

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

台灣粗榧樹葉中具生物活性成分之分離與鑑定

Isolation and Identification of Bioactive Compounds from the
Leaves of *Cephalotaxus Wilsoniana*

研 究 生：陳令宗

指 導 教 授：吳東昆 博士

中華民國九十六年三月

台灣粗榧樹葉中具生物活性成分之分離與鑑定

Isolation and Identification of Bioactive Compounds from the Leaves of
Cephalotaxus Wilsoniana

研究生：陳令宗

Student: Ling-Tsung Chen

指導教授：吳東昆

Advisor: Tung-Kung Wu



A Thesis

Submitted to Department of Biological Science and Technology

College of Science

National Chiao Tung University

In partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of

Master

in

Biological Science and Technology

March, 2007

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十六年三月

台灣粗榧樹葉中具生物活性成份之分離與鑑定

研究生：陳令宗 指導教授：吳東昆

國立交通大學生物科技學系

摘要

台灣粗榧是一種常綠樹木，分佈在台灣中海拔山區。台灣粗榧已有三種抗癌成分被分離出來，分別是Taiwanhomoflavone-A，Taiwanhomoflavone-B 和 C-3-epi-wilsonione。研究初步發現由 4.6 kg台灣粗榧樹葉的甲醇萃取物可能具有生物活性物質且對HeLa cell具有很強的抑制效果，這與先前研究結果不一致。為了找出此一物質，我們針對粗榧各個不同部位進行一系列甲醇、水、正丁醇的萃取，再以HPLC分離各成份，隨後以MTT assay對分離出 17 mg的單一成分進行生物活性確認，並運用各種光譜分析以鑑定結構。根據¹H-NMR、¹³C-NMR、HMQC、HMBC和COSY得到的結構命名為 4', 5, 7-trihydroxyflavone，學名是apigenin。Apigenin於先前文獻中已指出此化合物對數種癌細胞有抑制生長之作用。本研究發現apigenin對HeLa, BEAS-2B, AGS, COLO-205 的生物活性，其ED₅₀為 3.084、無反應、無反應、8.195 μg/ml(11.422, 無反應，無反應，30.35μM)。在我們成功的分離並鑑定出此藥物後，在未來將對此化合物的抑癌機制作進一步的探討，並希望能對此化合物作官能基的修飾以增進其抑癌的效果。

CELL	ED ₅₀	
	μg/ml	μM
BEAS-2B	x	x
AGS	x	x
COLO-205	8.195	30.35
HeLa	3.084	11.422

Isolation and Identification of Bioactive Compounds from the Leaves of *Cephalotaxus Wilsoniana*

Student : Ling-Tsung Chen Advisor : Tung-Kung Wu

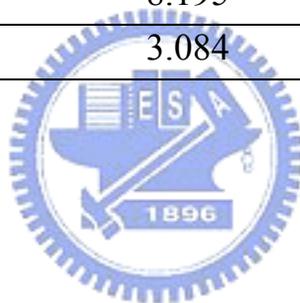
Department of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

Abstract

Cephalotaxus wilsoniana Hayata is an evergreen tree distributed over the middle mountains of Taiwan. Several antitumor components, including Taiwanhomoflavone-A, Taiwanhomoflavone-B and C-3-epi-wilsonione, have been reported from *C. wilsoniana* Hayata recently. A crude methanol extract of *C. wilsoniana* leaves (4.6 kg) showed potent cytotoxic activity against HeLa cells *in vitro*. This subdivided cytotoxic activity exhibited different discrepancy than previous research. In order to characterize the chemical constituents in different parts of plant and to find out the bioactivities compounds of *C. wilsoniana* Hayata, a series of extraction (from H₂O to butanol of original methanol extraction layer) was carried out. Moreover, HPLC chromatography was utilized to separate each component. The cytotoxic activity of these extracts against HeLa cells were analyzed by the MTT assay. Structure elucidation, using ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, and COSY, revealed the structure as 4', 5, 7-trihydroxyflavone and thatz the scientific name is apigenin (17 mg) . Researches on apigenin has shown inhibitory effect on the growth of various cancer cells. Our study showed

that apigenin showed bioactivity against the HeLa, BEAS-2B, AGS, and COLO-205 in concentration-dependent manner with ED₅₀ values of about 3.084, no reaction, no reaction, and 8.195 µg/ml (11.422, no reaction, no reaction, 30.35 µM). In the future, research will focus on the mode of action of the drug and the functional group modification of the drug for the improvement of anti-cancer efficacy.

CELL	ED ₅₀	
	µg/ml	µM
BEAS-2B	x	x
AGS	x	x
COLO-205	8.195	30.35
HeLa	3.084	11.422



誌謝

時光匆匆，猶記得當初帶著忐忑不安的心負笈北上，如今我將懷著感恩的心滿載而歸。

兩年多來的實驗室生活，首先要感謝的是我的指導教授吳東昆 博士總提供不虞匱乏的實驗室資源，並且以有教無類的精神，灌輸學生正確的實驗觀念及遇事所應有的積極態度；感謝口試委員刁維光 教授及林敬堯 教授能在百忙之中撥空審閱論文，並對論文中的各項細節提供諸多真知灼見的寶貴意見，使論文得以完備。

研究期間，感謝實驗室的大學長程翔學長，對我的實驗總能適時提供意見和正確方向，以及最後的結構光譜上的幫忙，才得以順利解出結構；感謝裕國學長，在 cell culture 方面指導許多技術層面的問題，讓 cell culture 實驗最後順利進行；感謝媛婷學姊，她總無時不刻的適時付出關心、鼓勵，也在實驗意見上給予我相當大的幫助；感謝晉豪學長，從我實驗之初，直到論文完成前的最後一刻，不厭其煩的從旁指導，和我討論實驗中的各個相關細節，直到現在能夠獨立操作實驗及思考；感謝文鴻學長，對任何人總是熱情毫無私心，總會在我需要協助時伸出援手；感謝號稱天才的晉源，在實驗室裡陪我一路走來，一起哭一起笑一起瘋狂；感謝大鳥和宏明兩位一起奮鬥的同學，一起熬過許多似無止盡的夜晚，並在最艱辛的畢業衝刺，能互相扶助、關心；還有可愛的學弟妹文暄、小妹、皓宇、大景、小高、文祥、世勳、采婷，總為實驗室帶來歡笑氣氛，並為在口試時的幫忙。

感謝袁俊傑老師實驗室的弘毅、威震、奕榮、佳穎，世昌、詩穎、彥棋及彭慧玲老師實驗室的智凱，在實驗最後階段不斷關懷打氣；感謝大學同學旭宇、志偉、蓮蒂、靜宜、曉青，在我研究期間從旁加油打氣。

最後，要感謝一路默默支持著我的爸爸媽媽，不時的噓寒問暖，給予精神上最大支柱，讓在實驗室的我，能心無旁騖的完成學業。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iv
目錄.....	v
圖表目錄.....	vii
一、序論.....	1
1.1 天然產物化學.....	1
1.2 細胞週期 (Cell Cycle) 和細胞凋亡 (Apoptosis)	7
1.2.1 細胞週期.....	7
1.2.2 細胞凋亡.....	11
1.2.3 細胞凋亡的研究方法.....	13
1.3 台灣粗榧 (Cephalotaxus wilsoniana Hayata.)	15
1.3.1 三尖杉屬 (Cephalotaxus)	15
1.3.2 三尖杉屬 (Cephalotaxus) 先前之研究.....	15
1.3.3 台灣粗榧 (Cephalotaxus wilsoniana Hayata) 之簡介.....	24
1.4 台灣粗榧之研究文獻回顧.....	25
1.4.1 Taiwanhomoflavone-A.....	25
1.4.2 Taiwanhomoflavone-B	26
1.4.3 C-3-epi-wilsonione.....	27
1.5 研究動機與目的.....	28
二、材料與方法.....	30
2.1 實驗材料.....	30
2.2 實驗儀器.....	31
2.3 分離方法簡述.....	32
2.4 癌細胞毒殺活性檢測 (MTT assay)	35
2.5 天然物分離實驗流程.....	38
三、結果與討論.....	44

3.1 有機層分析	44
3.1.1 植物之篩選	44
3.1.2 有機層之分析	44
3.2 HPLC分析	46
3.2.1 第一層HPLC分析	46
3.2.2 第二層HPLC分析	48
3.2.3 第三層HPLC分析	51
3.2.4 第四層HPLC分析	55
3.2.5 第五層HPLC分析	59
3.3 細胞生物活性測試分析	61
3.4 結構之解析	62
3.4.1 EI-MS	62
3.4.2 ¹ H-NMR	63
3.4.3 ¹³ C-NMR	64
3.4.4 DEPT	65
3.4.5 HMQC	66
3.4.6 HMBC	67
3.4.7 COSY	68
3.4.8 結構 4', 5, 7-trihydroxyflavone	69
3.5 討論	70
四、未來展望	75
五、參考文獻	76



圖表目錄

圖 1-1 paclitaxel.....	4
圖 1-2 camptothecin.....	4
圖 1-3 1981-2002 年新藥開發統計.....	5
圖 1-4 細胞週期 (cell cycle)	8
表 1-1 三尖杉屬先前之研究.....	15
圖 1-5 台灣粗榧.....	25
圖 1-6 Taiwanhomoflavone-A 結構.....	26
圖 1-7 Taiwanhomoflavone-B 結構.....	27
圖 1-8 C-3-epi-wilsonion 結構.....	27
圖 2-1 粗榧葉有機層萃取流程圖.....	33
圖 2-2 粗榧葉 HPLC 分析流程圖.....	34
圖 2-3 MTT assay 流程圖.....	36
圖 2-4 第一層 HPLC 移動相比例示意圖.....	40
圖 2-5 第二層 HPLC 移動相比例示意圖.....	41
圖 2-6 第五層 HPLC 移動相比例示意圖.....	42
圖 3-1 香杉、油杉和粗榧之葉子及嫩枝的 MTT assay 比較.....	44
圖 3-2-1 不溶於正丁醇萃取物之 MTT assay.....	45
圖 3-2-2 溶於正丁醇萃取物之 MTT assay.....	45
圖 3-3 正丁醇萃取物之 HPLC 分析.....	46
圖 3-4-1 由圖 3-3 中 HPLC 分析收得 fraction I 之 MTT assay.....	47
圖 3-4-2 由圖 3-3 中 HPLC 分析收得 fraction II 之 MTT assay.....	47
圖 3-4-3 由圖 3-3 中 HPLC 分析收得 fraction III 之 MTT assay.....	47
圖 3-5 正丁醇萃取物之第二層 HPLC 分析.....	48
圖 3-6-1 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得 fraction I 之 MTT assay.....	49
圖 3-6-2 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得 fraction II 之 MTT assay.....	49

圖 3-6-3 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得 fraction III 之 MTT assay.....	50
圖 3-6-4 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得 fraction IV 之 MTT assay.....	50
圖 3-7 正丁醇萃取物之第三層 HPLC 分析.....	51
圖 3-8-1 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得 fraction I 之 MTT assay.....	52
圖 3-8-2 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得 fraction II 之 MTT assay.....	52
圖 3-8-3 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得 fraction III 之 MTT assay.....	53
圖 3-8-4 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得 fraction IV 之 MTT assay.....	53
圖 3-8-5 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得 fraction V 之 MTT assay.....	54
圖 3-9 正丁醇萃取物之第四層 HPLC 分析.....	55
圖 3-10-1 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得 fraction I 之 MTT assay.....	56
圖 3-10-2 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得 fraction II 之 MTT assay.....	56
圖 3-10-3 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得 fraction III 之 MTT assay.....	57
圖 3-10-4 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得 fraction IV 之 MTT assay.....	57
圖 3-10-5 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得 fraction V 之 MTT assay.....	58
圖 3-10-6 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得 fraction VI 之 MTT assay.....	58
圖 3-11 正丁醇萃取物之第五層 HPLC 分析.....	59
圖 3-12 由正丁醇萃取物之第五層 HPLC 分析中所分離出來的單一峰之確	

認.....	59
圖 3-13-1 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰之 MTT assay.....	60
圖 3-13-2 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰以外之 MTT assay.....	60
圖 3-14 EI-MS 圖譜.....	62
圖 3-15 ¹ H NMR 圖譜.....	63
圖 3-16 ¹³ C NMR 圖譜.....	64
圖 3-17 DEPT 圖譜.....	65
圖 3-18 HMQC 圖譜.....	66
圖 3-19 HMBC 圖譜.....	67
圖 3-20 COSY 圖譜.....	68
圖 3-21 4', 5, 7-trihydroxyflavone 結構.....	69
圖 3-22 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 HeLa cell 之 MTT assay.....	70
圖 3-23 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 AGS cell 之 MTT assay.....	71
圖 3-24 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 COLO 205 之 MTT assay.....	71
圖 3-25 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 BEAS-2B 之 MTT assay.....	72
圖 3-26 Flavopiridol.....	74
圖 3-27 Apigenin 在子宮頸癌細胞凋亡途徑中所造成之影響.....	74

一、序論

1.1 天然產物化學

中草藥醫學對人類來說是最古老的用藥方式，它是許多早期文明社會治療的依靠，也仍是現今世界醫學中廣泛熟悉的方式，傳統中藥在東亞地區的使用情形相當普遍，形成了西藥之外的另一種用藥文化；但日本、中國等國家受西方價值觀念影響，曾分別在明治維新初期及民國初年毅然提倡西醫治療方法，幸賴少數有識之士承傳中國醫學，直至現代，中國醫學才又逐漸受到重視。西方對於中藥，一般的印象都是認為中藥的製程不夠科學、療效緩慢而不明顯、而適應的病症則是模糊且非單一的，因此許久以來一直遭受西方科學界的存疑。但隨著科技發展，中藥材的成分逐一被分離鑑定，並且其治療的功效也受到科學方法的証實，逐漸扭轉西方人對中草藥的觀念，也帶動了我國國人重新省思自己祖先累積數千年經驗所遺留下來的寶藏。

中草藥在人類的生長發展扮演著一個重要的部份，它提供我們生活所需的食物、用藥和化妝品之來源，因此我們能夠深刻地體認到在自然界中蘊藏著能治療各種不同疾病的天然物。如今約有25%的處方用藥取自於樹木、矮灌木和藥草。例如洋地黃(*Digitalis*)是被萃取自毛地黃(*Foxglove*)³，嗎啡(*morphine*)和可待因(*codeine*)是被分離自鴉片罌粟(*opium poppy*)⁴，奎寧(*Quinine*)是來自於金雞納(*cinchona*)樹皮⁵等等。

草藥醫學和一般用藥醫學兩者的不同點，是一般用藥醫學從植物萃取或從

實驗室合成出具活性的成分結構得以製成藥物；中草藥醫學是將整株植物進行萃取，得到混合的萃取物並用於治療行為。一般中醫師都相信，一整株植物當中所有具活性成分的整體治療成效，要比其中任何單一主要成分來的有療效。例如，在植物當中具有很強活性之有害成分的效力非常強，則同一植物當中其他成分可能限制其活性；若在植物當中具有活性之有益成分的效力不高，則同一植物當中其他成分可能加強其活性，或者能幫助有效成分能抵達身體中所需治療的器官組織。也因如此，中草藥醫學是以天然植物為原料並非合成的化學物質，故中草藥醫學與一般現代用藥相比，中草藥醫學有著較低副作用和負面影響的特性。因此，假使超過中草藥所指定的服用劑量，人類身體應該能夠承受服用過量草藥所帶來強而有力的效力及危險性。除了用於治療的中草藥外，還有一些植物化學成分是具有生物活性的；吡咯啉植物鹼(pyrrolizidine alkaloids)⁶是一種肝細胞毒，若大量服用會引發身體機能的混亂及迅速死亡。這些植物鹼(alkaloids)能夠在一些植物中被發現到，如澤菊(ragwort)、灌木(bush tests)，這些都是從野百合屬(crotalaria species)和紫草(comfrey)中被發現。

所有的中草藥治療原料皆來自各種植物，原料之取得方式如下：

- 1 製成藥片⁷
- 2 浸泡⁸：將葉子或花果置入沸水製得
- 3 煎煮⁹：將樹皮或樹根置入沸水中熬煮一段時間製得
- 4 酊劑¹⁰：將植物的某部位，以酒精和水混合的液體泡製

草藥可包含各種不同的植物化學物質，如礦物、維他命和微量元素。某些植物化學物質具備藥性反應並能對身體進行治療行為。在草藥處方中，不同植物有著不同特性，且處方中的草藥搭配可根據完整的病歷資料和透過物理診斷

對患者檢查出的問題來進行調整。中草藥的使用可伴隨著飲食、運動和任何的生活方式的改善來幫助病患減輕病狀。

人類對於中草藥和天然鹼藥物的使用已有相當長久的歷史，並且，中國傳統民俗藥物的神奇治療效果已廣為世人所知，然而如先前所述，一整株植物當中所有具活性成分的整體治療成效，要比其中任何單一主要成分來的有療效，但是將含有複雜成分的整株植物用於治療會有幾個缺點，包括：

1. 對藥材的收集、貯藏、製備，會因過程的變異而造成生物活性降低。
2. 非必要成分所引起生物活性的協同作用、拮抗作用及其它不可預知的生物活性之調控。
3. 植物的成分構成會因地域差異而有不同；氣候和生態條件；採收季節；植物部位（根、葉、樹皮、嫩枝、花、果實、種子、乳汁等）等等。¹¹

因此天然藥物化學在研究領域上扮演著重要角色，天然物化學的研究是植物物質化學研究的入門。從天然物分離出抗癌或抗HIV的藥劑已被證實，這些具有生物活性的成分，已被用於臨床當中，如紅豆杉醇（Taxol）¹²和喜樹鹼（Camptothecin）¹³。紅豆杉醇（Taxol），一種大有可為並用於化療的雙萜（diterpene），可由紫杉樹的樹皮中被分離出來，它能治療子宮癌和乳癌。然而紅豆杉醇（taxol）的產量極低，為了收集紅豆杉醇（Taxol）而去收集紫杉樹樹皮，使得紫杉樹面臨絕種的命運。全世界正企圖找出可當紅豆杉醇（Taxol）來源的植物種類，以便來進行半合成。紫杉醇（Paclitaxel），一種半合成化合物，美國食品及藥物管理局（FDA）已測試得知紫杉醇（Paclitaxel, 圖1-1）與紅豆杉醇（Taxol）具有生物相等性（Bioequivalent）。喜樹鹼（Camptothecin, 圖1-2）已被當作DNA拓樸異構酶I的抑制劑。（拓樸異構酶的作用是將超螺旋DNA纏

繞和鬆開以便組成染色體，假如染色體無法鬆開，則DNA轉錄不能進行，使得蛋白質合成受到阻擾。)

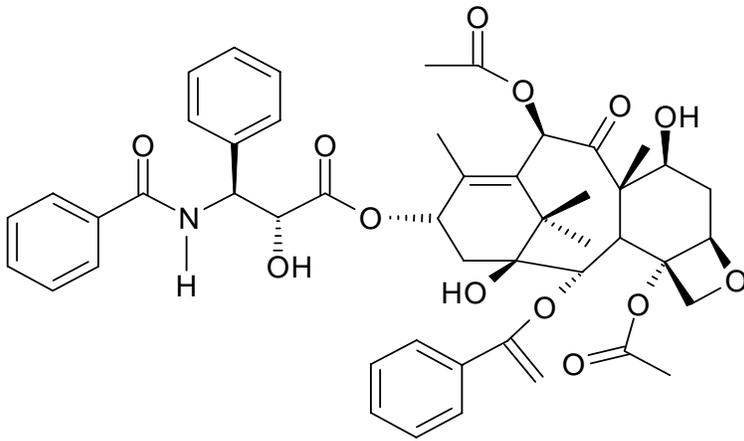


圖 1-1 paclitaxel

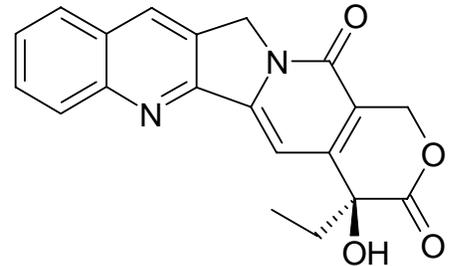
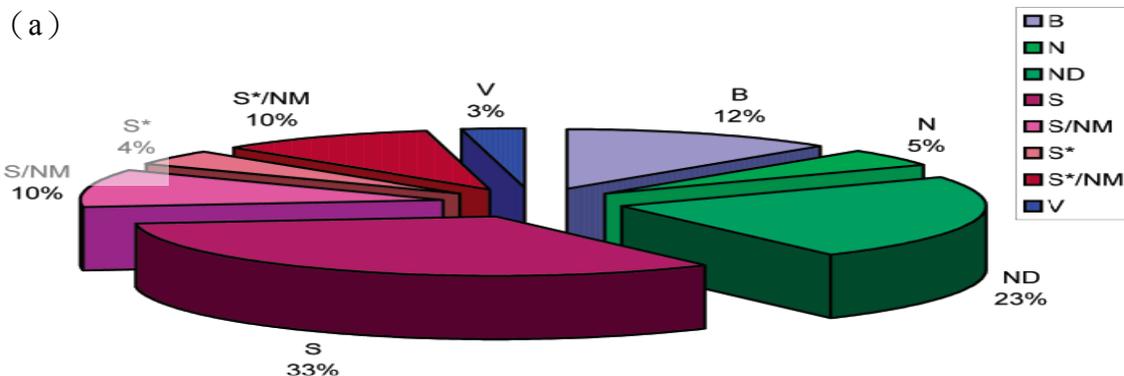


圖 1-2 camptothecin

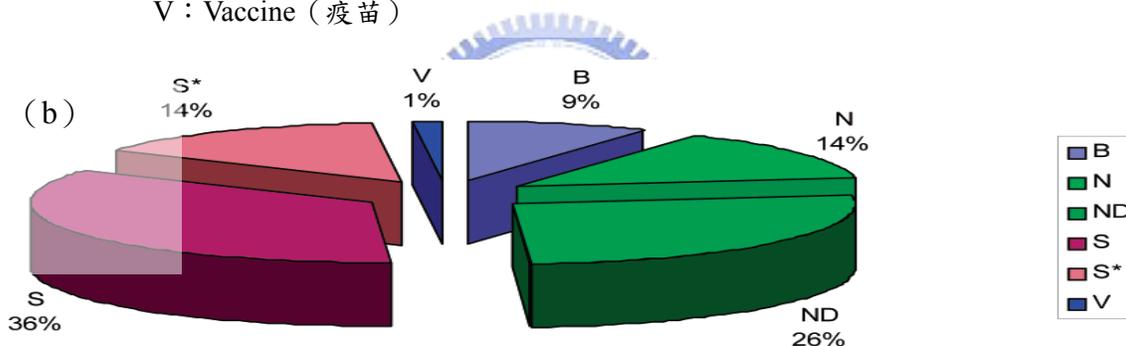
因此，天然物成分的分離包含以下幾個優點：

1. 在實驗室的觀點中，可以合成或相同方式將之再生；在治療觀點中，能夠掌握精確劑量用於治療及試驗。
2. 特定成份或成分的分類可促使分析測試之發展。
3. 經結構測定之具有生物活性的成分，可用來作為合成物質產物之原料。藉由官能基結構修飾可使其生物活性更好。

根據1981年至2002年之間的統計^{1,14-16}，有1031種藥物被開發，而這些藥物來源主要分類，可分為生物來源(B)、天然物來源(N)、衍生物來源(ND)、修飾現有藥物來源(S)、全合成來源(S*)、疫苗(V)。當中以天然物為基礎，最後成為藥物的共佔28% (天然物來源5%、天然物衍生物來源23%)，然而若將對抗疾病藥物的範圍縮減為抗癌藥物，可發現當中以天然物為基礎，最後成為藥物的共佔40% (天然物來源14%、天然物衍生物來源26%)，以統計數據觀察，從天然物尋找抗癌藥物是極具潛力的。(圖1-3)



- B : Biological (生物); 由有機體/細胞或經由生物技術從宿主得到的蛋白質作為用藥來源
 N : Natural product (天然物); 由植物提煉出化合物作為用藥來源
 ND : Derived from a natural product (天然物之衍生物); 以天然物為原料, 經由結構修飾官能基做為用藥來源
 S : Totally synthetic drug (合成藥物); 以現有之藥物, 經由結構之修飾作為用藥
 S* : 經全合成而得, 但其中藥效基團來自於天然物
 V : Vaccine (疫苗)



- B : Biological (生物); 由有機體/細胞或經由生物技術從宿主得到的蛋白質作為用藥來源
 N : Natural product (天然物); 由植物提煉出化合物作為用藥來源
 ND : Derived from a natural product (天然物之衍生物); 以天然物為原料, 經由結構修飾官能基做為用藥來源
 S : Totally synthetic drug (合成藥物); 以現有之藥物, 經由結構之修飾作為用藥
 S* : 經全合成而得, 但其中藥效基團來自於天然物
 V : Vaccine (疫苗)

圖 1-3 1981-2002 年新藥開發統計 (a) 新藥開發來源分類統計 (b) 抗癌藥物開發來源分類統計¹

生長在地球上的植物大約有 500,000 種。目前估計每單一類型的植物中, 至少有 5,000 個以上不同成分, 所以該用什麼策略去探索需要的成份呢? 依中

草藥醫學使用不同植物來進行治療來看，具有生物活性的成分會來自於不同的來源。傳統民俗藥物分離出植物中可用部份的成分來使用，但分離過程或條件的差異會造成生物活性的改變。另外，除已知中草藥醫學所選用植物外，尚有其它植物所含若干成分亦有生物活性，而這些有效成分在含有複雜成分的植物中無法凸顯出其效用，需藉由各種方式將其分離並應用。

首先，選定的植物用風乾或冷凍乾燥將多餘水分除去，之後使用甲醇或乙醇等不同溶劑加以萃取，再利用不同極性的各種溶劑作分層萃取。不同分層的分離需要多步驟及多維層析，許多的層析方式，如TLC (Thin-Layer Chromatography), CC (Column Chromatography) 和HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography) 等等已被廣泛應用在中草藥成分分離中。

而在結構分析方面主要分光儀來完成結構測定的過程，分光儀包含UV-Vis (Ultraviolet-Visible Spectroscopy), IR (Infrared Spectroscopy), NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) 和MS (Mass Spectrometry)。當未知成分有較好的結晶時，可使用單晶X射線繞射 (X-ray diffraction) 的方式來研究。在相同例子中，絕對立體化學亦可使用當作測定。X射線繞射的研究能夠獲得分子的3D形狀、鍵結長度和角度，以及分子內或分子外的互相作用等等有意義資訊。

發展植物成分的衍生物當做化療藥物時，須由植物學者、化學家和生物學家協力合作。然而，以地球上大量的植物來源比較，只有少部份種類已經被探測，可是並不完全。在許多例子中，極性或水溶成分和植物萃取物之巨分子並沒有完全被研究透徹，在日後也具有很大的研究價值。至今已有九種抗癌藥物

分離在美國臨床使用已獲得認可；這些藥物包含長春鹼(Vinblastine)、長春新鹼(Vincristine)、溫諾平(Navelbine)、順鉑(Etoposide)、替尼泊苷(Teniposide)、紅豆杉醇(Taxol)、泰索帝(Taxotere)、拓撲替康(Topotecan)、伊立替康(Irinotecan)等，這些都是目前甚至日後最佳的治療方式。

1.2 細胞週期 (Cell Cycle) 和細胞凋亡 (Apoptosis)

抗癌藥物能有效的對癌細胞產生作用，通常是藥物能改變癌細胞的細胞週期中的調控，並進一步使得癌細胞進入細胞凋亡，而達到對抗癌細胞之目的。以下進一步介紹細胞週期(Cell Cycle)與細胞凋亡(Apoptosis)的詳細機制。



1.2.1 細胞週期 (Cell Cycle)

生物體依照 DNA 序列的指示重複進行著生長、發育及生殖等過程。當母細胞生長、分裂成第一代子細胞，子細胞再生長、分裂為第二代子細胞，如此不斷地進行，這種週期則稱為細胞週期 (cell cycle)。細胞生長經由細胞週期和部份的轉錄調節，像是 DNA 複製就是利用一些蛋白質去調控其他的基因，並調節細胞週期中多方面的機制，而其中 cyclin 和 cyclin-dependent kinases (CDKs) 顯然在活化轉錄的影響上扮演著重要角色。

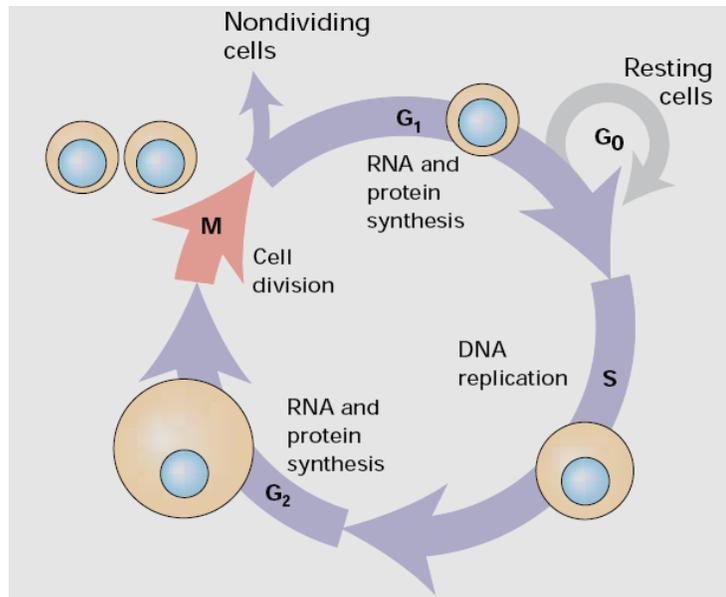


圖 1-4 細胞週期 (cell cycle)

細胞週期 (cell cycle) 指的是包含了 G₀/G₁、S、G₂、M 等階段時期。

Gap 0 (G₀): 細胞處於休眠的狀態，也許是暫時性休眠或是永久性休眠，需有適當的訊息才會重新進入細胞週期。

Gap 1 (G₁): 細胞維持正常代謝與繼續生長，在進入S (synthesis) 時期之前會檢查染色體 (chromosome) DNA是否受到破壞而進行修補 (repair) 工作，此時期需要花十小時到十二小時。細胞亦可由此脫離細胞週期進入不生長的休止狀態 (G₀)。

Synthesis (S): 當細胞進入S時期會花六到八小時進行DNA之複製，將原本的二十三對染色體加以複製。

Gap 2 (G₂): 當細胞進入G₂時期需要花三至四小時，此時期細胞繼續生長並且合成蛋白質，此外，細胞亦負責檢查染色體DNA的複製是否完整而準備進行下一步的有絲分裂 (mitosis)。

M (mitosis): 細胞會由一個母細胞變成兩個子細胞，當染色體複製完成之

後便會各自分配到子細胞內，讓子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，此時期約為一小時，最後子細胞便準備再進入下一個細胞週期。

在細胞週期方面癌細胞與正常細胞最大差別在於癌細胞的細胞週期調控脫離常軌，使其不正常的增生。調控細胞週期的因子最為廣泛研究的是p53，而p53的調節包括DNA錯誤配對修復(mismatch repair)、鹼基的切除修復(base excision repair)或核苷酸的切除修復(nucleotide excision repair)三種系統。在細胞週期中，每個階段之交界處都有所謂的「檢查點」(checkpoint)，由1980年美國的Leland Hartwell所提出，主要是說細胞週期有暫時停止的現象(cell cycle arrest)，並觀察細胞是否受到破壞，而進行修補(repair)或是進行DNA的合成(synthesis)，最後進行細胞有絲分裂(mitosis)，當其無法修復時，會走向細胞凋亡(apoptosis)的途徑，最後導致細胞死亡。而p53基因的調節錯誤往往會導致細胞癌化的現象發生。

週期素(cyclins) D和E主要存在G1期，並在G1-S時期會被分解，像是幾種cyclin-dependent kinases (CDKs)，皆與G1期調控有關，當靜止細胞進入細胞週期時，基因編碼(encoding)在D-type週期素上(D1, D2, 和D3)，並且誘發細胞分裂的訊息，而週期素亦會催化一些因子，如CDK4和CDK6，進而促進G1期。

由Cyclin D1去調節holoenzymes的次單元並使其磷酸化，而視網膜母細胞瘤蛋白(retinoblastoma protein; pRb)呈現未活化狀態而抑制細胞週期，pRb可說是G1期的看門人，亦可說它會穿越過限制點而導致DNA的合成。當cyclin D1

過度表現時，會是導致癌症和腫瘤因子的形成和轉移的開始。故cyclin D1在G1期的調控扮演重要角色。

關於真核細胞的G1/S期的檢查點(checkpoint)，主要是G1期進入DNA合成期(synthesis phase)時，由兩群細胞激素調控，包括(CDK4/6-cyclin D和CDK2-cyclin E)，及轉錄複合物包括(Rb and E2F) 扮演在此檢查點的關鍵角色。在G1-phase，發現Rb-HDAC的抑制複合物會與E2F-DP1轉錄因子結合並抑制下游路徑的轉錄。藉由CDK4/6和分離的CDK2與Rb-repressor complex會使Rb磷酸化，容許轉錄的S期基因與蛋白編碼(encoding)，成為一個G1往S期的開關，並進行DNA複製。多數不同的刺激會影響檢查點(checkpoint)的控制，如TGF- β ，DNA 損傷，接觸抑制(contact inhibition)，和生長因子消退。在INK4家族蛋白中，包括p14、p15 (INK4B)、p16 (INK4A)、p18 (INK4C) 以及p19 (INK4D)，會抑制CyclinD/CDK4與Cyclin D/CDK6而調控G1期。還包括Kip/Cip families亦與G1期調控有關。而TGF- β 會抑制Cdc25A的轉錄，並活化細胞週期激素的磷酸化。而KIP/CIP families，包括了p21^(CIP1/WAF1/SDI1)、p27^(KIP1)以及p57^(KIP2)。在細胞週期和細胞凋亡的路徑，轉錄因子p53扮演一個重要的角色，它是一個多頻率的腫瘤抑制基因，當細胞缺p53時會導致DNA損傷和裂殖原(mitogenic)受到刺激而使細胞死亡。造成細胞損傷可能是由蛋白質激素，ATM (ataxia telangiectasia mutated) 和ATR (ATM-related) 所引起的。ATM藉由離子放射線或其他因子辨識雙股的斷裂。ATM和ATR分別活化轉換調節點CHK2和CHK1。CHK1藉由細胞核的互斥或降解抑制CDC25磷酸化並抑制CDKs磷酸化。CHK2和ATM的訊息經p53誘發p21Cip1/WAF1的表現，多種前凋亡因子(Puma, Bax, Noxa)，DNA修補和氧化壓力基因和回饋調節HDM2。p53是一種壽命較短的蛋白並藉ATM的磷酸化而活化轉錄，而遍存素

(ubiquitin) 接合酶HDM2結合p53使細胞核p53互斥或破壞。另一個G1的調節點功能為p53和Rb去調控高度活化的Ras，Myc和E2F訊息。故與細胞週期有關的因子包括p15、p16、p21、p27、p53、CDK2、CDK4、CDK6、cyclin D、cyclin E等等都在G1期扮演著重要的角色。

1.2.2 細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡是一種細胞自殺的機制，用以調控組織中的細胞數目並減少個別細胞對於動物生存的威脅。如細胞表面的專一性受器、死亡受器 (death receptors)。而死亡受器會偵測到細胞外面死亡的訊息，並進入細胞內而導致細胞凋亡的機制。



細胞凋亡又稱為細胞計畫性死亡，在真核細胞的生長與細胞分化中排除大量與不需要的細胞的方式，為一種細胞自我毀滅的過程。在多細胞的生物體中，細胞凋亡為一種調控與維持細胞數目非常重要的程序。而生物體的恆定亦需要細胞凋亡與細胞增生的之間平衡來控制。倘若細胞凋亡程序被抑制或是其中調控的基因遭受損害，則會造成細胞無法走向程式性凋亡，而導致細胞循錯誤訊息而繁衍下去，造成細胞不斷增生與細胞癌化。

細胞凋亡與細胞壞死 (necrosis) 的不同在於細胞凋亡的死亡是經由分裂成DNA片段、細胞膜皺縮、染色質濃縮凝集形成凋亡小體 (apoptotic bodies)，由單核球或巨噬細胞 (macrophage) 吞噬處理掉。細胞凋亡是有計畫性的死亡，細胞凋亡只牽涉到本身的細胞，對於其他周圍的細胞並不涉及在內，而且不發生發炎現象。而細胞壞死意即是壞死，而其死亡方式會造成細胞發炎、細胞破

裂，釋出發炎因子並且涉及周圍細胞，有壞死現象的出現。

而細胞凋亡與凋亡蛋白酶（caspase）有很重要的關係，caspase-specific inhibitors會抑制促進細胞凋亡的刺激因子，故得知凋亡蛋白酶在細胞凋亡當中也是扮演著很重要的角色。在細胞凋亡啟動的時候，凋亡蛋白酶會活化細胞凋亡路徑，亦是所謂的瀑布式的效應，故利用本身的蛋白酶活性去切割下游的凋亡蛋白酶並活化凋亡蛋白酶。而細胞凋亡的現象，會產生DNA片段的斷裂，故從電泳圖可以看到DNA ladder的產生。而凋亡蛋白酶有兩個種類，其中一類包括起始的凋亡蛋白酶，有凋亡蛋白酶-2，-8，-9，-10，另一類則為有作用的凋亡蛋白酶，有凋亡蛋白酶-3，-6，-7，當凋亡蛋白酶活化時，有作用的凋亡蛋白酶會將細胞中蛋白質裂解掉，最後導致細胞的死亡。



經由粒線體路徑誘發的細胞凋亡，其會釋出細胞色素c（cytochrome c），是一種電子傳遞鏈的關鍵蛋白，經由粒線體的細胞凋亡信號，會活化Apaf-1，進而活化凋亡蛋白酶-9，而Smac/DIABLO會自粒線體釋出，並抑制IAP蛋白，使凋亡蛋白酶-9作用而促進細胞凋亡，而Bcl-2家族蛋白會調節細胞凋亡並形成複合物而進入粒線體的膜裡面，而後釋出Cytochrome c和其他蛋白。而凋亡蛋白酶的瀑布式反應經此路徑直接活化TNF家族受器而導致細胞凋亡，但不活化Bid、Bcl-2家族，這稱為粒線體誘發之細胞凋亡（mitochondria-mediated apoptosis）。Bax為另一群Bcl-2家族，藉由此路徑活化而增加，而後釋出細胞色素c和其他蛋白。而Bcl-2、Bcl-xl會防止孔道形成並阻斷細胞凋亡。細胞凋亡刺激因子（apoptosis inducing factor）是另一個粒線體因子，會釋出細胞質液誘發細胞凋亡，細胞凋亡刺激因子在分化期間為一重要角色但不需依賴凋亡蛋白酶的幫助。

(1) 細胞凋亡之外在路徑

外在路徑由死亡受器與細胞膜上的表面受器結合放出計畫性死亡訊號後開啟。當開啟細胞凋亡的大門之後會活化凋亡蛋白酵素，產生瀑布式(cascade)反應，而此路徑的速率很快，如CD95 (Fas)、TNFR1、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) 皆是外在路徑，在免疫系統和造骨作用中，TNF可調控多種機制，在先天性與適應性免疫反應中，扮演著一重要角色。這些蛋白包括TNF α 、lymphotoxin- α 或- β 、Fas ligand (FasL)、CD27L、CD30L、CD40L、TALL-1..等等。TNF α 在體外和體內的肝細胞增殖扮演著一個重要的角色，並且在幾種肝細胞損傷的模型中會產生作用並調控細胞死亡。

(2)細胞凋亡之內在路徑

內在路徑由粒線體路徑誘發的細胞凋亡，主要是由caspase蛋白和Bcl-2家族蛋白的參與。Caspase的全名為Cystein aspartase，為Cystein活化態殘基的蛋白酶。Bcl-2 family包括了Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-Xs、Bad、Bag、Bak、Bid。具有促進以及抵抗細胞凋亡的功能。

1.2.3 細胞凋亡的研究方法

辨別細胞是否進行細胞凋亡，目前有幾種指標可以參考。首先就細胞型態而言，由於細胞凋亡活化了許多內生性的蛋白質分解酶 (endogenous proteases)，導致細胞骨架的破壞 (cytoskeletal disruption)、細胞萎縮 (cell shrinkage)、細胞膜上會有泡狀物 (membrane blebbing) 的產生，並且有染色質濃縮 (chromatin condensation) 的現象。

另外就細胞核的變化而言，由於活化了細胞之核酸內切酶（endonuclease），造成此酵素吸附到 DNA 的核間區域（internucleosomal spacer DNA regions），使核內 DNA 斷裂成片段，此結果可藉由洋菜凝膠電泳（agarose gel electrophoresis）觀察到 DNA 呈梯狀的排列。以往的研究視 DNA 梯狀排列為細胞凋亡的正字標記，DNA 斷裂過程可能分為二期，第一期是把基因體以 domain cleavage 的方式切成 200-300 及 30-50 kb 的斷片，此期的核酸內切酶稱為 domain nuclease；第二期則由 fragmentation nuclease，切位在核小體（nucleosome）之間的連接處，而形成 180-200 bp 的 DNA 梯狀排列規則斷片。

流式細胞儀（flow cytometry）的應用是另一項較新的技術，其配有 15 微瓦的氬離子電射，發射出 488 nm 波長的藍光，細胞樣本附著能被 488 nm 藍光雷射激發的螢光染料後，會發散出或綠、或橙紅、或深紅色的螢光，而被儀器所分析。常用來定量 DNA 的染劑為碘化丙啶（Propidium Iodide, PI），能嵌入雙鏈 DNA 及 RNA 的鹼基對中，由於碘化丙啶不能進入細胞膜，因此進行 DNA 分析時，需先在細胞膜上打孔，再除去細胞中的 RNA，此法常用來做 DNA 細胞週期分析。

正常人體的 DNA 是雙套的（2N），由於凋亡細胞 DNA 斷裂成小片斷，因此會比正常 G0/G1 期細胞有較低的染色密度（stainability），經 PI 染色後，可將凋亡細胞顯現出來，而在直方圖中形成 sub G1 peak。同樣以凋亡細胞的 DNA 受核酸內切酶裂解現象，運用細胞內 TdT（terminal deoxynucleotidyl transferase）的反應，將 DNA 斷裂切口的 3'-端用螢光標記過的特殊核酸 BrdU 來補充，這便是所謂的 TUNEL（TdT-mediated dUTP-dogoxigenin nick end labeling）分析法。

另外在活細胞的細胞膜只有內側含有磷脂醯絲胺酸 (phosphatidylserine)，對凋亡細胞而言，細胞膜尚未受到破壞，但會有磷脂醯絲胺酸移位到膜外側面的現象，膜聯蛋白V (Annexin V) 是一種能與磷脂醯絲胺酸結合的蛋白質，經FITC染劑可標示移位細胞膜外的磷脂醯絲胺酸，再合併以PI對細胞膜破損的壞死細胞進行染色，如此可區別活細胞、凋亡細胞及壞死細胞三種細胞族群，可做為凋亡的早期變化之分析。

1.3 台灣粗榧 (Cephalotaxus wilsoniana Hayata.)

1.3.1 三尖杉屬 (Cephalotaxus)

台灣粗榧屬三尖杉屬之一種，而三尖杉屬為常綠喬木或灌木。葉線狀披針形，對生或近對生，下表面中脈兩側各有一白色氣孔帶。雌雄異株或同株；雄球花六至十一個聚生成頭狀，腋生；雌球花成頭狀，大孢子葉對生，頂端之數片各腋生二個胚珠。種子由肉質假種皮包圍。台灣有一屬，在台灣為地域性植物。¹⁷

1.3.2 三尖杉屬 (Cephalotaxus) 先前之研究

Compounds	Species
cephalotaxine (1) ^{18,19-22}	<i>C. wilsoniana</i> Hayata. <i>C. harringtonia</i> <i>C. hainanensis</i> Li <i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. drupacea</i> Sieb & Zucc and <i>C. nana</i> Nakai

isocephalotaxine (2) ²²⁻²⁷	<i>C. wilsoniana</i> Hayata. <i>C. harringtonia</i> <i>C. hainanensis</i> Li <i>C. fortunei</i> Hook <i>C. drupacea</i> Sieb & Zucc and <i>C. nana</i> Nakai
<i>epi</i> -cephalotaxine (3) ²⁸	<i>C. fortunei</i> Hook f.
cephalotaxinone (4) ^{29,28}	<i>C. harringtonia</i> <i>C. hainanensis</i> Li
isocephalotaxinone (5) ²⁸	<i>C. fortunei</i> Hook f.
demethylcephalotaxine (6) ³⁰	<i>C. fortunei</i> Hook f.
demethylcephalotaxinone (7) ^{28,30}	<i>C. fortunei</i> Hook f.
acetylcephalotaxine (8) ^{23,31}	<i>C. wilsoniana</i> Hayata. <i>C. hainanensis</i> Li <i>C. fortunei</i> Hook f.
cephalotaxinamide (9) ³²	<i>C. hainanensis</i> Li
4-hydroxycephalotaxine (10) ³³	<i>C. fortunei</i> Hook f.
11-hydroxycephalotaxine (11) ³⁴	<i>C. fortunei</i> Hook f.
harringtonine (12) ^{24,25,29}	<i>C. harringtonia</i>
isoharringtonine (13) ³⁵	<i>C. wilsoniana</i> Hayata.



	<i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. harringtonia</i>
2- <i>epi</i> -harringtonine (14)	<i>C. fortunei</i> Hook f.
homoharringtonine (15) ^{25,29,35}	<i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. harringtonia</i>
neoharringtonine (16) ^{25,29,35}	<i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. harringtonia</i>
2- <i>epi</i> -neoharringtonine (17)	<i>C. fortunei</i> Hook f.
anhydroharringtonine (18) ^{25,29,35}	<i>C. harringtonia</i> <i>C. fortunei</i> Hook f.
2- <i>epi</i> -anhydroharringtonine(19) ^{25,29,35}	<i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. harringtonia</i>
deoxyharringtonine (20) ^{25,29,35}	<i>C. harringtonia</i>
<i>epi</i> -deoxyharringtonine (21)	<i>C. fortunei</i> Hook f.
deoxyharringtonic acid (22) ³⁶	<i>C.hainanensis</i> Li
isoharringtoninic acid (23)	<i>C.hainanensis</i> Li
drupacine (24) ³⁷	<i>C. fortunei</i> Hook f.
wilsonine (25) ²³	<i>C. wilsoniana</i> Hayata.



	<i>C. fortunei</i> Hook f.
3- <i>epi</i> -wilsonine (26) ²³	<i>C. wilsoniana</i> Hayata. <i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. harringtonia</i> <i>C. drupacea</i> Sieb & Zucc and <i>C. nana</i> Nakai
fortuneine (27)	<i>C. fortunei</i> Hook f.
cephalofortuneine (28) ³³	<i>C. fortunei</i> Hook f.
2- <i>epi</i> -cephalofortuneine (29)	<i>C. fortunei</i> Hook f.
Schlhammericine (30) ³⁵	<i>C. wilsoniana</i> Hayata. <i>C. harringtonia</i>
3- <i>epi</i> -schelhammericine (31) ³⁸	<i>C. fortunei</i> Hook f.
3- <i>epi</i> -methylschelhammericine B(32)	<i>C. wilsoniana</i> Hayata. <i>C. fortunei</i> Hook f.
2- <i>epi</i> -cephalofortuneine (33)	<i>C. fortunei</i> Hook f.
hainanolide (34) ³⁹	<i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. hainanensis</i> Li
hainanolidol (35) ⁴⁰	<i>C. fortunei</i> Hook f. <i>C. hainanensis</i> Li
kayaflavone (36) ²²	<i>C. drupacea</i> Sieb & Zucc and <i>C. nana</i> Nakai



C. wilsoniana Hayata.

sequoiaflavone (37)²²

C. drupacea Sieb & Zucc and *C. nana* Nakai

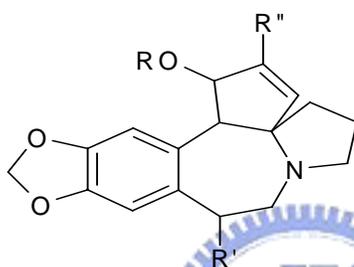
ginkgetin (38)²²

C. drupacea Sieb & Zucc and *C. nana* Nakai

sciadopitysin (39)²²

C. drupacea Sieb & Zucc and *C. nana* Nakai

表1-1 三尖杉屬先前之研究

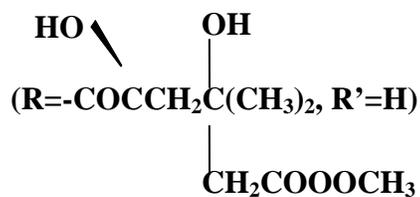


(1) Cephalotaxine ($R=H, R'=H, R''=OCH_3$)

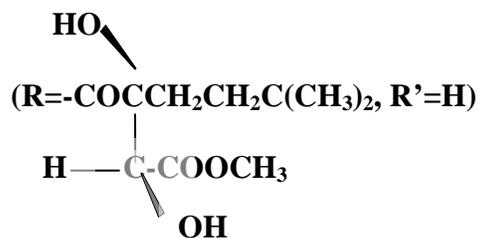
(8) Acetylcephalotaxine ($R=COCH_3, R'=H, R''=OCH_3$)

(11) 11-Hydroxycephalotaxine ($R=OH, R'=OH, R''=OCH_3$)

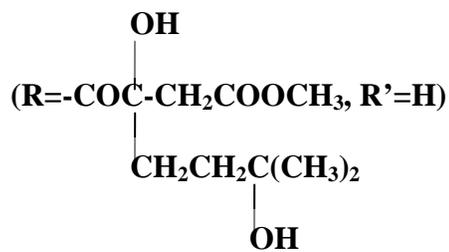
(12) Harringtonine ($R=C_{10}H_{17}O_6, R'=H$)



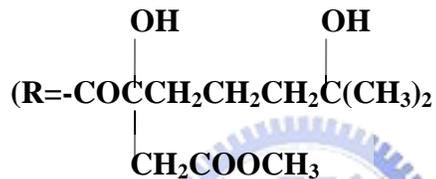
(13) Isoharringtonine ($R=C_{10}H_{17}O_5, R'=H$)



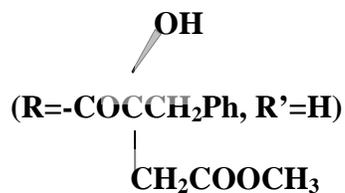
(14) *epi*-harringtonine ($R=C_{10}H_{17}O_5$, $R'=H$)



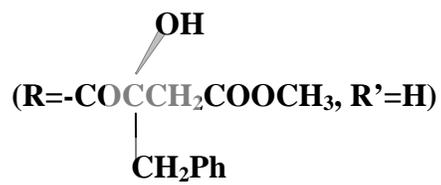
(15) Homoharringtonine ($R= C_{10}H_{19}O_5$, $R'=H$)



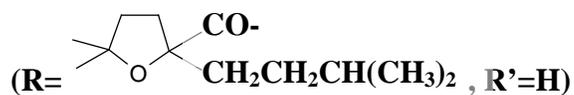
(16) Neoharringtonine



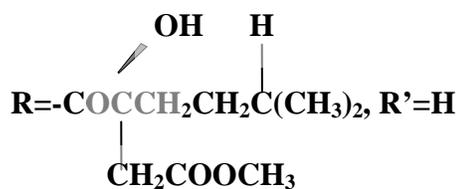
(17) *epi*-Neoharringtonine



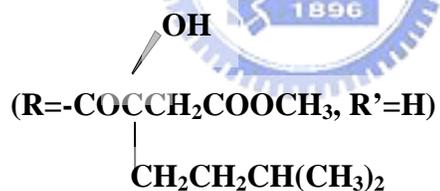
(18) Anhydroharringtonine



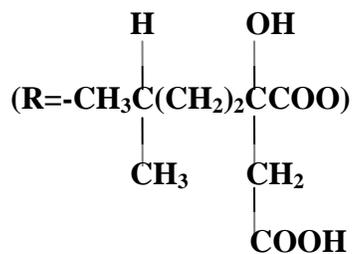
(20) Neoxyharringtonine



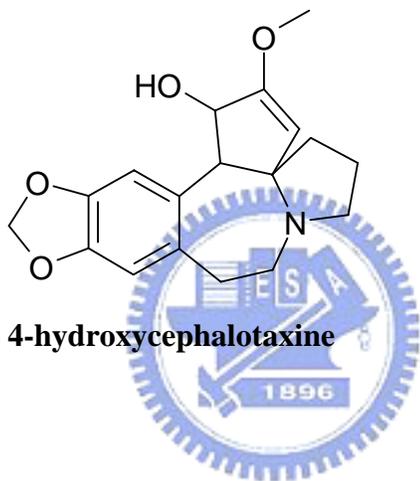
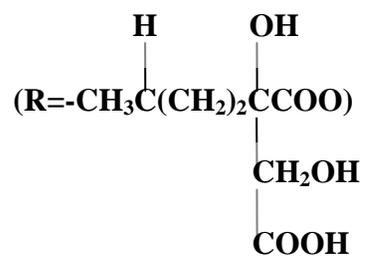
(21) *epi*-deoxyharringtonine



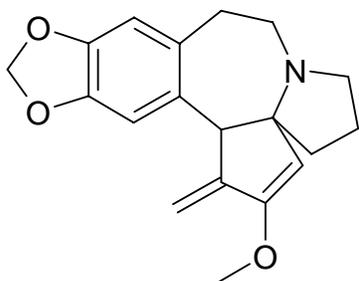
(22) Deoxyharringtonine acid



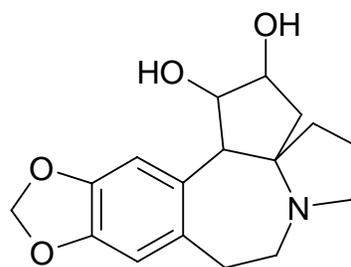
(23) Isoharringtonine acid



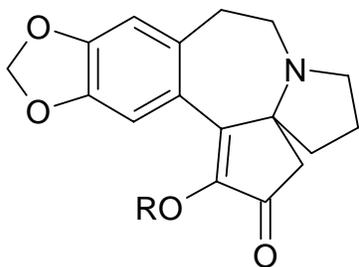
(10) 4-hydroxycephalotaxine



(4) Cehalotaxinone

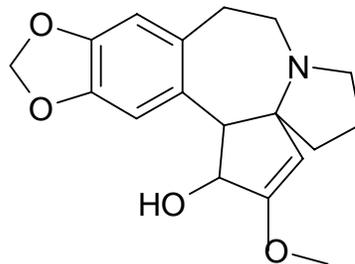


(6) Demethylcephalotaxinone

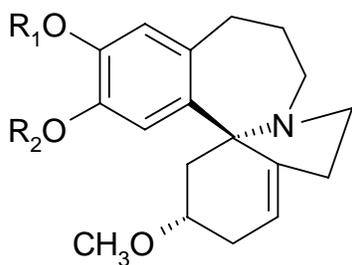


(2) Isocephalotaxinone (R=CH₃)

(7) Demethylcephalotaxinone (R=H)



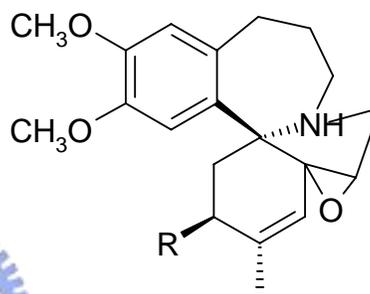
(9) Cephalotaxinamide



Homoerythrina alkaloids

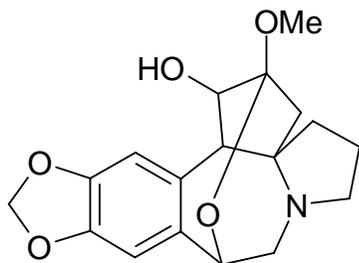
(31) 3-*epi*-schelhammericine (R₁+R₂=-CH₂-)

(32) 3-*epi*-schelhammericine B (R₁=R₂=CH₃)

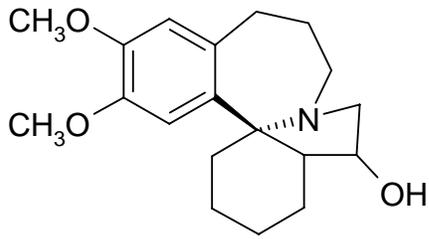


(25) Wilsonine (R=OMe, R'=H)

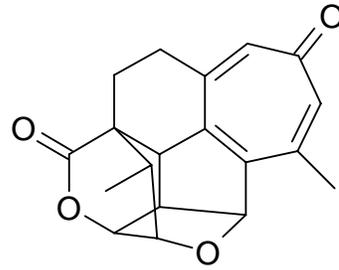
(26) 3-*epi*-wilsonine (R=H, R'=OMe)



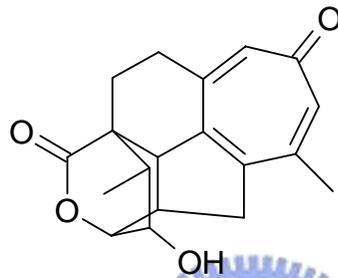
(24) Drupacine



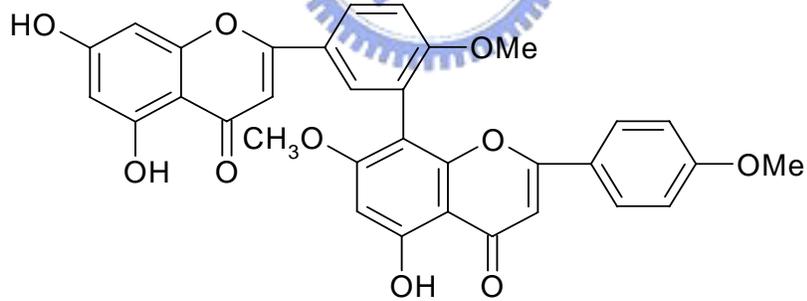
(27) Fortuneine



(34) Hainanolide



(35) Hainanolidol



(36) Kayaflavone

1.3.3 台灣粗榧 (*Cephalotaxus wilsoniana* Hayata) 之簡介

台灣粗榧 (圖1-4) 為常綠中喬木，高達10公尺，樹皮光滑，枝條下垂，小枝對生；頂芽常3枚並列。葉互生，扭生成兩列狀，線形扁平，略呈鐮刀狀

彎曲，先端銳形，基部鈍形，邊緣略為內捲。葉表面深綠色具光澤。背面具顯著灰白色氣孔帶2條。中肋表裏均凸起，雌雄異株。3月開花，雄毬花4~12個成頭狀花序著生於葉腋，雌花芽與新芽並生於小枝之頂端。授粉後於翌10~11月成熟。種子呈橢圓形，成熟時呈暗紫色，種子核果狀近於無柄。特產於本省海拔650~2,700公尺之山區，少量單株散生於針闊葉樹林及針葉樹林中，部分聚生成小族群。在觀霧、東埔山、沙里仙溪、溪頭、翠峰、鞍馬山及北大武山等地區見。本種為狹隘固有之子遺植物，近年來因棲地破壞、盜伐、藥用和園藝栽培等用途遭濫採之故，數量銳減，經列為稀有植物，極待保護。¹⁷



圖1-5 台灣粗榧

1.4 台灣粗榧之研究文獻回顧

1.4.1 Taiwanhomoflavone-A

西元2000年臺灣國立中國醫藥研究所郭曜豪教授從臺灣粗榧之莖部的乙

醇萃取物中，分別用生物活性試驗分層中的各個成分，最後分離得到了一個新的C-Methylated雙黃酮類化合物，Taiwanhomoflavone-A⁴¹（圖1-5）。其化合物結構皆由光譜分析鑑定之。化合物之細胞毒殺試驗顯示對鼻咽癌細胞（KB），結腸癌細胞（COLO-205），肝癌細胞（Hepa-3B）與子宮頸癌細胞（HeLa）具抑制作用，經三天生物活性測試，其ED₅₀數據分別為3.4、1.0、2.0與2.5 μg/ml。

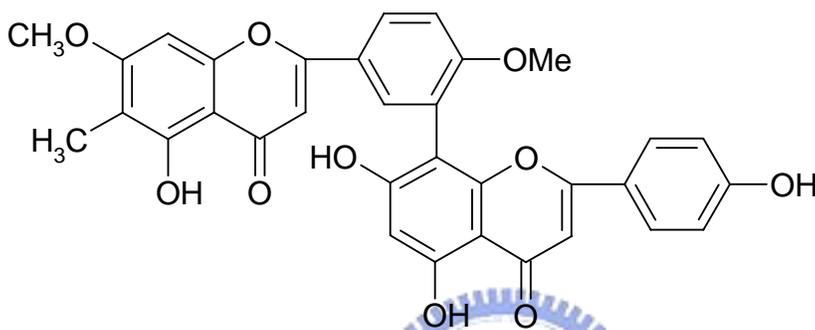


圖1-6 Taiwanhomoflavone-A結構

1.4.2 Taiwanhomoflavone-B

西元2000年臺灣國立中國醫藥研究所郭曜豪教授從臺灣粗榧之嫩枝的乙醇萃取物中，分別用生物活性試驗分層中的各個成分，最後分離得到了一個新的C-Methylated雙黃酮類化合物，Taiwanhomoflavone-B⁴²（圖1-6）。其化合物結構皆由光譜分析鑑定之。化合物之細胞毒殺試驗顯示對鼻咽癌細胞（KB），肝癌細胞（Hepa-3B）具抑制作用，經三天生物活性測試，其ED₅₀數據分別為3.8和3.5 μg/ml。

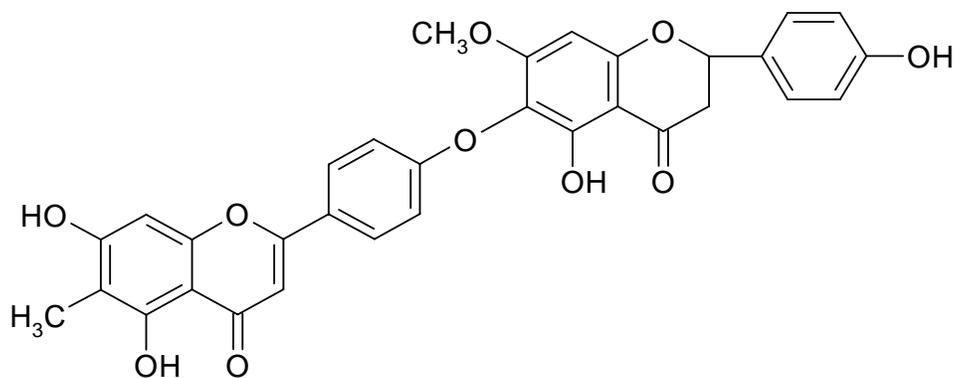


圖 1-7 Taiwanhomoflavone-B結構

1.4.3 C-3-epi-wilsonione

西元2004年台灣高雄醫學大學王立文教授從台灣粗榧之葉子的氯仿萃取物，分別用生物活性試驗分層中分離得到了一個新的homoerythrina alkaloid高刺桐生物鹼，C-3-epi-wilsonione⁴³（圖1-7）。其化合物結構皆由光譜分析鑑定之。化合物之細胞毒殺試驗顯示對高加索人肝癌細胞（Hep-G2），乳腺癌細胞（MCF-7），女性黑人肝癌細胞（Hep-3B），大腸癌細胞（HT-29）具抑制作用，經六天生物活性測試，其IC₅₀數據分別為52.0、42.0、52.0和24.0 μg/ml。

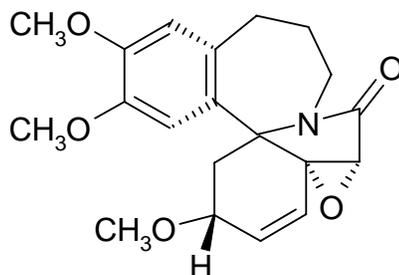


圖 1-8 C-3-epi-wilsonion 結構

1.5 研究動機與目的

台灣為一海島型國家，其中山脈佔了一半以上，最高之海拔超過三千公尺以上，從低海拔至高海拔，包含廣大的生態系，亦含各種不同種類且豐富的植物，這些植物是值得研究的題材。在民間傳統藥物療法已有數千年歷史，其用藥來源皆來自物種豐富的植物，眾多的民間傳統藥物療法一直具有神奇的療效，卻缺乏科學證據及研究，使多數人認為迷信或不值得信服，所以三、四十年前，許多人都認為研究中草藥沒有前途，不如往主流的西醫、西藥發展，如今在華人世界，已投入多年研究在中草藥的領域上，如台灣國立中國醫藥研究所從一九九三年至一九九八年所發表的學術性論文就達 287 篇，近五年間所發表的論文更高達三百多篇，其中更有三分之二的論文被刊載於國際知名的學術期刊上。



台灣粗榧係三尖杉科(*Cephalotaxaceae*)在台灣是屬於裸子植物，也是台灣地區的特有種。依據文獻記載廣泛分布於中央山脈中至高海拔森林內，大多呈單株散生，數量不多。在經濟利用上，據研究本屬植物之近緣植物其枝葉有抗惡性腫瘤、治癌症之效，而深受植物學家的重視。中國大陸已進行天然藥物的成分分析及藥理研究，從同屬植物的三尖杉(*C. fortunei* Hook. f.)分離出抗白血病藥物三尖杉酯鹼及高三尖杉酸鹼，並正式將之收載入藥典之中(邱明華等 1997)。邱永年和張光雄(1992)亦指出台灣粗榧的生物鹼，對於慢性白血病及淋巴瘤有明顯之療效。從開發國內藥用植物資源而言，對台灣特產且唯一的三尖杉科植物台灣粗榧進行資源調查及研究，自是深具意義的。又本植物因生育地減少、園藝栽培及藥用目的被濫採引起生存危機，而被列為稀有之森林植物。

屬三尖杉科的台灣粗榧，為台灣特有種之植物，但在研究上極為缺乏，目前只三篇論文被發表（如1.3台灣粗榧之研究文獻回顧所述），其中有五種成分被分離出來，分別為 Taiwanhomoflavone-A、Taiwanhomoflavone-B、Taiwanhomoflavone-C、C-epi-wilsonione 和 desmethylcephalotaxinone，當中 Taiwanhomoflavone-A、Taiwanhomoflavone-B 及 C-epi-wilsonione 具有生物活性，對細胞有抑制作用。

回顧台灣粗榧先前之研究，其成分之分離從乙醇或氯仿萃取開始，但同一種植物所包含之成分不下千種，而具生物活性之成分更可能分佈於各個有機層和不同極性溶液中，此等未知成分之探索，值得現今和未來所努力的目標，所以本論文使用甲醇作為成分之分離萃取之開始，之後搭配不同極性的再分層，並以液相層析系統作更進一步的分離，最後以癌細胞毒殺試驗作生物活性上的鑑定，以期得到先前研究中所未探索到之化合物。



二、材料與方法

2.1 實驗材料

(1) 培養基和試劑

- a. Fetal bovine serum (FBS)
- b. Dulbecco's MEM (DMEM)
- c. Resewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) Medium
- d. [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT)
- e. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- f. Phosphate-buffer saline (PBS)

(2) 台灣粗榧樹葉之來源

此次實驗中台灣粗榧樹葉的採集，時間是在民國九十三年一月，地點是在台灣南投縣集集鎮溪頭，採集葉子之溼重為 4.6 公斤，並感謝由農委會特有生物研究保育中心植物組李權裕先生辛苦採集。

(3) 癌細胞種類與來源

- a. HeLa : Human cervical epitheloid carcinoma

來源：購自新竹食品工業研究所。

培養液：含有 10% fetal bovine serum (FBS) 的 DMEM。

培養環境：含 5% CO₂，95% air，37°C 之細胞培養箱中。

b. BEAS-2B : Human bronchial epithelial cell line

來源：購自新竹食品工業研究所。

培養液：含有10% fetal bovine serum (FBS) 的RPMI 1640。

培養環境：含5% CO₂，95% air，37°C 之細胞培養箱中。

c. AGS : Human gastric carcinoma epithelial cell line

來源：購自新竹食品工業研究所。

培養液：含有10% fetal bovine serum (FBS) 的RPMI 1640。

培養環境：含5% CO₂，95% air，37°C 之細胞培養箱中。

d. COLO-205 : Human colon carcinoma

來源：購自新竹食品工業研究所。

培養液：含有10% fetal bovine serum (FBS) 的RPMI 1640。

培養環境：含5% CO₂，95% air，37°C 之細胞培養箱中。



2.2 實驗儀器

A. 高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography HPLC) :

a. Agilent 1100 Series Quaternary pump

b. Agilent 1100 Series Diode Array and Multiple Wavelength

c. Column: Inertsil ODS-3 (7 μ m, 20 mm \times 250 mm)與Inertsil 7 ODS-3 (7 μ m, 7.6 mm \times 250 mm)。

B 核磁共振儀 (NMR , Nuclei Magnetic Resonance) : 600 MHz NMR

C 電子撞擊式質譜儀 (EI-MS , Electron Impact-Mass Spectrophotometer)

2.3 分離方法簡述

將粗榧之葉子取下洗淨，得溼重 4.6 公斤，每 300 克溼重之葉子以 1 公升甲醇浸泡絞碎攪拌 24 小時後過濾，所得之甲醇層萃取液以減壓濃縮及冷凍乾燥得甲醇萃取物。將甲醇萃取物置於水中攪拌 24 小時，可得水層萃取液及不溶水層之甲醇萃取物，將水層萃取液冷凍乾燥得水層萃取物。將水層萃取物以正丁醇充分攪拌溶解 24 小時，可得正丁醇層萃取液及不溶正丁醇層之水層萃取物，將正丁醇層萃取液減壓濃縮得正丁醇層萃取物。



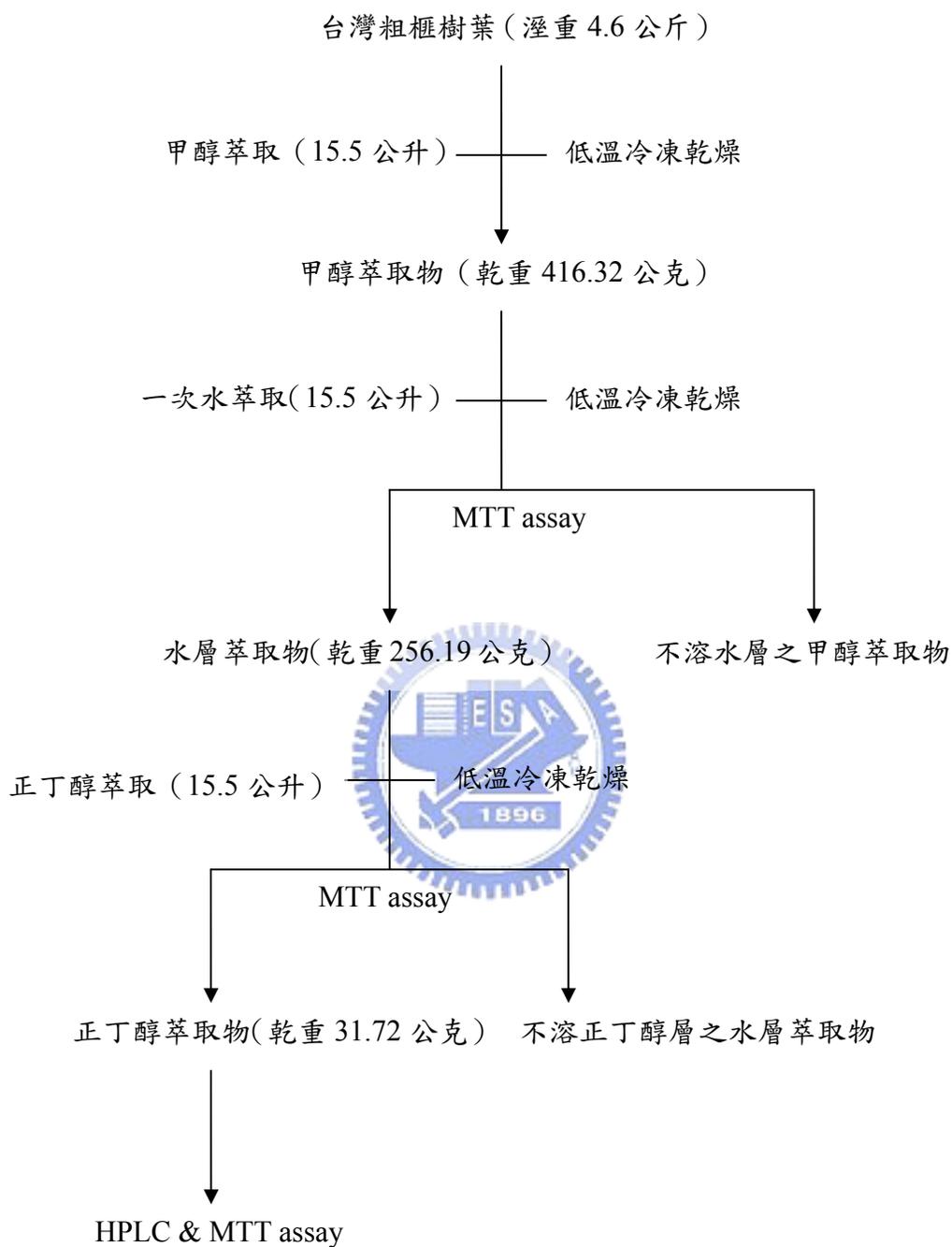


圖 2-1 粗榧葉有機層萃取流程圖

接下來以 HPLC 進一步做分離的動作，以期得到準確的分離效果，並在每一層各個部份，以 MTT assay 確定生物活性，再進一步細分混合物。

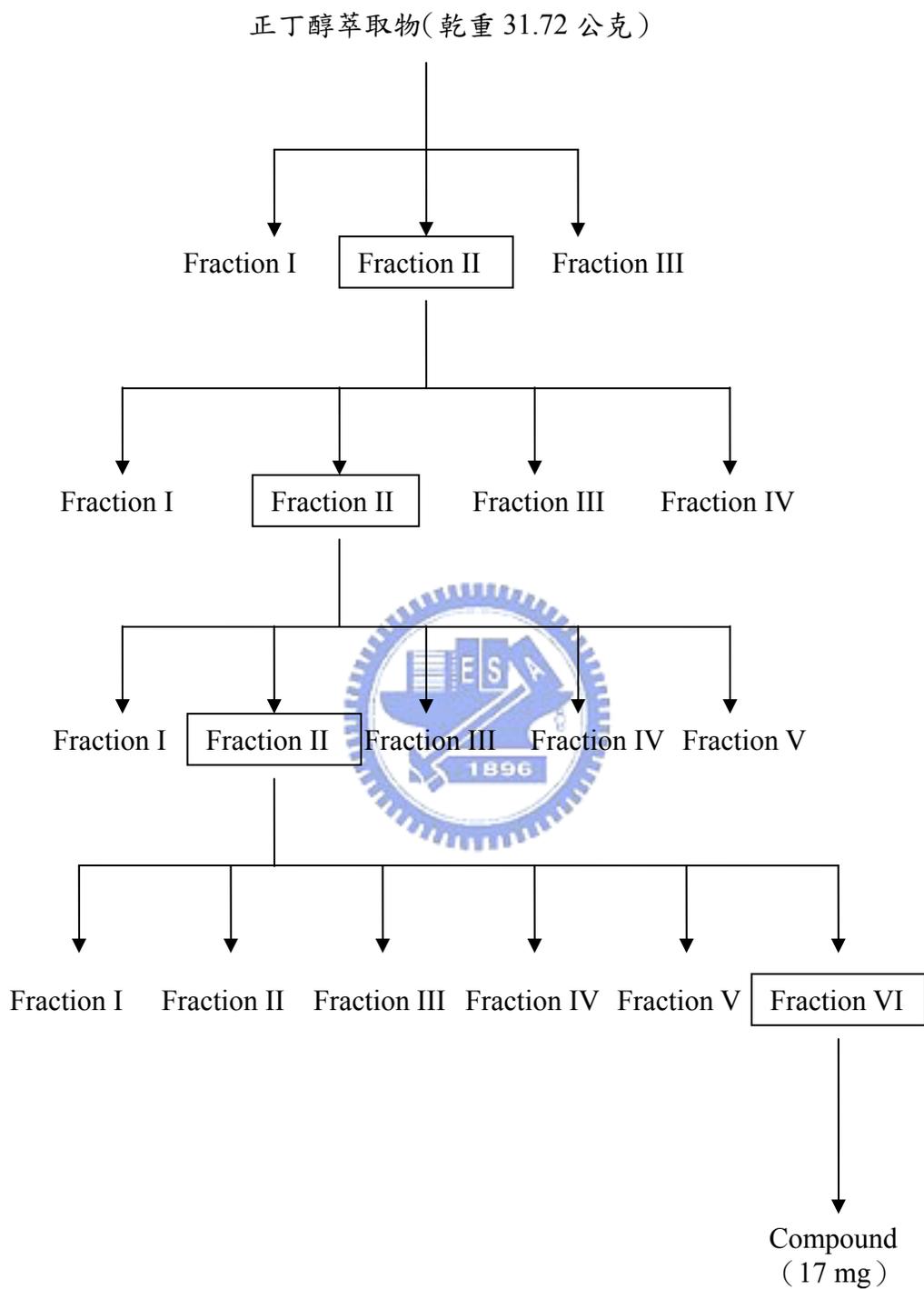
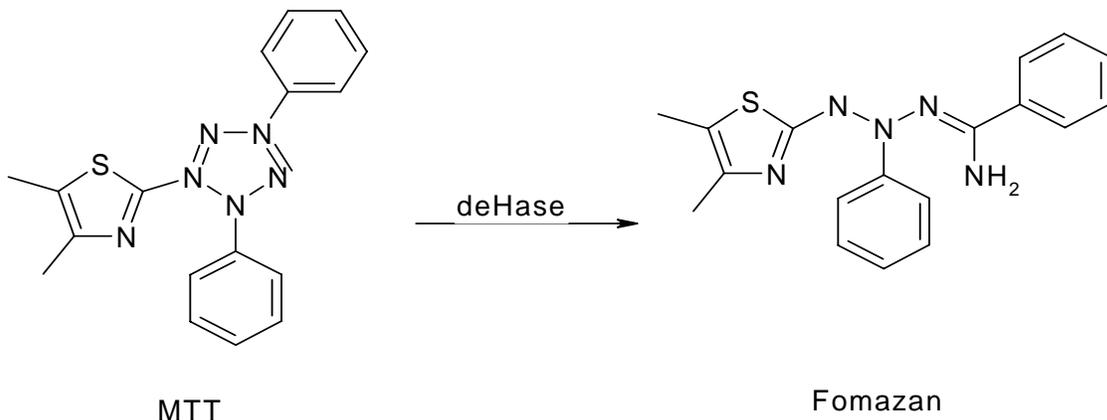


圖 2-2 粗榿葉 HPLC 分析流程圖

2.4 癌細胞毒殺活性檢測 (MTT assay)

(1) 癌細活性測試原理

本實驗利用 colorimetric MTT assay² 之方法來評估檢品之細胞生物活性作用。其原理為：活細胞的粒線體 (mitochondria) 含有各種的脫氫酶酵素 (dehydrogenase)，以脫氫酶酵素活性的測量來反映細胞的生長狀況，利用 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 加入後使活細胞破裂，釋出粒線體內之脫氫酶酵素，造成切斷 MTT 之重氮環 (tetrazolium ring)。此時，顏色會由原有的淡黃色液體轉為暗藍色的甲臍 (formazan) 結晶，而死細胞中的粒線體不具活化的脫氫酶酵素，無法反應產生甲臍結晶，仍維持淡黃色。MTT 在加入經數天培養的細胞培養液中與細胞中的脫氫酶作用四小時後，可產生與脫氫酶酵素活性總量成比例的甲臍結晶沉澱，將培養液倒除，以 DMSO 溶解甲臍結晶，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 讀取波長 570 nm 之吸光值 (optical density: O.D.)。將所得實驗組數據除以控制組，以同一樣品在不同濃度下所得之百分比與濃度的對數值作線性迴歸分析，推算在百分比為 50% 時的濃度值，作為樣品對癌細胞之生物活性指標，此即 ED₅₀ (Effective dose 50%)。



(2) 實驗流程

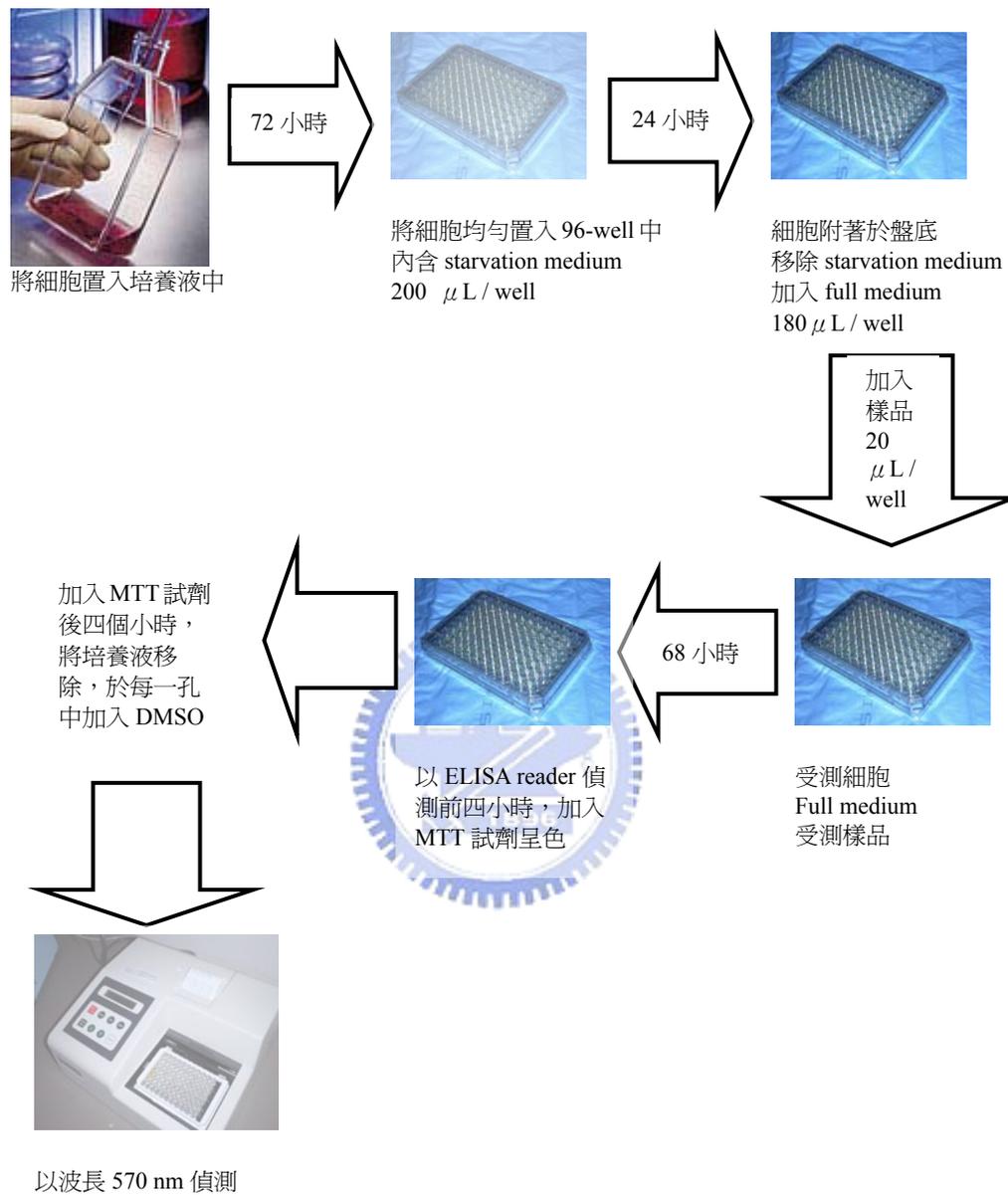


圖 2-3 MTT assay² 流程圖

(3) 樣品濃度：

秤取約2.0 mg 樣品以100 % DMSO 溶解成 5 mg/mL，再以DMSO 作序列稀釋成5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125 mg/mL，使用Full medium 稀釋成50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125 μ g/mL（此時在Full medium 含1% DMSO）。

(4)實驗方法：

當癌細胞長至培養瓶單層長滿時，以2 ml的trypsin於37 °C恆溫箱中作用2~3分鐘，分離出癌細胞，經染色劑[trypan blue solution (0.4 %)]染色並至於顯微鏡下計數細胞數目，將細胞濃度配置成 3×10^3 cells/well 置入96 孔培養盤 (culture plate)中(此時細胞液為180 μ l/well)，經過4~5小時後加入不同濃度的樣品。經72小時的培養後，加入MTT 20 μ l (1 mg/mL)，於5 %二氧化碳，37 °C恆溫培養箱中培養四個小時，去除所有液體，再加入200 μ l 的DMSO，溶解formazan 結晶於震盪機振10分鐘。以酵素免疫分析儀(ELISA reader)於波長570 nm下，測定其光學活性(O.D.)，並利用O.D.值計算ED₅₀值。

(5) 細胞毒性評估

Crude extract：ED₅₀ ≤ 20 μ g/mL，則視為有效。

Pure compound：ED₅₀ ≤ 4 μ g/mL，則視為有效。

以上是根據NCI (National Cancer Institute)之準則

ED₅₀(50 % inhibition concentration)代表藥物能抑制50 %癌細胞生長的濃度。

2.5 天然物分離實驗流程

實驗之初，有香杉、油杉、粗榧三種植物，將三種植物之樹葉及嫩枝部份取下洗淨，分別絞碎，用甲醇浸泡萃取 24 小時後，再經過濾和減壓濃縮，取得香杉、油杉、粗榧三種植物之甲醇萃取物，對 HeLa cell 進行四重複的 MTT assay。

於香杉，油杉和粗榧之樹葉及嫩枝等六種固狀萃取物中，各取 50mg 溶於 1mL DMEM 中，做超音波震盪後，經 0.2 μ m membrane 過濾，作為 MTT assay 之藥劑。HeLa 在內有 full medium (90% DMEM, 10% FBS, 1% PS) 培養盤中培養 72 小時。之後將 HeLa cell 分裝兩離心管並離心，其中一管分裝在培養基中繼續培養(含 90% DMEM, 10% FBS, 1% PS)，另一管分裝在內含 starvation medium (0.04% FBS, 99.6% DMEM) 之 96 孔培養盤中，培養 12 小時使 HeLa 附著於 96 孔培養盤底部。抽去 96 孔培養盤中的 starvation medium，加入 180 μ l 培養液(90% DMEM, 10% FBS, 1% PS)於每個盤孔中，加入已製備好之藥劑 20 μ l / well，培養 72h 後做 MTT assay (前 4~8h 加入 MTT)，測吸光值。

在香杉、油杉和粗榧之葉樹及嫩枝中，以粗榧樹葉對 HeLa cell 之生長具有較強的抑制作用，換言之，粗榧樹葉在甲醇層中含有對 HeLa cell 抑制生長之成分，又因甲醇萃取物必須事先溶於 full medium 中後過濾，更可進一步推測粗榧樹葉之甲醇萃取物在水層中含有對 HeLa cell 抑制生長的成分，故可將甲醇萃取物溶於一次水中攪拌 24 小時後過濾，可得水層萃取液和不溶水層之甲醇萃取物，取得之水層萃取液置 -80 $^{\circ}$ C 冷凍後，進行冷凍乾燥，得水層萃取物。

將水層萃取物溶於正丁醇中後過濾，可得正丁醇層萃取液和不溶於正丁醇層之水層萃取物，取得之正丁醇層萃取液減壓濃縮，得正丁醇層萃取物。將正丁醇層萃取物和不溶於正丁醇層之水層萃取物對 HeLa cell 做四重複 MTT assay。

將正丁醇層萃取物 (A drug) 和不溶正丁醇層之水層萃取物 (B drug) 分別溶於 DMEM 中，做超音波震盪後，經 0.2 μm 孔徑的濾膜過濾，系列稀釋配製成 20、10、5.0、2.5、1.25 mg/ml 之濃度，做為測 MTT assay 之藥劑。HeLa 在內有 full medium (90% DMEM, 10% FBS, 1% PS) 之培養皿中培養 72 小時。將 HeLa cell 分裝兩離心管並離心，兩管分裝在兩個培養盤中，皆含 starvation medium (0.04% FBS, 99.6% DMEM)，培養 12 小時使 HeLa 附著於培養盤底部。抽去培養盤中的 starvation medium，加入 180 μl 培養液 (90% DMEM, 10% FBS, 1% PS) 於培養盤每個孔中，加入已製備好之 20 μl 藥劑，培養 72 小時後做 MTT assay (前 4~8 小時加入 MTT)，測吸光值。

經實驗測試，正丁醇萃取物對 HeLa cell 之生長具有較強的抑制作用，在此，接著以 HPLC 分離正丁醇層中的成分。

在 HPLC 的分析條件中，以二次蒸餾水和乙腈搭配做為流動相，此兩種溶劑皆含有 0.1% 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid ; TFA)，流動相搭配方式為第二百零分鐘至第七分鐘以 80% 二次蒸餾水和 20% 乙腈混合，第七分鐘至第十二分鐘由 80% 二次蒸餾水和 20% 乙腈呈線性改變為 60% 二次蒸餾水和 40% 乙腈，第十二分鐘至第十七分鐘維持在 60% 二次蒸餾水和 40% 乙腈，第十七分鐘至第二十二分鐘由 60% 二次蒸餾水和 40% 乙腈呈線性改變為 0%

二次蒸餾水和 100% 乙腈，第二十二分鐘至第二十五分鐘維持在 0% 二次蒸餾水和 100% 乙腈，第二十五分鐘至第二十八分鐘由 0% 二次蒸餾水和 100% 乙腈呈線性改變為 100% 二次蒸餾水和 0% 乙腈。(圖 2-4)

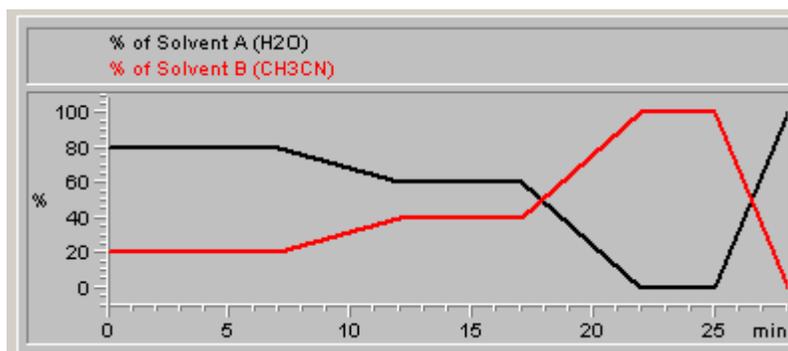


圖 2-4 第一層 HPLC 移動相比例示意圖

第一層 HPLC 分析圖共分為三個時間區域收集（第零分鐘至第八分三十秒為第一個時間區域；第八分三十秒至第十三分鐘為第二個時間區域；第十三分鐘至第二十八分鐘為第三個時間區域），再將此三個時間區域所收集之樣品做 MTT assay。第二個時間區域和第三個時間區域較具生物活性，決定由第二個時間區域之樣品作進一步的 HPLC 分析。在 HPLC 的分析條件中，以二次蒸餾水和乙腈搭配做為流動相，此兩種溶劑皆含有 0.1% 三氟乙酸（trifluoroacetic acid；TFA），流動相搭配方式為第零分鐘至第十五分鐘以 58% 二次蒸餾水和 42% 乙腈混合，第十五分鐘至第二十分鐘由 58% 二次蒸餾水和 42% 乙腈呈線性改變為 0% 二次蒸餾水和 100% 乙腈，第二十分鐘至第二十五分鐘維持在 0% 二次蒸餾水和 100% 乙腈，第二十五分鐘至第二十八分鐘由 0% 二次蒸餾水和 100% 乙腈呈線性改變為 100% 二次蒸餾水和 0% 乙腈。(圖 2-5)

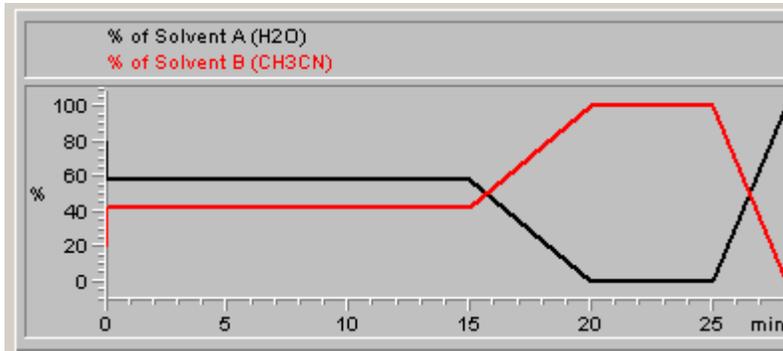


圖 2-5 第二層 HPLC 移動相比例示意圖

第二層 HPLC 分析圖共分為四個時間區域收集（第三分鐘至第五分三十秒為第一個時間區域；第五分三十秒至第十五分鐘為第二個時間區域；第十五分鐘至第二十分鐘為第三個時間區域；第二十分鐘至第二十八分鐘為第五個時間區域），再將此四個時間區域所收集之樣品做 MTT assay。

實驗結果得知以第二個時間區域和第三個時間區域之樣品具生物活性，決定以第二個時間區域作進一步 HPLC 分析，將之細分。在 HPLC 的分析條件中，以二次蒸餾水和乙腈搭配做為流動相，此兩種溶劑皆含有 0.1% 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid ; TFA)，流動相搭配方式為第二百零分鐘至第二十六分鐘以 62% 二次蒸餾水和 38% 乙腈混合。

第三層 HPLC 分析圖共分為五個區域收集(第三分鐘至第五分三十秒為第一個時間區域；第五分三十秒至十一分三十秒為第二個時間區域；十一分三十秒至第十四分鐘為第三個時間區域；第十四分鐘至第二十二分鐘為第四個時間區域；第二十二分鐘至第二十四分鐘為第五個時間區域)，再將此五個時間區域所收集之樣品做 MTT assay。經實驗結果顯示，第二個時間區域和第三個時間區域兩者具有生物活性，決定用 HPLC 對第二個時間區域所收集之樣品

作分析，將之細分。在 HPLC 的分析條件中，以二次蒸餾水和乙腈搭配做為流動相，此兩種溶劑皆含有 0.1%三氟乙酸 (trifluoroacetic acid ; TFA)，流動相搭配方式為第零分鐘至第二十六分鐘以 62% 二次蒸餾水和 38% 乙腈混合。

第四層 HPLC 分析圖共分為六個區域收集(第四分鐘至第八分鐘為第一個時間區域；第八分鐘至第十二分三十秒為第二個時間區域；第十二分三十秒至第十五分鐘為第三個時間區域；第十五分鐘至第十七分鐘為第四個時間區域；第十七分鐘至第二十二分鐘為第五個時間區域；第十五分鐘至第二十六分鐘為第六個時間區域)，再將此六個時間區域所收集之樣品做 MTT assay。經實驗結果顯示，第五個時間區域和第六個時間區域之樣品具有較強生物活性。決定以生物活性最強之第六個時間區域以 HPLC 作進一步的分析。在 HPLC 的分析條件中，以二次蒸餾水和乙腈搭配做為流動相，此兩種溶劑皆含有 0.1%三氟乙酸 (trifluoroacetic acid ; TFA)，流動相搭配方式為第零分鐘至第三十二分鐘以 80% 二次蒸餾水和 20% 乙腈混合，第三十二分鐘至五十二分鐘由 80% 二次蒸餾水和 20% 乙腈呈線性改變為 0% 二次蒸餾水和 100% 乙腈，第五十二分鐘至五十七分鐘維持在 0% 二次蒸餾水和 100% 乙腈。(圖 2-6)

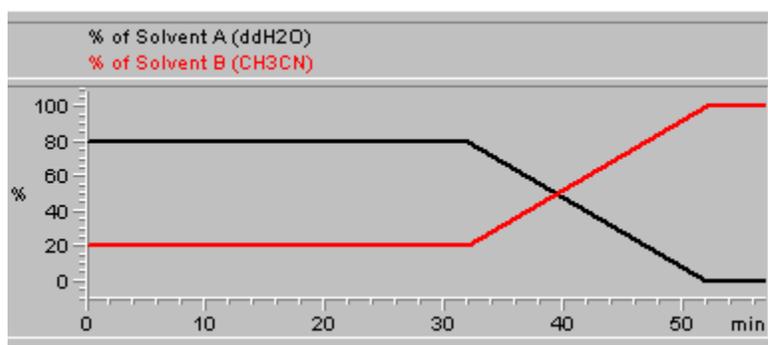


圖 2-6 第五層 HPLC 移動相比例示意圖

第五層 HPLC 分析圖共分為兩部份收集(第四十八分三十秒至第四十九分鐘為單一峰收為一部分，其餘收為另一部分)，再將此兩部份做 MTT assay。經實驗顯示，單一的部份有較高的生物活性，另一部份則無，到此，單一生物活性成分已被分離出來。



三、結果與討論

3.1 有機層分析

3.1.1 植物之篩選

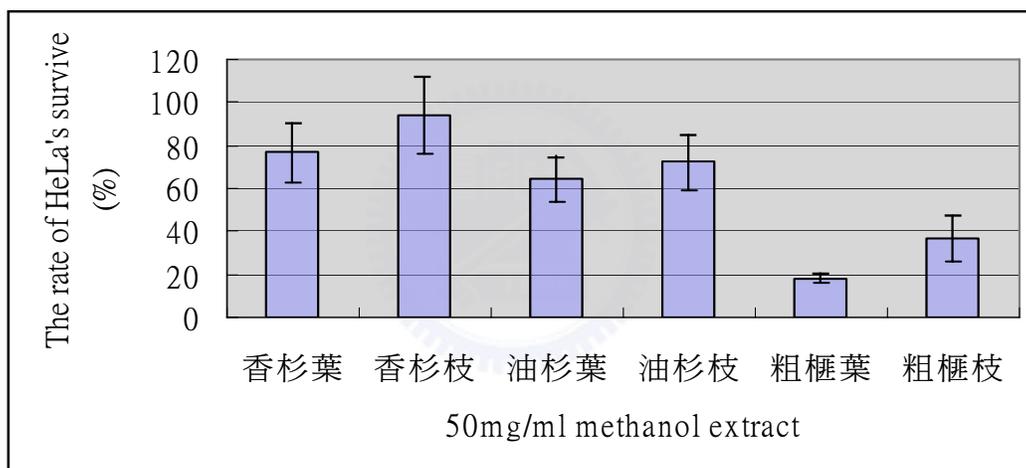


圖 3-1 香杉、油杉和粗榧之樹葉及嫩枝的 MTT assay 比較

由香杉、油杉和粗榧三种植物的樹葉和嫩枝以甲醇萃取所得之萃取物對 HeLa cell 作一初步的生物活性篩選，根據圖 3-1 結果得知，生物活性由強至弱依序為粗榧葉、粗榧枝、油杉葉、油杉枝、香杉葉、香杉枝。

3.1.2 有機層之分析

將粗榧葉甲醇萃取物先經水層之萃取，再將水層萃取物以正丁醇做萃取並

以 MTT assay 確認生物活性。

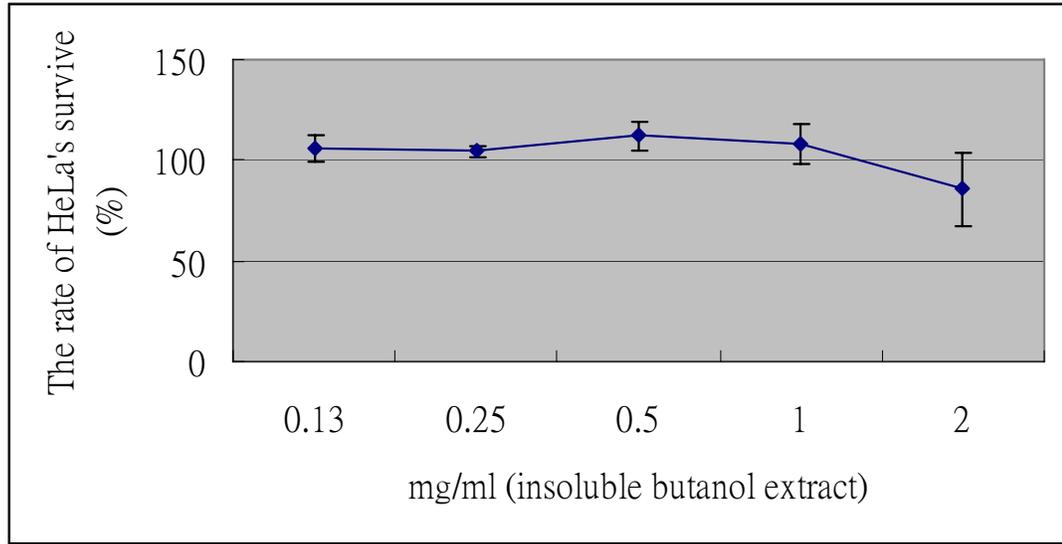


圖 3-2-1 不溶於正丁醇萃取物之 MTT assay

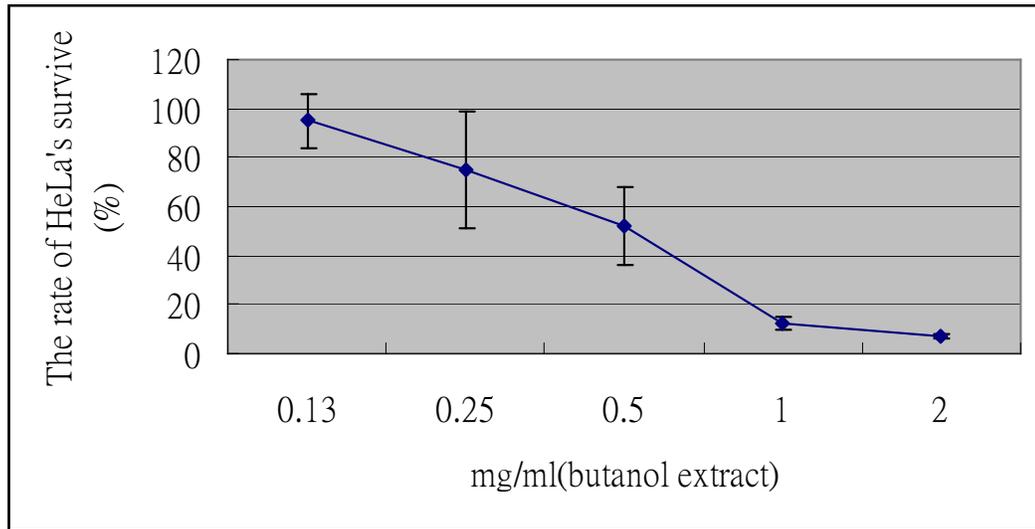


圖 3-2-2 溶於正丁醇萃取物之 MTT assay

經圖 3-2-1、圖 3-2-2 及表 3-1 之觀察，以溶於正丁醇萃取物生物活性較強，所以以正丁醇萃取物來作進一步的分析測試。

3.2 HPLC 分析

3.2.1 第一層 HPLC 分析

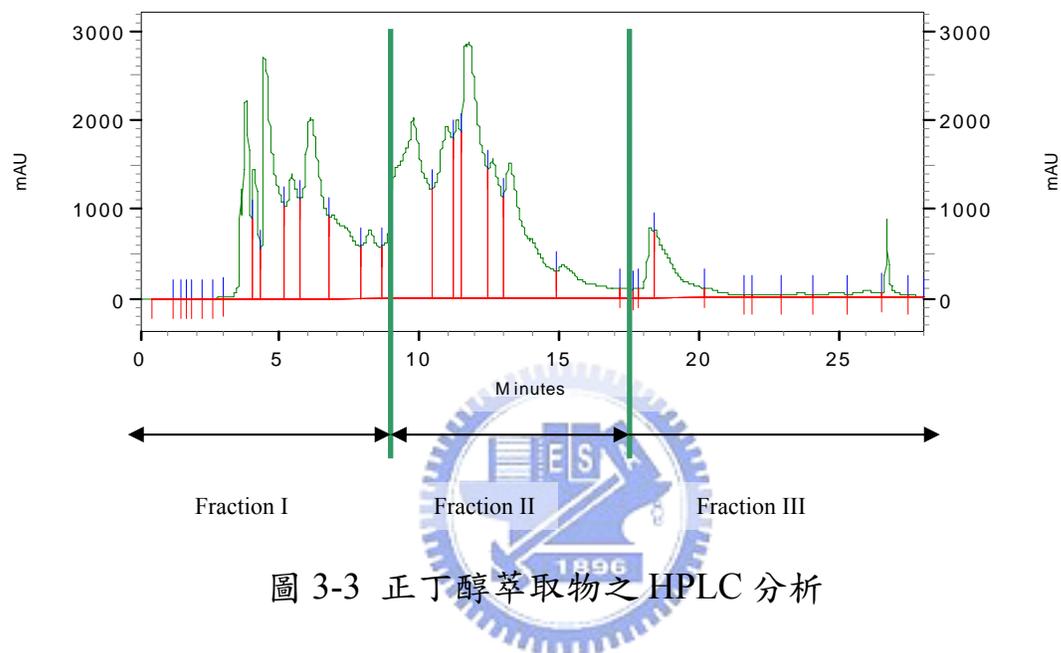


圖 3-3 正丁醇萃取物之 HPLC 分析

min	0	7	12	17	22	25	28
ddH ₂ O (0.1% TFA)	80%	80%	60%	60%	0%	0%	100%
CH ₃ CN (0.1% TFA)	20%	20%	40%	40%	100%	100%	0%

管柱：ODS-3 4.6*250nm

注入的樣品量：750uL

流速：10mL/min

偵測波長：225nm

第一層 HPLC 分析圖中，將收集三個時間區域的樣品以 MTT assay 分析對 HeLa cell 來確認其生物活性。

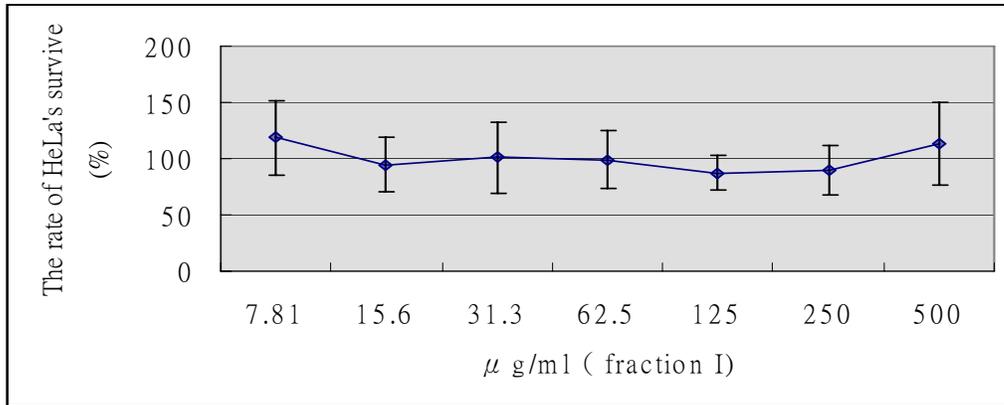


圖 3-4-1 由圖 3-3 中 HPLC 分析收得第一個時間區域樣品之 MTT assay

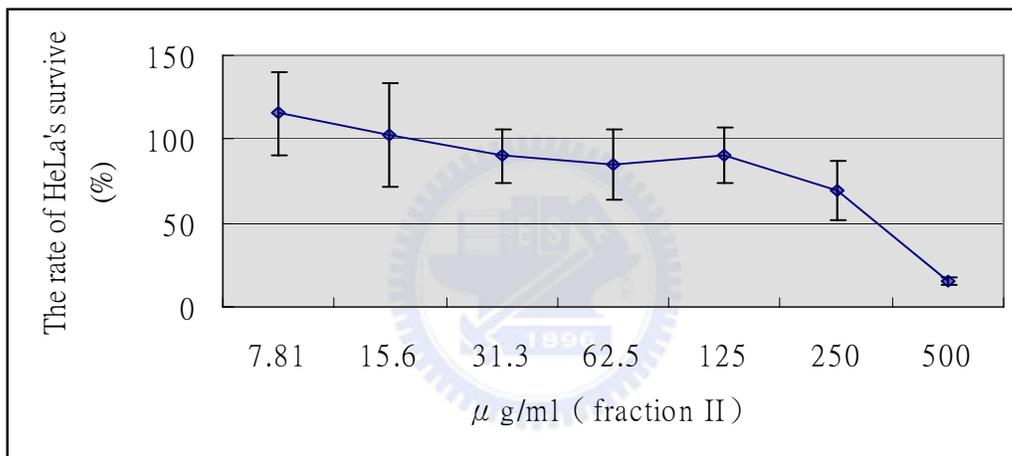


圖 3-4-2 由圖 3-3 中 HPLC 分析收得第二個時間區域樣品之 MTT assay

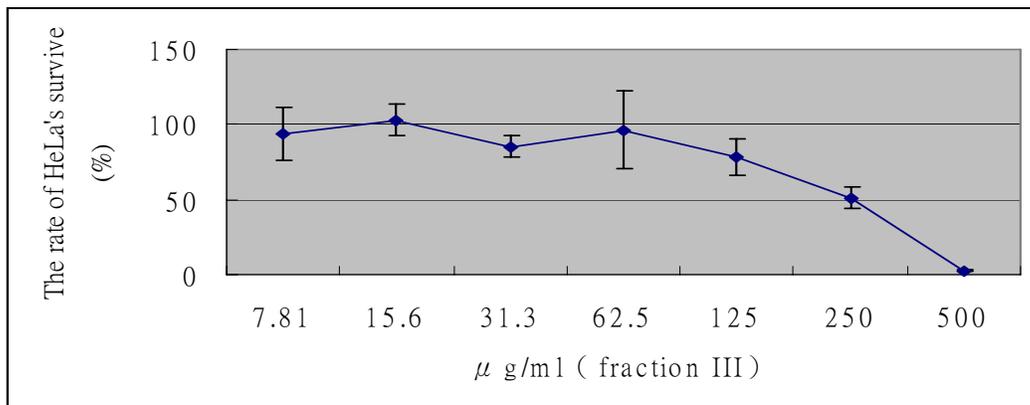


圖 3-4-3 由圖 3-3 中 HPLC 分析收得第三個時間區域樣品之 MTT assay

由圖 3-4-1、圖 3-4-2、圖 3-4-3 及表 3-2 來比較，以第二個時間區域和第三個時間區域的樣品生物活性較強，在配合圖 3-3 的觀察，第二個時間區域所含成分較為複雜，推測當中所含單一成分的生物活性應較強，故在此以第一層 HPLC 分析中的第二個時間區域作為研究方向，將之繼續細分。

3.2.2 第二層 HPLC 分析

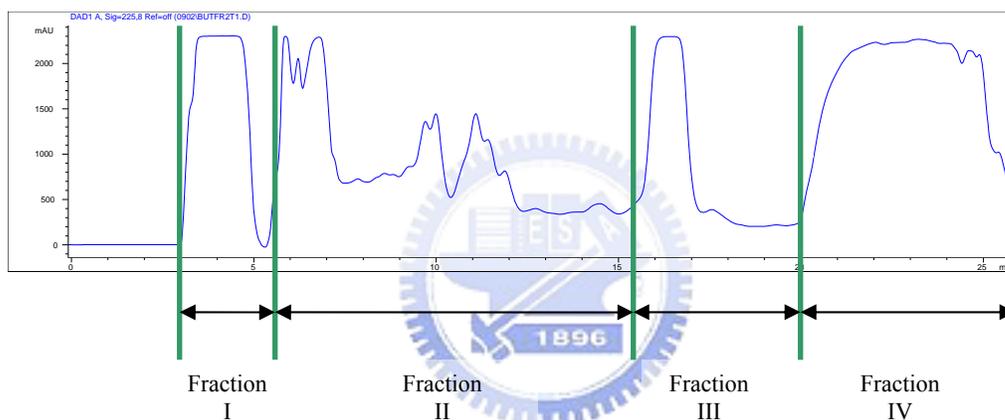


圖 3-5 正丁醇萃取物之第二層 HPLC 分析

min	0 -----> 15	15 -----> 20	20 -----> 25	25 -----> 28	
CH ₃ CN (0.1% TFA)	42%	42%	100%	100%	0%
ddH ₂ O (0.1% TFA)	58%	58%	0%	0%	100%

管柱：ODS-3 20*250nm

注入的樣品量：750uL

流速：10mL/min

偵測波長：225nm

流速：10mL/min

偵測波長：225nm

第二層 HPLC 分析圖中，將收集四個時間區域的樣品以 MTT assay 分析對 HeLa cell 來確認其生物活性。

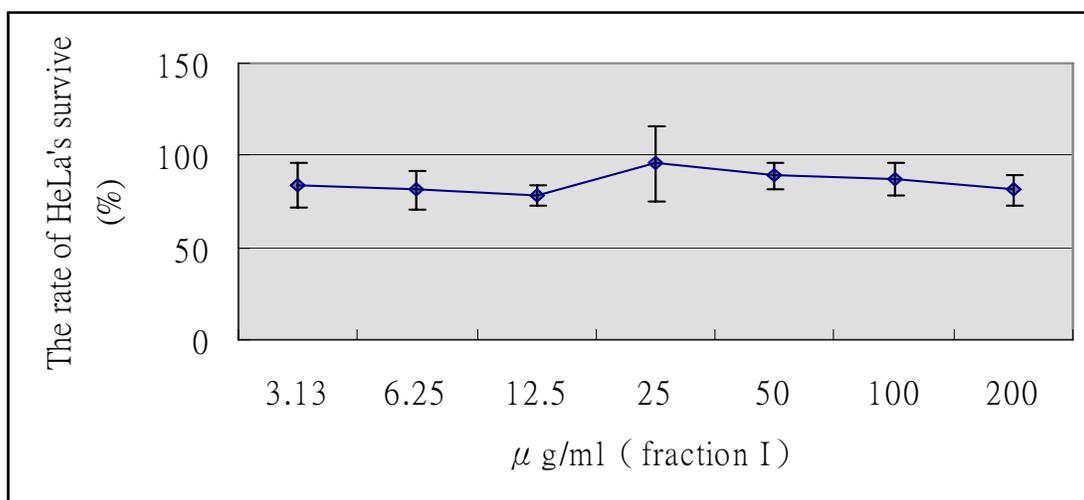


圖 3-6-1 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得第一個時間區域樣品之 MTT assay

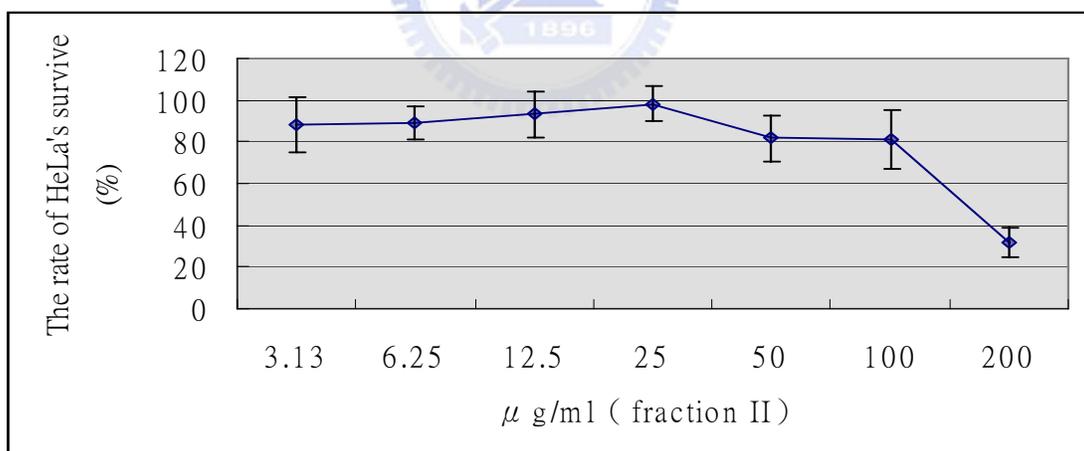


圖 3-6-2 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得第二個時間區域樣品之 MTT assay

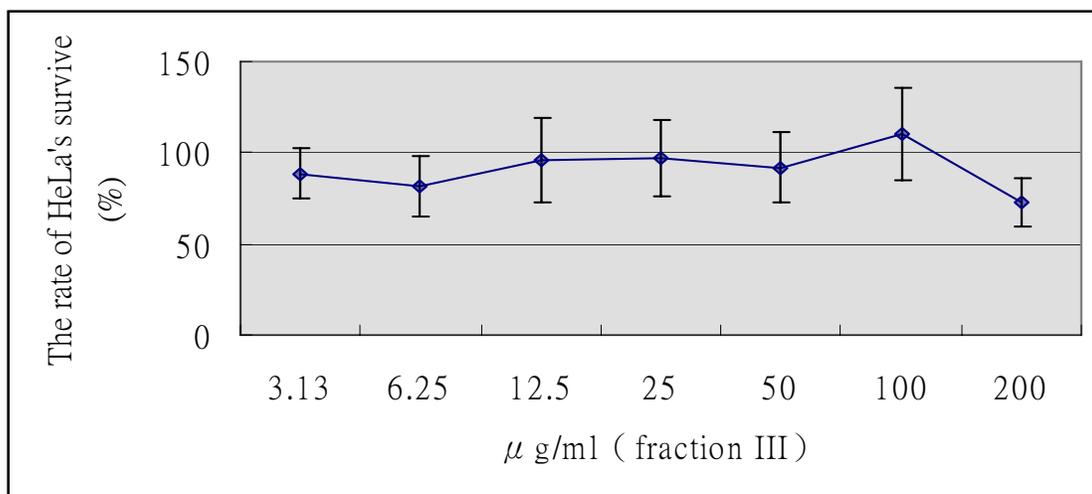


圖 3-6-3 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得第三個時間區域樣品之 MTT assay

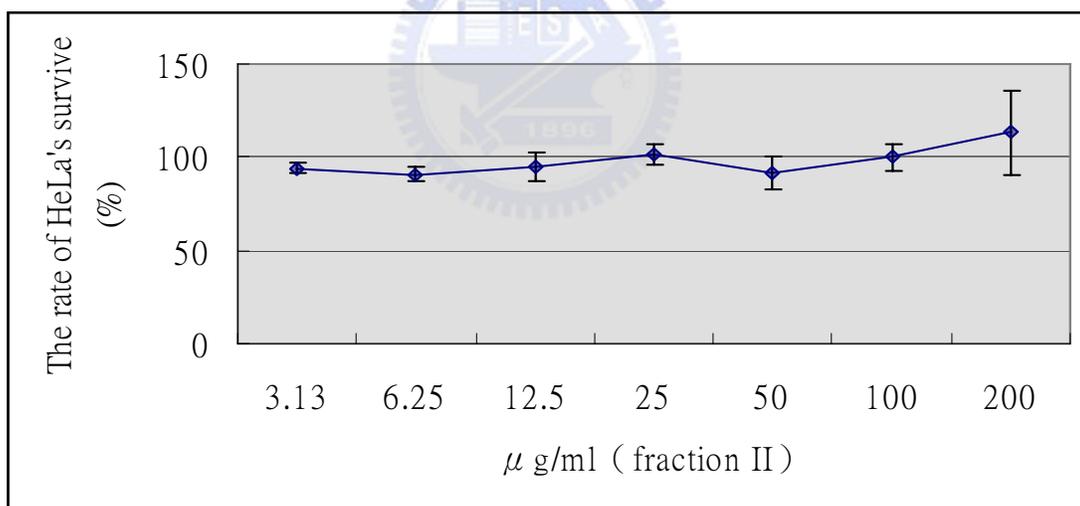


圖 3-6-4 由圖 3-5 中正丁醇第二層 HPLC 分析收得第四個時間區域樣品之 MTT assay

在圖 3-6-1~3-6-4 中，以第二個時間區域和第三個時間區域樣品具生物活性，但以 HPLC 分析圖中來觀察判斷，第二個時間區域樣品中含有較多的混合

物，當中可能含有較毒的單一成分，故在此判斷，以第二個時間區域樣品作 HPLC 分析，將之細分。

3.2.3 第三層 HPLC 分析

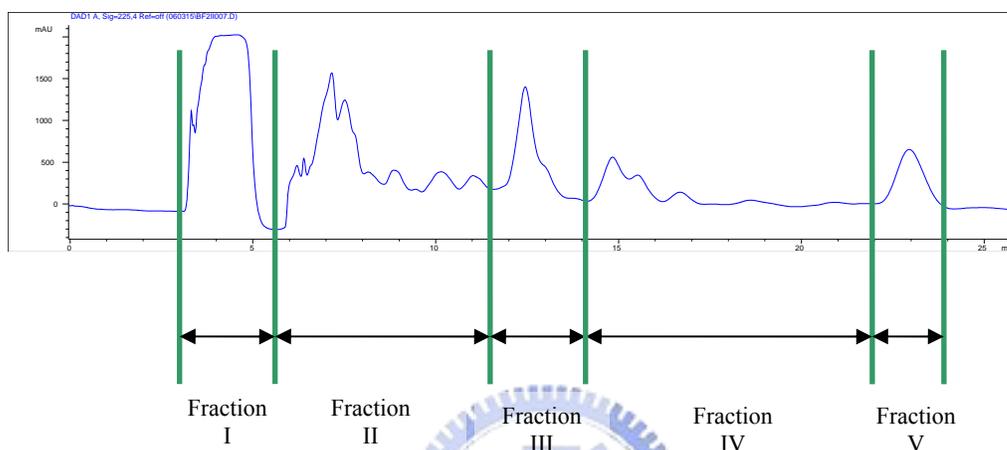


圖 3-7 正丁醇萃取物之第三層 HPLC 分析

min	0	----->	26
CH ₃ CN (0.1% TFA)	38%		38%
ddH ₂ O (0.1% TFA)	62%		62%
管柱：ODS-3 20*250nm			
注入量：500uL			
流速：10mL/min			
偵測波長：225nm			

第三層 HPLC 分析圖中，將收集五個區域的樣品以 MTT assay 分析對 HeLa cell 來確認其生物活性。

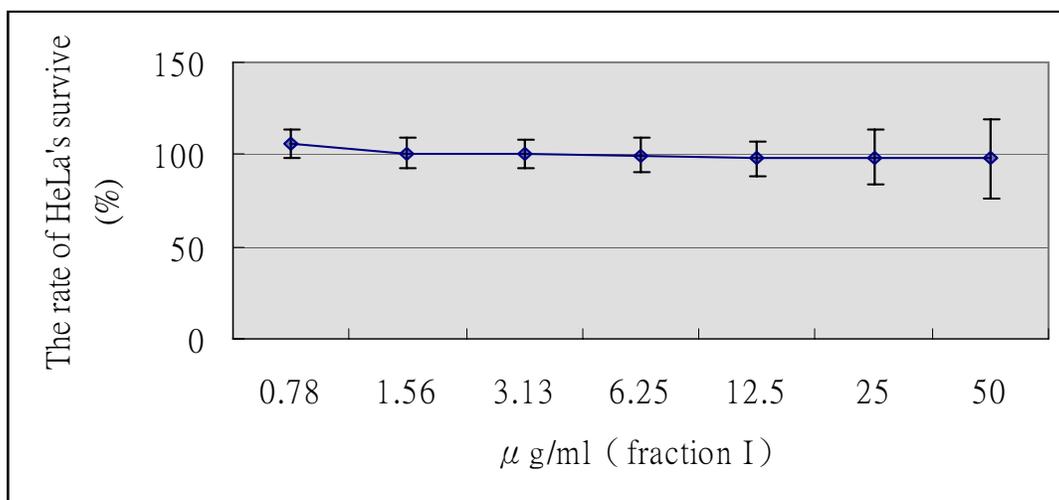


圖 3-8-1 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得第一個時間區域樣品之 MTT assay

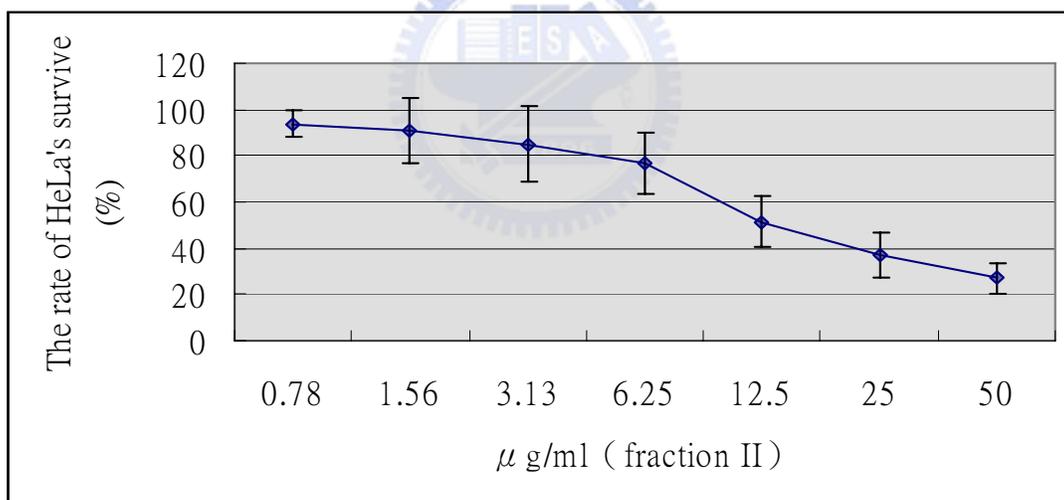


圖 3-8-2 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得第二個時間區域樣品之 MTT assay

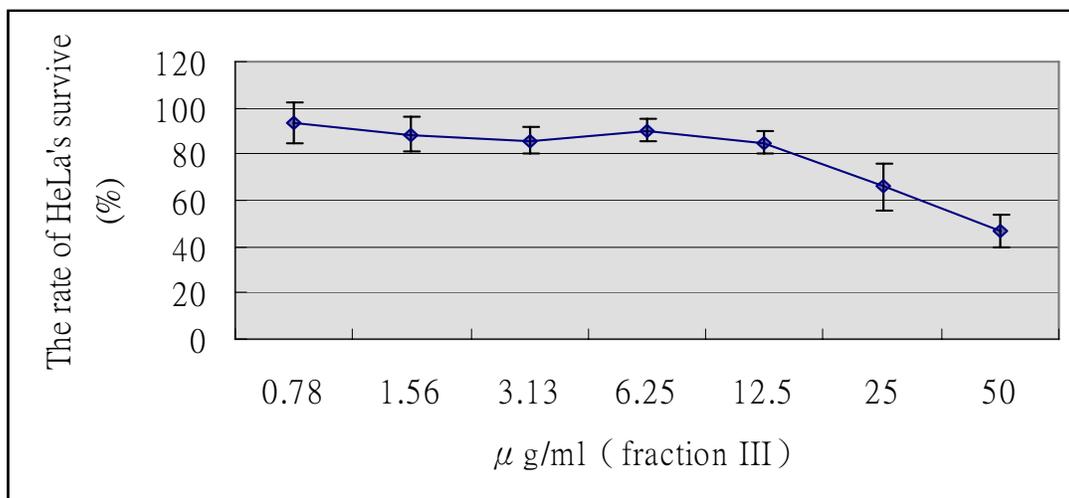


圖 3-8-3 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得第三個時間區域樣品之 MTT assay

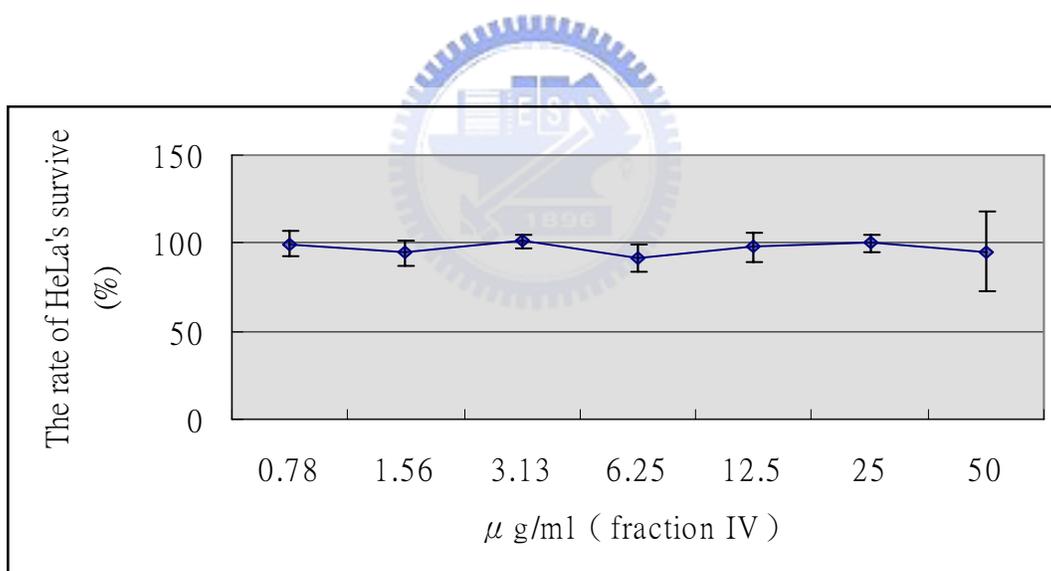


圖 3-8-4 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得第四個時間區域樣品之 MTT assay

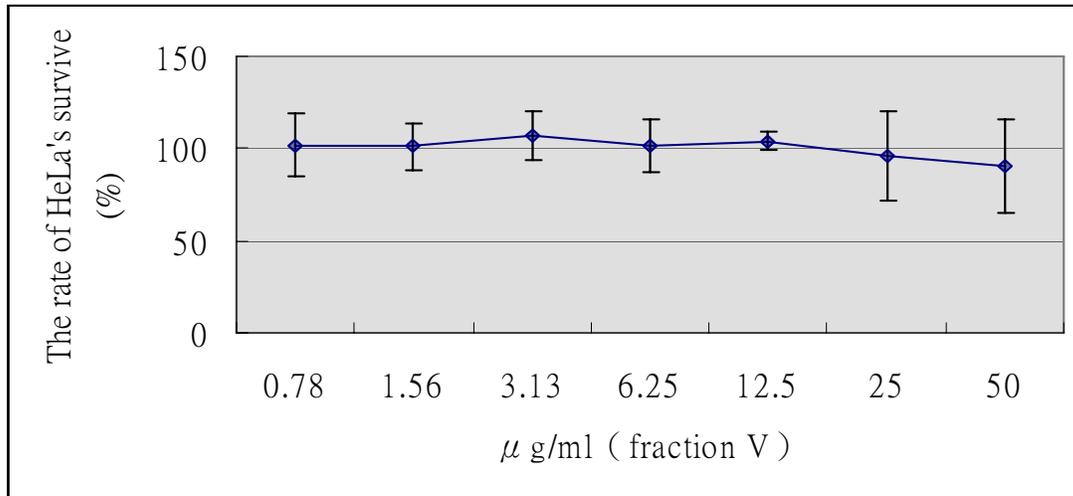


圖 3-8-5 由圖 3-7 中正丁醇第三層 HPLC 分析收得第五個時間區域樣品之 MTT assay

由這五張 MTT assay 結果(圖 3-8-1~3-8-5)顯示，第二個時間區域和第三個時間區域樣品具有生物活性，當中第三個時間區域在 HPLC 圖中看似單一的峰，所含成分應當較少且單純，相對的，在第二個時間區域中含有較多且複雜的成分，但考慮到尋求對癌細胞有較高生物活性的單一成分為目標，猜測在第二個時間區域中應有高於第三個時間區域生物活性的單一成分。故在實驗方向上，用 HPLC 對第二個時間區域樣品作分析，將之細分。

3.2.4 第四層 HPLC 分析

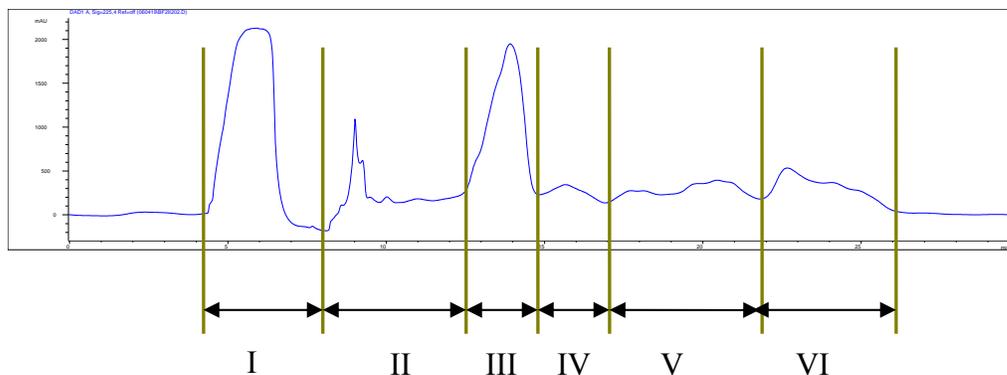


圖 3-9 正丁醇萃取物之第四層 HPLC 分析

min 0 -----> 26
CH₃CN (0.1% TFA) 25% 25%
ddH₂O (0.1% TFA) 75% 75%
管柱：ODS-3 20*250mm
注入量：500uL
流速：10mL/min
偵測波長：225nm

第四層 HPLC 分析圖中，將收集六個時間區域的樣品以 MTT assay 分析對 HeLa cell 來確認其生物活性。

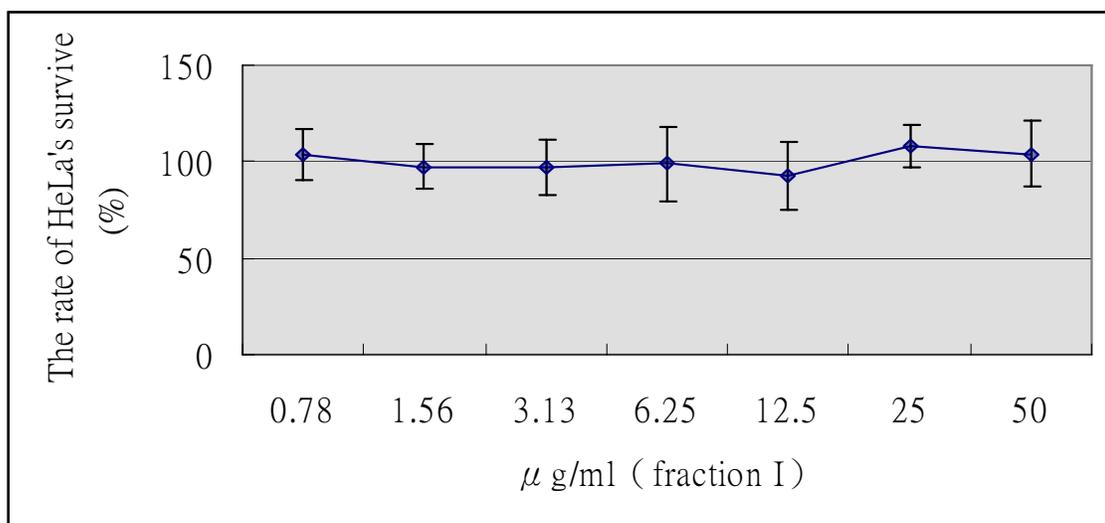


圖 3-10-1 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得第一個時間區域樣品之 MTT assay

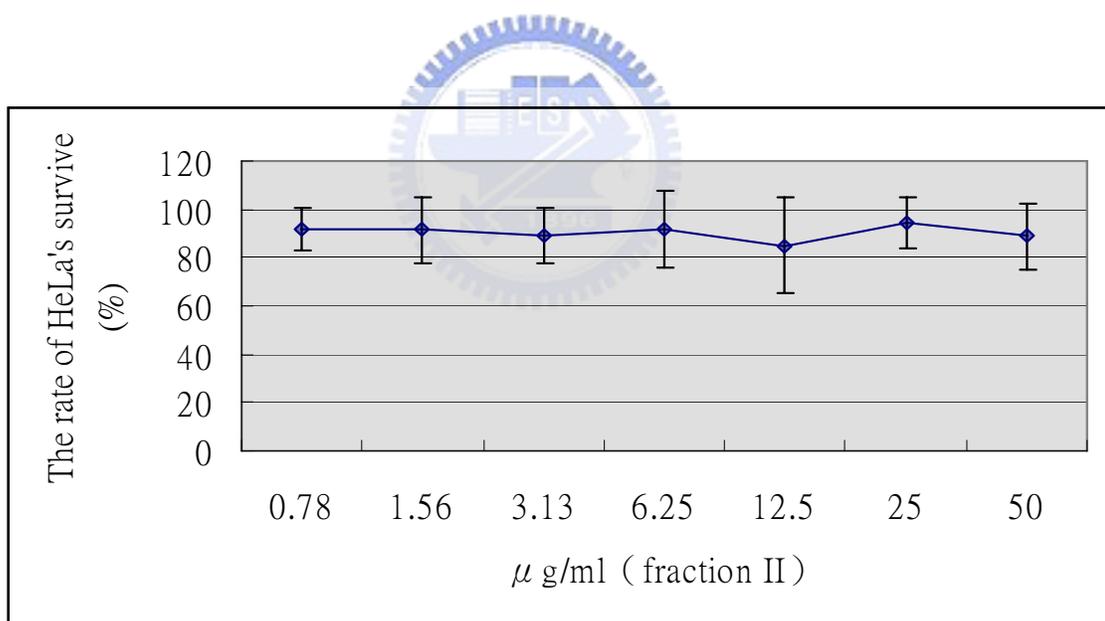


圖 3-10-2 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得第二個時間區域樣品之 MTT assay

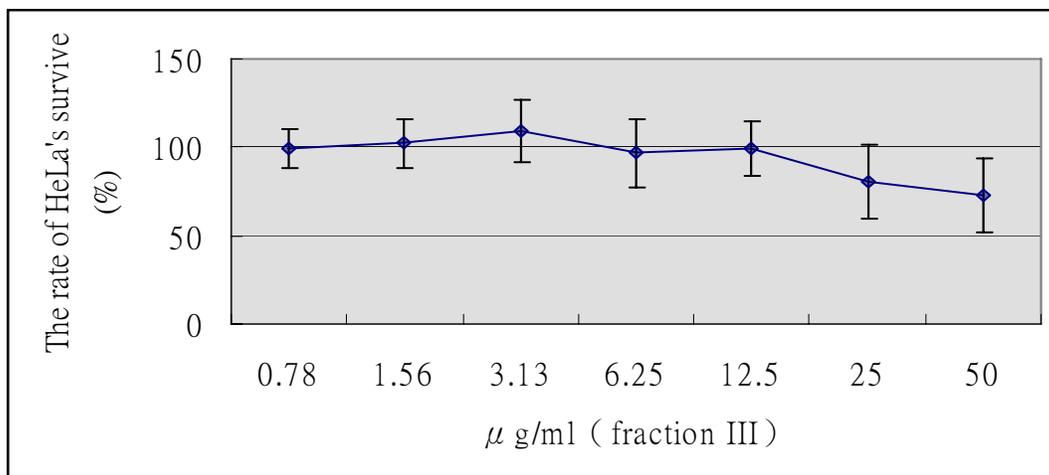


圖 3-10-3 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得第三個時間區域樣品之 MTT assay

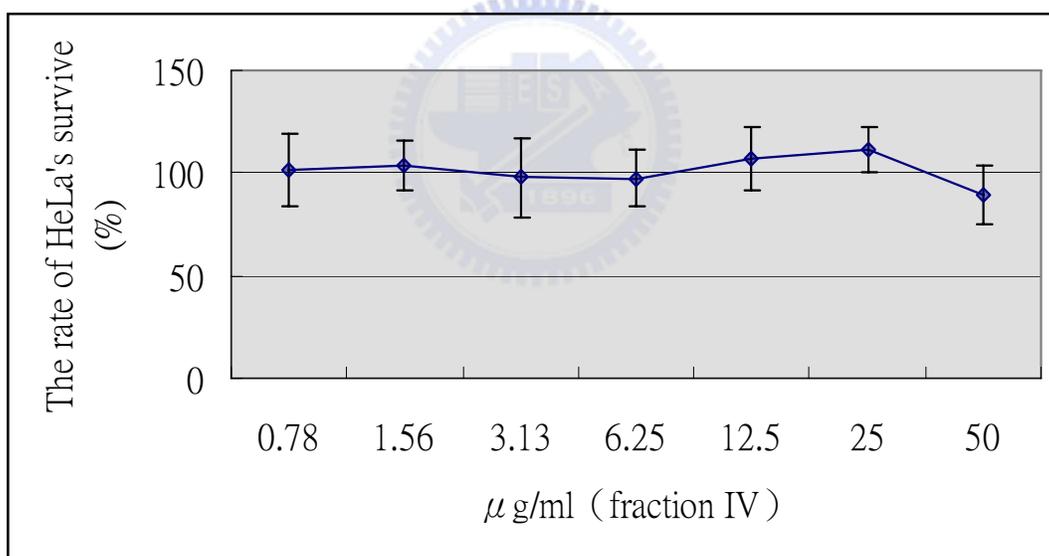


圖 3-10-4 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得第四個時間區域樣品之 MTT assay

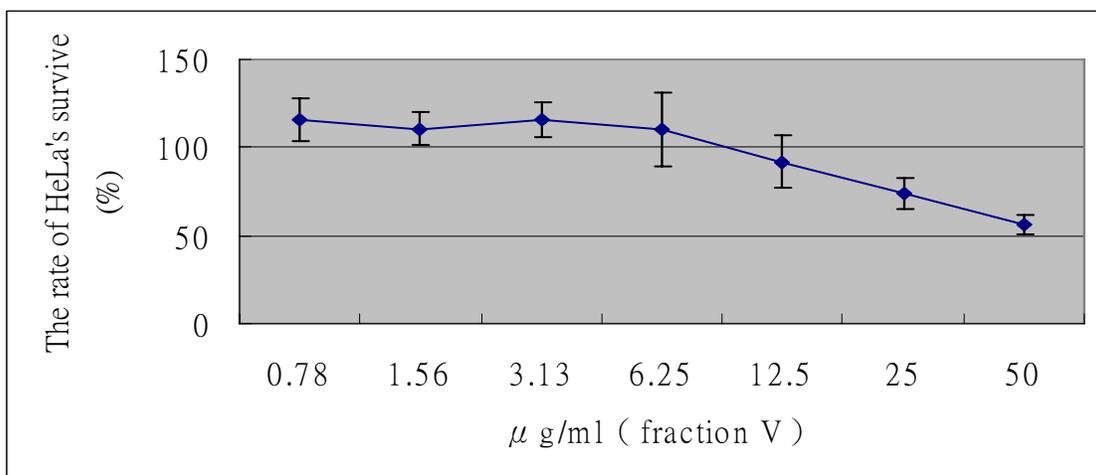


圖 3-10-5 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得第五個時間區域樣品之 MTT assay

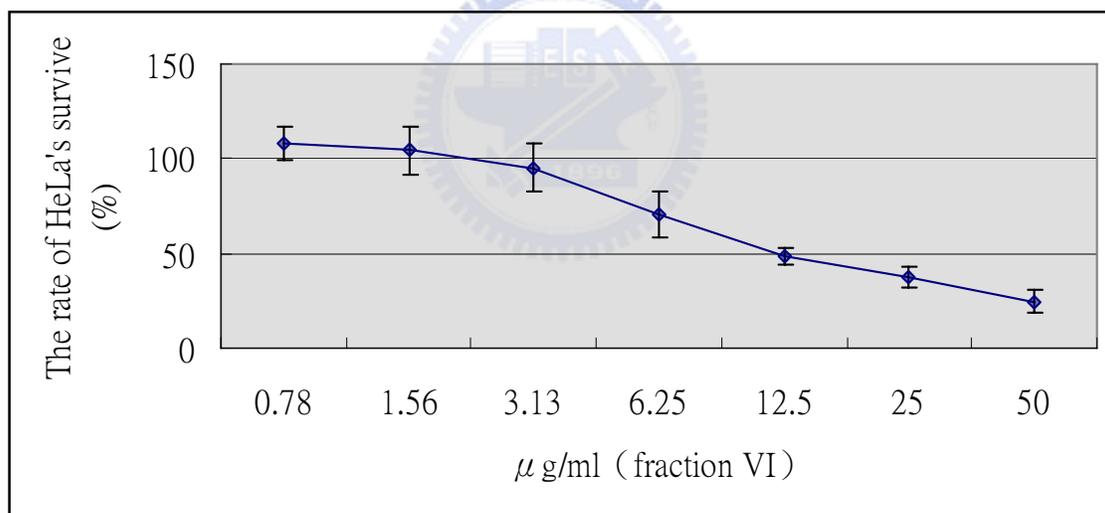


圖 3-10-6 由圖 3-9 中正丁醇第四層 HPLC 分析收得第六個時間區域樣品之 MTT assay

由 MTT assay 結果(圖 3-10-1~3-10-6)顯示，第六個時間區域樣品具有較強的生物活性用，所以用 HPLC 對第六個時間區域樣品作分析，將之細分。

3.2.5 第五層 HPLC 分析

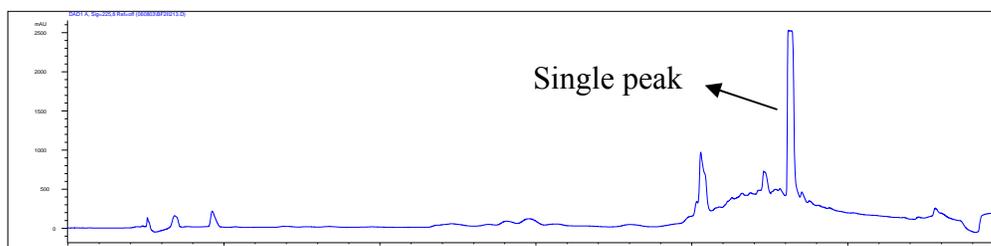


圖 3-11 正丁醇萃取物之第五層 HPLC 分析

min	0	32	52	57
CH ₃ CN (0.1% TFA)	20%	20%	100%	100%
ddH ₂ O (0.1% TFA)	80%	80%	0%	0%

管柱：ODS-3 20*250nm

注入量：200uL

流速：10mL/min

偵測波長：225nm

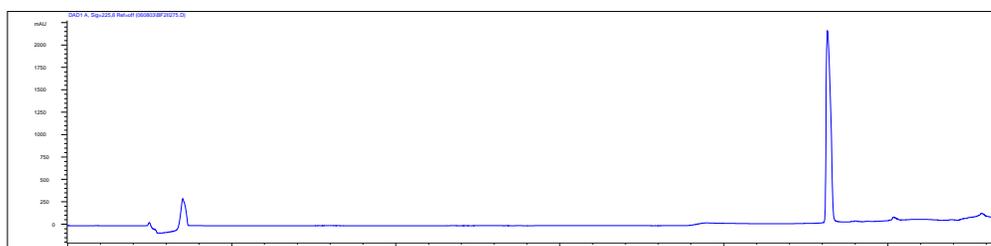
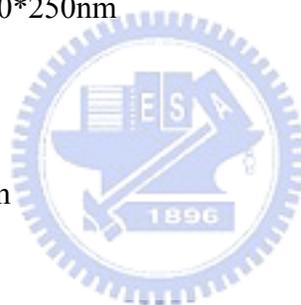


圖 3-12 由正丁醇萃取物之第五層 HPLC 分析中所分離出來的單一峰之確認

第五層 HPLC 分析圖中，將單一峰收集，其餘部分亦另外收集，將單一峰成分以同圖 3-11 之條件去確認為單一成分（圖 3-12），再以 MTT assay 分析對 HeLa cell 來確認兩者之生物活性。

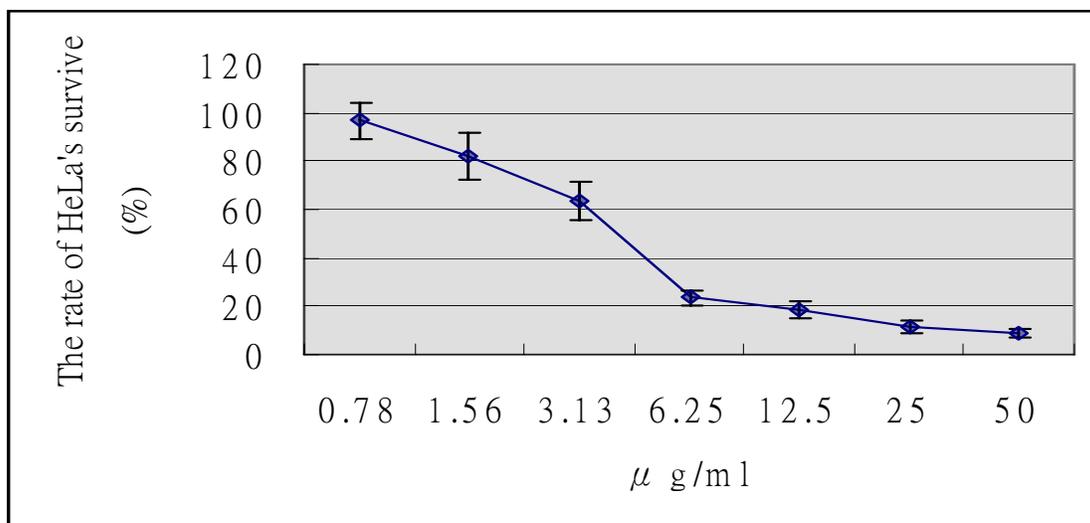


圖 3-13-1 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰之 MTT assay

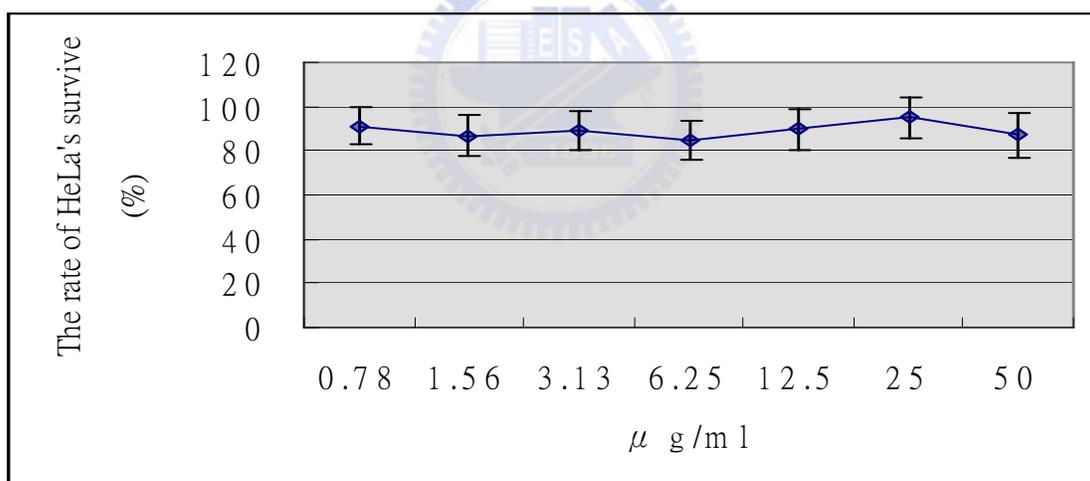


圖 3-13-2 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰以外之 MTT assay

由圖 3-13-1 和圖 3-13-2 比較，由 HPLC 分離出的單一峰生物活性明顯強很多，此時將此未知成分對其它細胞進行生物活性測試及結構之分析。

3.3 細胞生物活性測試分析

先前所分離出的未知物成分，在分離過程中，無論是有機層萃取或 HPLC 方面的分離方式，皆以 HeLa cell 為受測目標來決定未知成分的分離方向，因此，只能得知該未知成分對 HeLa cell 有明顯的生長抑制作用，尚不知該未知成分對其它細胞是否有其相同的生長抑制作用，所以分別對 BEAS-2B cell、AGS cell、COLO-205 cell 以未知成分來測試 MTT assay，其測試結果將置於 3.5 討論一節中一併討論。



3.4 結構之解析

3.4.1 EI-MS

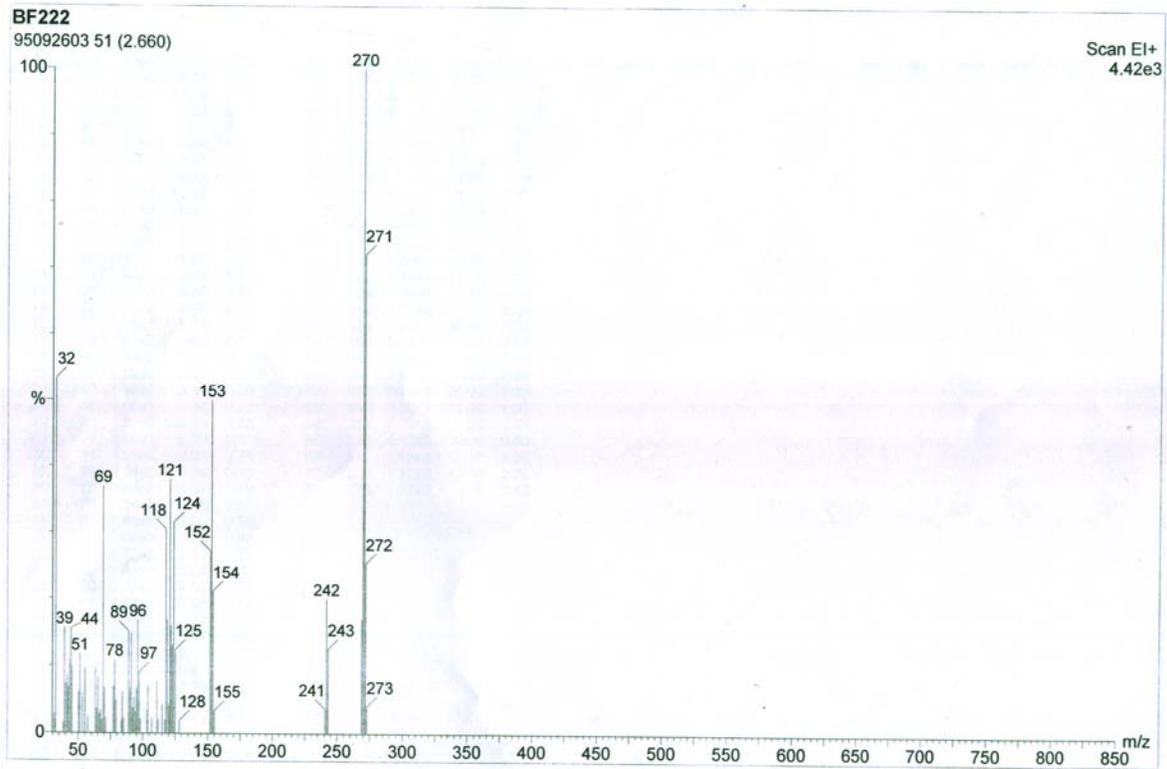


圖 3-14 EI-MS 圖譜

未知化合物由EI-MS (electron ionization mass spectrometry) 之偵測分析，其 m/z 為 270，推估分子式為 $C_{15}H_{10}O_4$

3.4.2 ^1H NMR

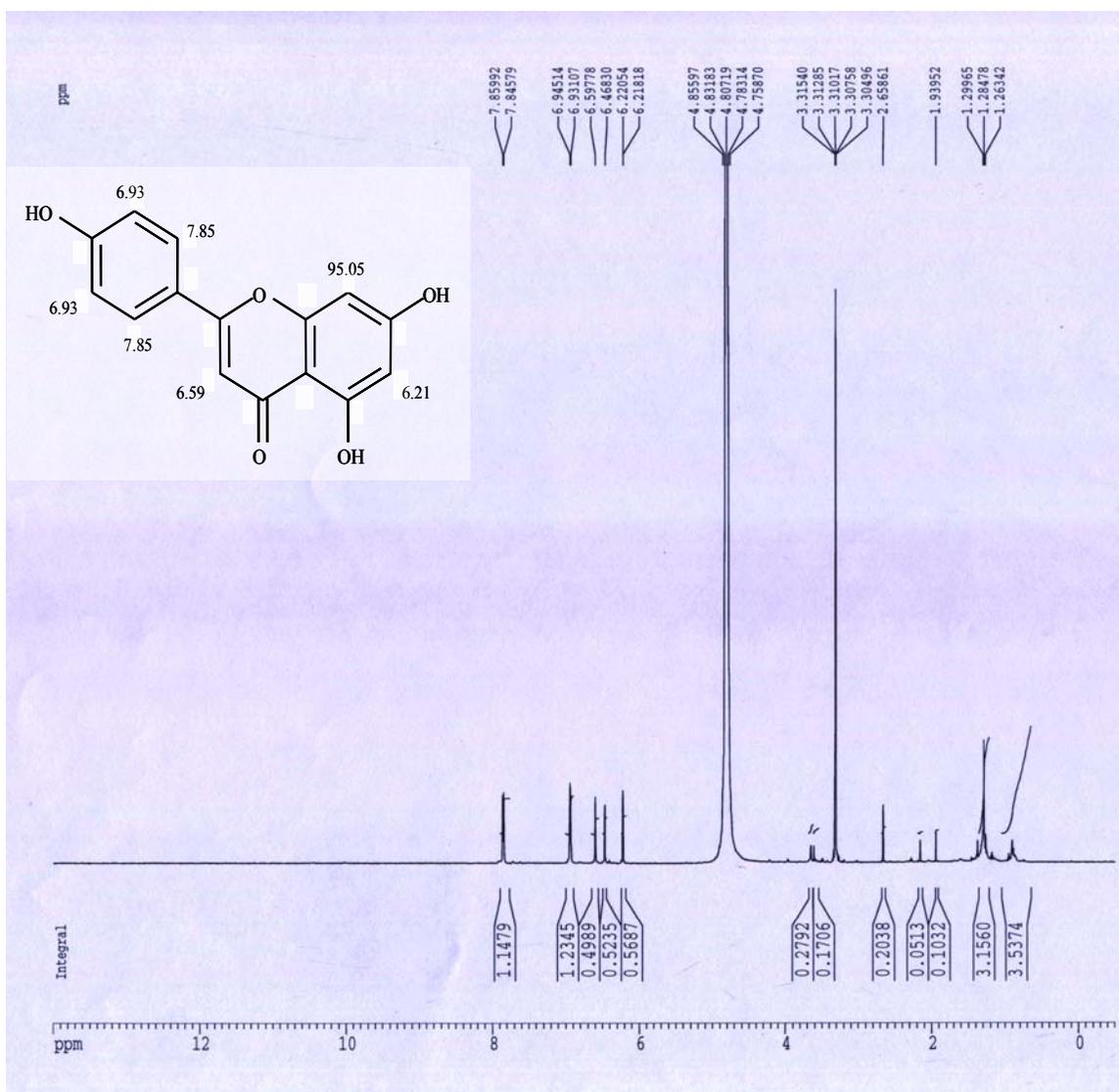


圖 3-15 ^1H NMR圖譜

在 ^1H NMR中所釋出的訊號有 δ_{H} 6.21(s)、 δ_{H} 6.46(s)、 δ_{H} 6.59(s)、 δ_{H} 6.93(s)、 δ_{H} 6.21(s)、 δ_{H} 6.94(d)、 δ_{H} 7.85(d)；在氫積分方面， δ_{H} 6.21(s)、 δ_{H} 6.46(s)、 δ_{H} 6.59(s)、 δ_{H} 6.93(s)、 δ_{H} 6.21(s)各有一個氫原子， δ_{H} 6.94(d)、 δ_{H} 7.85(d)各有兩個氫原子；其中推估各帶有兩個氫原子的 δ_{H} 6.94(d)、 δ_{H} 7.85(d)為對位苯環之結構。

3.4.3 ^{13}C NMR

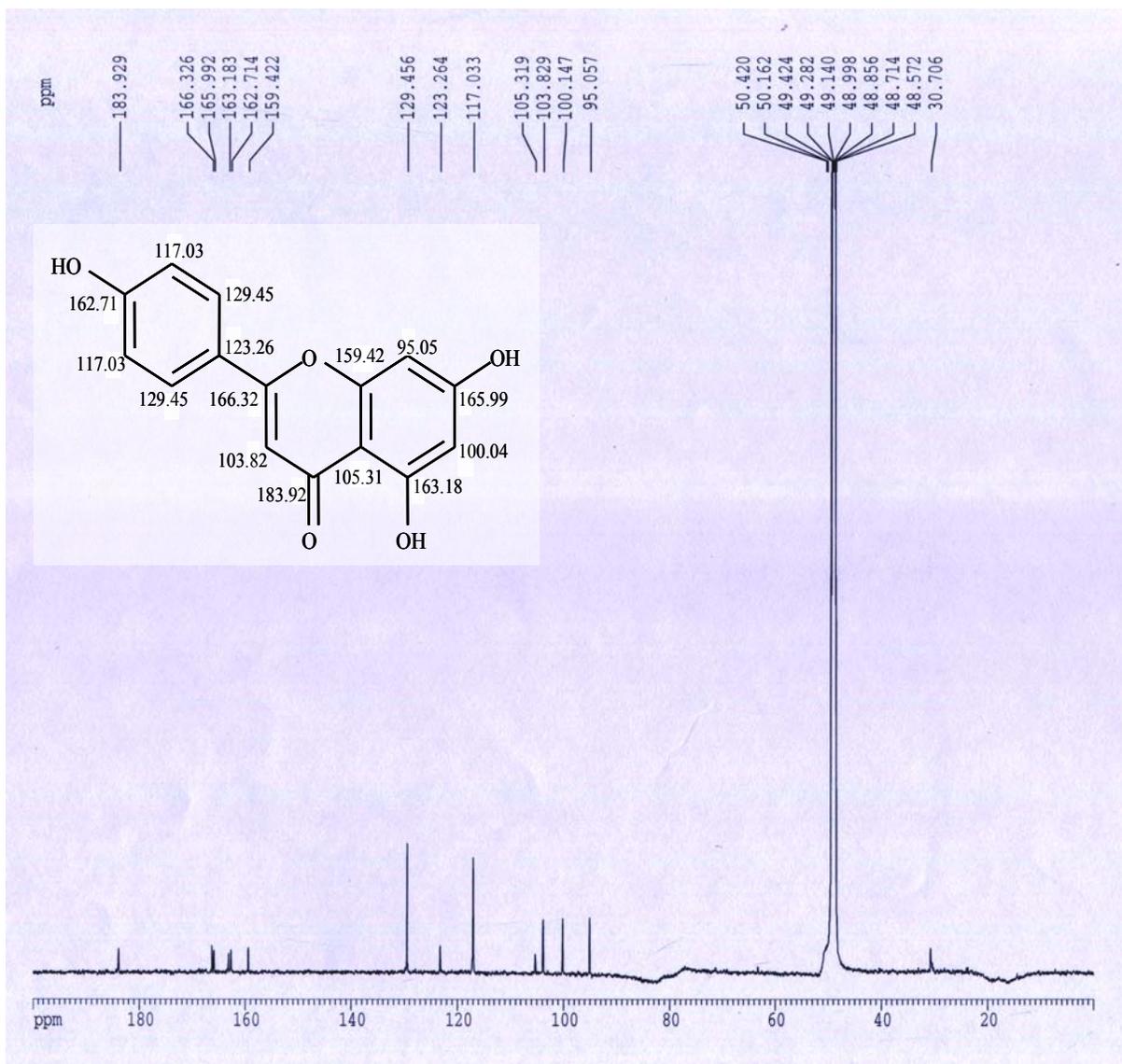


圖 3-16 ^{13}C NMR圖譜

在 ^{13}C NMR圖譜中總共釋出十三個訊號，分別為 δ_{C} 95.05、 δ_{C} 100.14、 δ_{C} 103.82、 δ_{C} 105.31、 δ_{C} 117.03、 δ_{C} 123.26、 δ_{C} 129.45、 δ_{C} 159.42、 δ_{C} 162.71、 δ_{C} 163.18、 δ_{C} 165.99、 δ_{C} 166.32、 δ_{C} 183.92 之訊號。

3.4.4 DEPT

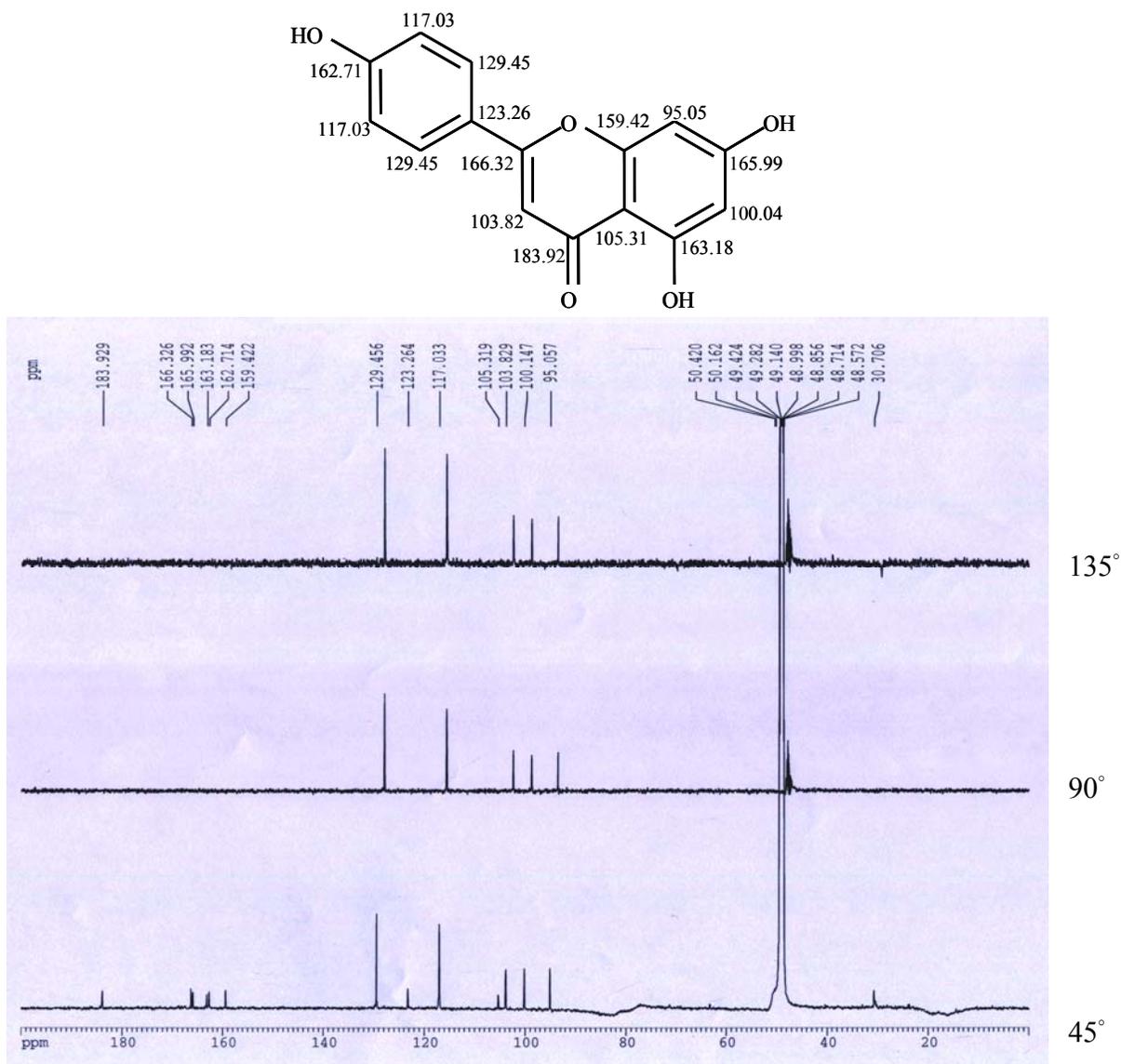


圖 3-17 DEPT 圖譜

由DEPT觀察得知， δ_C 95.05、 δ_C 100.14、 δ_C 103.82、 δ_C 117.03、 δ_C 129.45 為三級碳， δ_C 105.31、 δ_C 123.26、 δ_C 159.42、 δ_C 162.71、 δ_C 163.18、 δ_C 165.99、 δ_C 166.32、 δ_C 183.92 為四級碳，其中 δ_C 117.03 和 δ_C 129.45 之四級碳各為兩個碳之重複訊號，因此推估 δ_C 117.03 和 δ_C 129.45 之四級碳為對位苯環上之碳，另外， δ_C 159.42、 δ_C 162.71、 δ_C 163.18、 δ_C 165.99、 δ_C 166.32、 δ_C 183.92 之碳推估接有氧原子。

3.4.5 HMQC

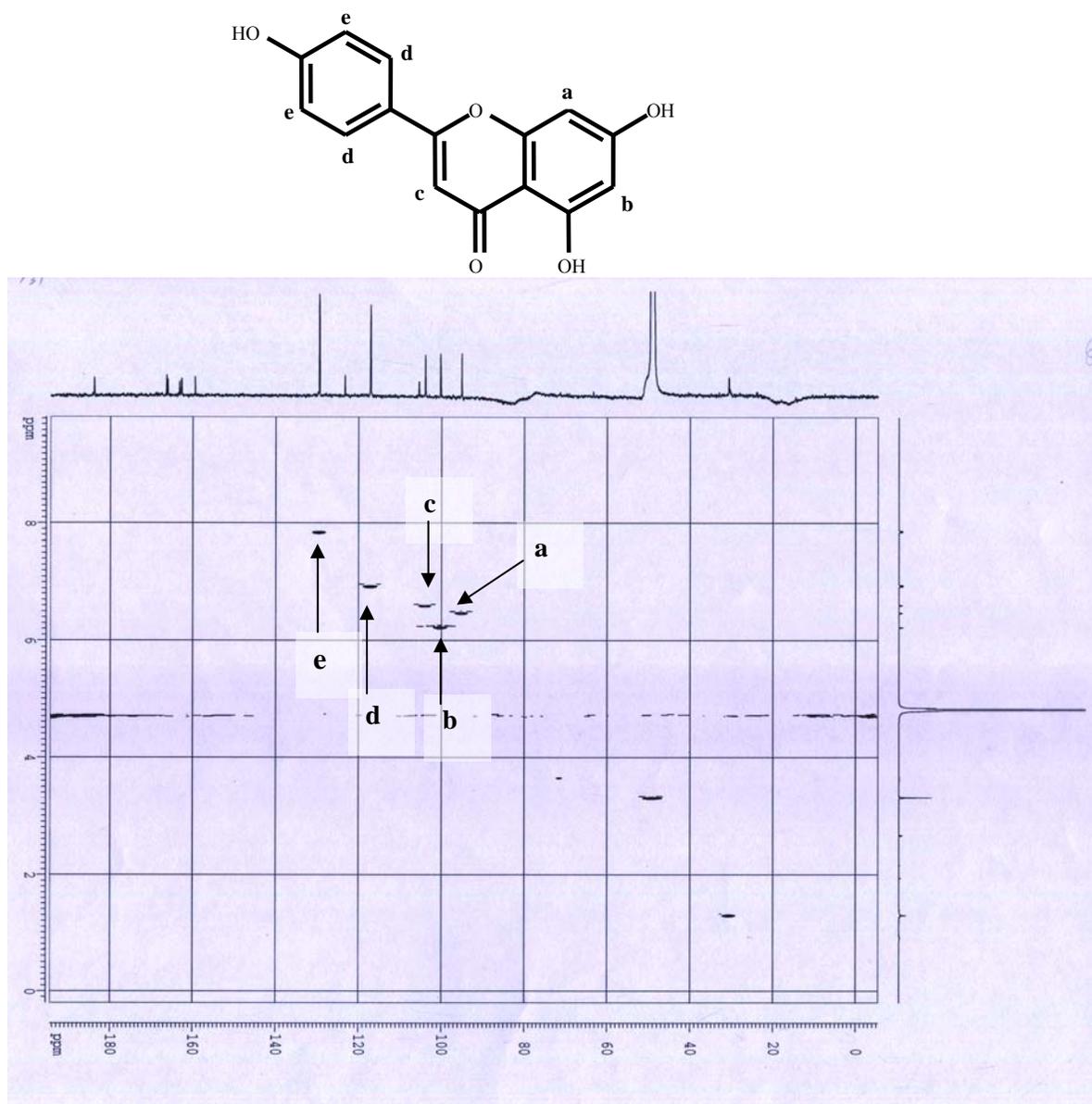


圖 3-18 HMQC 圖譜

依HMQC圖譜可觀察出碳與同一碳上的氫之間的關係，其中氫譜和碳譜之對應關係為 δ_H 6.21 \rightarrow δ_C 100.14、 δ_H 6.46 \rightarrow δ_C 95.05、 δ_H 6.59 \rightarrow δ_C 103.82、 δ_H 6.93 \rightarrow δ_C 117.03、 δ_H 7.85 \rightarrow δ_C 129.45，其中 δ_H 6.93 \rightarrow δ_C 117.03和 δ_H 7.85 \rightarrow δ_C 129.45分別為兩個氫和兩個碳，推估是同一對位苯環上之碳和氫。

3.4.6 HMBC

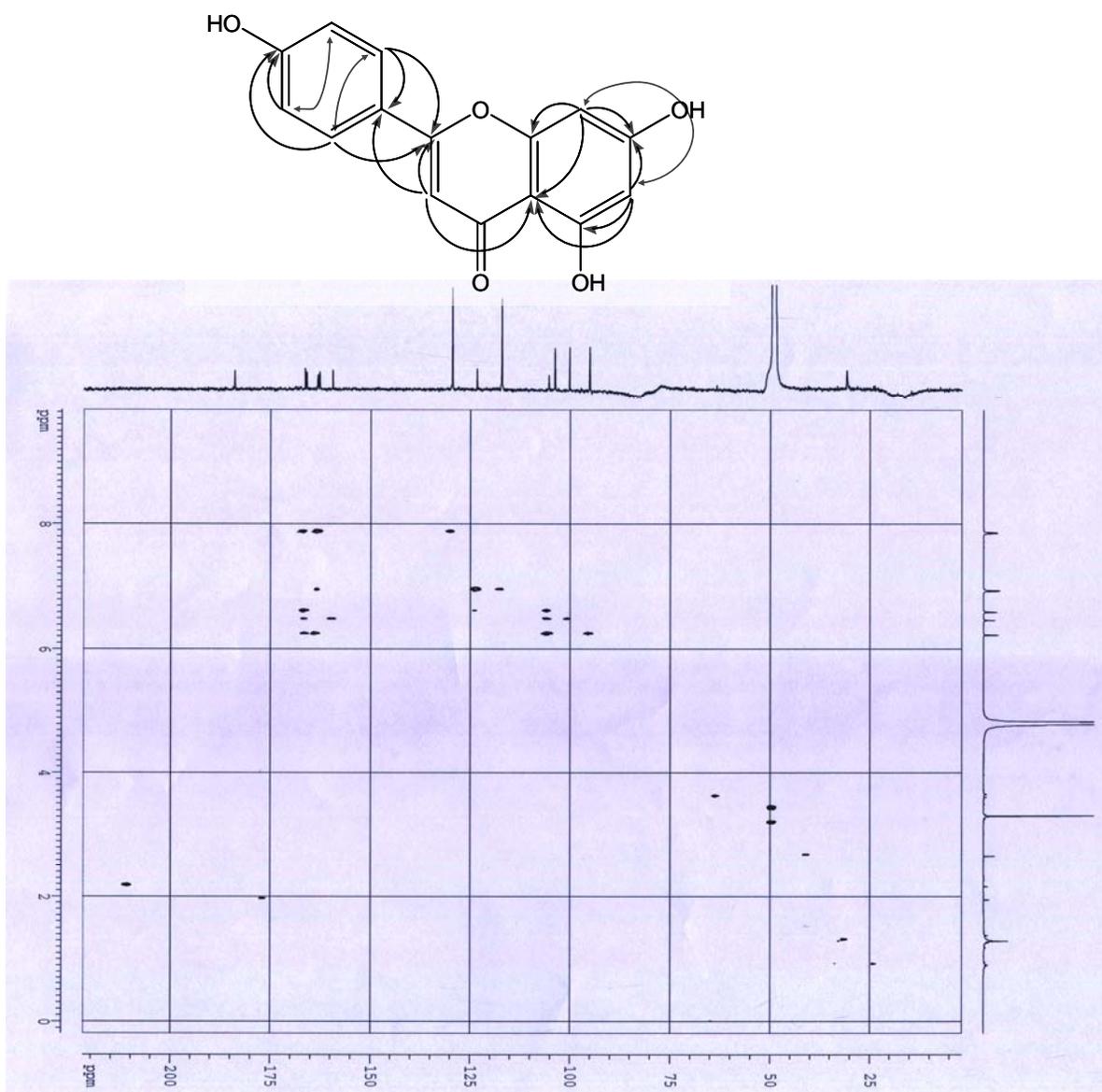


圖 3-19 HMBC 圖譜

依HMBC圖譜可觀察出氫與相鄰碳之間的關係，其對應關係為 $\delta_{\text{H}} 6.21 \rightarrow \delta_{\text{C}} 95.05$ 、 $\delta_{\text{C}} 105.31$ 、 $\delta_{\text{C}} 163.18$ 、 $\delta_{\text{C}} 165.99$ ； $\delta_{\text{H}} 6.46 \rightarrow \delta_{\text{C}} 100.14$ 、 $\delta_{\text{C}} 105.31$ 、 $\delta_{\text{C}} 159.42$ 、 $\delta_{\text{C}} 165.99$ ； $\delta_{\text{H}} 6.59 \rightarrow \delta_{\text{C}} 105.31$ 、 $\delta_{\text{C}} 123.26$ 、 $\delta_{\text{C}} 166.32$ ； $\delta_{\text{H}} 6.93 \rightarrow \delta_{\text{C}} 117.03$ 、 $\delta_{\text{C}} 123.26$ 、 $\delta_{\text{C}} 162.71$ ； $\delta_{\text{H}} 7.85 \rightarrow \delta_{\text{C}} 129.45$ 、 $\delta_{\text{C}} 162.71$ 、 $\delta_{\text{C}} 166.32$ 。

3.4.7 COSY

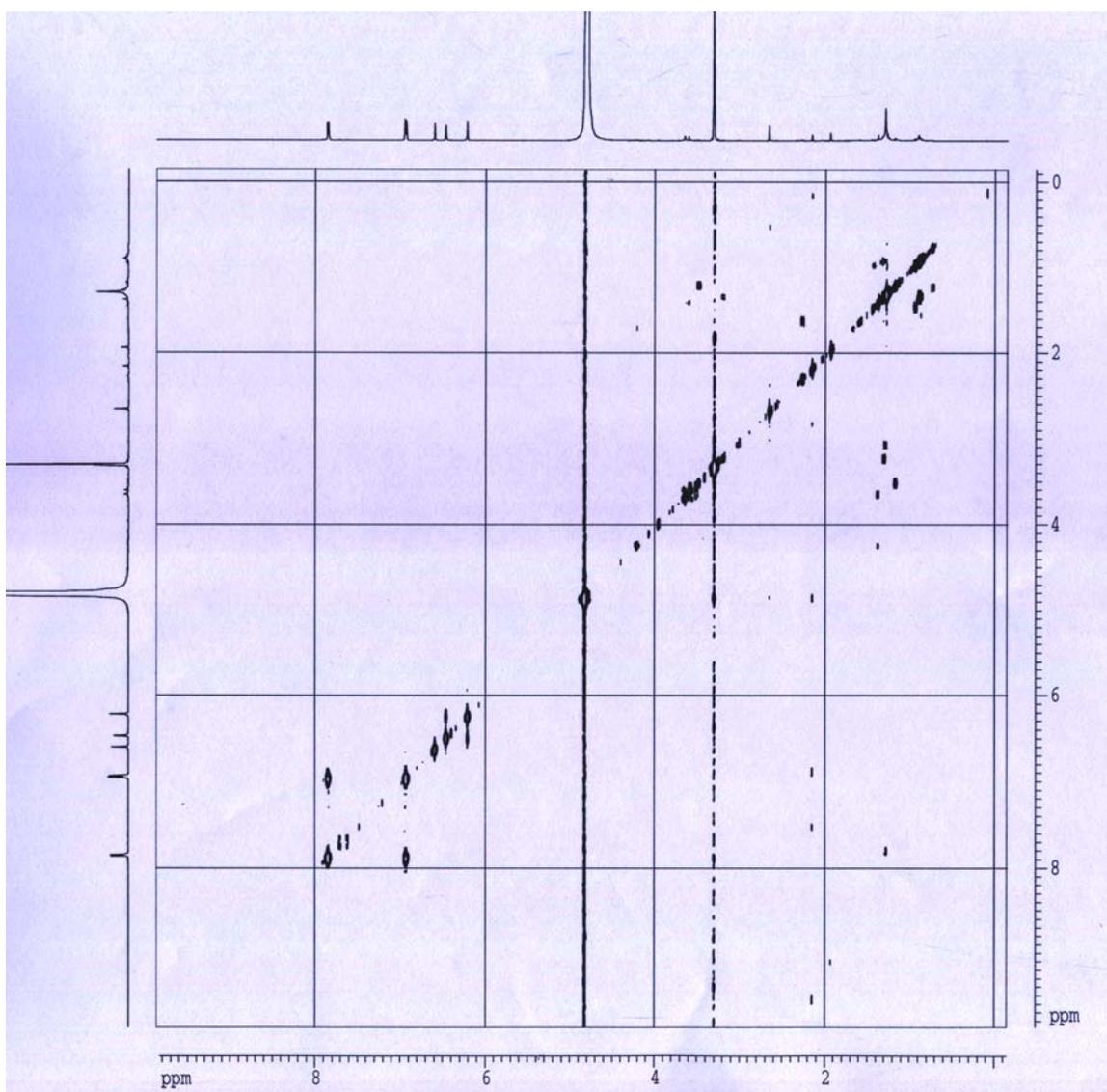


圖 3-20 COSY 圖譜

在COSY圖譜中可看出結構中可得知氫與氫之間的關係，其對應關係為 $\delta_{\text{H}} 6.21 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 6.46$ 、 $\delta_{\text{H}} 6.93 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 7.85$ ，故可推斷 $\delta_{\text{H}} 6.21$ 與 $\delta_{\text{H}} 6.46$ 兩個氫位置在結構上互為 α 和 β 之位置， $\delta_{\text{H}} 6.93$ 與 $\delta_{\text{H}} 7.85$ 兩個氫位置同樣的互為 α 和 β 之位置，且 $\delta_{\text{H}} 6.59$ 之氫週遭並無任何氫可與之影響作用產生訊號。

3.4.8 結構 4', 5, 7-trihydroxyflavone

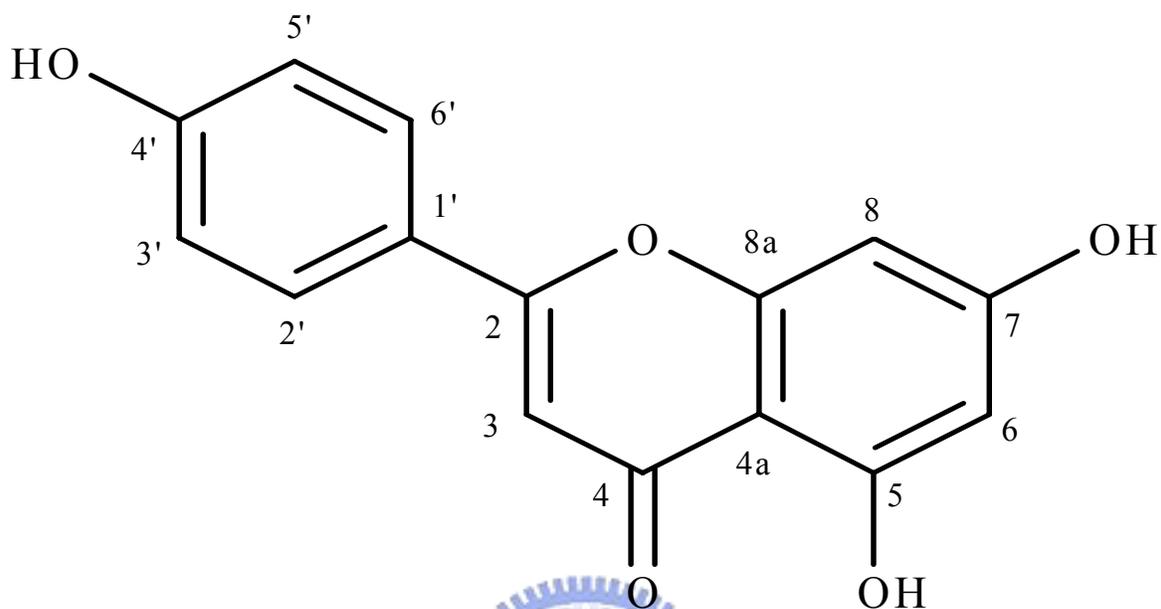


圖 3-21 4', 5, 7-trihydroxyflavone 結構

carbon	solvent		CD ₃ OD
	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C- ¹ H connectivities
1'	123.26 s	—	H-3, H-6'
2'	129.45 d	7.85 d	H-6'
3'	117.03 d	6.93 d	H-5'
4'	162.71 s	—	H-2', H-3', H-5', H-6'
5'	117.03 d	6.93 d	H-3'
6'	129.45 d	7.85 d	H-2'
2	166.32 s	—	H-2', H-6', H-3
3	103.82 s	6.59 s	—
4	183.92 s	—	—
4a	105.31 s	—	H-3, H-6, H-8
5	163.18 s	—	H-6
6	100.14 s	6.21 s	H-8
7	165.99 s	—	H-6, H-8
8	95.05 s	6.46 s	H-6
8a	159.42 s	—	H-8

3.5 討論

4', 5, 7-trihydroxyflavone又名apigenin(芹菜素)，此一化合物在台灣粗榧中是第一次被發現，亦是三尖杉屬植物中第一次發現，經由此次實驗測試，apigenin對HeLa cell進行MTT assay且經由計算，其ED₅₀為 3.08 μg/mL (11.4 μM)，此數值與之前文獻所提供之數值 (IC₅₀為 9.8 μM或 2.64 μg/mL)⁵⁵差異不大。

在實驗中，除 apigenin 對 HeLa cell 做 MTT assay 外，並以 BEAS-2B cell、AGS cell、COLO-205 cell 作為受測的細胞，發現 COLO-205 cell 有生長抑制作用，而 BEAS-2B cell、AGS cell 無明顯生長抑制作用。

(1) HeLa cell

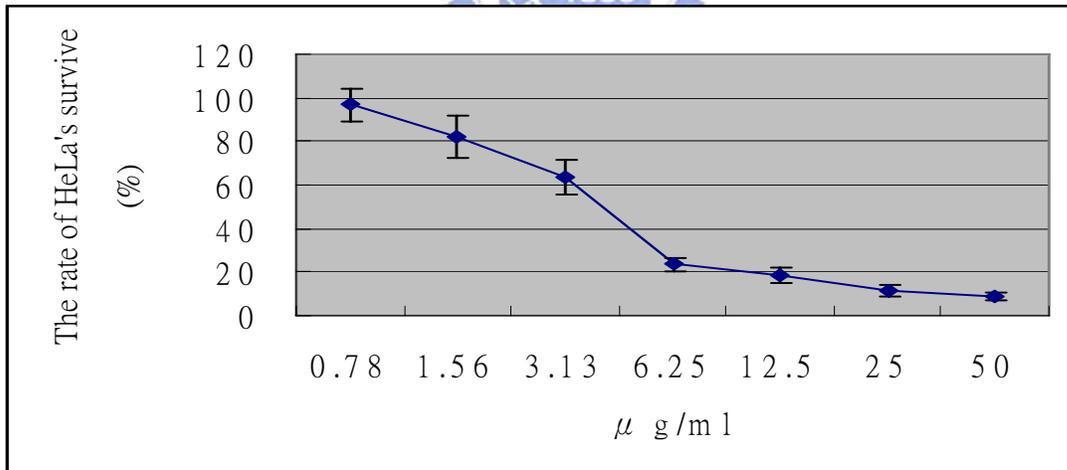


圖 3-22 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 HeLa cell 之 MTT assay

(2) AGS cell

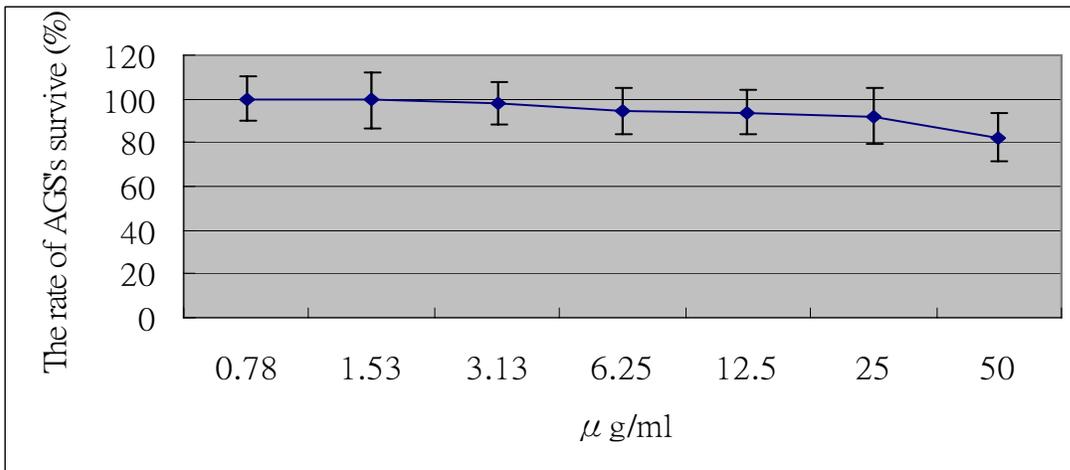


圖 3-23 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 AGS cell 之 MTT assay

(3) COLO 205 cell

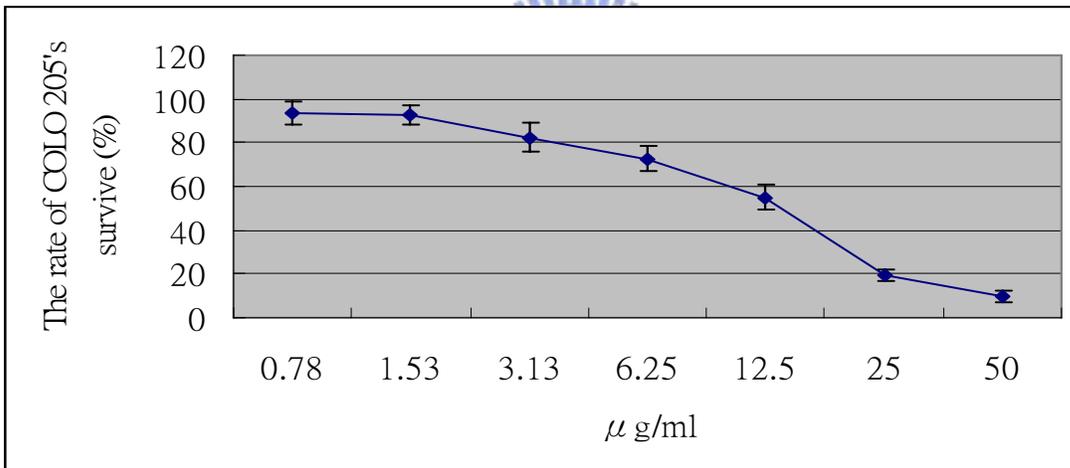


圖 3-24 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 COLO 205 之 MTT assay

(4) BEAS-2B cell

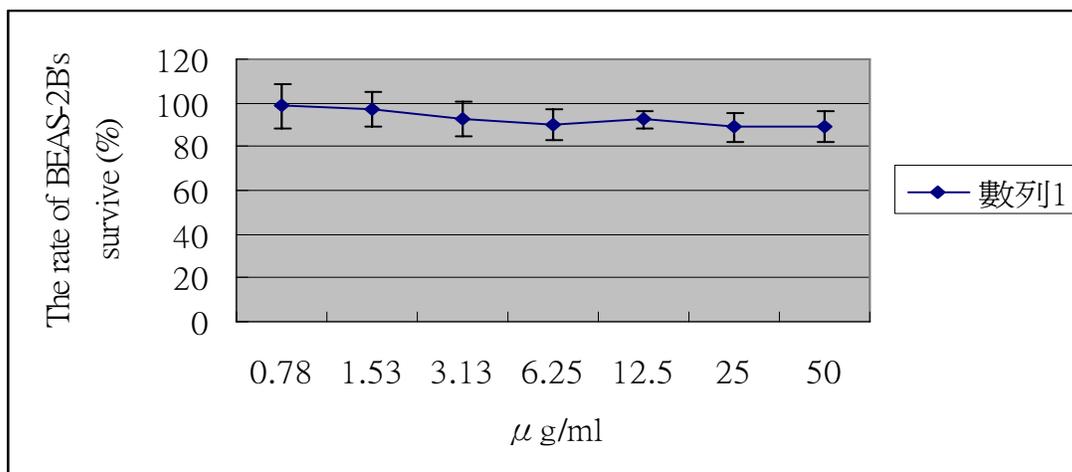


圖 3-25 由圖 3-11 中正丁醇第五層 HPLC 分析收得的單一峰對 BEAS-2B 之 MTT assay

HeLa cell 之 MTT assay 結果可由圖 3-22 觀察得知，在未知物濃度 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞存活率已有下降趨勢，在未知物濃度 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 時，其細胞存活率已低於 20%；AGS cell 之 MTT assay 結果可由圖 3-23 觀察得知，即使在最大濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ 之未知物測試下，細胞存活率仍有 80%，亦無明顯之生長抑制作用；COLO 205 cell 之 MTT assay 結果可由圖 3-24 觀察得知，在未知物濃度 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞存活率已有下降趨勢，在最大濃度 50.0 $\mu\text{g/ml}$ 之未知物測試時，細胞存活率已低於 20%，所以未知物對 COLO 205 cell 有明顯的生長抑制作用。BEAS-2B cell 之 MTT assay 結果可由圖 3-25 觀察得知，在最大濃度 50.0 $\mu\text{g/ml}$ 之未知物測試下，依然無明顯生長抑制作用之現象。

CELL	ED ₅₀	
	µg/ml	µM
BEAS-2B	x	x
AGS	x	x
COLO-205	8.20	30.4
HeLa	3.08	11.4

在本實驗中，所受測之四種細胞，僅BEAS-2B cell為正常細胞，AGS cell、COLO-205 cell、HeLa cell為癌細胞，在三種癌細胞中，apigenin僅對COLO-205 cell (ED₅₀ 8.20 µg/ml或 30.4 µM) 和HeLa cell (ED₅₀ 3.08 µg/ml或 11.4µM) 有明顯的生長抑制作用，故apigenin對細胞的生長作用中，對正常細胞是不具影響，而對特定的癌細胞具有生長抑制的作用。

Apigenin屬於類黃酮 (Flavonoids)，目前已知的類黃酮衍生物超過 9000 種，實驗中分離得到的apigenin是其中一種，皆以黃酮 (flavone) 為其基本結構，黃酮對於癌症的預防、治療和心臟冠狀動脈疾病都具有成效，此外，黃酮也被拿來做為藥物設計的基本結構。⁵⁴

Apigenin主要存在蔬菜水果⁴³⁻⁴⁶，例如：芹菜、豆類、柑橘類水果及一些堅果類之中。此類成分具有抗氧化作用⁴⁷，目前已經有許多研究報導指出此類成分也具有抗癌的效果，例如：大腸直腸癌、血癌、皮膚癌、乳癌和前列腺癌^{44-46,48-51}，主要是引起癌細胞的細胞週期停止而造成細胞凋亡使癌細胞增生受到抑制^{50,52,53}。Apigenin也具有防癌的效果，因為apigenin可以抑制TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) 所調節的癌促進作用而達到防止癌症的產生⁵²。目前已經有將此類藥物的結構加以修飾，使其穩定性增加後，已經

應用在臨床上，例如：Flavopiridol⁵¹（圖 3-26）。

Apigenin對子宮頸癌細胞（HeLa cell）之研究，除生物活性測試外，已有文獻指出apigenin使子宮頸癌細胞造成細胞凋亡之原因與p53、p21、Bcl-2及Fas有關（圖 3-27）⁵⁵；腫瘤抑制基因p53在細胞生長和死亡當中扮演著維持平衡的角色，也是抑制或誘導腫瘤細胞凋亡的關鍵；p21在細胞中的濃度受到p53之影響，會因為p53濃度的上升使得p21亦隨之提高，並且p21能夠在細胞循環中去抑制細胞G1及S狀態之間的轉換，使細胞循環停滯在G1狀態；Bcl-2在細胞凋亡途徑中扮演著關鍵調控者的一種蛋白，對細胞凋亡的發生有著很強的抑制效果；Fas在細胞中是一種接收細胞凋亡訊號的接收者分子，當p53過量表現時將會引起Fas的表現，Fas接收細胞凋亡訊號進而誘導癌細胞的死亡。

最後，本研究已架構由粗榧樹葉中分離出apigenin之方法，其原理是依靠各化合物間有著不同極性之特性將之分離，故在其它亦含apigenin的廣泛植物中，也能運用相同分離方法分離出apigenin。

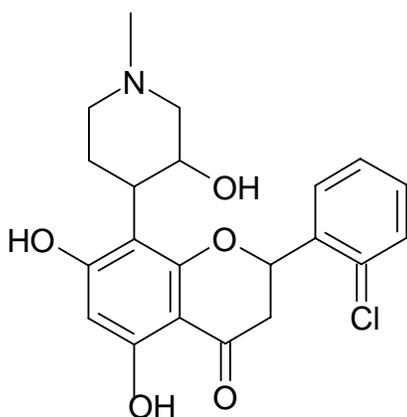


圖 3-26 Flavopiridol

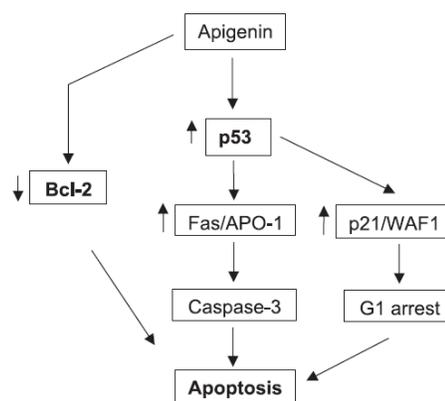


圖 3-27 Apigenin 在子宮頸癌細胞凋亡途徑中所造成之影響

四、未來展望

Apigenin 在自然界中普遍存在於植物當中，相關文獻也已證實 apigenin 對許多不同癌細胞有抑制生長的作用，但目前的研究仍侷限於人類及老鼠的細胞測試，對於動物活體實驗甚是缺乏。

雖然在植物中所包含各種不同的類黃酮 (Flavonoids)，當中許多成份亦可能涵蓋 apigenin 的結構在其中，卻甚少發現比 apigenin 之生物活性更強的衍生物，勢必有許多未知的各種 apigenin 衍生物存在於植物裡，其中可能有更適合對抗癌細胞的 apigenin 衍生物，但要從植物中分離出來，並不符合經濟效益且費時，所以 apigenin 衍生物的取得，可從化學結構合成及修飾來著手，逐一找出對癌細胞有更好抑制作用的成份，甚至可找出適宜存在於動物活體內的成份，例如在 apigenin 接上一醣基，試圖延長 apigenin 衍生物在動物活體內的滯留時間，以充分在動物活體內發揮長時間的藥效。

雖然過去文獻中 apigenin 對子宮頸癌細胞的研究已有初步探討，僅知道細胞凋亡途徑中是由少數蛋白質所造成的現象，而細胞凋亡的相關途徑卻是相當複雜而多樣的，故日後仍需再進一步探討 apigenin 對子宮頸癌所造成細胞凋亡途徑的相關研究。

五、參考文獻

1. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **2003**;66(7):1022-1037.
2. Furukawa S. In vitro chemosensitivity of hepatocellular carcinoma for hepatic arterial infusion chemotherapy using the MTT assay with the combinations of antitumor drugs. *Kurume Med J* **2004**;51(1):25-33.
3. Gunzel C, Weiss F. [Paper chromatographic study on aqueous extracts of leaves of red foxglove (*Digitalis purpurea*).]. *Pharmazie* **1955**;10(12):725-729.
4. Fairbairn JW, Wassel G. The Estimation Of Morphine, Codeine And Thebaine In Opium And In Poppy Latex By Paper Chromatography. *J Pharm Pharmacol* **1963**;15:SUPPL 216-221.
5. Aviado DM, Rosen R, Dacanay H, Plotkin SH. Antimalarial and antiarrhythmic activity of plant extracts. I. Cinchona and quinine in *Plasmodium berghei* in immature rats. *Med Exp Int J Exp Med* **1969**;19(2):79-94.
6. Smith LW, Culvenor CC. Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *J Nat Prod* **1981**;44(2):129-152.
7. Cha LY, Herlong HF, Mezey ES. [Treatment of experimental liver injury with a Chinese herbal medicine tablet]. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* **1986**;6(1):36-38, 35.
8. Nookabkaew S, Rangkadilok N, Satayavivad J. Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. *J Agric Food Chem* **2006**;54(18):6939-6944.
9. Maksimovic Z, Dobric S, Kovacevic N, Milovanovic Z. Diuretic activity of *Maydis stigma* extract in rats. *Pharmazie* **2004**;59(12):967-971.
10. Gawron-Gzella A, Witkowska-Banaszczak E, Dudek M. [Herbs and herbal preparations applied in the treatment of gastric hyperacidity, gastric and duodenal ulcer in cigarette smokers]. *Przegl Lek* **2005**;62(10):1185-1187.

11. M CS, J MR. *Bioactive natural products*; **1993**.
12. Cragg GM, Schepartz SA, Suffness M, Grever MR. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J Nat Prod* **1993**;56(10):1657-1668.
13. Morris EJ, Geller HM. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol* **1996**;134(3):757-770.
14. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* **1997**;60(1):52-60.
15. DJ N, GM C, S H, EA. S. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* **2002**;2:279-308.
16. Wiley RA, Rich DH. Peptidomimetics derived from natural products. *Med Res Rev* **1993**;13(3):327-384.
17. *Flora of Taiwan*. **1996**;2:555.
18. Choi YH, Kim J, Kim JY, Joung SN, Yoo KP, Chang YS. Modifier effects on supercritical CO₂ extraction efficiency of cephalotaxine from *Cephalotaxus wilsoniana* leaves. *Arch Pharm Res* **2000**;23(2):163-166.
19. Choi YH, Yoo KP, Kim J. HPLC-electrospray ionization-MS-MS analysis of *Cephalotaxus harringtonia* leaves and enhancement of the extraction efficiency of alkaloids therein by SFE. *J Chromatogr Sci* **2003**;41(2):67-72.
20. 何洪源. 中國粗榧果實和枝葉中三尖杉酯鹼和高三尖杉酯鹼分離方法的研究. *CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS* **2001**;32.
21. Kantarjian HM, Talpaz M, Santini V, Murgu A, Cheson B, O'Brien SM. Homoharringtonine:History, Current Research, and Future Directions. *American Cancer Society* **2001**;92:1591-1605.
22. Ito k, Fowden L. NEW CHARACTERIZATIONS OF AMINO ACIDS AND r-GLUTAMYL PEPTIDES FROM ACACIA GEORGINAE SEED. *Phytochemistry* **1972**;11:2541-2545.
23. Powell RG, Mikolajczak KL, Weisleder D, Smith CR. Alkaloids of *cephalotaxus wilsoniana*. *Phytochemistry* **1972**;11:3317-3320.
24. Powell RG, Weisleder D, Smith CR, Rohwedder WK. Structures of harringtonine,

- isoharringtonine. *Tetrahedron Letters* **1970**;11:815-818.
25. powell RG, Weisleder D, Smith CR, Jr. Antiitumor alkaloids from cephalotaxus harringtonia: structure and activity. *J Pharm. Sci.* **1972**;61:1227-1230.
 26. Mikolajczak KL, Powell RG, Smith CR. Dexyharringtonine, a new antitumor alkaloid from cephalotaxus: structure and synthetic studies. *Tetrahedron* **1995**;28:1995-2001.
 27. Powell RG, Weisleder D, Smith CR, Jr., wolff IA. Structure of cephalotaxine and related alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1969**;46:4081-4084.
 28. Weinreb SM, Auerbach J. Total synthesis of the cephalotaxus alkaloids. Cephalotaxine, cephalotaxinone, and demethylcephalotaxinone. *J Am Chem Soc* **1975**;97(9):2507-2516.
 29. Powell RG. Structures of homoerythrina alkaloids from cephalotaxus harringtonia. *Phytochemistry* **1972**;11:1467-1472.
 30. Parry RJ, Chang LMNT, Schwab IJM, Foxmanle BM. Biosynthesis of the *Cephalotaxus* Alkaloids. Investigations of the Early and Late Stages of Cephalotaxine Biosynthesis. *American Chemical Society* **1980**:1099.
 31. Scientific W. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*; **2000**.
 32. Abou-shoer, Ibrahim M. *Isolation and structure elucidation of cytotoxic agents from the higher plant Psorospermum febrifugum*. **1987**:169.
 33. Ma G, Sun G, ElSohly M, Turner C. STUDIES ON THE ALKALOIDS OF *CEPHALOTAXUS*. III 4-HYDROXYCEPHALOTAXINE, A NEW ALKALOID FROM *CEPHALOTAXUS FORTUNEI*. *J Nat Prod* **1982**:585.
 34. Bocar M, Jossang A, Bodo B. New alkaloids from *Cephalotaxus fortunei*. *J Nat Prod* **2003**;66(1):152-154.
 35. Powell RG, Weisleder D, Smith CR, Jr., Rohwedder WK. Structures of harringtonine, isoharringtonine, and homoharringtonine. *Tetrahedron Letter* **1970**;11:815-818.
 36. Gitterman A, Parry RJ, Richard F. Dufresne, Sternbach DD, Cabelli MD. Biosynthesis of the *Cephalotaxus* Alkaloids. Investigations of the Biosynthesis of Deoxyharringtonine, Isoharringtonine, and Harringtonine. *Journal of the American Chemical Society* **1980**:2074.
 37. Ye XR, Wu KM. [Synthesis and antitumor activity of the derivatives of cephalotaxine and drupacine]. *Yao Xue Xue Bao* **2003**;38(12):919-923.
 38. Aladesanmi AJ, Ilesanmi OR. Phytochemical and pharmacological investigation of the

- cardioactive constituents of the leaf of *Dysoxylum lenticellare*. *J Nat Prod* **1987**;50(6):1041-1044.
39. Sun NJ, Zhao ZF, Chen RT, Lin W, Zhou YZ. [Isolation and identification of the antitumor agent--hainanolide from *Cephalotaxus fortunei* (author's transl)]. *Yao Xue Xue Bao* **1981**;16(3):233-234.
40. Xue Z, Sun NJ, Liang XT. [Studies on the structure of hainanolidol (author's transl)]. *Yao Xue Xue Bao* **1982**;17(3):236-237.
41. Kuo YH, Lin CH, Hwang SY, Shen YC, Lee YL, Shyh-Yuan L. A novel cytotoxic C-methylated biflavone from the stem of *Cephalotaxus wilsoniana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2000**;48(3):440-441.
42. Kuo YH, Hwang SY, Yang Kuo LM, Lee YL, Li SY, Shen YC. A novel cytotoxic C-methylated biflavone, taiwanhomoflavone-B from the twigs of *Cephalotaxus wilsoniana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2002**;50(12):1607-1608.
43. Wang LW, Su HJ, Yang SZ, Won SJ, Lin CN. New alkaloids and a tetraflavonoid from *Cephalotaxus wilsoniana*. *J Nat Prod* **2004**;67(7):1182-1185.
44. Lepley DM, Li B, Birt DF, Pelling JC. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis*. **1996** Nov;17(11):2367-75.
45. Wei H, Tve L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res.* **1990** Feb 1;50(3):499-502.
46. Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog.* **2000** Jun;28(2):102-10.
47. Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* **1997** Nov 24;418(1-2):152-6.
48. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **2000** Jul 15;60(14):3823-31.
49. Way TD, Kao MC, Lin JK. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett.* **2005** Jan 3;579(1):145-52.

- 50 Nomoto S, Arao Y, Horiguchi H, Ikeda K, Kayama F. Oestrogen causes G2/M arrest and apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231. *Oncol Rep.* **2002** Jul-Aug;9(4):773-6.
- 51 Senderowicz AM. Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs.* **1999**;17(3):313-20. Review.
- 52 Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer.* **1999** Oct;35(10):1517-25.
- 53 Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* **1997** Jul 15;57(14):2916-21.
- 54 Martens F, Mithofer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry.* **2005** Oct;66(20):2399-407. Epub 2005 Aug 30.
- 55 Zheng PW, Chiang LC, Lin CC. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci.* **2005** Feb 4;76(12):1367-79.

