

第一章 前言

臺灣自民國七十五年至今十餘年來，癌症一直是十大死亡原因的第一位，根據行政院衛生署於民國八十五年的統計，惡性腫瘤不但位於十大死因之首，直腸及結腸癌並高居男性十大癌症發生率之第三位(個案數 3025，粗發生率 27.43%，年齡標準化發生率 25.82%)，死亡率第四位(個案數 1546，粗發生率 14.02%，年齡標準化發生率 13.35%)；女性十大癌症發生率(個案數 2227，粗發生率 21.39%，年齡標準化發生率 20.91%)及死亡率第三位(個案數 1096，粗發生率 10.53%，年齡標準化發生率 10.14%)。民國八十八年的統計，直腸及結腸癌已經高居男女十大癌症死亡原因之第三位。由此可見惡性腫瘤，乃至於大腸腫瘤的防治，一直都是醫界的一個重要的課題。

近幾十年來由於工業文明的快速進展，對人類有害的化合物也逐步出現在我們的生活環境當中，相對的使得我們接觸到這些化學物質機會也相對暴增。經由流行病學和統計的研究顯示：人類 80% 的癌症是來自於環境中的危險因子，而這些危險因子中以化學致癌物(chemical carcinogens)佔絕大多數。化學致癌物中以芳香氨類(arylamines)為很重要及常見的代表物，這些化學致癌物要經過體內酵素代謝後，才能活化，再與細胞內的 DNA 結合，形成 DNA 添加物(DNA adduct)，而造成基因突變，最後引發癌症產生。而乙醯轉移酵素(N-acetyltransferase, NAT)就是其中一個代表酵素。當個體暴露到含化學致癌物，如芳香氨類化合物的環境下，若提高乙醯轉移酵素的活性會增加許多芳香胺類致癌物質的敏感度，進而增加細胞突變而致癌。當 NAT 受到外來藥物之抑制，將使此致癌物質轉變為代謝物(如 2-AAF)減少，相對的，也就可以減少細胞突變和癌症的生成。

薑黃素為帶有辛辣苦味橘紅色的結晶粉末，在自然界中主要存在於薑黃(*Curcuma longa*, Zingiberaceae)，鬱金(*Curcuma aromatica* Salisbury, Zingiberaceae)，莪朮(*Curcuma zedoaria*, Zingiberaceae)等薑科植物。其功能具有破瘀，通經，涼血祛痰，行氣解鬱，消積化食等。近日來關於薑黃素作為人類大腸腫瘤的化學防

治劑的報告有相當多被發表，同時其可能之機轉也被廣泛之討論如乙醯轉移酵素之抑制，細胞周期的調控及細胞凋亡的促進。

本論文的重點在於檢視薑黃素是否對於人類大腸腫瘤細胞株的乙醯轉移酵素，DNA-AF-ADDUCT 及 NAT1 基因(NAT-mRNA)的表現有抑制作用，接著再檢視薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 是否有細胞毒性 (cytotoxicity)及細胞凋亡(apoptosis)的效應，並進一步了解薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 之細胞週期有無影響，最後經由 MICRO-ARRAY 來篩檢有哪些基因可能經由薑黃素的作用而提升或抑制，其結果還需要進一步分析來確認薑黃素與人類大腸腫瘤細胞株之基因表現間的關聯。

第二章 文獻探討

一、薑黃素(Curcumin)簡介

1. Curcumin.化學名

1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione; turmeric yellow; diferuloylmethane. 分子式 $C_{21}H_{20}O_6$; 分子量 368.37 組成 C68.47% , H5.47% O26.06% 為抽取自 *Curcuma Longa* , *Zingiberaceae* 根部的物質呈橘黃色結晶粉末 , 熔點 183 , 不溶於水及乙醚 , 溶於酒精 , 在鹼性溶液中呈棕黃色 , 在酸性溶液中呈淺黃色 , 通常用於製備偵測砷之薑黃試紙。產於印度 , 中國 , 東印度群島。具有芳香及辛辣但稍帶苦味之黃色物質。

2. 薑黃素 (Curcumin) , 主要存在於薑黃 , 鬱金 , 莪朮等植物⁸⁵⁻⁸⁸

薑黃 *Rhizoma curcumae*

[別名]川薑黃。

[來源]

本品為薑科(*Zingiberaceae*)植物薑黃 *Curcuma longa* Linne 的乾莖根莖。

[歷史]

大明諸家本草論薑黃療效可治癥瘕血塊。通月經 , 治仆損瘀血 , 暴風痛 , 冷氣下食 : 蘇頌嘉祐圖經本草則謂祛邪辟惡 , 治氣脹 , 產後敗血攻心。李時珍謂能治風痺臂痛。

[植物形態]

為多年生直立草本。根莖呈深橙黃色塊狀 , 肉質而芳香。葉長橢圓形 , 有長葉柄 , 秋季由葉柄的鞘內抽出穗狀花序 , 頂上總苞片尖端紅暈較淡 , 一苞內生三、四花 , 漸次開放 , 每花又各有小苞 , 比總苞片薄 , 色白 ; 花黃色 , 有漏頭狀的唇瓣。

[產地]

原產於亞洲南部。我國主產於四川的宜賓、福建、台灣、廣東、

廣西、雲南、江西、湖北等地。此外越南、印度、馬來亞聯邦、日本也有栽培。

[藥理研究]

1. 1955 年張言忠報告：以片姜黃製成之 50% 煎劑，試用於小白鼠，及豚鼠之離體子宮，證明本品有確實之子宮興奮作用，能使子宮維持 5—7 小時之陣發性收縮。本品對麻醉狗之膽汁排出，能促使其增加，但作用較弱而持久。
2. 1957 年曹仁烈報告：測定本品及鬱金之水浸液(1:3)，在試管內，對各種皮膚真菌，均有不同程度之抑制作用。

[醫療應用]

為芳香健胃利膽劑，兼有止血、祛風、通經、鎮痛作用，用於胃炎，十二指腸炎，膽道炎，黃疸及胸滿痞悶疼痛，腹痛，胃痛，肩臂凝痛等。亦治吐血、衄血、尿血、痔疾，有止血之效。外用為粉末塗布之，治膿腫創傷。

鬱金 *Tuber Curcumae* ; *Radix Curcumae*

[別名] 玉金、川益金、黃玉金、川玉金。

[來源] 本品係薑科(Zingiberaceae)植物：

1. 薑黃 *Curcuma longa* L. ;
2. 毛薑黃 *C. aromatica* Salisbury ;
3. 莪朮(山薑黃) *C. zedoaria*(Berg)Roscoe 等植物的乾燥塊根。

[歷史]

始載於唐本草。震亨謂：鬱金無香而性輕揚、能致達酒氣於高遠。古人用治鬱遏不能升者，恐命名因此也。李杲謂：治陽毒入胃，下血頻痛。唐本草載主治血積下氣，生肌止血，破惡血，血淋、尿血，金瘡。

[植物形態]

根莖塊狀略呈淡紫色，內面黃色而芳香。葉大矩圓形，長 30

90cm，寬 10—20cm，先端有尖尾，基部三角形，上面綠色，形似薑黃葉，但背被小柔毛，主脈兩邊常呈暗紫色。穗狀花序，於 4—7 月與葉同出或先葉而出，連花序柄長約 80cm；苞片淡綠色，卵形，長 4—5cm，最頂的較大而多少染有紅色；花短於苞片；花冠首長 2.5cm，黃色，上半部漏斗形，亦與薑黃同。花期春夏。

[產地]

四川等地產的多稱川鬱金又稱廣鬱金；浙江產的多稱溫鬱金、黑玉金，也有稱溫州產的為川鬱金。四川也產黑玉金。

[藥理研究]

1. Guttenberg 氏云：鬱金精油為膽石醇之溶劑，故可治膽石。
2. Robbers 云：本品以醚抽出之油可增進膽液之分泌，所含薑黃色素並可使膽囊收縮。
3. 李青祐云：本品有健胃止血之效，治胃痛或膀胱出血，每次 1—3 公分，外用治刀傷。
4. 陳存仁引：本品在胃時僅分解，至腸始被吸收，然半數仍由大便排出，由腸壁吸入血中，即能增進血液氧化之功，同時又能令子宮粘膜充血。
5. 藤田路一引：本品所含刺激膽汁分泌作用之成份，係存在於精油之 Polymethyl carbinol

[醫療應用]

為健胃利膽、鎮痛、通經劑，用於月經不調，行經困難，痛經膽石疝痛，膽道炎，黃疸，胃痙攣，胃潰瘍，食慾不振，消化不良，胃部滿悶作痛，胸腹脅肋諸痛等。亦用於充血性神經病、癲狂等症，及瘀血，金瘡，小便淋石，淋血等。

莪朮 *Rhizoma Zedoariae*

[別名] 莪述、蓬莪朮、廣莪朮、莪朮穗花山薑。

[來源]

本品係薑科(Zingiberaceae)植物莪朮(山薑黃)*Curcuma zedoaria*(Berg)Roscoe 的乾燥根莖。

[歷史]

蓬莪朮見於開寶本草，載有主治心腹痛、中惡，鬼氣，霍亂冷氣、吐酸水、解毒、食飲不消，酒研服之；又療婦人血氣結積、丈夫奔豚。藥性本草記載：破眩癖冷氣，以酒醋磨服。大明本草記載：即南中薑黃根。海南生者名蓬莪述。治一切氣、開胃消食，通月經、消瘀血，止仆損痛下血及內損惡血。王好古謂可通肝經聚血。蘇頌說今浙江或有之，根如生薑，茂在根下，似蛋。

[植物形態]

莪朮為多年生草本，地下根莖呈廣卵形及圓柱狀，淡黃色，稍有香氣。春季由根莖抽莖。葉狹長，長橢圓形，葉中部常有紫斑，背禿淨，葉柄長於葉片。春夏季於根莖抽花莖。花黃色或淡黃色，穗狀排列。苞片卵圓形，綠色而帶赤紋，花冠筒部漏斗狀。

[產地]

廣西、四川、廣東、雲南、福建、台灣、浙江等地均有出產。

[藥理研究]

1. Cineol 有樟腦臭及刺戟性之味，有殺蟲效能，故可用為防腐劑。
2. 其他尚無有價值之文獻發表。

[醫療應用]

本品健胃、祛痰、止痛、通經、破瘀藥，用於經閉、經痛、癥瘕積塊，及胸腹脅肋諸鬱血性疼痛。

二、薑黃素與人類大腸腫瘤相關研究之探討

大腸腫瘤，是最常發生的人類腫瘤之一¹⁻³。要嘗試透過降低或甚至消除我們對環境中有害致癌物的暴露是相當不切實際的，相對

而言，經由藥物來達到化學防治劑(chemopreventive medications)的效果就顯得相當的重要⁴⁻⁶。一些非類固醇類抗炎劑(NSAID)如 aspirin, piroxicam, sulindac 及 indomethacine 長久以來即被視為有效的大腸腫瘤的化學防治劑(chemopreventive medications)⁷⁻¹¹，其機轉是經由抑制 cyclooxygenase(COX)的活性，進而調控 arachidonic acid(AA)的代謝來降低大腸腫瘤的發生¹²。相關的研究並指出 NSAID 對於細胞週期的影響主要來自 G1 期的 blocking^{13,14}。但是由於 NSAID 於高劑量時易引起胃黏膜的出血或胃潰瘍^{15,16}，所以如果使用來當作大腸腫瘤的化學防治劑(chemopreventive medications)就顯得較為不恰當。

依流行病學及實驗診斷發現，人類大腸腫瘤的發生與飲食的習慣有相當的依存性¹⁷⁻¹⁹，有愈來愈多的證據顯示食用較多的水果及蔬菜甚至是食物中的一些非營養的成分如纖維質對於大腸腫瘤的發生有相當好的抑制結果²⁰。僅靠積極的食物攝取習慣改變對於減少大腸腫瘤的發生機率而言是不夠的，所以由一些具有化學防治作用的物質來構成第二級的防護是目前防治大腸腫瘤的重點^{4-6,21}。

近年來有些植物的成分被廣泛用於預防腫瘤的發生，如 flavone 被證實對於人類大腸腫瘤細胞株 HT-29 有強力的促進細胞分化及細胞凋亡的作用²²。Garlic (*Allium sativum*) 的有效成分 S-allylmercaptocysteine(SAMC)被證實對於許多種哺乳類腫瘤細胞株都有抑制的作用²³⁻²⁷，其對於人類大腸腫瘤細胞株 HT-29 及 SW-480 有抑制細胞生長及促進細胞凋亡的作用，其引起細胞凋亡的作用在於提升 caspase3-like 的作用，並同時促進 jun kinase 的活性，在細胞週期的方面 SAMC 則在於 G₂/M 的抑制²⁸。另外於人類大腸腫瘤的防治方面，也有文獻報導除了促進細胞凋亡的機轉外，細胞週期的調控也扮演一個重要的角色如 Genistein 就有文獻指出除了對於 HT-29 會引起細胞凋亡外，對於 HT-29, SW-620, SW-1116 colon cancer cell lines 也都會引起 cell cycle arrest at G₂/M phase³。最近的研究發現 Inducible nitric oxide synthase (iNOS) 由於會刺激 cyclooxygenase-2(COX-2)的表現，並進而增加大腸腫瘤發生的機

率，而薑黃素就是一種非特異性的 iNOS 抑制劑。

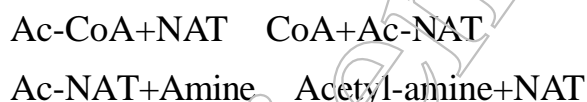
薑黃素(圖 15)，為一種由 *Curcuma Longa* Linn.rhizomes 所抽取的黃色染料，除了被當作一種香料或食物的染色劑外，也使用來處理一些發炎的疾病^{21,29-32}，並具有抗氧化的性質^{33,34}。在動物實驗方面據文獻報導薑黃素對於 benzo(a)pyrene (B(a)P)誘發前胃癌化的 A/J 小鼠，N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (EENG)誘發十二指腸癌化的 C57BL/6 小鼠及 azoxymethane (AOM)誘發直腸癌化的 CF-1 小鼠對於腫瘤的數量及大小都有明顯的抑制作用³⁵。根據 Kim JM 等 1998 年發表於 *Carcinogenesis* 的研究指出薑黃素對於 B6C3F1 雄性小鼠可以有效降低 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride(DMH)所誘發於結腸中 preneoplastic aberrant crypt foci (ACF)的數量³⁶。由美國國家癌症協會(US National Cancer Institute)所公佈的評估及篩檢具化學防治效成分之動物模型中^{37,38}，薑黃素也被觀察到同時對於 AOM 及 DMBA 所誘發結腸腫瘤及乳腺腫瘤小鼠均具有抑制作用，而 AOM 所誘發結腸腫瘤的抑制作用相較於 DMBA 所誘發乳腺腫瘤的小鼠效果要來的好³⁹。動物實驗也觀察到薑黃素對於 AOM 所誘發雄性 F344 大鼠結腸腫瘤的抑制作用可能是來自於 arachidonic acid metabolism.的調節作用¹⁰³。近來的研究也同時發現薑黃素對於抗腫瘤方面的機轉可能與抑制 arachidonic acid metabolism 相關的 cyclooxygenase(COX) 與 lipoxygenase(LOX) 及 protein kinase C(PKC), ornithine decarboxylase(ODC)與 tyrosine protein kinase(TPK) 等腫瘤促進(tumor promotion)因子和 c-fos,c-fun c-mycgenes , transcription factors (AP-1,NF- κ b)的表現有關⁴⁰⁻⁴²。

近日來關於薑黃素作為人類大腸腫瘤的化學防治劑的報告有相當多被發表，同時其可能之機轉也被廣泛之討論如細胞周期的調控及細胞凋亡的促進。根據 Hanan S.等 1997 年於 *Cancer Research* 發表的論文指出腫瘤的促進劑(tumor promoters)的作用在於對細胞凋亡的抑制⁴³，如薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株(LoVo)之生長抑制有劑量上的依存性，同時也引起細胞凋亡及細胞週期停滯於 S，G₂/M 期⁴⁴。薑黃素也會引起一些不死細胞如

NIH3T3(immortalized), 及腫瘤細胞如 human leukemic cell HL-60, human colon cancer cell HT-29, 及 human hepatocellular carcinoma cell HepG2 的細胞凋亡^{45,46}。但也有文獻指出薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 SW620 的抑制作用僅表現於 G₂/M arrest 而並無引起細胞凋亡的作用⁴⁷。薑黃素也被發現對於人類大腸上皮細胞之 NF-kappaB 活性起抑制作用, 並進而降低 Cyclo-oxygenase 2 (COX2) 的過度表現來達到防止癌化的作用⁴⁸。Hanif R. 等 1997 年發表於 Journal of Laboratory & Clinical Medicine 的論文指出薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 HT-29 and HCT-15 的抑制作用主要是來自於 G₂/M arrest, 而非對於前列腺素的抑制作用, 同時薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 HT-29 and HCT-15 並無觀察到有誘發細胞凋亡 (apoptosis) 的作用⁴⁹。

三、 乙醯轉移酵素 (N-acetyltransferase) 簡介 由流行病學和統計的研究顯示: 人類 70% 的癌症是來自於環境中的危險因子⁵⁰, 而這些危險因子中以化學致癌物 (chemical carcinogens) 佔絕大多數⁵¹。多半會致癌的化學物質幾乎都具有親電性, 這些致癌物上的親電基會與細胞內的核酸或蛋白質等分子行共價結合。化學致癌物中以芳香氨類 (arylamines) 為很重要及常見的代表物。目前已經證實在燃燒的空氣中含有包括 4-aminobiphenyl and 2-aminofluorene 等致癌物質^{52,53}。經研究後才發現許多化學致癌物要經過體內乙醯轉移酵素使用 acetyl coenzyme A 為 co-factor 乙醯化後⁷, 才能活化, 再與細胞內的 DNA 結合, 形成 DNA 添加物 (DNA adduct), 而造成基因突變, 最後引發癌症產生^{54,55}。在暴露於 AF 之後 DNA-AF adducts 可在多種器官內被發現如肝臟, 膀胱, 及循環中的白血球中發現⁵⁶⁻⁵⁸。乙醯轉移酵素存在於多種動物體內⁵⁹⁻⁶³, 包括兔子、天竺鼠、大老鼠、小老鼠及人類的各組織中如肝、大腸、膀胱, 也存在於兩棲類的青蛙, 魚類及老鼠的寄生蟲中, 黴菌中的白色念珠菌, 人類消化系統中的大腸桿菌和幽門螺旋桿菌, 甚至連我們平常食用的蔬菜和水果也都有乙醯轉移酵素存在⁶⁸⁻⁷⁶。

根據文獻報告指出：控制人類乙醯轉移酵素的基因位在第八對染色體上，分子量為 34 KDa，且分成 NAT1 與 NAT2 Locus。AF 是 NAT1 與 NAT2 的共同受質，而 p-aminobenzoic acid (PAPB) 則是 NAT1 的受質。日常生活中所接觸的化學物質因活性低，不易與細胞內的核酸結合，但經由酵素代謝後，轉變成親電性強的活性化學致癌物。芳香氨類化合物是一種強的化學致癌物，如 2-aminofluorene (AF)，其進入不同種的動物體內，常在肝臟、乳房上皮細胞、膀胱和白血球中被發現，但 AF 必須先經動物體內乙醯轉移酵素 (NAT) 的乙醯化。利用 Acetyl CoA 上的二醯基轉移至受質 (AF) 的 NH₂ 基上，而形成 2-acetyl-aminofluorene (AAF)，再經由體內其他酵素，如 Cytochrome P450、Sulfotransferase 等的代謝，才會變成活性強的終極致癌物 (ultimate carcinogen)，與標的器官細胞內的 DNA 之 Guanine 結合，形成 DNA 添加物，最後造成標的器官的致癌化。化合物如含有 hydroxyl、amino 及 sulfhydryl 基，進入體內首先須先經乙醯轉移酵素的乙醯化代謝後，利用 Acetyl-CoA 上的乙醯基轉移至受質 (如 AF) NH₂ 基上，而形成 Acetyl amine (如 2-AAF)，反應式如下：



接著再由 Cytochrome P450 作進一步的代謝，才會轉化為活性強的終極致癌物。

乙醯轉移酵素活性快慢分別，主要取決 NAT2 對受質的催化速率^{64,77-79}。暴露在 2-aminofluorene (AF) 的個體，快的乙醯轉移者較易罹患大腸癌和肝癌；慢的乙醯轉移者較易罹患膀胱癌⁸⁰⁻⁸³。當個體暴露到含化學致癌物，如芳香氨類化合物的環境下，若提高乙醯轉移酵素 (NAT) 的活性會增加許多芳香胺類致癌物質的敏感度，進而增加細胞突變而致癌⁸⁴。相類似地，也有學者根據流行病學指出若改變個體肝中 NAT 酵素的活性與該個體產生乳癌和膀胱癌有相關聯。NAT 受到外來藥物之抑制，將使此致癌物質轉變為代

謝物(如 AAF)減少,相對的,也就可以減少細胞突變和癌症的生成。

四、細胞週期(Cell Cycle)簡介 細胞週期生長及繁衍是所有生物的特徵,所有活細胞皆有染色體複製和將遺傳訊息傳給子細胞的能力,而這一個步驟是由細胞週期所控制。進行細胞週期的細胞,可分為兩個重要的時期所組成,一是細胞分裂 (division),為母細胞和子細胞的分離,二是間期 (interphase),為細胞成長時期。細胞週期可分為 G_0/G_1 、S 及 G_2/M 等 phase,而癌細胞的細胞週期與正常細胞不同⁹⁰。正常人體細胞的 DNA 是雙套,但是有些癌細胞的 DNA 可能不成套或多套,其 DNA 含量較正常細胞多或少。

G_0 期,細胞呈靜止態不生長,若細胞分裂被啟動,則細胞進入細胞週期中的 G_1 期,此時, RNA 的量會增加,而 DNA 複製所須的蛋白質亦被合成。當 DNA 的合成開始,即進入 S 期。此時, DNA 的量一直增加,直到成雙倍,當時, DNA 合成終止,細胞進入 G_2 期。最後,細胞進入有絲分裂期: M 期,分裂後回到 G_1 期,而若細胞分裂持續,則為 G_0 期。細胞週期中的 G_2 、M 期的 DNA 含量是 G_0 期的兩倍, S 期的 DNA 量則介於二者之間⁹⁰。細胞週期簡圖如圖 14 所示。

DNA 的複製和組蛋白 (histone) 的合成只有發生在 S 期。S 期是從 DNA 開始合成到 DNA 合成結束的全部過程,使 DNA 含量增加一倍(從 $2N$ 變成 $4N$)。S 期的前一時期稱為 G_1 期,也就是新產生的子細胞必須經過一定的間隔,才能進行 DNA 合成,稱之為 DNA 合成前期或 G_1 期。 G_1 期是子細胞生長發育階段,細胞週期時間長短主要由 G_1 期決定。各類細胞的細胞週期有很大差異。細胞在 G_1 期可以停留幾天、幾年甚至幾十年,如骨骼肌細胞、神經細胞,也可以停留幾分鐘。而細胞進入 S 期以後,一直到有絲分裂完成,所需的時間是相當恆定。但細胞並非一直進行分裂,當細胞週期停止的時後稱為 G_0 期,這一類的細胞稱之為 post-mitotic cell。此時期與 G_1 期不同,因 G_0 期並非為準備複製 DNA,但當給予某些外在刺激時,

可誘導 G_0 期進入 G_1 期。DNA 合成之後，到有絲分裂也必須經過一定的間隔，稱之為 DNA 合成後期或 G_2 期。一般體細胞的 G_2 期要經歷 2-5 小時，其 DNA 含量是 $4N^{89,90}$ 。

再利用流式細胞計數儀 (Flow cytometry : FACS) 分析細胞週期的技術方面，先將細胞製成懸浮液後，與螢光性染料反應，此螢光性染料是 Propidium Iodide (PI)，PI 是一種嵌入性螢光染料，能夠嵌入雙鏈 DNA 及 RNA 的鹼基對中，再將此懸浮液送入流式細胞計數儀，此時幾乎是以單一細胞通過，再經由雷射光照射 PI 後發出激光，來做定量分析，而決定細胞此時在什麼週期⁴⁰。

五、細胞凋亡 (Apoptosis) 簡介 細胞凋亡，在希臘文中 apoptosis 為樹葉或花瓣凋落 (falling off) 的意思⁹¹。生物為了維持正常的功能及型態，自胚胎發育開始直到死亡為止，細胞凋亡的程序不斷的在進行中。於成年的生物個體當中，一些不再需要的細胞如停止發炎狀態的組織中被活化的 T-CELL，或 DNA 的損害已無法修復而成為潛在性的致癌細胞，這些細胞都會通過計畫性的細胞死亡 (programmed cell death) 來維持個體的功能及結構正常。事實上，腫瘤細胞最重要的特徵之一就是無法進行細胞凋亡。細胞透過細胞凋亡的程序而死亡的步驟是有秩序的，首先整個細胞及細胞核的體積縮小，接著細胞由連接著的周圍組織細胞中脫落，染色質分解成為片段，最後被吞噬細胞所吞食⁹²。與壞死 (necrosis) 程序最大的區別在於細胞凋亡並不會引起周圍組織的發炎⁹³。圖 16 簡單的說明了壞死與凋亡的區別。

凋亡細胞最特別的型態特徵是胞核染色質的降解，染色質會聚集於核模下，呈緻密的團塊狀，在一般或電子顯微鏡下觀察可見。染色質的濃集可能是細胞核內 DNA 裂解的結果，DNA 雙鍊發生裂解，先形成約 300 bp 大小的片段，爾後再造一步裂解成 185 bp 的核小體，此小體是細胞凋亡的特異性標誌。

目前已發現許多抗癌藥是引起腫瘤細胞的計畫性死亡 (programmed cell death)。

以流式細胞技術研究凋亡細胞，基本上分析細胞形態上、及生化

學上的特徵。活細胞或胞膜完整的細胞可將一些染料排斥在外，例如 Propidium Iodide (PI), 7-Amino Actinomycin D (7-AAD), 由於早、中期凋亡細胞仍保留完整胞膜，故對上述染料拒染，可利用此法分辨凋亡細胞與壞死細胞⁹⁴。

有文獻指出具有化學防治(chemopreventive agent)腫瘤的物質如 sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate(PEMC)等，細胞凋亡(Apoptosis)可能扮演一個可靠的生化指標(biomarker)⁴³，因此本實驗也利用培養中的人類大腸腫瘤細胞株(colo-205)，加入薑黃素，然後抽取 DNA 來跑電泳，看有否 Apoptosis 的現象。

第三章 材料和方法

第一節 實驗儀器

1. 高效液相層析儀(HPLC)Beckman(Programmable Solvent Module 126; Diode Array Detector Module 168)

本儀器係利用不同溶液為移動相，透過通過靜態相的管柱，藉著在移動相中之檢品各成分對於靜態相管柱結合時間上的不同，進而將其分離之操作。實驗先由已知濃度的標準品溶液，算出峰線面積，再求得檢體峰線面積，兩者比較後，進而算出檢體的含量。

測定 NAT 活性的條件：

- A. C18 reversed – phase column (spherisorb 4 . 6 × 250 nm)
- B. Solvent system : 20 mM KH₂PO₄(PH4 . 5) / CH₃CN(53 : 47)
- C. Wavelength : 280 nm
- D. Retention time : AAF : 6.5 min , AF : 9.0 min

2. 流式細胞分析儀：Flow Cytometry (美商必帝 FACS can)

流式細胞技術在研究凋亡細胞的原理，是經由分析細胞形態上及生化上特徵的不同。在流式分析術中，前方散射光 (FSC) 代表細胞大小，側方散射光 (SSC) 表示細胞的顆粒性。凋亡細胞的 FSC 變小，SSC 先增加後減少，本法之使用必需檢測活細胞才有意義。活細胞或胞膜完整的細胞可將一些染料排斥在外，例如 Propidium Iodide (PI)，由於早、中期凋亡細胞乃保留完整的細胞膜，故對 PI 拒染，所以可利用此方法分辨凋亡細胞和壞死細胞。

3. 倒立式相位差顯微鏡：Nikon Ellipse TE 300

4. 離心機：Model 3200 Eppendoff / Brinkman

5. 製冰機：King –Seeley Thermos Co. USA

6. 紫外線燈 : Spectvoline model ENF-24

第二節實驗材料

1. 購自美國 P-L Biochemicals Inc. (Milwaukee , WI) 公司者 : Acetyl Co-A
2. 購自美國 K and K laboratories (Plainview , NY) 公司者 :
2-Aminofluorene (AF)
2-acetylaminofluorene (AAF)
3. 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis , MO) 者 :
Leupeptin
Tris-HCl
Trischloroacetic acid
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
P-aminobenzolic acid (PABA)
N-acetyl-p-aminobenzoic acid (N-ac-PABA)
Formic acid (Ammonium salt) = Ammonium formate
1,4-Dithiothreitol (DTT)
Bovine serum albumin (BSA)
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
Adenosine 5-triphosphate (ATP)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)
Trypsin ○
Trypan blue
Ribonuclease A (RNase)
Acetylcarnitine
Carnitine acetyltransferase
Tergitol NP-40

4. 購自瑞士 Fluka 公司者：

Propidium Iodide (PI)

5. 購自美國 Gibco laboratories (Grand Island , NY)公司者：

RPMI 1640 culture medium

Fetal bovine serum

Hanks balanced salts

Antibiotics (Kanamycin , Penicillin , Streptomycin)

Glutamine

6. 購自西德 Merck 公司者：

Acetonitrile

Acetic acid

Ethanol

Acetone

Triethylamine

Iodoacetamide

Ethyl acetate

7. 購自西德 FERAX (GMBH, Berlin)公司者：

Ethylene glycol monoethylether

Trisodium citrate 2-hydrate

8. Working Lysing Buffer Solution (冰浴操作)

Working solution 《 PH7.5 , 4 , 20mM Tris-HCL , 1 mM Dithioth-reitol (DTT) , 1 mM Ethylene diaminete traacetate acid (EDTA) 》20 mL , 50 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)20 μ L 及 10 μ M leupetin 20 μ L , 後兩者以維持酵素活性。

9. Acetyl-CoA recycling mixture

50 mM Tris-HCL (PH 7.5) , 0.2 mM EDTA , 2 mM DTT , 15 mM acetylcarnitine , 2 U/mL carnitine acetyl transferase , AF(22.5 μ M)

10. Cdk1,cdk2,cyclin-e 1st , 2nd antibody from BECKMAN COULTER US.
11. 人類大腸腫瘤細胞株 (Human colon cancer cell line : COLO 205)
取自台灣新竹食品工業發展研究所
cell line : COLO 205
cell type human colon adenocarcinoma
species : homo sapiens(human)
tissue : colon;adenocarcinoma;from metastatic site : ascites
discription : Isolated from ascitic fluid of a 70-year-old Caucasian male with carcinoma of the colon,the patient had been treated with 5-fluorouracil for 4-6 weeks before removal of the fluid specimen;procuce carcinoembryonic antigen;tumorigenic in suitable host animals.
12. 薑黃素 (Curcumin) : 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis , MO USA)
1,7-bis[4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-1,6-heptadiene-3,5-dione.
From curcuma longa(Turmeric)
Inhibits the induction of nitric oxide synthase in activated macrophages; inhibits cyclooxygenase and 5-lipoxygenase
 $C_{21}H_{20}O_6$

第三節 實驗方法

1. 薑黃素的製備

本實驗之薑黃素係購自 SIGMA ,USA 之產品 , 並依不同濃度以 DMSO 製備。

2. 薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)的影響。

本實驗分成九個部份：

一、 不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株
(COLO 205) 中 NAT 的活性效應。

A . 在細胞質內

將培養的人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 取 5×10^8 cells 個細胞，置於 2 ml 的 lysis buffer (20 mM Tris-HCL(PH7.5 at 4) , 1 mM DTT , 1 mM EDTA , 50 mM PMSF and 10 μ M Leupatin) 中，懸浮液先以 9000 rpm，離心 1 分鐘，取上層液，再用 10000rpm，離心 60 分鐘。取上層液先制成胞質液，置於冰浴備用。利用 AF 和 PABA 作受質來決定 Acetyl-co A 依賴的乙醯轉移酵素乙醯化 AF 和 PABA 的量。反應混合液組成總共體積 90 μ L：包括取 50 μ L 的 (COLO 205) 胞質液，加入 20 μ L 的 Acetyl-coenzyme A recycling mixture((50 mM Tris-HCL , PH 7.5) , 0.2 mM EDTA , 2 mM DTT , 15 mM acetyl carnitine , 2U/ml carnitine acetyltransferase) ，以 22.5 μ M 的 AF 或 PABA 當受質，最後加了 20 μ L 的 Acetyl-CoA 及 10 μ L 不同濃度的薑黃素 (1 , 5 , 10 , 25 , 50 μ M) 後，反應起始。控制組不加 Acetyl-CoA ，而加入蒸餾水。培育於 37 $^{\circ}$ C，10 分鐘，再加入 100 μ L acetonitrile 終止 AF 或 PABA 反應。實驗組及控制組均作 3 次，再經由 HPLC 分析，得出人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 中薑黃素對 NAT 活性測定。流程圖如下：

NAT ACTIVITY IN (COL-205) CELL CYTOSOL
PROTOCOL

5×10^8 COLO 205 cells

lysis buffer

cytosol

+AF(22.5 μ M) or PABA (22.5 μ M)

\pm curcumin(1-50 μ M)

acetyl coenzyme A

Incubated 37 $^{\circ}$ c 10 min

HPLC

The amount of AF and AAF of PABA and N-Ac-PABA

B . 在活細胞內

將培養的人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205), 每一格計數人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 1×10^6 cells / ml 放入 24 well plate (含 1 ml RPMI 培養基 , glutamine , 10%胎牛血清) 中 , 再加入不同濃度(15, 30, 60, 90 μ M)的arylamin 受質 AF 或 PABA 及分別有無加入薑黃素試劑 25 μ M 一起在 37 $^{\circ}$ C , 95%空氣 , 5%二氧化碳下反應 , 經過不同的時間 (分別為 6 , 12 , 18 , 24 小時) 反應終結 , 將細胞及培養基移取離心。上清液立即以 ethylacetate / methanol (95 : 5%) 萃取 , 此溶液冷凍揮發乾燥後 , 再溶於 200 μ L methanol 中混合均勻 , 取 20 μ L 打入高效液相層析儀 , 再經由 HPLC 分析乙醯化受質 (AAF) 和未乙醯化 AF 的量 , 實驗組及控制組均作 3 次 , 得出薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞中 N-acetyltransferase (NAT) 酵素活性的影響。流程圖如下 :

(COLO 205) CELL NAT ACTIVITY
PROTOCOL

1x10⁶ cells/ml in 24 well plate

+AF or PABA(15-90μM)

±curcumin 25 μ M

Incubate for different time(6-24 hrs)

collect supernatant

dry down under speed vacuum

methanol

HPLC

The amount of AF and AAF or PABA and N-Ac-PABA

二、 薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 在不同濃度的 AF 產生 DNA ADDUCT 的影響。

用 24 well plate , 每個 well 置入 1x10⁶ COLO 205 cells , 並以不同濃度的 AF(30 , 60 , 90 μM)及有無加入薑黃素 2.5 μM 來培養 24 小時後收集細胞,並以 GENOME DNA isolation kit protocol(BIO 101 , La Jolla , CA , USA)來抽取 DNA , 接著再將已抽取的DNA溶於TE buffer(10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA , pH 8.0)。取 5 ml TE buffer(含 5 μg 的 DNA)與 5 ml 的 10x T4 polymerase buffer(0.33 M Tri acetate , 0.66 M potassium acetate , 0.10 m magnesium acetate , 5.0 mM DTT , Ph 7.5)及 40 ml H₂O 混合。再加入 17 pmol 的 ⁻[³²P]dATP

(3000 Ci/mmol)及 22 單位的 T4 DNA polymerase ,並在 60° c 共同培養 60 分鐘 接著再以 10 ml 的 0.5M EDTA 來中反應 以反應及未反應的同位素以 Sephadex G-50 chromatography 來分離 , 以標識的 Beckman HPLC 分析 (pump 168 and detector 126 , 使用 Ultrasphere C18 reversed phase ion-pairing column 4.6x25 cm , 30 mM KH₂PO₄ , pH 6.0 , 含有 10% CH₃CN 流速 1.5 ml/min 灌流 10 分鐘 , 接著再以 90% 30 mM KH₂PO₄ , Ph 6.0 , 5 mM 的 tetrabutylammonium phosphate 及 50% CH₃CN 灌流 65 分鐘。UV 使用 254 nm。最後樣本 (1 min=1.5 ml) 則以 scintillation spectrometry (Levy and Weber , 1989; Chung et al.,2000)來收集及定量。DNA 添加物量的計算則經由特定同位素標定的 ATP 波峰(peak)放射性來度量之。DNA 添加物的單位則由 pmol adduct/mg DNA 來表示。(Levy and Weber , 1989;Levy et al.,1994 Chung , 1999;Chung et al.,2000)

ANALYSIS OF AF-DNA ADDUCT PROTOCOL

1x10⁶ cells/well in 24 well plate

+different concentration of AF(30 , 60 , 90 μM)and/or curcumin 2.5
μM

Incubate for 24 hrs

harvest cell

isolate DNA with GENOME DNA kit

digest DNA by nuclease

HPLC

AF-DNA adduct

三、 利用 RT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)方法檢測薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞 NAT1 基因(NAT mRNA)表現的影響。

用 12 well plate , 每個 well 置入 5×10^6 COLO-205 cells , 分別有無加入各種不同濃度 (0.1 , 1.0 , 2.5 , 5.0 , 10 , 25 , 50 μ M) 的薑黃素(Curcumin) , 然後培養 24 小時 , 經由離心而收集細胞 , 再利用 Qiagen Rneasy Mini Kit (Qiagen , inc , Valencia , CA , USA) , 收集 total RNA , 然後將 total RNA (1.5 μ g) , 0.5 μ g of oligo-dT primer and DEPC (diethyl pyrocarbonate)-treated water 一起混合成 12.5 μ L 然後倒入微量離心管中。將混合液在 70 $^{\circ}$ 加熱 10 分鐘然後在冰上冷卻 1 分鐘 , 接下來反轉錄步驟完全照操作指示(First-strand cDNA synthesis kit, Novagen)。從 total RNA 反轉錄的產物作為 PCR 的一個模板。當放大 target cDNA , 在 50 μ L 的溶液中的組成如下 : (1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 20 pmoles of each primer (B-MDIEA-NAT1 & VPKHGD-X-NAT1 for NAT1, FP1-NAT2 & RP1-NAT2 for NAT2, Act b 1 & Act b 2 for beta-actin)。cDNA 模板與從 50 ng total RNA 和 2 units of DyNAzyme DNA Polymerase 合成的量一致 , The sequence of primers as follows :

B-MDIEA-NAT1, 5'-CACCCGGATCCGGGATCATGGACATT
GAAGC-3', nt 435-454, GenBank accession number X17059;
VPKHGD-X-NAT1, 5'-GGTCCTCGAGTCAATCACCATGTTT
GGGCAC-3', nt1295-1278, GENBANK accession number
X17059;

FP1-NAT2,5'-CTAGTTCCTGGTTGCTGGCC-3',nt
79-98,GenBank accession number NM-000015;
RP1-NAT2,5'-TAACGTGAGGGTAGAGAGGA-3',nt
1073-1054,GenBank accession number NM-000015;
Act b1,5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3', nt 94-114,
GenBank accession number NM-001101;
Act2 b2,5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3',nt
446-422,GenBank accession number NM-001101. (41,42,43)
流程圖如下 :

NAT1 GENE EXPRESSION PROTOCOL

5×10^6 cells/well in 12 well plates

±curcumin(0.1 , 1.0 , 2.5 , 5.0 , 10 , 25 , 50 μ M)

incubate 24 hrs

isolate total RNA (Qiagen Rneasy Mini Kit)

RT-PCR(cDNA)

Primer (NAT1, beta-actin)

Gel Electrophoresis

Get Picture

四、 不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株

(COLO 205) 細胞毒性 (cytotoxicity) 的效應。

先將培養的人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)細胞收集，用 PBS 洗清細胞，再用 Trypsin 處理貼壁的人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)細胞，離心後棄置上層液，用 24 well plate，每個 well 置入 1×10^6 cells (COLO 205)細胞，在細胞培養中，分別有無加入不同濃度的薑黃素試劑 (0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.5 , 5.0 μM)，一起在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，95%空氣，5%二氧化碳下，經過不同的時間 (分別為 6 , 12 , 24 , 48 , 72 小時) 培養後收集細胞，再利用錐蟲藍 (Trypan blue) 染色，死細胞因細胞膜通透性增加，故錐蟲藍得以進入而使細胞呈藍色，活細胞則沒有被錐蟲藍所染而呈白色。以倒立式顯微鏡觀察，放大 400 倍，利用細胞計數皿計算出活細胞數目及死亡細胞數目，得知存活細胞的數目，並可進一步算出細胞的死亡率或存活率。流程圖如下：

VIABLE CELL
PROTOCOL

1×10^6 cells/well in 24 well plates

\pm curcumin(0.1-5.0 μM)

incubation(6-72 hrs)

harvest cells

Trypan blue

FACS

count viable cell

五、 不同濃度的薑黃素 (Curcumin) 對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) DNA 的破壞效應。

用 6 well plate , 每個 well 置入 1×10^6 cells COLO 205 細胞 , 在細胞培養中 , 分別有無加入不同濃度的薑黃素試劑 (0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.5 , 5.0 μ M) , 一起在 37 $^{\circ}$ C , 95% 空氣 , 5% 二氧化碳下 , 經過 24 小時培養後收集細胞 , 再萃取 DNA 跑電泳膠。DNA 的抽取是利用 G - NOME DNA KIT 萃取 , 首先將培養好的人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 用 trypsin 將細胞打下約 1×10^6 cells/well 細胞 , 收集 , 離心 , 再用 PBS 清洗、離心 , 完成後倒掉上層液 , 加入 cell suspension solution , 混合完成後加 50 μ L RNase , 充分混合均勻再加入 100 μ L cell lysis / denaturing solution , 在 55 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘後 , 再加入 25 μ L protease mixture 混合 , 在 55 $^{\circ}$ C 反應 60 分鐘後 , 加 500 μ L Salt - Out mixture 輕輕混合均勻後置于 4 $^{\circ}$ C 10 分鐘 , 再高速離心 10 分鐘 , 取上清液加入 TE buffere 和 100% ethanol 使 DNA 沉澱出 , DNA 乾燥後用 1% agarose in TBE buffer (含 ethidium bromide) 利用 50mV 做電泳分析 , 後再以 UV 燈檢視 , 然後照相及觀察 DNA fragment 移動情形 , 看 DNA 的破壞情形。流程圖如下 :

DNA DAMAGE

PROTOCOL

1×10^6 cells/well in 6 well plates

\pm curcumin(0.1-5.0 μ M)

incubation(24hrs)

harvest cells

DNA (G-NOME DNA Kit)

electrophoresis

ethidium bromide

UV

Picture

六、 不同濃度的薑黃素 (Curcumin) 對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞型態 (cell morphology) 的效應。

用 24 well plate , 每個 well 置入 1×10^6 cells (COLO 205) 細胞 , 在細胞培養中 , 分別有無加入不同濃度的薑黃素試劑 (0.1 , 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.5 , 5.0 μ M) , 一起在 37 , 95% 空氣 , 5% 二氧化碳下 , 經過 24 小時培養後 , 以位相差顯微鏡觀察並照相 , 看細胞膜破壞的情形及細胞型態的改變。流程圖如下 :

CELL MORPHOLOGY

PROTOCOL

1×10^6 cells/well in 24 well plates

\pm curcumin(0.1-5.0 μ M)

incubation(24hrs)

harvest cells

Reverse Phase Microscope

Picture

七、 不同濃度的薑黃素 (Curcumin) 對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞週期 (cell cycle) 的效應。

用 24 well plate, 每個 well 置入 1×10^6 cells COLO 205 細胞, 在細胞培養中, 分別有無加入不同濃度的薑黃素試劑 (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 μ M), 一起在 37 $^{\circ}$ C, 95% 空氣, 5% 二氧化碳下, 經過 6, 24, 48, 72 小時培養後收集細胞, 先將 PBS 和 70% 乙醇放於冰上冷卻, 收集細胞後, 用 PBS 清洗細胞, 再用 Trypsin 處理貼壁的人類胃癌細胞株, 離心後倒掉上層液, 再用 PBS 來調整細胞濃度並清洗細胞兩次, 經低速離心 5 分鐘 300Xg, 吸除上清液留約 200 μ L 的 PBS, 使細胞均勻混合, 接下來一面搖晃振盪一面加入 3 cc 70% 乙醇以固定細胞, 靜置于 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中過夜, 上機前先再以低速離心 5 分鐘 300Xg, 吸除上清液再加入 PBS 清洗, 盡量吸除上清液將細胞團塊打散, 最後加入 1 mL 的 stain solution (final concentration of Triton 1% RNase 0.1 mg/mL & PI 4 μ g/mL), 在室溫下反應 30 分鐘並輕輕搖晃, 反應完後在一小時內上流式細胞計數儀分析。利用流式細胞計數儀檢測 G0/G1, S, G2/M phase 等細胞週期 DNA 量的變化, 並利用電腦分析以測知對大腸癌細胞 DNA 增生有否抑制。流程圖如下:

CELL CYCLE ANALYSIS PROTOCOL

1×10^6 cells/well in 24 well plates

±curcumin(0.1-5.0 μ M)

incubation(6 , 24 , 48 , 72 hrs)

harvest cells

Propidium Iodine

FACS

Cell cycle analysis

八、 薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205)
之 Cyclin-Kinase 的影響。

取 1×10^6 COLO 205 cells 置於 6 well 並分別有無加入薑黃素 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.5 , 5.0 μ M 於 37° C , 5%CO₂ 培養後除去上清液 , 加入 trypsin 0.1cc 將細胞打下 , 再加入 1ccPBS 後將細胞置入 1.5cc 離心管於 4° C 1500rpm 離心 5min , 再以 Trypan blue 染色 , 於顯微鏡下以細胞計數皿計算細胞數。加藥與否都各取 5×10^5 cells/200 μ l 並至入 96 well 中 , 離心 1500 rpm 4° C 2min 後除去上清液 , 加入 ice-cold 1% formaldehyde 100 μ l for 5min , 再加入 ice-cold 99% Methanol 100 μ l for 30 min , 並於 4° C 離心 1500 rpm 2 min 後除去上清液。接著加入 100 μ l 之 0.1%BSA in PBS 並於 4° C 離心 1500 rpm 2 min 後除去上清液並重複三次 , 再加入 100 μ l 之 0.1% Triton X-100+0.1% sodium-citrate in PBS 並於冰上置放 45min。接著加入 100 μ l 之 0.1%BSA in PBS 並於 4° C 離心 1500 rpm 2 min 後除去上清液並重複三次。再加入 100 μ l 之 cdk2 or cdk1 or cyclin-E antibody 並於室溫下反應 2.5 小時 (Ab 以含 0.1% BSA+0.1% sodium azide 之 PBS 稀釋) , 接著

加入 100 μ l 之 0.1% BSA in PBS 並於 4 $^{\circ}$ C 離心 1500 rpm 2 min 後除去上清液並重複三次。再加入 100 μ l FITC-conjugated IgG antibody , 並於室溫下避光反應 30 分鐘,接著加入 100 μ l 之 0.1% BSA in PBS 並於 4 $^{\circ}$ C 離心 1500 rpm 2 min 後除去上清液並重複三次。再加入 100 μ l 之 20 μ g/ml PI+0.5 mg/ml Rnase in PBS 後並於室溫下避光反應 30 分鐘,最後各加入 100 μ l 之 0.1% BSA in PBS, 放入 FACS 分析細胞內 cdk2 , cdk1 , cyclin-E 及 DNA 之變化, 並以電腦分析百分比。本法係依據 Mark J. Jaroszeski and Richard Heller 所著 Flow Cytometry Protocols (Methods in Molecular Biology Volume 91) Chpt 6:Detection of the Cyclins in Individual Cells by Flow and Laser Scanning Cytometry .p67-75。

ANALYSIS OF CYCLIN-KINASES EFFECT PROTOCOL

1x10⁶ cells/well in 6 well plates

\pm curcumin(0.1-5.0 μ M)

incubation 24 hrs

Harvest Cell

ice-cold 1% formaldehyde 100 μ l for 5 min

ice-cold 99% methanol 100 μ l for 30 min

wash

100 μ l 0.1% Triton X-100 + 0.1 % sodium citrate in PBS

1^o antibody

2^o antibody

FACS

九、 利用微晶片偵測薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞 (COLO 205) 之 基因表現的影響。

取 5×10^6 cells of Colo 205, 加或不加薑黃素 2.5 μ M 並移入 37^o C 5%CO₂ 培養箱培養 24 小時, 再加入 trypsin 0.1 cc 將細胞打下, 以 PBS 清洗後, 將細胞置入 1.5 CC 離心管, 以 4^o C 離心 1500 rpm 5 min, 倒除上清液, 再以 pipette 吸乾上清液, 加入 350 μ l Buffer RTL 且 vortex 60 秒, 再加入 70% ethanol 350 μ l 且 mix by pipetting, 接著以 pipette 吸取並放置於 column sitting in 2ml collection tube, 離心 15 sec at 10000 rpm, 然後倒掉下層液, 再加入 700 μ l Buffer RW1, 離心 15 sec at 10000 rpm, 然後倒掉下層液, transfer column to a new 2 ml collection tube, 加入 500 μ l Buffer RPE, 離心 15 sec at 10000 rpm, 然後倒掉下層液, 加入 500 μ l Buffer RPE, 離心 2 min at 10000 rpm, transfer column to a new 1.5 ml collection tube, 加入 30 μ l RNA-free water 且離心 1 min, 下層即 RNA, 再於 260 nm 下測 OD 值。(OD 值=1 時 DNA=50 μ g/ μ l 或 RNA=40 μ g/ μ l)。最後將 RNA 交由百恩諾生技公司進行 micro-array 之分析。

The Micro-array analysis

Protocol

5×10^6 cells of COLO 205

\pm curcumin(2.5 μ M)

total RNA

生技公司 (百恩諾)

cDNA Microarray

Gene Up or Down Regulation

Futher Study

第四節 統計分析

以 unpaired student's test 和 ANOVA 作統計分析。

第四章 結果

一、不同濃度的薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)中 NAT 的活性效應。

A . 在細胞質內

加入不同濃度的薑黃素，依序為 1.0 , 5.0 , 10 , 25 , 50 μ M , 再

用 HPLC 檢測收集之細胞液，發現 NAT 活性(以 AF 檢測)在薑黃素濃度為 25 μ m 時被抑制了 40.9%，在薑黃素濃度為 50 μ M 時被抑制了 54.59%。結果顯示，薑黃素的濃度愈高，對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)胞質液中 NAT 活性抑制就愈強(表 1)。

B. 在活細胞內

1. 薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)劑量及時間依存性之影響：

結果顯示，arylamin 受質 AF 或 PABA 的濃度愈高，或培養的時間越長，則人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)細胞中的 NAT 活性就被降得愈低了(表 2, 表 3)(圖 1, 圖 2)。譬如在加入不同濃度(15, 30, 60, 90 μ M)的 arylamin 受質 AF 經作用 24 小時，用 HPLC 檢測，發現 NAT 活性分別被抑制了 32.62%，23.51%，34.40%，36.17%，顯示濃度愈高，抑制力愈強。

2. 薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205) NAT 酵素 K_m 及 V_{max} 之影響：

結果顯示，薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205) NAT 酵素 K_m 及 V_{max} 值都有明顯的抑制作用(表 4)(表 5)(圖 3-1, 圖 3-2)並且薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)之 NAT 酵素活性的抑制，是屬於 Uncompetitive inhibitor 的模式。

3. 薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205) NAT 代謝產物之影響結果顯示，薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205) NAT 酵素的代謝產物有減少的作用(圖 4-1, 圖 4-2 圖, 圖 4-3, 圖 4-4, 圖 4-5, 圖 4-6)。

二、薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)在不同濃度的 AF 產生 DNA ADDUCT 的影響。

結果顯示，在濃度越高的 AF，薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株

(COLO 205)產生 DNA-AF-Adduct 的抑制就愈強(表 6) (圖 5)。
譬如在加入不同濃度的 AF，依序為 30，60，90 μ M，發現 DNA-AF-Adduct 被抑制率分別為 45.16%，45.61%，38.54%。

三、 利用 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) 方法來檢測薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞 (COLO 205) 中 NAT1 基因(NAT mRNA)表現影響。

結果顯示，薑黃素濃度越高，對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205) NAT1 基因(NAT mRNA)表現的抑制就愈強(圖 6)。

四、 不同濃度的薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)細胞毒性 (cytotoxicity) 的效應。

從實驗結果得知，譬如在 24 小時的培養時間，所加薑黃素濃度從 0.1，0.5，1.0，2.5，5.0 μ M，COLO 205 細胞其存活率依次為 83.66%，74.96%，64.15%，51.09%，24.01%。發現薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)的毒殺效應，在相同的培養時間，濃度愈高時，毒殺效應愈佳 (表 7) (圖 7-1 . 圖 7-2)。顯示薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 的毒殺效應呈現濃度正相關性，濃度愈高，毒殺效應就愈明顯。

五、 不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) DNA 的破壞效應。

結果發現 DNA 有典型裂解的現象出現，此為細胞壞死的特徵。並且有少量固定 base-pair DNA 出現為 APOPTOSIS 的特徵 (圖 8-1，圖 8-2，圖 8-3)。所以薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞死亡效應，主要是經由細胞毒殺效應，並少許經由計畫性的細胞死亡來進行。

六、 不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205) 細胞型態(cell morphology)的影響。

結果發現濃度愈高，細胞型態改變愈明顯，受損的細胞數亦顯著增加（圖 9）。

七、不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205) 細胞週期 (cell cycle)的影響。

結果發現薑黃素對於 G_0/G_1 期有明顯的抑制作用，而且濃度越高，抑制作用越明顯，同時對於 S 期有明顯的提升作用，而且濃度越高，提升作用越明顯，但是對於 G_2/M 期的作用並不明顯。譬如在 48 小時的培養下，所加薑黃素試劑濃度分別為 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 μ M，其 total S-Phase 依序為 8.67% , 6.06% , 6.30% , 12.44% , 21.85% , G_0/G_1 期依序為 84.61% , 83.76% , 84.37% , 74.78% , 68.78% (表 8)(圖 10-1, 圖 10-2, 圖 10-3, 圖 10-4, 圖 10-5, 圖 10-6, 圖 10-7)(圖 11-1, 圖 11-2, 圖 11-3, 圖 11-4)。

八、薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)之 Cyclin 及 Cdk 的影響。

結果顯示不同濃度的薑黃素對於 CYCLIN-E, CDK1, CDK2 都有增加的作用 (圖 12-1, 圖 12-2, 圖 12-3), 但是 CYCLIN-E, CDK1 的增加並無統計上的意義, 而 CDK2 的增加有統計上的意義。譬如 CDK2 呈陽性反應的細胞在薑黃素濃度為 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 μ M 時相較於控制組分別增加了 12.95% , 18.52% , 44.86% , 65.57% 。

九、以微晶片偵測薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 之 基因表現的影響。

其結果經分析製圖, 圖 13-1, 圖 13-2, 13-3, 圖 13-4, 表 9, 表 10 為經篩檢與細胞週期及細胞凋亡有關之基因。圖 13-5, 表 11 為 AANAT 有意義的表現抑制(down regulation), 表 12 為 cyclin-A 表現抑制(down regulation)。表 13 為 up or down regulation 最為明顯之基因。薑黃素與人類大腸腫瘤細胞 (COLO 205) 之基因表現間的關聯尚需進一步之分析以確認之。

第五章 討論

薑黃素 (Curcumin)，主要存在於薑黃，鬱金，莪朮等植物。其功能具有破瘀，通經，涼血祛痰，行氣解鬱，消積化食等。

鬱金，始載於《藥性本草》。為薑科植物鬱金 *Curcuma aromatica* Salisb、廣西莪朮 *Curcuma kwangsiensis* S.Lee et C.F. Liang 薑黃 *Curcuma*

longa L.或莪朮 *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. 的乾燥塊根，成分含揮發油，其中主成分為倍半帖烯、倍半帖烯醇，另還含有薑黃素等。薑黃，始載於《新修本草》。為薑科植物薑黃 *Curcuma longa* L.的乾燥根莖，薑黃主要含薑黃素和揮發油(薑黃酮、薑烯)。莪朮，始載於《藥性本草》，原名蓬莪茂。為薑科植物莪朮 *Curcuma zedoaria*(Berg.)Rosc.、鬱金 *C.aromatica* Salisb，或廣西莪朮 *C.kwangsiensis* S.Lee et C.F.Liang. 的乾燥根莖。莪朮含揮發油 1—1.5%。油中主含 20 多種倍半帖，此外，尚含微量的薑黃素、去甲氧基薑黃素及去二甲氧基薑黃素。

本實驗就在於鎖定薑黃素來研究，探討薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 的影響。

據 Takahiko Katoh.等 2000 年發表於 *Cancer* 的文獻指出胃及大腸腫瘤和 NAT1 基因表現有關⁹⁵，而芳香胺類 (Aromatic amine) 的致癌物早被報導且已証實⁹⁶，如果以以它餵食實驗動物會導致癌症的發生，但若直接打到體內的標的器官，並沒有造成標的器官(Target organs)的癌化⁹⁷。經過研究後來才了解，芳香胺類的致癌作用，須先靠 NAT (N-acetyl transferase) 的活化，然後經由其他酵素的共同作用，最後再與 DNA 結合，形成 DNA 添加物(DNA-adduct)^{98,99}，最後造成標的器官的癌化。有報導指出老鼠的血液、膀胱、大腸、肝臟等皆含有 NAT¹⁰²，一般認為芳香胺類化合物代謝主要著重在肝臟，血液能運送致癌物質到其他的靶的器官，如膀胱、大腸¹⁷。另有報導增加 NAT 活性，則當個體暴露到芳香胺類致癌物，會增加芳香胺類突變效應的易感性¹⁰¹。另有報告指出降低肝細胞 NAT 活性，當個體暴露到致癌物 1, 6-dinitropyrene 可降低肝細胞癌化的產生¹⁰⁰。所以如果能抑制 NAT 的活性，那是否能夠降低癌症的發生，這是大家一直都很有興趣的問題。最近更有學者指出，人類乳癌和膀胱癌的發生與 NAT 酵素的改變有直接相關連。

在動物實驗方面薑黃素對於 B(a)P 誘發前胃癌化的 A/J 小鼠，EENG 誘發十二指腸癌化的 C57BL/6 小鼠及 AOM 誘發直腸癌化的 CF-1 小鼠對於腫瘤的數量及大小都有明顯的抑制作用³⁵。薑黃素對於 B6C3F1 雄性小鼠可以有效降低 DMH 所誘發於結腸中 preneoplastic aberrant crypt foci (ACF)的數量³⁶。薑黃素也被觀察到同時對於 AOM 及 DMBA

所誘發結腸腫瘤及乳腺腫瘤小鼠均具有抑制作用³⁹。於薑黃素可能之抗腫瘤機轉方面動物實驗觀察到薑黃素對於 AOM 所誘發雄性 F344 大鼠結腸腫瘤的抑制作用可能是來自於 arachidonic acid metabolism 的調節作用¹⁰³。近來的研究也同時發現薑黃素對於抗腫瘤方面的機轉可能與抑制 arachidonic acid metabolism 相關的 COX 與 LOX 及 PKC, ODC 與 TPK 等腫瘤促進因子以及 c-fos, c-fun c-myc genes, transcription factors (AP-1, NF- κ B) 的表現有關⁴⁰⁻⁴²。

在薑黃素作為人類大腸腫瘤的化學防治劑方面相關的報告有相當多被發表，同時其可能之機轉也被廣泛之討論如細胞週期的調控及細胞凋亡的促進。根據 Chen H. 等於 1999 年發表於 Anticancer Research 的論文指出薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 (Iovo) 之生長抑制有劑量上的依存性，同時也引起細胞凋亡及細胞週期停滯於 S, G₂/M 期⁴⁴。薑黃素也會引起一些不死細胞如 NIH3T3, 及腫瘤細胞如 HL-60, HT-29, 及 HepG2 的細胞凋亡^{45,46}。但也有文獻指出薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 SW620 的抑制作用僅表現於 G₂/M arrest 而並無引起細胞凋亡的作用⁴⁷。Hanif R. 等 1997 年發表於 Journal of Laboratory & Clinical Medicine 的論文指出薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 HT-29 and HCT-15 的抑制作用主要是來自於 G₂/M arrest, 而非對於前列腺素的抑制作用，同時薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 HT-29 and HCT-15 並無觀察到有誘發細胞凋亡 (apoptosis) 的作用。

所以我們首先探討薑黃素 (Curcumin) 對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 能否影響細胞中 NAT 的活性及人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞胞質液中的 NAT 活性，並進一步利用 RT-PCR 的技術來探討不同濃度的薑黃素 (Curcumin) 對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 是否會影響 NAT1 基因的表現。首先在人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞胞質液的 NAT 活性測試中，可見到濃度愈高，NAT 活性降的就愈明顯。另外在活細胞中，我們發現加不同濃度的薑黃素 (Curcumin) 經 6, 12, 18, 24 小時培養，可降低 NAT 的活性 (N-acetylation of AF 的量)，且濃度愈高，培養時間愈久，NAT 的活性 (N-acetylation of AF 的量) 降低就愈明顯。實驗並顯示薑黃素對於 NAT 酵素的 V_{max} 及 K_m 值及其

已醃化的代謝產物都有降低的作用，同時酵素活性抑制模式為 uncompetitive inhibitor(藥物抑制酵素的作用有三種，一:Competitive inhibitor，二: Noncompetitive inhibitor，三: Uncompetitive inhibitor。)。本實驗也發現薑黃素可以降低 AF 的相關代謝產物。在 RT-PCR 的實驗中，經由最後的照相結果觀察，結果顯示，薑黃素濃度越高，對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)產生 NAT1 基因(NAT mRNA)的抑制就愈強。在薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 在不同濃度的 AF 產生 DNA 添加物(DNA adduct)的影響方面，我們發現，濃度越高的 AF，薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)產生 DNA 添加物的抑制就愈強。所以薑黃素(Curcumin)可降低人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞胞質液及活細胞中 NAT 活性，同時降低人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞 NAT1 基因的表現。所以薑黃素在抑制人類大腸腫瘤方面可能是同時透過降低 NAT 酵素的活性及其基因的表現。另外從不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 的細胞毒性效應實驗發現濃度愈高，細胞的毒殺效果就愈強。為了進一步了解薑黃素(Curcumin)引起細胞死亡的原因，我們進一步檢測細胞型態和 DNA 的影響。首先在細胞的型態方面發現，人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞經不同濃度的薑黃素(Curcumin) 經過不同的時間處理後發現薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 的毒殺效應和濃度有正相關，濃度愈高，毒殺效應就愈明顯。其次由大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞經不同濃度的薑黃素(Curcumin)處理後 24 小時，由萃取 DNA 電泳發現薑黃素(Curcumin)造成人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞的死亡主要是經由細胞壞死(necrosis)，並少許經由計畫性的細胞死亡(programmed cell death, apoptosis)來進行。

在細胞週期的影響方面，據 So JB，等 2000 年發表於 Journal of Surgical Research 的論文指出，胃癌中 p27 之表現較低而 cyclin E 的表現較高¹⁰⁶。Shin JY 等 2000 年發表於 Experimental & Molecular Medicine 的論文也指出活細胞中都存在著 P27 基因表現¹⁰⁷，Aoyagi K.等於 2000 年發表於 Kurume Medical Journal.的文獻更指出 cyclin E 之過度表現 (overexpression)可當作胃癌之預後指標分子¹⁰⁸，也就是說減少 p27 表現

對有 cyclin E 過度表現之胃癌患者，是一個不好之預後¹⁰⁹。另外有文獻指出 cyclin D1 是控制從 G1 phase 到 S phase 之細胞週期之 cyclin，經研究確定在胃癌中，cyclin D1 mRNA 有過度之表現，且 cyclin D2 之表現也較高。由上述可見抗腫瘤藥物機轉之探討方面，細胞週期及 cdk-cyclin 的影響也是近日來研究的重點，所以本實驗接著考慮薑黃素是否對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 之細胞週期有無影響。我們將人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 以不同濃度的薑黃素 (Curcumin) 與不同時間處理後，再經由流式細胞計數儀 (FACS) 分析結果顯示，結果發現薑黃素 (Curcumin) 對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞週期 (cell cycle) 的效應在於減少 G₀/G₁ 期細胞比例，增加 S 期細胞比例，但是 G₂/M 期細胞比例並無變化。關於這一點發現與其它已發表之文獻薑黃素大多造成 G₂/M arrest 不同，結果的差異可能是來自不同細胞株的影響。接著再考慮細胞週期的影響是否與 cyclin-kinase 有關，結果我們在薑黃素 (Curcumin) 對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 之 Cyclin-Kinase 的影響方面發現了薑黃素對於 CDK2 的提升具有統計上的意義，但是 CDK1 的提升並不具有統計上的意義，由於 CDK2 及 CDK1 各為 G₀/G₁ 期進入 S 期及 S 期進入 G₂/M 期的關鍵 kinase，這一點也符合了我們在細胞週期流式細胞計數儀 (FACS) 的發現也就是薑黃素 (Curcumin) 對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞週期 (cell cycle) 的效應在於減少 G₀/G₁ 期細胞比例，增加 S 期細胞比例，但是 G₂/M 期細胞比例並無變化。最後我們嘗試了解薑黃素 (Curcumin) 對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 之基因表現的影響，除了我們發現 AANAT 有意義的表現抑制 (down regulation) 以外，其結果還需要進一步之分析來確認薑黃素與人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 之基因表現間的關聯。

第六章 結論

本實驗發現加入不同濃度的薑黃素，可降低人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞中 NAT 的活性，且濃度愈高，培養時間愈久，NAT 活性降低就愈明顯。同時據實驗結果顯示，薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株

(COLO 205)之 NAT 酵素活性的抑制，是屬於 Uncompetitive inhibitor，並且薑黃素同時可以減少乙醯化的代謝產物的產生。

接著我們檢測不同濃度的薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株之 DNA-Adduct 的作用，結果顯示，在濃度越高的 AF，薑黃素對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)產生 DNA-AF-ADDUCT 的抑制就愈強。

在利用 RT-PCR 方法來檢測薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞是否有影響 NAT1 基因(NAT mRNA)的表現方面，我們發現高濃度的薑黃素(10 , 25 , 50 μ M)對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205)NAT1 基因(NAT mRNA)有明顯的抑制作用。

從不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)的細胞毒性效應實驗發現，濃度愈高，細胞的毒殺效果就愈強。

人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞經不同濃度的薑黃素 (Curcumin)處理後 24 及 48 小時，由萃取 DNA 電泳發現 DNA 有典型裂解的現象出現(Smear)，並且有少量固定 base-pair DNA 出現，所以薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞死亡效應，主要是經由細胞毒殺效應，並少許經由計畫性的細胞死亡來進行。

另外不同濃度的薑黃素(Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞型態(cell morphology)的效應方面。結果發現濃度愈高，細胞型態改變愈明顯，被破壞的細胞數亦顯著增加。

接著考慮不同濃度的薑黃素 (Curcumin)對人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞週期 (cell cycle)的影響方面，我們發現薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞週期由 G_0/G_1 期進入 S 期有明顯的提升作用，而且濃度越高，提升作用越明顯。

我們進一步探討薑黃素(Curcumin)是否對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 之 Cyclin-Kinase 是否有影響，結果顯示不同濃度的薑黃素對於 CYCLIN-E, CDK1, CDK2 都有提升的作用，但是 CYCLIN-E, CDK1 的提升並無統計上的意義，而 CDK2 的提升有統計上的意義。這一點也符合我們在細胞週期方面的發現，也就是薑黃素對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 細胞週期由 G_0/G_1 期進入 S 期有明顯的提升作用，而且濃度越高，提升作用越明顯。

最後我們探討我們嘗試探討了薑黃素(Curcumin)對於人類大腸腫瘤細胞株 (COLO 205) 是否有任何之基因表現的影響。除了我們發現了 AANAT 有意義的表現抑制(down regulation)以外，需要進一步之分析來確認薑黃素與人類大腸腫瘤細胞株(COLO 205)之基因表現間的關聯。

圖表

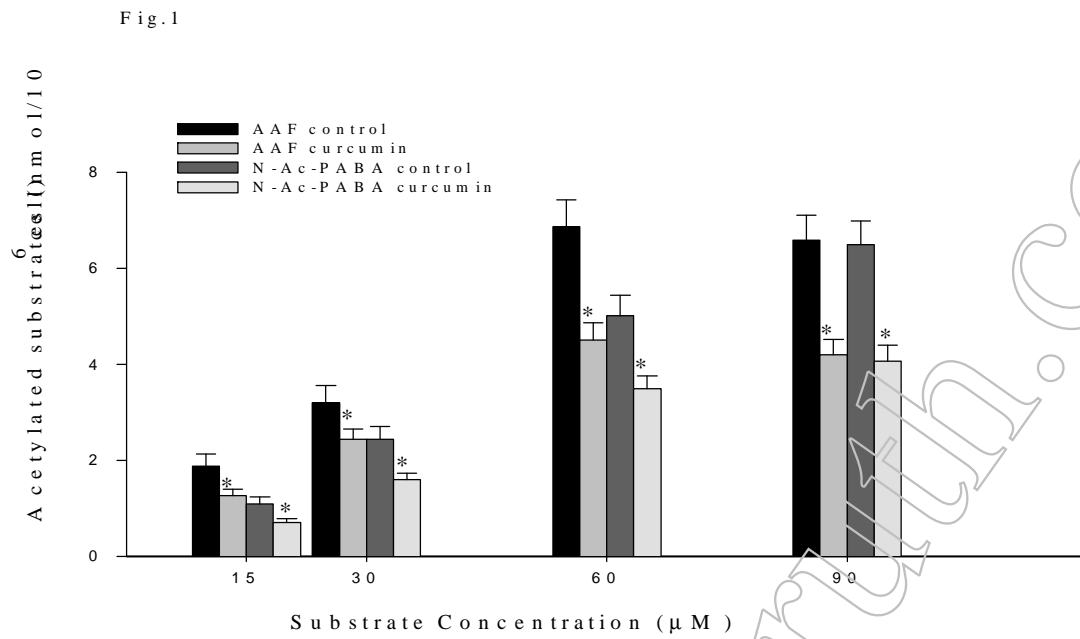


Fig.1 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cell- different substrate concentration.

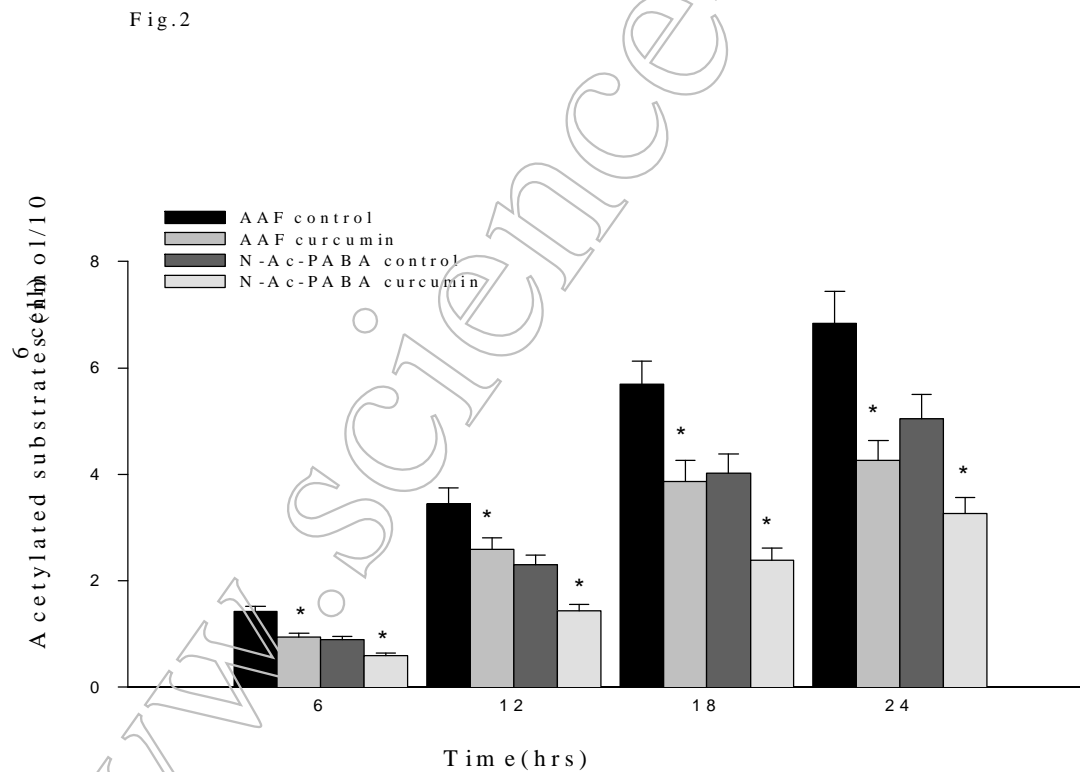


Fig.2 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cell - different incubation time.

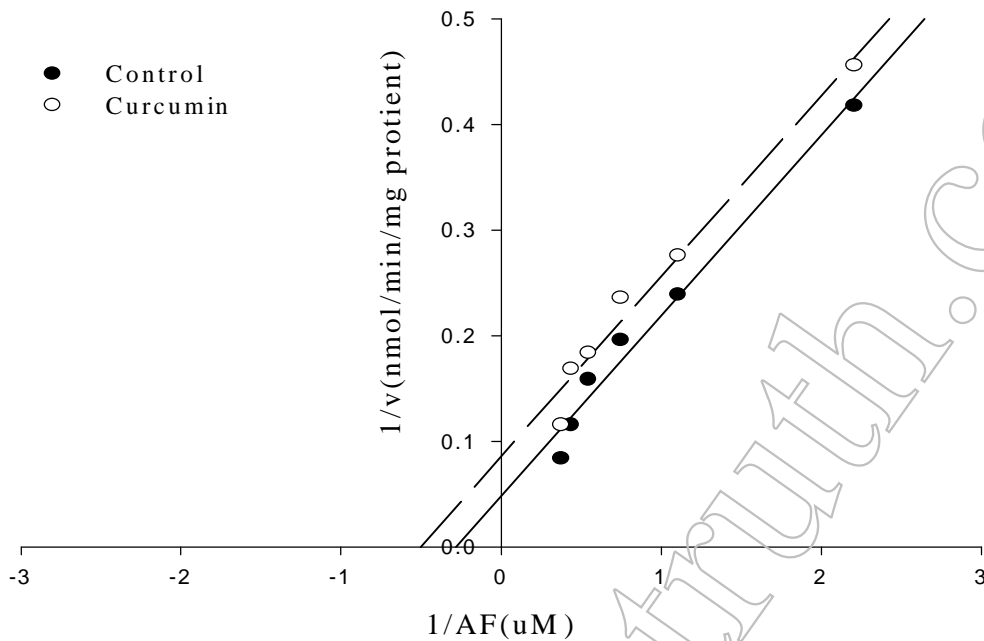


Fig.3-1 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cell - k_m and v_{max} analysis, AF as substrate.

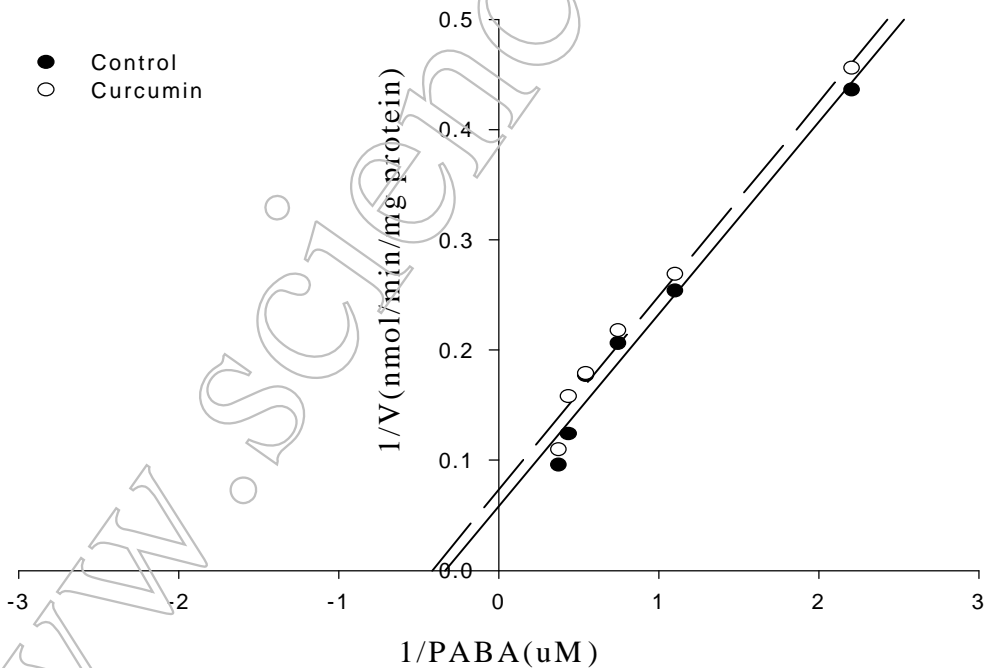


Fig.3-2 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cell - k_m and v_{max} analysis ,PABA as substrate.

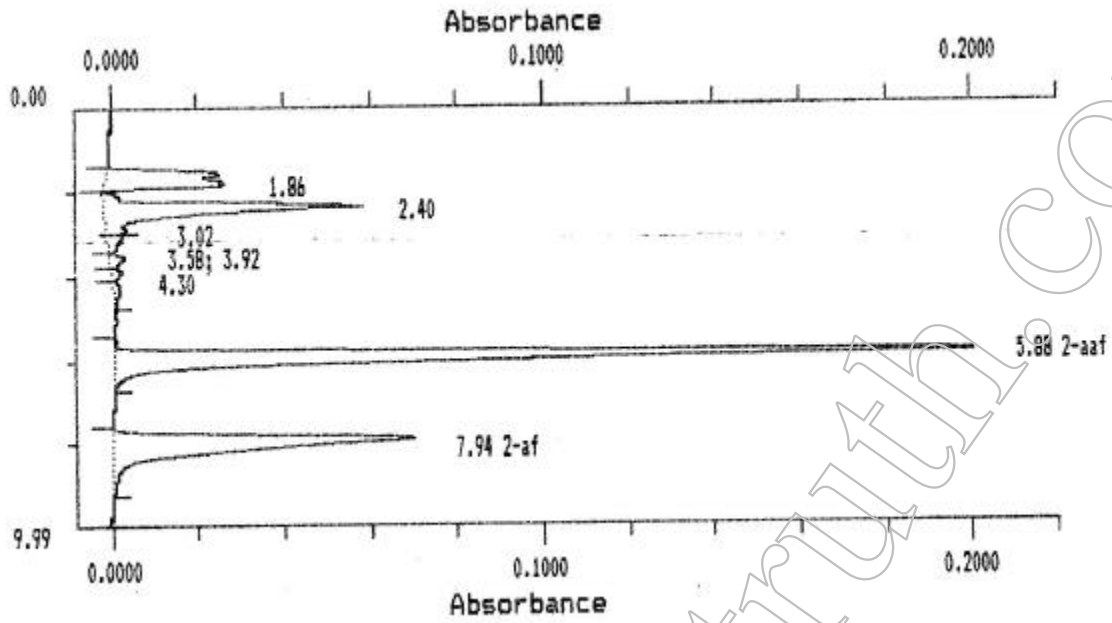


Fig.4-1 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT metabolites.control, treatment for 18h.

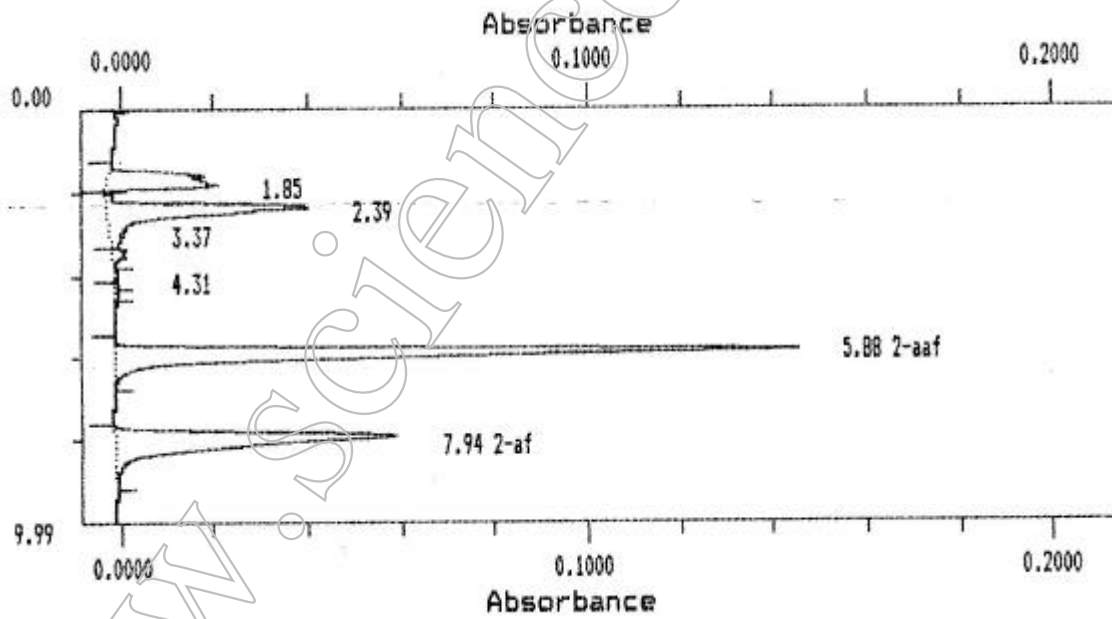


Fig.4-2 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT metabolites 0.1µm curcumin , treatment for 18h.

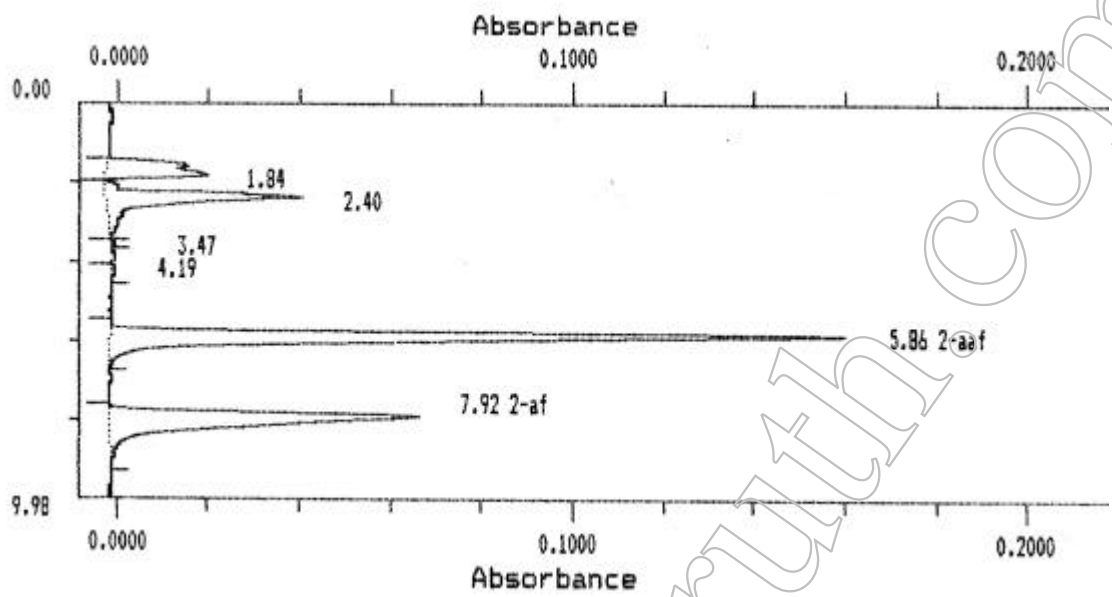


Fig.4-3 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT metabolites. 0.5 μ m curcumin, treatment for 18h.

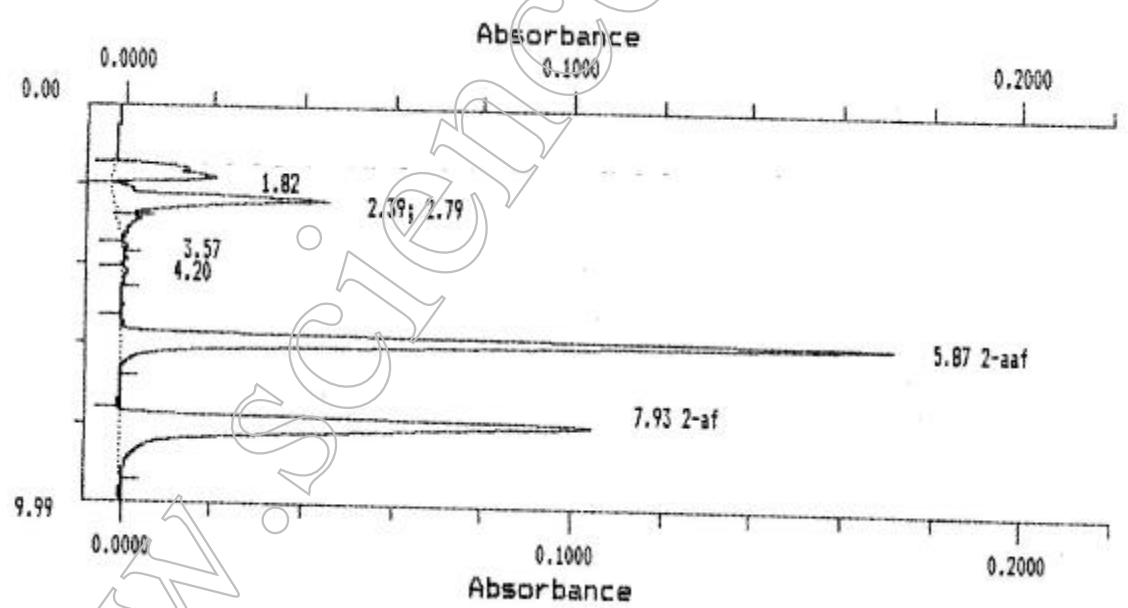


Fig.4-4 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT metabolites. 1.0 μ m curcumin, treatment for 18h.

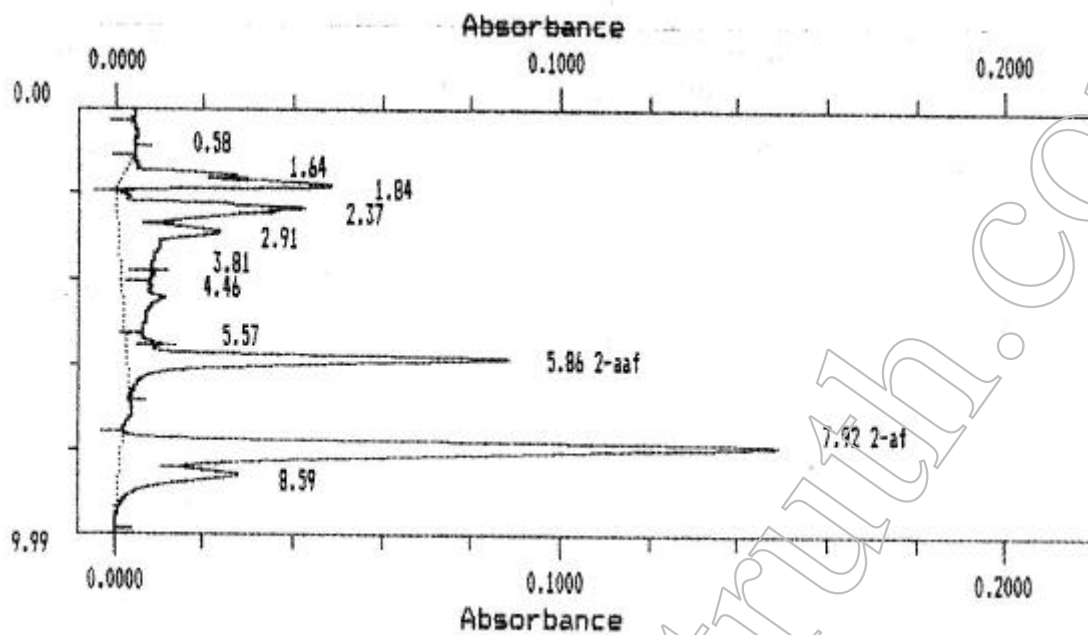


Fig.4-5 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT metabolites. 2.5µm curcumin, treatment for 18h.

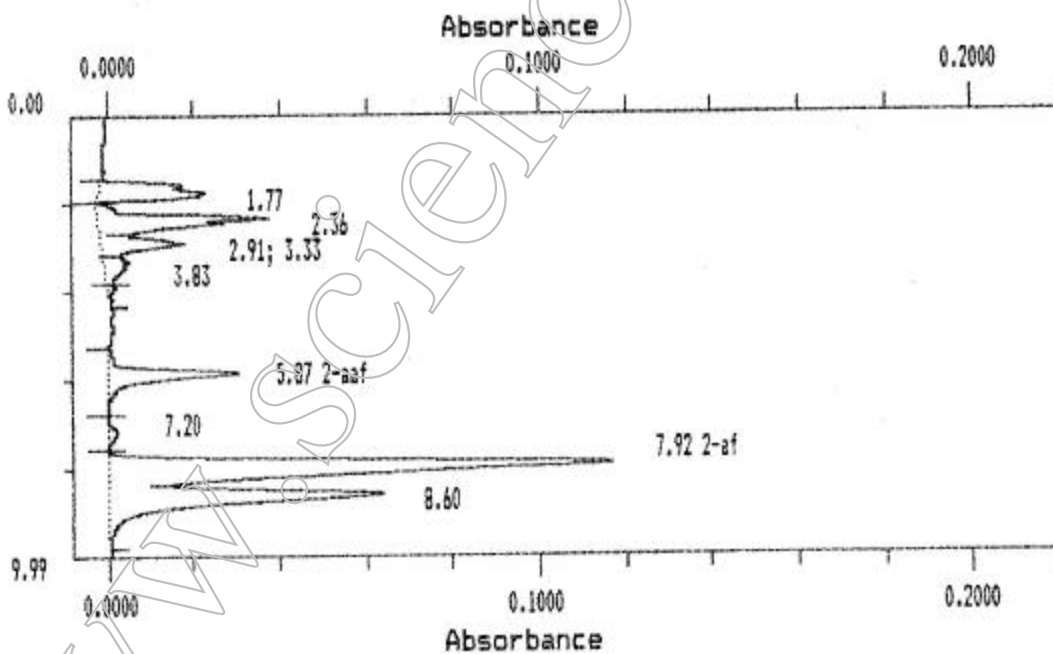


Fig.4-6 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT metabolites. 5.0µm curcumin, treatment for 18h.

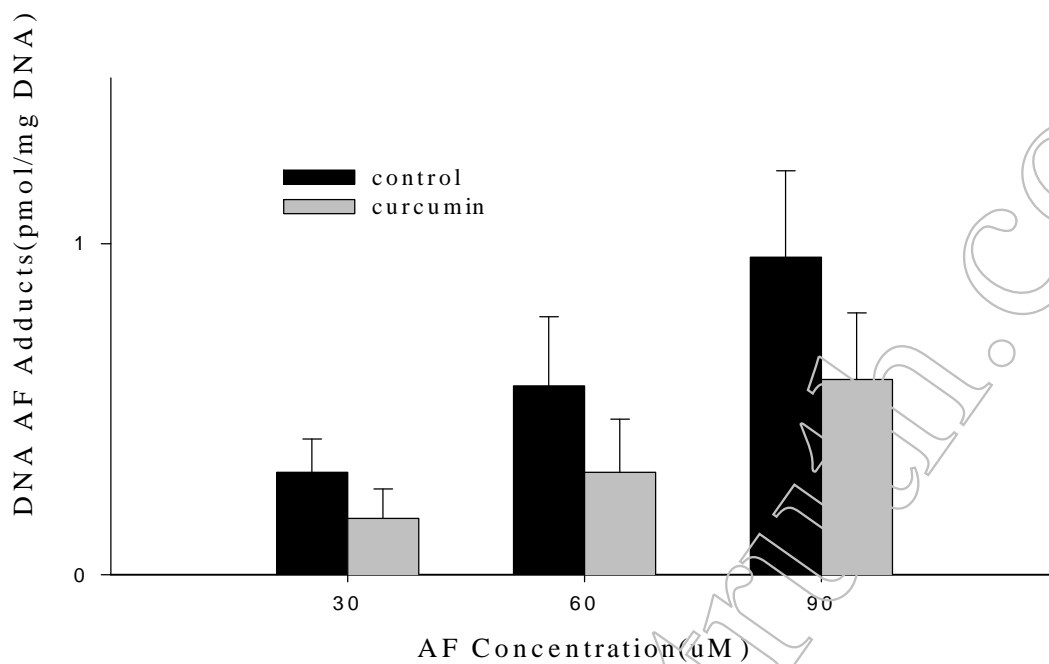


Fig.5 Effects of Curcumin on the formation of DNA-AF Adduct

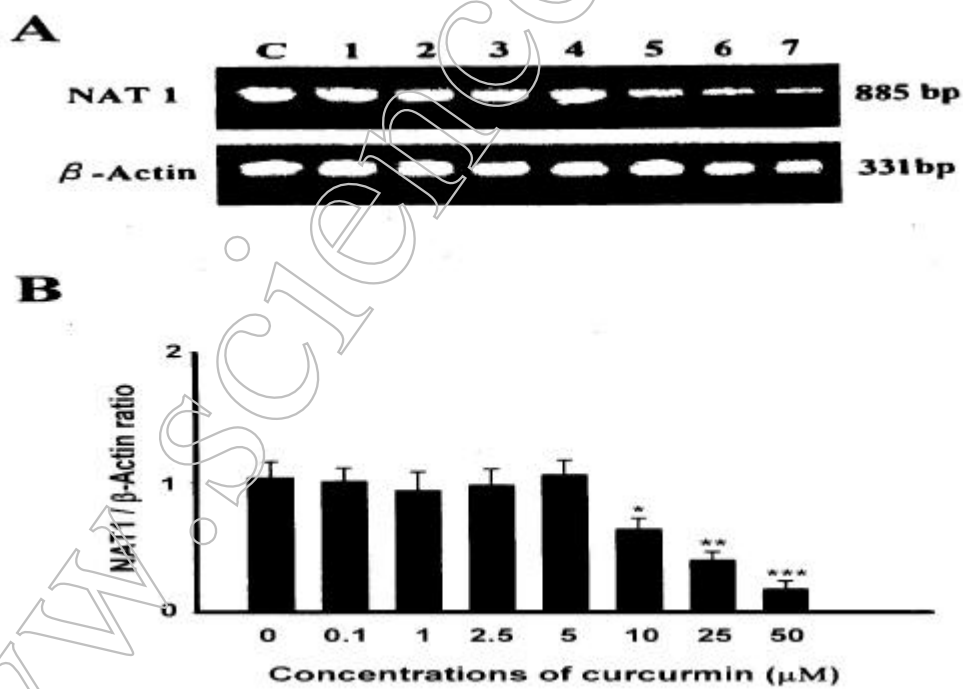
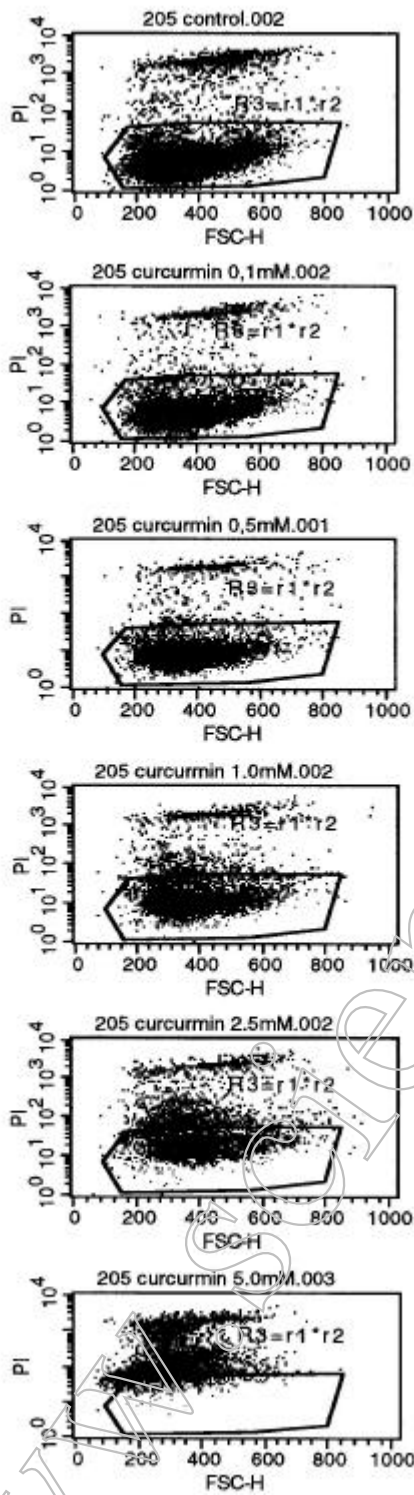


Fig.6 Effects of Curcumin on NAT1 mRNA expression



Collected cell No.	Viability	Cytotoxicity
13447	86.03%	13.97%
7143	87.22%	12.78%
5576	87.47%	12.53%
5093	81.23%	18.77%
3503	64.16%	35.84%
15.83	15.83%	84.17%

Fig 7-1 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell cytotoxicity effect, Viable cells percentage on 48 hrs

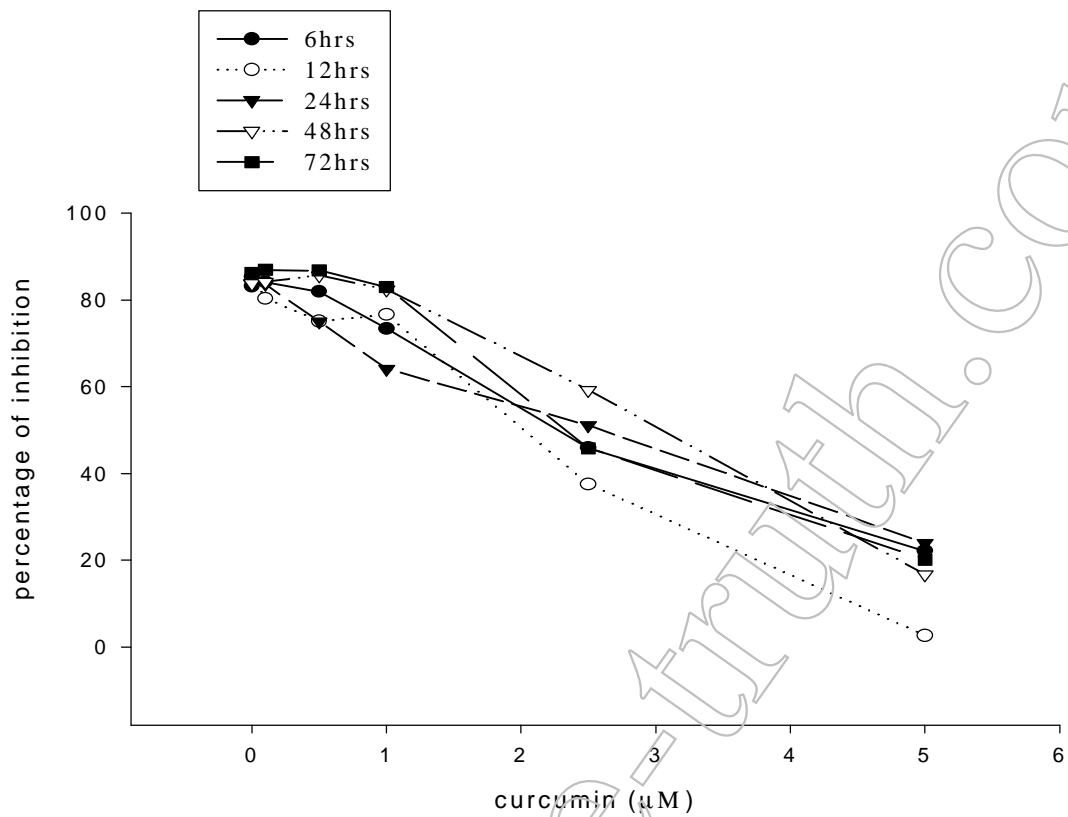
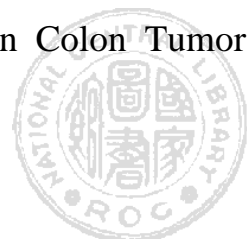


Fig.7-2 Effects of Curcumin on viability of Human Colon Tumor Cells



Fig.8-1 Effects of Curcumin on DNA contents of Human Colon Tumor Cells for 12 hrs treatment



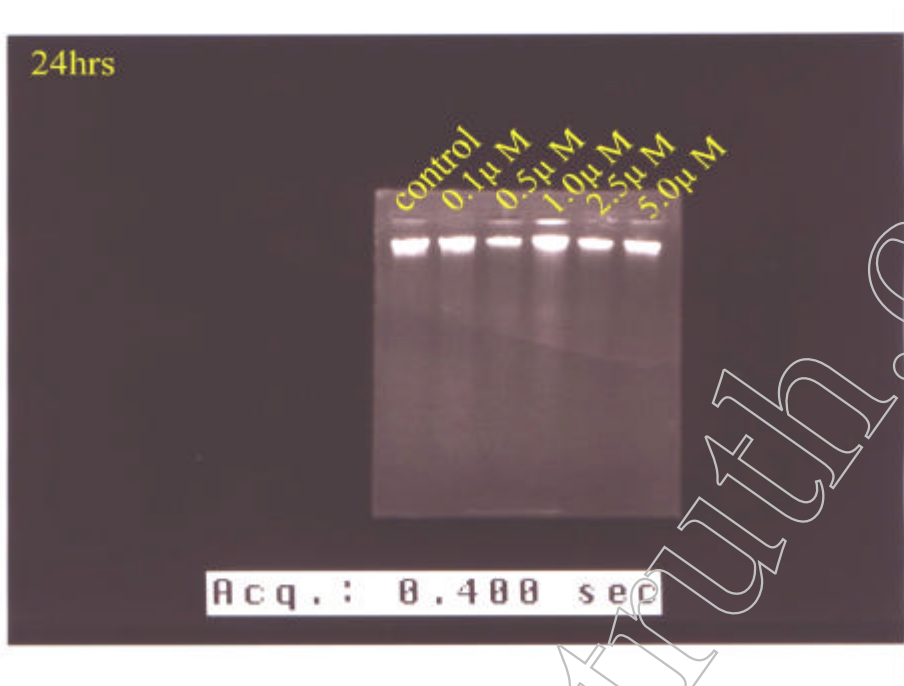


Fig.8-2 Effects of Curcumin on DNA contents of Human Colon Tumor Cells for 24 hrs treatment

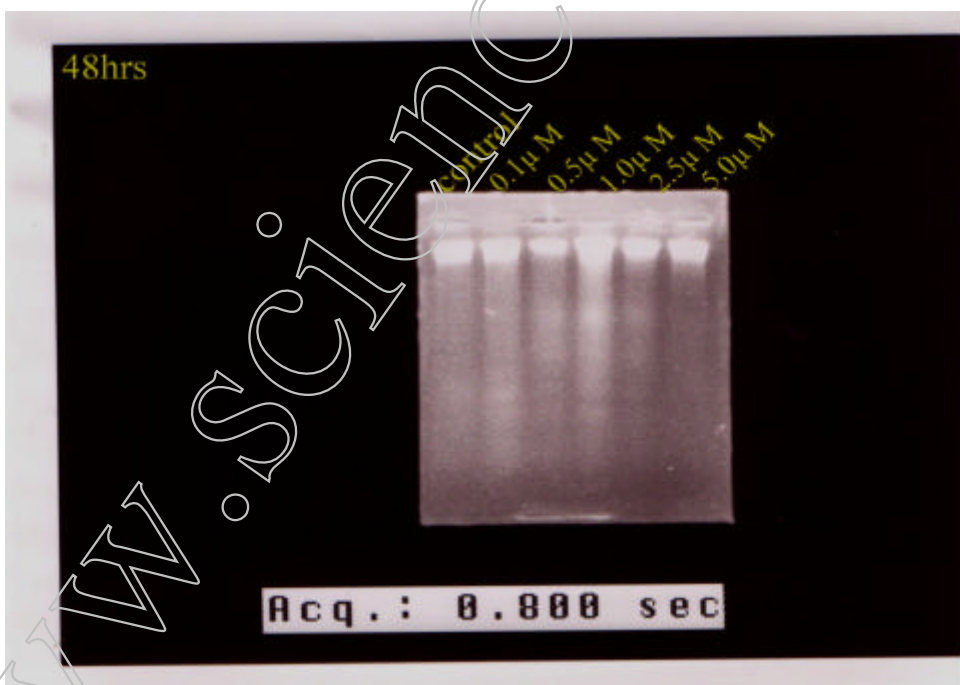


Fig.8-3 Effects of Curcumin on DNA contents of Human Colon Tumor Cells for 48 hrs treatment

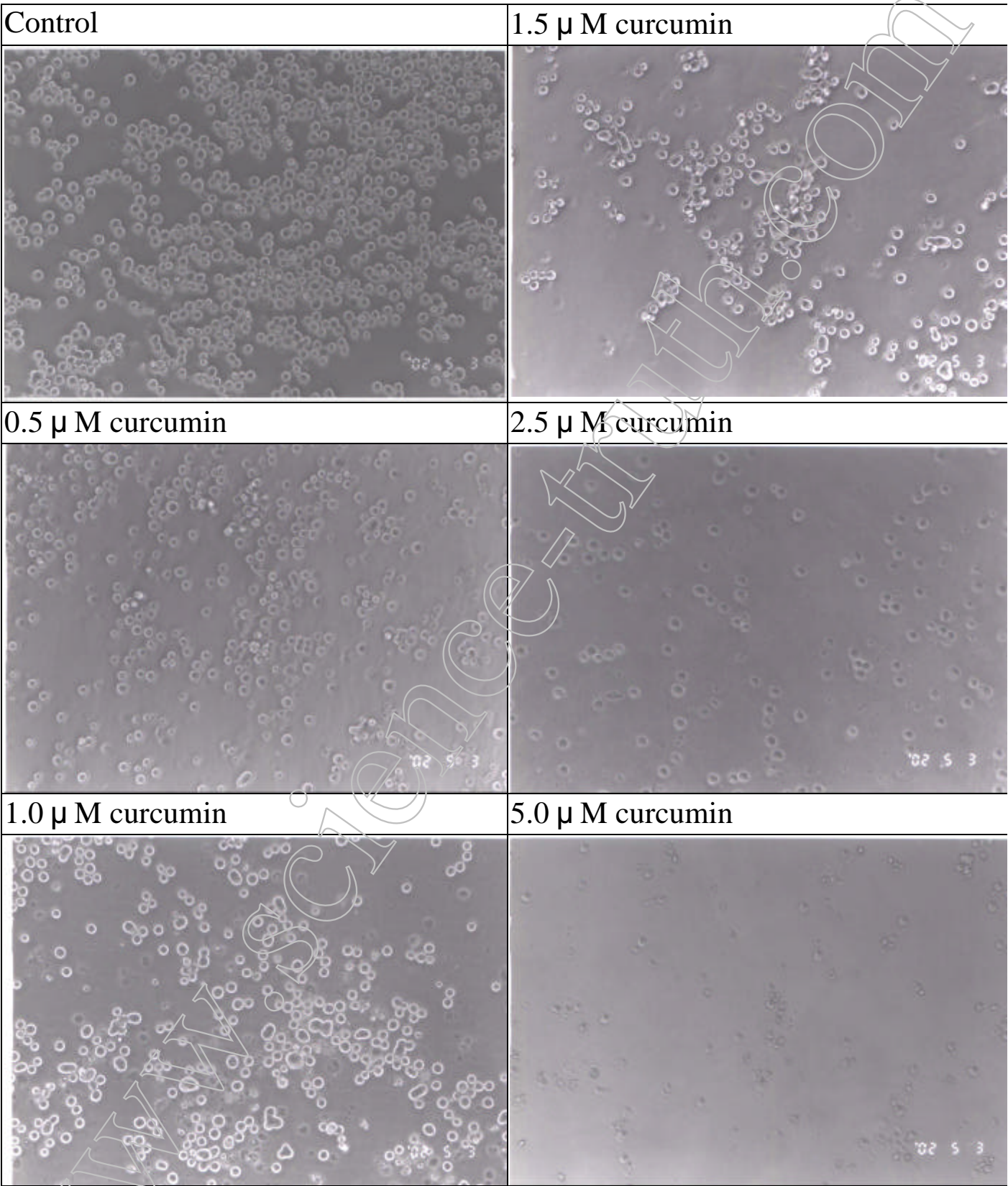


Fig.9 Effects of Curcumin on cell's morphology of Human Colon Tumor Cells

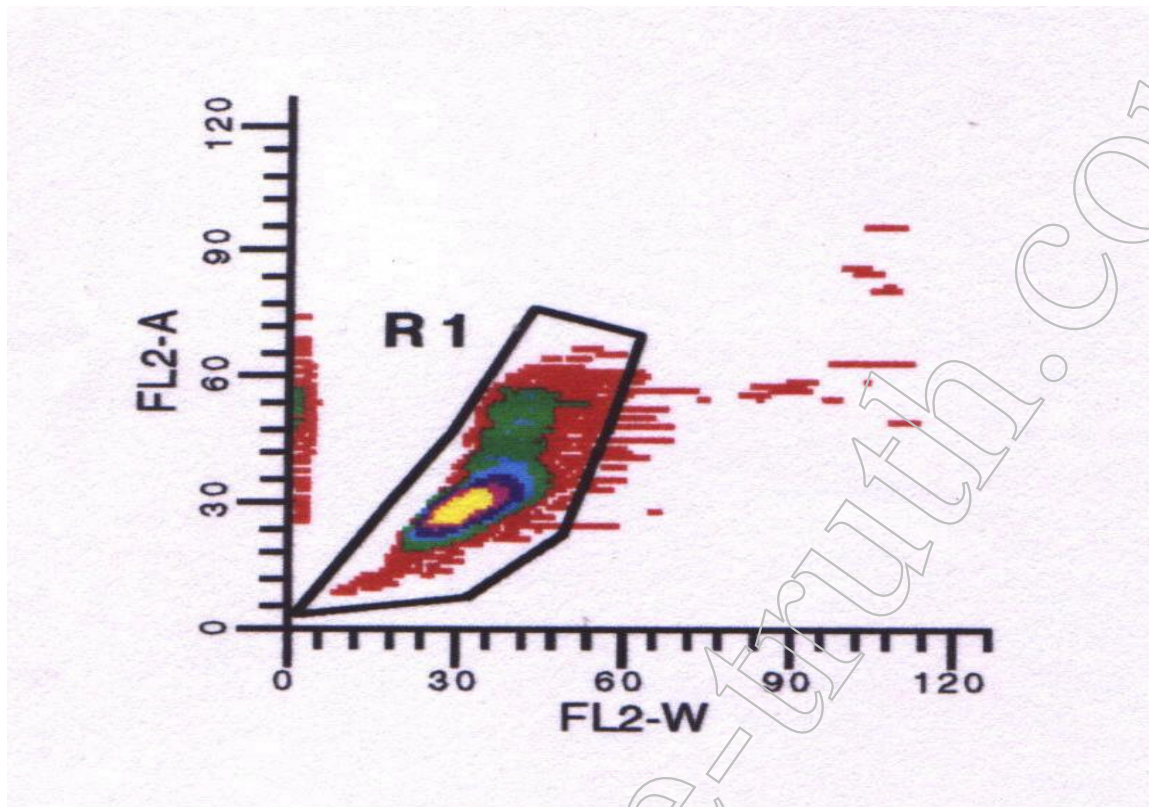


Fig.10-1 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell, the cell cycle on 48 hrs.

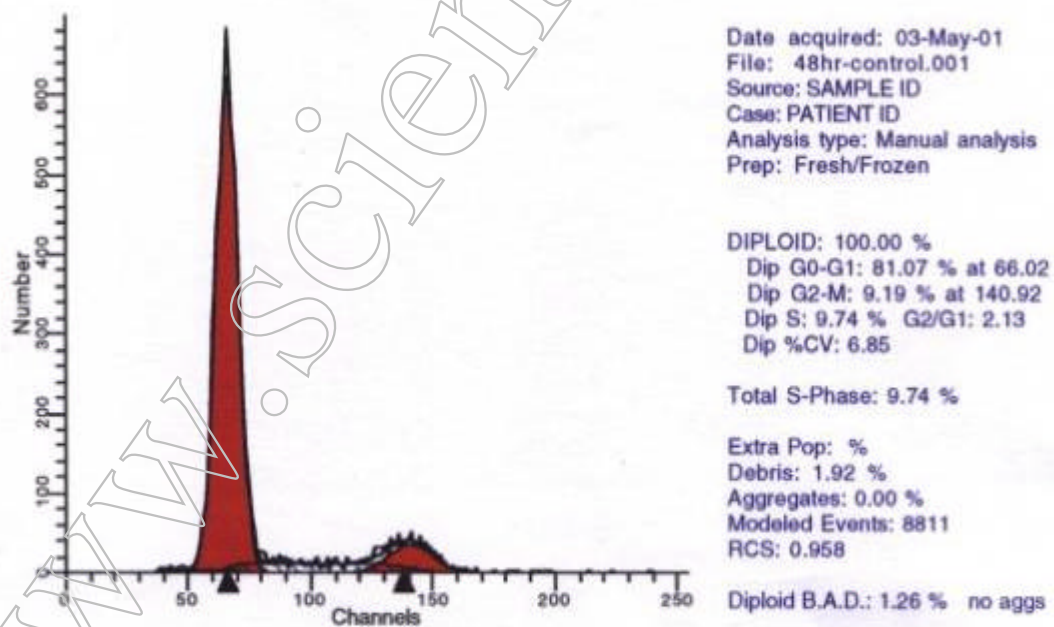


Fig.10-2 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell, the cell cycle 48 hrs, (control).

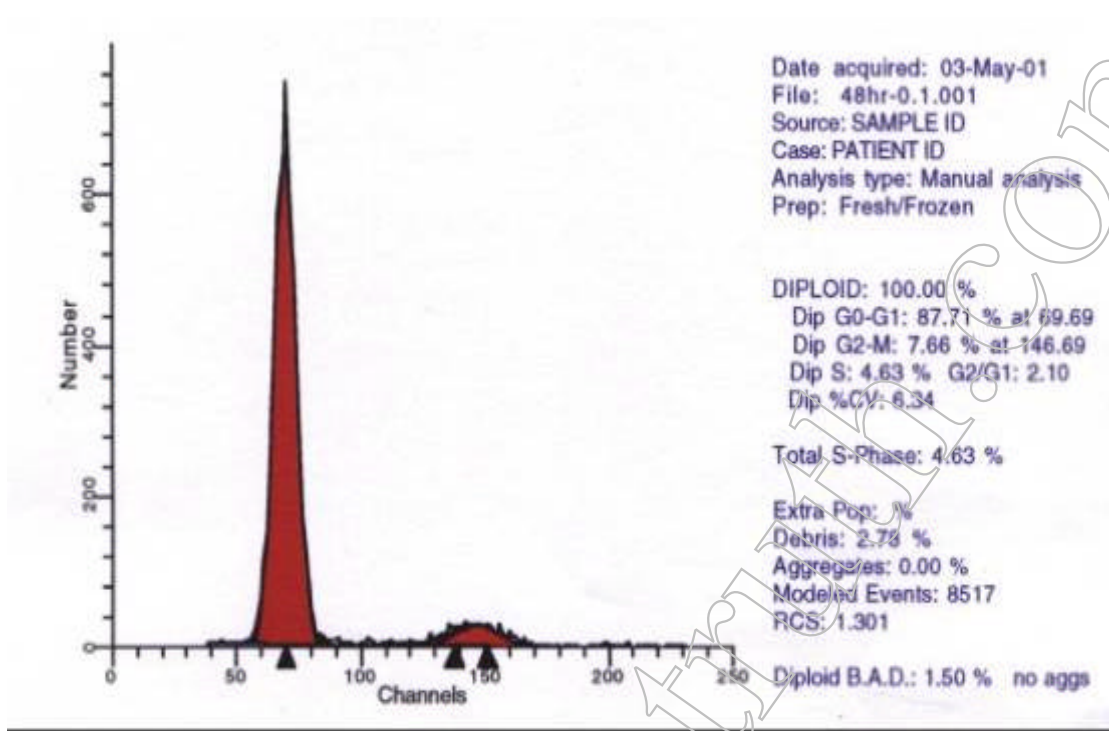


Fig.10-3 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell, the cell cycle 48 hrs, (0.1 μ M of curcumin).

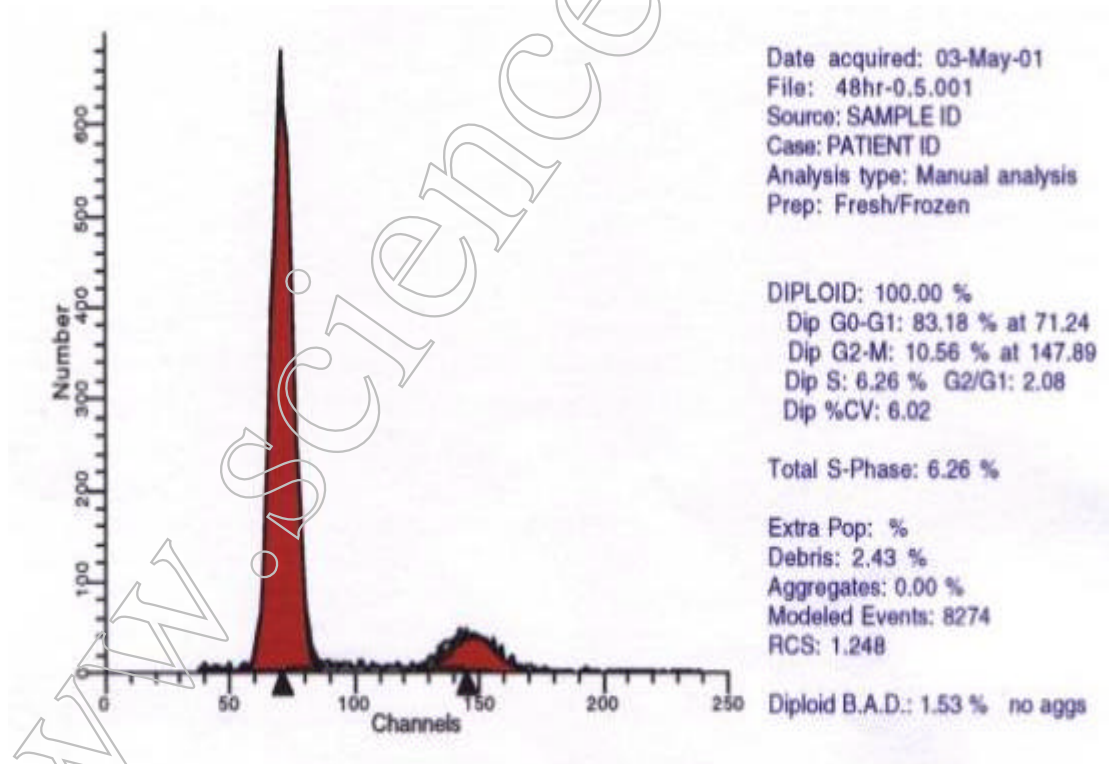


Fig.10-4 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell, the cell cycle 48 hrs,(0.5 μ M of curcumin).

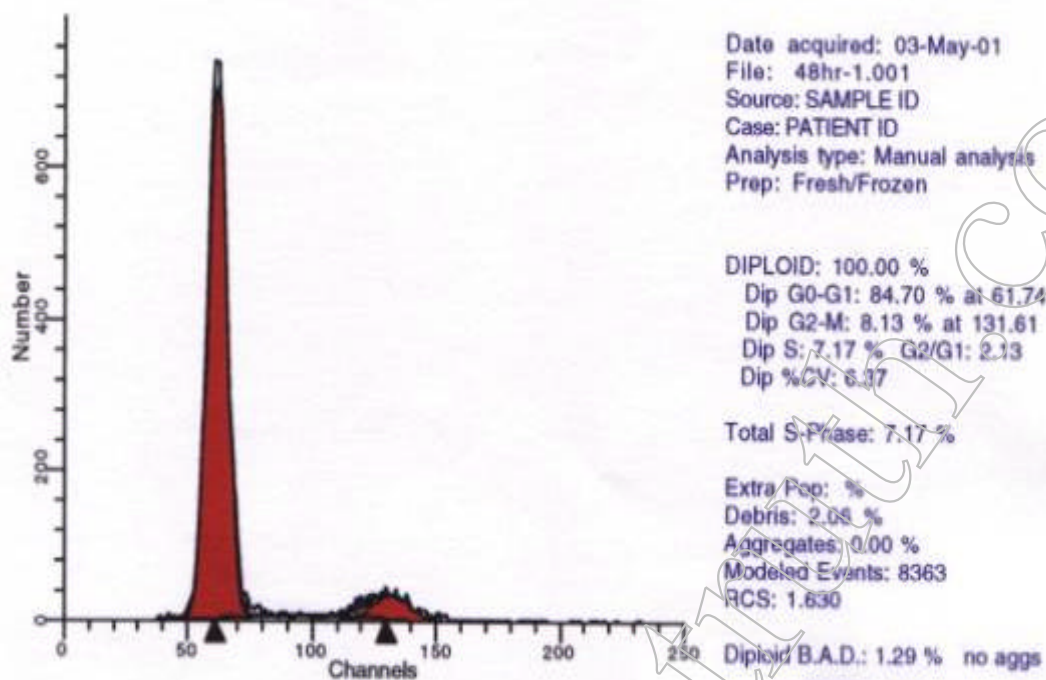


Fig.10-5 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell, the cell cycle 48 hrs , (1.0 μ M of curcumin) .

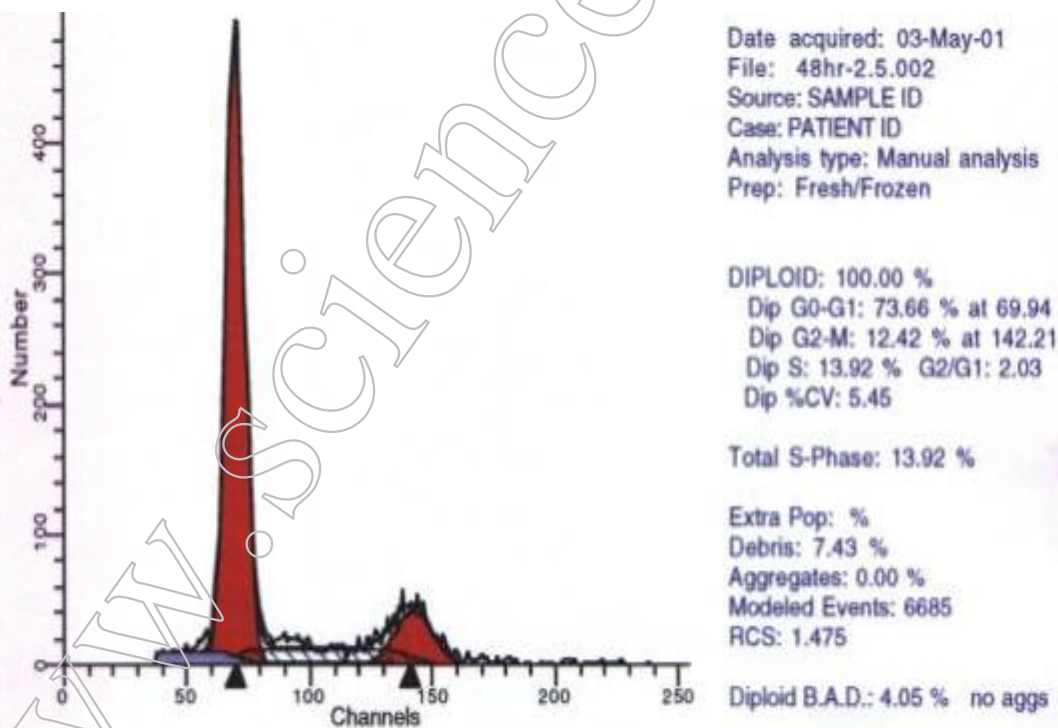


Fig.10-6 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell, the cell cycle 48 hrs, (2.5 μ M of curcumin).

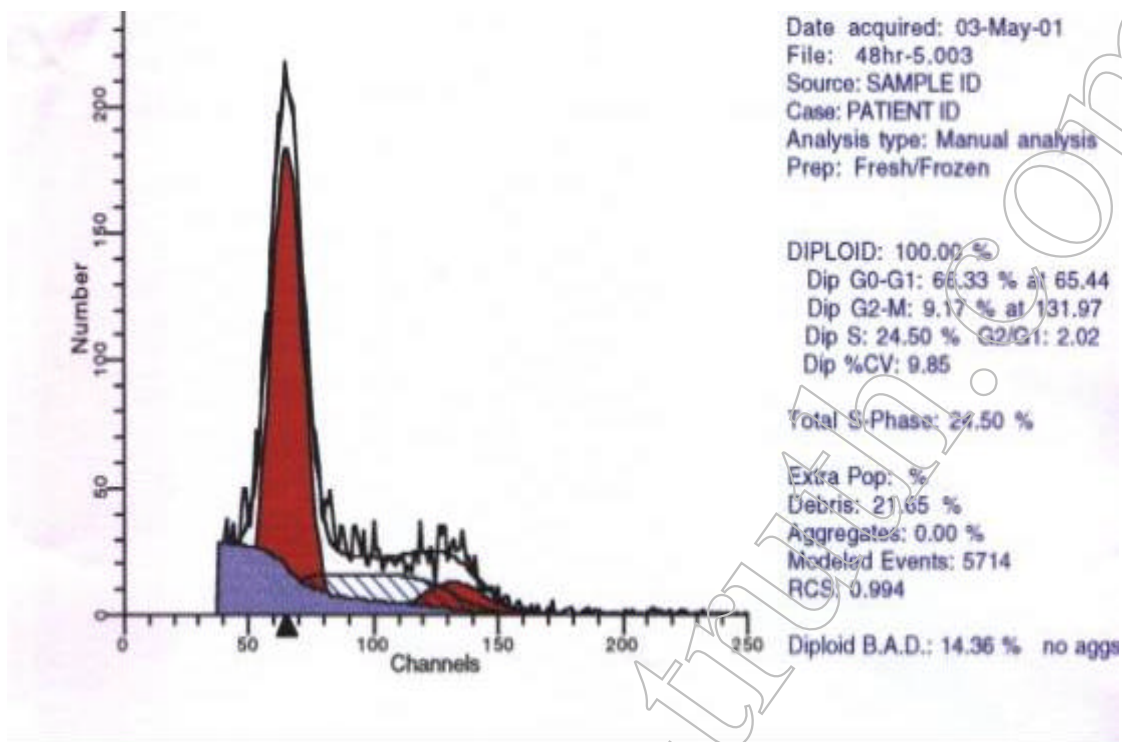


Fig.10-7 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell, the cell cycle 48 hrs, (5.0 μ M of curcumin).

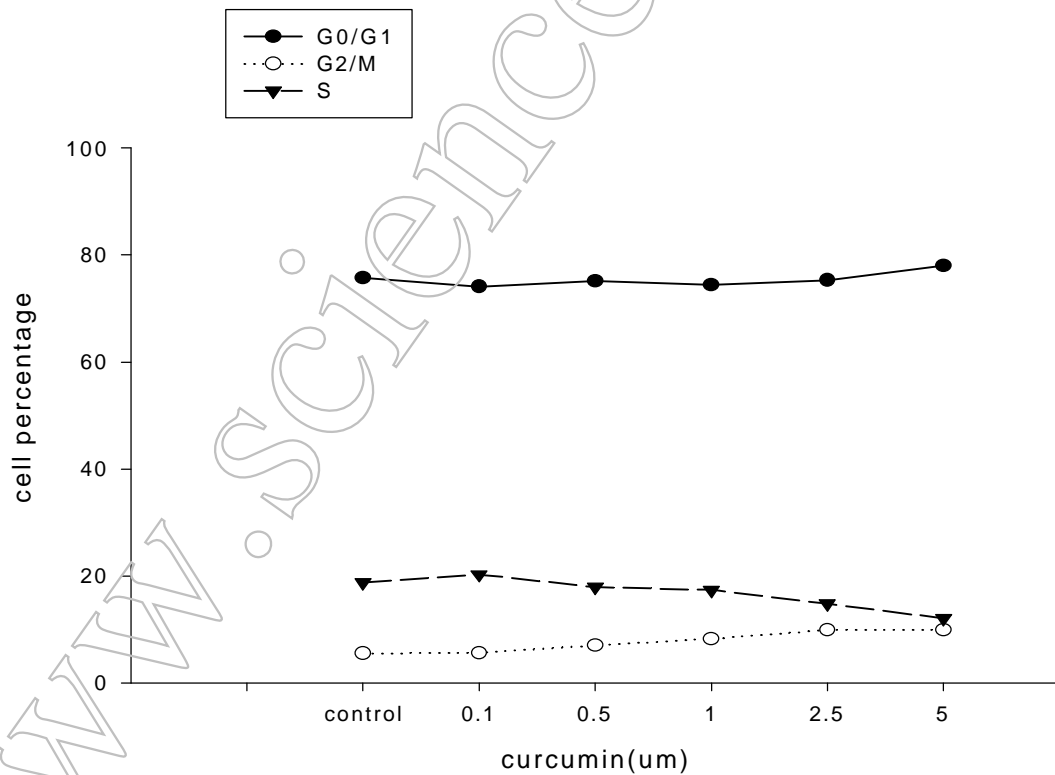


Fig.11-1 Effects of Curcumin on cell cycle of Human Colon Tumor Cells for 6 hrs treatment.

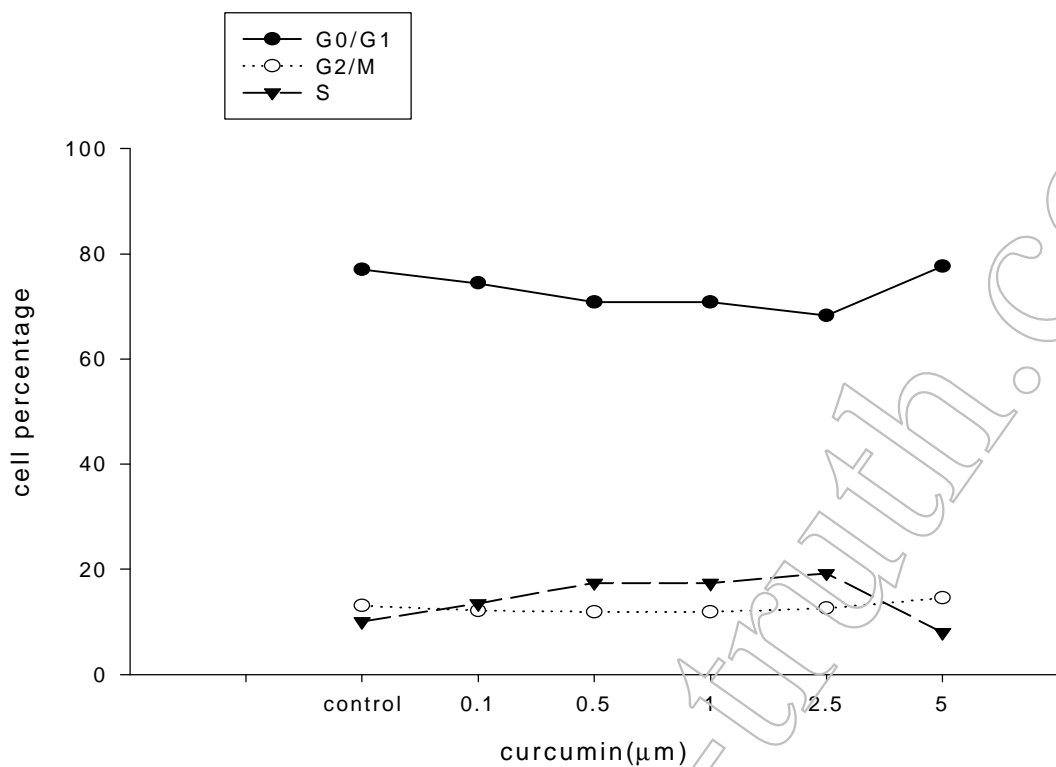


Fig.11-2 Effects of Curcumin on cell cycle of Human Colon Tumor Cells for 24 hrs treatment.

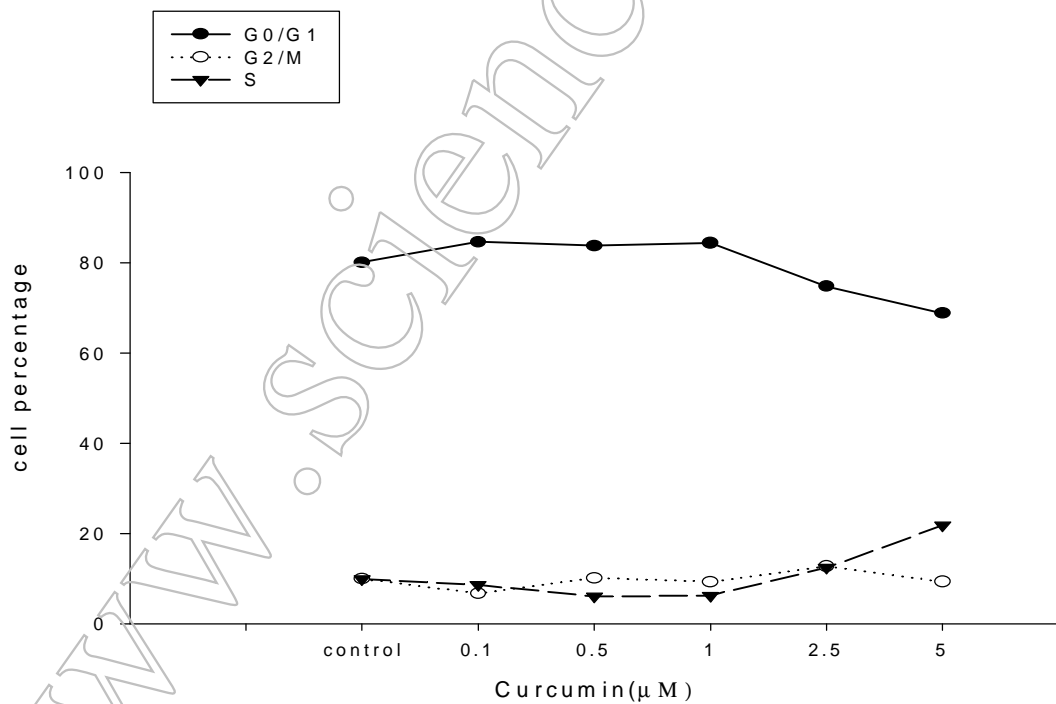


Fig.11-3 Effects of Curcumin on cell cycle of Human Colon Tumor Cells for 48 hrs treatment.

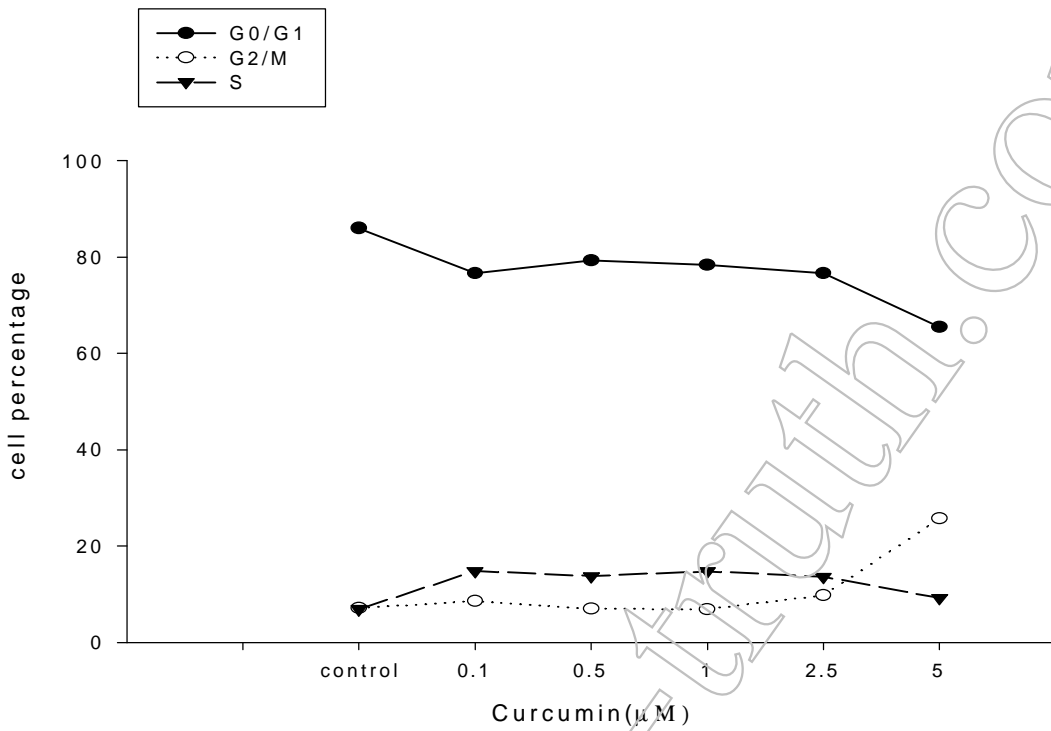


Fig.11-4 Effects of Curcumin on cell cycle of Human Colon Tumor Cells for 72 hrs treatment.

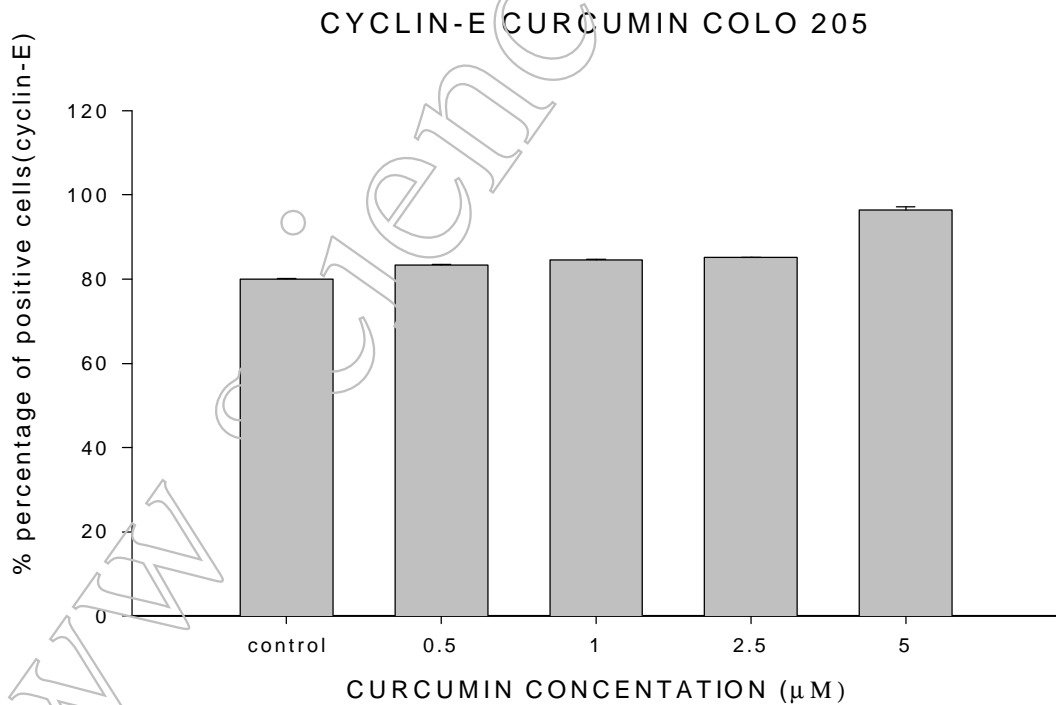


Fig.12-1 Effects of Curcumin on Cyclin-Kinase of Human Colon Tumor Cells , CYCLIN-E.

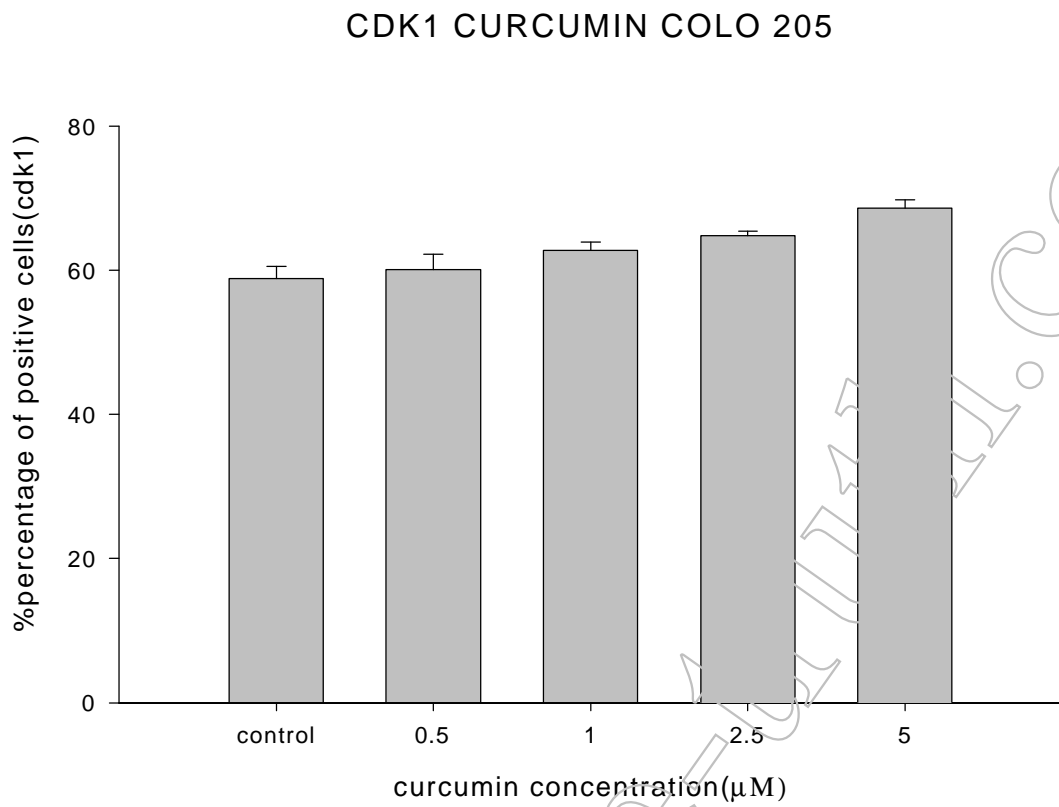


Fig.12-2 Effects of Curcumin on Cyclin-Kinase of Human Colon Tumor Cells , CDK1.

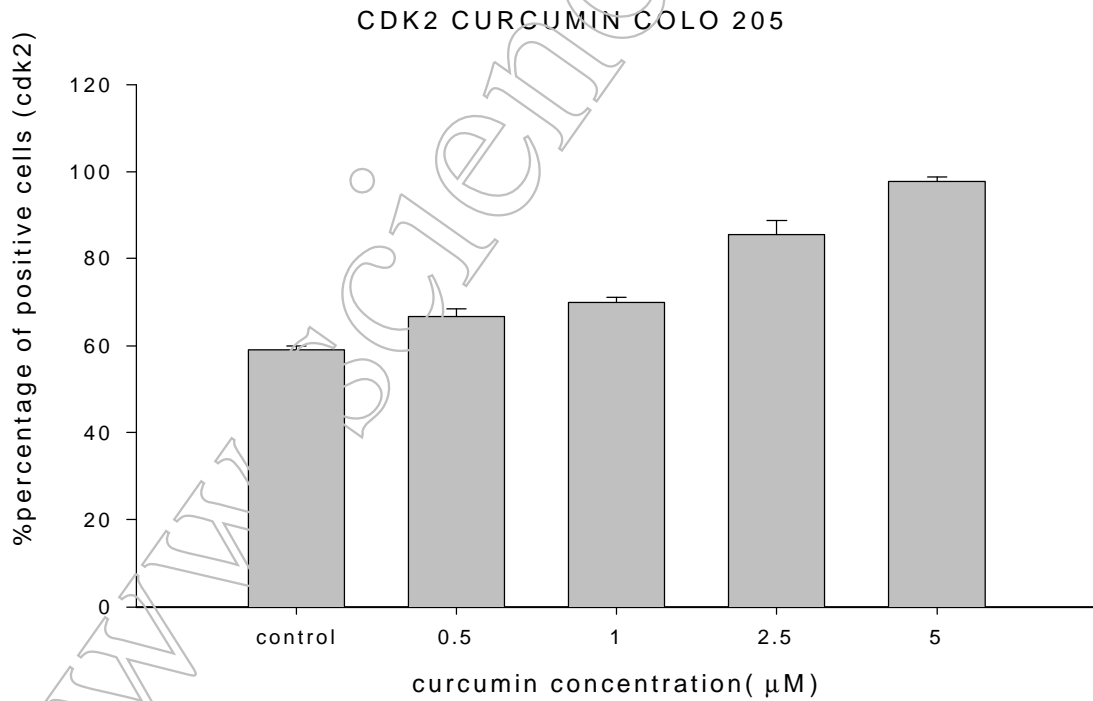
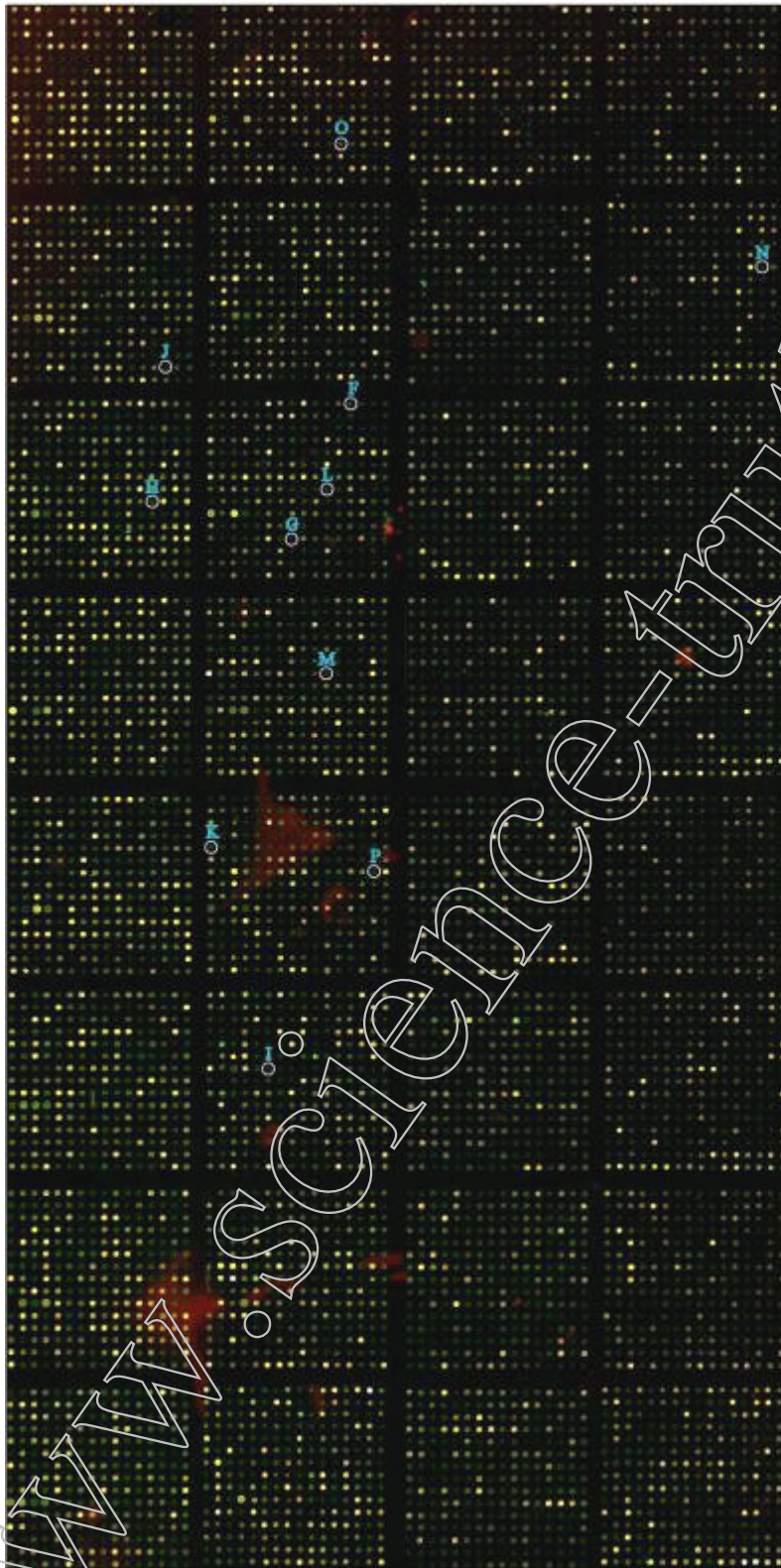


Fig.12-3 Effects of Curcumin on Cyclin-Kinase of Human Colon Tumor Cells , CDK2.

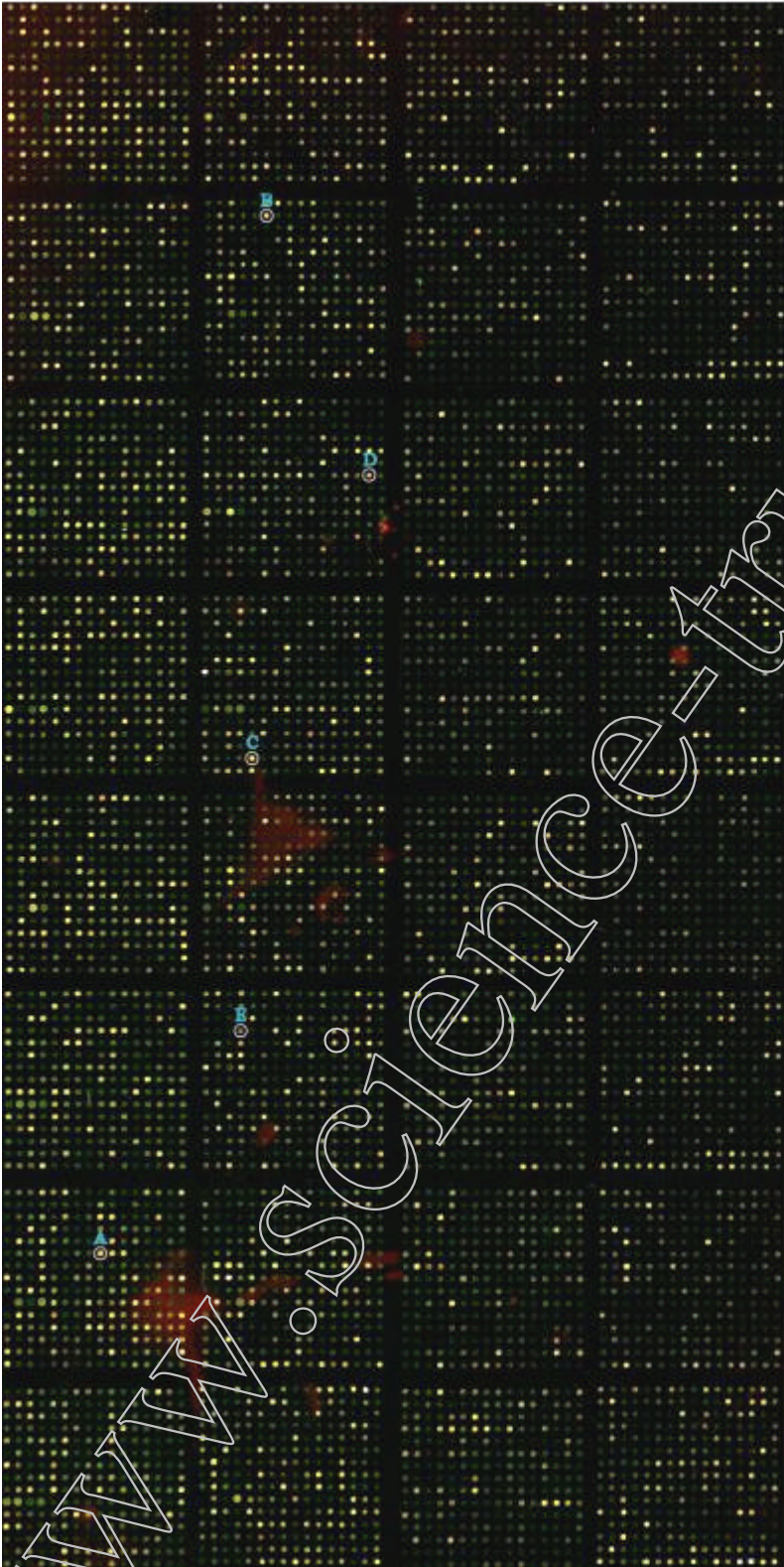
Apoptosis Down Regulation



- F. **MAX**
Mas protein
- G. **STAT2**
Homo sapiens mRNA for STAT induced STAT inhibitor-2, complete cds
- H.
Human guanine nucleotide exchange factor mRNA, complete cds
- I. **RELB**
Transcription Factor Relb
- J. **PPM1B**
Homo sapiens protein phosphatase Wip1 mRNA, complete cds
- K. **MPO**
Myeloperoxidase
- L.
Human Epstein-Barr virus-induced protein mRNA, complete cds
- M. **FOXO3A**
Homo sapiens forkhead protein (FKHRL1) mRNA, complete cds
- N. **EIF4G2**
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2
- O. **TIP30**
Homo sapiens CC3 (CC3) mRNA, complete cds
- P. **PSMA6**
Proteasome Iota Chain

Fig.13-1 Down-Regulation of apoptosis-related genes by curcumin

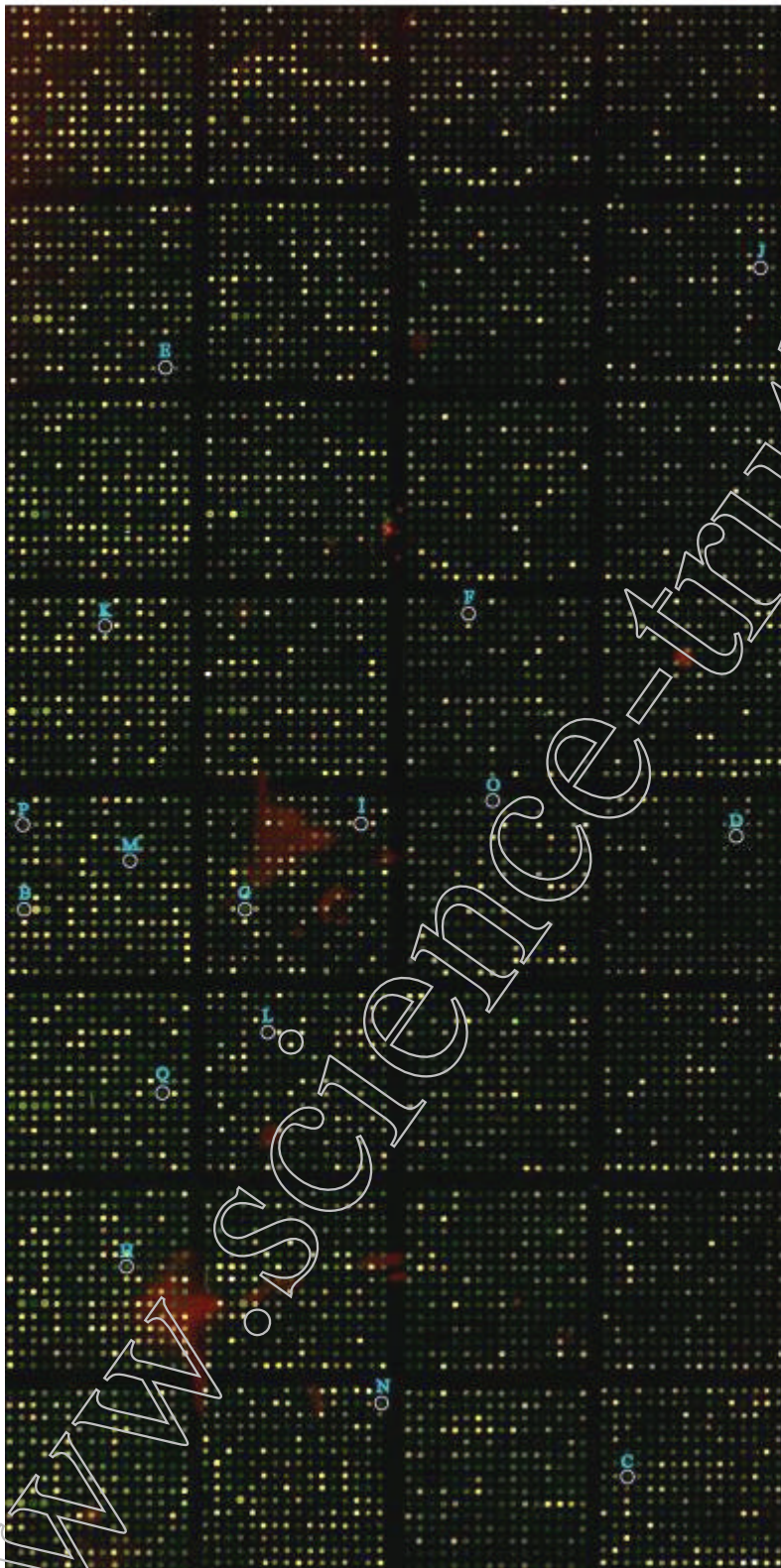
Apoptosis Up Regulation



- A. **BMP4**
Bone morphogenetic protein 4
- B. **PSMB6**
Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6
- C. **LGALS4**
Human galectin-4 (GAL4) mRNA, complete cds
- D. **PSMB10**
Proteasome Component Mecl-1 Precursor
- E. **HD**
Huntingtin (Huntington disease)

Fig.13-2 Up-Regulation of apoptosis-related genes by curcumin.

Cell Cycle Down Regulation



- B - MTCPI**
H.sapiens MTCPI gene, exons 2A to 7 (and joined mRNA)
- C - CCNE2**
Cyclin E2
- D - CDC42**
cell division cycle 42 (GTP-binding protein, 25kD)
- E - PPM1D**
Homo sapiens protein phosphatase Wip1 mRNA, complete cds
- F -**
Human Bcl2, p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2) mRNA, complete cds
- G - MAD2L1**
Homo sapiens mitotic feedback control protein Madp2 homolog mRNA, complete cds
- H - HEC**
Homo sapiens retinoblastoma-associated protein HEC mRNA, complete cds
- I - LTBP2**
Latent transforming growth factor beta binding protein 2
- J - EIF4G2**
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2
- K - FACC/FANCC**
Fanconi anemia complementation group C
- L - GAS1**
Growth arrest-specific 1
- M - BCL3**
B-cell ClI/lymphoma 3
- N - ZNF35**
Zinc finger protein 35 (clone HF.10)
- O - CCNT1**
Homo sapiens cyclin T mRNA, complete cds
- P - CDC27**
Cell division cycle 27
- Q -**
Human p300/CBP-associated factor (P/CAF) mRNA, complete cds

Fig.13-3 Down-Regulation of cell cycle related genes by curcumin.

Cell Cycle Up Regulation



A. **BTG1**
B-cell translocation gene 1,
anti-proliferative

Fig.13-4 Up-Regulation of apoptosis-related genes by curcumin.

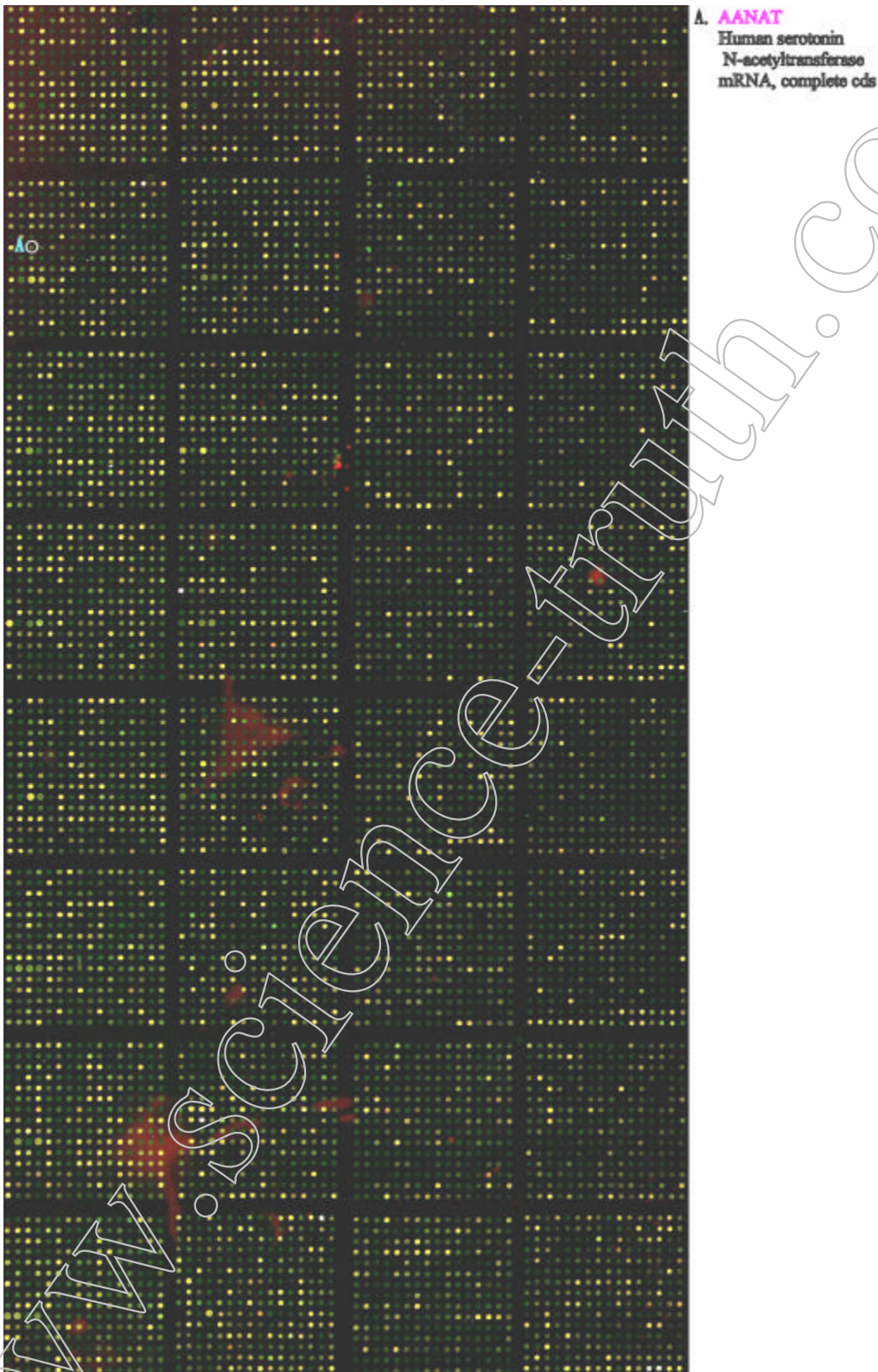


Fig.13-5 Down-Regulation of NAT genes by curcumin.

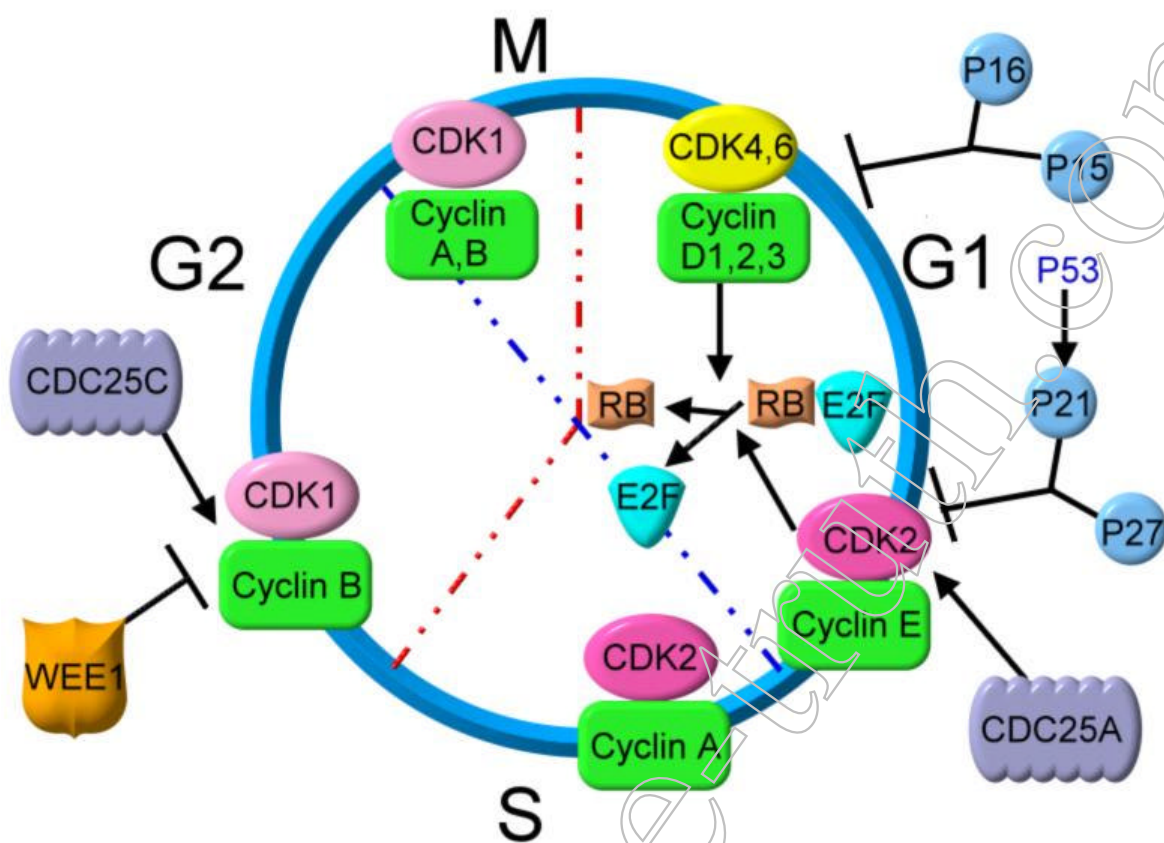


Fig.14 The Cell Cycle.

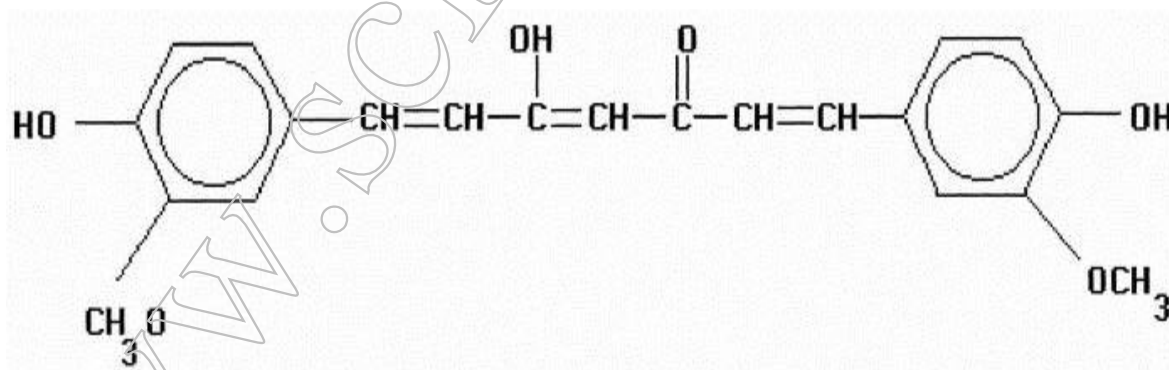


Fig.15 The Curcumin.

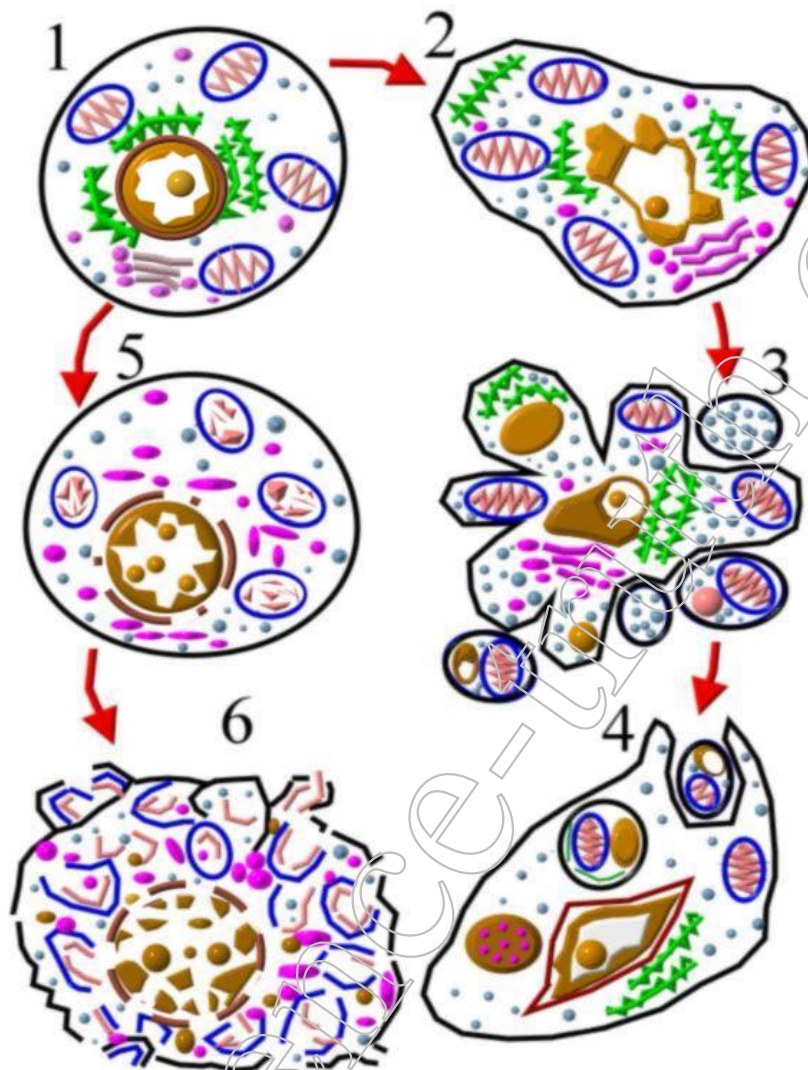


Fig.16 Apoptosis and necrosis

1. normal cell.
2. compaction and segregation of chromatin, condensation of the cytoplasm, and mild convolution of the nuclear and cellular outlines.
3. nuclear fragmentation and marked convolution of the cellular surface . produce membrane-bound apoptotic bodies.
4. lately phagocytosed and digested by adjacent cells.
5. early necrosis.
6. clumping of chromatin into ill-defined masses. swelling of organelles, flocculent densities in the matrix of mitochondria .finally, membranes break down and cell disintegrates.

Table 1 Effects of Curcumin on cytosolic NAT Activity.

Curcumin Treatment	AAF	N-Ac-PABA
Control	6.87 ± 0.56	5.01 ± 0.46
1 μ M	6.84 ± 0.55	5.04 ± 0.48
5 μ M	6.90 ± 0.59	5.10 ± 0.52
10 μ M	6.94 ± 0.62	4.91 ± 0.40
25 μ M	4.06 ± 0.44 ^{abcd}	3.86 ± 0.27 ^{abcd}
50 μ M	3.12 ± 0.27 ^{abcd}	2.90 ± 0.14 ^{abcd}

Note. Values are mean ± SD of activity(nmol/min/mg protein); n=6.

Anova analysis used for comparisons.

^aSignificantly different, at p level of 0.05, compared to control.

^bSignificantly different, at p level of 0.05, compared to 1 μ M.

^cSignificantly different, at p level of 0.05, compared to 5 μ M.

^dSignificantly different, at p level of 0.05, compared to 10 μ M.

Table 2 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cells-different substrate concentration.

substrate concentration(μ)	Acetylated substrates(nmol/10 ⁶ cells)			
	AAF		N-Ac-PABA	
	control	curcumin	control	curcumin
15	1.87 ± 0.26	*1.26 ± 0.14	1.09 ± 0.14	*0.70 ± 0.08
30	3.19 ± 0.36	*2.44 ± 0.21	2.44 ± 0.26	*1.59 ± 0.14
60	6.86 ± 0.57	*4.50 ± 0.36	5.01 ± 0.43	*3.49 ± 0.27
90	6.58 ± 0.53	*4.20 ± 0.32	6.49 ± 0.49	*4.06 ± 0.34

Table 3 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cell - different incubation time.

Times(hrs)	Acetylated Substrates(nmol/10 ⁶ cells)			
	AAF		N-Ac-PABA	
	Control	Curcumin	control	curcumin
6	1.42 ± 0.10	*0.94 ± 0.08	0.90 ± 0.06	*0.60 ± 0.04
12	3.44 ± 0.31	*2.59 ± 0.22	2.30 ± 0.18	*1.44 ± 0.12
18	5.69 ± 0.44	*3.87 ± 0.39	4.02 ± 0.36	*2.39 ± 0.22
24	6.84 ± 0.59	*4.26 ± 0.38	5.04 ± 0.46	*3.26 ± 0.31

Table 4 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cell - k_m and v_{max} analysis, AF as substrate.

1/AF (μM)	1/V(nmol/min/mg protein)	
	control	curcumin
0.373	0.084	0.116
0.435	0.116	0.169
0.543	0.159	0.184
0.745	0.196	0.236
1.102	0.239	0.276
2.205	0.418	0.456

Table 5 Effects of Curcumin on Human Colon Tumor Cell NAT Activity in intact cell - k_m and v_{max} analysis ,PABA as substrate.

1/PABA(μ M)	1/V(nmol/min/mg protein)	
	control	cur cumin
0.373	0.096	0.110
0.435	0.124	0.158
0.543	0.177	0.179
0.745	0.206	0.218
1.102	0.254	0.269
2.205	0.436	0.456

Table 6 Effects of Curcumin on the formation of DNA-Adduct.

AF Concentration(μ)	DNA-AF Adducts(pmol/mg DNA)	
	Control	curcumin
30	0.31 \pm 0.10	*0.17 \pm 0.09
60	0.57 \pm 0.21	*0.31 \pm 0.16
90	0.96 \pm 0.26	*0.59 \pm 0.20

Table 7 Cytotoxic effect of curcumin on COLO 205 cells.

	6hrs	12hrs	24hrs	48hrs	72hrs
	viable cells %	viable cells %	viable cells %	viable cells %	viable cells %
control	83.20±0.79	85.33±4.67	83.73±0.82	83.78±5.16	86.21±2.11
0.1	84.11±1.93	80.34±1.28	83.66±1.35	84.18±3.27	86.91±3.13
0.5	81.94±1.81	75.1±2.27	74.96±0.14	85.66±2.05	86.78±1.28
1.0	73.40±1.34	76.58±0.60	64.15±2.04	82.39±2.98	82.95±3.36
2.5	45.93±4.01	37.56±1.62	51.09 ± 1.65	59.24±5.39	45.87±6.76
5.0	22.20±2.23	2.7±1.10	24.01±1.50	16.73±7.56	20.21±2.17

Table 8 Cell Cycle distribution of COLO 205 cells.

	6hs			24hrs		
	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
control	75.72±1.70	5.53±0.95	18.75±0.75	76.96±2.61	13.03±1.27	10.01±1.47
0.1	74.11±0.79	5.61±0.48	20.28±1.10	74.38±2.28	12.14±0.90	13.48±1.40
0.5	75.09±2.08	7.01±0.47	17.90±1.64	70.78±2.17	11.83±1.13	17.39±1.95
1.0	74.37±0.42	8.25±0.65	17.39±0.62	70.80±2.30	11.88±0.58	17.32±1.76
2.5	75.30±1.09	9.90±0.94	14.80±1.11	68.26±3.09	12.52±0.43	19.22±3.31
5.0	78.01±0.97	9.92±0.46	12.07±0.59	77.60±2.43	14.54±0.84	7.93±1.58
	48hrs			72hrs		
	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
control	80.08±0.95	9.99±0.85	9.92±0.18	85.99±1.89	7.12±1.36	6.90±0.69
0.1	84.61±5.87	6.72±0.85	8.67±6.48	76.61±1.73	8.56±0.66	14.83±2.19
0.5	83.76±0.57	10.19±0.39	6.06±0.18	79.23±1.76	6.97±0.94	13.80±1.26
1.0	84.37±0.67	9.33±1.04	6.30±0.97	78.36±1.92	6.90±0.90	14.75±2.19
2.5	74.78±1.46	12.77±0.99	12.44±1.29	76.59±0.35	9.80±0.35	13.61±0.27
5.0	68.78±2.12	9.37±0.61	21.85±2.37	65.43±1.99	25.73±4.51	9.19±5.59

Table 9 Cell Cycle related genes regulated by curcumin.

Cell Cycle Up/Down Regulation				
Gene_Symbol	Name	Function_Category	NF ratio of mean	Up/Down
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	cell cycle	2.056855396	Up
MTCP1	H.sapiens MTCP1 gene, exons 2A to 7 (and joined mRNA)	cell cycle	0.440449284	Down
CCNE2	cyclin E2	cell cycle	0.436173078	Down
CDC42	cell division cycle 42 (GTP-binding protein, 25kD)	cell cycle	0.431896871	Down
PPM1D	Homo sapiens protein phosphatase Wip1 mRNA, complete cds	m-phosphatase/cell cycle/apoptosis	0.416217447	Down
	Human Bcl2, p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2) mRNA, complete cds	cell cycle/SD/binding protein(TP53,Bcl2)	0.410515838	Down
MAD2L1	Homo sapiens mitotic feedback control protein Madp2 homolog mRNA, complete cds	cell cycle	0.400538022	Down
HEC	Homo sapiens retinoblastoma-associated protein HEC mRNA, complete cds	cell cycle	0.350648945	Down
LTBP2	Latent transforming growth factor beta binding protein 2	cell cycle/binding protein	0.344947336	Down
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	cell cycle/apoptosis/protein synthesis	0.340671129	Down
FACC/FANCC	Fanconi anemia complementation group C	DNA repair/cell cycle	0.337820325	Down
GAS1	Growth arrest-specific 1	cell cycle	0.317864694	Down
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	oncogene/cell cycle/transcription factor	0.283655041	Down
ZNF35	Zinc finger protein 35 (clone HF.10)	cell cycle/transcription factor	0.273677225	Down
CCNT1	Homo sapiens cyclin T mRNA, complete cds	cell cycle/transcription factor	0.269401019	Down
CDC27	Cell division cycle 27	cell cycle	0.266550214	Down
	Human p300/CBP-associated factor (P/CAF) mRNA, complete cds	cell cycle/cell proliferation/m-transferase/transcription	0.257997801	Down

Table 10 Apoptosis related genes regulated by curcumin

Apoptosis Up/Down Regulation				
Gene_Symbol	Name	Function_Category	NF ratio of mean	Up/Down
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	growth factor/apoptosis	3.038957521	UP
PSMB6	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6	apoptosis/protease	2.414631351	UP
LGALS4	Human galectin-4 (GAL4) mRNA, complete cds	apoptosis/cell growth/cell adhesion/inflammation	2.396101123	UP
PSMB10	Proteasome Component Mecl-1 Precursor	apoptosis/protease	2.158058953	UP
HD	Huntingtin (Huntington disease)	apoptosis	2.128125506	UP
MAX	Mas protein	oncogene/apoptosis/transcription factor	0.477509742	Down
STAT2	Homo sapiens mRNA for STAT induced STAT inhibitor-2, complete cds	binding protein/cell proliferation/apoptosis/inhibitor	0.457554111	Down
	Human guanine nucleotide exchange factor mRNA, complete cds	binding protein/SD/apoptosis/cell proliferation	0.446150893	Down
RELB	Transcription Factor Relb	oncogene/apoptosis/transcription factor	0.419068251	Down
PPM1D	Homo sapiens protein phosphatase Wip1 mRNA, complete cds	m-phosphatase/cell cycle/apoptosis	0.416217447	Down
MPO	Myeloperoxidase	peroxidase/stress protein/apoptosis	0.406239631	Down
	Human Epstein-Barr virus-induced protein mRNA, complete cds	apoptosis	0.370604576	Down
FOXO3A	Homo sapiens forkhead protein (FKHRL1) mRNA, complete cds	transcription factor/apoptosis	0.354925151	Down
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	cell cycle/apoptosis/protein synthesis	0.340671129	Down
TIP30	Homo sapiens CC3 (CC3) mRNA, complete cds	apoptosis/tumor suppressor/binding protein/transcription	0.340671129	Down
PSMA6	PROTEASOME IOTA CHAIN	apoptosis/protease	0.23804217	Down

Table 11 AANAT down regulation of COLO 205 cells by curcumin.

Gene_Symbol	Name	Function_Category	NF ratio of mean
AANAT	Human serotonin N-acetyltransferase mRNA, complete cds	m-transferase	0. 392489164 (down regulation)

Table 12 Cyclin A down regulation of COLO 205 cells by curcumin.

Name	Gene_Symbol	Function_Category	NF ratio of mean
Cyclin A	CCNA2	cell cycle	0. 630027779 (down regulation)

Table 13 Significant gene up or down regulation of COLO 205 by curcumin.

Name	Gene_Symbol	Function_Category	NF ratio of mean
kelch (Drosophila)-like 3	KLHL3	structure protein	6.633821907
aldehyde dehydrogenase 3	ALDH3A1	m-dehydrogenase/transporter	4.971302924
INTESTINAL TREFOIL FACTOR PRECURSOR		cell matrix protein/cell adhesion	4.643960415
Homo sapiens IGF-II mRNA-binding protein 1 (IMP-1) mRNA	IMP-1	RNA binding protein/protein synthesis	4.581242718
Human mitogen-activated kinase kinase kinase 5 (MAP3K5) mRNA, complete cds	MAP3K5	kinase	0.206683321
Elastase 1, pancreatic (elastase IIA)	ELA1	m-protease	0.202407114
Orosomucoid 1	ORM1	cell matrix protein/inflammation	0.196705506
Fatty acid binding protein 4, adipocyte	FABP4	binding protein/transporter	0.191003897
claudin 1	CLDN1	membrane protein/cell adhesion	0.153943439

參考文獻

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer*. 1993, 54:594.
2. Parkin DM, Laara E, Muir CS: Estimate of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988, 41:184.
3. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA: Cancer Statistics. 1996. *CA Cancer J Clin*. 1996, 46:5-27.
4. Wattenbert, L. W. Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In: M. Wattenger, C. W. Lipkin, C. W. Boone, and G. J. Kelloff (eds.), *Cancer Chemoprevention*, pp. Boca Raton, FL: CRC press, 1992.
5. Boone, C. W., Kelloff, G. J., and Malone, W. F. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res.*, 1990, 50:2-9.
6. Kelloff, G. J., Boone, C. W., Malone, W. E., and Steele, V. E. Recent results in preclinical and clinical drug development of chemopreventive agents at the National Cancer Institute. In: L. W. Wattenberg, M. Lipkin, C. W. Boone, and G. J. Kelloff (eds.), *Cancer Chemoprevention*, pp. 41-56. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.
7. Greenberg ER, Barron JA: Prospects for preventing colorectal cancer death, *J Natl Cancer Inst* (editorial). 1993, 85:1182-1184.
8. Pollard M, Luckert PH: Effect of indomethacin on intestinal tumors induced in rats by the acetate derivative of dimethylnitrosamin. *Science*. 1981, 214: 558-559.
9. Moorghen M, Ince P, Finney K, Sunter JP, Appleton DR, Watson AJ: A protective effect of sulindac against chemically-induced primary colonic tumors in mice, *J Pathol*. 1988, 156:341-347.
10. Pollard M, Luckert PH: Prevention and treatment of primary intestinal tumors in rats by piroxicam. *Cancer Res*. 1989, 49:6471-6473.
11. Graven PA, DeRubertis FR: Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis, *Carcinogenesis*. 1992, 13:541-546.

12. Shen TY, Ham EA, Cirillo VJ, Zanetti M: Prostaglandin synthetase inhibitors (H.J. Robinson and J., R. Vane [eds]) Raven Press, NY, 1974.
13. Bayer BM, Beaven MA: Evidence that indomethacin reversibly inhibits cell growth in the G1 phase of cell cycle. *Biochem Pharmacol.* 1978, 28:441-443.
14. Shiff SJ, Tsai L, Rigas B: The effect of sulindac on cell proliferation and the cell cycle distribution of human colon cancer cells. *Gastroenterology.* 1994, 106:A440.
15. Prichard PJ, Kitchingma GK, Hawkey CJ: Gastric mucosal bleeding: What dose of aspirin is safe? *Gut.* 1987, 28:A1401
16. Aoll AH, Weinstein WM, Kurata J, MacCarthy O: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer disease. *Ann Intern Med.* 1991, 114:307 -319.
17. Wynder. E.L., Kajitani, T., Ishidawa. S., Dodo, H., and Takano, A. Environmental factors in cancer of colon and rectum. *Cancer (Phila)*, 1969, 23:1210-1220.
18. Willett, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., and Speizer, F.E. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N. Engl. J. Med.*, 1990, 323:1664-1672.
19. Reddy. B.S. Nutritional factors and colon cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1995, 35:175-190.
20. Potter, J.D., and Steinmatz, K. Vegetables, fruits and phytoestrogens as preventive agents. *IARC Sci. Publ.*, 1996, 139:61-90.
21. Ammon, H.P.T., and Wahl, M.A. Pharmacology of *curcuma longa*. *Planta MED.*, 57:1-7, 1991.
22. Uwe Wenzel, Sabin Kuntz, Mathias D. Brendel, and Hannelore Daniel. Dietary Flavone Is a Potent Apoptosis Inducer in Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Research* 2000, (60):3823-3831.
23. Nishino, H., Iwashima, A., Itakura, Y., Matsuura, H., and Fuwa, T. Antitumor-promoting activity of garlic extracts. *Oncology*, 1989, 46:277-280.

24. Sundaram,S.G.,and Milner,J.A.Dially disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture.Biochim.Biophys.Acta,1996,1315:15-20.
25. Takeyama.H.,Hoon,D.S.B.,Saxton,Re.,Morton,D.L.,and Irie,R.F.Growth inhibition and modulation of cell markers of melanoma by S-allyl cysteine. Oncology,1993,50:63-69.
26. Welch,C.,Wuarin,L,and Sidell,N.Antiproliferative effect of the garlic compound allyl cysteine on human neuroblastoma cells *in vitro*.Cancer lett.,1992,63:211-219.
27. Lee,E.S.,Steiner,M.,and Lin,R.Thioallyl compounds:potent inhibitors of cell proliferation .Biochim.Biophys.Acta.,1994,1221:73-77.
28. Haim Shirin,John T.Pinto,Yuichi Kawabata,Jae-Won Soh,Thomas Delohery, Steven F.Moss,Vundavalli Murt,Richard s.Rivlin,Peter R.Holt,and I.Bernard Weinsein.Antiproliferative Antiproliferative Effects of S-Allylmercaptocysteine on Colon Cancer Cells When Tested Alone or in Combination with Sulindac Sulfide.Cancer Research 2001,(61):725-731.
29. Nadkarani,K.M.*Curcuma Longa*.In:K.M.Nadkarani(ed.),India Materia Medica.pp.414-416.Bombay:Popular Prakashan Publishing Co.,1976.
30. Tonnesen.H.H.Chemistry of curcumin and curcuminoids.In:C-T.HO,C.Y.Lee, AND M-T.Haung(eds.),Phenolic Compounds in Food and Their Effect of Health.Vol.1:Analysis.Occurrence and Chemistry.ACS Symposium Series No.506,pp143-153.Washington.DC:American Chemical Society.1992.
31. Srinial R.C.,and Dhawan.B.N.Pharmacology of diferuloylmethane (curcumin),a non-steriodal anti-inflammatory agent.J.Pharm.Pharmacol., 1973,25:447-452.
32. Satoskar,R.R.,Shah.S.J.,and Shenoy.S.G.Evaluation of anti-inflammatory

- property of curcumin(dieruloylmethane)in patients with postoperative inflammation.Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol.,1986,24:651-654.
33. Sharma,O.P.Antioxidant activity of curcumin and related compounds. Biochem.Pharmacol.,Ther.Toxicol.,1986,24:651-654.
34. Toda,S.,Miyase,T.,Arichi,H,Tanizawa,H.,and Takino,Y.Natural antioxidant III.Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma Longa* L.Chem.Pharm.Bull.(Tokyo),1985,33:1725-1728.
35. Mou-Tuan Huang,You-Rong Lou,Wei Ma,Harold L.Newmark,Kenneth R.Reuhl,and Allan H.Conney.Inhibitory Effects of Dietary Curcumin on Forestomach,Duodenal,and Colon Carcinogenesis in Mice.Cancer Research.1994(54):5841-5847.
36. Kim JM. Araki S. Kim DJ. Park CB. Takasuka N. Baba-Toriyama H. Ota T. Nir Z. Khachik F. Shimidzu N. Tanaka Y. Osawa T. Uraji T. Murakoshi M. Nishino H. Tsuda H.Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. Carcinogenesis.1998,19(1):81-85.
37. Steele,V.E.,Moo,R.C.,Lubert,R.A.*et al*.Preclinical efficacy evaluation of potential chemoprefentie agents in animal carcinogenesis models:methods and results from the NCI chemoprevention drug development program. *J.CELL.Biochem*.1994,20(suppl.),32-54.
38. Kelloff,G.J.,Boone,C.W.,Crowell,J.A.,Steele,V.E.,Lubert,R.and Sigman, C.C.Chemopreventive drug development:perspectives and progress,Cancer Epidemiol.Biomarkers.Prev.1994,3,85-98.
39. Pereira MA. Grubbs CJ. Barnes LH. Li H. Olson GR. Eto I. Juliana M. Whitaker LM. Kelloff GJ. Steele VE. Lubet RA.Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin,upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats.Carcinogenesis.1996,17(6):1305-1311.
40. Kakar SS,Roy D:Curcumin inhibits TPA induced expression of c-fos,c-jun and c-myc proto-oncogenes messenger RNAs in mouse skin.Cancer Lett. 1994,87(1):85-89.

41. Huang TS, Lee SC, Lin JK: suppression of c-JUN/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88(12):5292-5296.
42. Singh S, Aggarwal BB: Activation of transcription factor NF-kappaB is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J Biol Chem*. 1995, 270(42):24995-25000.
43. Hanan S, Samaha, Gary J, Kelloff, Vernon Steele, Chinthalapally V, Rao, and Bandaru S, Reddy. Modulation of Apoptosis by Sulindac, Curcumin, Phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl Isothiocyanate: Apoptotic Index as a Biomarker in Colon Cancer Chemoprevention and Promotion. *Cancer Research*. 1997(57):1301-1305
44. Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, Zhou DY. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Research*. 1999 19(5A):3675-80,
45. Jinag MC, Yang YHF, Yen JL, Lin IK: Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer*. 1996, 26(1):111-120.
46. Kuo ML, Huang TS, Lin JK: Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*. 1996, 1317(2):95-100.
47. Ordonaro M, Mariadason JM, Aslam F, Heerdt BG, Augenlicht LH. Butyrate-induced apoptotic cascade in colonic carcinoma cells: modulation of the beta-catenin-Tcf pathway and concordance with effects of sulindac and trichostatin A but not curcumin. *Cell Growth & Differentiation*. 1999 10(10):713-720
48. Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*. 1999, 18(44): 6013-20,
49. Hanif R, Qiao L, Shiff SJ, Rigas B. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in

- colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*. 1997, 130(6):576-584.
50. 林松洲, 食物與癌症, 豪峰出版社, 台北, 1993; 303 .
51. Couch DB. : Carcinogenesis: Basic principles. 【 Review 】 *Drug and Chemical Toxicology* . 1996;19(3): 133-148
52. Hoffman,d.,Masuada,Y.,and Wynder,E.L.L.Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. *Nature* .1969(221):255-256.
53. Kuller,L.H.,Garfinkle,l.,Coreo,P.,Haley,n.,Haffman,D.,Preston-Martin,S., and Sander,D.contribution of passive smoking to respiratory cancer. *Environ. Health Perspect.* 1986(70):57-69.
54. Lower, G.M. Concepts in causality: Chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer*, 1982 ; 49 : 1056-1066 .
55. Weber, W.W. The acetylase genes and drug response. Oxford University press New York 1987.
56. Levy GN, Chung JG and Weber WW: 2-aminofluorene metabolism and DNA adduct formation by mononuclear leukocytes from rapid and slow acetylase mouse strain. *Carcinogenesis*, 1994 ; (15) :353-357.
57. Levy,G.N.,DNA-carcinogen adducts in circulating leukocytes as indicators of arylamine carcinogen exposure. *Fundam.Appl.Toxicol.*1993(21):23-30
58. Levy,G.N.,and Weber.W.W.2-Aminofluorene-DNA adducts in mouse urinary bladder:effect of age,sex and acetylase phenotype. *Carcinogenesis*.1992(13):159-164.
59. Chung , J.G. , levy , G.N. and weber W.W. Distribution of 2-aminofluorene and p-aminobenzoic N-acetyltransferase activity in tissue of C57b1/6j rapid and B6 A-Nats slow acetylase congenic mice . *Drug metabolism and disposition.* 1993(21): 1057-1063.
60. Hein , D . W., Omichinski, J.G. , Brewer J.A. and weber , W.W. A unique pharmacogenetic expression of the N-Acetylation polymorphism in the

- inbred hamster. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; (220): 8-15
61. Juberg, D.R., Bond, J.T., and Weber, W.W. N-acetylation of aromatic amines: genetic polymorphism in inbred rat strains. *Pharmacogenetics*. 1991(1):50-57.
 62. Vatsis, K.P., and Weber, W.W. Structural heterogeneity of Caucasian N-acetyltransferase at the NAT1 gene locus. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993(301):71-76.
 63. Weber, W.W., Micelli, J., Hears, D.J., and Drummond, S. N-acetylation of drugs: Pharmacogenetic studies in rabbits selected for their acetylator characteristic. *Drug. Metab. Dispos.* 1976(4):94-101.
 64. Grant, D.M., Blum, M., Beer, M., and Meyer, U.A. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferase: a comparison of liver isozymes and expressed product of two cloned genes. *Mol. Pharmacol.* 1991; 39:184-191.
 65. G.I. Salti, S. Grewal, r.r. Mehta, T.K. Das Gupta, A.W. Boddie Jr, A.I. Constantino. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. *European Journal of Cancer*. 2000(36):796-802.
 66. Chinthalapally V. Rao, Toshiniko Kawamori, Rachid Hamid and Bandaru S. Reddy. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis* 1999 20(4):641-644.
 67. Weber, W.W., and Hein, D.W. N-Acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol. Rev.* 1985, (37):25-79.
 68. Hares, D.J. and Weber W.W. Multiple N-acetyltransferase and drug metabolism, tissue distribution, characterization and significance of mammalian N-acetyltransferase. *Biochem. J.* 1973; 132 : 519-528.
 69. Hein, D.W., Eustan, J.D., Furman, E.J. and Martin, W.J. Extrahepatic expression of the N-acetylation polymorphism toward arylamine carcinogens in tumor target organ of an inbred rat model. *J. pharmacol.*

- Exp. Ther. 1991; 258: 232-236.
70. Glowinski , I.B., and Weber , W.W. Biochemical characterization of genetically variant aromatic amine N-acetyltransferase in A/J mice . J. Biol Chem. 1982; 257:143-147.
71. Ho , C.C. , Lin , T. H. , Chung , J.G., Levy , G.N. and Weber , W.W. Kinetics of acetyl CoA: Arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylator frog tissue . Drug metabolism and disposition. 1996; 20: 137-143.
72. Chung , J.G. , Kuo , H.M. , Ho , C.C. ,Levy , G.N. and Weber , W.W. Kinetics and characterization of ary ; amine N-acetyltransferase from Anisakis aimlex . Cancer Letters. 1996;106: 1-8.
73. Fang , S.H. , Chung , J.G. ,Levy , G.N. and Weber , W.W. Candida albican ary ; amine N-acetyltransferase : Kinetics and characterization . Toxicol Lett. 1997.
74. Chang F.C. 2-aminofluorene metabolism by human disgest system bacteria. Master Thesis 1996.
75. Chung , J.G. , Wang , H.H. , Lo , H.H. , Chang , S.S. , Wu , L.T. , Lee , J.H. and Hung C.F. Evidence for arylamine N-acetyltransferase activity in the bacteria Helicobacter pylori . Toxicol Lett, 1997; 91: 63-71.
76. Chung , J.G., Lee , J.H. ,Ho , C.C. , Lai , J.M. , Hung , C.F. and Huan , S.C. A suryey of arylamine N-acetyltransferase in common fruits and vegetables. Journal of Food Biochemistry. 1997; 20: 481-490.
77. Smith , G. , Stanley , L.A. , Strang , R.C. and Wolf , C.R. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility . Cancer Survey.1995; 25:27-35.
78. Grant , D.M. , Blum , M. and Meyer , U.A. Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. Nucleic Acids res. 17:3978-3986.
79. Coroneos , E. , Sim , E. Arylamine N-acetyltransferase activity in human cultured cell lines . Biochem. J. 1993; 294: 481-486.

80. Miller EC, and Miller JA. Search for the ultimate chemical carcinogens and their reaction with celler macromolecules. *Cancer* 1981;47: 2327-2345 .
81. Hein DW. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis . *Biochem . Biophys.*1988; *Acta* 948: 37-66.
82. Weber W.W., Levy G.N., Hein D.W. Acetylation “ Conjugation Reactions in Drug Metablism” (G.J. Mulder, ed.) Taylor and Francis, London,1990; 163-191 .
83. Weber W.W and Hein D.W. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol. Rev.*1985; 37: 25-99.
84. Einisto P. Watanabe M. Ishidate M Jr. And Normi T.: Mutagenicity of 30 chemicals in Saimonella typhimurium strains possessing dufferant nitoreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutation Research*, 1991 ; 259 (1) :95-102
85. 顏正華,中藥學(下)高等中醫研究參考叢書 14 知音出版社.1991.
86. 張賢哲,本草備要解析.中國醫藥學院出版組.1988
87. 陳欽銘,當代中藥學.協進圖書有限公司 1982
88. 現代本草,中國藥材學(上.下) 啟業書局 1976.
89. 宋今丹 , 醫學細胞生物學 ; 243-258.
90. P. Fantes and R. Brool. The cell cycle. 1993, 51-53.
91. Raff,MC.Social controls on cell survival and cell death.*Nature* 1992;356:397-399.
92. Gerald Karp.*Cell and Molecular Biology.*1999:688-690.
93. G.P.Studyiaski;*Cell Growth and Apoptosis.*,1996.
94. M.G.Ormerod;*Flow Cytometry.*1990,79.
95. Takahiko Katoh , Robert Boissy , Naoki Nagata ,Kyoko Kitagawa , Yusuke Kuroda , Hideaki Itoh , Toshihiro Kawamoto and Douglas A. Bell Inherited polymorphism in the N-acetyltransferase1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma *Int. J. Cancer* : 2000 ; 85 : 46-49

96. Blum M., Grant DM., Demierre A. and Meyer VA.: N-acetylation pharmacogenetics: a gene deletion causes absence of arylamine N-acetyltrans in liver of slow acetylators, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989, 86(23):9554-9557.
97. Selkirk JK. And Macleod MC.: Chemical carcinogenesis: Nature's metabolic mistake. *Bioscience*, 1982; 32:601-605.
98. Debiec-Rychter M., Tada M., Poiruer MC. And Wang CY. DNA adduct formation in human and rat mammary epithelium by N-hydroxyderivatives of 2-aminofluorene and 4-aminobiphenyl 3 Teratogenesis, Carcinogenesis, & Mutagenesis 1998; 18(1):35-39.
99. Hein DW. : Acetylator genotype and arylamine induced carcinogenesis. *Biochimica et biophysica Acta* .1988; 948:37-66.
100. Srivastava A.K. and Wiebel F.J.: Arylamine N-acetyltransferase activities in cell lines of mouse, rat, hamster and man differing in their sensitivity to 1,6 di-nitropyrene 1990; 54 (1) : 71-76.
101. Einisto, P., Watanabe, M., Ishidate, M. and Nohmi, T. Mutagenicity of 30 chemicals in *S. typhimurium* possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutation Res.* 1991; 259:95-102.
102. Wick MJ, Hanna PE. Bioactivation of N-arylhydroxamine acids by rat hepatics N-acetyltransferase: detection of multiple enzyme formed by mechanism based in activation. *Biochem. Pharmacol.* 29:991-1003.
103. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Research.* 1995, 55(2):259-266.
104. Rogers, A.E. and Nauss, K.M. (1985) Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig. Dis. Sci.*, 30(suppl.), 87s-102s.
105. Huggins, S., Grand, L.C. and Brillantes, F.P. mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. *Nature*,

1961,189:204-207.

106. So JB., Samarasinge K., Raju GC., Moochhala SM. And Ti TK.: Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E correlates with survival in gastric carcinoma patients. *Journal of Surgical Research*. 2000, 94(1):56-60.
107. Shin JU., Kim HS., Lee KS., Kim J., Park JB., Won MH., Chae SW., Choi YH., Choi KC., Park YE. And Lee JY., Mutation and expression of the p27KIP1 and p57KIP2 genes in human gastric cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2000, 32(2):79-83.
108. Aoyagi K., Koufujik., Yano S., Murankami N., Terasaki Y., Yamasaki Y., Takeda J., Tanaka M. and Shirouzu K. Immunohistochemical study on the expression of cyclin D1 and E in gastric cancer. *Kurume Medical Journal*. 2000, 47(3):199-203.
109. Xiangming C., Natsugoe S., Takao S., Hokita S., Tanabe G., Baba M., Kuroshima K. and Aikou T. *Cancer* 2000, 89(6):1214-1219.

ABSTRACT

Colorectal cancer is a major cause of cancer deaths in Western countries as well as in Taiwan. Curcumin (diferuloylmethane), derived from the rhizome of *Curcuma longa* L. and having both antioxidant and anti-inflammatory properties, inhibits chemically induced carcinogenesis in the skin, forestomach, and colon when it is administered during initiation and/or postinitiation stages on animal model. This study was designed to investigate the chemopreventive action of curcumin on the human colon cancer line (COLO 205) by means of NAT (N-acetyltransferase) activity analysis, DNA-AF adduct assay, NAT mRNA expression, cytotoxicity, cell morphology, cell cycle, apoptosis and micro-array assay.

The result indicate that curcumin decreased NAT activity in human colon tumor cell's cytosol and this effect is dose-dependent manner. curcumin decreased N-acetylation of AF in human colon tumor intact cells.in dose-dependent and time-course effect .Curcumin also decrease K_m and V_{max} value of NAT enzyme in human colon tumor Cells. It is an uncompetitive inhibitor for NAT enzyme in this examinant cells . Curcumin also reduce AF metabolites in decrease AF-DNA adduct and NAT gene expression in human colon tumor Cells. Curcumin induce cytotoxicity effect in human colon tumor intact cell. It is a dose-dependent and time-course effects. Curcumin also induce major in necrosis and minor in apoptosis effect depend on the dose of Curcumin in colon tumor intact cells. Curcumin affect cell morphology by decreasing cell number in human colon tumor cells. Curcumin also affect cell cycle by decreasing the percentage of G_0/G_1 phase and increasing the percentage of S phase in human colon tumor cells. Curcumin do increase cyclin-E,cdk1,cdk2 expression in human colon tumor intact cell. The micro-array analysis shows AANAT down regulation. The futher study is needed to explain the relationship between curcumin and human colon cancer.

This result, together with a long history of consumption without

adverse health effects, suggest that curcumin is an important candidate for consideration in colon cancer prevention.

Keywords : curcumin (diferuloylmethane) , colorectal cancer , chemopreventive , human colon cancer cell line (COLO 205) , N-acetyltransferase(NAT) , arylamine(2-aminofluorene and p-aminobenzoic acid) , uncompetitive inhibitor , cell cycle , micro-array analysis .