

利用動物模式研究中草藥成分對化學致癌物 誘發 DNA 損傷與基因突變之拮抗作用

The use of an animal model to study the protective effects of the ingredients of Chinese herbal medicines on chemical-induced DNA damage and mutations

中國醫藥學院

江素瑛、吳焜裕、謝慶良、陳巧倩、賴俊雄

摘 要

癌症位居國人死亡原因首位，尋求預防與治療癌症的藥物乃是當代醫學重要的課題。近年來的研究已證實化學致癌物或其衍生物可與 DNA 反應形成 DNA 鍵結物(DNA adducts)，未即時被修補的 DNA adducts 在細胞複製時可能會誘發基因突變，進而引發癌症。此 DNA 損傷與基因突變已被公認為化學致癌的起始因子，基於化學預防 DNA 損傷與基因突變在減緩癌症發生的重要性，化學預防中藥的篩選與及機制的探討為一重要課題。本計劃建立了化學致癌物誘發 DNA 損傷與基因突變之動物模式，以便應用於研究可降低 DNA 損傷與基因突變進而用於抗癌防癌的中藥

首先採用中藥萃取出來的多酚類化合物單離成分茶多酚 epigallocatechin gallate (EGCG)和并沒食子酸 ellagic acid (EA)為試驗樣品進行體內測試，採用化學致癌物乙基亞硝酸基尿素 (N-ethyl N-nitrosourea, ENU) 誘發老鼠為實驗模

式,以致癌機轉中早期的 DNA 損傷與基因突變為指標,探討不同濃度的 EGCG 與 EA 對化學致癌劑 ENU 誘發老鼠組織 DNA 傷害與基因突變是否具有保護作用。小鼠經腹腔注射化學致癌物 ENU 作為陽性對照組,另外兩組小鼠經胃管餵食不同劑量的 EGCG 或 EA,連續給于七天後再投于 ENU。一批老鼠在投于 ENU 之二小時後犧牲,取出肝臟以萃取 DNA,用新發展完成之高敏感度與專屬性的氣相層析儀加質譜儀 (GC/MS) 方法定量分析 ENU 誘發的 DNA adduct 7-ethylguanine (7-EG)。另外一批老鼠在投于 ENU 之一個月後犧牲,取出脾臟分離淋巴細胞,以 T-cell cloning 方法培養在選擇性試劑(6-thioguanine)中十天,以計算 *hprt* 基因的突變機率。結果顯示陰性對照組(只餵水)老鼠肝臟組織的 7-EG 的量很低,低於我們方法偵測的極限($<1.0 \text{ pmol}/\mu\text{mol guanine}$)。30 mg ENU/kg 處理組老鼠肝臟組織的 7-EG 為 $53 \pm 9 \text{ pmol}/\mu\text{mol guanine}$,顯著高於陰性對照組老鼠。若以 200 mg/kg 與 100 mg/kg EGCG 前處理老鼠,其肝臟組織的 7-EG 分別為 19 ± 4 與 $21 \pm 19 \text{ pmol}/\mu\text{mol guanine}$,明顯低於 ENU 處理組老鼠 ($P<0.05$)。以 200 mg/kg 與 100 mg/kg EA 前處理組老鼠肝臟組織的 7-EG 分別為 $31 \pm 10 \text{ pmol}/\mu\text{mol guanine}$ ($P<0.05$)與 $54 \pm 9 \text{ pmol}/\mu\text{mol guanine}$ ($P>0.05$)。此結果顯示 EGCG 與 EA 對 ENU 誘發的 DNA 傷害有拮抗的能力,但 EGCG 的抗 DNA 損傷的效果明顯比 EA 好。在基因傷害方面,ENU(30, 60 and 90mg/kg)處理老鼠脾臟淋巴細胞之 *hprt* 突變率分別為 $36 \pm 15 \times 10^{-6}$, $63 \pm 12 \times 10^{-6}$ 與 $114 \pm 20 \times 10^{-6}$,顯著高於陰性對照組老鼠的 $2.0 \pm 0.3 \times 10^{-6}$ ($P<0.001$),同時呈現劑量反應關係。而以 100 mg/kg 和 200 mg/kg EA 或 EGCG 連續餵食老鼠七天,平均 *hprt* 突變率為 $2.0 \pm 1.0 \times 10^{-6}$ ($P>0.05$),與陰性對照組老鼠比較並無顯著差異,顯示 EA 和 EGCG 於本實驗所使用之劑量對老鼠並不具致突變性。以 25 mg/kg、100 mg/kg 或 200 mg/kg EGCG 前處理的老鼠可明顯降低 ENU (60 or 30mg/kg)誘發的脾臟淋巴細胞的 *hprt* 突變機率,對 ENU 致突變性的抑制率分別為 38 % ($P<0.05$)、53 % ($P<0.05$)與 62 % ($P<0.05$)。而 100 mg/kg 或 200 mg/kg EA 前處理組老鼠亦有顯著降低 *hprt* 基因傷害的趨勢,*hprt* 突變機率的抑制率分別為 34 % ($P<0.05$) 與 44 % ($P<0.05$)。綜合以上的結果,EGCG 與 EA 對 ENU 所誘發的 DNA 損傷與 *hprt* 基因突變有明顯的拮抗作用,即有抗基因毒性的功

能，目前正著手研究 EGCG 與 EA 是否藉著增強老鼠體內去毒能力、增加抗氧化能力或者強化 DNA 修補的能力而產生抗 DNA 損傷與基因突變的作用。本計畫利用中藥抽提物之單離成分以驗證此基因傷害與突變的動物模式，未來將繼續利用這個動物模式來探討各種中藥單劑與複方之抗癌效果與其作用機制。

關鍵詞：DNA 損傷、基因突變、化學致癌物、中草藥、并沒食子酸、茶多酚

China Medical College

Su-yin Chiang, Kuen-yuh Wu, Ching-Liang Hsieh,
Chiao-Chien Chen and Jim-Hsoun Lai

Abstract

Cancer is the leading death cause in Taiwan. It becomes an urgent issue to search for medicines against cancer. Recent studies have demonstrated that genotoxic chemicals or their derivatives can interact with DNA to form DNA adducts, which may cause mutations during DNA replication and subsequently lead to cancer development. DNA adducts and mutations are considered as early indicators in the pathogenesis of carcinogenesis. Medicines that could inhibit the formation of DNA adducts and mutations might suggest their potential in cancer prevention. In this study, we developed an animal model to investigate the protective effects of the ingredients of Chinese herbal medicines on genotoxicant-induced DNA damage and mutations. Ellagic acid (EA) or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), isolated ingredients from Chinese herbal medicines, are known to possess anti-carcinogenic effects in rodents. However, more studies are needed to understand their underlined mechanisms. Mice were orally fed with EA or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) for seven days before challenging with genotoxicant N-ethyl nitrosourea (ENU). Two hours after ENU administration, mice were sacrificed, and the liver DNA was extracted for analysis of

DNA adduct (7-ethylguanine) by using highly sensitive and specific gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Another sets of mice were sacrificed 4 weeks after ENU administration; the splenic lymphocytes were isolated and cultured in the presence of the selective agents 6-thioguanine. The mutant colonies were counted to determined *hprt* mutation frequency. The level of 7-EG in the liver tissues of 30 mg/kg ENU-exposed mice was 53 ± 9 pmol/ μ mol guanine, much higher than that in control mice (<1.0 pmol/ μ mol guanine). Pretreatment with EGCG (100 and 200 mg/kg) or EA (200 mg/kg) significantly reduced ENU-induced 7-EG in mouse liver tissues ($P<0.05$). Treatment with 30, 60, and 90 mg/kg ENU in mice induced the *hprt* mutation frequencies of $36 \pm 15 \times 10^{-6}$, $63 \pm 12 \times 10^{-6}$ and $114 \pm 20 \times 10^{-6}$, respectively, as compared to the control ($2.0 \pm 0.3 \times 10^{-6}$). Pretreatment with EGCG (25, 100 and 200 mg/kg) or EA (100 and 200 mg/kg) significantly reduced ENU-induced *hprt* mutations in mice ($P<0.05$). Our data showed that EA and EGCG could reduce ENU-induced DNA damage and *hprt* mutations, suggesting that the anti-carcinogenic effects of EA and EGCG might at least partly result from this mechanism. We successfully used the isolated ingredients of Chinese herbal medicines (EA or EGCG) to establish this animal model. Future studies will be extended to the anti-carcinogenic effects of single or mixed Chinese herbal medicines. The development of this animal model will provide a great opportunity to study the anti-genotoxic mechanisms of Chinese herbal medicines in animal.

Keywords : Anti-genotoxic effects, DNA adduct, *hprt* mutation frequency, ellagic acid, (-)-epigallocatechin gallate

壹、前言

近年來癌症已居國人死因的首位，早期的診斷再經由手術切除、放射、或化學治療，為目前提高癌症存活率的不二法門。但仍面對某些癌症可能有癒後不好，或是癌症病人未能提早就醫診斷等問題，因此癌症的預防已成為癌症研

究的重要主題之一。另外在許多研究中也發現傳統的中醫藥可能具有抗癌的功能，其機轉可能隨著藥物種類而異，但可能仍遵循中醫扶正祛邪的基本原則。扶正可增強機體的抵抗能力，而祛邪乃以各種方法祛除病邪，使機體不受病邪影響而保持健康，在此病邪指的是人體內外環境中所有致病因子的總稱。

癌症為一因攜帶人類遺傳密碼的基因病變而引起之疾病，基因病變可能受環境因素（environmental factors）、個人生活行態（life style）、與內生性因子（endogenous sources）等影響。在一般生活中，人或多或少經呼吸及飲食會吸入一些致癌物，而體內脂質過氧化（lipid peroxidation）也會產生一些對身體有害的物質（1），這些物質會攻擊基因而造成傷害與突變。因此基因的傷害與突變可能隨年紀的增長而累積，Bruce Ames 就曾經發表癌症發生率與年齡的四次方成比例的關係（2）。減少基因的損傷或突變可能與預防致癌或老化有密切關係，也進一步驗證扶正祛邪基本原則。

目前化學致癌理論支持基因毒物（genotoxicants）或其活性代謝物會與體內大分子（macromolecules）反應（3），形成共價鍵結合穩定的產物。其與 DNA 反應的產物為 DNA adducts，被認為是致癌物對基因最早的傷害。如果未能及時為體內 DNA 修補酵素（repair enzymes）修復，這些 DNA adducts 於細胞分裂後可能會引起突變，如突變發生在一些關鍵基因，則突變細胞可能逐漸發展為癌細胞（1,2）。而非基因毒物（non-genotoxic）的致癌物則可能是間接引起基因突變，而引發癌的生成。因此分析活體內基因毒物所誘發的 DNA adducts 可代表基因受傷害的程度，如使用抗癌中藥能降低 DNA adducts 的濃度，則代表著這些中藥可能藉抑制代謝活化、增強去毒能力、或者強化 DNA 修補的能力而產生抗癌性，因此可利用這類動物模式研究中藥的抗癌效能與機制。

乙基亞硝酸尿素（ethylnitrosourea; ENU）為一不需經活化代謝的基因毒物，會解離為乙烷基離子而與 DNA 的 bases 反應而產生各種 DNA adducts（4），如 7-ethylguanine（7-EG）與 O⁶-ethylguanine 等，老鼠實驗已證實 ENU 會造成基因的突變頻率增加（5）。因此以 ENU 作為動物實驗之誘發劑，將可建立一良好動物模式，供測試中藥對人預防癌症的功效。

目前國內亟需建立一個動物模式，以有系統的作中醫藥防癌抗癌的測試，

不僅能提供測試中醫藥的抗癌的效應，同時也可以檢驗抗癌藥物的作用機制。本計畫的目的就是要利用處理過基因毒物 ENU 的老鼠模式以測試中醫藥的抽提物的抗 DNA 傷害與突變的功用，進而了解這些藥物在體內作用的機轉。

在本計畫中，中藥的抽提物單離成分并沒食子酸 (ellagic acid) 和表沒食子兒茶素表沒食子酸酯 ((-)-epigallocatechin gallate, EGCG) 成分將被用於測試其對 ENU 所誘發的 DNA 傷害與突變是否有抑制的作用(圖一)。并沒食子酸存在於許多常見的中草藥植物中，如葉下珠、丁香、安石榴、蜜甘草和廣棗等(6,7,8,9)。台灣常見的水果如草莓、芒果、與番石榴等，也都含有高量的并沒食子酸(8)。其抗癌的作用在 1980 年代就已被發現 (10)，在文獻中亦記載它能抑制許多致癌物在動物體內所誘發的基因損傷與惡性腫瘤 (8,11)，體外實驗也證實它能預防基因突變 (8,12)。并沒食子酸的抗癌作用可能藉由抑制代謝酵素的活性或者誘發去毒酵素的功能 (8,13)，而實際的機制尚未完全被了解。因此亟需進一步作動物實驗來研究其抗基因突變之效果，以了解其抗癌機制。

茶葉為舉世常用的天然健康飲料，其不但可解渴提神，並有保健的功效。唐代<本草拾遺>提到“諸藥為各病之藥，茶為萬病之藥”。茶多酚類(catechins)為綠茶葉的主要多酚類化合物，約佔茶葉物重 18-25%，包含茶多酚((+)-catechin)、表兒茶素((-)-epicatechin, EC)、表沒食子兒茶素((-)-epigallocatechin, EGC)、表兒茶素表沒食子酸酯((-)-epicatechin gallate, ECG) 與 EGCG。茶多酚類具有廣泛的藥理活性；有抗腫瘤、抗突變、抗氧化、降血脂及抗動脈粥樣硬化、抗凝血及抗血栓、防齲、殺菌消炎和抗衰老等主要功效(14,15,16)。由於茶葉具有很強的抗氧化性，而自由基的生成與腫瘤、心臟血管疾病、與衰老等的發生有密切的關係(16)。近年來流行病學研究指出，時常飲用綠茶的人們其得到某些癌症的機率顯著降低(8,17)。茶多酚類是一類相當有研發價值的天然藥物，目前茶葉對致癌物在誘癌過程中的作用，多數研究還停留在動物實驗階段(18,19)，其對於某些腫瘤的預防價值得進一步研究。

貳、材料與方法

實驗方法與步驟描述如下：

- 1.動物準備：雄性 C57BL6 小鼠，每隻體重約 20 克，每六隻一組飼養在籠子內，先讓動物適應于光照與熄燈各 12 小時，並放置標準食物與飲水，由動物們隨意取食，為期一個禮拜。
- 2.基因損傷與突變模型：使用 ENU 化學致癌劑來誘發基因損傷與突變。
 - (1)老鼠經 ENU(30, 60, 90mg/kg)腹腔注射處理，誘導基因損傷與突變，並留一批老鼠用 water 腹腔注射作為陰性對照組。於注射二小時後，將每組 3-4 隻老鼠犧牲，取出肝臟等器官供作 DNA adducts 研究。於注射後第二十八天將剩餘每組 4 隻老鼠犧牲，取出脾臟以作基因突變研究。
 - (2)餵食老鼠高劑量(200mg/kg)或低劑量(100, 25mg/kg)的 EGCG 或并沒食子酸七天，每天一次。于二十八天後，老鼠將被犧牲取出脾臟，供作 EGCG 與并沒食子酸的可能誘發基因突變之研究。
 - (3)餵食老鼠高劑量或低劑量的 EGCG 或并沒食子酸七天(每天一次)，一小時後，老鼠再經 ENU(30 or 60 mg/kg 腹腔注射處理。於 ENU 注射二小時後，將每組 3-4 隻老鼠犧牲，取出肝臟等器官供作 DNA adducts 研究。於 ENU 注射後第二十八天將剩餘每組 4 隻老鼠犧牲，取出脾臟以作基因突變研究。
- 3.分析 DNA adducts 含量：
 - (1)DNA 由老鼠肝臟用氯仿及酚抽取方法抽取之。
 - (2)準備約 100 μ g DNA 樣品溶液，加入定量的 $[^{13}\text{C}_4]$ -7EG，放置在 4 過一夜。
 - (3)將所準備的樣品在 100 加熱 15 分鐘，迅速將樣品放置於冰浴中，在加入適量冷 1N HCl，並在 1300 g 條件下離心 15 分鐘。
 - (4)收取懸浮液、再加入適量的冷 1N HCl，離心在 1300 g 為時 15 分鐘。

- (5)合併兩次取懸浮液、用真空乾燥器吹乾後、加入適量的 degassed 6 N HCl 及適量的 *tert*-butylnitrite 在 4 反應 4 小時。
- (6)用真空乾燥器吹乾後、用適量的乙酸乙酯及適量的水 (HPLC grade) 萃取樣品，保留水層。
- (7)用真空乾燥器吹乾後，加入 5 mg 的碳酸鉀，10% 的 pentafluorobenzyl bromide/acetonitrile，在室溫反應 20 小時。用氮氣加熱吹乾後、再用適量的乙酸乙酯萃取三次。氮氣加熱吹乾後，用 silica gel 去除未反應物及雜物。
- (8)用氮氣加熱吹乾後、溶於適量的甲苯，注射 1.0 μ l 的樣品進入 GC column。
- (9)氣相層析儀加質譜儀分析樣品中 7-MG 的含量：使用 30 m 長 DB-5 毛細管管柱 (0.32 mm 直徑 及 0.1 薄膜厚度)，經由 Fisons AS800 型 (GC8060 Model) 氣相層析儀與 VG Platform II 質譜儀連接。氣相層析儀使用 split-splitless 注射頭 (injector)，氮氣作攜帶氣體 (head pressure 設 10 psi)，甲烷作為離子化氣體，設定在 5×10^{-5} mbar，溫度由 70°C 到 300°C 十分鐘，在 300°C 維持三分鐘。source 溫度設 250°C，定性分析時，以全掃描模式操作 (full-scan mode)，定量分析時，以選擇固定離子偵測 (selective-ion mode)。

4.脾臟淋巴細胞 *hprt* 突變測試：

- (1)脾臟淋巴細胞之分離：在無菌下取出小鼠脾臟，並置於細胞培養基 (RPMI-1640)中，然後將個別的脾臟以鑷子擠碎，再用針筒以 25 號針管吸取三次，即成單一懸浮細胞液(single cell suspension)。經用 Percoll 密度梯度離心後 (density gradient centrifugation)，回收脾臟淋巴單核細胞。
- (2)脾臟淋巴細胞之培養：脾臟淋巴單核細胞(1×10^6 /ml)調配於內含 10 % 胎牛血清之細胞培養基(RPMI-1640)中，加入白鳳豆素(Concanavalin A)當作分裂原(mitogen)與 T-細胞生長因子(interleukin-2)來刺激細胞增殖，於培養箱中培養一天。

(3)hprt 突變率量測：二天後，再培養脾臟淋巴細胞在含有選擇試劑(6-thioguanine)之培養基中(5×10^5 cells/ml)，于 96 孔之培養皿中，每孔加入 100 μ l 之細胞，將細胞培養十天後，計算突變細胞窟窿數(Colony)以決定突變頻率。

5. 結果統計分析

平均數據以 Mean \pm S.D.表示，而各組間的差異比較，將採用 Student' s-t-test 加以評估分析，若 $P < 0.05$ 則視為有意義的差異。

參、結果

一、研究 EA 與 EGCG 預防 DNA 損傷的能力：

氣相層析儀加質譜儀分析 7-ethylguanine (7-EG)的方法已發展成功；合成 $^{13}\text{C}_4$ -7-EG 作為內標準品以定量樣品中之 7-EG，為定量分析 7-EG，一以 7-EG 對 $^{13}\text{C}_4$ -7-EG 作檢量線，其線性非常好($R^2=0.99$)。這種方法又稱為同位素稀釋法，其優點在於使用一不具輻射性之同位素標示的 7-EG 作內標準品，因其物理化學性質完全相同，故在氣相層析儀的管柱中滯留時間完全相同，可由 GC/MS 圖譜看到上圖譜 ($m/z = 359$) 與下圖譜($m/z = 363$) 各有一滯留時間為 19.56 分鐘的峰(圖二)，兩者同時出現，此方法的另一好處為自動校正樣品在前處理中的損失。

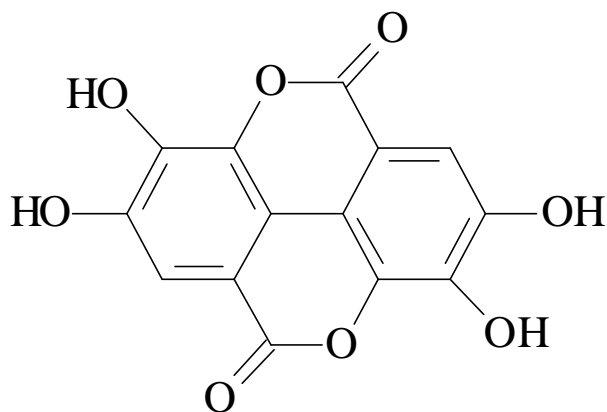
以水處理過的陰性對照組老鼠肝臟組織的 7-EG 的量很低，低於我們方法偵測極限(<1.0 pmol/ μ mol guanine)，30 mg ENU/kg 處理組老鼠肝臟組織的 7-EG 為 53 ± 9 pmol/ μ mol guanine，顯著高於陰性對照組老鼠。結果並顯示 EGCG 與 EA 都有拮抗 DNA 傷害的能力，若以 200 mg/kg 與 100 mg/kg EGCG 前處理老鼠其肝臟組織的 7-EG 分別為 19 ± 4 與 21 ± 19 pmol/ μ mol guanine，明顯低於 ENU 處理組老鼠($P < 0.05$) (圖三,四)，以 200 mg/kg 與 100 mg/kg EA 前處理組老鼠肝臟組織的 7-EG 分別為 31 ± 10 pmol/ μ mol guanine ($P < 0.05$)與 54 ± 9 pmol/ μ mol guanine ($P > 0.05$)。由此結果證實 EGCG 的抗 DNA 損傷的效果不錯，不論高劑量或低劑量都有效。EA 則只有在高劑量才有抗基因傷害的效果，並

且其效果不如 EGCG 的好。

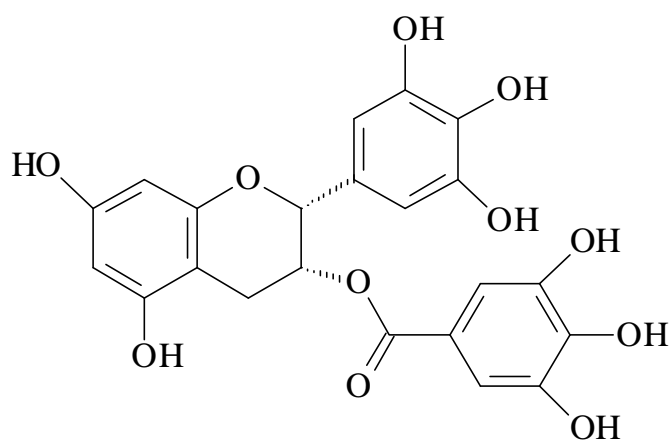
二、研究 EA 與 EGCG 預防基因突變的能力：

為了發展老鼠體內 *hprt* 突變測試模型，首先必須初代培養老鼠脾臟淋巴細胞，並克服初代淋巴細胞所造成的低 cloning efficiency。我們選用三家不同廠牌 (Gibco BRL, Selborne Biological Services, Biological industries) 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、三家不同廠牌 (Pepro Tech EC, R&D systems, Boehringer Mannheim) 的 T-細胞生長因子 (interleukin-2, IL-2)、二家不同廠牌的無血清培養基 (serum-free medium, HL-1 medium from BioxWhittaker, QBSF medium from Sigma)、二家不同廠牌 (Amersham Pharmacia, Sigma) 的分裂原 (Concanavalin A, conA) 來進行測試。目前已經找到最佳條件，cloning efficiency 於 11 隻老鼠為 $6.7 \pm 3.1 \%$ ，比文獻上報導的 2.0 ~ 5.0 % 更好 (20,21)。

在基因傷害方面，以 PBS 或水腹腔注射老鼠作為正常對照組，其老鼠脾臟淋巴細胞 *hprt* 突變機率为 $2.0 \pm 0.3 \times 10^{-6}$ (0.4~2.6)。老鼠經 30 mg/kg、60 mg/kg、90 mg/kg 的 ENU 腹腔注射處理，其老鼠脾臟淋巴細胞 *hprt* 突變機率隨著劑量的增加而增加，*hprt* 突變率分別為 $36 \pm 15 \times 10^{-6}$ ， $63 \pm 12 \times 10^{-6}$ 與 $114 \pm 20 \times 10^{-6}$ ，顯著高於陰性對照組老鼠 ($P < 0.001$) (圖五)。同時呈現劑量反應關係。而以 100 mg/kg 和 200 mg/kg EA 或 EGCG 連續餵食老鼠七天，平均 *hprt* 突變率為 $2.0 \pm 1.0 \times 10^{-6}$ ($P > 0.05$)，與陰性對照組老鼠比較並無顯著差異，顯示 EA 和 EGCG 於本實驗所使用之劑量對老鼠並不具致突變性。以 25 mg/kg、100 mg/kg 或 200 mg/kg EGCG 前處理的老鼠可明顯降低 ENU (60 or 30mg/kg) 誘發的脾臟淋巴細胞的 *hprt* 突變機率，對 ENU 致突變性的抑制率分別為 38 % ($P < 0.05$)、53 % ($P < 0.05$) 與 62 % ($P < 0.05$) (圖六,七)。而 100 mg/kg 或 200 mg/kg EA 前處理組老鼠亦有顯著降低 *hprt* 基因傷害的趨勢，*hprt* 突變機率的抑制率分別為 34 % ($P < 0.05$) 與 44 % ($P < 0.05$) (圖六,七)。綜合以上的結果，EGCG 與 EA 可減低 ENU 所誘發的 DNA 損傷與基因突變，即有抗基因毒性的功能。

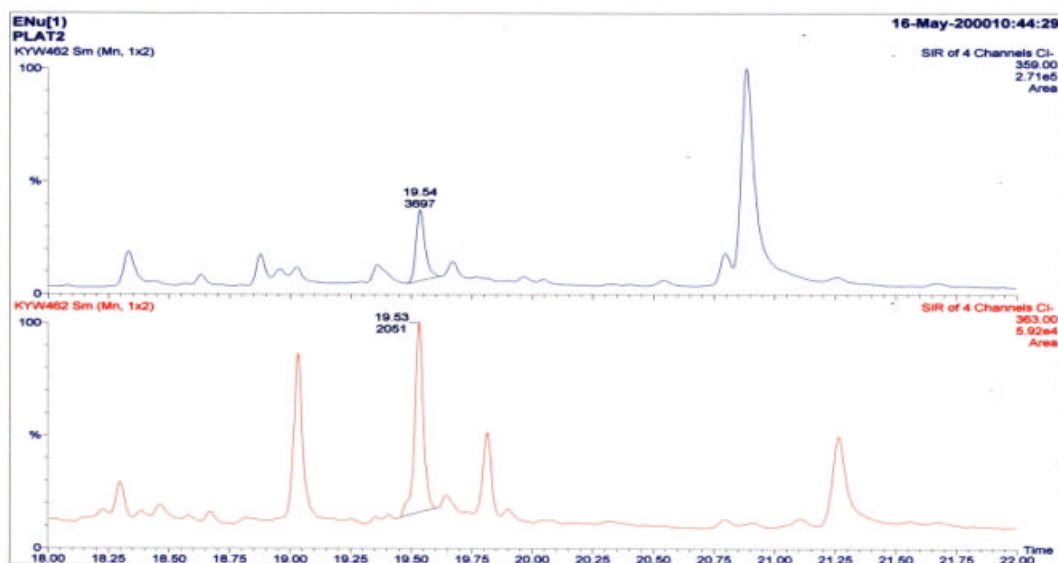


并沒食子酸 (Ellagic acid, EA)



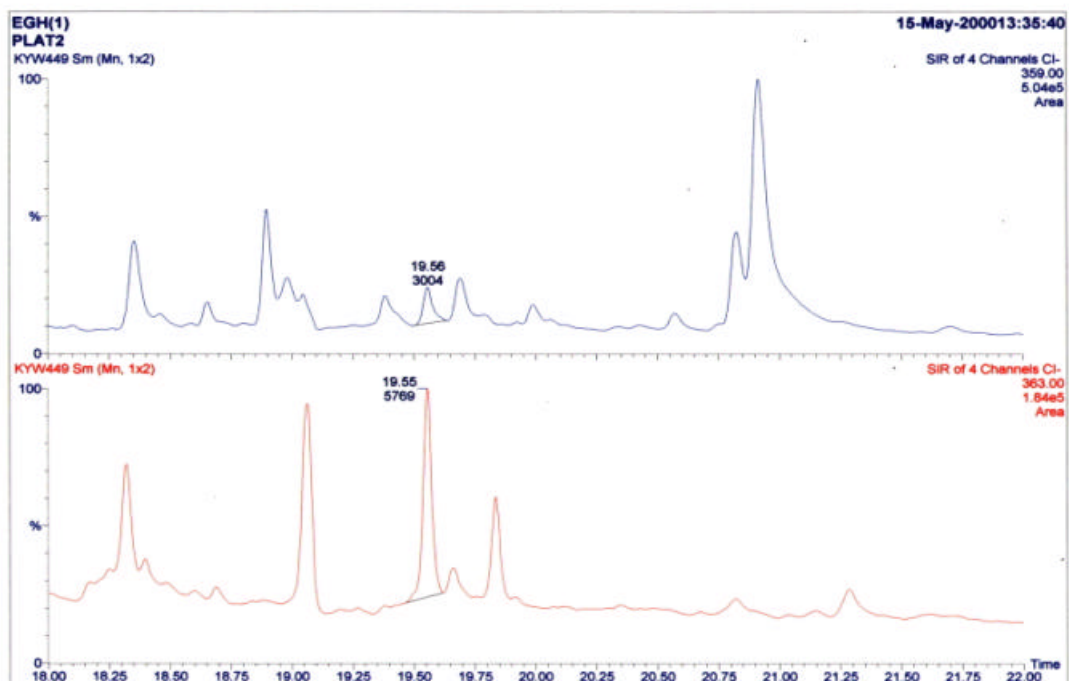
表沒食子兒茶素表沒食子酸酯
(-)-epigallocatechin gallate, EGCG)

圖一、EA 與 EGCG 之化學結構式



圖二、ENU 處理老鼠之肝臟 DNA 的 7-EG GC/MS 圖譜

老鼠僅以 ENU (30 mg/kg) 處理二小時後，肝臟 DNA 中 7-EG 的含量，此圖上半部為 $m/z = 359$ 之 GC/MS 圖譜，下半部為 $m/z = 363$ 之 GC/MS 圖譜，兩者之分子量差為 4，即來自 7-EG 與 $^{13}\text{C}_4$ -7-EG 的分子量間的差異。兩者因物理化學性質相同，在毛細管中的置留時間幾乎完全一樣。



圖三、EGCG 前處理老鼠之肝臟 DNA 的 7-EG GC/MS 圖譜。

老鼠經以 EGCG (200 mg/kg) 連續處理七天後，再以 ENU (30 mg/kg) 處理二個小時，其肝臟 DNA 中 7-EG 的量確實降低。與圖二相同上半部為 $m/z = 359$ 之 GC/MS 圖譜，下半圖為 $m/z = 363$ 之 GC/MS 圖譜。

Treatment	7-EG (pmol/ m mol guanine)*
Control (water)	ND (< 1) **
ENU (30 mg/kg)	53 ± 9
ENU + EGCG (100 mg/kg)	21 ± 19 #
ENU + EGCG (200 mg/kg)	19 ± 4 ##
ENU + EA (100 mg/kg)	54 ± 9
ENU + EA (200 mg/kg)	31 ± 10 #

*7-EG (pmol/ μ mol) = [m/z =359 area / (m/z =363) area] x
(1 pmol of internal std.)/DNA content (μ mol of guanine)

**ND: below the detection limit

圖四、EGCG 與 EA 對 ENU (30 mg/kg) 誘發老鼠肝臟 DNA 損傷 7-EG 的拮抗作用。Mean and standard deviation of three mice.

Control : water only

ENU : ENU 30 mg/kg

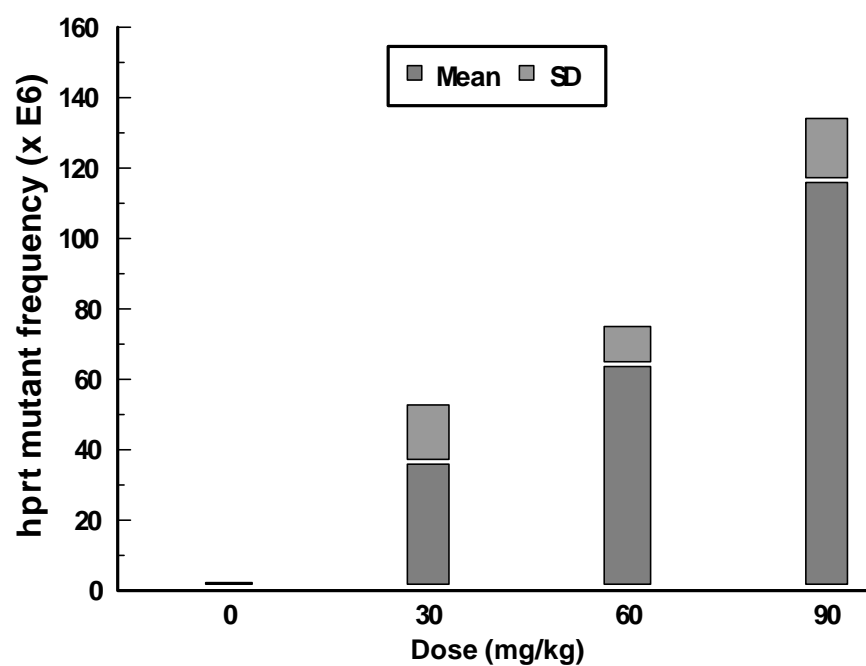
EGCG 100 : EGCG 100 mg/Kg

EGCG 200 : EGCG 200 mg/Kg

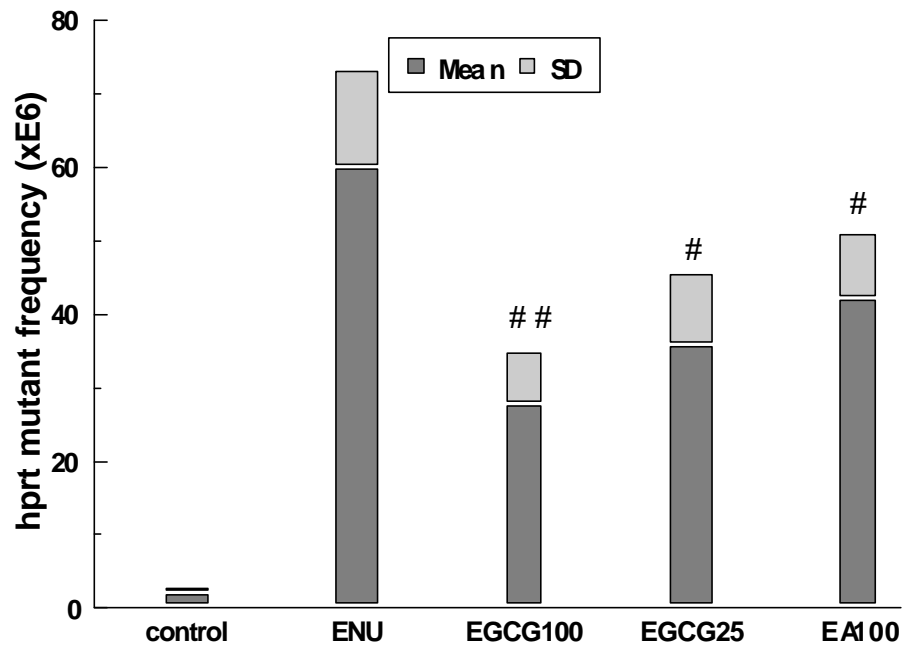
EA 100 : EA 100 mg/Kg

EA 200 : EA 200 mg/Kg

P<0.05, ##P<0.01 compared with the values of ENU



圖五、ENU 誘發老鼠脾臟 T 淋巴球產生 *hprt* 基因突變的劑量反應關係。
Mean and standard deviation of four mice.



圖六、EGCG 與 EA 對 ENU(60 mg/kg)誘發老鼠脾臟 T 淋巴球 *hprt* 基因突變的拮抗作用。Mean and standard deviation of four mice.

Control : water only

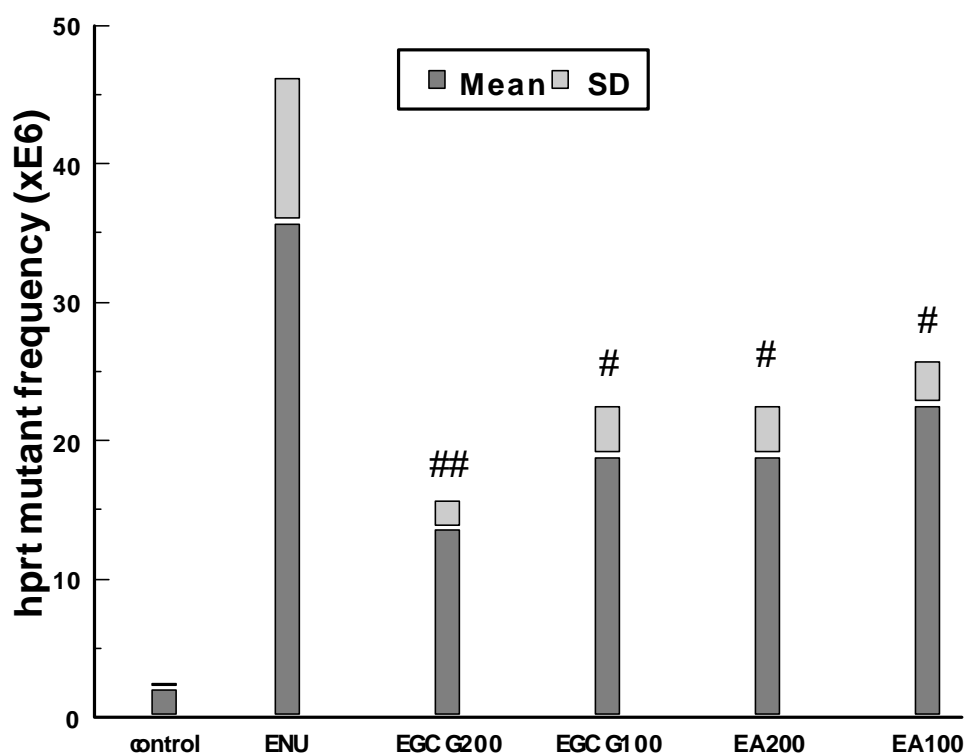
ENU : ENU 60 mg/kg

EGCG 100 : EGCG 100 mg/Kg

EGCG 25 : EGCG 25 mg/Kg

EA 100 : EA 100 mg/Kg

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with the values of ENU



圖七、EGCG 與 EA 對 ENU(30 mg/kg)誘發老鼠脾臟 T 淋巴球 *hprt* 基因突變的拮抗作用。Mean and standard deviation of three mice.

Control : water only

ENU : ENU 30 mg/kg

EGCG 200 : EGCG 200 mg/Kg

EGCG 100 : EGCG 100 mg/Kg

EA 200 : EA 200 mg/Kg

EA 100 : EA 100 mg/Kg

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with the values of ENU

肆、討論

為探討 EGCG 與 EA 的抗 DNA 損傷的效用，我們利用新開發之高專一性與敏感度的同位素稀釋 (Isotopic dilution) / 氣相層析儀加質譜儀方法來分析 7-EG，這是世界上首次利用這種方法來分析 7-EG。傳統分析 7-EG 的方法有高效能液體層析儀 (HPLC) 加螢光儀 (fluorescence) 電化學偵測器 (electrochemical detector ; ECD) 免疫化學 (immunochemistry) ^{32}P -postlabeling 或是 HPLC 加 ^{32}P -postlabeling 等 (22,23,24)。這些方法不是敏感度 (sensitivity) 不足，就是專屬性 (specificity) 不佳。近年來由於分析化學技術及儀器的進步，使用氣相層析儀加質譜儀 (GC/MS) 來定量 DNA adducts，其敏感度非常高，同時用 GC/MS 分析樣品亦可得到化學結構相關的資料，專屬性非常高，為其他方法所不及。

而本實驗中用於探討 EA 與 EGCG 降低老鼠體內 7-EG 效果所使用的 GC/MS 方法，為在質譜儀的定量分析方法中最適用於超微量分析的同位素稀釋法。這方法需要合成一非常穩定而且不具輻射性的同位素標識之 DNA adduct 作為內標準品 (internal standard)，如能與分析物的質量的差異在四以上最為適當。因為內標準品與要分析的 adduct 具完全相同的物理和化學性質，如於樣品準備時加進定量的內標準品，則可彌補樣品在前處理的損失而不會低估分析物之含量 (25)。

先前研究顯示 ENU 處理老鼠其 7-EG 的濃度在暴露後 1.5-2 小時為最高 (26)，因此本實驗採用於 ENU 暴露後 2 小時的組織來測量其 DNA 傷害。實驗結果顯示 EGCG 抗 DNA 損傷的效果明顯比 EA 好，EA 則只有在高劑量才有抗 DNA 傷害的效果，並且其效果不如 EGCG 的好。為什麼 EGCG 的預防 DNA 傷害的效果比 EA 好，可能需要進一步的研究以瞭解其機制。基本上 ENU 不需 CYP450 的活化代謝既可形成乙烷離子，因此 7-EG 濃度的降低，並非經由藥物對代謝酶的影響。反過來，可能與去毒酶或 DNA 修復酶的誘發有相關。另外最重的因素則可能是 EA 在許多的溶劑中的溶解度非常低，在本實驗中 EA

以水製成懸浮液後餵食老鼠，EA 的抗 DNA 傷害效果是否受其吸收效率的影響須要進一步探討(8)。

另外本實驗首次使用活體動物 *hprt* 突變模式評估中醫藥有效成分的抗突變效用，使用次黃嘌呤鳥糞嘌呤轉磷酸核糖基醇素基因（*hprt*）為標識基因（Marker gene），其為毒理學中最常用於研究致癌物質誘發基因突變的標識基因。*hprt* 基因位於 X-性染色體上，只要誘變劑引發單一突變的產生，則足以讓 *hprt* 的功能喪失。*hprt* 蛋白為一非細胞生存必需蛋白，具 *hprt* 基因突變的細胞仍可存活下來。同時具 *hprt* 基因突變的細胞可很容易被選擇性試劑（6-thioguanine）挑選出來，進而計算出 *hprt* 基因的突變機率，此數字表示遺傳物質損傷程度，這是偵測遺傳毒性的一個靈敏且準確可靠的方法(20,21)。

T-淋巴球的 *hprt* 突變率已被廣泛應用，作為環境化學物暴露與可能誘發毒性反應程度的生物指標，*hprt* 突變可偵測許多種不同形式的突變，其中有許多突變類似於那些在惡性腫瘤上的致癌基因所發現的突變。最近的報告更進一步證實了偵測 T-淋巴球的 *hprt* 突變率可以忠實的代表骨髓瘤突變反應發生的頻率(27)。即使低濃度的受試藥物就能引起 *hprt* 突變機率的增加，因此可配合量測 DNA adducts 的量，提供非常重要的有關中藥如何影響動物體內的代謝活化、去毒作用、與 DNA 修補功能的交互作用，進而產生抗癌作用(8,28)。

由文獻上，我們可看到在一般的動物防癌實驗中，所使用的防癌藥物與化學致癌物的劑量都有偏高的現象。但是在日常生活中人所暴露的化學致癌物很低，此時所形成的 DNA adducts 的量也都相當低。因此一般人所需攝取的防癌藥物的劑量應該也不需要很高，如果要分析 DNA adduct 的量以驗證其防癌效果，則需要使用敏感度(sensitivity)與專屬性(specificity)都非常高的方法。這時我們所開發的氣相層析儀加質譜儀的方法，將會是最適用的分析方法。本實驗中我們建立一個新的測試抗 DNA 損傷與突變動物模式，希望同時經由對機制的探討，如 EGCG 與 EA 是否藉著增強老鼠體內去毒能力、增加抗氧化能力或者強化 DNA 修補的能力而產生抗 DNA 損傷與基因突變的作用，可能會提供一個開發新藥的方向。

伍、結論與建議

在本計劃執行中，利用我們實驗室新建立的老鼠體內基因突變模式，首先發現茶多酚與并沒食子酸確實可抑制化學致癌物所誘發老鼠脾臟 T 淋巴球產生的 *hprt* 基因突變，來驗證 EGCG 與 EA 的預防癌症效果。因此經常飲用綠茶對某些高危險群的人，如可能會接觸化學或輻射的癌物的工作人員及抽煙者的健康有所助益。

同時利用我們新發展成功的氣相層析儀加質譜儀的方法，再次證實茶多酚與并沒食子酸確實可降低化學致癌物所誘發老鼠組織的 DNA 傷害，顯示其對癌症的預防具有應用價值。我們已開發先進的動物模式供評估中醫藥有效成分的防癌效用評估，未來如能進行各種去毒能力、DNA 損傷修復能力與基因突變圖譜的分析研究，將可進一步幫助我們瞭解中醫藥抗癌機制。

陸、參考資料

1. Weinberg R.A. Oncogenes, antioncogens, and the molecular bases of multistep carcinogenesis, *Cancer Res.*, 1989, 49: 3713-3721.
2. Ames, B.N. and Gold, L.S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.*, 1991250:3-16.
3. Miller, E.C and Miller, J.A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, 1981, 47: 1055-1064.
4. Preussmann, R. and Eisenbrand, G. N-nitroso carcinogens in the environment. In: Acs Monograph 182, Chemical Carcinogens, Vol. 1. Pp. 829-868., 1984.
5. Skopek, T.R., Walker, V.E., Cochrane, J.E., Craft, T.R. and Cariello, N.F. Mutational spectrum at the *hprt* locus in splenic T-cells of B6C3F₁ mice exposed to N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89: 7866-7870.
6. 萬振先、易楊華:葉下珠化學成分的研究。中草藥。25(9):455~456,492,1994
錢浩、胡巧玲:中藥廣棗化學成份研究。現代應用藥 9(5):212~213,1992

7. Cai, L. and Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, 1996, 59(10):987-990
8. Stoner, G.D. and Mukhtar, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents, *J. Cellular biochemistry, Supplement*, 1995, 22:169-180
9. Satomi, H., Umemura, K., Ueno, A., Hatano, T., Okuda, T., Noro, T. Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1993, 16(8):787-790
10. Lesca P. Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis*, 1983, 4:1651-3.
11. Mientjes, E.J., Hochleitner, K., Luiten-Schuite A., van Delft, J.H., Thomale, J., Berends, F., Rajewsky, M.F., Lohman, P.H., Baan, R.A., Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food & Chemical Toxicology*, 1999, 37(4):313-8
12. Dixit, R. and Gold, B. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 1986, 83: 8039-43.
13. Majid, S., Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Kapur, S. and Sharma, R.R. Influence of ellagic acid on antioxidant defense system and lipid peroxidation in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 1991, 42:1441-1445.
14. Taniguchi, S., Fujiki, H., Kobayashi, H., Go, H., Miyado, K., Sadano, H. and Shimokawa, R. Effect of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines. *Cancer Lett.*, 1992, 65: 51-54.
15. Kuroda Y. Bio-antimutagenic activity of green tea catechin in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.*, 1996, 361: 179-86.
16. 楊秀芳、楊賢強、王立新：茶多酚清除活性氧自由基的效能及對腫瘤的化學預防作用。上海醫藥期刊。19(12)：29-31, 1998

17. 吳永方、徐國華、羅仁峰、陳瓊霞:綠茶素(TP-91)抗腫瘤作用的實驗研究。腫瘤防治研究。26(3):161~163,1999
18. Hasegawa, R., Chujo, T., Sai-Kato, K. Umemura T., Tanimura A. and Kurukawa, Y. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food & Chem. Toxicol.*, 1995, 33: 961-970.
19. 韓馳：茶葉防癌有效成份及其作用機理。中國藥理學與毒理學雜誌。11 (2): 105-106, 1997
20. Skopek, T.R., Kristy, L.K. and Deborah, R.M. Relative sensitivity of the endogenous *hprt* gene and lacI transgene in ENU-treated Big Blue™ B6C3F1 mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1995, 26: 9-15.
21. Walker, V.E. and Skopek, T.R. A mouse model for the study of *in vivo* mutational spectra: Sequence specificity of ethylene oxide at the *hprt* locus. *Mutat. Res.*, 1993, 288: 151-162.
22. Koivisto, P. and Hemminki, K. ³²P-postlabelling of 2-hydroxyethylated, ethylated, and methylated adducts of 2'-deoxyguanosine 3'-monophosphate. *Carcinogenesis*, 1990, 11: 1389-1392.
23. Walker, V.E., Fennell, T.R., Upton, P.B., Skopek, T.R. Prevost, V., Shuker, D.E. and Swenberg, J.A. Molecular dosimetry of ethylene oxide: formation and persistence of 7-(2-hydroxyethyl)guanine in DNA following repeated exposures of rats and mice. *Cancer Res.*, 1992, 52: 4328-4334.
24. Van Delft, J.H., van Winden, M.J.M., van den Ende, A.M.C. and Baan, R.A. Determining N7-alkylguanine adducts by immunochemical methods and HPLC with electrochemical detection: application in animal studies and in monitoring human exposure to alkylating agents. *Environ. Health Perspect.*, 1993, 99: 25-32.
25. Wu, Kuen-Yuh, Scheller, Nova, Ranasinghe, Asoka, Yen, Robert, and Swenberg, James A. A gas chromatography/electron capture/negative chemical ionization high-resolution mass spectrometry method for analysis of endogenous and

- exogenous N7-(2-hydroxyethyl)guanine in rodents and its potential for human biological monitoring. *Chemical Research in Toxicology*, 1999, 12: 722-729.
26. Mientjes, E.J., Luiten-Schuite, A., van, der. Wolf. E., Borsboom, Y., Bergmans, A., Berends, F., Lohman, P.H., Baan, R.A., van, Delft, J.H., DNA adducts, mutant frequencies, and mutation spectra in various organs of lambda lacZ mice exposed to ethylating agents. *Environmental & Molecular Mutagenesis*, 1998, 31(1):18-31.
27. Grant, B.W., Trombley, L.M., Hunter, T.C., Nicklas, J.A., O'Neill, J.P. and Albertini, R.J. HPRT mutations in vivo in human CD 34+ hematopoietic stem cells. *Mutation Research*, 1999, 431(2):183-98
28. Chou, F.P., Chu, Y.C., Hsu, J.D., Chiang, H.C., Wang, C.J., Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 60(5):643-50