空質體的細胞和沒有做任何處理的細胞，其冷光活性值，比轉殖 NF- κ B 質體的細胞低。而轉殖 NF- κ B 質體的細胞在馬兜鈴酸處理後，其冷光活性值顯著降

低， $p < 0.001$ 。此結果得知， $10 \mu\text{M}$ 的馬兜鈴酸可以有效抑制 NF- κB 的活性。

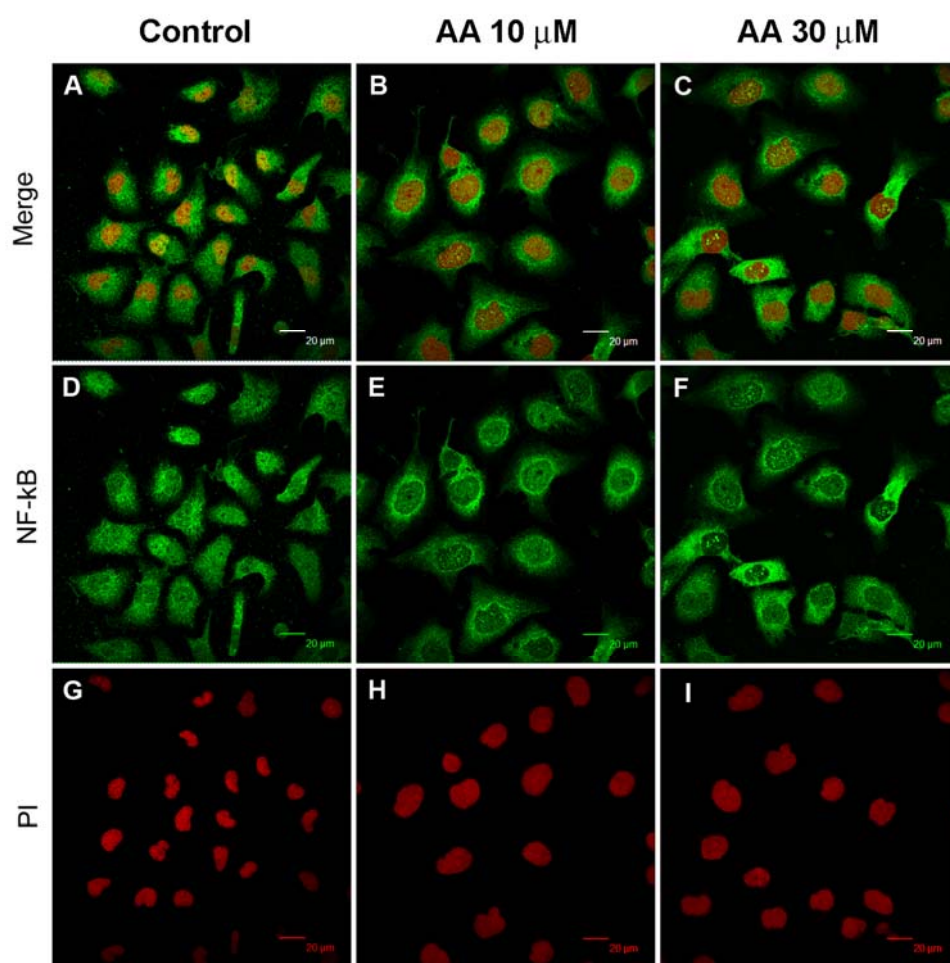


圖 4.4 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞抑制 NF- κB 轉位

利用共軛焦顯微鏡/免疫染色方法，NF- κB 的位置如圖 D-F(綠色)所示，PI 用於染細胞核如圖 G-I(紅色)所示。在馬兜鈴酸處理 HK-2 細胞後 NF- κB 在細胞核中的分布，明顯比未處理組少，如圖 A-F 所示。

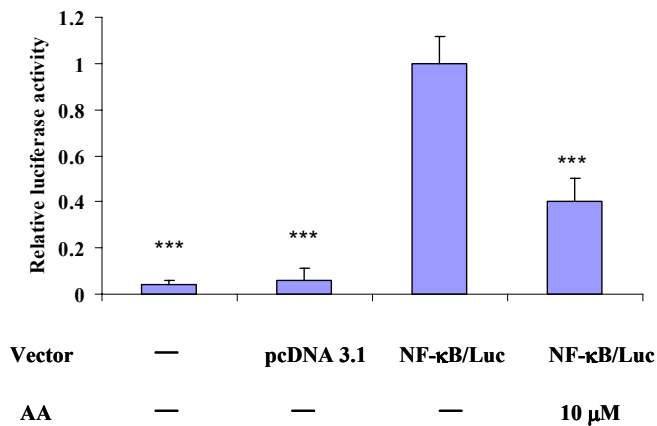


圖 4.5 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞抑制 NF-κB 活性表現

實驗的重複數為三次，且結果以 relative luciferase units (RLU)表示。相對冷光活性的計算方式是以處理 10 μM 馬兜鈴酸細胞的 RLU 除以未處理馬兜鈴酸細胞的 RLU。 $p < 0.001$ ，表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較有顯著差異。

第四節 馬兜鈴酸的基因毒性可能來自於抑制 DNA 修補

壹、馬兜鈴酸調控 HK-2 細胞 DNA 傷害及修補相關基因的表現

利用 Limma package 裡面的 GeneSetTest 探討馬兜鈴酸調控的 HK-2 細胞基因的集群分析(cluster analysis)。結果如表 4.1 所示，DNA repair 相關基因是受馬兜鈴酸調控最明顯的。除此之外，stress response、cell cycle, apoptosis、fibrogenic response 和 biotransformation 相關基因，也明顯受到馬兜鈴酸所調控，表 4.5 列出所篩選的基因。表 4.6 列出的基因為與 DNA 修補相關的基因，分為六大類，分別為 Base Excision Repair、Nucleotide Excision Repair、Direct Reverse Repair、Mismatch Repair、Homologous Recombination 和 Non-Homologous End Joining。

表 4.5 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞調控壓力反應、細胞週期、凋亡、纖維化反應、生物轉化及氧化酵素相關基因表現圖譜

| Gene symbol | Annotation | Fold change \pm SD | | |
|------------------------|---|----------------------|---------------------|---------------------|
| | | 10 μ M AA | 30 μ M AA | 90 μ M AA |
| Stress Response | | | | |
| DDIT3 | DNA-damage-inducible transcript 3 | – | 1.66 \pm 0.16* | 4.03 \pm 0.12** |
| GADD45B | growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | 2.68 \pm 0.16* | 3.66 \pm 0.19* | 3.00 \pm 0.15* |
| GADD45G | growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma | – | 5.08 \pm 0.33* | 13.36 \pm 0.32** |
| GPX3 | glutathione peroxidase 3 (plasma) | -1.87 \pm 0.19* | -1.76 \pm 0.16** | – |
| GPX6 | glutathione peroxidase 6 (olfactory) | – | -2.56 \pm 0.22* | -2.10 \pm 0.17* |
| GSR | glutathione reductase | – | -2.61 \pm 0.12** | -2.42 \pm 0.20* |
| HSPA14 | heat shock 70kDa protein 14 | 1.89 \pm 0.07*** | 1.85 \pm 0.10** | 1.41 \pm 0.06** |
| HSPC047 | HSPC047 protein | 1.97 \pm 0.25* | 4.19 \pm 0.25** | 4.60 \pm 0.27** |
| HSPC065 | HSPC065 protein | 1.87 \pm 0.29* | 1.91 \pm 0.29* | – |
| MT1X | metallothionein 1X | -1.83 \pm 0.23* | -1.45 \pm 0.12* | – |
| SOD3 | superoxide dismutase 3, extracellular | -1.51 \pm 0.16* | -2.09 \pm 0.11** | – |
| Cell Cycle | | | | |
| CCND2 | cyclin D2 | -2.25 \pm 0.06*** | -2.89 \pm 0.05*** | -5.69 \pm 0.15** |
| CCNE1 | cyclin E1 | -1.25 \pm 0.25* | -1.50 \pm 0.20* | -1.84 \pm 0.15** |
| CDKL1 | cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase) | -1.68 \pm 0.21* | -1.79 \pm 0.24* | – |
| CDKN1A | cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) | -1.64 \pm 0.17* | – | – |
| CDKN1B | cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) | -1.42 \pm 0.08** | – | -2.82 \pm 0.11*** |
| CDKN2B | cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4) | -1.54 \pm 0.12** | -1.33 \pm 0.11* | -1.58 \pm 0.12** |

SD為標準差，*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較其基因表現有顯著差異，實驗的重複數為3次。“+”代表上調；“-”代表下調。

表 4.5 馬兜鈴酸在HK-2 細胞調控壓力反應、細胞週期、凋亡、纖維化反應、生物轉化及氧化酵素相關基因的表現圖譜(續)

| | | | | |
|----------------------------|--|--------------|---------------|---------------|
| CDKN3 | cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase) | -1.91±0.25* | -2.49±0.09*** | – |
| E2F3 | E2F transcription factor 3 | -1.21±0.07* | -1.51±0.12* | -1.84±0.06*** |
| MDM2 | Mdm2, p53 binding protein (mouse) | -1.41±0.11* | -1.57±0.08** | – |
| RB1 | retinoblastoma 1 (including osteosarcoma) | – | -1.44±0.18* | -2.24±0.20** |
| RBL2 | retinoblastoma-like 2 (p130) | – | -2.25±0.18** | -1.49±0.13* |
| TP53 | tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) | -1.90±0.14* | -1.50±0.08* | -1.34±0.05** |
| WEE1 | WEE1 homolog (S. pombe) | -2.00±0.18** | -2.01±0.23* | -2.58±0.24** |
| Apoptosis | | | | |
| BAX | BCL2-associated X protein | – | – | 1.28±0.07* |
| BCL2L2 | BCL2-like 2 | – | -2.26±0.10** | -1.95±0.06** |
| BNIP3 | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 | -2.04±0.19** | -2.76±0.20** | -3.60±0.17** |
| CASP3 | caspase 3, apoptosis-related cysteine protease | 1.05±0.15* | 1.40±0.17* | 1.34±0.13* |
| CCL2 | chemokine (C-C motif) ligand 2 | – | -1.86±0.19* | -3.54±0.31** |
| NAIP | apoptosis inhibitor protein | 3.25±0.38* | 4.91±0.35** | 3.25±0.10*** |
| PRKCA | protein kinase C, alpha | – | -1.41±0.09** | -2.92±0.17** |
| TNFRSF1B | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B | 1.67±0.21* | 1.61±0.25* | 2.35±0.37* |
| TNFRSF21 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 | 1.46±0.09* | 1.33±0.13* | 1.88±0.12** |
| TNFSF6 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6 | – | 3.46±0.25* | 4.55±0.32** |
| Fibrogenic Response | | | | |
| FOS | v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog | – | 1.37±0.17* | 1.97±0.20** |
| ITGB7 | integrin, beta 7 | 5.01±0.40* | 12.22±0.12*** | 15.36±0.19*** |

SD為標準差，*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較其基因表現有顯著差異，實驗的重複數為3次。“+”代表上調；“-”代表下調。

表 4.5 馬兜鈴酸在HK-2 細胞調控壓力反應、細胞週期、凋亡、纖維化反應、生物轉化及氧化酵素相關基因的表演圖譜(續)

| | | | | |
|---|---|---------------|---------------|--------------|
| LTBP2 | latent transforming growth factor beta binding protein 2 | 1.51±0.17* | 2.47±0.20** | 2.50±0.16** |
| MMP2 | matrix metalloproteinase 2 | -1.75±0.31* | -2.10±0.22* | -1.64±0.21* |
| NBL1 | neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1 | -1.12±0.12* | -1.37±0.16* | -1.27±0.11* |
| PLAU | plasminogen activator, urokinase | 1.32±0.10* | 1.54±0.08** | – |
| SMAD4 | SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila) | – | 1.77±0.14* | 1.55±0.07** |
| STAT1 | signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa | -2.28±0.11** | -3.33±0.19** | -4.21±0.10** |
| TBRG4 | transforming growth factor beta regulator 4 | 1.71±0.13** | 2.64±0.08*** | 4.17±0.21** |
| Biotransformation | | | | |
| CYP1A1 | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 | 3.22±0.24* | 4.91±0.29** | 4.85±0.25** |
| EPHX1 | epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic) | – | 1.33±0.06* | 1.11±0.01*** |
| GNMT | glycine N-methyltransferase | 4.49±0.19** | 7.94±0.13** | 7.04±0.09*** |
| GSTA2 | glutathione S-transferase A2 | – | -1.85±0.09** | -2.18±0.26* |
| GTDC1 | Glycosyltransferase-like 1 | -2.00±0.14** | -2.60±0.14** | -4.34±0.22** |
| MGST2 | microsomal glutathione S-transferase 2 | – | -1.95±0.19* | -2.09±0.18* |
| MGST3 | microsomal glutathione S-transferase 3 | -1.49±0.11** | -2.15±0.14* | -1.90±0.13* |
| POR | P450 (cytochrome) oxidoreductase | – | 1.46±0.08** | 2.53±0.12*** |
| XDH | xanthine dehydrogenase | – | -2.28±0.31* | -2.05±0.36* |
| Human Oxidative Stress and Antioxidant Defense | | | | |
| DHCR24 | 24-dehydrocholesterol reductase | – | -1.72±0.26* | -1.93±0.22* |
| GPX4 | glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase) | -1.52±0.04*** | -1.89±0.07** | -1.25±0.03** |
| MGST3 | microsomal glutathione S-transferase 3 | -1.49±0.11** | -2.15±0.14** | -1.90±0.13** |
| MPV17 | MpV17 transgene, murine homolog, glomerulosclerosis | -2.02±0.21* | -2.67±0.07*** | – |

SD為標準差，*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較其基因表現有顯著差異，實驗的重複數為3次。“+”代表上調；“-”代表下調。

表 4.5 馬兜鈴酸在HK-2 細胞調控壓力反應、細胞週期、凋亡、纖維化反應、生物轉化及氧化酵素相關基因的表現圖譜(續)

| | | | | |
|--------|--------------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| MSRA | methionine sulfoxide reductase A | -1.80±0.10** | -3.11±0.13*** | -2.28±0.19** |
| PRDX3 | peroxiredoxin 3 | – | -1.31±0.15* | -2.11±0.11** |
| PRDX4 | peroxiredoxin 4 | – | -1.44±0.10* | -1.30±0.14* |
| SCARA3 | scavenger receptor class A, member 3 | – | -2.07±0.11** | -2.37±0.17* |
| TPO | thyroid peroxidase | – | -1.28±0.10* | -1.47±0.12* |

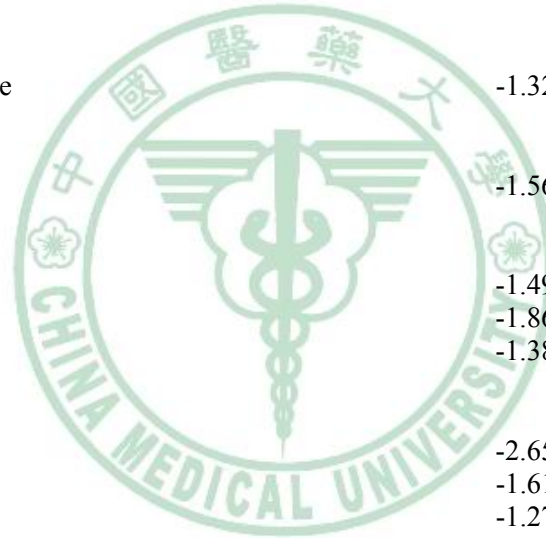
表 4.6 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞調控 DNA 修補相關基因的表現圖譜

| Gene symbol | Annotation | Fold change ± SD | | |
|-----------------------------------|---|------------------|--------------|--------------|
| | | 10 μM AA | 30 μM AA | 90 μM AA |
| Base Excision Repair | | | | |
| APEX2 | APEX nuclease (apurinic/aprimidinic endonuclease) 2 | -1.52±0.16* | -1.51±0.19* | -2.06±0.15** |
| LIG3 | ligase III, DNA, ATP-dependent | -1.80±0.16* | -1.60±0.09** | -1.13±0.10 |
| MPG | N-methylpurine-DNA glycosylase | -1.89±0.13** | -2.28±0.11** | 1.02±0.15 |
| OGG1 | 8-oxoguanine DNA glycosylase | -1.81±0.36 | -2.53±0.23* | -2.12±0.42 |
| PARP1 | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 | -1.32±0.17 | -1.68±0.17* | -2.21±0.15** |
| SMUG1 | single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase | -1.18±0.22 | -1.51±0.11* | -1.64±0.16* |
| Nucleotide Excision Repair | | | | |
| ERCC1 | excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 | -2.53±0.22** | -2.76±0.20** | 1.16±0.16 |

SD為標準差，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較其基因表現有顯著差異，實驗的重複數為3次。“+”代表上調；“-”代表下調。

表 4.6 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞調控 DNA 修補相關基因的表現圖譜 (續)

| | | | | |
|-----------------------------------|---|---------------|---------------|--------------|
| ERCC2 | excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 | -4.32±0.12*** | -3.79±0.11*** | -1.48±0.08** |
| PNKP | polynucleotide kinase 3'-phosphatase | -4.18±0.24** | -3.51±0.18** | -1.26±0.10 |
| RAD23A | RAD23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) | -1.88±0.15** | -1.48±0.17* | -1.21±0.15 |
| RAD23B | RAD23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) | -1.38±0.16* | -1.53±0.16* | -2.33±0.21* |
| Direct Reverse Repair | | | | |
| MGMT | O-6-methylguanine-DNA methyltransferase | -1.32±0.29 | -2.60±0.31* | -1.56±0.32 |
| Mismatch Repair | | | | |
| POLD4 | polymerase (DNA-directed), delta 4 | -1.56±0.12** | -1.78±0.13** | 1.21±0.14 |
| Homologous Recombination | | | | |
| NBS1 | Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin) | -1.49±0.34 | -1.86±0.24* | -4.32±0.26** |
| RAD18 | RAD18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | -1.86±0.20* | -1.61±0.13** | -1.39±0.11* |
| RAD54L | RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>) | -1.38±0.09* | -1.35±0.12* | 1.42±0.13* |
| Non Homologous End Joining | | | | |
| BTG2 | BTG family, member 2 | -2.65±0.26** | -2.29±0.25* | -1.54±0.22* |
| CIB1 | calcium and integrin binding 1 (calmyrin) | -1.61±0.12** | -1.83±0.12** | 1.64±0.09** |
| RFC3 | replication factor C (activator 1) 3, 38kDa | -1.27±0.46 | -1.54±0.12* | -2.18±0.16** |
| RFC4 | replication factor C (activator 1) 4, 37kDa | -1.36±0.19 | -1.61±0.21* | -1.69±0.21* |



為了做進一步的確認，我們選擇 DNA 修補相關基因、反應壓力相關基因共 8 個(DNA 修補相關基因 5 個:ERCC1、ERCC2、MGMT、OGG1 和 PARP1;細胞凋亡相關基因 2 個:TP53 和 NAIP;反應壓力相關基因:GADD45B)，利用 qRT-PCR 確認，結果如表 4.7 和 4.8 所示，顯示與基因微陣列結果相似。而這 8 個基因中，DNA 修補相關基因及反應壓力相關基因，在馬兜鈴酸處理 24 小時後，被下調的現象最為明顯。

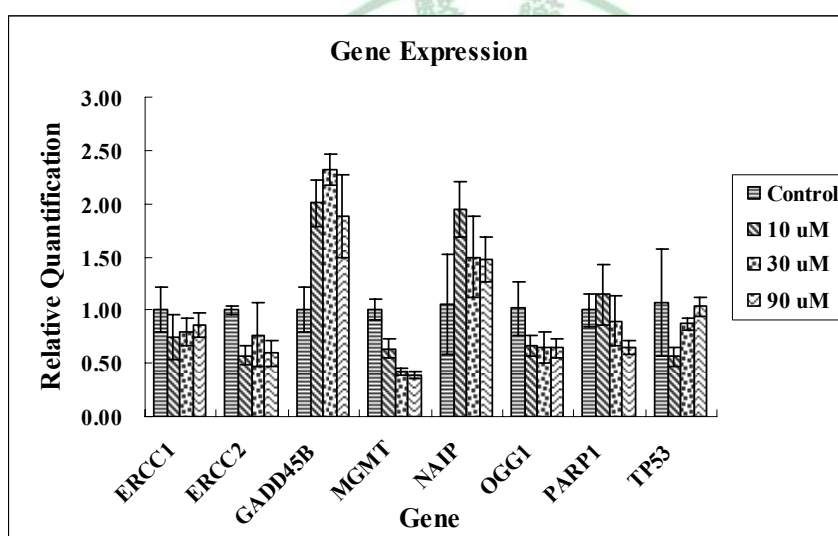


圖 4.6 qRT-PCR 確認馬兜鈴酸調控 DNA 修補、氧化傷害相關基因表現的劑量反應關係

表 4.7 qRT-PCR 確認馬兜鈴酸調控 DNA 修補、氧化傷害相關基因表現的劑量反應關係

| Gene | Microarray (Fold change ± SD) | | | qRT-PCR (Fold change ± SD) | | |
|---------|-------------------------------|---------------|--------------|----------------------------|------------|------------|
| | 10 μM AA | 30 μM AA | 90 μM AA | 10 μM AA | 30 μM AA | 90 μM AA |
| ERCC1 | -2.53±0.22* | -2.76±0.20** | -1.34±0.05** | -1.35±0.39 | -1.27±0.21 | -1.16±0.15 |
| ERCC2 | -4.32±0.12*** | -3.79±0.11*** | -1.48±0.08** | -1.75±0.28 | -1.39±0.54 | -1.69±0.35 |
| GADD45B | 2.68±0.16** | 3.66±0.19** | 2.99±0.15** | 2.00±0.22 | 2.31±0.15 | 1.87±0.39 |
| MGMT | -1.32±0.29 | -2.60±0.31* | -1.56±0.32 | -1.56±0.21 | -2.63±0.16 | -2.56±0.24 |
| NAIP | 3.25±0.38* | 4.91±0.35** | 3.25±0.10*** | 1.94±0.26 | 1.48±0.38 | 1.46±0.21 |
| OGG1 | -1.81±0.36 | -2.53±0.23** | -2.12±0.42 | -1.49±0.22 | -1.56±0.37 | -1.56±0.22 |
| PARP1 | -1.32±0.17 | -1.68±0.17* | -2.21±0.15** | 1.13±0.22 | -1.14±0.30 | -1.54±0.17 |
| TP53 | -1.90±0.14* | -1.50±0.08* | -1.34±0.05** | -1.82±0.27 | -1.15±0.07 | 1.03±0.09 |

SD 為標準差，*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較其基因表現有顯著差異，實驗的重複數為 3 次。“+”代表上調；“-”代表下調。

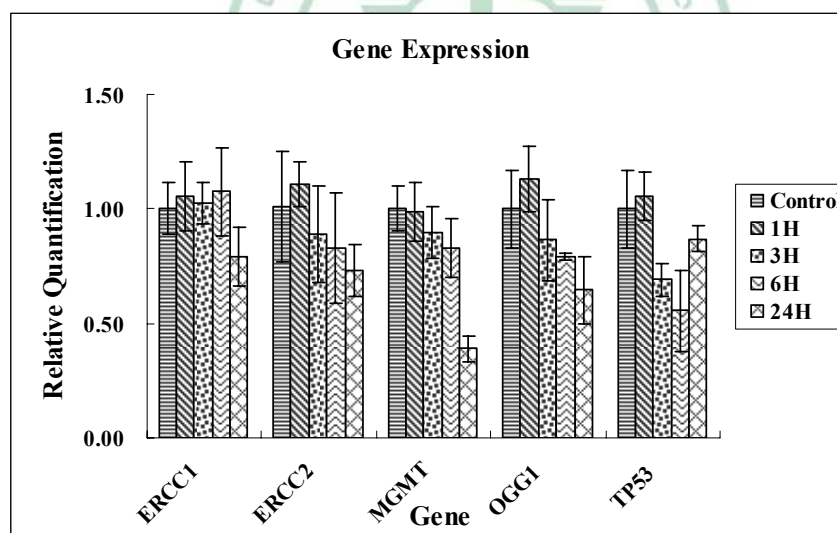


圖 4.7 qRT-PCR 確認馬兜鈴酸調控 DNA 修補、氧化傷害相關基因表現的時間反應關係

表 4.8 qRT-PCR 確認馬兜鈴酸調控 DNA 修補、氧化傷害相關基因表現的時間反應關係

| Gene | Microarray (Fold change ± SD) | | | | qRT-PCR (Fold change ± SD) | | | |
|-------|-------------------------------|------------|-------------|---------------|----------------------------|------------|------------|------------|
| | 1 h | 3 h | 6 h | 24 h | 1 h | 3 h | 6 h | 24 h |
| ERCC1 | -1.09±0.28 | -1.03±0.24 | 1.54±0.06** | -2.76±0.20** | 1.05±0.08 | 1.02±0.03 | 1.07±0.10 | -1.27±0.21 |
| ERCC2 | 1.08±0.11 | -1.26±0.16 | 1.06±0.20 | -3.79±0.11*** | 1.11±0.10 | -1.14±0.22 | -1.23±0.36 | -1.39±0.21 |
| MGMT | 1.05±0.49 | 1.89±0.29 | 1.14±0.49 | -2.60±0.31* | -1.02±0.02 | -1.12±0.14 | -1.20±0.19 | -2.63±0.38 |
| OGG1 | 1.09±0.56 | -1.10±0.28 | -1.48±0.63 | -2.53±0.23** | 1.13±0.14 | -1.16±0.24 | -1.27±0.02 | -1.56±0.37 |
| TP53 | 1.04±0.09 | 1.24±0.19 | 1.02±0.13 | -1.50±0.08* | 1.05±0.08 | -1.45±0.15 | -1.85±0.60 | -1.15±0.07 |

SD為標準差，*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較其基因表現有明顯的差異，實驗的重複數為3次。“+”代表上調；“-”代表下調。

貳、馬兜鈴酸在 HK-2 細胞誘發 DNA 股斷裂的增加

利用彗星試驗，進一步檢驗馬兜鈴酸是否會誘導HK-2細胞DNA受損。結果如圖4.8所示，隨著馬兜鈴酸的濃度越高，DNA脫尾的現象越嚴重，這代表越多的DNA受損。結果顯示馬兜鈴酸誘導DNA股斷裂的增加且存在劑量反應關係。

參、馬兜鈴酸在 HK-2 細胞誘發氧化 DNA 的傷害

利用8-OHdG免疫染色法評估氧化DNA損傷現象，此方法為最常被用來評估氧化DNA損傷程度。結果如圖4.9所示，8-OHdG主要位於核的部位，經由馬兜鈴酸處理的HK-2細胞，8-OHdG染色強度越深，特別是高濃度的馬兜鈴酸處理組(90 μM)。

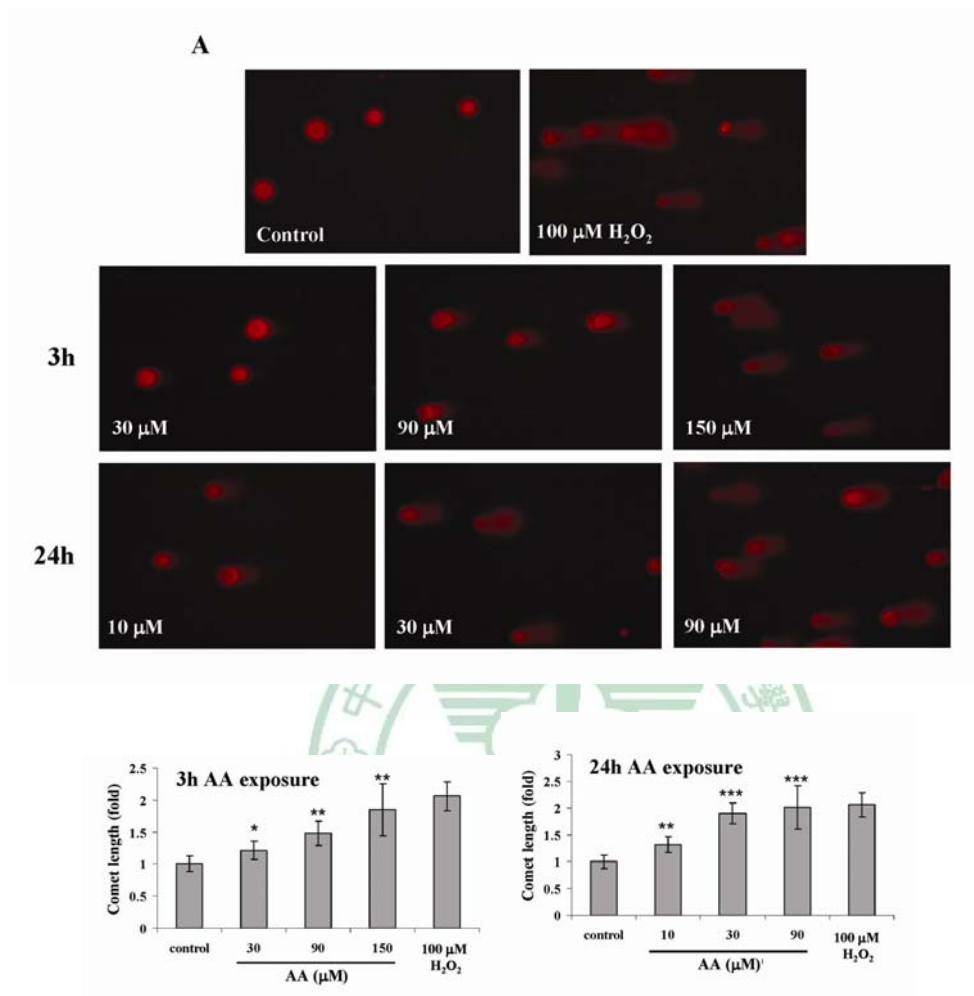


圖 4.8 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞誘發 DNA 股斷裂的增加

圖 A 為三次實驗的代表圖，圖 B 為彗星脫尾長度的定量圖。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 表示與未經處理馬兜鈴酸的細胞比較有顯著差異。

肆、馬兜鈴酸暴露 HK-2 細胞後對蛋白質表現的影響

進一步利用西方墨點法分析 c-fos, OGG1, caspase 3, Bax, 和 p21 的蛋白質表現，將 HK-2 細胞處理不同濃度 (10、30 或 90 μM) 的馬兜鈴酸後並再培養 24 小時。取 45 μg 的蛋白質進行 SDS-聚丙烯酰胺凝膠電泳，再將

蛋白質轉滯到硝酸纖維素膜。加入一級抗體Ogg1、p21、c-fos、caspase-3、Bax或 α -tubulin反應隔夜後，再加入二級抗體，最後以ECL呈色。結果和我們預期的相似，如圖4.10所示，隨著馬兜鈴酸劑量越高c-fos、caspase 3和Bax蛋白質表現量越多；而Ogg1和p21則是下降的趨勢。

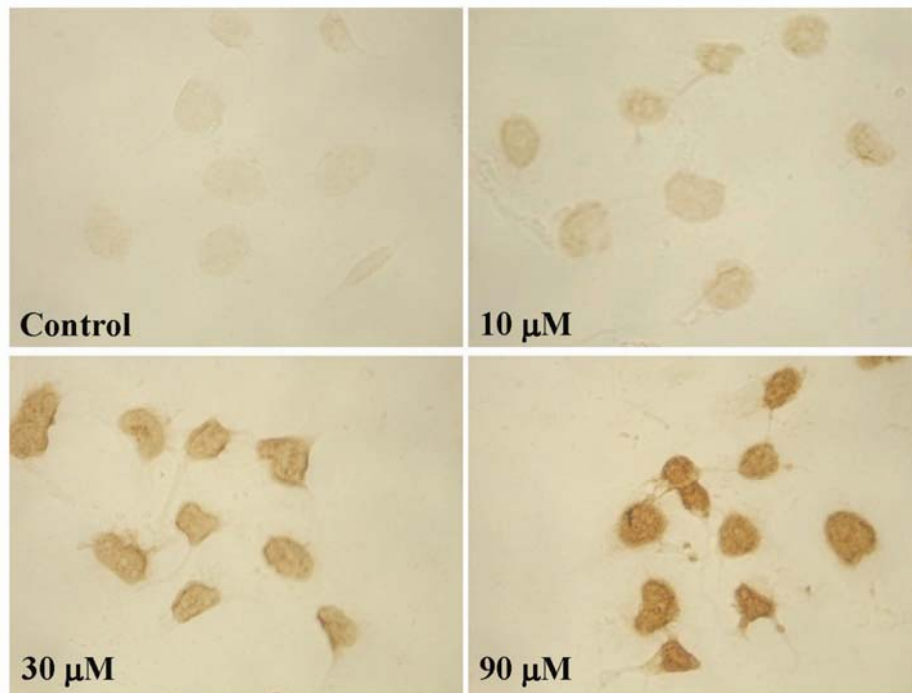
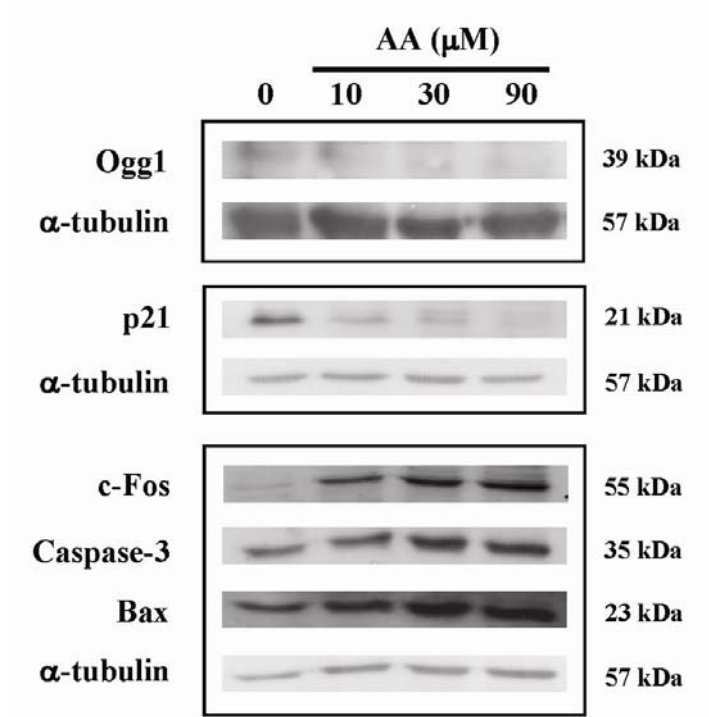


圖 4.9 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞誘發氧化 DNA 傷害的增加

將 HK-2 細胞處理不同濃度(10、30 或 90 μ M)的馬兜鈴酸後並再培養 24 小時。接著將細胞進行 8-OHdG (N45.1 單株抗體，稀釋倍數為 1：200)免疫染色。三次實驗的代表圖如上。



α -Tubulin 在此為 loading control。

圖 4.10 馬兜鈴酸暴露 HK-2 細胞後 Ogg1、p21、c-Fos、Caspase-3 和 Bax 蛋白質表現的變化

伍、馬兜鈴酸在 HK-2 細胞誘發微核率的增加

進一步利用微核試驗測試馬兜鈴酸的基因毒性，微核試驗是染色體傷害的指標。將 HK-2 細胞處理不同濃度(10、30 或 90 μM)的馬兜鈴酸後並再培養 24 小時，接著加入含有 cytochalasin B (3 $\mu\text{g/ml}$)的細胞培養液以獲得雙核細胞，並再培養至少 16 個小時，接著進行固定和 acridine orange solution (0.1 mg/ml)的染色，藉著計數在 1000 顆雙核細胞中有微核的細胞來評估染色體的傷害程度，實驗的重複數為 3 次。如圖 4.11 所

示，處理不同濃度的馬兜鈴酸，隨著劑量越高，在雙核中微核越高。未經處理的細胞，微核率為 3.5 ± 0.4 ；處理馬兜鈴酸(10 和 30 μM)微核率分別為 10.2 ± 1.4 、 13.9 ± 1.9 。

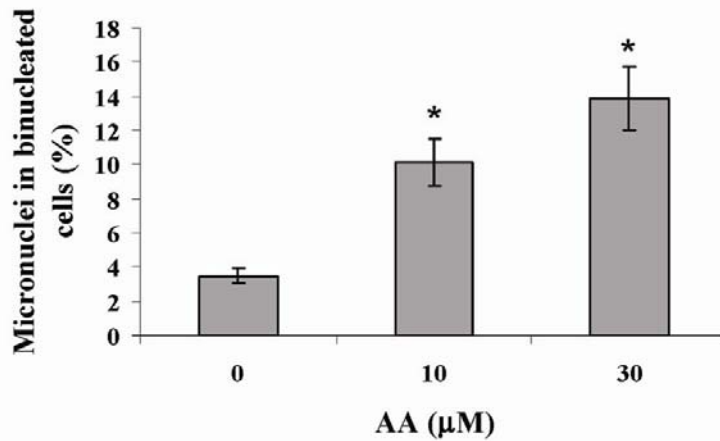


圖 4.11 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞誘發微核率的增加

經 one way ANOVA 檢測，不同濃度的馬兜鈴酸，隨著劑量越高，在 HK-2 細胞中的雙核誘發的微核率越高。* $P < 0.05$ ，表示顯著差異。

第五章 討論

傳統中醫藥的使用在亞洲地區已有數千年的歷史，不同於其它地區的民族醫學，中醫藥有其系統性的理論基礎、診察方法、診斷規則、藥物炮製及藥物方劑的使用經驗，除此之外，還有臨床病例的大量記載，可以說是世界上唯一有系統性理論的民族傳統醫學。雖然目前在臺灣西方醫學為醫療上的主流，但是中醫藥的使用仍為多數民眾所接受，因此應用現代科技來進一步闡明中醫藥的作用機轉，將有助於驗證中藥臨床療效及提供中醫師診治作為參考。

本篇於討論方面分為二大部份，一為對馬兜鈴酸抗發炎的藥理機轉探討，一為對馬兜鈴酸致基因毒性的病理機轉探究。

第一節 馬兜鈴酸抑制 NF- κ B 之訊息傳遞路徑

基因微陣列技術已成為研究藥物影響細胞、組織或器官之基因表達的實用工具；然而，只有少數研究利用基因微陣列技術來分析馬兜鈴酸對基因表達的影響。本研究以體外試驗探討馬兜鈴酸對人類正常腎臟近端小管細胞株(HK-2)基因表現圖譜的影響，有別於之前的研究所使用的人類大腸直腸癌細胞株(HCT 116)^[129]，我們的結果顯示出HK-2細胞對於馬兜鈴酸所誘導的細胞毒性，比HCT 116細胞更為敏感。HK-2細胞

經馬兜鈴酸處理 24 小時後，估計的半數致死劑量約在 30 μM 附近，而 HCT 116 細胞的半數致死劑量為 100 μM ，除此之外，馬兜鈴酸對HK-2 細胞基因的影響，比對HCT 116 細胞基因的影響還要明顯^[129]。先前研究指出，將TP53-WT HCT 116 細胞處理 100 μM 馬兜鈴酸 24 小時後，TP53 沒有顯著的差異；然而我們的研究發現，將HK-2 細胞處理 10 μM 馬兜鈴酸 24 小時後，p53 被顯著下調(經由qRT-PCR確認，改變量為對照組的-1.92 倍)。另外有一體內試驗研究，將大鼠以馬兜鈴酸處理後，分析馬兜鈴酸致癌的標的器官(腎臟)和非標的器官(肝臟)的基因表現^[130]，結果指出在腎臟中受馬兜鈴酸調控的基因和生物路徑明顯比在肝臟中多；這個結果顯示，基因圖譜分析技術可以用來辨別馬兜鈴酸對腎臟和肝臟的不同影響。另一個實驗研究，以短時間的馬兜鈴酸處理Eker大鼠(heterozygous for a mutation in the tuberous sclerosis 2 [Tsc2] tumor suppresser gene)和野生型(wild-type)大鼠，來探討馬兜鈴酸誘導生成之腎臟腫瘤的基因圖譜表現^[131]；結果指出，經馬兜鈴酸處理後之Eker大鼠和wild-type大鼠的基因表現圖譜變化和Tsc2 沒有相關。

我們的MTT結果顯示馬兜鈴酸對HK-2 細胞的細胞毒性有劑量反應關係，這個結果和先前的研究相似^[132]，其研究指出AA-I、AA-Ia和AA-II 會抑制HK-2 細胞的生長，且有劑量和時間反應關係；他們同時也發現AA-I、AA-Ia和AA-II可以影響細胞生長週期且可以誘導細胞凋亡。此

外，藉由基因微陣列分析，我們發現DNA repair、response to DNA damage stimulus、apoptosis和cell cycle相關的基因，明顯受不同濃度的馬兜鈴酸所調控(表 4.1)。從路徑分析(pathway analysis)之結果中發現，許多受馬兜鈴酸調控的生物路徑都和免疫調控路徑相關，這意味著馬兜鈴酸可能參予調控免疫相關基因的表現。此外，我們注意到NF- κ B在基因網路圖譜中扮演核心的角色(圖 4.2)。NF- κ B為細胞核轉錄因子，由Rel A (p65)、Rel B、c-Rel、p50 和p52 組成。NF- κ B的活性(activity)，可以經由感染、病原微生物、致癌物、細胞壞死產物和發炎激素所誘發。當NF- κ B受到刺激，會由細胞質轉位到細胞核，然後NF- κ B會和特定基因的啟動子區域結合，開始此特定基因的轉錄、轉譯，最後形成蛋白質，來調控壓力反應、細胞增生和細胞凋亡^[133]。當NF- κ B活化時，可以當作轉錄因子，而且NF- κ B些微的改變，即會明顯影響到其下游調控的基因表現。

當NF- κ B持續活化時，可以誘導發炎前驅基因的過度表現，進而導致急性或慢性發炎相關疾病：如類風濕性關節炎、腸炎和動脈硬化等疾病^[134]，同樣的，在胰臟癌、肝癌、和大腸直腸癌中也發現NF- κ B有上調的現象^[135]。最近的研究認為，慢性發炎疾病與NF- κ B活化及癌症有相關性^[135-136]，因為NF- κ B的標的基因可以促進腫瘤增生、存活、轉移和血管新生，因此臨床研究認為，抑制NF- κ B可能是一個很有效的抗癌療法。然而，另一方面卻發現，抑制NF- κ B表現反而會促進表皮鱗狀上皮

細胞癌^[137-138]的發生，這種情形類似於馬兜鈴科植物的使用狀況。雖然馬兜鈴科的植物過去一直被用來當作抗發炎(關節炎)、止痛藥、利尿劑，甚至抗癌藥物，但令人玩味的是，近來它被報導有腎毒性和致癌性，這讓我們認為，馬兜鈴酸的不同性質表現，可能和NF- κ B的雙重效應一樣。在我們的實驗中，以共軛焦顯微鏡/免疫染色方法、和NF- κ B/luciferase的基因轉殖細胞都顯示馬兜鈴酸可以有效的抑制NF- κ B的活性。NF- κ B在細胞核的表現，在經過處理 10 和 30 μ M馬兜鈴酸處理後，有明顯的下降趨勢，因此推測馬兜鈴酸可以抑制NF- κ B從細胞質轉位到細胞核。同樣的，我們的結果也顯示馬兜鈴酸可以顯著抑制NF- κ B/luciferase的基因轉殖細胞中的NF- κ B的活性。

HK-2 細胞經由 10、30 和 90 μ M三種不同濃度的馬兜鈴酸處理後，改變很多基因的表現，如表 4.3 所示。在表 4.3 中，chemokine ligand 20 (CCL20)受馬兜鈴酸下調最明顯；CCL20 為巨噬細胞的發炎蛋白質，在B細胞貼附到發炎的內皮細胞扮演重要的角色^[139]。Interleukin 8 (IL-8)為另外一個在我們研究當中發現的下調基因。IL-1 和TNF可以誘導IL-8的基因表現，且IL-8的表現同時受NF- κ B調控^[140]。Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)在我們的研究當中，經馬兜鈴酸處理後也下調。IGFBP3 可以抑制增生，IGFBP3 也可以抑制insulin-like growth factor (IGF)的抗凋亡功能^[141]。近來研究指出，IGFBP3 的調控和

phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)和NF- κ B路徑相關^[141-142]。另一個被下調的基因為CD68，CD68 為穿膜醣蛋白，在人類單核細胞和巨噬細胞中高度表現；CD68 為scavenger receptor的一員，能夠清除細胞中的殘渣碎片、促進細胞吞噬作用，並且和補充、活化巨噬細胞相關。經由免疫組織染色得知CD68 為histiocytic (類似T淋巴細胞的標記CD3)，且和multicentric reticulohistiocytosis^[143]、rheumatoid arthritis^[144]、Crohn's disease^[145]和vasculitic neuropathies^[146]有關。除了上面提及的基因，其他NF- κ B下調的基因，包含SAA2、LTB和TNFRSF9 也都經過qRT-PCR確認，大部分下調的NF- κ B相關基因，都與發炎有關。總之，受NF- κ B調控的基因，經由馬兜鈴酸處理後表現量下降，可能可以解釋為何中草藥馬兜鈴科的植物過去被用來治療與發炎有關的疾病(例如關節炎)的原因。

第二節 馬兜鈴酸抑制 DNA 修補作用並誘發氧化 DNA 傷害

此部分我們應用毒理基因體學來闡釋馬兜鈴酸誘導人類正常腎臟近端小管 (HK-2) 細胞的毒理分子機轉。我們發現在 10、30 和 90 μ M 三種不同濃度的馬兜鈴酸調控的基因中，與 DNA 修補相關路徑的基因群(DNA repair-related genes)最明顯被調控。除此之外，在 HK-2 細胞中 stress response、cell cycle、apoptosis、fibrogenic response、biotransformation

和 antioxidant defense 相關基因也明顯受到不同濃度的馬兜鈴酸所調控 (表 4.5)。另外，我們利用 qRT-PCR 分析 8 個基因(ERCC1、ERCC2、GADD45B、MGMT、NAIP、OGG1、PARP1、TP53)，來確認基因微陣列的結果(表 4.7 和 4.8)，馬兜鈴酸明顯抑制 DNA 修補相關的基因(ERCC1、ERCC2、MGMT、OGG1 和 PARP1)的 mRNA 表現；除此之外，OGG1 的基因和蛋白質表現同樣受到抑制。OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase)為一種特別的 DNA 糖苷酶，可以切除 8-OHdG 來進行 DNA 修補。HK-2 細胞經過馬兜鈴酸處理後，OGG1 的表現被抑制，可能可以解釋染上 8-OHdG 的細胞數變多，且 DNA 單股斷裂變多。另外，微核現象也隨著馬兜鈴酸的濃度增加而增多(圖 4.8)，因此推論馬兜鈴酸會誘導 DNA 傷害及抑制 DNA 修補相關基因。我們的實驗結果顯示氧化傷害參予馬兜鈴酸誘導的細胞毒性，因此提出一個新的觀點，即 DNA 修補受到抑制可能與馬兜鈴酸的基因毒性有關。

有研究指出馬兜鈴酸可以誘導細胞毒性，包含人類大腸癌HCT 116 細胞、porcine renal LLC-PK1 細胞，和opossum kidney (OK)細胞。在我們的研究當中，HK-2 細胞對馬兜鈴酸所誘導的細胞毒性比HCT 116 細胞^[129]及OK細胞^[147]強。除此之外，將OK細胞加入 10 或 20 μ M馬兜鈴酸培養 24 小時後，發現沒有細胞毒性的現象產生，這個結果顯示在做毒理研究的時候，使用正確的人類標靶器官的細胞株是很重要的。

我們的毒理基因表現圖譜顯示，和DNA修補相關的基因是最明顯受到調控的(表 4.1)。在stress response相關的基因中，GADD45B (growth arrest and DNA-damage-inducible, beta gene)在三種不同濃度的馬兜鈴酸處理中明顯上調(表 4.5)。GADD45B為一結構相關的蛋白質家族的成員之一，包含GADD45A和GADD45G。GADD45B對生理和基因毒性的壓力訊息傳遞相關^[148]，進而導致細胞週期停滯、DNA修補、細胞存活或細胞凋亡；除此之外，缺乏GADD45 的表現，可能和癌症的生長相關^[149]。我們的結果顯示馬兜鈴酸處理後GADD45B的表現上調，類似先前的研究^[150]，即GADD45B可以被烷化劑MMS (methylmethane sulfonate) 和sorbitol所誘導。

另外，有研究指出，AA-I可以藉由抑制細胞內游離鈣離子濃度的增加，進而誘導LLC-PK1 細胞的凋亡受損。我們的基因微陣列的研究顯示，經馬兜鈴酸處理後，會增加凋亡前驅蛋白質的表現，包含BAX和Caspase。BAX (BCL2-associated X protein gene)在最高濃度的馬兜鈴酸(90 μ M) 處理後有上調的現象(表 4.5)。Caspase 3 在馬兜鈴酸(30 μ M) 處理後有上調的現象，和先前Balachandran^[151]的研究相似。他們指出在LLC-PK1 細胞中，caspase的活性可以被AA-I、AA-II、AA-Ia和AA-VIIIa所誘導。我們西方墨點法的結果顯示馬兜鈴酸可以誘導BAX和caspase 3 的蛋白質表現，且呈現劑量反應關係。NAIP (apoptosis inhibitor protein)

在很多癌症當中都有過度表現的現象，且如果NAIP被抑制，會增加細胞凋亡的現象。馬兜鈴酸處理後NAIP的表現上調，這個結果需要更多的研究來解釋。

而和細胞生長週期相關的基因，CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21)的基因和蛋白質的表現在處理 10 μ M的馬兜鈴酸後有下調的現象。CDKN1A調控p53-dependent的細胞生長週期G1 期停滯，而包含基因毒性、缺氧或致癌基因的活化都會導致G1 期停滯。我們的結果和HCT 116 細胞株經 100 μ M的馬兜鈴酸處理 48 小時^[129]剛好相反。先前研究^[152]指出，馬兜鈴酸混合物(AA-M; 41% AA-I, 56% AA-II)可以導致人類泌尿道上皮細胞(SV-HUC-1)細胞週期停滯在G0/G1 期(從37.6%到49.2%)，這可能和cyclin E/cdk2 (the cdk inhibitor)複合物相關。他們也發現，很多控制細胞生長週期相關的蛋白質，包含p53、p21 和 p27，在處理馬兜鈴酸 24 小時後有劑量反應關係的現象。我們的西方墨點法則顯示，三種不同濃度的馬兜鈴酸處理 24 小時後，p21 的表現顯著受到抑制。

另一個和細胞週期相關的基因MDM2，是轉錄因子p53 的標的基因。我們發現馬兜鈴酸可以明顯抑制MDM2，這和先前馬兜鈴酸處理 wild-type大鼠的研究相似^[131]。MDM2 過表現會導致p53 的不活化，因而減少p53 的腫瘤抑制功能。抑癌基因p53 可以藉由和其他蛋白質的結合，

因而影響細胞生長週期、細胞凋亡和腫瘤生成。DNA因為UV光、化學物質，或輻射受損時，p53 會被活化。大部分都認為，p53 的活性主要受其蛋白質所調控。c-fos為細胞中的proto-oncogene，且為fos轉錄因子家族的成員之一。c-fos可以和c-Jun形成結合成二具體，形成AP-1 轉錄因子的複合物，進而參予很多細胞大事，包含細胞增生、分化、凋亡和壓力反應。在我們的研究當中，c-fos在HK-2 細胞經高濃度的馬兜鈴酸(90 μ M) 處理後有上調的現象，和HCT 116 細胞株的表現相反^[129]。

有研究指出馬兜鈴酸可以導致人類淋巴細胞的染色體變異，及在 λ /lac Z基因轉植鼠(MutaTM Mouse)的轉植基因lac Z基因和c II 基因(在前胃、腎臟和膀胱)的突變率(MF)增加，以及在c II 基因序列中AT \rightarrow TA transversion的突變率增加。Cosyns等人發現在馬兜鈴酸腎病變的病人當中，TP53的過度表現與膀胱癌具有相關性^[86]。另外，有研究指出在一位馬兜鈴酸腎病變所導致的膀胱癌病患當中，偵測到在TP53基因的codon 139 of exon 5有一個特別的AAG-to-TAG突變^[153]。TP53基因的突變可能可以引起馬兜鈴酸腎病變病人的腫瘤生成，和馬兜鈴酸誘導大鼠的H-ras 基因的codon 61突變所導致的腫瘤生成相似^[102]。在我們的研究當中，基因微陣列分析和qRT-PCR結果顯示，10、30和90 μ M三種不同濃度的馬兜鈴酸可以下調TP53的表現，這個現象與另一研究不同，其結果顯示p53-WT HCT 116細胞暴露100 μ M馬兜鈴酸24小時後，TP53並沒有顯著

的改變^[129]。許多研究指出TP53參與nucleotide excision repair訊息傳遞路徑，且丟失TP53將會導致DNA傷害增加^[154-156]。有研究指出，砷可以藉由抑制p53主導的nucleotide excision repair而導致基因毒性^[156]。另有一研究指出檳榔中主要的鹼性物質(檳榔鹼)，可以抑制人類表皮細胞p53所活化的DNA修補能力，且會誘導DNA損傷^[155]。我們的基因微陣列結果和qRT-PCR顯示出馬兜鈴酸可以導致TP53下調，這可能導致DNA修補的能力下降，接著進而導致腫瘤的生成。馬兜鈴酸處理後的TP53基因和蛋白質的表現，需要更進一步的研究。

表4.6為馬兜鈴酸處理HK-2細胞後，DNA修補相關基因的表現顯著被調控者。在這些基因當中，nucleotide excision repair (NER)基因是最有可能參與修復AA-DNA鍵結物的基因群。這是因為NER基因在避免毒性、及bulky、distortive DNA lesions突變中扮演重要角色。NER的修補程序包含damage recognition、local opening of the DNA duplex around the lesion、dual incision of the damaged DNA strand、gap repair synthesis和strand ligation^[157]。NER 訊息傳遞路徑分成兩種子路徑：transcription-coupled repair (TCR)和global genomic repair (GGR)，兩種子路徑基本上是相同的，除了damage recognition這個步驟不一樣外。在人類中，NER路徑是主要的保護路徑，能夠抵擋UV光所導致的致癌影響、和天生缺陷像xeroderma pigmentosum (XP)^[158]。ERCC1 (excision repair

cross-complementing group 1) 和 ERCC2 (XPD) (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2; xeroderma pigmentosum D)屬於NER-deficient complementation groups。ERCC1 domain在DNA strand dual incision步驟中，為部份的endonuclease (5's incision)^[159]；且ERCC1的mRNA過度表現，和抗cisplatin的胃癌、卵巢癌、和肺癌相關^[160-162]。ERCC1的表現，也被報導指出為氧化壓力導致的NER修飾中的特別目標^[163]。ERCC2 (XPD)含蓋在GGR和TCR路徑中，且ERCC2為基本轉錄因子BTF2/TFIIH複合物中不可缺少的因子，缺少這些基因可能導致三種不同的缺陷：the cancer-prone syndrome xeroderma pigmentosum complementation group D、trichothiodystrophy和 Cockayne syndrome^[164]。我們的研究發現ERCC1和ERCC2在馬兜鈴酸處理後都有下調的趨勢。在Cheng 等人^[165]和Wei 等人^[166]的研究中也有相似的發現。他們發現，淋巴細胞中DNA修補相關基因(包含ERCC1和ERCC2)的mRNA表現低的話，罹患頭頸癌及肺癌的相對危險程度較高。馬兜鈴酸處理後ERCC1的表現下調，這個結果也和另一研究的結果相似，他們指出砷可以下調NER相關基因的表現ERCC1、XPF (ERCC4)和XPB (ERCC3)^[167]。另一個DNA修補相關的基因，MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase)，在30 μ M的馬兜鈴酸處理後有下調的趨勢，這個結果和馬兜鈴酸處理的大鼠表現不一致^[131]。

眾所皆知，活性氧族群reactive oxygen species (ROS)可以導致氧化DNA傷害。我們的transcriptome分析揭示馬兜鈴酸的暴露可以導致抗氧化酶的下調，像superoxide dismutase、glutathione reductase和glutathione peroxidase。除此之外，我們發現馬兜鈴酸可以導致氧化壓力，藉由誘導8-OHdG和DNA單股斷裂增加之特性得知，這個結果顯示，氧化壓力可能參予馬兜鈴酸所誘發的毒性。8-OHdG為一個主要的氧化壓力DNA損傷指標，8-OHdG可以被糖苷酶OGG1修復^[117-120]。在我們的研究中，OGG1的表現在處理馬兜鈴酸後有下調的現象，基因微陣列分析顯示有2.5倍的下調；qRT-PCR顯示有1.6倍的下調。除此之外，8-OHdG染色現象增加，可能原因為OGG1的表現下降，我們還用彗星試驗檢查DNA受損的狀況。彗星試驗結果顯示處理不同濃度的馬兜鈴酸後，皆有顯著的脫尾現象(圖4.5) ($P < 0.05$)。這個結果和先前的研究相似，他們使用彗星試驗和微核試驗去確認馬兜鈴酸的基因毒性，清楚發現25–200 μM 的馬兜鈴酸處理人類肝癌HepG2細胞會增加DNA脫尾的長度，且有劑量反應關係；12.5–50 μM 的馬兜鈴酸會增加微核的頻率^[121]。他們也發現馬兜鈴酸的濃度 $\geq 50 \mu\text{M}$ 可以導致明顯的NO生成和增加8-OHdG，因而假設高濃度的馬兜鈴酸處理HepG2細胞，可能經由NO的生成而有基因毒性。值得注意的是，hOGG1的表現和活性，被認為主要是受TP53所調控^[168]。在我們的研究當中，OGG1和TP53的表現，在處理馬兜鈴酸後明顯下調。

本研究應用基因晶片分析方法，來探討馬兜鈴酸對人類正常腎細胞之基因表達圖譜的影響，雖然能夠藉此探究馬兜鈴酸的分子作用機轉，但是仍有其研究上的限制：其一是馬兜鈴酸對細胞的基因表達變化不等於馬兜鈴酸在生物體內的藥物動力學變化，其二是人體食入含馬兜鈴酸的藥物，會有多少比例(劑量)是以馬兜鈴酸型式進入細胞，目前尚未有任何研究可以解答此一問題，因此到底多少濃度的馬兜鈴酸實際對人的組織細胞產生影響，可能只能透過流行病學調查來反推其劑量。但是本研究仍有進一步發展的空間，由於馬兜鈴酸的代謝活化過程被認為是造成致腎毒性及致癌的關鍵步驟之一，因此可以選擇被馬兜鈴酸顯著調控的代謝基因，進一步在動物實驗裏作生物學上的驗證，將有助於了解這些代謝基因在馬兜鈴酸致腎毒性與致癌性所扮演的角色。

第六章 結論

本論文以微陣列技術探討馬兜鈴科中草藥主要成分之藥理與毒理作用機轉，結果發現馬兜鈴酸對 HK-2 細胞的細胞毒性呈現劑量與時間反應關係；DNA repair、response to DNA damage stimulus、macromolecule metabolic process 和 carbohydrate metabolic process 等相關生物路徑的基因，皆明顯受不同濃度的馬兜鈴酸所調控。另外，我們證實馬兜鈴酸可以調控免疫相關的生物路徑，而且 NF- κ B 在交互網路圖譜中扮演中心的角色。除此之外，我們進一步用 qRT-PCR、共軛焦顯微鏡/免疫染色方法、和 NF- κ B/luciferase 的基因轉殖細胞確認馬兜鈴酸和 NF- κ B 的關係。馬兜鈴酸可以抑制人類 NF- κ B 的活性，而這個結果可以解釋馬兜鈴科植物抗發炎的藥理現象。

在毒理作用機轉研究方面，我們發現 DNA repair 相關基因的表現是最明顯受到馬兜鈴酸調控，我們用 qRT-PCR 來確認馬兜鈴酸抑制這些 DNA 修補相關的基因；另外，以彗星試驗、免疫染色和微核試驗等方法，發現馬兜鈴酸會導致氧化 DNA 傷害和染色體變異，由 OGG1 的下調及其他 DNA 修補相關基因的下調，可以解釋 8-OHdG 和微核率增加，最後導致 DNA 受損增加。我們的結果顯示馬兜鈴酸導致 DNA 修補相關基因的下調，這也許可以解釋馬兜鈴酸誘導的致突變性和致癌性。

我們以新穎微陣列分析探討馬兜鈴科中草藥之主要成分馬兜鈴酸混合物誘發的基因反應圖譜，發現馬兜鈴酸抗發炎機轉可能經由抑制 NF- κ B 之訊息傳遞路徑來展現，另外馬兜鈴酸會抑制 DNA 修補作用並誘發氧化 DNA 傷害，以上結果對含馬兜鈴酸中草藥可能的療效分子機轉或病理機轉提供新的證據，可以提供中醫師臨床用藥作為參考。

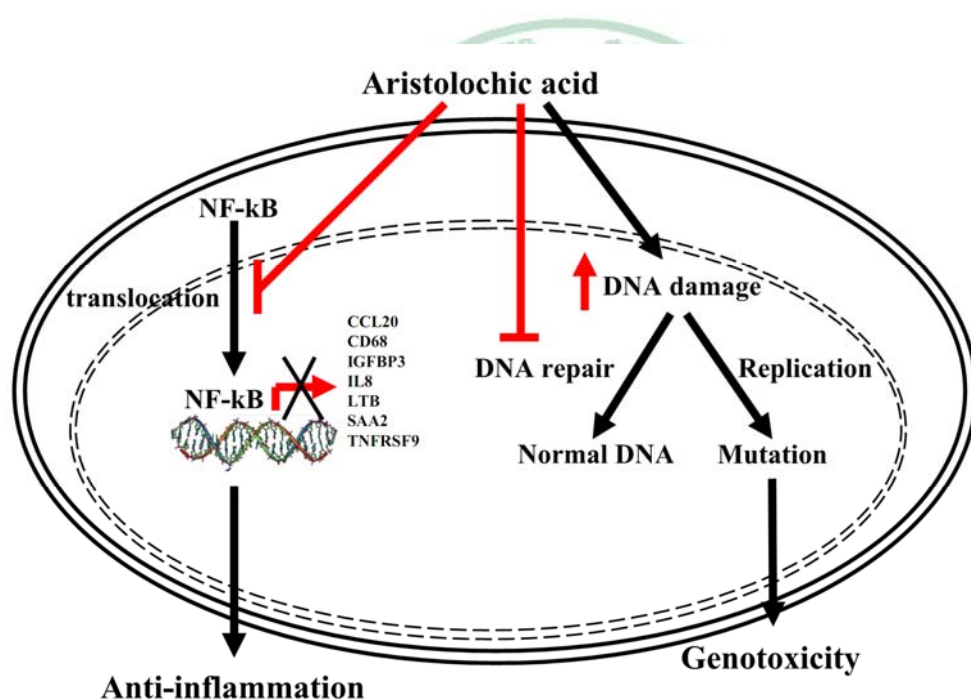


圖 6.1 馬兜鈴酸在 HK-2 細胞之藥理、毒理作用機轉簡圖

參考文獻

- 1 Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int* 2008; 74 (2): 158-69.
- 2 Zhang G, Shimokawa S, Mochizuki M, Kumamoto T, Nakanishi W, Watanabe T, Ishikawa T, Matsumoto K, Tashima K, Horie S, Higuchi Y, Dominguez OP. Chemical constituents of *Aristolochia constricta*: antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. *J Nat Prod* 2008; 71 (7): 1167-72.
- 3 Messiano GB, Vieira L, Machado MB, Lopes LM, de Bortoli SA, Zukerman-Schpector J. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (8): 2655-9.
- 4 Hinou J, C.Demetzos, Harvala C, Roussakis C. cytotoxic and antimicrobial principles from the Roots of *Aristolochia longa*. *int J Crude Drug Res* 1990; 28 (2): 149-51.
- 5 高學敏, 鍾贛生: 實用中藥學, 中國中醫藥出版社, 北京 2006; pp.400-402.
- 6 周秦, 黃劍林, 劉繼才. 中藥木通的鑑別及運用. *陝西中醫* 2007; 28 (11): 1546-48.
- 7 張賢哲: 本草備要解析, 中國醫藥學院出版組, 台中 1985; pp.45,75-76,175,199.
- 8 吳天賞, 林昭庚: 馬兜鈴酸之研究與回顧, 國立中國醫藥研究所, 台北 2005; pp.1-8.
- 9 Vanherweghem LJ. Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy). *J Altern Complement Med* 1998; 4 (1): 9-13.
- 10 Waters MD, Fostel JM. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat Rev Genet* 2004; 5 (12): 936-48.
- 11 張賢哲: 道地藥材圖鑑, 中國醫藥大學, 台中 2007; pp.1312-1316.
- 12 東漢·孫星衍, 孫馮翼: 神農本草經, 五洲出版社, 台北 1985; pp.1,2,20,8,17.
- 13 明·李時珍: 本草綱目, 文化圖書公司, 台北 1994; pp.762,775.
- 14 謝宗方. 通草與木通品種的本草考証. *中藥通報* 1986; 11 (5): 269.
- 15 魏晉·陶弘景: 名醫別錄(輯校本), 人民衛生出版社, 北京 1986; pp.38,244.
- 16 清·張璐: 本經逢原, 中國中醫藥出版社, 北京 2007; pp.110-11,118-19.
- 17 明·李時珍: 新較增訂本草綱目(中), 宏業書局, 台北 1989; pp.69.
- 18 明·劉文泰: 本草品彙精要(上), 南天書局, 台北 1983; pp.240,414.
- 19 清·黃宮綉: 本草求真, 人民衛生出版社, 北京 1987; pp.208.

- 20 王伯溥. 木通考異. 浙江中醫雜誌 1984; 19 (12): 561.
- 21 馬紅梅, 張伯禮. 不同科屬木通比較. 中國中藥雜誌 2002; 27 (6): 412-18.
- 22 周娟娟, 潘金火. 關木通研究進展. 醫藥導報 2009; (05): 620-22.
- 23 吳松寒. 木通所致急性腎功能衰竭 2 例報告. 江蘇中醫 1964; 9 (10): 12-14.
- 24 Stiborova M, Frei E, Sopko B, Wiessler M, Schmeiser HH. Carcinogenic aristolochic acids upon activation by DT-diaphorase form adducts found in DNA of patients with Chinese herbs nephropathy. *Carcinogenesis* 2002; 23 (4): 617-25.
- 25 張翠英, 王璇, 尚明英, 俞捷, 許俊羽, 李振國, 李曉玫, 蔡少青, 難波恆雄. 以關木通為例探討不同入藥形式對中藥中有毒成分含量的影響. 中國中藥雜誌 2005; 30 (11): 835-39.
- 26 Liang Z, Jiang Z, Leung KSY, Chan CL, Z. Z. Authentication and differentiation of two easily confusable chinese materia medica: herba solani lyrati and herba aristolochiae mollissimae. *J Food Drug Anal* 2006; (14): 36-43.
- 27 Zhao ZZ, Liang ZT, Jiang ZH, Leung KS, Chan CL, Chan HY, Sin J, Man TO, Law KW. Comparative study on the aristolochic acid I content of Herba Asarifor safe use. *phytotherapy* 2008; 15 (9): 741-8.
- 28 Hsu SC, Yang JS, Kuo CL, Lo C, Lin JP, Hsia TC, Lin JJ, Lai KC, Kuo HM, Huang LJ, Kuo SC, Wood WG, Chung JG. Novel quinolone CHM-1 induces apoptosis and inhibits metastasis in a human osteogenic sarcoma cell line. *J Orthop Res* 2009; 27 (12): 1637-44.
- 29 王智民, 由麗雙, 姜旭, 李琳, 王維皓, 王冠. 利用炮制技術去除關木通毒性成分的方法學研究. 中國中藥雜誌 2005; (16): 1243-46.
- 30 陽國平, 袁洪, 閻宏偉, 黃志軍, 譚鴻毅, 吳海華. 炮制及提取方法對關木通中馬兜鈴酸 A 含量的影響. 中南大學學報(醫學版) 2005; (04): 477-78.
- 31 王智民, 由麗雙, 李琳, 王維皓. 關木通生品及其制品的藥效學及毒理學研究. 中國藥物與臨床 2006; (10): 728-32.
- 32 盧歡, 潘金火. 關木通及其炮制品中馬兜鈴酸 A 的含量變化. 中國中醫藥信息雜誌 2008; (09): 37-38.
- 33 胡芳, 潘金火. 關木通及其炮制品中馬兜鈴酸 A 的含量變化. 時珍國醫國藥 2009; (03): 672-73.
- 34 全世建, 丁潔, 王紅丹. 配伍滋陰養血中藥對關木通馬兜鈴酸 A 含量的影響. 遼寧中醫雜誌 2009; (10): 1766-67.
- 35 李春香, 丁里玉, 李國川, 寶玉紅, 郝蕾. 配伍減低關木通中馬兜鈴酸 A 溶出量的研究. 河北醫科大學學報 2006; (05): 354-57.
- 36 林玲, 巴元明. 小薊飲子各配伍組對關木通腎毒性的比較研究. 湖北中醫雜誌 2007; (01): 16-17.
- 37 孫瑩, 毛曉春, 馮高平, 陳琳熹. 滋陰補腎丸對關木通減毒作用的初步研究. 中國藥事 2008; (04): 329-31.

- 38 焦樹德. 中藥用法十講 1985: 40-41.
- 39 馮振宇, 閔潤紅, 李艷彥, 王永輝, 劉必旺, 馬艷苗. 生地對廣防己減毒作用最佳配伍比例的研究. 世界中西醫結合雜誌 2009; (04): 251-53.
- 40 Jong TT, Lee MR, Hsiao SS, Hsai JL, Wu TS, Chiang ST, Cai SQ. Analysis of aristolochic acid in nine sources of Xixin, a traditional Chinese medicine, by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33 (4): 831-7.
- 41 樊景坡. 蒼耳子、細辛、枸杞子、白朮對小鼠組織自由基代謝的影響. 中醫藥信息 1994; (02): 48.
- 42 Hashimoto. K. 細辛根中抗過敏成分的研究. 國外醫學中醫中藥分冊 1994; (06): 43-44.
- 43 何秀芬, 施子棣, 蔣時紅, 張桂蘭, 王浴銘, 朱鳳云. 細辛對體外培養乳鼠心肌細胞的影響. 河南中醫藥學刊 1994; (05): 26-28.
- 44 黃順旺. 細辛的藥理毒理和臨床應用. 安徽醫藥 *Anhui Medical and pharmaceutical Journal* 2003; 7 (6): 477-79.
- 45 徐雅慧, 羅吉方, 張憲昌, 林哲輝. 市售細辛藥材之鑑別. 藥物食品檢驗局調查研究年報 2003; (21): 153-67.
- 46 曾韋綸. 1997-2001 年全民健保馬兜鈴酸相關方劑處方概況.
- 47 Lai MN, Lai JN, Chen PC, Tseng WL, Chen YY, Hwang JS, Wang JD. Increased risks of chronic kidney disease associated with prescribed Chinese herbal products suspected to contain aristolochic acid. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14 (2): 227-34.
- 48 陳南衡, 胡志沁. 天仙藤散治療特發性水腫 12 例分析. 中國實用婦科與產科雜誌 1992; (03): 57.
- 49 沙明榮. 天仙藤散治療卵巢囊腫二則. 北京中醫 1993; (04): 53.
- 50 吳立軍, 陳仲良, 黃寶山, 殷夢龍. 青木香有效成分的研究. 沈陽藥科大學學報 1982; (16): 19-22.
- 51 李國賢, 王道宏, 劉強. 綿毛馬兜鈴油抗炎作用的研究. 中國中藥雜誌 1985; (06): 41-43.
- 52 何林興, 薛慧中, 徐云翔, 翁靜. 尋骨風化學成份的研究. *Journal of Integrative Plant Biology* 1984; (05): 527-31.
- 53 王文華, 鄭錦海. 中藥尋骨風及其成分馬兜鈴酸 A 終止妊娠作用和毒性的研究. 藥學學報 1984; (06): 405-09+81.
- 54 Rosenmund H, Reichstein T. Zur Kenntnis der Aristolochiasäure. *Pharm Acta Helv* 1943; (18): 243-61.
- 55 Kluthe R, Vogt A, Batsford S. [Double blind study of the influence of aristolochic acid on granulocyte phagocytic activity]. *Arzneimittelforschung* 1982; 32 (4): 443-5.
- 56 Vishwanath BS, Gowda TV. Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli*

- phospholipase A2: its effect on enzymatic and pathological activities. *Toxicon* 1987; 25 (9): 929-37.
- 57 Marshall LA, Chang JY, Calhoun W, Yu J, Carlson RP. Preliminary studies on phospholipase A2-induced mouse paw edema as a model to evaluate antiinflammatory agents. *J Cell Biochem* 1989; 40 (2): 147-55.
- 58 Vishwanath BS, Fawzy AA, Franson RC. Edema-inducing activity of phospholipase A2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. *Inflammation* 1988; 12 (6): 549-61.
- 59 Rosenthal MD, Vishwanath BS, Franson RC. Effects of aristolochic acid on phospholipase A2 activity and arachidonate metabolism of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1001 (1): 1-8.
- 60 Lindahl M, Tagesson C. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation* 1993; 17 (5): 573-82.
- 61 Vishwanath BS, Appu Rao AG, Gowda TV. Interaction of phospholipase A2 from *Vipera russelli* venom with aristolochic acid: a circular dichroism study. *Toxicon* 1987; 25 (9): 939-46.
- 62 Moreno JJ. Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and in vivo models of inflammation. *Immunopharmacology* 1993; 26 (1): 1-9.
- 63 Shirwaikar A, Somashekar AP, Udupa AL, Udupa SL, Somashekar S. Wound healing studies of *Aristolochia bracteolata* Lam. with supportive action of antioxidant enzymes. *phytotherapy* 2003; 10 (6-7): 558-62.
- 64 Denson DD, Worrell RT, Eaton DC. A possible role for phospholipase A2 in the action of general anesthetics. *The American Physiological Society* 1996; (270): 636-44.
- 65 Loiko EN, Samal AB, Shulyakovskaya SM. H₂O₂-induced platelet aggregation and increase in intracellular Ca²⁺ concentration are blocked by inhibitors of intracellular signaling. *Biochemistry (Mosc)* 2003; 68 (11): 1210-6.
- 66 Iuliano L, Pedersen JZ, Pratico D, Rotilio G, Violi F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur J Biochem* 1994; 221 (2): 695-704.
- 67 Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Vanhaelen-Fastre R, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993; 341 (8842): 387-91.
- 68 Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem JL. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 1994; 343 (8890): 174.
- 69 Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M, van YdSC, Cosyns JP. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res* 1996; 56 (9): 2025-28.

- 70 Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF, De PL, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med* 2000; 342 (23): 1686-92.
- 71 Lord GM, Tagore R, Cook T, Gower P, Pusey CD. Nephropathy caused by Chinese herbs in the UK. *Lancet* 1999; 354 (9177): 481-2.
- 72 Lord GM, Cook T, Arlt VM, Schmeiser HH, Williams G, Pusey CD. Urothelial malignant disease and Chinese herbal nephropathy. *Lancet* 2001; 358 (9292): 1515-6.
- 73 Tanaka A, Nishida R, Maeda K, Sugawara A, Kuwahara T. Chinese herb nephropathy in Japan presents adult-onset Fanconi syndrome: could different components of aristolochic acids cause a different type of Chinese herb nephropathy? *Clin Nephrol* 2000: 301-06.
- 74 Yang CS, Lin CH, Chang SH, Hsu HC. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis associated Chinese herbal drug. *Am J Kidney Dis* 2000; (35): 313-18.
- 75 Chang CH, Wang YM, Yang AH, Chiang SS. Rapidly progressive interstitial fibrosis associated with Chinese herbal medications. *Am J Nephrol* 2001; (21): 441-48.
- 76 Kabanda A, Jadoul M, Lauwerys R, Bernard A, van Ypersele de Strihou C. Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48 (5): 1571-6.
- 77 Nortier JL, Deschodt-Lanckman MM, Simon S, Thielemans NO, de Prez EG, Depierreux MF, Tieleman CL, Richard C, Lauwerys RR, Bernard AM, Vanherweghem JL. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney Int* 1997; 51 (1): 288-93.
- 78 Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, De Plaen JF, Ferluga D, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int* 1994; 45 (6): 1680-8.
- 79 Yang L, Li X, Wang H. Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 (2): 445-56.
- 80 Tanaka A, Nishida R, Maeda K, Sugawara A, Kuwahara T. Chinese herb nephropathy in Japan presents adult-onset Fanconi syndrome: could different components of aristolochic acids cause a different type of Chinese herb nephropathy? *Clin Nephrol* 2000; 53 (4): 301-6.
- 81 Tanaka A, Nishida R, Yokoi H, Kuwahara T. The characteristic pattern of aminoaciduria in patients with aristolochic acid-induced Fanconi syndrome: could iminoaciduria be the hallmark of this syndrome? *Clin Nephrol* 2000; 54 (3):

- 198-202.
- 82 譚貽璞, 陳文. 馬兜鈴酸腎病的研究進展. 腎臟病與透析腎移植雜誌 2002; 11 (1): 63-66.
 - 83 陶雅非, 任東升, 崔冰. 以慢性腎功能衰竭為表現的馬兜鈴酸腎病的臨床觀察. 中國中西醫結合雜誌 2003; 23 (1): 60-61.
 - 84 Depierreux M, Van Damme B, Vanden Houte K, Vanherweghem JL. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *Am J Kidney Dis* 1994; 24 (2): 172-80.
 - 85 Arlt VM, Pfohl-Leszkowicz A, Cosyns J, Schmeiser HH. Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy. *Mutat Res* 2001; 494 (1-2): 143-50.
 - 86 Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, Wese FX, van Ypersele de Strihou C. Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1999; 33 (6): 1011-7.
 - 87 Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, Van Cangh PJ, van Ypersele de Strihou C. Urothelial malignancy in nephropathy due to Chinese herbs. *Lancet* 1994; 344 (8916): 188.
 - 88 Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M, van Ypersele de Strihou C, Cosyns JP. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res* 1996; 56 (9): 2025-8.
 - 89 Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54 (18): 4855-78.
 - 90 Tsai CS, Chen YC, Chen HH, Cheng CJ, Lin SH. An unusual cause of hypokalemic paralysis: aristolochic acid nephropathy with Fanconi syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330 (3): 153-5.
 - 91 Hong YT, Fu LS, Chung LH, Hung SC, Huang YT, Chi CS. Fanconi's syndrome, interstitial fibrosis and renal failure by aristolochic acid in Chinese herbs. *Pediatr Nephrol* 2006; 21 (4): 577-9.
 - 92 Robisch G, Schimmer O, Goggelmann W. Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 1982; 105 (4): 201-4.
 - 93 Mengs U. On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid. *Arch Toxicol* 1983; 52 (3): 209-20.
 - 94 Mengs U. Tumour induction in mice following exposure to aristolochic acid. *Arch Toxicol* 1988; 61 (6): 504-5.
 - 95 Mengs U, Stotzem CD. Renal toxicity of aristolochic acid in rats as an example of nephrotoxicity testing in routine toxicology. *Arch Toxicol* 1993; 67 (5): 307-11.
 - 96 Broschard TH, Wiessler M, von der Lieth CW, Schmeiser HH. Translesional

- synthesis on DNA templates containing site-specifically placed deoxyadenosine and deoxyguanosine adducts formed by the plant carcinogen aristolochic acid. *Carcinogenesis* 1994; 15 (10): 2331-40.
- 97 Broschard TH, Wiessler M, Schmeiser HH. Effect of site-specifically located aristolochic acid DNA adducts on in vitro DNA synthesis by human DNA polymerase alpha. *Cancer Lett* 1995; 98 (1): 47-56.
- 98 Kohara A, Suzuki T, Honma M, Ohwada T, Hayashi M. Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaMouse). *Mutat Res* 2002; 515 (1-2): 63-72.
- 99 Schmeiser HH, Schoepe KB, Wiessler M. DNA adduct formation of aristolochic acid I and II in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 1988; 9 (2): 297-303.
- 100 Stiborova M, Fernando RC, Schmeiser HH, Frei E, Pfau W, Wiessler M. Characterization of DNA adducts formed by aristolochic acids in the target organ (forestomach) of rats by 32P-postlabelling analysis using different chromatographic procedures. *Carcinogenesis* 1994; 15 (6): 1187-92.
- 101 Bieler CA, Stiborova M, Wiessler M, Cosyns JP, van Ypersele de Strihou C, Schmeiser HH. 32P-post-labelling analysis of DNA adducts formed by aristolochic acid in tissues from patients with Chinese herbs nephropathy. *Carcinogenesis* 1997; 18 (5): 1063-7.
- 102 Schmeiser HH, Scherf HR, Wiessler M. Activating mutations at codon 61 of the c-Ha-ras gene in thin-tissue sections of tumors induced by aristolochic acid in rats and mice. *Cancer Lett* 1991; 59 (2): 139-43.
- 103 Schmeiser HH, Janssen JW, Lyons J, Scherf HR, Pfau W, Buchmann A, Bartram CR, Wiessler M. Aristolochic acid activates ras genes in rat tumors at deoxyadenosine residues. *Cancer Res* 1990; 50 (17): 5464-9.
- 104 Schmeiser HH, Frei E, Wiessler M, Stiborova M. Comparison of DNA adduct formation by aristolochic acids in various in vitro activation systems by 32P-post-labelling: evidence for reductive activation by peroxidases. *Carcinogenesis* 1997; 18 (5): 1055-62.
- 105 Pfau W, Schmeiser HH, Wiessler M. N6-adenyl arylation of DNA by aristolochic acid II and a synthetic model for the putative proximate carcinogen. *Chem Res Toxicol* 1991; 4 (5): 581-6.
- 106 Stiborova M, Hajek M, Frei E, Schmeiser HH. Carcinogenic and nephrotoxic alkaloids aristolochic acids upon activation by NADPH : cytochrome P450 reductase form adducts found in DNA of patients with Chinese herbs nephropathy. *Gen Physiol Biophys* 2001; 20 (4): 375-92.
- 107 Stiborova M, Frei E, Wiessler M, Schmeiser HH. Human enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acids: evidence for reductive

- activation by cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Chem Res Toxicol* 2001; 14 (8): 1128-37.
- 108 Stiborova M, Frei E, Hodek P, Wiessler M, Schmeiser HH. Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer. *Int J Cancer* 2005; 113 (2): 189-97.
- 109 Stiborova M, Frei E, Sopko B, Sopkova K, Markova V, Lankova M, Kumstyrova T, Wiessler M, Schmeiser HH. Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Carcinogenesis* 2003; 24 (10): 1695-703.
- 110 Stiborova M, Frei E, Breuer A, Wiessler M, Schmeiser HH. Evidence for reductive activation of carcinogenic aristolochic acids by prostaglandin H synthase -- (32)P-postlabeling analysis of DNA adduct formation. *Mutat Res* 2001; 493 (1-2): 149-60.
- 111 Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petain M, Depierreux MF, De Pauw L, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med* 2000; 342 (23): 1686-92.
- 112 Pfau W, Schmeiser HH, Wiessler M. 32P-postlabelling analysis of the DNA adducts formed by aristolochic acid I and II. *Carcinogenesis* 1990; 11 (9): 1627-33.
- 113 Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review 2002; (17): 265-77.
- 114 Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 1992; 275 (3-6): 331-42.
- 115 Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 387 (3): 147-63.
- 116 Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 1991; 349 (6308): 431-4.
- 117 Mei N, Kunugita N, Hirano T, Kasai H. Acute arsenite-induced 8-hydroxyguanine is associated with inhibition of repair activity in cultured human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297 (4): 924-30.
- 118 Kinoshita A, Wanibuchi H, Wei M, Yunoki T, Fukushima S. Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell proliferation via generation of oxidative stress

- by organic arsenicals contributes to their carcinogenicity in the rat liver and bladder. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 221 (3): 295-305.
- 119 Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ, Khan MF. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233 (2): 247-53.
- 120 Kang KA, Lee JH, Chae S, Zhang R, Piao MJ, Kim HS, You HJ, Hyun JW. Butin decreases oxidative stress-induced 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels via activation of oxoguanine glycosylase 1. *Chem Biol Interact* 2009; 181 (3): 338-42.
- 121 Wu K, Jiang L, Cao J, Yang G, Geng C, Zhong L. Genotoxic effect and nitrate DNA damage in HepG2 cells exposed to aristolochic acid. *Mutat Res* 2007; 630 (1-2): 97-102.
- 122 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270 (5235): 467-70.
- 123 Kulesh DA, Clive DR, Zarlenga DS, Greene JJ. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84 (23): 8453-7.
- 124 Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (24): 13057-62.
- 125 Smyth GK editor. *Limma: linear models for microarray data* New York; 2005.
- 126 Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguez P, Vera J, Mukherjee S, Valls J, Pujana MA, Alloza E, Herrero J, Al-Shahrour F, Dopazo J. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* 2006; 34 (Web Server issue): W486-91.
- 127 Seifert M, Scherf M, Epple A, Werner T. Multievidence microarray mining. *Trends Genet* 2005; 21 (10): 553-8.
- 128 Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13 (11): 2498-504.
- 129 Simoes ML, Hockley SL, Schwerdtle T, Gamboa da Costa G, Schmeiser HH, Phillips DH, Arlt VM. Gene expression profiles modulated by the human carcinogen aristolochic acid I in human cancer cells and their dependence on TP53. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008.
- 130 Chen T, Guo L, Zhang L, Shi L, Fang H, Sun Y, Fuscoe JC, Mei N. Gene Expression Profiles Distinguish the Carcinogenic Effects of Aristolochic Acid in

- Target (Kidney) and Non-target (Liver) Tissues in Rats. *BMC Bioinformatics* 2006; 7 Suppl 2: S20.
- 131 Stemmer K, Ellinger-Ziegelbauer H, Ahr HJ, Dietrich DR. Carcinogen-specific gene expression profiles in short-term treated Eker and wild-type rats indicative of pathways involved in renal tumorigenesis. *Cancer Res* 2007; 67 (9): 4052-68.
- 132 Guo YC, Lin ZX, Li H, Luo WH. The toxic effects of three Aristolochia compounds on HK-2 cell. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis* 2006; 18 (2): 88-92.
- 133 Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004; 382 (Pt 2): 393-409.
- 134 Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2004; 67 (2): 201-12.
- 135 Zhang Z, Rigas B. NF-kappaB, inflammation and pancreatic carcinogenesis: NF-kappaB as a chemoprevention target (review). *Int J Oncol* 2006; 29 (1): 185-92.
- 136 Dobrovolskaia MA, Kozlov SV. Inflammation and cancer: when NF-kappaB amalgamates the perilous partnership. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5 (5): 325-44.
- 137 Dajee M, Lazarov M, Zhang JY, Cai T, Green CL, Russell AJ, Marinkovich MP, Tao S, Lin Q, Kubo Y, Khavari PA. NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 2003; 421 (6923): 639-43.
- 138 van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgard R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* 1999; 59 (14): 3299-303.
- 139 Meissner A, Zilles O, Varona R, Jozefowski K, Ritter U, Marquez G, Hallmann R, Korner H. CC chemokine ligand 20 partially controls adhesion of naive B cells to activated endothelial cells under shear stress. *Blood* 2003; 102 (8): 2724-7.
- 140 Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1990; 265 (34): 21128-33.
- 141 Gewirtz DA. Growth arrest and cell death in the breast tumor cell in response to ionizing radiation and chemotherapeutic agents which induce DNA damage. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 62 (3): 223-35.
- 142 Deng DX, Spin JM, Tsalenko A, Vailaya A, Ben-Dor A, Yakhini Z, Tsao P, Bruhn L, Quertermous T. Molecular signatures determining coronary artery and saphenous vein smooth muscle cell phenotypes: distinct responses to stimuli. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26 (5): 1058-65.

- 143 Luz FB, Gaspar TAP, Kalil-Gaspar N, Ramos-e-Silva M. Multicentric reticulohistiocytosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15 (6): 524-31.
- 144 Catalina-Fernandez I, Alvarez AC, Martin FC, Fernandez-Mera JJ, Saenz-Santamaria J. Cutaneous intralymphatic histiocytosis associated with rheumatoid arthritis: report of a case and review of the literature. *Am J Dermatopathol* 2007; 29 (2): 165-8.
- 145 Franchimont N, Reenaers C, Lambert C, Belaiche J, Bours V, Malaise M, Delvenne P, Louis E. Increased expression of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clin Exp Immunol* 2004; 138 (3): 491-8.
- 146 Haslbeck KM, Bierhaus A, Erwin S, Kirchner A, Nawroth P, Schlotzer U, Neundorfer B, Heuss D. Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE)-mediated nuclear factor-kappaB activation in vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve* 2004; 29 (6): 853-60.
- 147 Lebeau C, Arlt VM, Schmeiser HH, Boom A, Verroust PJ, Devuyt O, Beauwens R. Aristolochic acid impedes endocytosis and induces DNA adducts in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2001; 60 (4): 1332-42.
- 148 Liebermann DA, Hoffman B. Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal* 2008; 3: 15.
- 149 Cretu A, Sha X, Tront J, Hoffman B, Liebermann DA. Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer Ther* 2009; 7 (A): 268-76.
- 150 Zumbun SD, Hoffman B, Liebermann DA. Distinct mechanisms are utilized to induce stress sensor gadd45b by different stress stimuli. *J Cell Biochem* 2009; 108 (5): 1220-31.
- 151 Balachandran P, Wei F, Lin RC, Khan IA, Pasco DS. Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: toxicity in cultured renal epithelial cells. *Kidney Int* 2005; 67 (5): 1797-805.
- 152 Chang HR, Lian JD, Lo CW, Huang HP, Wang CJ. Aristolochic acid-induced cell cycle G1 arrest in human urothelium SV-HUC-1 cells. *Food Chem Toxicol* 2007; 45 (3): 396-402.
- 153 Lord GM, Hollstein M, Arlt VM, Roufosse C, Pusey CD, Cook T, Schmeiser HH. DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2004; 43 (4): e11-7.
- 154 Lloyd DR, Hanawalt PC. p53-dependent global genomic repair of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide adducts in human cells. *Cancer Res* 2000; 60 (3): 517-21.
- 155 Tsai YS, Lee KW, Huang JL, Liu YS, Juo SH, Kuo WR, Chang JG, Lin CS, Jong YJ. Arecoline, a major alkaloid of areca nut, inhibits p53, represses DNA repair,

- and triggers DNA damage response in human epithelial cells. *Toxicology* 2008; 249 (2-3): 230-7.
- 156 Shen S, Lee J, Weinfeld M, Le XC. Attenuation of DNA damage-induced p53 expression by arsenic: a possible mechanism for arsenic co-carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2008; 47 (7): 508-18.
- 157 Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272 (38): 23465-8.
- 158 Conforti G, Nardo T, D'Incalci M, Stefanini M. Proneness to UV-induced apoptosis in human fibroblasts defective in transcription coupled repair is associated with the lack of Mdm2 transactivation. *Oncogene* 2000; 19 (22): 2714-20.
- 159 Wood RD, Araujo SJ, Ariza RR, Batty DP, Biggerstaff M, Evans E, Gaillard PH, Gunz D, Koberle B, Kuraoka I, Moggs JG, Sandall JK, Shivji MK. DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000; 65: 173-82.
- 160 Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, Groshen S, Salonga D, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Konda B, Leichman L. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998; 16 (1): 309-16.
- 161 Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 1994; 94 (2): 703-8.
- 162 Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, Cardenal F, Sanchez JM, Gumerlock PH, Taron M, Sanchez JJ, Danenberg KD, Danenberg PV, Rosell R. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (7): 2286-91.
- 163 Langie SA, Knaapen AM, Houben JM, van Kempen FC, de Hoon JP, Gottschalk RW, Godschalk RW, van Schooten FJ. The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. *Toxicol Lett* 2007; 168 (3): 302-9.
- 164 Caggana M, Kilgallen J, Conroy JM, Wiencke JK, Kelsey KT, Miike R, Chen P, Wrensch MR. Associations between ERCC2 polymorphisms and gliomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10 (4): 355-60.
- 165 Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Wei Q. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and

- neck. *Cancer* 2002; 94 (2): 393-7.
- 166 Wei Q, Wang LE, Sturgis EM, Mao L. Expression of nucleotide excision repair proteins in lymphocytes as a marker of susceptibility to squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (8): 1961-6.
- 167 Andrew AS, Karagas MR, Hamilton JW. Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. *Int J Cancer* 2003; 104 (3): 263-8.
- 168 Chatterjee A, Mambo E, Osada M, Upadhyay S, Sidransky D. The effect of p53-RNAi and p53 knockout on human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1) activity. *FASEB J* 2006; 20 (1): 112-4.

註解 [C1]:

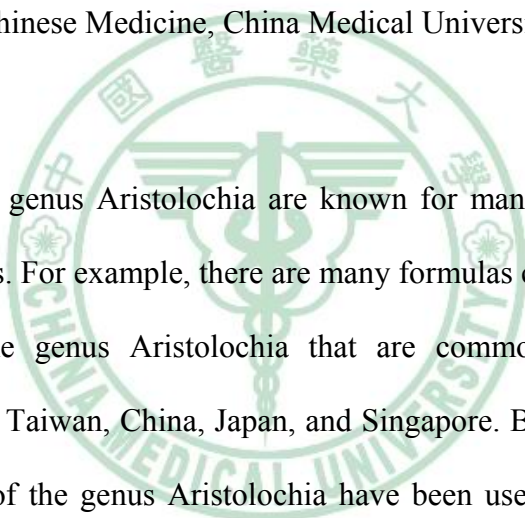


Using microarray analysis to study the pharmacological and toxicological effects of the major active components in the family Aristolochiaceae

Ya-Yin Chen

Major Professor: Su-Yin Chiang

School of Chinese Medicine, China Medical University



Plant species of the genus *Aristolochia* are known for many therapeutic effects in past centuries. For example, there are many formulas containing various species of the genus *Aristolochia* that are commonly used in traditional medicine in Taiwan, China, Japan, and Singapore. Beside in East Asia, several species of the genus *Aristolochia* have been used to regulate menstruation, induce labor, expel parasites and treat arthritis, cancer and snake bites in India, West Africa, the Mediterranean, and South America. Many plant species of the genus *Aristolochia* were commonly used as folk medicine until 1990' s when studies showed that aristolochic acid (AA), the major active component of the genus *Aristolochia* induces aristolochic acid nephropathy (AAN) and urothelial cancer in AAN patients. In this study, we used microarray analysis to clarify the pharmacological and toxicological

mechanism of AA (AA I : AA II= 41 % : 56 %) in normal human kidney proximal tubular (HK-2) cells, the target cells of AA.

HK-2 cells were treated with AA (0, 10, 30, 90 μ M) for 24 hours and 30 μ M for 1, 3, 6, 12, and 24 hours. Cell viability was measured by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Complementary DNA microarrays were used to investigate the gene expression pattern of HK-2 cells exposed to AA and the results of this microarray study were in triplicate. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay was used to verify the microarray data for selected genes. The results showed that AA induced cytotoxic effects in a dose-dependent manner (10, 30, 90 μ M for 24 h) and a time-dependent manner (30 μ M for 1, 3, 6, 12, and 24 h). Microarray analysis showed that AA can induce alterations in expression profiles of genes related to DNA damage response, apoptosis, regulation of cell cycle, and stress response. In addition, 9 biological pathways associated with immunomodulatory functions were down-regulated in AA-treated HK-2 cells. Network analysis revealed that NF- κ B played a central role in the network topology. Among NF- κ B-regulated genes, 8 differentially expressed genes were verified by real-time RT-PCR. Inhibition of NF- κ B activity by AA was confirmed by immunofluorescence confocal microscopy and by NF- κ B luciferase reporter assay.

Moreover, among the differentially expressed genes analyzed by Limma

and Ingenuity Pathway Analysis software, we found that genes related to DNA repair processes were the most significantly regulated by all AA treatments. Among the differentially expressed genes found in the dose-response and time-course studies that were involved in those biological processes, two up-regulated genes (*GADD45B*, *NAIP*), and six down-regulated genes (*TP53*, *PARP1*, *OGG1*, *ERCC1*, *ERCC2*, and *MGMT*) were confirmed by qRT-PCR. AA exposure also caused a down-regulation of the gene expression of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase. AA treatment led to increased frequency of DNA strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine-positive nuclei, and micronuclei in a dose-dependent manner in HK-2 cells, possibly as a result of the inhibition of DNA repair. These data suggest that oxidative stress plays a role in the cytotoxicity of AA.

In conclusion, our data revealed that AA could suppress NF- κ B activity in normal human cells, perhaps partially accounting for the reported anti-inflammatory effects of some plants from the genus *Aristolochia*. In addition, our results provide insight into the involvement of suppression of DNA repair genes, and trigger DNA strand breaks, oxidative DNA damages, and chromosome damages in normal human kidney proximal tubular cells. These data may provide some guidance to TCM doctors on how to use AA-containing herbs safely.

Key words : aristolochic acid, microarray analysis, human kidney proximal tubular (HK-2) cells, NF- κ B, DNA repair



作者簡歷

陳雅吟，民國 55 年生。中國醫藥大學中醫系第二十屆畢業生，1997 年取得中國醫藥大學中國醫學研究所碩士學位，於中國醫藥大學附設醫院中醫部接受內科住院醫師訓練，歷任總醫師、中醫內科主治醫師、中醫婦科主治醫師，現執業於中國醫藥大學附設醫院中醫部婦科，並兼任中國醫藥大學中醫系講師。



謝辭

本論文得以完成，首先要感謝江素瑛老師的辛勤指導、諄諄教誨，傳授基礎研究的方法及治學之道；由於她的寬容及體諒，讓我在歷經數次研究主題的改變及調整後，學業仍然得以完成；在學習過程中，江老師嚴謹的研究態度及溫和、精細的要求，讓我獲益良多。侯庭鏞教授，是我另一位要誠摯感謝的老師，由於他在研究計畫裏人力、物力的諸多支援，分析軟體的提供及指導，讓此項研究得以順利進行，並有突破性的發現，他的靈活思路及研究策略，值得我輩深思學習。

另外還要感謝林昭庚董事、鍾景光老師，由於他們的鼓勵支持、面授機宜，讓我的論文得以順利投稿刊出。還要感謝另一位指導教授高尚德院長，由於他時時提點關心，讓我如沐春風，能夠堅持下去。

感謝陳光偉所長、蘇奕彰主任、陳悅生老師及其他中醫學院老師們的教學及指導，讓本項研究可以精益求精。

還要感謝江老師、侯老師帶領的研究團隊，許博期醫師、鄭惠倪學妹及沈偉舜、王紫璇、黃薇頻、丁肇瑩、田婉諭、李佩怡、陳奕瑾等研究助理們的分工合作及幫忙，讓研究仍夠順利進行且完成。

最後要感謝我的先生賴銘南醫師，謝謝他在精神上及物質上給我的支持，並且幫忙照顧兩個小孩，才能讓我歷經9年還能念完博士。

其實要感謝的人很多很多，最後只能以感謝老天來表達我無限真摯的謝意。