

欖仁葉之抗遺傳毒性研究

Studies on the antigenotoxic effect of the leaf of *Terminalia catappa* L.

李志恆

行政院衛生署麻醉藥品經理處

摘要

近年來在臺灣相傳用乾枯的欖仁樹落葉煎水做茶飲，或與茶葉混用沖泡開水服用，有治療肝病的效果。而在最近我們的研究發現，欖仁葉的水萃取物(TCE)可以預防DNA的被傷害。因此，在本實驗中將更進一步研究欖仁葉能保護哪一類的致突變劑對DNA的傷害，並研究其機轉。

本研究使用三種突變劑：烷化劑 ethyl methanesulfonate (EMS)，自由基產生物 bleomycin，及需要被 cytochrome P-450 活化的多環碳氫化合物 3-methylcholanthrene 來誘發 CHO-K1 細胞中 hgprt 基因突變並觀察 TCE 之抗突變能力。結果發現，TCE 在低濃度時可以預防 bleomycin 所誘發的基因突變，並且可以有限度的部份預防 EMS 所誘發的基因突變。但 TCE 對 3-methylcholanthrene 則無抗突變性。此外，TCE 也觀察到可以保護 bleomycin 所造成的 DNA 斷裂現象及降低細胞內的過氧化物含量。而 TCE 成份中含量較高的 punicalagin，也發現具有保護 bleomycin 所造成的 DNA 斷裂及降低細胞內的過氧化物含量的能力，但其抗突變能力則較 TCE 差。由於接受 TCE 處理過後細胞內的抗氧化物質，如 glutathione 含量，catalase、glutathione peroxidase 及 glutathione transferase 的活性皆無明顯變化，所以 TCE 本身可能就是抗氧化物，可以去除 bleomycin 所產生的自由基並避免遺傳毒性的產生。

本研究中發現TCE對過氧化物所產生的基因毒性具有抗性，但僅在低劑量範圍的處理下觀察得到，高劑量範圍的處理不僅抗性較差外，若再提高劑量則更會對細胞造成毒性，因此欖仁茶的服用必須適量，過多反而有害，這是值得注意並且要進一步探討的問題。

關鍵詞：欖仁葉，基因突變，抗氧化物

ABSTRACT

The antigenotoxic effects of *T. catappa* water extract (TCE) against *hgp_{rt}* gene mutations, induced by three different types of mutagens, ethyl methanesulfonate (EMS), 3-methylcholanthrene (3MCA) and bleomycin, were determined in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. The pretreatments of CHO cells with lower doses of TCE could partially prevent EMS-induced *hgp_{rt}* gene mutation and almost prevent completely bleomycin-induced gene mutation while there were no effects on 3MCA-induced gene mutation. In addition, TCE could prevent bleomycin induced c, which plays an important role in bleomycin-induced gene mutation. However, pretreatment of TCE did not elevate glutathione level nor glutathione peroxidase, catalase and glutathione transferase activities in CHO-K1 cells. Punicalagin, one of the components of TCE, could partially protect bleomycin-induced gene mutation, DNA damage and intracellular free radical generation. These results demonstrate that TCE can prevent mutagens-induced gene mutations, especially most effective in bleomycin-induced mutation. The antimutagenic activity of TCE against bleomycin induced mutation was possibly due to its antioxidative potential.

Keywords: *Terminalia catappa* L., gene mutation, antioxidant

壹、前言

欖仁樹(*Terminalia catappa* L.)為使君子科的植物，廣泛分布在熱帶及亞熱帶的海邊，包括臺灣南部的高雄，屏東，恆春半島以及蘭嶼等地。在菲律賓，印尼及馬來西亞等東南亞國家，欖仁樹的葉，樹皮和果實等皆有被使用為民間生藥的情形，分別有止瀉，解熱與止血的功能(1)。近年來在臺灣則是用乾枯的落葉煎水做茶飲，或與茶葉混用沖泡開水服用，相傳有治療肝病的效果。但是其確切的療效及機轉目前並不清楚。所以對欖仁葉之功效做進一步的探討，乃成為有興趣研究的方向。

欖仁葉的成分富含有許多水解型鞣質(hydrolyzable tannin)，包括有terflavins A， Terflavins B， tergallagin， tercatin， punicalin， punicalagin， chebulagic acid， geraniin， 和 granatin B等(2)。其中一些成分的藥性研究已經有被報導。

此外，從*Terminalia chebula*的樹葉分離出來的chebulagic acid和從*Geranium thunbergii*分離出來的geraniin，這兩種也存於欖仁葉的成分被發現對黑色素瘤細胞(melanoma cells)有細胞毒性(3)。Chebulagic acid還被發現有抑制topoisomerase I活性的功能(4)。Geraniin則可使以過氧化脂質處理過的老鼠之血清及受損的肝臟中脂質過氧化物(lipid peroxide)的濃度及glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)，glutamic pyruvic transaminase (GPT)的程度降低(5)。Geraniin還被發現對過氧化傷害的老鼠之眼球水晶體有保護作用，並且鈉/鉀離子的比例，GSH含量，Na/K-ATPase，GSH reductase的活性也都被保護(6)。在對從*Punica granatum* L.的果皮純化出來的punicalin，punicalagin與granatin B這三種存於欖仁葉的成分所做的研究發現，其為carbonic anhydrase的抑制劑(7)。

在最近我們的研究發現，不論是體外的細胞實驗或體內的動物實驗，欖仁葉的水萃取物可以預防並抑制mitomycin C所誘發的微小核(micronucleus)產生(8)。微小核產生的原理乃是由於染色體的斷裂或不正常，使得細胞在進行有絲分裂時，會產生染色體的斷片游離在細胞質中，此時藉由特殊的染色即可觀察到此斷片，而稱為微小

核(9)。因此，欖仁葉可預防抑制微小核的產生表示其可預防 DNA 的被傷害。由於細胞內遺傳物質 DNA 的傷害被認為屬於癌症形成的起始階段，故欖仁葉可能有預防癌症發生的功效。

因此，在本實驗中將更進一步研究欖仁葉能保護哪一類的致突變劑對 DNA 的傷害，並研究其機轉。我們分別以烷化劑 ethyl methanesulfonate (EMS)，自由基產生物 bleomycin，及需要被 cytochrome P-450 活化的多環碳氫化合物 3-methylcholanthrene 為致突變劑，觀察欖仁葉的水萃取物能否保護其對 CHO-K1 細胞內次黃嘌呤(鳥糞嘌呤)磷酸核糖基轉化酵素 (hypoxanthine (guanine) phosphoribosyl transferase, hgprt) 基因的突變作用。另由於與我們合作的大仁藥專林大楨博士已成功地分離出一些欖仁葉的成分，所以我們可以進一步分析欖仁葉中那些成分是有效的，並探討其預防癌症發生的角色。

貳、材料與方法

一、欖仁葉水萃取物的製備

將欖仁葉自然陰乾後，取 100 克，以 1500 毫升的蒸餾水煮沸十分鐘，處理兩次，收集兩次的抽取液，過濾後以回轉式蒸發機濃縮至少量，再進行冷凍乾燥，得到的乾燥粉末即為欖仁葉的水萃取物，簡稱為 TCE (Terminalia catappa extract)。保存於 4°C 中，依實驗需要再以二次水新鮮配製。

二、細胞聚落形成分析

將 5×10^4 CHO-K1 細胞培養隔夜後，處理 TCE 或其成份 24 小時，用胰蛋白酶將細胞分離下來，每組處理的實驗取 100 個細胞培養，因每一細胞在正常狀況下皆可生長成聚落，所以七天後將細胞以溶於 30 % 酒精的結晶紫(crystal violet)染劑染色，觀察形成的聚落數目，便可知道所做處理對細胞是否有毒。

三、基因致突變性分析 (hgprt gene mutation assay)

將 5×10^4 CHO-K1 細胞以含有 HAT (100 μ M hypoxanthine 0.4 μ M aminoperin 及 16 μ M thymidine) 之培養液培養三天，以降低或除去 hgprt 自發性功能缺失的細胞，再換上不含有 HAT 之培養液。依實驗分別取 1×10^6 個這些細胞，處理 TCE 25, 50, 75, 100 μ g/ml 24 小時後，以磷酸緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)洗兩次，再處理 ethyl methanesulfonate 2 小時，或 bleomycin 24 小時，或 3-methylcholanthrene 合併處理 cytochrome P-450 活性旺盛的老鼠肝臟萃取液 S9 2 小時。之後以 PBS 洗兩次，用胰蛋白酶將細胞分離下來，每組處理的實驗取 100 個細胞培養七天，看此處理對細胞的存活率，同時取 10^6 個細胞繼續培養，每隔兩天分植一次，分植三次後，取 100 個細胞培養七天，來偵測細胞的種植效率，同時每組處理取 10^6 個細胞平均培養在 10 個 100 mm 培養皿，並且於每毫升的培養液中加入 11 μ g 的 6-thioguanine，這樣 hgprt 基因發生突變而喪失功能的細胞便可存活下來，培養七天後便可用染色來觀察存活細胞所長成的細胞聚落的數目。此數目再除以種植效率即為該處理對細胞所產生的突變率(10)。

四、單細胞電泳分析方法 (single cell electrophoresis assay)

將 1×10^6 個 CHO-K1 細胞種於 100 mm 培養皿，隔夜後，先分別以 25, 50, 75, 100 μ g/ml 的 TCE 處理 24 小時後，以 PBS 洗去，再處理 ethyl methanesulfonate 2 小時，或 bleomycin 24 小時，或 3-methylcholanthrene 合併 S9 2 小時。之後以 PBS 洗兩次，用胰蛋白酶將細胞分離下來，取 4×10^5 個細胞混於 1% 的低熔點洋菜膠 (agarose)，再置於鋪有一層 1% 一般熔點洋菜膠的玻璃片上，待凝固後，再鋪上一層 1% 的低熔點洋菜膠，然後把玻璃片置於含有 Triton X-100 的溶解液，使得細胞膜被打破，最後將這些玻璃片置於電泳槽中，以 25 V, 300 mA 跑 30 分鐘，染上 ethidium bromide，用螢光顯微鏡觀察。

五、細胞內 H_2O_2 測量方法

將 1×10^6 個 CHO-K1 細胞先分別以 25, 50, 75, 100 μ g/ml 的

TCE 處理 24 小時後，再處理 ethyl methanesulfonate 2 小時，或 bleomycin 24 小時，或 3-methylcholanthrene 合併 S9 2 小時。之後以 PBS 洗兩次，用胰蛋白酶將細胞分離下來，取 1×10^6 個細胞置於 2ml PBS，加入新鮮配製的 20 mM dichlorofluorescein diacetate 8 μ l，在 37°C 培養 30 分鐘，再以 1000 rpm 離心 10 分鐘，沈澱物加入 3ml PBS，然後在螢光分光光度計(fluorescence spectrophotometer)下以 502 nm 的紫外光激發(excitation)，觀察螢光波長(emission) 522 nm 的變化(11)。

六、蛋白質含量測定方法

將小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 200 μ g/ml，分別取適量體積，在加入蛋白質分析液後，以分光光度計(spectrophotometer)測量波長 595 nm 的吸光值，繪出一標準曲線。然後取一定體積的樣本，加入蛋白質分析液後測量波長 595 nm 的吸光值，再與標準曲線對照，即可知樣本的蛋白質含量。

七、細胞內 glutathione (GSH)含量之測量方法

將分別以 25，50，75，100 μ g/ml 的 TCE 處理 24 小時的 CHO-K1 細胞以胰蛋白酶分離下來，用 Puck's saline A (PSA) 洗後，每處理分成兩管，其中一管以 4°C 1000 rpm 離心五分鐘後，沈澱物加入 0.1 N 的氫氧化鈉溶液，混合均勻後測蛋白質含量；另一管測 GSH 含量。先將 GSH 配成各濃度的溶液 2 ml，加入 50mM pH 8.0 的磷酸鈉(KH_2PO_4)緩衝液 0.5 ml 及 0.1% O-pathalaldehyde 0.1 ml，在室溫下靜置 15-20 分鐘，以激發波長 350 nm，螢光波長 420 nm 測吸光值，繪成一標準曲線。同時將待測的細胞樣本加入冰冷的二次水，震盪打破，再加入 25 % 偏磷酸 (metaphosphoric acid)，震盪使 GSH 與其他大分子分離，之後再以 4°C 12000 rpm 離心 15 分鐘，GSH 就會被萃取於上清液。取一定量的上清液配成 2 ml，加入 50mM pH 8.0 的磷酸鈉緩衝液 0.5 ml 及 0.1% O-pathalaldehyde 0.1 ml 後，在室溫下靜置 15-20 分鐘，以激發波長 350 nm，螢光波長 420 nm 測吸光值，再對照標準曲線即知 GSH 含量(12,13)。

八、測量 glutathione peroxidase 方法

將分別以 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCE 處理 24 小時的 CHO-K1 細胞以橡膠棒刮下來，經離心收集，在 pH 7.0 的 0.1 M KH_2PO_4 溶液中超音速震盪，將細胞震破後，以 12500 rpm 離心 30 分鐘，上清液即含有 glutathione peroxidase 等一些存於細胞質的酵素。取適量的上清液測蛋白質含量，同時取 180 μl 上清液，400 μl pH 7.0 的 0.1 M KH_2PO_4 溶液，10 μl 0.1 M EDTA，100 μl 10 mM GSH，100 μl 10 mM NaN_3 ，10 μl 1 unit GSH reductase，共 800 μl ，在 37°C 下培養 30 分鐘，再加入 100 μl 2 mM NADPH 及 100 μl 2.5 mM H_2O_2 ，以 340 nm 波長的吸光值測量 NADPH 被氧化的速率，再除以上清液的蛋白質含量，即為 glutathione peroxidase 的活性(14)。

九、測量 catalase 方法

將 TCE 處理過的 CHO-K1 細胞，用橡膠棒刮下，離心收集後，在 pH 7.0 的 50 mM KH_2PO_4 溶液中超音速震盪，將細胞震破後，以 12500 rpm 離心 30 分鐘，取上清液。拿適量測蛋白質含量，同時取適量上清液，與 10 mM H_2O_2 混合，測量 240 nm 波長的吸光值變化，再除以上清液的蛋白質含量，即為 catalase 的活性(15)。

參、結果

一、欖仁葉水萃取物之毒性測試

以欖仁葉水萃取物 (Terminalia catappa extract, TCE) 對 CHO-K1 細胞作毒性測試，結果發現 TCE 在 100 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下並沒有明顯的毒性，而在 300 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度則有剩下約 30% 的存活率，LC50 約為 200 $\mu\text{g/ml}$ (圖一)。這些被高濃度 TCE 所傷害的細胞，其細胞週期並無明顯變化，亦無大量細胞凋亡的現象發現。而在 TCE 中，含量較高的成份 punicalagin 在 1 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞的存活率還約達 80% 以上。

二、hgprrt 基因突變測試

(1) TCE 及 punicalagin 所誘導之 hgprrt 基因突變測試

依據初步結果顯示，TCE從沒有毒性的濃度到30%存活率的300 $\mu\text{g/ml}$ 來處理CHO-K1細胞，都沒有誘發hgp_{rt}基因突變的現象（表一）。而punicalagin在1.0 $\mu\text{g/ml}$ 時，也沒有基因突變的現象（表二）。

(2) TCE抑制ethyl methanesulfonate(EMS)所誘導之hgp_{rt}基因突變測試

以無細胞毒性濃度的TCE處理CHO-K1細胞24小時後，再以EMS處理2小時，依據初步結果顯示，25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 等低濃度的TCE有部份抑制EMS所誘導之hgp_{rt}基因突變的能力，而較高濃度的75, 100 $\mu\text{g/ml}$ 就沒有此抑制的能力（圖一）。

(3) TCE抑制3-methylcholanthrene(3-MCA)所誘導之hgp_{rt}基因突變測試

以無細胞毒性濃度的TCE處理CHO-K1細胞24小時後，再以3-MCA加S9處理2小時來誘發hgp_{rt}基因突變，結果顯示，TCE並無抑制3-MCA誘發hgp_{rt}基因突變的能力（圖二）。

(4) TCE抑制bleomycin所誘導之hgp_{rt}基因突變測試以無細胞毒性濃度的TCE處理CHO-K1細胞24小時後，再以bleomycin處理24小時，結果顯示，TCE有抑制bleomycin所誘發之hgp_{rt}基因突變的能力，尤其以25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 等低濃度的TCE效果最好（圖三）。

(5) Punicalagin抑制bleomycin所誘導之hgp_{rt}基因突變測試

以無細胞毒性濃度的punicalagin處理CHO-K1細胞24小時後，再以bleomycin處理24小時，結果顯示，punicalagin抑制bleomycin所誘發之hgp_{rt}基因突變的能力僅在1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的效果較好（圖四），但效果仍比TCE差。再低的濃度則沒顯著差異。

三、單細胞電泳實驗

利用此方法來看細胞內DNA被傷害的程度，結果發現，以bleomycin 15 mU/ml處理2小時所造成的DNA斷裂可被TCE及punicalagin的前處理24小時抑制（表三、表四）。

四、細胞內過氧化物含量的變化

以螢光染劑dichlorofluorescein diacetate來測量細胞內 H_2O_2 或過氧化物的含量，發現在TCE 25, 50 $\mu g/ml$ 前處理24小時後，可以減少bleomycin處理24小時所誘發之過氧化物含量增加。但TCE本身卻不會影響細胞內過氧化物的含量(表五)。而punicalagin也觀察到可以減少bleomycin處理24小時所誘發之過氧化物含量增加(表六)。

五、抗氧化酵素活性測試

結果發現，以TCE 25, 50, 75, 100 $\mu g/ml$ 處理過後的CHO-K1細胞，其glutathione, catalase的活性皆無明顯變化(表七)。Glutathione peroxidase的活性在TCE濃度為100 $\mu g/ml$ 時降低為原來的83.4%。另外glutathione transferase在TCE濃度為75及100 $\mu g/ml$ 時，活性增加了20.2%和34.3%。

肆、討論

近年來在臺灣則是用乾枯的落葉煎水做茶飲，或與茶葉混用沖泡開水服用，相傳有治療肝病的效果。但是其確切的療效及機轉目前並不清楚。在我們先前的研究中發現，欖仁葉的水萃取液(TCE)可能擁有anticlastogenic的能力。而在本研究中，我們認為TCE對於不同形態的致突變劑所引發的基因突變有不同的保護效果。從結果得知，TCE對烷化劑EMS及會產生自由基的bleomycin所誘發的基因突變有保護效果；而對必須藉由肝臟內酵素代謝而活化的致突變劑3-MCA所誘發的基因突變則沒有保護作用。此外，即使TCE一樣是在低濃度對EMS及bleomycin所誘發的基因突變有保護作用，但在相同TCE的濃度下，對bleomycin的保護效果卻是比EMS好得多。由此可知，TCE似乎是對產生自由基的致突變劑有較好的保護效果。在我們先前的研究中，TCE也是可以保護產生自由基的致突變劑mitomycin C對細胞所產生的微小核現象。但是TCE是如何能幫助細胞對抗氧化性傷害呢？

我們偵測到TCE前處理過後的細胞能降低被bleomycin所誘發細胞內過氧化物的含量。而細胞內一些可以對抗氧化性傷害的物質，如catalase, glutathione peroxidase等酵素和glutathione，在TCE處理過後的細胞內並無顯著的變化足以解釋低濃度的TCE可以顯著地預防bleomycin誘發基因突變的現象。所以TCE可預防降低bleomycin所誘發細胞內過氧化物的含量及基因突變可能不是藉由活化細胞內的抗氧化物質，而是TCE本身就具有抗氧化的能力。我們在in vitro的實驗中也發現TCE的確可降低H₂O₂所激發的螢光強度。

因此，在本研究當中，發現低濃度的欖仁葉的水萃取物可以預防bleomycin所誘發的基因突變，DNA斷裂傷害及細胞內的過氧化物增加。其可能的機轉是藉由TCE本身的抗氧化能力，來降低自由基(free radical)對細胞內DNA的氧化性傷害。

而在欖仁葉水萃取液的成份方面，我們由合作的大仁藥專林大楨教授處取得punicalagin，依文獻記載，其約佔欖仁葉水萃取液的0.5% (2)，而其能有效地預防bleomycin所引發基因突變的濃度為1 μ g/ml，換算為TCE則約為200 μ g/ml，這在TCE應無預防突變的效果。若以TCE最有效的濃度50 μ g/ml來換算，punicalagin約為0.25 μ g/ml，這也沒有預防突變的效果。所以TCE中能預防bleomycin所引發基因突變的有效成份除了punicalagin外，應還有其他成份的參與其中。

伍、結論與建議

經由本研究對欖仁葉的抗遺傳毒性之初步探討，發現低濃度欖仁葉的水萃取物，藉由其抗氧化的能力可以很有效地預防bleomycin所造成的基因突變及傷害。同時也可以部份地預防烷化劑ethyl methanesulfonate所誘發的基因突變。值得注意的是，TCE有一定的有效濃度範圍，在本研究中有的是在較低劑量的25及50 μ g/ml，當使用的濃度較高，則可能預防的效果會變差，當濃度再提高，更會對細胞造成毒性。

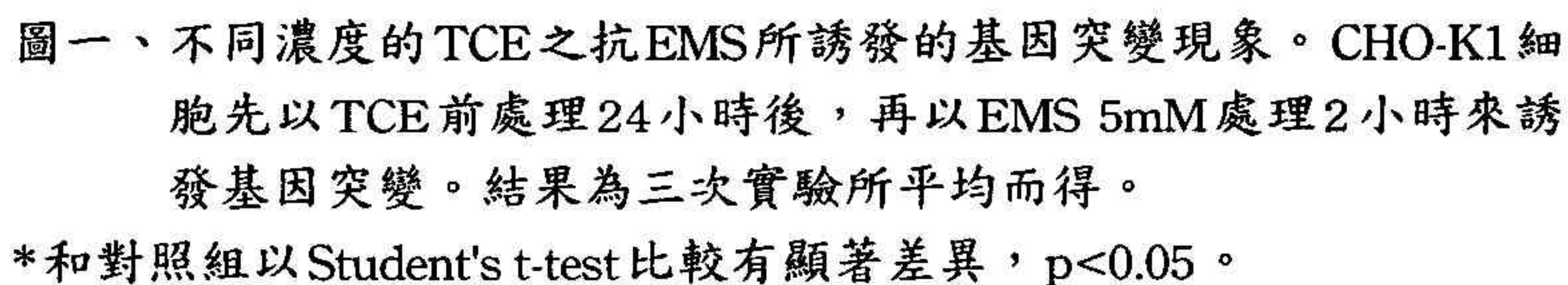
然而再本研究中所使用的實驗材料是中國倉鼠卵巢細胞株，所得到的有效劑量範圍如要應用於人體上仍有待進一步探討，因此關

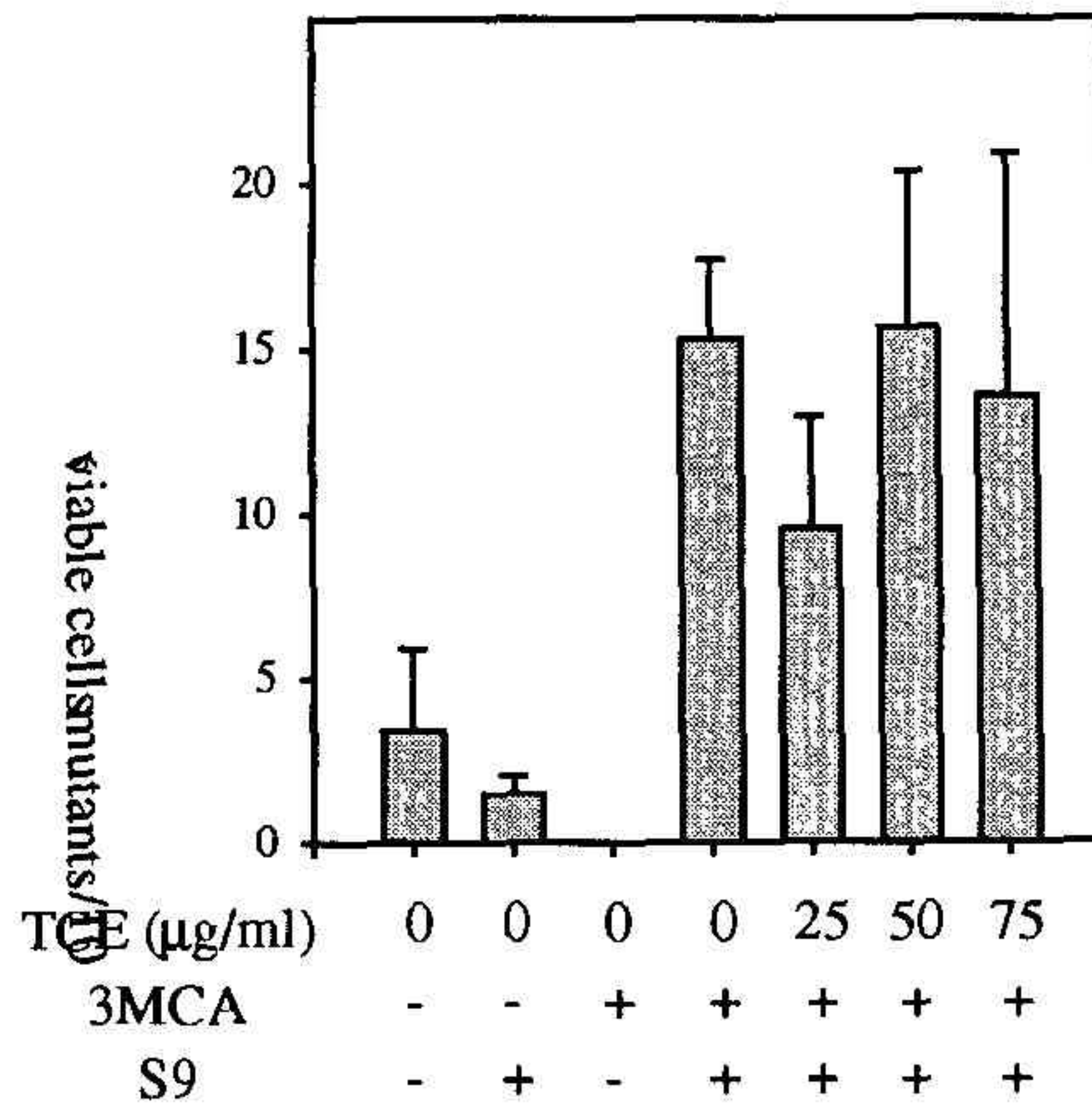
於服用欖仁茶時血中濃度多少？多少劑量以上為有害？這方面的數據仍有待更進一步的動物及臨床實驗來探討。本研究只能初步地提出，欖仁葉，或是其所沖泡的飲料可能有抗氧化性傷害的能力，但若服用過量，可能反而會造成本身的危害。

陸、參考文獻

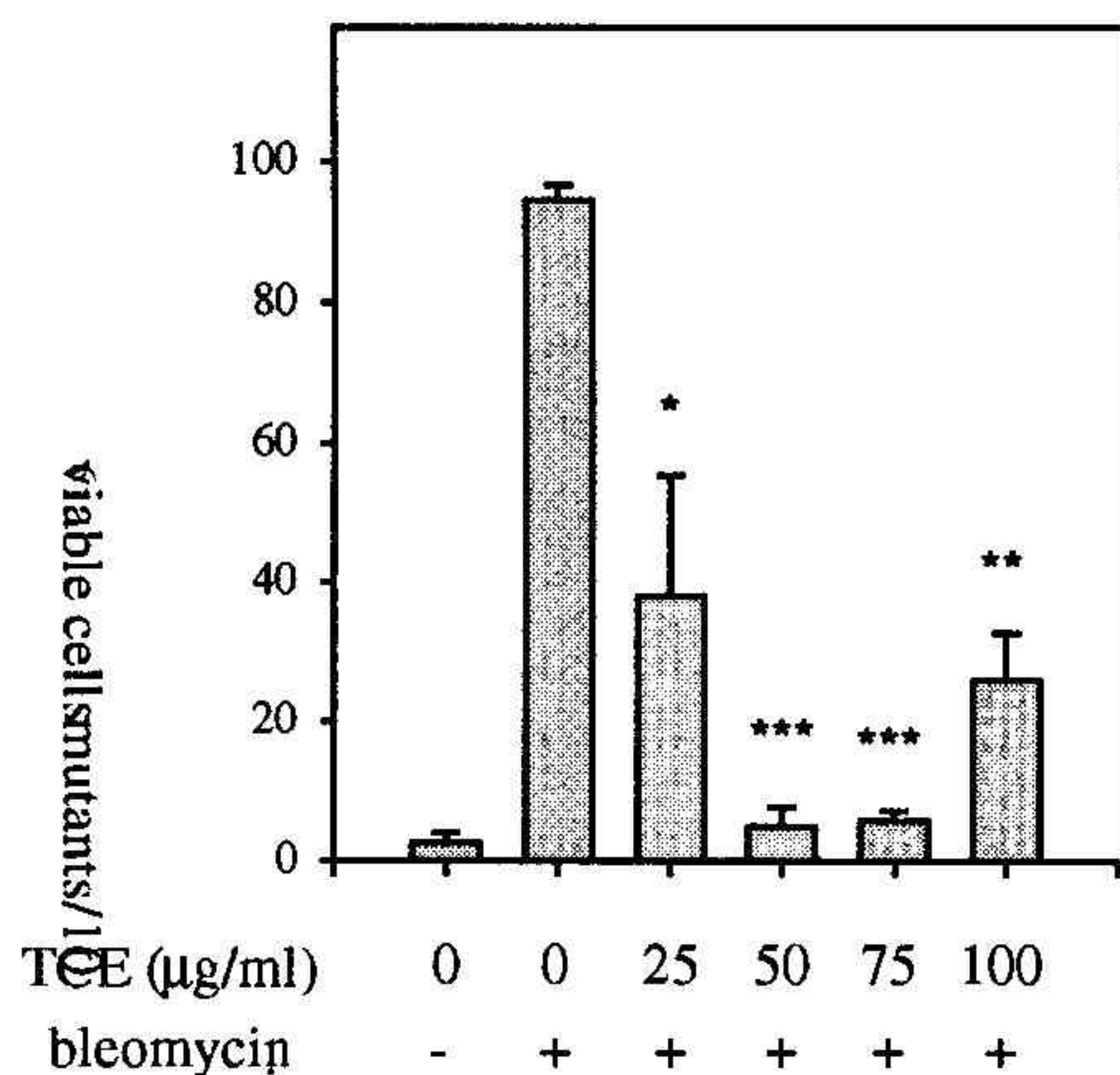
1. Lin, T. -C. (1992) Study on the tannins and related compounds in the fruit of *Terminalia catappa* L., *J. Chin. Med. Pharm. Res.*, 14, 165-174.
2. Tanaka, T., G. -I. Nonaka and I. Nishioka (1986) Tannins and related compounds. XLII. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergallagin and tercatain from the leaves of *Terminalia catappa* L., *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1039-1049.
3. Kashiwada, Y., G. -I. Nonaka, I. Nishioka, J. -J. Chang and K. -H. Lee (1992) Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents, *J. Nat. Prod.*, 55, 1033-1043.
4. Heght, S. M., D. E. Berry, L. J. Mackenzie, R. W. Busby and C. A. Nasuti (1992) A strategy for identifying novel, mechanistically unique inhibitors of topoisomerase I, *J. Nat. Prod.*, 55, 401-413.
5. Kimura, Y., H. Okuda, K. Mori, T. Okuda and S. Arichi (1984) Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. IV. Effects of various extracts of *geranii herba* and *geraniin* on liver injury and lipid metabolism in rats fed peroxidized oil, *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 1866-1871.
6. Fukaya, Y., K. Nakazawa, T. Okuda and S. Iwata (1988) Effect of tannin on oxidative damage of ocular lens, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 32, 166-175.

7. Satomi, H., K. Umemura, A. Ueno, T. Hatano, T. Okuda and T. Noro (1993) Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L., *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 787-790.
8. Liu, T. -U., L. -K. Ho, Y. -C. Tsai, S. -H. Chiang, T. -W. Chao, J. -H. Li and C. -W. Chi (1996) Modification of mitomycin C-induced clastogenicity by *Terminalia catappa* L. in vitro and in vivo, *Cancer Lett.*, 105, 113-118.
9. Durse, L., S. Rajagopapan, H. M. Eliot, J. M. Covey and B. K. Sinha (1990) DNA interstrand cross-link and free radical formation in a human multidrug-resistant cell line from mitomycin C and its analogues. *Cancer Res.*, 50, 648-652.
10. Oberly, T. J., B. J. Bewsey and G. S. Probst (1987) A procedure for the CHO/HGPRT mutation assay involving treatment of cells in suspension culture and selection of mutants in soft agar, *Mutat. Res.*, 182, 99-111.
11. Huang, X., K. Frenkel, C. B. Klein and M. Costa (1993) Nickel induces increased oxidants in intact cultured mammalian cells as detected by dichlorofluorescein fluorescence, *Appl. Pharmacol.*, 120, 29-36.
12. Cohn, V. H. and J. Lyle (1966) A fluorometric assay for glutathione., *Anal. Biochem.*, 14, 434-440.
13. Murray, D. and R. E. Meyn (1986) Cell cycle dependent cytotoxicity of alkylating agents: determination of nitrogen mustard-induced DNA cross-links and their repair in Chinese hamster ovary cell synchronized by centrifugal elutriation, *Cancer Res.*, 46, 2324-2329.
14. Flohe, L. and W. A. Gunzler (1984) Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*, 105, 114-121.
15. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods Enzymol.*, 105, 121-126.



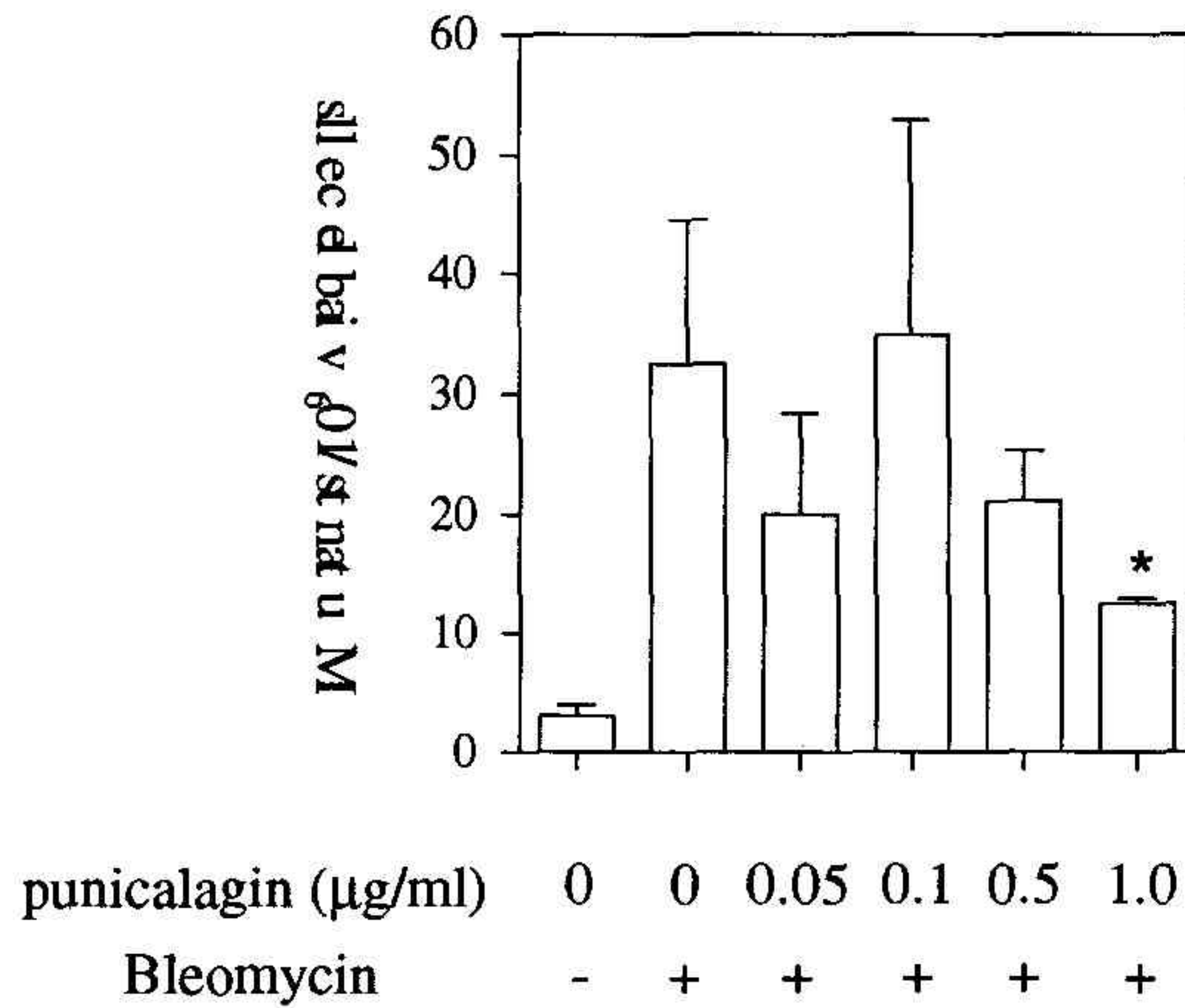


圖二、不同濃度的TCE之抗3MCA所誘發的基因突變現象。CHO-K1細胞先以TCE前處理24小時後，再以3MCA 3 µg/ml在S9同時存在下處理2小時來誘發基因突變。結果為三次實驗所平均而得。



圖三、不同濃度的TCE之抗bleomycin所誘發的基因突變現象。CHO-K1細胞先以TCE前處理24小時後，再以bleomycin mU/ml處理24小時來誘發基因突變。結果為三次實驗所平均而得。

*, **, ***和對照組以Student's t-test比較有顯著差異，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.001$ ，***表示 $p < 0.005$ 。



圖四、不同濃度的 punicalagin 之抗 bleomycin 所誘發的基因突變現象。CHO-K1 細胞先以 TCE 前處理 24 小時後，再以 bleomycin 2.25 mU/ml 處理 24 小時來誘發基因突變。結果為三次實驗所平均而得。

*表示和對照組以 Student's t-test 比較有顯著差異， $p < 0.05$ 。

表一

TCE對CHO-K1細胞之細胞毒性及突變性研究

TCE濃度 (μg/ml)	% 存活率	突變率 (突變株/106 存活之細胞)
0	100	2.5±1.5
25	92.6±8.0	0.9±0.9
50	96.4±7.2	1.2±1.7
75	87.6±10.8	1.6±0.7
100	89.3±15.7	4.6±2.7
300	30.1±7.1*	2.1±2.1

*和對照組以 Student's t-test 比較有顯著差異，P<0.05。

數據表示方法為平均值±標準誤。

表二

Punicalagin對CHO-K1細胞之細胞毒性及突變性研究

Punicalagin濃度 (μg/ml)	% 存活率	突變率 (突變株/106 存活之細胞)
0	100	0.7±0.9
0.05	80.4±0.88	0.7±0.9
0.1	87.7±2.7	1.7±1.3
0.5	74.4±6.2	1.2±1.1
1.0	80.5±8.6	0.5±0.5

數據表示方法為平均值±標準誤。

表三

不同濃度的TCE對bleomycin所造成CHO-K1細胞內DNA斷裂之保護作用

TCE ($\mu\text{g/ml}$)	Bleomycin (2.25 mU/ml)	tail moment	百分比 ^a
-	-	6.9	0
-	+	16.7	100
25	+	8.3	47.4
50	+	6.9	67.8
75	+	9.8	60.8
100	+	9.5	57.7

^a 在每個實驗中bleomycin所誘發過氧化物而表現出來的螢光強度當成100%。

數據表示方法為平均值 $\pm$ 標準誤。

*和bleomycin單獨處理組以Student's t-test比較有顯著差異 $P < 0.05$ 。

表四

不同濃度的 punicalagin 對 bleomycin 造成 CHO-K1 細胞內 DNA 斷裂之保護作用

TCE ($\mu\text{g/ml}$)	Bleomycin (15 mU/ml)	tail moment	百分比 ^a
-	-	8.0	0
-	+	19.8	100
0.05	+	13.8	49.5
0.1	+	13.6	47.4
0.5	+	10.5	21.1
1.0	+	13.9	49.7

a 將對照組當成 0%，bleomycin 單獨處理組當成 100% 換算而得。

表五

不同濃度的TCE對bleomycin所誘發CHO-K1細胞內過氧化物之保護作用

TCE ($\mu\text{g/ml}$)	Bleomycin (2.25 mU/ml)	螢光強度百分比	抑制之百分比 ^a
-	-	0	
-	+	100	
25	+	52.6 $\pm$ 7.5*	47.4
50	+	32.2 $\pm$ 6.1*	67.8
75	+	39.2 $\pm$ 10.0*	60.8
100	+	42.3 $\pm$ 4.4*	57.7
25	-	87.1 $\pm$ 1.8	12.9
50	-	75.4 $\pm$ 3.8	24.6
75	-	84.1 $\pm$ 1.7	15.9
100	-	100 $\pm$ 20.1	0

^a 在每個實驗中bleomycin所誘發過氧化物而表現出來的螢光強度當成100%。

數據表示方法為平均值 $\pm$ 標準誤。

*和bleomycin單獨處理組以Student's t-test比較有顯著差異 $P<0.05$ 。

表六

不同濃度的punicalagin對bleomycin所誘發CHO-K1細胞內過氧化物之保護作用

punicalagin ($\mu\text{g/ml}$)	Bleomycin (2.25 mU/ml)	螢光強度百分比	抑制之百分比 ^a
-	-	0	
-	+	100	
0.1	+	50.0 $\pm$ 18.5*	50.0
0.25	+	56.1 $\pm$ 7.5*	43.9
0.5	+	54.7 $\pm$ 20.8*	45.3
1.0	+	101.8 $\pm$ 14.1	-1.8
0.1	-	118.5 $\pm$ 20.2	-18.5
0.25	-	116.6 $\pm$ 13.4	-16.6
0.5	-	120.2 $\pm$ 17.7	-20.2
1.0	-	107.2 $\pm$ 28.3	-7.2

^a 在每個實驗中 bleomycin 所誘發過氧化物而表現出來的螢光強度當成 100%。

* 和 bleomycin 單獨處理組以 Student's t-test 比較有顯著差異 $P < 0.05$ 。

表七

TCE處理過後細胞內GSH含量，GSH peroxidase、catalase和GSH S-transferase活性的變化。

TCE (μg/ml)	GSH	GSH peroxidase	catalase	GSH S-transf ^{..}
0	29.6±1.4 ^a	118.6±4.4 ^b	51.71±13.7 ^c	79.3±3.6
25	37.9±7.0	114.6±2.8	50.3±4.2	87.7±5.0
50	29.1±3.7	100.5±8.8	47.7±0.2	93.2±6.4
75	30.7±2.4	93.7±6.8	50.6±17.5	95.3±0.7
100	30.5±1.0	98.9±0.8*	49.0±1.6	106.5±7.1

^a 數據為三次實驗之平均值，表示方式為平均值±標準誤，單位為 μg/mg of proteins。

^{b,c,d} 數據為三次實驗之平均值，表示方式為平均值±標準誤，單位為 nmol/min/mg of proteins。

*和對照組以 Student's t-test 比較有顯著差異 P<0.05。