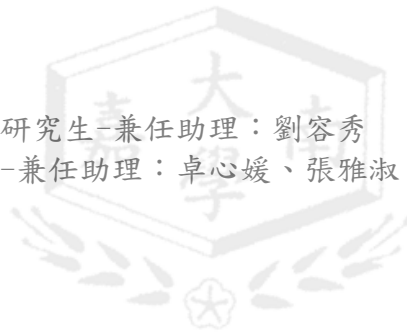


行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

S-腺核昔同半胱胺酸在細胞及熱中風動物模式下對肝與神經的毒性評估及基因表現之影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2320-B-041-012-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫主持人：楊彩秀
共同主持人：劉家全
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：劉容秀
大學生-兼任助理：卓心媛、張雅淑



處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 26 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

S-腺核苷同半胱胺酸在細胞及熱中風動物模式下對肝與神經的毒性評估及基因表現之影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC95-2320-B-041-012-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日

計畫主持人：楊彩秀

共同主持人：劉家全

計畫參與人員：張雅淑、劉容秀、卓心媛

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

中華民國 96年 10月 1日

中文摘要

腺核甘同半胱胺酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)為甲硫胺酸代謝循環之產物。有報導指出，SAH的代謝產物-同半胱胺酸(Homocysteine, Hcy)為心血管、腎臟、肝臟及神經系統相關疾病的危險因子之一。然而近年來有一些人體試驗發現：與Hcy相關疾病中，SAH可能也扮演重要的角色。但目前我們對SAH在生理和毒理上的作用瞭解甚少。最近申請人在*Nutr. Cancer*中報導SAH會促進將小鼠內皮細胞和人類腸細胞株中DNA尿嘧啶誤植及DNA低甲基化，而造成DNA傷害。同時亦有研究發現在肝臟和神經系統相關的疾病中，SAH的含量有增加的趨勢，其與肝臟及神經細胞損傷有關。這些結果暗示著SAH可能具有細胞毒性的作用，尤其對肝及神經細胞。但目前尚未有文獻針對SAH對肝及神經細胞的毒性作用以及利用動物模式進行探討。因此本研究將進行SAH對小鼠肝細胞(BNL CL.2 cell line)及小鼠神經膠細胞(BV-2 cell line)的毒性評估，並以Hcy來做比較。我們發現5~20 μM SAH會促進細胞DNA損傷、抑制細胞存活率，並可能是藉由降低SAM/SAH比例與5-mdc含量。而Hcy濃度需高達5mM才有此效果。未來將可提供SAH造成疾病發生的可能機制及日後疾病的預防或治療提供更多基礎知識。

英文摘要

S-Adenosylhomocysteine (SAH) is produced during methionine metabolic cycle. Homocysteine (Hcy, a metabolic product of SAH) is a recognized risk factor for cardiovascular disease, renal disease, liver disease and neurodegenerative disease. However, some recent human studies have found that SAH also may play an important role in Hcy-related diseases. But little is known of the physiological or toxicological roles of SAH. We recently showed that SAH strongly enhanced H_2O_2 -induced DNA damage in SVEC and Int407 cell lines by increasing uracil misincorporation and DNA hypomethylation (Yang et al., 2003 in *Nutr. Cancer*). Moreover, in liver disease and neurodegenerative disease, SAH is elevated in plasma and brain tissues. And the elevated SAH is correlated with cell injury. These results suggested that SAH might induce cytotoxicity in liver and nerve system. But the cytotoxic effect of SAH in liver and nerve system is still unknown in cell culture and animal model. Whether elevated SAH can result in cytotoxicity and DNA damage and how it may do to be investigated. Based on the above discussion, we plan to investigate the cytotoxic effects of SAH in mouse liver cell line and mouse microglial cell line. We found that SAH (5~20 μM) induced cell DNA damage and inhibition of cell viability by decreasing SAM/SAH ratio and 5-mdc%. The proposed studies are expected to increase our understanding of the cellular roles of SAH and to contribute to nutritional and related fields. Because of the novel hypotheses proposed in this research project, these studies should be able to promote the level of basic research in Taiwan.

Keywords: S-adenosylhomocysteine, Homocysteine, 5-methyldeoxycytidine, DNA hypomethylation

前言

在人體的甲硫胺酸代謝循環中，當腺核昔甲硫胺酸(S-adenosylmethionine, SAM)提供甲基給需甲基的物質後，形成腺核昔同半胱胺酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)。SAH 會經由 SAH 水解酶作用而形成腺核昔和同半胱胺酸(Homocysteine, Hcy)。這個反應雖是可逆反應，但較偏向 SAH 的合成，非 SAH 的水解(Finkelstein et al., 1998)，同時此分解反應為移除 SAH 的途徑。SAH 在人體血漿中的含量約為 0.02-0.04 μM ，而 Hcy 約 10-15 μM ，SAH 可以是 Hcy 的 1/500 (Chiang et al., 1998; Yi et al., 2000)。當 Hcy 的代謝效率降低時，將導致 SAH 增加，例如人體中葉酸缺乏或代謝酵素(Cystathionine β -synthase, CBS)缺乏(Chiang et al., 1998)。事實上，越來越多的證據暗示 SAH 與許多疾病有明顯的相關性。然而，關於 SAH 的研究稀少，SAH 是否會傷害細胞，以及其可能的作用機制目前所知仍然有限。

研究目的

SAH 與 Hcy 對小鼠肝細胞(BNL CL.2 cell line)及小鼠神經膠細胞 (BV-2 cell line)的毒性評估。本研究在測定細胞處理 SAH 或 Hcy 期間，細胞內外 SAH 與細胞存活率、DNA 傷害和 DNA 甲基化的濃度和時間關係。我們的假說是：SAH 會造成肝及神經細胞的損傷與 DNA 低甲基化，造成 DNA 無法修補，導致細胞損傷。同時進一步利用動物模式驗證 SAH 的毒理作用。本計畫將利用對肝臟及神經系統造成損傷的動物模式(熱中風大鼠)，即時監控老鼠之血壓、心跳及腦血流，並測定大鼠的存活時間。

文獻探討

最近有一些研究發現 SAH 在某些與 Hcy 相關的疾病中也可能扮演重要的角色。例如：在心血管疾病的病人血漿中 SAH 含量呈顯著的上升，Hcy 則無明顯的變化，並且血漿中 SAH 含量比 Hcy 低，SAH 含量的變化會比 Hcy 的變化明顯，因此認為 SAH 比 Hcy 含量為更靈敏的指標(Kerins et al., 2001)。此外，SAH 在阿茲海默症的病人血漿中以及腦中的含量都顯著高於正常人，而且病人腦部的 SAH 含量足以抑制甲基轉移酶，並且和病人的認知能力呈現負相關(Kennedy et al., 2004)。Eto 等人(Eto et al., 2002)亦發現阿茲海默症病人的血漿中，Hcy 和 SAH 含量均顯著高於正常人。另有研究指出纖維囊腫的孩童血漿中 SAH 會上升(Innis et al., 2003)。在喪失腎臟功能的病人身上發現，血漿中 SAH 含量顯著地高於正常人，與膜蛋白的低甲基化相關，造成膜蛋白傷害累積、傷害不能被修復(Pema et al., 1993)。

亦有研究指出 SAH 在肝病和神經系統相關疾病可能扮演重要角色。例如：SAH 上升會促使 TNF- α 對肝臟的毒性，而降低 SAH 含量可使肝毒性降低(Song et al., 2004)；阿茲海默症病人的血漿中，Hcy 和 SAH 含量均顯著高於正常人(Eto et al., 2002)。有少數的細胞試驗更發現 SAH 對細胞造成毒性，如酵母菌(Christopher et al., 2002)、大鼠親鉻細胞瘤細胞(PC12 cells) (Zhao et al., 2002)和小鼠纖維母細胞(L929 cells) (Ratter et al., 1996)。本人最近以 H₂O₂ 誘發小鼠內皮細胞株和人類腸細胞株所得的結果也顯示，SAH 會促進 DNA 傷害(Yang et al., 2003)。此外，本人最近的初步結果顯示：將人類肝細胞(BNL CL.2 cell line)及小鼠神經膠細胞 (BV-2 cell line)以 10 μM SAH 處理時，會顯著的造成 DNA 傷害。以上研究暗示著 SAH 可能具有細胞毒性的作用，但目前 data 並不充分。因此有待進一步探討。

另外前述提及 SAH 的研究稀少，SAH 對人體的影響及其可能的作用機制仍然有限。目前尚無文獻以動物模式探討 SAH 的毒理作用。有趣的是，本人發表於 Nutr. Cancer (Liu et al., 2004)的研究顯示：SAH 會促進 H₂O₂ 對細胞 DNA 的傷害。另外本人亦利用缺乏 DNA

修補酵素 ERCC2 的中國倉鼠卵巢細胞，證明 SAH 會抑制 ERCC2 酵素進而抑制 DNA 修復系統 (Yang, 2004, 博士論文)。因此，當 DNA 受到傷害時，過量的 SAH 可能會使 DNA 傷害擴大。當動物體內 SAH 過高時，是否對肝臟及神經系統造成損傷的動物模式進一步造成傷害擴大？尚有待驗證。

一般人體所能承受的熱壓力及溫度變化有限，當體溫超過身體所能忍受的最大極限時 (多發於炎熱氣候、高溼度或高溫的環境)，隨即會引起腦部缺氧缺血及神經細胞損傷，合併造成多器官衰竭或損傷、組織或內分泌酵素系統的功能障礙，進而危及到生命 (Mcardle et al., 1991; Bouchama et al., 2002)。研究發現熱中風形成時，會造成許多器官及組織的損傷；其中許多文獻報導和證據顯示在肝臟及神經系統中，造成損傷 (Pastor et al., 1999; Sukenik et al., 1991; Bazille et al., 2005; Liu et al., 2004)。Hung 等人 (2005) 指出熱中風大鼠的肝中 Heat shock protein (HSP 72) 蛋白質會過度表現。另有熱中風狒狒的動物模式發現其血漿中 alanine aminotransferase 量增加 (Bouchama et al., 2005)。許多研究發現熱中風大鼠腦中大量單胺類神經傳導物質 (Lin et al., 1995; Kao et al., 1996; Lin MT, 1997; Yang et al., 1998) 和自由基生成 (Yang et al., 2002)，而更進一步的造成腦神經細胞損傷。截至目前為止，臨床上熱中風死亡率偏高，並無藥物或適宜的治療策略，能專一且有效的完全治癒因熱中風所引發的各種損傷。因此在熱中風的預防上顯得更加重要。因此本計畫將利用對肝臟及神經系統造成損傷的動物模式 (熱中風大鼠)，即時監控老鼠之血壓、心跳及腦血流，並測定大鼠的存活時間。

研究方法

1. 細胞培養與處理

BNL CL.2 cell line (小鼠肝細胞)，購自國家衛生研究院細胞庫，培養於 DMEM 培養基其中含有 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)，並置於含有 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱中培養。當細胞生長至九分滿時使用來進行各項處理和分析 (Yang et al., 2003)。

BV-2 cell lines (小鼠神經膠細胞)，購自國家衛生研究院細胞庫，培養於 RPMI 1640 培養液，其中含有 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)，並置於含有 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱中培養。當細胞生長至九分滿時使用來進行各項處理和分析 (He et al., 2002)。二種細胞分別處理不同濃度的 SAH (1 ~ 20 μM) 與 Hcy (50 ~ 2000 μM) 24 至 72 小時，進行各項處理和分析。

2. 細胞存活率 (MTT test) (Loveland et al., 1992)

將等量細胞培養於 24 孔微量平盤，每孔分別置入 1 毫升培養基，文獻中發現人體血漿中 SAH 含量雖然比我們所使用的含量要小，但我們可使用短時間低劑量 SAH 處理細胞，以模擬人體處於長時間低劑量 SAH 的影響。經 24~72 小時後進行讀數。讀數之前，先將 MTT 用 5 % FBS 的 DMEM 稀釋成 1-2 毫克/毫升 (mg/ml)，每孔加入 1 毫升含 MTT 之培養液，於 37°C 下培養 2 小時後，移去培養液，每孔加入 1 毫升 DMSO 加以溶解，直到看不見晶體，以 O.D.492 nm 讀取其吸光值。

3. 彗星分析 (comet assay, DNA 斷裂的指標) (Singh et al., 1988, Yeh et al., 2001)

細胞經 SAH 或 Hcy 培養 24~72hr，分別以 1 x TE (trypsin-EDTA buffer) 切下後，經三層封膠，將玻片浸置於 lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris pH=10, 1% sodium sarcosinate with 1% Triton X-100 and DMSO)、4°C，1 小時。之後放入電泳槽 (電泳液: 1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH)，靜置 15 分鐘使 DNA Unwinding，電泳 20 分鐘 (25 V、300 mA、4°C) 後，放入 Tris buffer 中和 (0.4 M Tris, pH 7.5) 5 分鐘，再以 ethidium bromide 染色，以螢光顯微鏡觀察 DNA 拖尾情況，並加以定量。

4. 細胞內、外 SAH (Wise et al., 1997; Fu et al., 2000)

將細胞收集於 1.5 ml 微量離心管，離心(3000 rpm, 5min)，去除上清液，下層溶解於 80 μ l 之 0.1M sodium acetate buffer(pH 6.0)中，再加入 20 μ l 40% TCA buffer，冰浴 30 min。將沉澱後之樣品進行離心(10000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)，將上清液加入等量的乙醚均勻震盪 30 sec 後進行離心(10000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)並取下層液體，此步驟重複兩次，下層液冰存於 4 $^{\circ}$ C 待進行 HPLC 分析。

HPLC 條件設定如下：使用 Hitachi L-6200 intelligent pump 並連結 L-7420 UV-VIS 偵測器，並設定其波長為 254nm，使用 RP-18 (250 \times 4.6mm, I.D. particle size 5 μ m) 管柱。其移動相為 0.1M sodium acetate, 2.4 mM heptanesulfonic acid 及 4.2% acetonitrile 及 50 mM sodium perchlorate，以 70% perchloric acid 將其 pH 調成 3.5，其流速條件為 1.3ml/min，每次注射 40 μ l 樣品萃取液進行分析。

5. DNA 甲基化的測定 (Cooney et al., 1997)

DNA 甲基化是以 5-methyldeoxycytidine(5-mdc) 來作為指標 (Cooney et al., 1997)，DNA 從細胞中萃取，以 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 方式 (Gupta et al., 1984)，DNA 溶解在 100 μ l 200mM NaOH、中和 12 μ l 200mM 醋酸。之後以 650 μ l H₂O, 130 μ l 醋酸鈉及 20 μ l 10mM ZnSO₄ 混合，再加入 40 μ l nuclease p1 及 alkaline phosphatase 溶液 (1U/ μ l)，最後體積為 200 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下培養 5 小時，之後加 2 倍體積酒精去離心，上清液乾燥之後以水溶解，以 HPLC 分析。

HPLC 分析條件如下：buffer A：0.05mM potassium dihydrogenphosphate 包含 2.5% 甲醇，buffer B：0.05mM potassium dihydrogenphosphate 包含 9% 甲醇。以 UV-VIS 偵測器在 280nm 分析。

6. 試驗設計及流程

當大鼠完成基本手術後，SAH 的投與法為將 SAH 溶於 DMSO 中 (stock solution 的濃度為 1mM；DMSO 的終濃度為 <0.5%)，直接注射 1ml 至股靜脈 (i.v.) 中。注射 1hr 後，即開始進行熱中風誘發，期間必須紀錄各項參數值。

試驗組別：

第一組：控制組。不做任何處理。

第二組：靜脈注射 10 μ M SAH 1hr，不進行熱中風誘發。

第三組：不給予 SAH，進行熱中風誘發。

第四組：靜脈注射 (i.v.) 0.5% DMSO 1hr 後，進行熱中風誘發。

第五組：靜脈注射 (i.v.) 低濃度 (20 μ M) SAH 1hr 後，進行熱中風誘發。

實驗完成後，大鼠死亡之後取出血液、肝臟及腦等器官。將血液離心 (2000g, 15min)，取上清液放微離心管中於 -80 $^{\circ}$ C 保存。肝臟置於液態氮中保存；腦則置於 10% 中性福馬林 (paraformaldehyde) 溶液中浸泡。

7. 熱中風誘發 (Yang et al., 2002)

當大鼠完成基本手術後，再以一外包 PE-200 的 Copper-constantan 熱電偶線插入大白鼠直腸中深約 6 至 7 公分，另一端連接多頻道溫度紀錄器，連續記錄體溫 (T_{co}, colon temperature) 的變化。一切準備妥當後，將大白鼠放入可調控之恆溫箱中，並且可連續偵測箱內溫度 (T_a, ambient temperature)，此時箱內溫度維持於 24 \pm 1 $^{\circ}$ C。將老鼠予以穩定適應一段時間並維持體溫約為 36.0 $^{\circ}$ C 時，關上箱門，然後提高箱內溫度上升至 42 $^{\circ}$ C 並保持這溫度，以誘發大白鼠之熱中風生成。隨著加熱時間不斷持續，動物體動脈血壓不斷

上升，而熱中風形成的判定，是以平均動脈血壓突然瞬間下降 25 毫米汞柱，且血壓瞬間下降的趨勢為不可回復時，再者大白鼠的肛溫需大於 42 °C 以上，此時局部腦血流量亦有瞬間下降的情形，可視為熱中風生成，而此一時間點也稱為熱中風生成點(the onset of heatstroke)。熱中風生成後，即快速打開箱門並停止加熱，並使箱內溫度迅速回復至 24±1 °C，觀察並記錄生理參數的變化和存活時間。

結果與討論

1. SAH 與 Hcy 對 BNL CL.2 與 BV-2 細胞存活率之影響

在小鼠肝細胞(BNL CL.2 cells)及神經膠細胞(BV-2 cells)中，5~20 μM SAH 皆顯著的抑制了細胞存活率(抑制率分別可達 CL-2 cells 64%與 BV-2 : 68%)；而且這個作用具有劑量效應；且隨著培養時間增加，抑制效果亦顯著增加(Fig. 1)。而溶劑組(0.2% DMSO)並不會改變細胞的存活率(Data not shown)。另外，以 Hcy 處理 CL.2 與 BV-2 細胞後，我們發現 5 mM Hcy 能顯著的抑制細胞存活率(抑制率分別可達 CL-2 cells 36%與 BV-2 : 64%)，且具有時間效應；但 1 mM 和 2 mM Hcy 則無明顯的改變(Fig. 2)。

2. SAH 與 Hcy 對 BNL CL.2 與 BV-2 細胞 DNA 傷害之影響

以 SAH 處理 CL.2 細胞 48 小時後，對細胞 DNA 斷裂具有劑量效應，5 ~20 μM SAH 處理組的 TM 值顯著的高於溶劑組(SAH 溶於 0.2% DMSO，0.2% DMSO 不會造成 DNA 斷裂)，分別比溶劑組高了 2.5, 3.8 和 6.9 倍。相對的，Hcy 造成 DNA 斷裂的劑量要達 1mM 以上，5mM Hcy 與 20 μM SAH 的 TM 值相當(Fig. 2A)。我們並發現在 BV-2 細胞下也可觀察到同樣的結果(Fig. 2B)。

3. SAH 與 Hcy 對 BNL CL.2 與 BV-2 細胞內 SAH、SAM 含量之影響

為了瞭解培養 SAH 與 Hcy 是否藉由胞內 SAH、SAM 的改變，造成細胞存活率、DNA 斷裂。我們進一步測定細胞內 SAH、SAM 含量(Table 1)。單純培養 DMSO 48 小時，並不會改變胞內 SAH、SAM 含量。隨著外加 SAH (5~20 μM)劑量增加，細胞內 SAH 顯著的比溶劑組增加(p<0.05)。但 Hcy 則需為 5mM，才能顯著的增加胞內 SAH 含量。當細胞處理 SAH 或 Hcy 48 小時，胞內 SAM 含量皆不會改變。另外，細胞內 SAM/SAH 比例可代表細胞內甲基化程度。我們發現 20 μM SAH 處理組胞內 SAM/SAH 比例顯著的比溶劑組下降(19.4 vs. 6.6)，而 Hcy 的效果並無 SAH 強。在 BV-2 細胞下，亦可觀察到相同結果(Data not shown)。

4. SAH 與 Hcy 對 BNL CL.2 細胞內 5-mdc 含量之影響

我們同時直接測定代表細胞內甲基化程度的 5-mdc 含量變化(Table 2)。5-mdc 含量越低，則顯示細胞內甲基化程度下降(DNA hypomethylation)。當 CL.2 細胞處理 5~20 μM SAH 後，5-mdc%顯著的隨著 SAH 劑量增加而下降(p<0.05)。而 1~5mM Hcy 同樣能使細胞的 5-mdc%降低。20 μM SAH 組與 5mM Hcy 組的 5-mdc%分別比控制組下降了 32%與 9.3%。

5. 結論與建議

本研究的目的是驗證 SAH 對小鼠肝及神經細胞的細胞毒性評估。我們研究發現 SAH 確實會對肝及神經細胞造成 DNA 損傷及抑制細胞存活率，並可能是透過降低細胞內 SAM/SAH 比例與 5-mdc 含量。因此由本研究得知，未來可進一步利用動物試驗驗證 SAH 對肝及神經細胞的毒性作用。

Figure 1. Effect of SAH on cells viability in (A) BNL CL.2 cells and (B) BV-2. BNL CL.2 and BV-2 cells were treated with different concentrate of SAH for 24 h~72 h. Cell viability was determined by MTT and expressed as a percentage of viable cells in the total number of cells counted. The figure shows means \pm SD ($n \geq 5$) for each treatment.

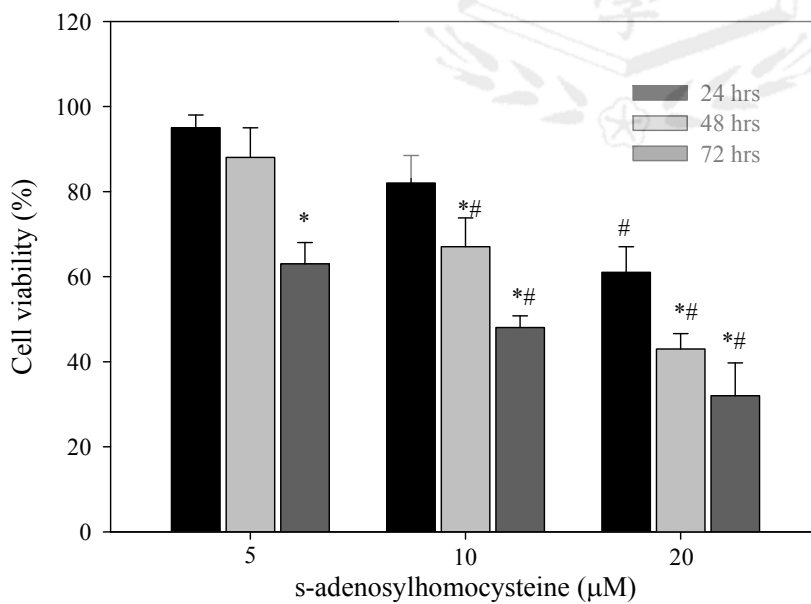
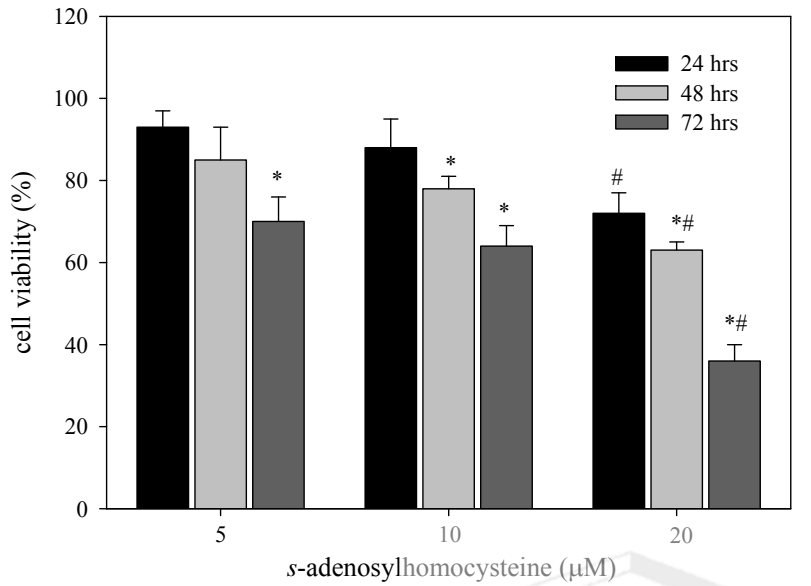


Figure 2. Effect of Hcy on cells viability in (A) BNL CL.2 cells and (B) BV-2. BNL CL.2 and BV-2 cells were treated with different concentrate of Hcy for 24 h~72 h. Cell viability was determined by MTT and expressed as a percentage of viable cells in the total number of cells counted. The figure shows means \pm SD ($n \geq 5$) for each treatment.

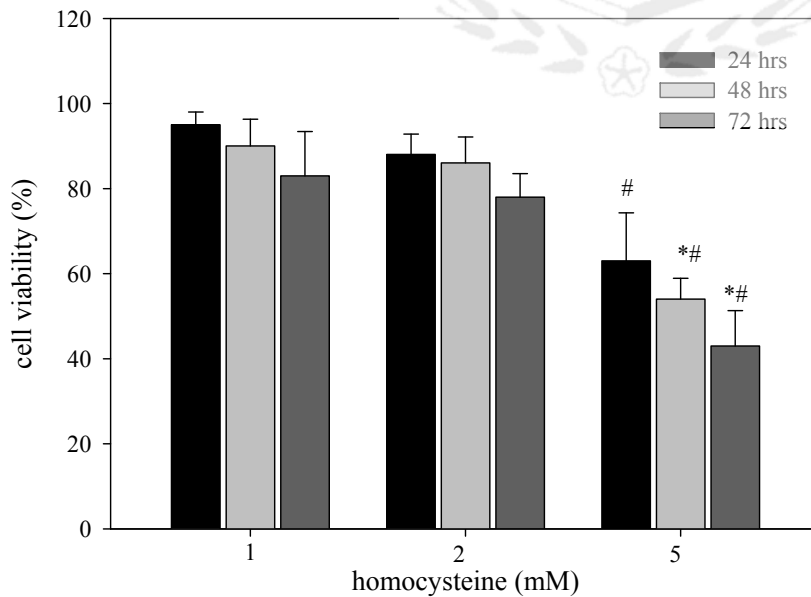
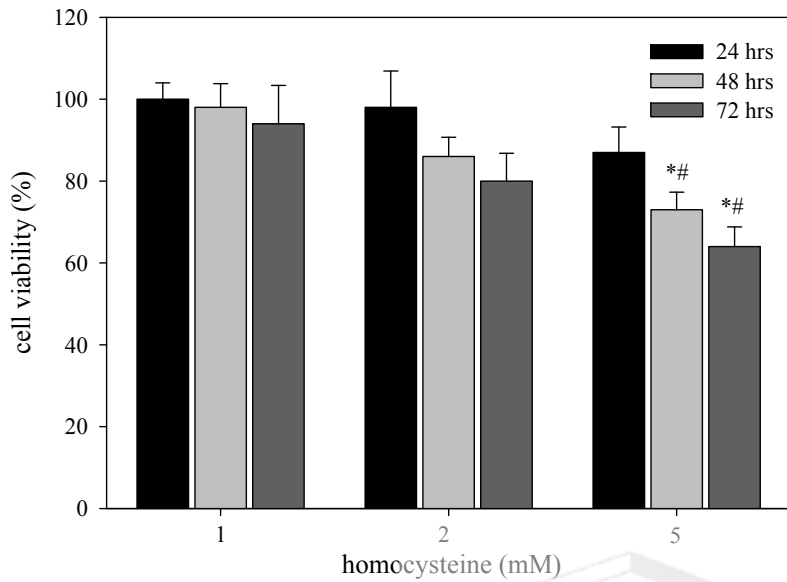


Figure 3. Effects of SAH and Hcy on DNA strand breaks in BNL CL.2 cells (A) and BV-2 cells (B). Cells were treated with SAH (5 to 20 μ M) or Hcy (1 to 5 mM) for 48 hr. DNA strand breaks were determined using comet assay and expressed as tail moment.

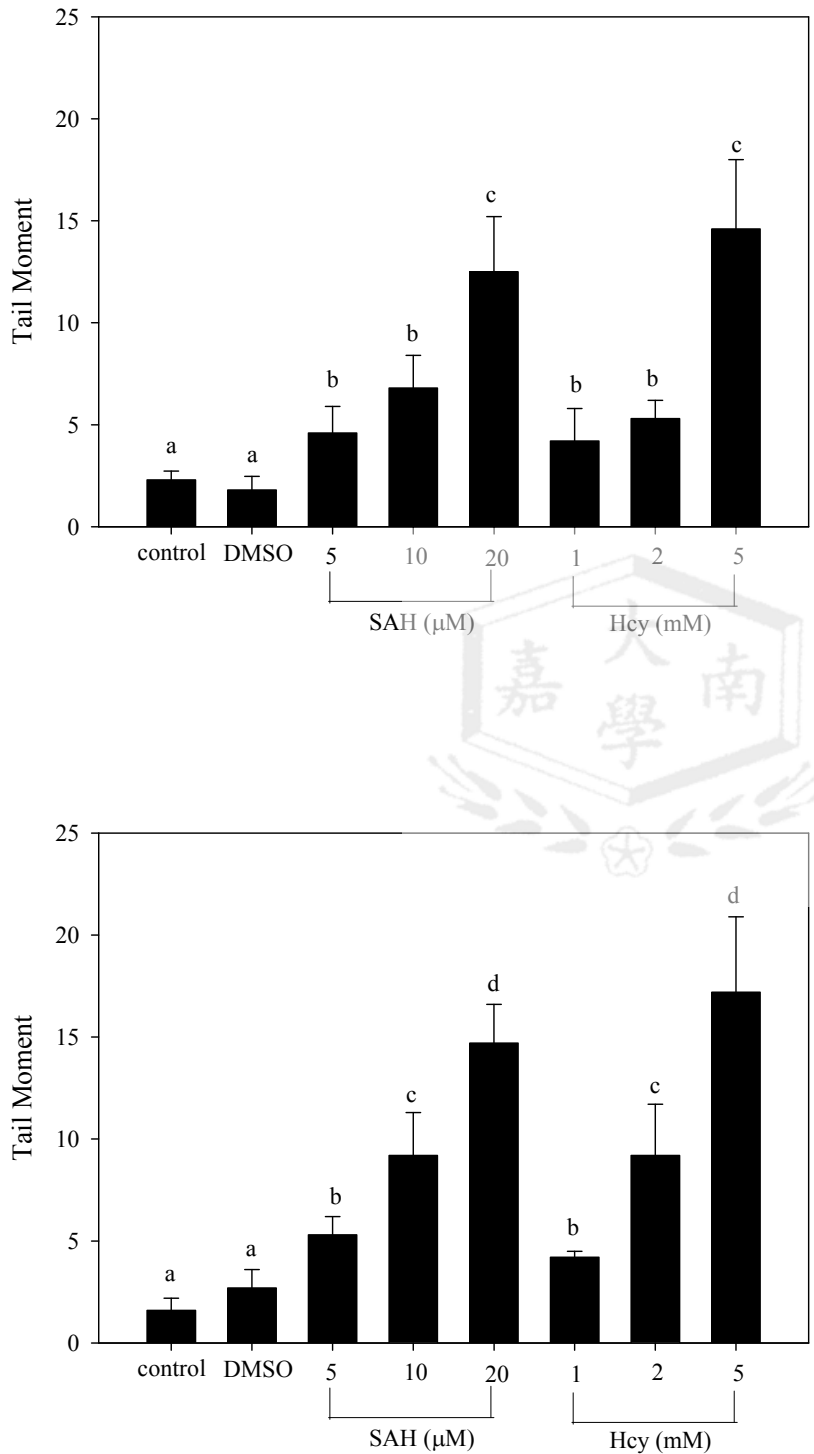


Table 1. Intracellular levels of SAH and SAM in BNL CL.2 cells^{a,b}.

Treatment	SAH (nmol/mg protein)	SAM (nmol/mg protein)	SAM/SAH
Control	1.8±0.1 ^a	31±2	17.0
DMSO	1.7±0.2 ^a	33±3	19.4
SAH			
5 µM	2.1±0.3 ^{ab}	36±3	17.1
10 µM	2.6±0.2 ^b	37±4	14.2
20 µM	5.3±0.3 ^c	35±3	6.6
Hcy			
1 mM	1.9±0.1 ^a	35±4	18.4
2 mM	2.1±0.2 ^a	34±3	16.2
5 mM	2.7±0.1 ^b	36±3	13.3

a: A T-75 flask was seeded with 1×10^6 cells, and the cells were incubated at 37°C for 48 hr.

b: Values are means \pm SD of triplicate assays. Data in the same column not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

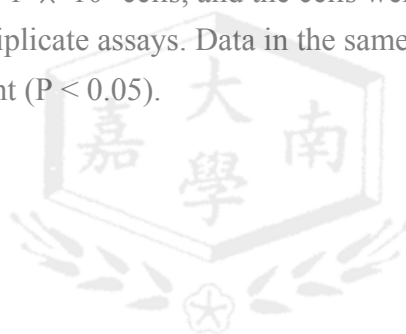


Table 2. The content of 5-methyldeoxycytidine in BNL CL.2 Cells^{a,b,c}.

Treatment	5-methyldeoxycytidine (%)
Control	1.94±0.01 ^d
DMSO	1.93±0.02 ^d
SAH	
5 µM	1.85±0.02 ^c
10 µM	1.78±0.01 ^b
20 µM	1.31±0.03 ^a
Hcy	
1 mM	1.90±0.01 ^c
2 mM	1.89±0.02 ^c
5 mM	1.76±0.01 ^b

a: For each cell line, a T-75 flask was seeded with 1×10^6 cells, and the cells were incubated at 37°C for 48 hr.

b: 5-methyldeoxycytidine (5-mdc) and deoxycytidine (dC) in cellular DNA were determined by high performance liquid chromatography. The molar 5mdc%, that is, $100 \times 5\text{mdc}/(\text{dC}+5\text{-mdc})$, was calculated.

c: Values are means \pm SD of triplicate assays. Data in the same column not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3. Effects of heat exposure (HE; $T_a = 42^\circ\text{C}$) on latency to the onset of heatstroke and survival time in rats treated with normal saline (NS), in rats treated with SAH, and in rats treated with Hcy.

Treatment	Latency (min)	Survival (min)
Rats treated with NS and kept at 24°C	450 ± 3	450 ± 2
Rats treated with NS (1 mL/kg, i.v.) and kept at 42°C	77 ± 3	21 ± 2
Rats treated with DMSO(0.5%, 1 mL/kg,i.v.) and kept at 42°C	80 ± 2	22 ± 3
Rats treated with SAH($20 \mu\text{M}$, 1 mL/kg,i.v.) and kept at 42°C	$65 \pm 4^*$	$10 \pm 3^*$
Rats treated with Hcy(1mM, 1 mL/kg,i.v.) and kept at 42°C	78 ± 2	24 ± 3

Values are the means \pm SEM of 10 rats per group. Groups 2 through 4 exposed to 42°C had HE withdrawn at the onset of heatstroke. NS or drugs were administered before the onset of heatstroke.

* $P < 0.05$ compared with the corresponding control values (rats kept at 24°C) (one-way ANOVA followed by Duncan's test).



參考文獻

- Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. 1998. *Eur. J. Pediatr.* 157: S40-44.
- Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. 1998. *Pharmacol. Therapeut.* 77: 115-134.
- Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increase in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. 2000. *J. Biol. Chem.* 275: 29318-29323.
- Kerins DM, Koury Mj, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. 2001. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 723-729.
- Kennedy BP, Bottiglieri T, Hansen A, and Maslish E. Elevated S-adenosylhomocysteine in Alzheimer rain: influence on methyltransferase and cognitive function. 2004. *J. Neural. Transm.* 111: 547-567.
- Eto, K, Asada, T, Arima, K, Makifuchi, T. and Kimura H. Brain hydrogen sulfite is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 293: 1485-1488.
- Innis SM, Davidson AG, Chen A, Dyer R, Melnyk S, James SJ. Increased plasma homocysteine and S-adenosylhomocysteine and decreased methionine is associated with altered phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in cystic fibrosis. 2003. *J. Pediatr.* 143: 351-356.
- Pema AF, Ingrosso D, Zappia V, Galletti P, Capasso G, DeSanto NG. Enzymatic methyl esterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure. Evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine. 1993. *J. Clin. Invest.* 91: 2497-24503.
- Song Z, Zhou Z, Uriarte S, Wang L, Kang YJ, McClain CJ. S-adenosylhomocysteine sensitizes to TNF- α hepatotoxicity in mice and liver cells: a possible etiological factor in alcohol liver disease. 2004. *Hepato.* 40: 989-997.
- Christopher SA, James SJ, Kruger WD. S-adenosylhomocysteine, but not homocysteine, is toxic to yeast lacking cystathionine β -synthase. 2002. *Mol. Genet. Metabo.* 75: 335-343.
- Zhao WQ, Williams Z, Reuben JS, Lee ES, Charlton CG. S-adenosylmethionine induced apoptosis in PC12 cells. 2002. *J. Neurosci. Res.* 69: 519-529.
- Ratter F, Germer M, Fischbach T, Peter ME, Droge W, Krammer PH, Lehmann V. S-adenosylhomocysteine as a physiological modulator of Apo-1-mediated apoptosis. 1996. *Int. Immunol.* 8: 1139-1147.
- Yang TH, Yang NC, Hu ML. S-adenosylhomocysteine enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage by inhibition of DNA repair in two human cell lines. 2003. *Nutr. Cancer.* 47:70-75.
- Mcardle w.d., Katch, FI. and Katch VL. 1991. *Exercise Physiology.* (3rd ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, USA pp 547-555.
- Bouchama A, Knochel JP. Heat stroke. 2002. *N.Engl.J.Med.* 346: 1978-1988.
- Pastor MA, Perez-Aguilar F, Ortiz V, Nicolas D, Berenguer J. Acute hepatitis due to heatstroke.

- Gastroenterol Hepatol. 1999. 22: 398-399.
- Sukenik S., Livnat S., Hausmann M.J., Sikuler E. Heat stroke associated with massive hepatic necrosis. 1991. Harefuah. 121: 425-429.
- Bazille C, Megarbane B, Bensimhon D, Lavergne-Slove A, Baglin AC, Loirat P, Woimant F., Mikol J., Gray F. Brain damage after heat stroke. 2005. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 64: 970-975.
- Liu CC, Ke D, Chen ZC, Lin MT. Hydroxyethyl starch produces attenuation of circulatory shock and cerebral ischemia during heatstroke. 2004. Shock. 22: 288-294.
- Hung CH, Chang NC, Cheng BC, Lin MT. Progressive exercise preconditioning protects against circulatory shock during experimental heatstroke. 2005. Shock. 23: 426-433.
- Bouchama A, Roberts G, Al Mohanna F, El-Sayed R, Lach B, Chollet-Martin S, Ollivier V, Al Baradei R, Loualich A, Nakeeb S, Eldali A, de Prost D. Inflammatory, hemostatic, and clinical changes in a baboon experimental model for heatstroke. 2005. J Appl. Physiol. 98: 697-705.
- Lin MT, Kao TY, Chio CC, Jin YT. Dopamine depletion protects striatal neurons from heatstroke-induced ischemia and cell death in rats. 1995. American Journal of Physiology. 269: H487-H490.
- Kao TY, Lin MT. Brain serotonin depletion attenuates heatstroke-induced cerebral ischemia and cell death in rats. 1996. Journal of Applied Physiology. 80: 680-684.
- Lin MT. Heatstroke-induced cerebral ischemia and neuronal damage. Involvement of cytokines and monoamines. 1997. Annals of the New York Academy of Sciences. 813: 572-580.
- Yang YL, Pan WH, Chiu TH, Lin MT. Striatal glutamate release is important for development of ischemic damage to striatal neurons during rat heatstroke. 1998. Brain Research. 795: 121-127.
- Yang CY, Lin MT. Oxidative stress in rats with heatstroke-induced cerebral ischemia. 2002. Stroke. 33: 790-794.
- He BP, Wen W, Strong MJ. Activated microblia (BV-2) facilitation of TNF-mediated motor neuron death in vitro. 2002. J. Neuroimmunol. 128: 31-38.
- Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. 1992. Biochem. Intern. 27: 501-510.14.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. 1988. Exp. Cell Res. 175: 184-191.
- Yeh SL, Hu ML. Induction of oxidative DNA damage by oxidized lycopene and β -carotene in Hs68 cells. 2001. Free Radic. Res. 35: 203-213.
- Wise Ck, Conney CA, Ali SF, and Poiror LA. Measuring S-adenosylhomocysteine in whole blood, red blood cells and culture cells using a fast preparation method and high-performance chromatography. 1997. J. Chromator. B. 696: 145-152.
- Fu W, Dudman NPB, Perry MA, Young K, Wang XI. Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine. 2000. Biochem Biophys. Res. Commun. 271: 47-53.
- Cooney CA, Wise CK, Poirier LA. An improved sample preparation method for the quantitative HPLC determination of 5-methyldeoxycytidine in animal tissue DNA. 1997. J. Liq. Chrom. &

Rel. Technol. 20:1279-1293.

Gupta RC. Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-Acetyl-aminofluorene to repetitive sequence of rat liver DNA in vivo. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6943-6947.

計畫成果自評

本計畫成果豐碩，驗證了 SAH 的細胞毒性，達成預估目標。未來應至少可發表 2 篇國外期刊(已在準備中)。並訓練了二位碩士班研究生(一位目前已至清華大學研讀博士，另一位尚在研讀碩士)與一位大學專題生(準備研究所甄試中)。

