

香椿與食茱萸萃取物對女性癌細胞之研究

周怡雯、蔡明勳

E-mail: 322075@mail.dyu.edu.tw

摘要

由行政院衛生署所公佈的統計資料顯示，癌症死亡率自1982年起已連續每年都位居國人十大死因之首位。近年來，女性癌症包括乳房，卵巢和子宮頸癌的發生率和死亡率明顯增長，因此對於這些癌症的防治工作已到了刻不容緩的地步。在許多研究報告中可以發現，抗癌藥物誘發細胞進程式性死亡是目前著重的一個研究方向。數種治療乳癌的化學治療藥物被報導會引起許多副作用，所以低毒性甚至無毒的中草藥及食材成為當前抗癌熱門話題。在此研究中，使用民間常用中草藥—香椿 *Toona sinensis* (TS) 與食茱萸 *Zanthoxylum ailanthoides* (ZA)，本研究使用50%乙醇萃取此兩種植物之根、莖、葉、刺和樹皮，共得九種萃取物，分別使用最終濃度0.05和0.02 mg/mL作用於人類女性癌症細胞，包括：MCF-7乳癌細胞株、HeLa子宮頸癌細胞株、PA-1卵巢癌細胞株，作用24及48小時後，針對細胞存活率和細胞週期進行分析研究。利用trypan blue染劑排除實驗證明此九種萃取物皆能有效殺死三種癌細胞。利用3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay測試細胞活性，評估不同萃取物對腫瘤細胞株生長的影響，結果發現TS及ZA萃取物以劑量依賴(dose-dependent)和時間依賴(time-dependent)方式導致此三種女性癌症細胞死亡。九種萃取物中，以香椿莖(TSS)、香椿葉(TSL)、食茱萸根(ZAR)與食茱萸莖(ZAS)有最明顯的細胞致死作用。以流式細胞儀分析發現，此四種萃取物對三種癌細胞的生長抑制都使其細胞週期停滯在Sub-G1期，以AnnexinV/Propidium iodine 雙染色法證明細胞凋亡狀況。進一步以西方墨點法分析促進細胞凋亡的BAX蛋白質分子表現量，發現導致細胞凋亡的BAX蛋白表現增加。綜合以上結果，可以推測香椿與食茱萸萃取物可能破壞MCF-7乳癌細胞、HeLa子宮頸癌細胞和PA-1卵巢癌細胞的複製與細胞週期進行。在未來，香椿與食茱萸萃取物也許有潛力開發為抗癌藥物，而其抗三種女性癌細胞的機制需要進一步研究。

關鍵詞：細胞凋亡、抗癌研究、乳癌細胞、子宮頸癌細胞、卵巢癌細胞、香椿、食茱萸

目錄

封面內頁	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv	英文摘要	vi	目錄	ix	圖目錄	xiv	表目錄	xvii	1. 緒論	1	2. 文獻回顧	3	2.1 植物簡介	3	2.1.1 香椿	3	2.1.2 香椿之成分	5	2.1.3 香椿之功效	6	2.1.4 食茱萸	7	2.1.5 食茱萸之成分	8	2.1.6 食茱萸之功效	9	2.2 癌症	10	2.2.1 乳癌	11	2.2.1.1 乳癌的致病因子	11	2.2.2 子宮頸癌	12	2.2.2.1 子宮頸癌的致病因子	13	2.2.3 卵巢癌	14	2.2.3.1 卵巢癌的致病因子	15	2.3 細胞週期 (Cell cycle)	15	2.4 Cell cycle調控簡介	17	2.4.1 Bcl-2家族(Bcl-2 family)	17	2.5 細胞凋亡	19	2.6 誘發細胞凋亡在癌症治療上的應用	20	2.7 MTT assay(Tetrazolium dye colorimetric assay)	21	2.8 細胞週期測定	23	2.8.1 流式細胞儀	23	2.8.2 Propidium iodine (PI)	25	2.8.3 Annexin V	26	3. 材料與方法	27	3.1 實驗材料及儀器	27	3.1.1 細胞株來源	27	3.1.2 細胞培養	27	3.1.3 萃取物抑制生長測定用品來源	28	3.1.4 細胞生長週期測定用品來源	28	3.1.5 西方點墨法用品來源	28	3.2 實驗儀器設備來源	29	3.3 藥品配製	30	3.4 植物萃取液配製	34	3.5 細胞培養(Cell cultures)	34	3.5.1 解凍細胞	34	3.5.2 繼代培養	35	3.5.3 細胞計數	35	3.5.4 冷凍細胞	36	3.5.5 利用倒立式位像差顯微鏡檢測細胞型態的影響	36	3.6 MTT assay (Tetrazolium dye colorimetric assay)	37	3.7 流式細胞儀(Flow cytometry)	38	3.7.1 分析各細胞週期的比率	38	3.7.2 分析細胞死亡的情形(為細胞凋亡或壞死)	39	3.8 萃取細胞全蛋白質及蛋白濃度測定	39	3.8.1 抽取細胞全蛋白質	39	3.8.2 蛋白質濃度測定	40	3.9 西方點墨法(Western blotting)	41	3.9.1 SDS-PAGE蛋白質電泳分析	41	3.10 統計分析	45	4. 結果與討論	46	4.1 香椿與食茱萸對人類女性癌症細胞株型態上的影響	58	4.2 香椿與食茱萸對人類女性癌症細胞株存活率之測定	62	4.3 香椿與食茱萸對人類女性癌症細胞株抑制率之測定	62	4.3.1 香椿與食茱萸對人類女性乳癌細胞株抑制率之測定	63	4.3.2 香椿與食茱萸對人類女性子宮頸癌細胞株抑制率之測定	65	4.3.3 香椿與食茱萸對人類女性卵巢癌細胞株抑制率之測定	67	4.4 香椿與食茱萸對人類女性癌症細胞株細胞週期之影響	68	4.4.1 香椿與食茱萸對人類女性乳癌細胞株影響細胞週期之比例	70	4.4.2 香椿與食茱萸對人類女性子宮頸癌細胞株影響細胞週期之比例	72	4.4.3 香椿與食茱萸對人類女性卵巢癌細胞株影響細胞週期之比例	74	4.5 香椿與食茱萸對人類女性癌症細胞株細胞凋亡或壞死之探討	76	4.5.1 香椿與食茱萸對人類乳癌細胞株(MCF-7)細胞凋亡或壞死之探討	76	4.5.2 香椿與食茱萸對人類子宮頸癌細胞株(HeLa)細胞凋亡或壞死之探討	78	4.5.3 香椿與食茱萸對人類卵巢癌細胞株(PA-1)細胞凋亡或壞死之探討	80	4.6 香椿與食茱萸對人類女性癌症細胞株(MCF-7、HeLa、PA-1)細胞凋亡相關蛋白質BAX之探討	82	4.6.1 香椿與食茱萸對人類乳癌細胞株(MCF-7)細胞凋亡相關蛋白質BAX之探討	83	4.6.2 香椿與食茱萸對人類子宮頸癌細胞株(HeLa)細胞凋亡相關蛋白質BAX之探討	84	4.6.3 香椿與食茱萸對人類卵巢癌細胞株(PA-1)細胞凋亡相關蛋白質BAX之探討	86	4.7 探討香椿與食茱萸萃取物對正常細胞的影響	88	5. 結論	91	參考文獻	96	圖目錄	圖2.1 香椿樹外型	4	圖2.2 香椿葉	4	圖2.3 食茱萸外型	8	圖2.4 細胞週期的進行	16	圖2.5 粒線體細胞凋亡路徑	18	圖2.6 細胞死亡的兩種型式	20	圖2.7 MTT及其經由succinate dehydrogenase還原後所形成之formazan產物構造	23	圖2.8 流式細胞儀以接受器分	
------	-----	-----	-----	------	----	------	----	----	----	-----	-----	-----	------	-------	---	---------	---	----------	---	----------	---	-------------	---	-------------	---	-----------	---	--------------	---	--------------	---	--------	----	----------	----	-----------------	----	------------	----	-------------------	----	-----------	----	------------------	----	-----------------------	----	--------------------	----	-----------------------------	----	----------	----	---------------------	----	---	----	------------	----	-------------	----	-----------------------------	----	-----------------	----	----------	----	-------------	----	-------------	----	------------	----	---------------------	----	--------------------	----	-----------------	----	--------------	----	----------	----	-------------	----	-------------------------	----	------------	----	------------	----	------------	----	------------	----	----------------------------	----	--	----	---------------------------	----	------------------	----	---------------------------	----	---------------------	----	----------------	----	---------------	----	-----------------------------	----	-----------------------	----	-----------	----	----------	----	----------------------------	----	----------------------------	----	----------------------------	----	------------------------------	----	--------------------------------	----	-------------------------------	----	-----------------------------	----	---------------------------------	----	-----------------------------------	----	----------------------------------	----	--------------------------------	----	---------------------------------------	----	--	----	---------------------------------------	----	--	----	--	----	---	----	--	----	-------------------------	----	-------	----	------	----	-----	------------	---	----------	---	------------	---	--------------	----	----------------	----	----------------	----	--	----	-----------------	--

析不同散射光及螢光 24 圖2.9 細胞在流式細胞儀中經雷射光照射產生之不同散射光 25 圖3.1 轉漬夾型式圖 43 圖4.1 A 利用顯微鏡觀測經萃取物處理之乳癌(MCF-7)細胞株，分別於24小時及48小時後的形態改變 47 圖4.1 B 利用顯微鏡觀測經萃取物處理乳癌(MCF-7)細胞株，分別於24小時及48小時後的形態改變 48 圖4.1C 利用顯微鏡觀測經萃取物處理乳癌(MCF-7)細胞株，於24小時及48小時後的形態改變 49 圖4.1 D 利用顯微鏡觀測經萃取物處理乳癌(MCF-7)細胞株，於24小時及48小時後的形態改變 50 圖4.1 E 利用顯微鏡觀測經萃取物處理子宮頸癌(HeLa)細胞株，於24小時及48小時後的形態改變 51 圖4.1 F 利用顯微鏡觀測經萃取物處理子宮頸癌(HeLa)細胞株，於24小時及48小時後的形態改變 52 圖4.1G 利用顯微鏡觀測經萃取物處理子宮頸癌(HeLa)細胞株，於24小時及48小時後的形態改變 53 圖4.1H 利用顯微鏡觀測經萃取物處理子宮頸癌(HeLa)細胞株，於24小時及48小時後的形態改變 54 圖4.1I 利用顯微鏡觀測經萃取物處理卵巢癌(PA-1)，於24小時及48小時後的形態改 55 圖4.1J 利用顯微鏡觀測經萃取物處理卵巢癌(PA-1)，於24小時及48小時後的形態改變 56 圖4.1K 利用顯微鏡觀測經萃取物處理卵巢癌(PA-1)，於24小時及48小時後的形態改變 57 圖 4.1L 利用顯微鏡觀測經萃取物處理卵巢癌(PA-1)，於24小時及48小時後的型態改變 58 圖 4.2 A 香椿與食茱萸各部分萃取物0.05 mg/mL 處理人類女性乳癌細胞株(MCF-7) 24及48小時後，以血球計數器計數細胞存活率 60 圖 4.2 B 香椿與食茱萸各部分萃取物0.05 mg/mL 處理人類女性子宮頸癌細胞株(HeLa) 24及48小時後，以血球計數器計數細胞存活率 61 圖 4.2 C 香椿與食茱萸各部分萃取物0.05 mg/mL 處理人類女性卵巢癌細胞株(PA-1) 24及48小時後，以血球計數器計數細胞存活率 62 圖4.4 A 香椿與食茱萸不同萃取物對乳癌細胞株(MCF-7)之細胞週期影響 71 圖4.4 B 香椿與食茱萸不同萃取物對子宮頸癌細胞株(HeLa)之細胞週期影響 73 圖4.4 C 香椿與食茱萸不同萃取物對卵巢癌細胞株(PA-1)之細胞週期影響 75 圖4.5 A 香椿與食茱萸對人類乳癌細胞株 (MCF-7) 細胞凋亡之影響 77 圖4.5 B 香椿與食茱萸對人類子宮頸癌細胞株 (HeLa) 細胞凋亡之影響 79 圖4.5 C 香椿與食茱萸對人類卵巢癌細胞株 (PA-1) 細胞凋亡之影響 81 圖4.6 A 以西方點墨法分析觀察與apoptosis有關的BAX的蛋白表現量 84 圖4.6 B 以西方點墨法分析觀察與apoptosis有關的BAX的蛋白表現量 85 圖4.6 C 以西方點墨法分析觀察與apoptosis有關的BAX的蛋白表現量 87 圖4.7 A 利用顯微鏡觀測經萃取物0.02 mg/mL處理人類肺纖維細胞株於24小時及48小時後的形態改變 89 圖4.7 B 利用顯微鏡觀測經萃取物0.02 mg/mL處理人類肺纖維細胞株於24小時及48小時後的形態改變 90 表目錄 表 3.1 Sample buffer 配製比例 33 表 3.2 SDS-PAGE 上層膠配製比例 41 表 3.3 SDS-PAGE 下層膠配製比例 42 表4.3 A 香椿與食茱萸各部位萃取物0.05 mg/mL對MCF-7 細胞處理24小時及48小時之MTT存活率 64 表4.3 B 香椿與食茱萸各部位萃取物0.05 mg/mL對HeLa 細胞處理24小時及48小時之MTT存活率 64 表4.3 C 香椿與食茱萸各部位萃取物0.05 mg/mL對PA-1 細胞處理24小時及48小時之MTT存活率 66 表4.3 D 香椿與食茱萸各部位萃取物0.02 mg/mL對MCF-7 細胞處理24小時及48小時之MTT存活率 66 表4.3 E 香椿與食茱萸各部位萃取物0.02 mg/mL對HeLa 細胞處理24小時及48小時之MTT存活率 68 表4.3 F 香椿與食茱萸各部位萃取物0.02 mg/mL對PA-1 細胞處理24小時及48小時之MTT存活率 68 表4.5 A 香椿與食茱萸不同萃取物對人類乳癌細胞株處理48小時，以Annexin V/PI染色後以流式細胞儀分析 78 表4.5 B 香椿與食茱萸不同萃取物對人類子宮頸癌細胞株處理48小時，以Annexin V/PI染色後以流式細胞儀分析 80 表4.5 C 香椿與食茱萸不同萃取物對人類卵巢癌細胞株處理48小時，以Annexin V/PI染色後以流式細胞儀分析 82

參考文獻

1. 王珮憶。2001。椿葉水萃取液在Alloxan所誘發糖尿病鼠中降血糖作用之研究。高雄醫學大學醫學研究所碩士論文。
2. 甘偉松。1980。臺灣藥用植物誌 第1-3 卷。中國醫藥研究所出版。
3. 李興保。2000。早期乳腺癌的保乳治療。淮海醫藥期刊18(4):269。
4. 李孟達。1991。子宮頸癌淋巴轉移的相關因素。國外醫學；婦產科學分冊18(1):8-9。
5. 明 李時珍撰。1979。本草綱目。第36-38頁。宏業書局。
6. 林宗旦、林宗平、林景彬。1985。新編中藥大辭典。第4205-4207頁。新文豐出版公司。
7. 徐沛甄、徐雯敏、許勝光、廖俊旺、王銘富、詹吟菁。2003。香椿葉萃取物對老化促進小白鼠學習記憶能力之影響。中華民國營養學會第29屆年會暨學術研討會手冊。
8. 國家衛生研究院。2007。TCOG子宮頸癌臨床指引。國家衛生研究院。
9. 國家衛生研究院。2004a。乳癌診斷與治療共識。國家衛生研究院。
10. 國家衛生研究院。2004b。子宮頸癌篩檢、子宮頸癌、子宮內膜癌、上皮性卵巢癌臨床指引。國家衛生研究院。
11. 崔月犁、冉先德等三十多人。1993。中華藥海。第538-542。哈爾濱出版社。
12. 張雪娥、陳健祺、楊媛綸、許麗鳳、王叔苑、陳姍姍、陳瓊雲、魏育慧、黃效民、袁國芳。1998。利用動物細胞進行安全性評估 - 雙歧桿菌的長期毒性試驗。食品工業發展研究所研究報告第87-1297號。
13. 程劍華、李以鑽。1998。抗癌植物藥及其驗方。第608頁。江西科學出版社。
14. 曾薰緻、顏郁晉。2000。乳癌治療的趨勢。聲洋防癌之聲；90(3):9-13。
15. 楊今詳。1992。抗癌中草藥製劑。第165頁。渡假出版社有限公司。
16. 楊再興。1982。台灣植物名彙。第2301-2303頁。天然書社有限公司。
17. 潘吉初。1977。標準藥性大字典。第106頁。新文豐出版社。
18. 衛生署全國衛生統計資訊網。http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=10238&class_no=440&level_no=1
19. 歐辰雄、何東輯。1997。台灣產芸香科植物介紹(IX)花椒屬2。自然保育季刊春季刊 第17 期。台灣省農業試驗所。
20. 魏育慧:利用動物細胞進行抗癌藥物篩選。2000。食品工業。32(11):27-35。
21. 聲洋防癌之聲。<http://www.sydao.org.tw/bulletin/bulletin.html>
22. Ahmedin, J., D.V.M., Rebecca, S., Elizabeth, W. M., Yongping, H., Jiaquan, X. and Michael, J. T. 2009. Cancer Statistics 2009. A Cancer Journal of Clinician. 59:225-249.
23. Allan, A. L., Vantighem, S. A., Tuck, A. B., Chambers, A. F., Chin-Yee, I. H. and Keeney, M. 2005. Detection and quantification of circulating tumor cells in mouse models of human breast cancer using immunomagnetic enrichment and multiparameter flow cytometry. Cytometry Part A. 65:4-14.
24. Amit, M. W., Gillies, M. K. and Ruth, J. M. 1997. Cyclin A message, stability varies with the cell cycle. Cell Growth and Differentiation. 8:311-318.
25. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M. and Draetta, G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for

cell cycle progression in G1. *Genes & Development*. 7:812-821. 26. Boersma, H. H., Kietselaer, B. L. and Stolk, L.M. 2005. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *Journal of Nuclear Medicine*. 46:2035-2050. 27. Bohn, H. and Kraus, W. 1979. Isolation and characterization of a new placenta specific protein. *Arch Gynecol*. 227:125-134. 28. Boulikas, T. 1994. Control of DNA replication by protein phosphorylation. *Anticancer Research*. 14(6B):2465-2472. 29. Bray, F., Parkin, D. M., Ferlay, J. and Pisani, P. 2005. Global cancer statistics. 2002. *A Cancer Journal for Clinicians*. 55(2): 74-108. 30. Bristow, R. E. and Karlan, B. Y. 1996. Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. *Fertility and Sterility*. 66(4):499-507. 31. Chang, H. C., Hung W. C., Huang, M. S. and Hsu, H. K. 2002. Extract from the leaves of *Toona sinensis* exert potent anti-proliferative effect on human lung cancer cells. *American Journal of Chinese*. 2:307-314. 32. Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. and Lee, W. H. 1989. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*. (58):1193-1199. 33. Chiou, S. K., Rao, L. and White E. 1994. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Molecular & Cellular Biology*. 14(6):4333. 34. Chiou, W. F., Sung, Y. J., Liao, J. F., Shum, A. Y. and Chen, C. F. 1997. Inhibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrophages. *Journal of Nature Products*. 60:708-711. 35. Chiou, W. F., Liao, J. F. and Chen, C. F. 1996. Comparative study of the vasodilatory effects of three quinazoline alkaloids isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Journal of Nature Products*. 59:374-378. 36. Courjal, F., Louason, G., Speiser, P., Katsaros, D., Zeillinger, R. and Theillet, C. 1996. Cyclin gene amplification and over-expression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *International Journal of Cancer*. 69:247-53. 37. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del-Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P. and Traganos, F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 13:795-808. 38. Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 89:271-7. 39. Diamandopoulos, G. T. 1996. An historical perspective. *Anticancer Research*. 16:1595-1602. 40. Draetta, G. F. Mammalian, G1 cyclins. 1994. *Current Opinion in Cell Biology*. 6(6):842-846. 41. Edmonds, J. M. and Staniforth, M. 1998. *Toona Sinensis* Meliaceae. *Curtis's Botanical Magazine*. 15 (3):186-193. 42. Eguchi, Y., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Research*. 57:1835-1840. 43. Evan, G. and Friesel, R. 1996. A license to kill. *Cell*. 85(6):781-784. 44. Ferrari, M., Fornasiero, M. C. and Isetta, A. M. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxicity activity in vitro. *Journal Immunological Methods*. 131:165-72. 45. Gerhart, J., Wu, M., Cyert, M. and Kirschner, M. 1985. M-phase promoting factors from eggs of *Xenopus laevis*. *Cytobios*. 43(174S):335-47. 46. Gerschenson, L. E. and Rotello, R. J. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB Journal*. 6(7):2450-5. 47. Gong, J., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. 1994. Staurosporine blocks cell progression through G1 between the cyclin D and cyclin E restriction points. *Cancer Research*. 54(12):3136-9. 48. Henshaw, E. C. 1995. A multidisciplinary approach for physicians and students. *Clinical Oncology*. 8:23-24. 49. Hsieh, T. J., Liu, T. Z., Chia, Y. C., Chern, C. L., Lu, F. J., Chuang, M. C., Mau, S. Y., Chen, S. H., Syu, Y. H. and Chen, C. H. 2004. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* Meliaceae against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. *Food and Chemical Toxicology*. 42(5):843-850. 50. Huh, D., Gu, W., Kamotani, Y., Grotberg, J. B. and Takayama, S. 2005. Micro-fluidics for flow cytometric analysis of cells and particles. *Physiological Measurement*. (26):173-198. 51. Ibrado, A. M., Huang, Y., Fang, G., Liu, L. and Bhalla, K. 1996. Over-expression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res*. 56:4743-4748. 52. Jacobson M. D., Weil M. and Raff M. C. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997. 88:347-354. 53. Jennifer, M. E. and Martin, S. 1998. *Toona Sinensis*. Bentham-Moxon Trust. 186-196. 54. Jennings, C. D. and Foon, K. A. 1997. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 90:2863-2892. 55. Kerr, J. F. R., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancers*. 73(8):2013-2026. 56. King, C. L., Kong, Y. C., Wong, N. S., Yeung, H. W., Fong, H. H. 1980. and Sankawa U. Uterotonic effect of *Evodia rutaecarpa* alkaloids. *Journal of Nature Products*. 43:577-582. 57. Ko, H. C., Tsai, T. H., Chou, C. J., Hsu, S. Y., Li S. Y. and Chen, C. F. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of rutaecarpine in rat plasma: application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography*. 655:27-31. 58. Lakhani, S., Khanna, N. C. and Tewari, K. K. 1993. Nascent transcript-binding protein of the pea chloroplast transcriptionally active chromosome. *Plant Molecular Biology*. 5:963-979. 59. Lin, L. C., Chou, C. J., Chen, K. T. and Chen, C. F. 1991. Flavonoids from *Evodiae Fructus*. *Journal of Chinese Medicine*. 2: 94-100. 60. Matsuda, H., Wu, J. X., Tanaka, T., Iinuma, M. and Kubo, M. 1997. Anti-nociceptive activities of 70 % methanol extract of *evodia fructus* (fruit of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*) and its alkaloidal components. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 20: 243-248. 61. Moon, T. C., Murakami, M., Kudo, I., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. 1999. A new class of COX-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evodia rutaecarpa*. *Inflammation Research*. 48:621-625. 62. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2):55-63. 63. Newbold, R. R., Jefferson, W. N., Padilla-Burgos, E. and Bullock, B. C. 1997. Uterine carcinoma in mice treated neonatally with Tamoxifen. *Carcinogenesis*. 18:2293-2298. 64. Offit, K., Gilewski, T., McGuire, P., Schluger, A., Hampel, H., Brown, K., Swensen, J., Neuhausen, S., Skolnick, M., Norton, L. and Goldgar, D. 1996. Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *The Lancet*. (347): 1643-1645. 65. Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M. and Pagano, M. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular & Cellular Biology*. 15(5):2612-2624. 66. Oltvai, Z. N., Millman, C. L. and Korsmeyer, S. J. 1993. Bcl-2 hetero-dimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74(4):609-619. 67. Park, J. C., Yu, Y. Y., Lee, J. H., Chol, J. S. and Ok, K. D. 1996. Phenolic Compounds from the Rachis of *Cedrela sinensis*. *Korea Journal of Pharmacogn*. 27(3):219-223. 68. Parkin, D. M., Pisani, P. and Ferlay, J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of

eighteen major cancers in 1985. *International Journal of Cancer*. 54:594-606. 69. Reed, 1995. J. C. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemo-resistance. *Current Opinion in Oncology*. 7:541-546. 70. Reed, S. I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D. and Slingerland, J. 1994. G1 control in mammalian cells. *Journal of Cell Science - Supplement*. 18:69-73. 71. Rexen, P. and Emborg, C. 1992. Investigation of different modifications to the tetrazolium based colorimetric viability assay. *Biotechnology Techniques*. 6:255-260. 72. Reutelingsperger, C. P., Hornstra, G. and Hemker, H. C. 1985. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem*. 151:625-629. 73. Rossing, M. A., Daling, J. R., Weiss, N. S., Moore, D. E. and Self, S.G. 1994. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *The New England Journal of Medicine*. 331(12):771-6. 74. Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L. and Wang, H. G. 1995. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.92(5):2016. 75. Sager, R. 1992. Tumor suppressor genes in the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*. 4(2):155-160. 76. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell line. *Cancer Research*. 48:4827-4833. 77. Schiffman, M. H. and Brinton, L. A. 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*. (76):1888-1901. 78. Senderowicz, A. M. 2004. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Current Opinion in Cell Biology*. 16(6):670-678. 79. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*. 9(10):1149-1163. 80. Shapiro, H. M. 2003. *Practical flow cytometry*. 4th Edition. John Wiley & Sons. 81. Shapiro, H. M. 1985. *Practical, flow cytometry*. Alan R. Liss Inc. New York. 82. Slater, T. F., Sawyer, B. and Strauli, U. D. 1963. *Biochim Biophys Acta*. (77):383. 83. Smith, M. L. and Fornace, A. J. 1996. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Research*. 340:109-124. 84. Sutherland, C., Campbell, D. G. and Cohen, P. 1993. Identification of insulin-stimulated protein kinase-1 as the rabbit equivalent of rskmo-2. Identification of two threonine phosphorylated during activation by mitogen-activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry*. (212):581-588. 85. Tait, J. F. 1985. Clinical application of annexins. In: Seton B.A. ed. *Annexin V: molecular structure to cellular function*. 1996. 213-220. 86. Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E. and Croce C. M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 228(4706):1440-1443. 87. Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 335(6189):440-442. 88. Van Heerde, W. L., de Groot, P. G., Reutelingsperger, C. P. 1995. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost* 73:172-217. 89. Venn, A., Watson, L., Lumley, J., Giles, G., King, C. and Healy, D. 1995. Breast and ovarian cancer incidence after infertility and in vitro fertilization. *Lancet*. 346(8981):995-1000. 90. Wang, G. J., Shan, J., Pang, P. K. T., Yang, M. C. M., Chou, C. J. and Chen, C. F. 1996. The vaso-relaxing action of rutaecarpine: direct paradoxical effects on intracellular calcium concentration of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 276:1016-1021. 91. Wang, C. Y., Lin K. H., Yang, C. J. Tsai, J. R., Hung, J. U., Wang, P. H., Hsu, H. K and Huang, M. H. 2010. Toona sinensis extracts induced cell cycle arrest and apoptosis in the human lung lagre cell carcinoma. *Kaohsiung Journal of Medicine Science*. 26: 68 – 75. 92. Williams, G. T. and Smith, C. A. 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*. 74(5): 777-779. 93. Yan, X. M., Zhong, W. W., Tang, A. J., Schielke, E. G., Hang, W. and Nolan, J. P. 2005. Multiplexed flow cytometric immunoassay for influenza virus detection and differentiation. *Analytical Chemistry*. 77:7673-7678. 94. Yang, L. M., Chen, C. F. and Lee, K. H. 1995. Synthesis of rutaecarpine and cytotoxic analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 5:465-468. 95. Yu, L. L., Liao, J. F. and Chen, C. F. 1994. Effect of the crude extract of Evodiae fructus on the intestinal transit in mice. *Planta Medica*. 60:308-312.