

編號：CCMP91-RD-117

## 以基因列陣法快速開發台灣抗癌草藥資源 及其基原成分與療效研究（2-2）

顏銘宏

高雄醫學大學藥學系

### 摘 要

本計畫係兩年期計畫，第一年已從民間、中藥大辭典記載及台灣現有之抗癌中草藥中篩選、萃取出數十種台灣中草藥，並進行其萃提取物之活性與機轉試驗。第二年從南台灣黃芩（*Scutellaria austrotaiwanensis*）、台灣敗醬（*Patrinia formosana*）、長葉耳草（*Hedyotis uncinella*）、蟛蜞菊（*Wedelia chinensis*）、春不老（*Ardisia elliptica*）、台灣前胡（*Osmorhiza aristata*）、白花草（*Leucas chinensis*）、大明橘（*Myrsine sequinii*）及南五味子（*Kadsura longipedunculata*）等台灣抗癌植物所得之九種萃提取物作用於肺癌細胞 16 小時後，以 Hematoxylin 染色，並以光學顯微鏡觀察細胞株之細胞型態，可明顯觀察到細胞核及染色質濃染（chromatin condensation）、凋亡小體（apoptotic bodies）的特徵。以 Flow cytometry 分析細胞週期分佈時，在中草藥萃提取物作用 16 小時後 Sub-G1 peak 有增加的現象。且於探討九種萃提取物在肺癌細胞所引起的死亡訊息傳遞之分子機制中，利用 RT-PCR 分析其對肺癌細胞基因表現之調控，結果發現 TNFR-I、Fas、FADD、TRADD、caspase-3 的表現量有明顯被提高的現象，也驗證了於第一階段中 cDNA array 所得到之結果。最後經動物體外試驗後，發現實驗組腫瘤細胞的生長顯著被抑制。期望這一系列的探討，可以為傳統中藥癌症治療上提供更加完善的科學依據。

關鍵詞：台灣草藥資源開發、基因列陣法、療效評估、作用機轉

Number : CCMP91-RD-117

# **Rapid Evaluation of Anticancer Potential of Herbal Resources in Taiwan by the Method of cDNA Array (2-2)**

Ming-Hong Yen

School of Pharmacy, Kaohsiung Medical University

## **ABSTRACT**

This is a two-year project for the evaluation of anticancer potential of the herbal resource in Taiwan. First year, several Taiwanese herbs that had been utilized in the folk and cited in the Dictionary of Chinese Medicine were evaluated. After identification of the herbal origin, the herbs were individually extracted with water and ethanol followed by evaporation and lyophilization. The extracts were then subjected to cytotoxicity analysis. Second year, the extracts of *S. austrotaiwanensis*, *P. formosana*, *H. uncinella*, *W. chinensis*, *A. elliptica*, *O. aristata*, *L. chinensis*, *M. sequinii* and *K. longipedunculata* were treated in lung cancer cells. In order to define the action mechanism of the extracts on lung cancer cells, the morphological changes, DNA content, and gene expression of the cells were analyzed. The appearances of chromatin condensation were observed after treatment with of the extracts for 16 hr, apoptotic bodies in cells were observed, and the cell membrane was broken. The sub-G1 peak of the extracts-treated H661 cells was determined by flow cytometry. The results indicate that the extracts of the herbs induced cell death by apoptosis. Significant up-regulations of TNFR, FADD, TRADD, Fas and caspase-3 gene expression were observed. The results of RT-PCR verified the experiments of cDNA array. After establishing significant cytotoxicity to the extracts of the herbs in vitro, human lung carcinoma xenografts (in vivo) were then treated

with the extracts resulted in significantly greater growth inhibition. This study demonstrates the action mechanism of the extracts of the herbs and may shed light on the investigation of Taiwan herbs as new potential and chemotherapeutic agents for cancer therapy.

**Keywords:** Herbal resource of Taiwan, cDNA array, Functional evaluation, Action mechanism

## 壹、前言

癌症的發生係導因於細胞基因發生改變(1-3)，一般而言，細胞的生長與分化受到體內生長激素的嚴格控制。當細胞受到特定病毒感染或因化學試藥、放射線、染色體變異或其他因素導至基因變異時，則將產生錯誤的訊息傳遞蛋白質，而導致細胞在失去控制下生長而逐漸形成癌細胞(4)。癌症是國人第一大死亡原因，今年肺癌死亡率在台灣已高於其他癌症，與肝癌同是國人之最主要癌症。癌症目前最有效的治療方式除早期發現而可手術切除外，事實上臨床所使用之化療藥物並無顯著改善的效果(5)。因此尋求中草藥治療，幾乎已成為每位癌症患者之另類治療方式。但是有關台灣中草藥之資源與療效尚未被有系統的分析及科學化，不當或錯誤使用或將造成患者的更大傷害與失望。

癌的發生與細胞基因變化有關，而治療藥物是否達到效果亦與藥物能否啟動特定的基因有關，有關細胞計畫性凋亡(Apoptosis)機轉已逐漸明瞭(6,7)，而治療藥物是否達到效果亦與藥物能否啟動特定的基因有關，尤其是與啟動計畫性凋亡相關的基因(8,9)。近年來研究利用細胞計畫性凋亡機轉以達到抗癌的目的已成為重要癌症研究(10-12)，許多的調節因子已被發現與細胞之計畫性死亡有關，例如: Ceramide(13)、Cystein protease(14)、Fas/APO-1(15-17)、p53、myc、Bcl-2、WAF1、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  converting enzyme(ICE)、TNFR(18)及 E2F 轉錄因子等，其中 Bcl-2 與抑制細胞進行 Apoptosis 有關(19,20)，Bcl-2 基因在 Lymphomas 及 Leukemias 細胞中表現時可避免化學藥物對細胞的毒殺作用(21)。分子生物領域中近年來最重要的研究成果係將人類二十三對染色體 DNA 序列分析完成，此「人類基因圖譜」將加速研究對細胞中各種基因調控機轉的瞭解，對疾病的預防與控制將更為有效。因此在後基因時代應用此重要基因圖譜成果於藥物研發上，將加速新藥研發。另外，細胞的癌化過程及癌的生長調控與基因息息相關，因此具抗癌作用之藥物並不一定需具細胞毒性，只要具調控特定基因能力而矯正細胞癌化或改變癌細胞生長環境使提高對藥物之敏感性，在抗癌治療上將扮演非常重要的角色。

細胞凋亡(Apoptosis)是有機體正常調控機制之一，細胞會按照自身設定的程序進行，直到細胞被吞噬，目的在保持有機體或組織的衡定，多數真核細胞在不被機體需要、或受到嚴重損害、或受環境因子刺激時，皆有可能進行細胞凋亡(22, 23)。細胞計畫性死亡在型態學及生化學上有別於細胞壞死(Necrosis)的死亡機轉。其特徵型態有許多變化：(一)細胞會皺縮而無法和相鄰的細胞接觸及喪失細胞表面微絨毛和偽足等結構。(二)細胞核內的染色質

會聚集於核膜下，在光學或電子顯微鏡下可見緻密的團塊狀（Chromatin Condensation）。（三）Wyllie 所發現的 DNA laddering，其具有內核酸酵素（fragmentation nuclease）被活化，將 nucleosome 之間的連接處（internucleosomal linker region）切斷，造成 180-200 bp 的規則片斷。（四）被切斷的 DNA 被細胞膜包附而形成凋亡小體（Apoptotic Body），其很快被吞噬細胞所清除，以確保其內容物不釋出而引起進一步的發炎反應。在 Wyllie 等人發現內核酸酵素於細胞凋亡的 13 年後，另一類在執行細胞凋亡很重要的酵素—蛋白酵素（protease）也漸漸為人所知，且成為研究細胞凋亡重要的一個分支。有不少證據支持其為在細胞凋亡發生中不可或缺，如把一種修補 DNA 的酵素-poly（ADP-ribose）polymerase（PARP）行蛋白質分解則會發生細胞凋亡。

DNA 微陣列（cDNA microarray）目前已是新藥開發研究的主力（24）。因此本計畫擬利用基因列陣法快速開發台灣在抗癌方面之草藥資源（25）。過去研發中草藥物之時程緩慢，每次能進行的種類有限。有鑑於依據傳統藥物研發過程，耗時且效益不高，同時為快速建立資料及提供民眾正確應用草藥資訊及加速開發台灣現有草藥資源，尤其是民間廣泛使用及中藥大辭典已記載且台灣常見之抗癌草藥，例如萬年松、野木藍、繖花龍土珠、台灣粗榧、台灣小蘗、雲南冬清、南台灣黃岑、台灣馬蘭、台灣敗醬及其他等。

本實驗擬以民間使用且中藥大辭典有記載抗腫瘤之台灣草藥萃取物啟動肺癌細胞進程式凋亡並探討其機轉作為指標，利用 cDNA array 及 RT-PCR 探討與癌細胞計畫性凋亡之相關基因，例如 TNFR-I、Fas、TRADD、FADD、Capase 3、 $\beta$ -Actin 所扮演的角色，進而觀察型態學上的變化，並利用細胞流式分析儀（flow cytometry）偵測細胞週期的改變，且經由一系列的體外試驗（in vitro）來評估效果。本計劃僅是利用數十種中草藥進行先期試驗與條件建立，待完成基因列陣之技術條件後，將可大規模分析台灣中草藥資源，以建立台灣中草藥資料庫，並期望這一系列的探討，可以為傳統中草藥之癌症治療研發有所裨益。

## 貳、材料與方法

### 篩選之中草藥

經過篩檢二十種計畫書中所列之台灣中草藥植物（事實上不只二十種，因為部分植物分為根、莖、葉分別進行實驗），其中大部分植物顯示並未具足夠抗癌潛力，因此以其中八種中草藥，包括南台灣黃芩（*Scutellaria austrotaiwanensis*）、台灣敗醬（*Patrinia formosana*）、長葉耳草（*Hedyotis uncinella*）、蟛蜞菊（*Wedelia chinensis*）、春不老（*Ardisia elliptica*）、台灣前胡（*Osmorhiza aristata*）、白花草（*Leucas chinensis*）、大明橘（*Myrsine sequinii*）等台灣抗癌植物，再進一步探討其作用機轉。

### 細胞株（Cell lines）

使用的細胞株為人類肺癌細胞株（Squamous cell carcinoma, H441）。細胞株均培養於 RPMI 1640 含 10% FBS 及 Penicillin/Streptomycin 抗生素中。

### 細胞中 RNA 的萃取

Cellular RNA 的萃取係將細胞收集後，以 TE 或 TBS buffer 洗淨，並以 Lysis 溶液溶解細胞，以 Guanidinium Thiocyanate 方法之 RNA 萃取組萃取。RNA 濃度的計算係以測其 260nm 之吸光度為基準，並計算其 260 nm/280 nm 的比值。

### 細胞毒性試驗

植物萃取物劑量範圍（1~200  $\mu\text{g}$ ）分別加入細胞培養盤中，作用 16 小時後，利用四錯鹽分析法之 metabolically active cells 脫氫酵素（dehydrogenase）將 MTS（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2-H-tetrazolium, inner salt）還原產生強烈鮮紅色螢光的 formazan。此螢光物質 formazan 在吸收波長 490 nm 有最大吸光值，由此藉以測定活細胞數目。

### 探針標幟方法（Probe labeling method）

本實驗採 [ $^{32}\text{P}$ ]-或 [ $^{33}\text{P}$ ]-dCTP 標幟方法，利用反轉錄酵素進行 cDNA 合成以製作探針標幟。

## 基因列陣 (cDNA Microarray)

(1) 利用 PCR 製備特定的基因片段。本實驗室現有 49 種癌相關之基因，將基因片段加熱變性使呈單股，取固定量轉漬於 Nylon membrane 上，經 UV Cross-linked 及真空烘箱乾燥後，置於 4°C 下保存備用。(2) 利用購買之 112 種計畫性凋亡相關基因之晶片。以經及未經藥物處理之放射性標幟之 cDNA 探針進行 Southern hybridization。

## 反轉錄作用 (Reverse transcription) 製備 cDNA

cDNA 的製備是選用 Advantage™ RT-for-PCR Kit (Clontech Laboratories, Inc., USA)。其步驟如下：首先取 2 µg 的 RNA，加入適量 DEPC water 使體積總量達 12.5 µl，加入 1 µl oligo(dT)<sub>18</sub> primer (20 pmole) 後，於 70°C 加熱 denature 2 分鐘，隨後置於冰上。依序加入 4 µl 5 × reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>)、1 µl dNTP mixture (10 mM each)、0.5 µl recombinant RNase inhibitor (1 unit/µl)、1 µl MMLV reverse transcriptase (200U)，使總體積為 20 µl，混合均勻。接下來於 42°C 作用 1 小時後，再於 94°C 加 5 熱分鐘以去除 MMLV-RTase 活性並終止反應。最後加入 80 µl DEPC-H<sub>2</sub>O 使總體積為 100 µl，即完成第一股 cDNA 之製備。保存 cDNA 於 -20 °C。

## 聚合酵素鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

取 10 µl cDNA 至微量離心管中，先後分別加入 5 µl 10 × reaction buffer、2 µl 的 25 mM MgCl<sub>2</sub>、0.8 µl 10 mM dNTP (200 mM each dGTP、dATP、dTTP、dCTP) 及各 1 µl 之 50 µM upstream primer、downstream primer、Taq DNA Polymerase (5 unit/µl)，最後加入去離子水 (ddH<sub>2</sub>O) 使總體積達 50 µl。置於自動溫度循環機 (Techne Progene) 進行 PCR 反應，其反應條件如下：前變性反應 (denaturation) 98°C 3 分鐘一個循環；繼之變性反應 94°C、黏合反應 (annealing) 60°C、合成反應 (extension) 72°C 各 1 分鐘之聚合鏈反應，總反應過程共進行 35 個循環。待反應完畢後，取出適量反應產物進一步以 2% 瓊脂凝膠電泳來分析。而用來校正的 β-actin 其引子 (primer) 序列如下：5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' 及 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'。

## 瓊脂凝膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

估計 DNA 分子量大小，秤量適當克數的瓊膠粉 (agarose, GIBCO)，溶於適量之 1 × TAE 緩衝溶液中，以微波爐加熱使粉末完全溶解。加入 ethidium bromide

(EtBr, 0.5 mg/L, Boehringer Mannheim) 混合均勻後，倒入水平模盤中，插入齒梳 (comb)，使之冷卻凝固。凝固後將齒梳拔除，置入裝有  $1 \times$  TAE 緩衝液的水平電泳槽內，將 DNA 樣品與適量的 loading dye [0.25 % bromophenol, 0.25 % xylene cyanol, 15 % Ficoll (type 400) in  $H_2O$ ] 混合均勻後，放入凝膠上的小孔，另取標示用核酸 (100 bp-ladder DNA marker) 作對照，同時進行 100 伏特電泳。待 DNA 跑至適當距離後，把凝膠移至紫外光照光裝置 (ultraviolet transilluminator) 上觀察，並以拍立得 (Polaroid) 相機照相。

### 細胞週期的分析

PI 染色：將  $1 \times 10^6$  細胞培養於 35 mm culture dish 中 16 小時，加入藥物翠取物作用，反應 16 小時後，以  $1 \times$  Trypsin 將細胞打下 (上清液 medium 須一併收集)，置於 15 ml 離心管中，1000 rpm，離心 5 分鐘後，倒掉上清液。再加入約 300  $\mu$ l  $1 \times$  PBS 混合均勻後，取 300  $\mu$ l 置於 microtube 內，加入 700  $\mu$ l 絕對酒精將細胞固定。放置於  $4^\circ\text{C}$  冰箱 30 分鐘以上， $4^\circ\text{C}$ 、1200 rpm、5 分鐘，離心完後，吸取上清液，並輕混合均勻。加入 445  $\mu$ l  $1 \times$  PBS 使細胞混合均勻；加入 5  $\mu$ l RNase (10 mg/ml) 將 RNA 破壞分解；加入 50  $\mu$ l 10 % Triton-X100 將細胞打洞；置於  $37^\circ\text{C}$  培養箱反應 1 小時後離心，吸取上清液；加入 495  $\mu$ l  $1 \times$  PBS，混合均勻後，再加入 5  $\mu$ l PI (5 mg/ml) 於  $4^\circ\text{C}$  避光反應 15-30 分鐘，再以過濾膜過濾。染色後的細胞，以 Coulter FACScan 100 cells/sec 導入 flow cytometer 中，每次分析 10000 個細胞，細胞首先穿過 75  $\mu$ m 半徑的小孔，產生與體積同比例的電流脈衝訊號，細胞以氫離子的雷射光束 488 nm 激發出螢光。所得資料配合 Winmdi 軟體分析細胞內的 DNA 含量多寡並觀察細胞週期。

### 動物試驗

將  $2\sim 3 \times 10^7$  cells/animal 的肺腺癌細胞 (H441)，於八週大的裸鼠 (20-25g) 背部以皮下注射的方式植入腫瘤細胞。五天後，將形成腫瘤的裸鼠隨機分組 (5-7 mice/group)，並使用 0.8mm 的注射針以 I.P. 的方式開始注射治療藥物，持續約 3 天。每隔二天紀錄裸鼠體重，並以 micrometer 測量其腫瘤大小，於 5-7 天後進行下一個療程，並持續觀察二個月以上。

計算方式：

$$1. \text{Tumor Weight} = \text{Length} \times \text{Width} \times \text{Height}$$

$$2. \text{Tumor Weight } \Delta = \text{Length} \times \text{Width} \times \text{Height}$$



## 參、結果

### 進行基因列陣分析以探討具有抗癌潛力之草藥

本計畫篩選民間使用、中藥大辭典記載及台灣現有之抗癌中草藥進行資源開發，所選用之數十種台灣中草藥，先進行植物基源確認後，分別以水及醇萃取並減壓濃縮及冷凍乾燥後，進行其萃取物之活性與機轉試驗。經過篩檢二十種計畫書中所列之台灣中草藥植物(事實上不只二十種，因為部分植物分為根、莖、葉分別進行實驗)，其中大部分植物顯示並未具足夠抗癌潛力，因此擇其中較具潛力之九種中草藥進一步以基因晶片分析，即南五味子 (*Kadsura longipedunculata*)、南台灣黃芩 (*Scutellaria austrotaiwanensis*)、台灣敗醬 (*Patrinia formosana*)、長葉耳草 (*Hedyotis uncinella*)、蟛蜞菊 (*Wedelia chinensis*)、春不老 (*Ardisia elliptica*)、台灣前胡 (*Osmorhiza aristata*)、白花草 (*Leucas chinensis*)、大明橘 (*Myrsine sequinii*)，萃取其成分以進行基因列陣分析，以基因晶片分析結果(圖一)，除南五味子外，因其基因表現在植物成分作用前後並未有明顯變化(圖二)，因此本計畫乃進行上述九種植物成分之再分離，擬將有效成分再濃縮後，再進行進一步之分析。結果經分離再純化後之植物成分，其對肺癌細胞之作用效果均較原醇萃取之萃取物低(圖三~圖七)，顯示分離過程中可能有效成分少，故無法被有效分離或成分被破壞。

### 探討有效成份對癌細胞之作用機轉，包括型態學變化及基因調控影響

以九種中草藥(南五味子、春不老、長葉耳草、白花草、台灣前胡、台灣敗醬、蟛蜞橘、大明橘、南台灣黃芩)萃取成分作用於肺癌細胞中，並觀察細胞之型態學變化、基因調控和細胞週期之影響。發現將 H441 細胞分別投與中草藥萃取物作用，於 16 小時後萃取總量的 RNA，並在  $A_{260}$  和  $A_{280}$  測定其吸光值，計算出所萃取的細胞 RNA 濃度，之後取約 2 $\mu$ g 之 RNA 將其轉成 cDNA，進行低濃度與高濃度之  $\beta$ -actin 定量。分別用一系列特異性的引子 TNFR-I、TNFR-II、Fas 及 FADD、TRADD、Bcl-XL、TRAILR 等來進行 PCR 反應，產物最末以電泳觀察，結果如圖八所示，以南五味子為例主要以 Fas、TRAILR-2 及 TRAIL-3 增加基因表現最為明顯(圖九及圖十)。其餘所篩選之中草藥亦是以提高 Fas、FADD、TRAILR 等基因最為明顯(圖十一及圖十二)。經由所篩選之中草藥萃取物作用 16 小時後，再以 Hematoxylin 染色，並以光學顯微鏡觀察細胞株之細胞型態，可明顯觀察到細胞核及染色質濃染(chromatin condensation)、凋亡小體(apoptotic bodies)的特徵(圖十三及圖十四)。另外以 Propidium Iodide 染色及 Flow cytometry 去分析細胞的細胞週期分佈時，在中草

藥萃取物作用 16 小時後 Sub-G1 peak 有增加的現象 (圖十五~圖十七)，分析其細胞週期比例可得知，所篩選之九種中草藥均具有引發肺癌細胞凋亡之作用，其 Sub-G1 peak 明顯增加 (表一及表二)。由於南五味子 (*Kadsura longipedunculata*) 在研究過程中均能顯現及明顯之結果，因此本計畫乃繼續進行 DNA laddering 的分析 (圖十八)，同時經南五味子作用後，其 apoptotic effectors 即 Caspase-3 及 -8 活性顯著增加 (圖十九)，顯示南五味子深具抗癌作用潛力。

### 探討有效成份對癌細胞體外試驗作用情形

在經過一系列的動物體外試驗對中草藥之效果評估後，利用中草藥萃取物治療植入肺腺癌細胞之裸鼠 4~5 個 cycles 後，初步成果實驗組腫瘤細胞的生長顯著被抑制 (圖二十)。

綜合本計畫已完成之項目如下：(1) 台灣抗癌中草藥共收集 31 種，遠超出預期之二十種，上述植物已採集乾燥完成；(2) 製備本實驗室約 30 種癌細胞凋亡與正常人類細胞修補相關之 cDNA 基因；(3) 分別以水及醇萃取上述 32 種植物成分並冷凍乾燥儲存；(4) 秤取上述 31 種之冷凍乾燥萃取物分別測試對癌細胞之毒性試驗；(5) 利用所測得萃取物之適當濃度，作用於癌細胞以進行基因調控作用；(6) 研發本實驗室之中草藥 cDNA 基因列陣；(7) 萃取 mRNA 後進行基因放射線標幟；(8) 進行基因列陣分析以探討具有抗癌潛力之中草藥；(9) 進行基因列陣條件最佳化等工作。(10) 於 31 種不同植物萃取物中，已完成細胞毒性試驗，結果南五味子、南台灣黃芩、台灣敗醬、長葉耳草、蟛蜞菊、春不老、台灣前胡、白花草、大明橘等台灣抗癌植物之萃取物具有很強的細胞毒性，在劑量 50  $\mu\text{g}$  / 100  $\mu\text{l}$  即可使 80% 癌細胞死亡，並進一步利用基因晶片分析其細胞基因調控機轉，以確定其抗癌潛力並確定基因列陣所得結果；(11) 探討有效成份對癌細胞之作用情形，包括型態學變化、細胞週期及相關基因調控機轉；(12) 進行動物試驗，以評估其體內抗癌效果；(13) 完成台灣抗癌中草藥資源之研究，並整理結果、申請專利與撰寫報告及論文。本計畫可提供產學合作機會，對開發台灣中草藥使科學化及國際化很有幫助。

## 肆、討論

目前積極開發中草藥抗癌新藥是癌症治療的首要重點。一些抗癌藥物對於殺死癌細胞的作用機轉乃是經由計劃性凋亡，或阻斷細胞的週期。在腫瘤中自然發生計劃性凋亡的速度是與細胞分裂的速度是相類似的，因此計劃性凋亡的程度可能與腫瘤的惡化程度有其相關性，因此計劃性凋亡已成為近年來在抗腫瘤研究上的新方向。

自從基因晶片研發出後，已實質改善新藥研發速度，本計畫亦配合科技研發潮流，應用基因晶片於中草藥新藥開發上去篩選民間最常用且藥典已記載之台灣抗癌草藥，發現南台灣黃芩、台灣敗醬、長葉耳草、蟛蜞菊、春不老、台灣前胡、白花草、大明橘等台灣抗癌植物之萃取物會活化細胞計劃性死亡相關基因，故進一步藉由流式細胞分析儀分析細胞型態上、及生化學上的特徵變化。結果顯示上述抗癌植物之萃取物對肺癌細胞期早期確實是進行程式凋亡。綜合上述結果，上述之台灣中草藥具潛力發展成抗癌藥物，期許藉由這一系列的探討，可以為傳統中草藥之癌症治療研發有所裨益。

## 伍、結論與建議

利用基因晶片篩檢具潛力之中草藥以進一步開發，事實上並未如想像中容易，且因為市面上基因晶片之 cDNA 品質參差不齊、價格昂貴，而以水醇所萃取枝中草藥其萃取物成分不足，所以除非是特別有效之植物成分，否則使用基因列陣分析之再現性及正確度效果並不佳，使其在開發上困難度增加，是中草藥開發上值得注意及加強解決的問題。

## 誌謝

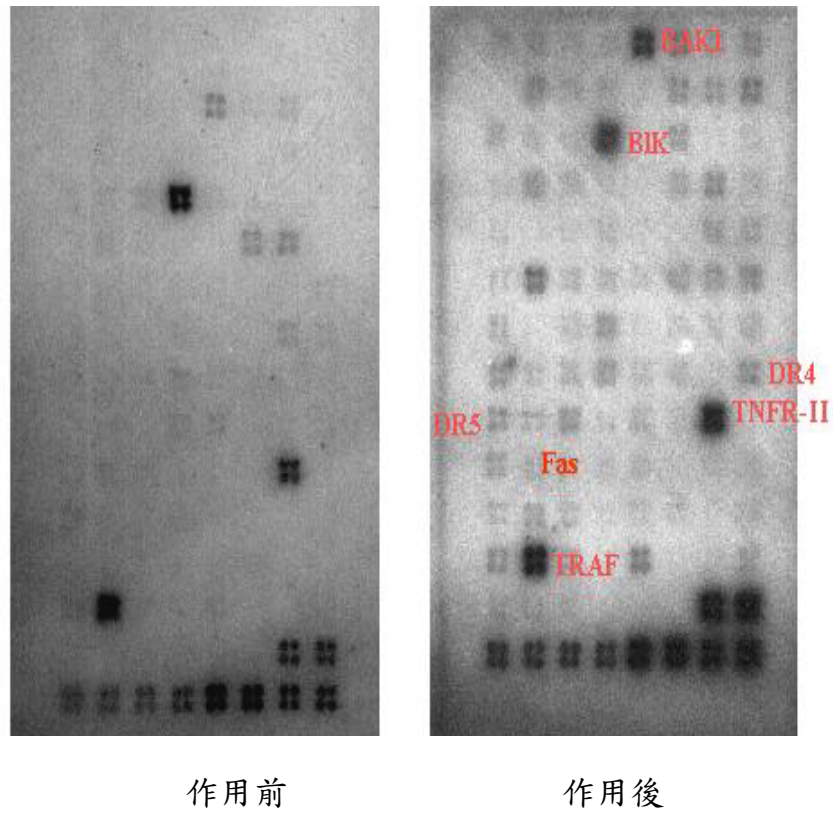
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP91-RD-117 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

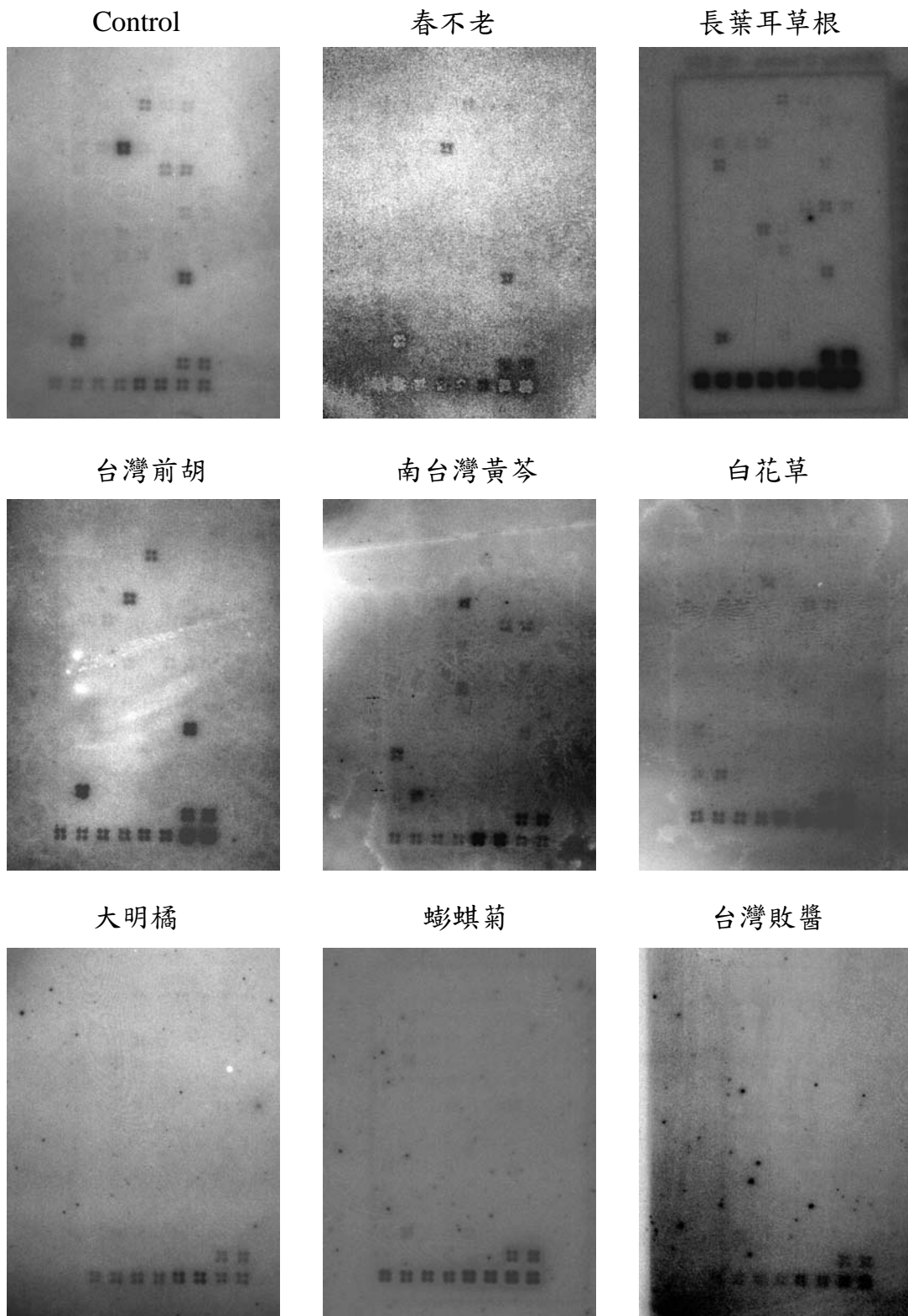
1. Chen, P.L., Chen, Y., Bookstein, R. and Lee, W.H. (1990) *Science* 250, 1576-1580.
2. Finlay, C.A., Hinds, P.W. and Levine, A.J. (1989) *Cell* 57, 1083-1093.
3. Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon E.R., Willson, J.K.V. and Vogelstein, B. (1990) *Science* 249, 912-915.
4. Hinds, P., Finlay, C. and Levine, A.J. (1989) *J. Virol.* 63, 739-746.
5. Nishio, K., Nakamura, T., Koh, Y., Suzuki, T., Fukumoto, H. and Saijo, N. (1999) *Curr. Opin. Oncol.* 11, 109-115.
6. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980) *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.
7. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1985) *Anticancer Res.* 5, 131-136.
8. Steller, H. (1995) *Science.* 267, 1445-1449.
9. Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L. and Mignotte, B. (1995) *FASEB J.* 9, 1277-1287.
10. Alnemri, E.S., Fernandes-Alnemri, T. and Litwack, G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 4312-4317.
11. Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.I. and Guild, B.C. (1995) *Nature* 374, 733-736.
12. Boldin, M.P., Goncharvo, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1996) *Cell* 85, 803-815.
13. Kolesnick, R. and Golde, D.W. (1994) *Cell* 77, 325-328.
14. Lazebnik, Y., Takahashi, A., Moir, R., Goldman, R., Poirier, G., Kaufmann, S. and Earnshaw, W.C. (1994) *Nature* 371, 346-347.
15. Cascino, I., Papoff, G., De Maria, R., Testi, R. and Ruberti, G. (1996) *J. Immuno.* 156, 13-17.
16. Arase, H., Arase, N. and Saito, T. (1995) *J. Exp. Med.* 181, 1235-1238.
17. Friesen, C., Fulda, S. and Debatin, K. M. (1997) *Leukemia* 11, 1833-1841.
18. Brockhaus, M., Schoenfeld, H. J., Schlaeger, E. J., Hunziker, W., Lesslauer, W.

- and Loetscher, H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3127-3131.
19. McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. and Korsmeyer, S.J. (1989) *Cell* 57, 79-88.
20. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. and Korsmeyer, S. (1990) *Nature* 348, 334-336.
21. Mentz, F., (1994) *Blood* 84, 657-665.
22. Earnshaw, W. C. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 337-343.
23. Martin, S. J. and Green, D. R. (1995) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 18, 137-153.
24. Aitman, T. J. (2001) *BMJ* 323, 611-615.
25. Johnson, D. H. (1995) *Lung Cancer.* 13, 71-75.

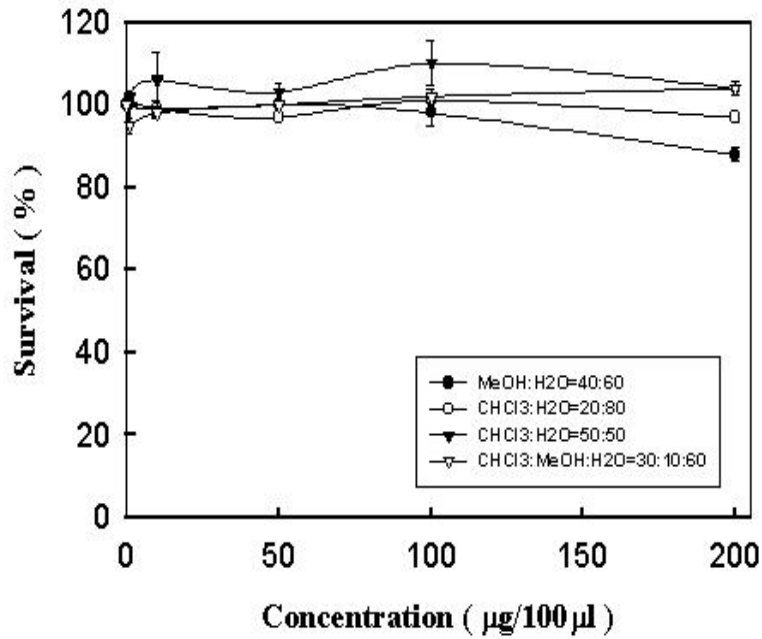
## 柒、圖、表



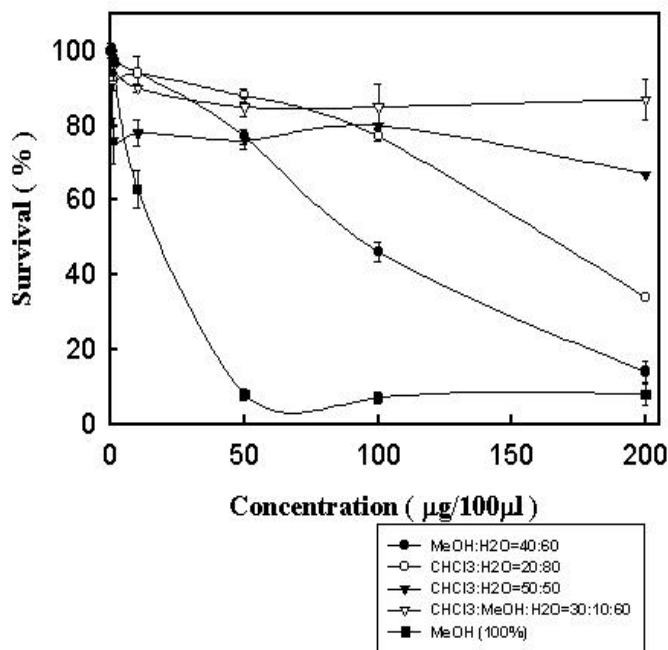
圖一、南五味子對肺癌細胞作用 16 小時後影響細胞基因表現之基因列陣圖。萃取細胞 RNA 後，轉換並標誌其 cDNA，以利基因列陣分析雜交使用。利用放射線顯影分析其結果。



圖二、春不老，長葉耳草根，台灣前胡，南台灣黃芩，白花草，大明橘，台灣敗醬，蟛蜞菊的基因列陣圖。與 Control 的基因列陣圖比較，基因變化並不明顯。

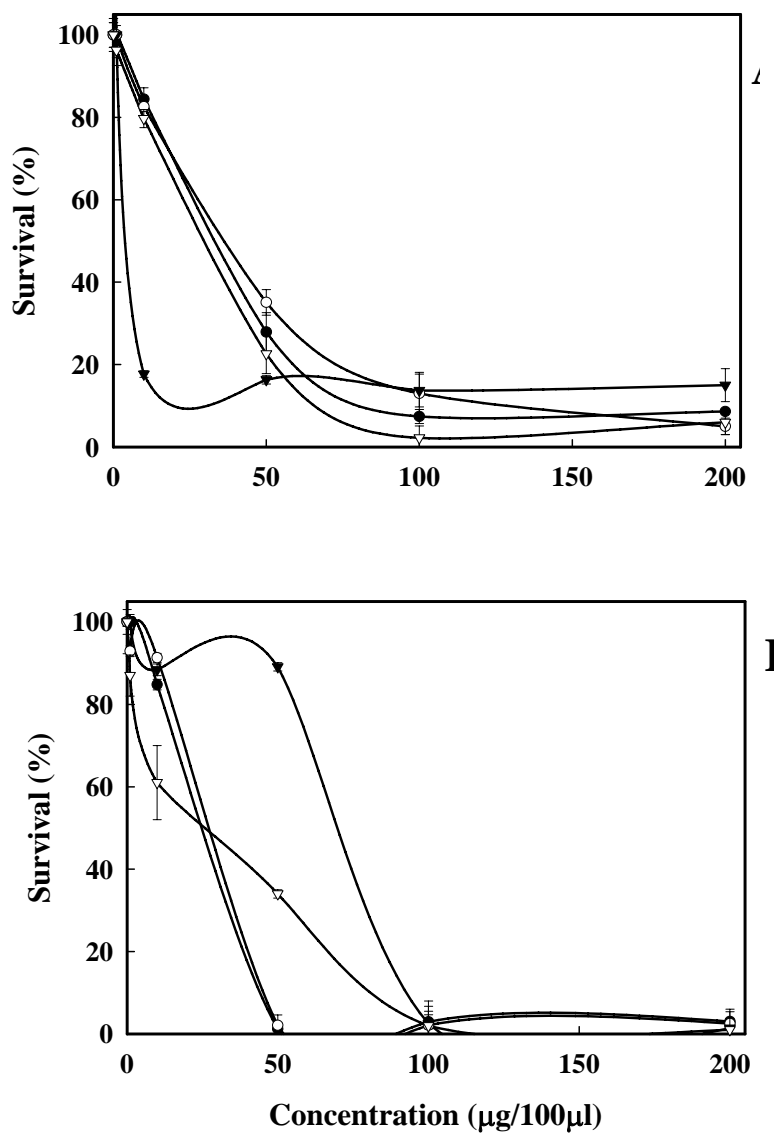


圖三、南五味子水萃取物對肺癌細胞之毒性影響。細胞毒性係利用 MTS 分析。經由南五味子水萃取物處理及未處理之存活百分率以平均值±標準差表示，每個數據均由三重複取得。

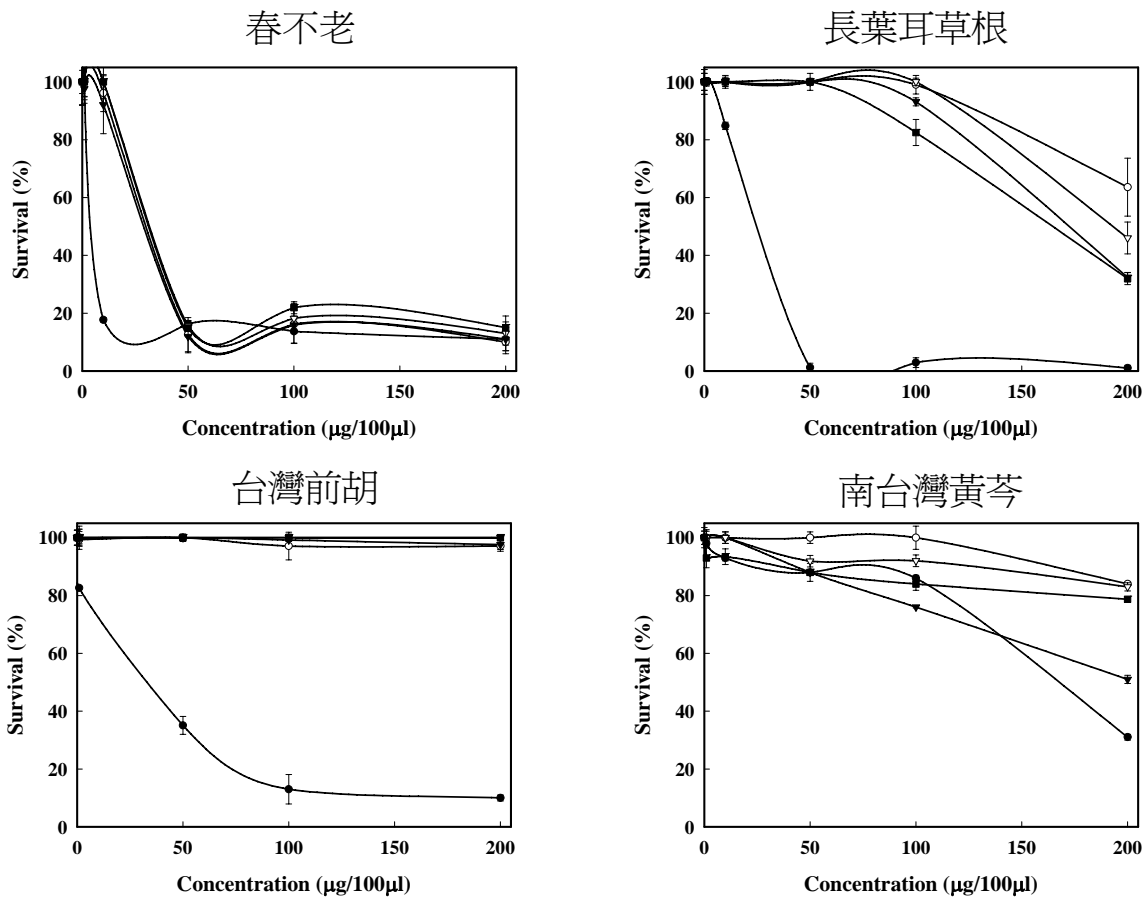


圖四、南五味子醇萃取物對肺癌細胞之毒性影響。

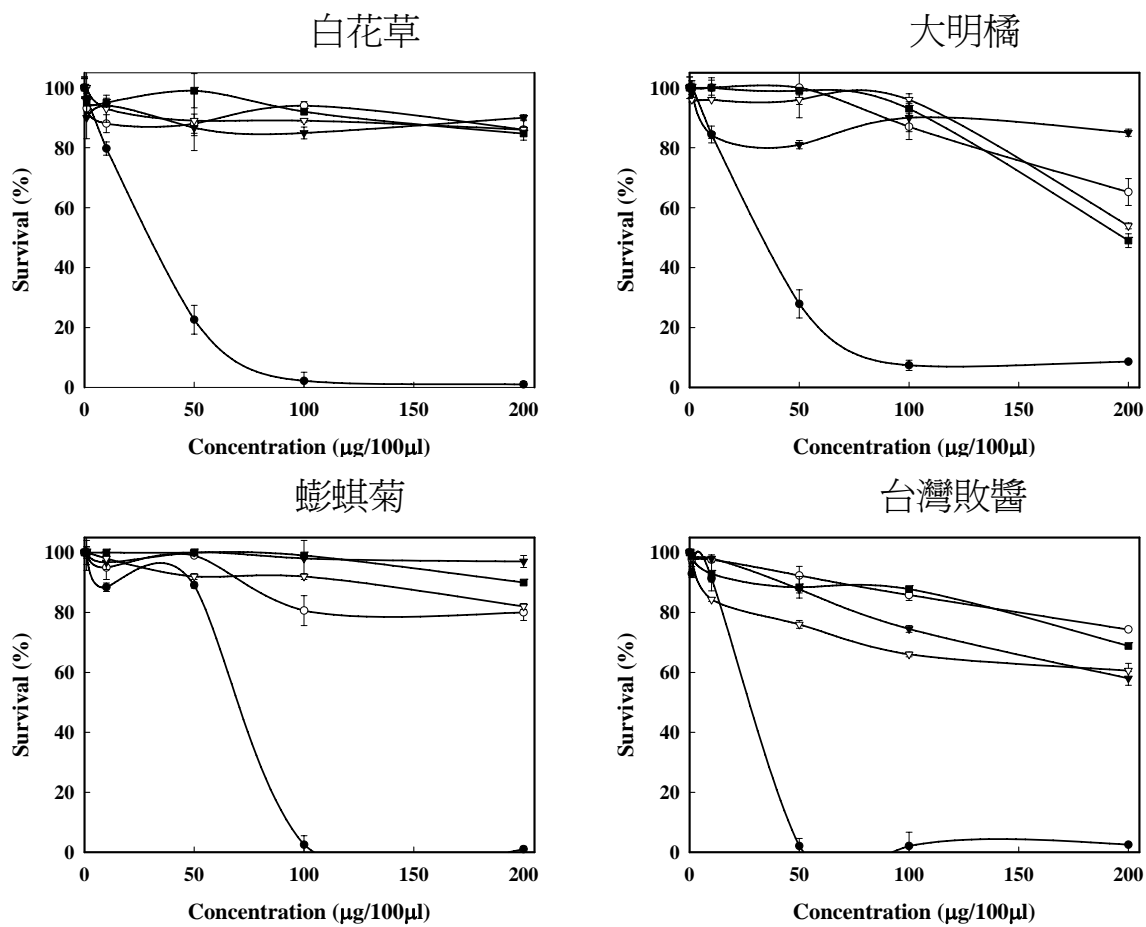




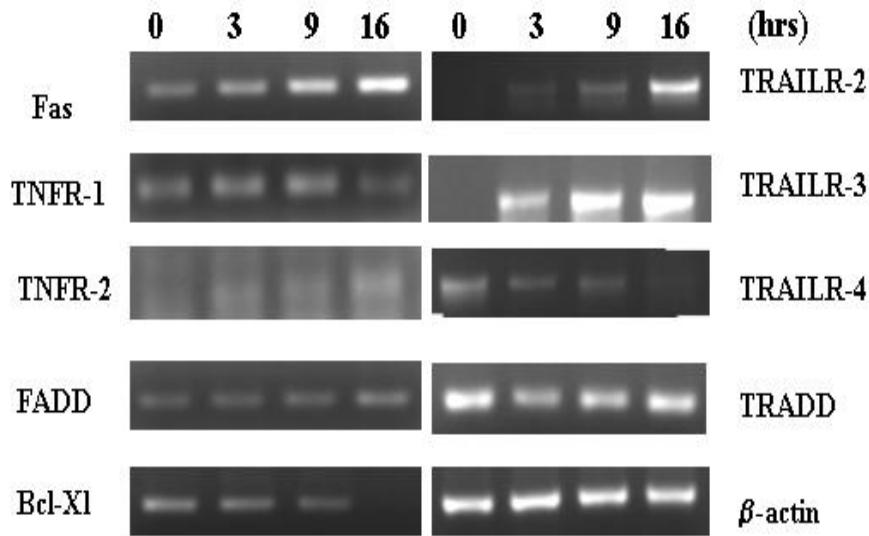
圖五、由醇類萃取之藥物對肺癌細胞毒性結果。圖 A：大明橘，台灣前胡，春不老，白花草；圖 B：長葉耳草根，台灣敗醬，蟛蜞菊，南台灣黃芩。在 50µg/100ml 的劑量下細胞有 80%之死亡率。



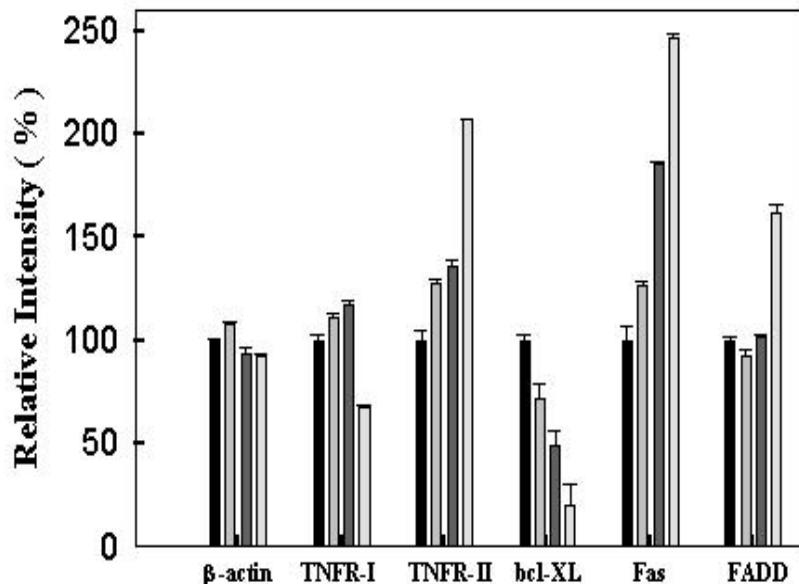
圖六、由醇類萃取之中草藥物利用進行再初步分離。細胞毒性顯示以完全未分離之 100% 甲醇回溶之藥物效果最強。



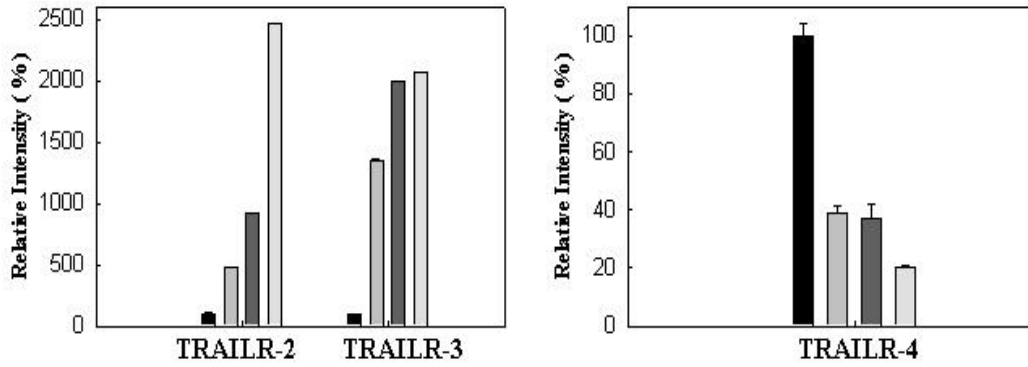
圖七、由醇類萃取之中草藥物利用進行再初步分離。細胞毒性顯示以完全未分離之 100% 甲醇回溶之藥物效果最強。



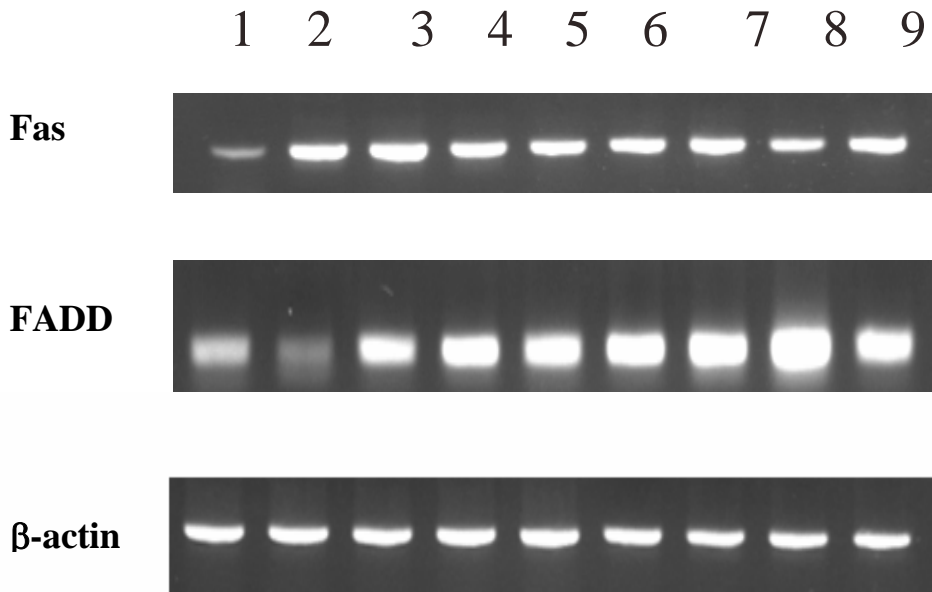
圖八、南五味子萃取物對肺癌細胞基因表現的影響。藉由各基因高特異性引子進行β-actin 以偵測 Fas、TNFR-I、TNFR-II、FADD、Bcl-XI、TRAILR-2、TRAIL-3、TRAIL-4、TRADD、β-actin 之基因表現。利用β-actin 控制各個進行 RT-PCR 的反應為等量的 cDNA。



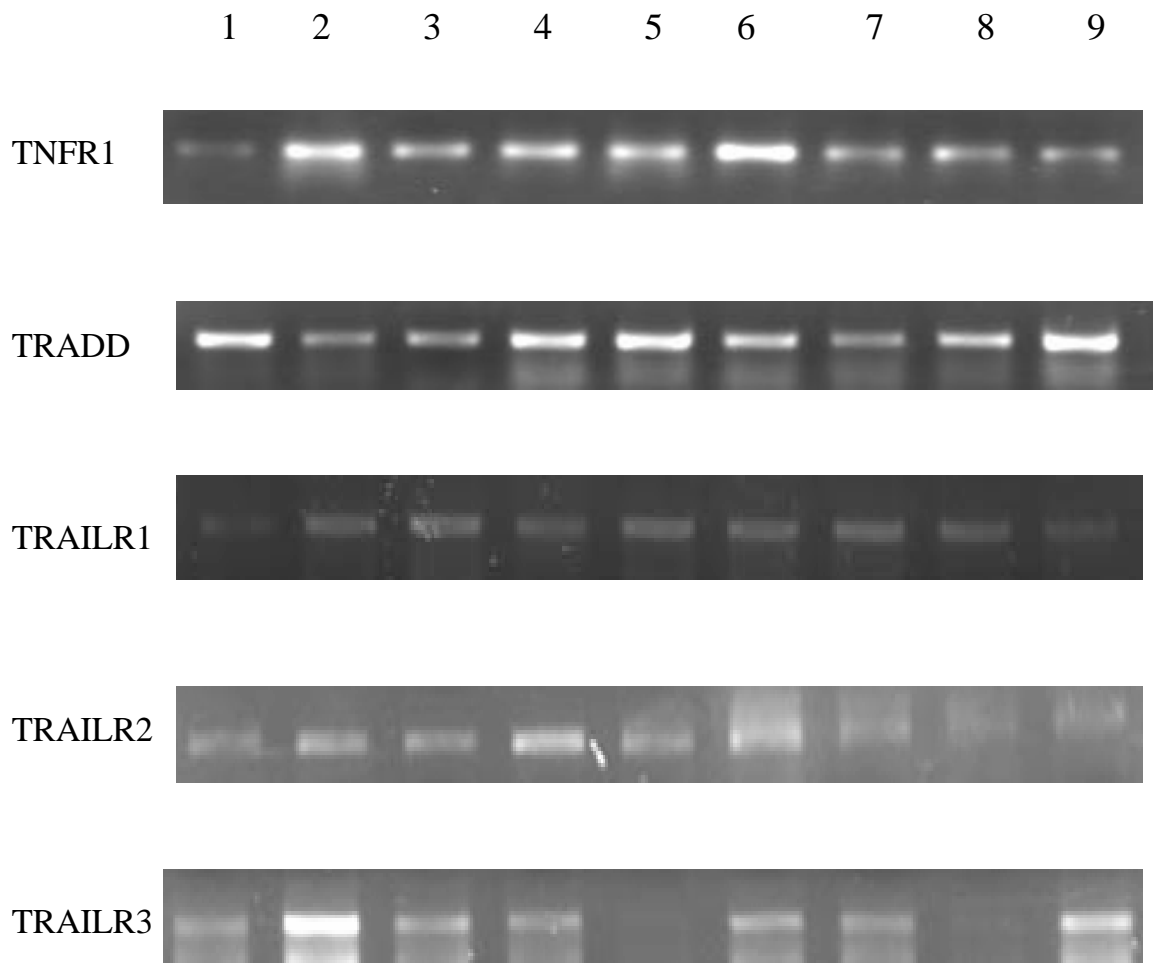
圖九、南五味子萃取物對肺癌細胞基因表現的定量分析。RT-PCR 分析 mRNA 表現後，利用濃度密度分析儀分析各基因表現之相對量。



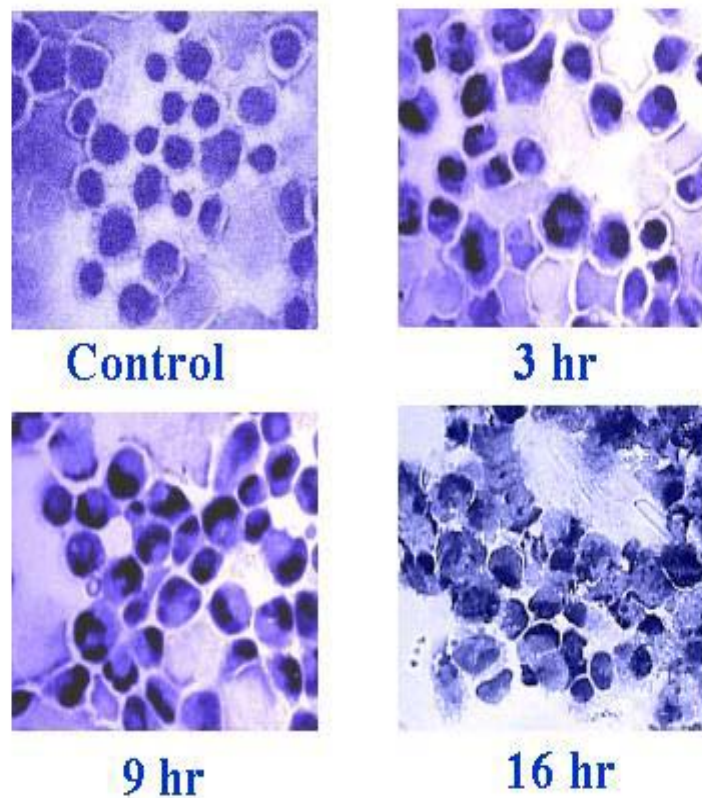
圖十、南五味子萃取物對肺癌細胞基因表現的定量分析。RT-PCR 分析 TRAILR-2、TRAILR-3、TRAILR-4 之表現後，利用濃度密度分析儀分析各基因表現之相對量。



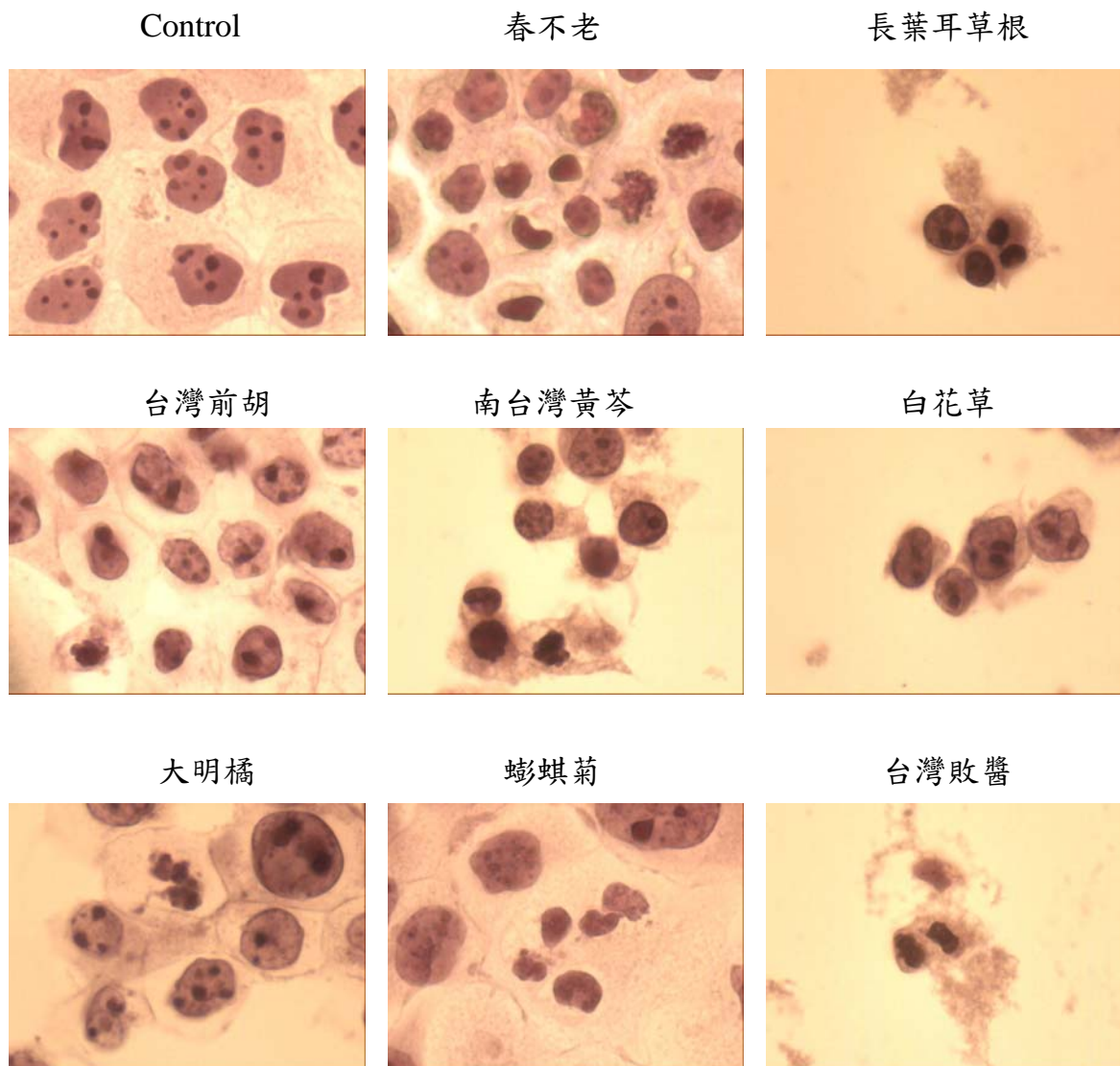
圖十一、利用 RT-PCR 偵測八種藥物對肺癌細胞基因表現的影響。數字依序代表 Control，春不老，長葉耳草根，台灣前胡，南台灣黃芩，白花草，大明橘，台灣敗醬，蟛蜞菊。



圖十二、利用 RT-PCR 偵測 8 種藥物對肺癌細胞基因表現的影響。數字依序代表 control，春不老，長葉耳草根，台灣前胡，南台灣黃芩，白花草，大明橘，台灣敗醬，蟛蜞菊。

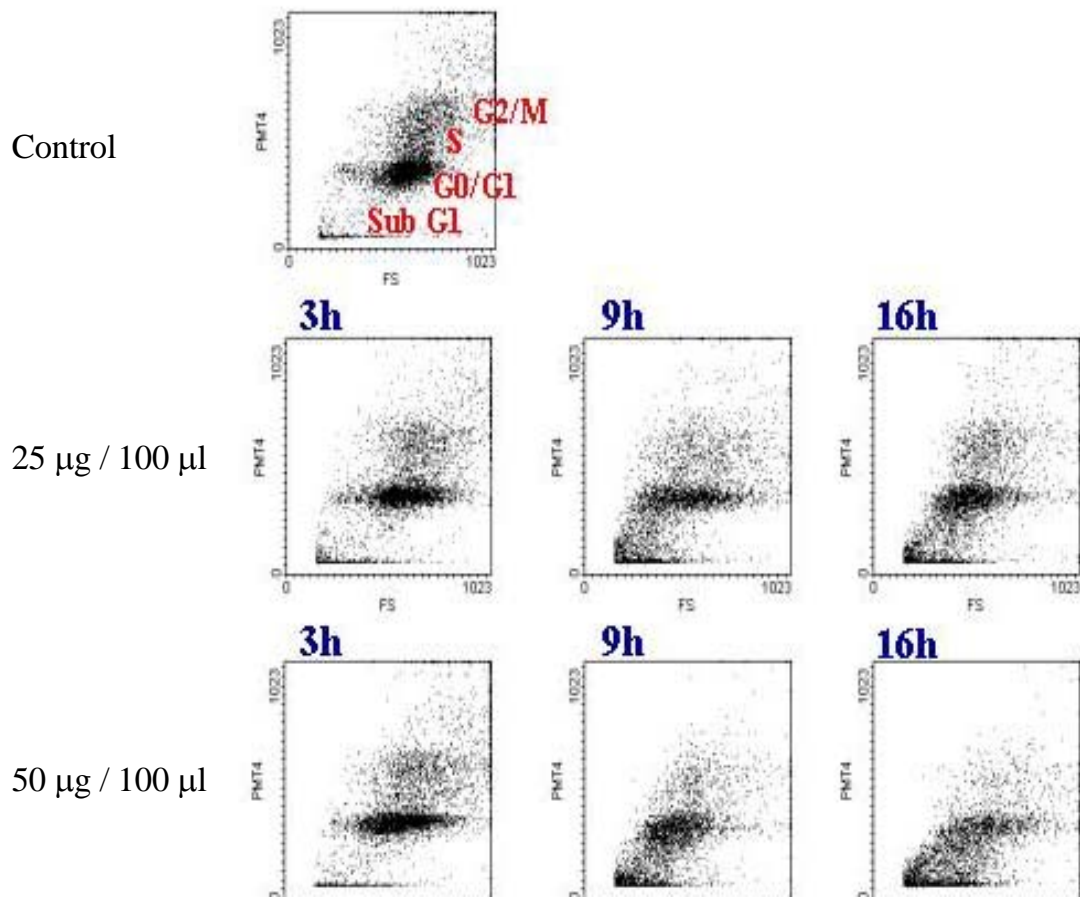


圖十三、南五味子萃取物對肺癌細胞染色體型態變化影響之分析。肺癌細胞經南五味子投藥 0、3、9、16 小時後，利用 hematoxylin 染色並藉由光學顯微鏡觀察細胞型態 (x400)。

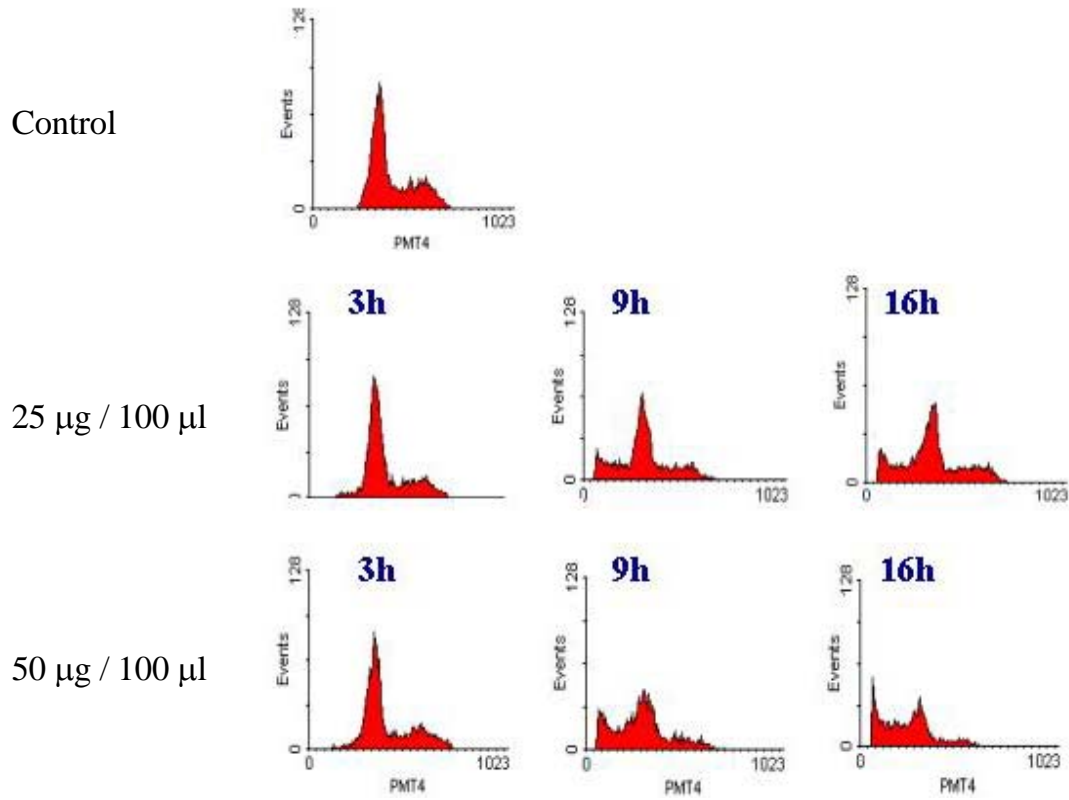


圖十四、利用光學顯微鏡觀察春不老，長葉耳草根，台灣前胡，南台灣黃芩，白花草，大明橘，台灣敗醬，蟛蜞菊對肺癌細胞投藥 24 小時後細胞外形的改變。細胞明顯皺縮，細胞核有濃染現象。

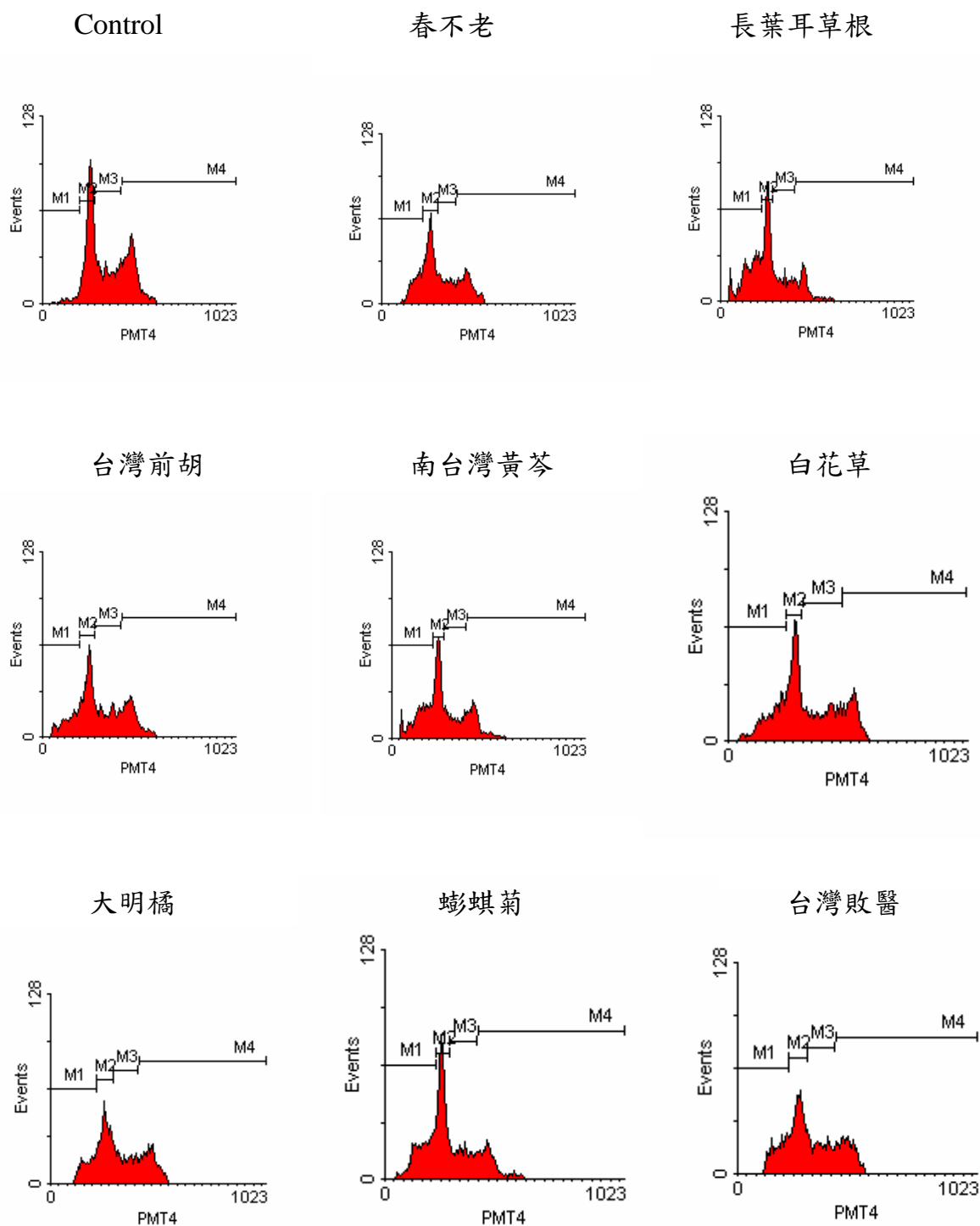




圖十五、利用流式細胞儀分析南五味子對肺癌細胞之計畫性凋亡。南五味子對肺癌細胞投藥 0、3、9、16 小時後，利用 PI 染色來分析。



圖十六、利用流式細胞儀分析南五味子對肺癌細胞之細胞週期影響。南五味子對肺癌細胞投藥 0、3、9、16 小時後，細胞經由固定、RNase 作用及 PI 染色後以藍光激發來分析。



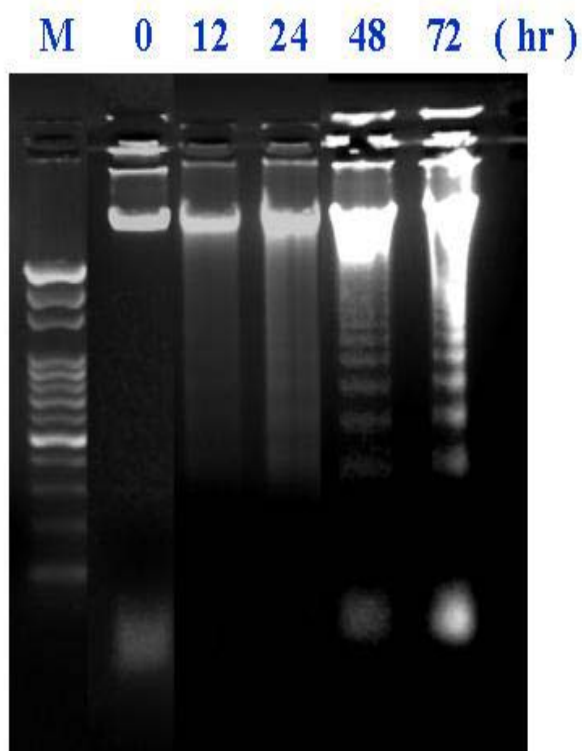
圖十七、利用流式細胞儀分析春不老，長葉耳草根，台灣前胡，南台灣黃芩，白花草，大明橘，台灣敗醬，蟛蜞菊對肺癌細胞投藥 24 小時後細胞週期的改變。細胞經由固定、RNase 作用及 PI 染色後以藍光激發來分析。

表一、南五味子對肺癌細胞投藥 0、3、9、16 小時後細胞週期的影響

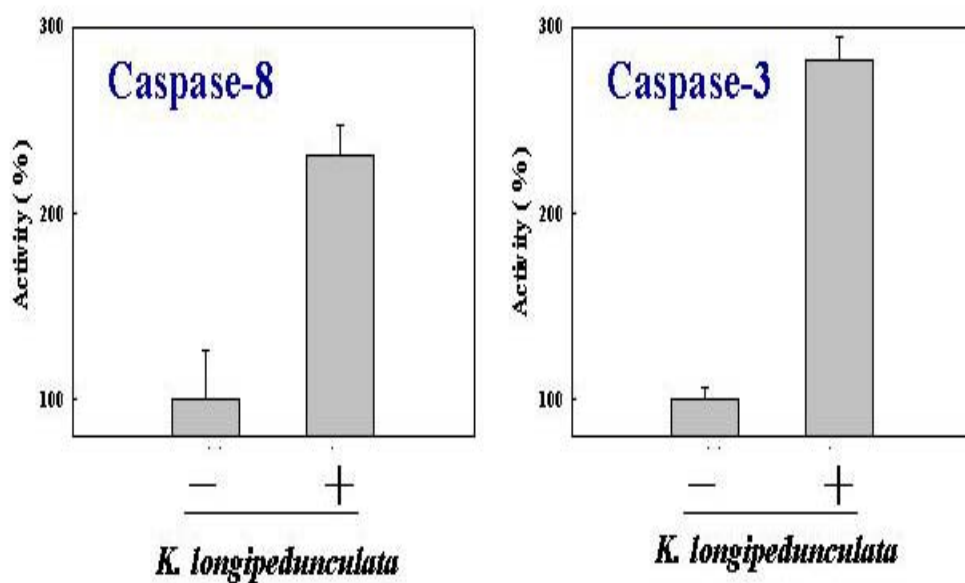
Time for treatment (hr)	Cell Population (%)							
	Sub-G <sub>1</sub> Phase		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> Phase		S phase		G <sub>2</sub> /M Phase	
	Mean	%	Mean	%	Mean	%	Mean	%
(250µg/ml)								
0	3.9	100	63.9	100	14.1	100	18.7	100
3	5.5	142	65.8	103	13.1	93	17.7	95
9	22.6	586	55.6	87	8.7	62	13.0	69
16	34.4	893	40.8	64	10.7	76	13.9	74
(500µg/ml)								
0	3.9	100	63.9	100	13.5	100	18.7	100
3	10.4	271	59.6	93	14.9	111	16.2	87
9	29.0	753	47.8	75	12.8	95	10.2	54
16	42.77	1109	42.0	66	10.8	80	5.5	29

表二、春不老，長葉耳草根，台灣前胡，南台灣黃芩，白花草，大明橘，台灣敗醬，蟛蜞菊對肺癌細胞投藥 24 小時後細胞週期的影響

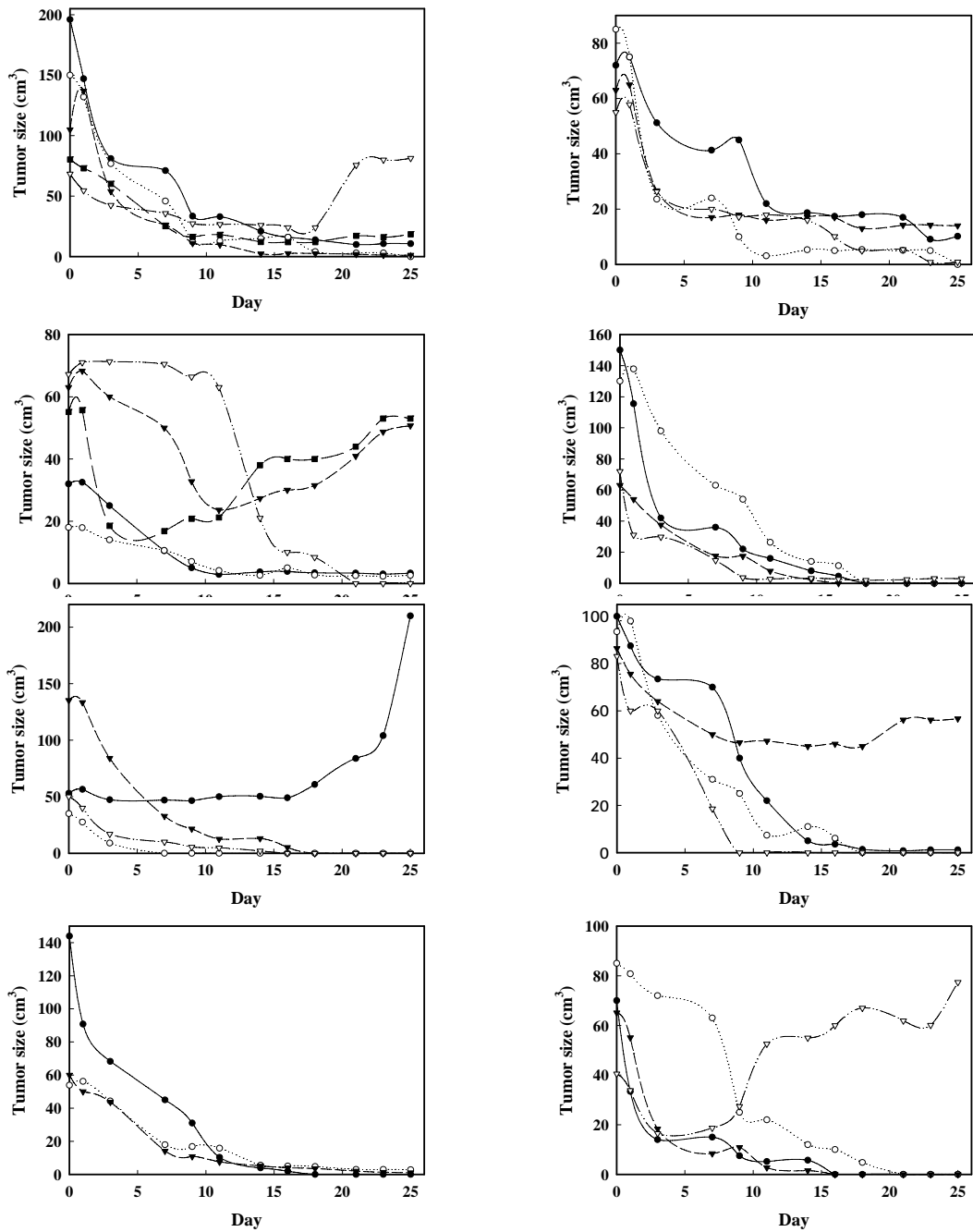
Drug treatment	Cell Population (%)							
	Sub-G <sub>1</sub> Phase		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> Phase		S Phase		G <sub>2</sub> /M Phase	
	Mean	%	Mean	%	Mean	%	Mean	%
control	2.4	100	38.42	100	28.63	100	1831.23.7	100
春不老	18.42	767	39.8	103	19.78	69	22.91	73
長葉耳草根	34.3	1429	34.53	89	18.39	64	13.39	43
南台灣黃芩	18.16	750	33.87	88	25.25	88	23.26	74
白花草	29.72	1238	32.7	85	21.45	75	17.05	55
台灣前胡	23.33	972	31.18	81	27.95	97	18.08	58
大明橘	17.41	725	34.78	91	23.99	84	24.5	78
蟛蜞菊	26.95	1123	26.8	70	20.52	72	16.42	52
台灣敗醬	18.98	791	34.65	90	24.62	86	22.38	72



圖十八、肺癌細胞經南五味子作用後其 DNA 的斷片。以南五味子作用於肺癌細胞 0、12、24、48、72 小時後，萃取 DNA 並以 2% 瓊脂洋菜膠進行電泳分析。



圖十九、南五味子萃取物作用於肺癌細胞後之 caspase-3 及 caspase-8 的表現



圖二十、實驗動物經八種萃取物治療後其肺癌腫瘤之大小變化情形。a, 春不老；b, 長葉耳草根；c, 台灣前胡；d, 南台灣黃芩；e, 白花草；f, 大明橘；g, 台灣敗醬；h, 蟛蜞菊。