

編號：CCMP97-RD-041

在動物體內研究丹參酮ⅡA 與 5-FU 對大腸癌的協同作用與分子機制

蘇進成

花蓮佛教慈濟綜合醫院

摘 要

惡性腫瘤是台灣十大死亡原因的首位。結腸直腸癌居惡性腫瘤死亡原因的第三位。丹參酮ⅡA 是丹參(danshen)的提取物，我們先前研究證實，在體外，丹參酮ⅡA 有抑制人類大腸癌細胞 colo 205 的增殖和引起凋亡的功效，也可以減少 colo 205 細胞侵襲和轉移能力。但在動物體內，單獨使用丹參酮ⅡA 對 colo 205 細胞異種皮移殖腫瘤卻沒有抑制的功效。所以本研究將研究丹參酮ⅡA 和西藥的交互作用，利用動物實驗探討丹參酮ⅡA 合併抗大腸癌的化療藥物 5-FU 的作用。將免疫不全小鼠(NOD.CB17-Prkdc-scid/JTcu mice)皮下接種人類大腸癌細胞 colo 205 2×10^6 /0.2 ml，等到大腸癌細胞移植成功後，才開始分別以腹腔注射給予 5-Fu (I.P)、灌胃口服給予丹參酮ⅡA (P.O)或丹參酮ⅡA 合併 5-FU (20 mg/ 每公斤體重 /0.2 ml/ 每劑) 進行治療，之後觀察及測量每組免疫不全小鼠體重及腫瘤生長情形，治療 30 日後犧牲，犧牲前秤體重，犧牲後取瘤秤重，檢測丹參酮ⅡA 合併 5-FU 對 colo 205 細胞異種皮移殖腫瘤的治療效應。並分別利用西方墨點法和蛋白質體學的方法評估單用丹參酮ⅡA，西藥 5-FU 與中西合併用藥對於組織蛋白質的差異，探討可能的分子機轉，對日後臨床價值，可提供有效的參考資料。

關鍵字：丹參酮ⅡA、5-FU、大腸癌、協同作用、動物體內

Number: CCMP97-RD-041

The Synergistic effects and Molecular Mechanisms for Colon Cancer were Treated with Tanshinone IIA and 5-FU in Vivo

Chin-Cheng Su

Buddhist Tzu Chi General Hospital

ABSTRACT

Malignant tumor is in the first leading causes of death in Taiwan. Colon cancer is the third leading cause of cancer-related death in Taiwan.. Tanshinone II is one of the compositions of danshen (*Salvia miltiorrhiza*, Bunge). Our previous studies showed that Tan-IIA could inhibit the proliferation and induce apoptosis, Tan-IIA also could inhibit invasion and metastasis in human colon cancer colo 205 cells in vitro. But the efficacy for colo 205 cells xenograft tumors in SCID mice were treated with Tan-IIA was not significant in vivo. In the present study we investigated the antitumor activity of Tanshinone II A with 5-FU in human colon cancer xenograft model. For in vivo studies, male SCID mice (3 weeks old, number=24) were xenografted with colo 205 cells tumors (3×10^6 /0.2 ml) and on day 10 onwards 5-FU (20 mg/kg ,I.P, Q.W1) +corn oil (0.2ml ,P.O,Q.W3.5); 5-FU (20 mg/kg ,I.P, Q.W1) +Tan IIA (20 mg/kg ,P.O,Q.W3.5); were administered for 30 days. As a control, xenografted tumors were separately treated with normal saline (0.2ml ,I.P, Q.W1) +corn oil (0.2ml ,P.O,Q.W3.5);. The xenografted tumor volumes and animal body weight were measured every three days. The molecular mechanisms and proteins expression of xenografted tumors were measured by Western Blotting and Proteomics 2D LC/MS Analysis. These results may be helpful for clinical use in the future.

keywords: Tanshinone IIA, 5-FU, colon cancer, synergistic efficacy, in vivo

壹、前言

依據行政院衛生署 98 年公務統計年報指出，台灣 97 年惡性腫瘤死亡人數為 38,913 人，標準化死亡率為每十萬人口 133.7 人，是台灣十大死亡原因的首位。結腸直腸癌死亡人數為 4,266 人，標準化死亡率為每十萬人口 14.4 人(<http://www.doh.gov.tw>)，結腸直腸癌居惡性腫瘤死亡原因的第三位¹。在西方國家，結腸直腸癌居死亡率的第二位，全球每年約有 940,000 新病例²，大腸癌的發病率，世界各地差異很大，在 2000 年全球大腸癌發病資料統計結果顯示，澳洲和紐西蘭每 10 萬人口死亡率為 45.80；北美地區每 10 萬人口死亡率為 44.33；日本每 10 萬人口死亡率為 39.54；北歐每 10 萬人口死亡率為 34.35；中美洲每 10 萬人口死亡率為 27.24；東歐每 10 萬人口死亡率為 25.29；東亞地區每 10 萬人口死亡率為 21.31；中國每 10 萬人口死亡率為 13.29；東南亞每 10 萬人口死亡率為 11.39；東非每 10 萬人口死亡率為 8.11³。這種不同地區大腸癌發病率的不同，顯示大腸癌是由環境、生活習慣、遺傳因素、飲食和藥物等共同作用的結果。據文獻統計報導，在 2004 年美國約有 106,000 人被診斷出來得到大腸癌^{4,5}，但超過 1/3 已經有淋巴轉移，臨床診斷已屬 III 期，單純手術已無法根治，即使實施根治手術治療者也約有 50%~60% 在 5 年之內會出現轉移或復發⁶，因此尋找有效的輔助治療已經成為大腸癌治療上的當務之急，目前學者積極研究的首要目標之一。

在 1980 年代有隨機臨床試驗，發現做根治手術切除加上 5-Fluorouracil (5-Fu) 治療，可以相對減少 30% 的死亡率，提升 10% 的五年存活率⁷。於是美國 National Institutes of Health (NIH) 正式通過第三期大腸直腸癌手術後一定要配合以 5-Fu 為基礎的輔助化學治療來治療⁸。目前用來治療大腸直腸癌的方式有三種：手術切除、放射線及化學藥物治療。依據診斷出的期別，治療方式有不同，兩種或三種方式可能同時進行或者分開使用。手術是根治大腸癌的主要治療方法，手術加上輔助性的化學治療和放射治療就成為治療晚期大腸癌患者的標準治療方法。但中晚期大腸癌預後還是不好，美國癌症聯合會(American Joint Committee on Cancer, AJCC)根據第 5 版結腸癌分期標準，報告在 119,363 例大腸癌患者中，5 年生存率在 I、II、III、IV 期，分別為 93.2%、82.5%、59.5% 和 8.1%⁹。所以對大腸癌的防治，除了早期診斷，早期治療外，針對大腸癌致病的因素做防治和尋找有效的輔助療法，成為研究的重點。

結腸直腸癌的發生是許多因素共同作用的結果，到現在引發大腸癌真正的原因還是沒有十分明白。由於流行病學與分子生物學的進步，和對致癌基因或腫瘤抑制基因的知識增加，使我們知道發生結腸直腸癌的危險因

素。一般認為結腸癌源自於既有的腺瘤，也就是黏膜表皮細胞產生不正常的增值，慢慢長大變成息肉、腺瘤，然後腺瘤變大，腺瘤上的細胞有的再漸漸發生癌變，再慢慢長大增殖，侵犯蔓延。另一種學說，認為從一個正常的表皮細胞，因基因發生了變化，失去正常的功能，而直接演化生成癌細胞，無限制增殖長大，產生癌症。有文獻報導，高脂飲食者大腸癌發生率比低脂飲食者高 2 倍，每天平均的糞重與患大腸癌的危險性呈負相關，與飲食纖維的攝入量呈正相關，排糞量隨飲食纖維的增加而增加¹⁰。有學者認為發生大腸癌的因素中，百分之七十是環境因素，特別是飲食習慣所決定。限制脂肪的攝取量，增加纖維的攝取量，盡可能每天攝取五份以上的蔬菜和水果，應該可以預防發生大腸癌¹¹。

目前大腸癌手術切除後，最常用的且療效相對較高的藥物為 5-Fu，5-Fu 是一種抗代謝作用的抗癌藥物，主要通過抑制細胞內胸腺嘧啶核苷酸合成酶的活性，阻斷尿嘧啶去氧核苷向胸腺嘧啶去氧核苷的轉變，影響細胞內的 DNA 與 RNA 的合成，從而抑制腫瘤生長的作用，使細胞停在 S-phase^{12,13}。5-Fu 的半衰期很短(約 10~20 分鐘)，單獨使用 5-Fu 治療晚期大腸癌的有效率為 20%左右¹⁴。為了提高 5-Fu 的療效，1984 年法國 de Gramont 教授，建立了 Leucovorin calcium (LV)加 5-Fu 持續滴注 48 小時療法。LV 其作用是透過穩定 5-Fu 活化的代謝物(5-FdUMP)和胸腺嘧啶核苷酸合成酶(Thymidylate synthetase)的鍵結，提高 5-Fu 的療效¹⁵⁻¹⁷。目前，LV 加 5-Fu 持續滴注 48 小時療法已經成為晚期大腸癌治療的標準方案之一且被廣泛接受¹⁸。草酸鉑(Oxaliplatin, L-OHP)屬於第三代鉑類抗癌藥，由於側鏈被二氫環己烷(diaminocyclohexane, DACH)基團取代，主要作用機制為通過與 DNA 鏈形成交聯，阻斷其複製和轉錄而抑制細胞增殖^{19,20}，對結腸癌有較好的療效，Oxaliplatin 單獨使用對大腸癌的療效可達 22%，與 5-Fu 有著顯著的協同作用²¹。Ⅲ期臨床試驗中，治療組 L-OHP 85 mg/m² 2 小時滴注後加 LV/5-Fu 方案優於 LV/5-Fu 方案，並具有統計學意義，緩解率為 50.7%，支持 L-OHP 與 5-Fu 聯合作為大腸癌的一線治療方案^{22,23}。最近有文獻報導，用血管生成素的抑制劑 Bevacizumab (Avastin)，配合 5-Fu 治療大腸癌轉移的病人，取得較好的療效²⁴。但是這些新開發的藥物，費用卻是相當昂貴，並非人人負擔得起。目前輔助性的化學治療是治療中晚期大腸癌的有效方法，而化學治療常伴隨不同程度的副作用。如何提高化學治療的療效，減輕化學治療的不良反應，提高患者的生存品質，尋找有效且價格低廉的替代藥物，是目前很多研究者的目標。

中國傳統醫學是先人經過長期臨床觀察和實際醫療行為累積的智慧結晶，也是新藥開發的寶庫。許多研究結果也證明中藥具有抗腫瘤的作用，因此傳統中醫藥對大腸癌患者的輔助治療，在提高大腸癌的治療效果、延

長大腸癌患者的生存期、提高生活品質方面等，具有相當重要意義，已引起越來越多的重視，成為眾人研究的焦點。以中醫藥治療大腸癌的臨床研究與實驗研究報導很多，如有文獻報導，用中藥複方三根湯加減，治療中、晚期大腸癌患者，其 1 年、5 年生存率優於化療組²⁵。臨床觀察服用中藥複方腸必安(炙黃芪、龜板、白朮、鱉甲、川芎、益母草、山楂為主藥)治療的 50 位大腸癌患者術後，與單純手術對照 50 位比較，結果服用腸必安 3 年生存率明顯高於單純手術的大腸癌患者²⁶。中晚期大腸癌患者多以脾、腎虛，氣血不足為主要表現，手術後，腫瘤雖已被切除，但患者往往存在正虛邪伏的病機特點。在進行手術後輔助化學治療的過程中，結合中醫扶正祛邪的治療方法，能增加療效、減少化療的毒副作用，延長生存期。治療多用健脾、益腎，補氣、生血為主，常用的方藥有參苓白朮散、八珍湯、補中益氣湯等。

又文獻指出臨床上用健脾消積湯配合化療治療晚期大腸癌患者 61 位，隨機分成 2 組，均採用 5-Fu + CF 方案化療，治療組加用健脾消積湯治療。結果健脾消積湯配合化療可提高晚期大腸癌患者的機體免疫功能、提高生存品質、延長生存期²⁷。用健脾活血中藥，配合化療，對改善大腸癌術後患者脾虛症狀，減輕化療部分不良反應有一定的效果²⁸，擬健脾活血方藥(黃芪、黨參、白朮、茯苓、三棱、莪朮、川芎、天龍、地龍)配合化療治療大腸癌根治術後的患者，結果顯示腫瘤緩解率為 44.2%，與單用化療的患者比較，有顯著差異。同時健脾活血中藥能調節機體免疫水準，並減輕化療對機體免疫的抑制作用。另一方面治療組患者治療前後，全血粘度、血漿粘度、紅血球聚集指數均顯著降低。尤其是反應紅血球聚集的指標較對照組顯著減低，亦提示健脾活血的中藥，可能幫助改善腫瘤術後患者的血液高凝狀態，降低血行轉移的可能性²⁹。另有報導指出：用複方丹參滴丸，配合化療，治療中晚期大腸癌，有助於減輕化療某些不良反應和提高患者的免疫功能，從而改善生存品質，但無明顯提高患者的治療有效率³⁰。臨床治療大腸癌，要謹守辨證論治的原則，大腸癌屬本虛標實之證，病程中多見虛實夾雜。早期患者以熱毒、濕濁、瘀阻為主，以活血，解毒，清熱，除濕，化瘀，消腫為治療法，以攻為主，可用白頭翁、黃柏、敗醬草、赤芍、牡丹皮、忍冬藤、藤梨根、苦參、地榆、桃仁、三棱、莪朮及生大黃等藥物；在辨證論治的基礎上，結合中醫藥的傳統理論，針對藥物的性、味、功效，選擇一些已證實有抗癌功效的藥物，常用的對大腸癌有效的藥物有薏苡仁、苦參、白花蛇舌草、半枝蓮、仙鶴草、七葉一枝花、守宮、蜈蚣等³¹。苦參鹼(matrin) 是從中藥苦參的乾燥根中提取的一類活性物質，傳統被用在抗炎、抗心律失常等³²，有報導指出：苦參鹼具有選擇抑制 HT-29 細胞 Cox-2 mRNA (cyclooxygenase-2, Cox-2) 的表達和蛋白表現及 PGE2 (prostaglandin

E2)合成水準，在一定濃度和時間範圍內，呈現出時間效應與劑量效應關係³³。有關單味藥抗大腸癌的研究報導還有很多，諸如絞股藍提取物³⁴、天花粉蛋白³⁵、白頭翁醇提物³⁶及新疆紫草素³⁷等等，不勝枚舉。

丹參酮 II A 是丹參(danshen)的提取物，丹參為唇形科，鼠尾草屬(*Salvia miltiorrhiza*, Bunge)植物丹參(*Radix, Salviae, Miltiorrhizae*)的乾燥根莖。在中醫道統相信丹參有活血化瘀的功效，所以有關丹參的藥性文獻中記載為：活血化瘀，養血寧心，寬胸止痛。另有一味丹參，功同四物之說。丹參性味苦，微寒，入心、肝經。現代醫學研究報導，有擴張冠狀血管、增加冠狀動脈血流量、改善心肌收縮力和降壓作用；還有鎮靜及止痛作用。臨床用於腦血栓、心肌梗塞、血栓閉塞性脈管炎、急慢性肝炎等。丹參提取物的化學成分目前已闡明成分結構的約有 50 多種，主要成分包括丹參酮 I、II A、II B (Tanshinone I、II A、II B)、隱丹參酮(Cryp-totanshinone)、異丹參酮 I、II (Iso-tanshinone I、II)、丹參新酮、丹參醇及維生素 E 等，丹參的有效成分迄今尚待進一步探討和研究⁽³⁸⁾。丹參可清除自由基和抗氧化，其主要是含有丹參素，丹參素是丹參中一個重要的水溶性成分，已被證明具有保護心肌、抗動脈硬化等藥效⁽³⁹⁾。文獻報導丹參的氣仿提取物對多種癌細胞株(包含 KB, Hela, Colo-205 和 Hep-2)有毒殺作用，可能透過活化自由基的產生，造成對 DNA 的損傷，且在 1 µg/ml 以下就有效⁽⁴⁰⁾，有很多研究報導指出丹參酮 I & II (Tanshinone I & II)可以誘導肝癌細胞凋亡⁽⁴¹⁻⁴²⁾和肺癌細胞凋亡⁽⁴³⁻⁴⁴⁾。

在 95 年度由花蓮佛教慈濟綜合醫院，醫療科技研究部補助，研究計畫，體外實驗(in vitro)檢測大腸癌細胞 colo 205 有否受丹參酮 II 的抑制，結果顯示丹參酮 II A 可以抑制 colo 205 細胞的增殖，可引起人類大腸癌細胞 colo 205 細胞停滯在 G0/G1 期，引起 colo 205 細胞發生凋亡，成果已發表⁽⁴⁵⁾。在 96 年度由花蓮佛教慈濟綜合醫院，醫療科技研究部補助，研究計畫，動物實驗探討丹參酮 II A 對人類大腸癌細胞 colo 205 的影響，結果顯示丹參酮 II A 對大腸癌 Colo 205 細胞株轉殖鼠的治療，與控制組腫瘤大小沒有明顯差異，取下腫瘤由西方墨點法分析，結果發現 Caspase 3 (active form)、TNF- α 表達上調，而酪氨酸激酶受體 ErbB2 有明顯抑制表達，拓撲異構酶 Topoisomerase I 的表達也有明顯抑制，但在血管新生因子 VEGF 卻有明顯的上調。可能是因為血管新生入腫瘤，而抵消丹參酮 II A 的療效。所以在本研究將用動物實驗探討中西醫整合的交互作用，以期能有所突破，朝人體試驗的路前進。

丹參酮 II A 和 5-FU 皆具有抗大腸癌作用，本研究的目的是研究丹參酮 II A 和 5-FU 是否有協同作用(Synergism)，發揮 1 加 1 大於 2 的作用，並探討其可能機轉。

貳、材料與方法

一、材料

(一)細胞實驗

RPMI-1640 (R8758), 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

HEPES, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Sodium pyruvate, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Dulbecco's PBS, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Penicillin/Streptomycin, 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

Dimethyl Sulfoxide (DMSO), 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).

Trypan blue, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Fetal bovine serum (FBS), 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

Trypsin-EDTA, 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

(二)西方墨點法

10X TG-SDS buffer, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).

Acrylamide/Bis 30% solution (29:1), 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).

APS (Ammonium persulfate), 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).

Tween 20, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).

SDS (Sodium dodecylsulfate), 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).

6X Protein loading dye, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).

Methanol, 購自 TEDIA(Fairfield.OH, USA).

BioMax Flim, 購自 Kodak.

顯影劑, 購自 Kodak.

定影劑, 購自 Kodak.

Protein assay-Dye reagent concentrate, 購自 Bio-Rad.

Protein maker, 購自 Femantas.

PRO -PREP protein extraction solution, 購自 iNtRON Biotechnology.

ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit), 購自 Amersham.

(三) 抗體

Antibody	MW (kDa)	Dilu (X)	廠商	膠體濃度	2Ab	2Ab 廠商	Dilu (X)
mTOR	245	2000	Abcam	8%	Rabbit	Sigma	15000
Topoisomerase II	200	1000	Cell	8%	Rabbit	Sigma	15000
p-GP	180	500	Sigma	8%	Mouse	Sigma	15000
EGF-R	170	500	Sigma	8%	Mouse	Sigma	15000
EGFR	170	200	Abcam	8%	Rabbit	Sigma	15000
ErbB2	131	500	R&D	8%	Mouse	Sigma	15000
phospho-EGF R	115	250	R&D	8%	Rabbit	Sigma	15000
Topoisomerase I	100	1000	Sigma	8%	Mouse	Sigma	15000
MMP-9	92,86	1000	SANTA	8%	Goat	Sigma	15000
MMP-2	72.63	200	R&D	8%	Mouse	Sigma	15000
Cox-2	72	500	SANTA	8%	Goat	Sigma	15000
NF-kBp65	65	500	Abcam	10%	Rabbit	Sigma	15000
p53	53	1500	R&D	10%	Mouse	Sigma	15000
Caspase 8	53	200	R&D	10%	Mouse	Sigma	15000
JNK	54,46	1000	R&D	10%	Mouse	Sigma	15000
Fas	48	500	R&D	10%	Goat	Sigma	15000
Beta-actin	46	12000	Sigma	10%	Mouse	Sigma	20000
VEGF	46	250	R&D	10%	Mouse	Sigma	15000
Bax	42	1000	R&D	10%	Mouse	Sigma	15000
EIF2- α	36	1000	Abcam	10%	Mouse	Sigma	15000
Cdc2	34	500	Abcam	10%	Mouse	Sigma	15000
GADD153	31	1000	Abcam	15%	Mouse	Sigma	15000
MMP-7	28,19	500	R&D	15%	Mouse	Sigma	15000
Bcl-2	26	500	R&D	15%	Mouse	Sigma	15000
p21	21	150	R&D	15%	Mouse	Sigma	15000
LC3B	18,16	1000	Abcam	15%	Rabbit	Sigma	15000
caspase 3	18	1000	R&D	15%	Mouse	Sigma	15000
TNF-a	17	500	Abcam	15%	Rabbit	Sigma	15000

(四) 設備與儀器

1. 細胞培養

儀器名稱	儀器型號或廠牌
無塵無菌操作台	Lian Shen
細胞培養箱	Thermo Forma
離心機	Allegra X-1LR, Beckman
恆溫水浴槽	Kansin Instruments
電動吸量器	Basic Pipette
細胞計數器	Boeco
倒立式相位差顯微鏡	Axiovert 200
顯微鏡用相機	Cool-Pix 5000, NIKON

2. 檢體製備與藥品製備

儀器名稱	儀器型號或廠牌
超高速低溫離心機	5415R, Eppendorf
超音波洗淨器	8510, Branson
加熱攪拌器	PC-4200, CORNING
真空濃縮機	Heidolph VV2000
酸鹼值測定計	C831; Consort
水平震盪器	DIG system
搖擺震盪器	Kansin Instruments
迴旋震盪器	Kansin Instruments
微量天平	GR-20, A&D
去離子水製造機	Milipore
微量天平	GR-200; A&D
pH 檢測器	JENCO
均質機	ADVANCE

3. 膠體電泳法、二維電泳法、西方墨點法

儀器名稱	儀器型號或廠牌
SNAP id	Millipore
真空幫浦	Millipore
電泳槽套組	Bio-Rad
電源供應器	Amersham Biosciences
電源供應器	Bio-Rad
電源供應器	E122, CONSORT

4. 檢體、藥品保存

儀器名稱	儀器型號或廠牌
乾燥箱	典藏大師
4 度 C 冰箱	Kansin Instruments
-20 度 C 冰箱	Heavy duty Commercial Freezer
-80 度 C 冰箱	Thermo Forma

二、方法

(一) 細胞培養

人類大腸癌 colo 205 細胞株的培養

(1) 培養基的配製

本實驗使用購於 Sigma Chemical 生產型號 R8758 一公升瓶裝的 RPMI-1640 培養基，添加 100 mL 去補體活性胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)、10 mL Penicillin/Streptomycin、10 mL Sodium Pyruvate、10 mL HEPES。

(2) 細胞解凍與培養

將培養液放入 37°C 水槽回溫，再從液態氮桶中取出大腸癌 colo 205 細胞株冷凍管，迅速的將冷凍管移至 37°C 水槽中，使冷凍的細胞快速融化。然後移至無菌操作台操作。取回溫至 37°C 的培養液 10 mL，放入 15 mL 無菌離心管中，再將冷凍管內融化的細胞液放入離心管中混和均勻，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，

然後除去上清液，再加入新鮮的培養液 10 mL 混合均勻，移入新的 100 mm 培養皿中，在 37 °C、5% CO₂ 的培養箱中培養，每 3 日更換新鮮的培養液。

(二) 異種移植

1. 細胞收集

待細胞培養到足夠供給異種移植所需的細胞數後，利用 Trypsin-EDTA 作用 3 分鐘，將細胞從培養皿上打落，並蒐集與離心，再將細胞重新懸浮在 PBS 中，並調整細胞濃度到 1.5×10^6 cells/mL，置於裝滿碎冰的低溫傳送箱中。

2. 細胞皮下轉殖

在細胞懸浮後的一小時內進行轉殖，一人將小鼠進行雙手保定，另一人以胰島素專用針吸取 0.2mL 的細胞懸浮液，緩慢將細胞液打入小鼠右大腿與背部之間的皮下，注射細胞液後的小鼠留觀 30 分鐘，無異狀後才能放回動物飼養架。

(三) 動物給藥與觀察

1. 動物給藥

(1) 給藥時機

大約一週後，當小鼠腫瘤最長徑達 0.5 公分時，開始給與藥物，依照實驗目標不同，給藥時機會有所修正。

(2) 給藥模式

本計畫中，共使用三種給藥方式，分別為腹腔注射法、皮下注射法、強制灌胃法。腹腔注射法：將藥物吸取後，左手保定小鼠，並使其腹部凸顯出來，並以手指夾住鼠尾；右手持針，下針位置於下腹部約膀胱上方偏左，緩慢推藥。皮下注射法：將藥物吸取後，左手保定小鼠，並壓制小鼠桌面，以手指捏起頭頸部皮膚；右手持針，下針位置於捏起來的頭頸部皮膚，緩慢推藥。強制灌胃法：將藥物吸取後，左手保定小鼠，保持身體直立姿勢，並以手指夾住鼠臉頰；右手持裝有餵食針的針筒，將餵食針放入小鼠口中沿食道到胃處，緩慢推藥。

2. 動物觀察

(1) 腫瘤量測

以左手保定小鼠後，並將背部長腫瘤的地方，以游標卡尺量測，最長徑與最短徑，套入腫瘤體積估算公式，藉以評估其腫瘤體積。

$$\text{腫瘤體積} = (\text{最長徑} \times \text{最短徑}^2) \div 2$$

(2) 體重量測

每次給藥前，進行體重量測，以克為單位，紀錄小鼠體重的變化，若有體重快速下降時，便將該鼠進行隔離。

(3) 外觀紀錄

小鼠給藥前，觀察其活動力、毛色、精神、活動力、有無腹瀉...等不良反應，不良反應狀況發生時，便將該鼠進行隔離。

(四) 小鼠腫瘤摘除手術

1. 摘除手術

小鼠經給藥觀察後，以二氧化碳犧牲，剪開腫瘤附近的皮膚，使腫瘤顯露出來，並拍照紀錄，接著將腫瘤摘取下來，依照編號拍照紀錄。

2. 腫瘤重量量測

摘取下來的腫瘤，以微量天平進行秤重，以克為單位，記錄其重量。

3. 腫瘤處理

將腫瘤對切成兩部份，一部份放入含有 10% 的中幸福馬林液的 50 mL 離心管中，放入 4 度 C 冰箱保存，另一部份以眼科剪把腫瘤剪成碎泥狀，分成多份放入 1.5mL 離心管中，於-80 度 C 冰箱保存。

4. 腫瘤轉移檢查

打開小鼠腹腔，逐一檢查心臟、肺臟、肝臟、脾臟、胰臟、胃、小腸、大腸、腎臟、膀胱、生殖器官...等有無腫瘤的出現。

(五) 蛋白質萃取與定量

1. 蛋白質萃取

(1) 將凍存的腫瘤隨機採樣 100 mg 放入 1.5 mL 微離心管中，每管各加入 100 μ L PRO-PERP 蛋白質萃取液，並加入氧化鉻 (ZrO) 磁珠，以均質機打碎研磨成漿，移除磁珠後至於冰上，反應 40 分鐘，並每 5 分鐘震盪一次。

(2) 再將組織漿液移至 1.5 mL 微離心管，以 13200 rpm 離心 10 分鐘，取上清液，即為所要的蛋白質。

2. 蛋白質的定量

(1) 以胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin; BSA) 為蛋白質標準品，配製濃度為 (10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、80 μ g/mL、100 μ g/mL) 標準品樣品。

(2) 將細胞蛋白質萃取液以 Q 水稀釋 100 倍，並將蛋白質標準品

樣品與細胞萃取稀釋液各 20 μ L，依序放入 96 Well ELISA plate 中，在 590 nm 測定吸光值。

- (3) 將結果以 Microsoft Excel 分析，計算出標準曲線與線性公式，且 r 值須達 0.98 以上，藉此計算出細胞蛋白質萃取液的蛋白質濃度。

(六) 膠體電泳

1. SDS 膠體電泳膠(SDS-PAGE gel)配製

- (1) 下層膠 (Running Gel 10%) 的組成：H₂O₂ 9.6 mL、40 % Acrylamide 5.0 mL、Running Buffer 5.0 mL、10 % SDS 0.2 mL、10% APS 0.2 mL、TEMED 30.0 μ L；總量 20 mL 為 4 片量。
- (2) 上層膠 (Stacking Gel) 的組成：H₂O₂ 4.06 mL、40% Acrylamide 1.02 mL、Running Buffer 1.66 mL、10% SDS 66 μ L、10% APS 33.4 μ L、TEMED 12 μ L；總量 8mL 為 4 片量。
- (3) 下層膠注入膠台後，緩緩用 RO 水去除氣泡並壓平下層膠的上緣，約等 30 分鐘待膠體凝固。將上層膠注入，然後小心地插入梳子到未凝固的膠體中，避免氣泡出現於樣品槽下緣。約等 30 分鐘待上層膠凝固後，將樣品槽梳子拔出來，用保鮮膜包好，放入夾鍊袋中保濕，放入冰箱保存。

2. SDS 膠體電泳(SDS-PAGE)

- (1) 將膠體放入電泳槽，再加入 Running buffer。小心的用滴管去除膠體殘留的氣泡。先以 30V 電泳 30 分鐘。
- (2) 配置樣品時，將細胞蛋白質萃取液和 6X Loading Dye 混合，並調整蛋白質濃度到 50 μ g/well，接著把樣品隔水加熱 10 分鐘。
- (3) 取 3 μ L 分子量標準品 (maker) 和配製好的樣品由左至右分別 loading 到樣品槽。以 80 V 電泳 60 分鐘，再改成 120V 電泳 90 分鐘。

(七) 西方墨點法

1. Bio-Rad System

- (1) 轉漬膜(PVDF)先用 100% Methanol 浸潤 10 秒，再放於 transfer buffer 中浸泡 2 分鐘，將轉漬夾打開後黑色面當底放，取出已浸泡轉漬緩衝液的海綿墊片放於其上面，並依序在海綿片上放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel 以及 PVDF 轉漬膜、3M 濾紙，最後再放上一片海棉墊片後夾上轉漬夾，形成三明治夾層的構造。

- (2)接著將轉漬夾放入電泳槽中，然後放入冰盒中並加滿 transfer buffer，與放入攪拌磁石。並且在電泳槽的外圍放入足夠的冰塊。
- (3)以固定安培 400 mA、最高伏特、150 分鐘為條件，進行蛋白質轉漬。等待蛋白質轉漬完成後，取出轉漬膜，並且裁去多餘部分，以 0.1% TBS-Tween 20 (後簡稱為 TBST)清洗 3 次，每次 10 分鐘。
- (4)以 5 mL Blocking buffer (溶於 TBST 中的脫脂牛奶)將轉漬膜進行 blocking，在室溫震盪 60 分鐘。
- (5)將轉漬膜取出，放在小保鮮盒中用 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。
- (6)放入 4 mL 的一級抗體(以 Blocking buffer 稀釋)，在 4°C 冷房中搖擺震盪整夜。
- (7)隔天將轉漬膜取出後，置於小保鮮盒中以 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。然後加入 5mL 的 blocking buffer 搖擺震盪 30 分鐘，再以 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。
- (8)加入二級抗體(以 TBST 稀釋)於室溫下搖擺震盪 60 分鐘，再將轉漬膜以 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。
- (9)最後在暗房中進行底片顯影，將轉漬膜浸泡於 ECL 試劑 20 秒。壓片卡匣內先以投影片當底，然後再將轉漬膜放入，最後蓋上投影片，放入壓片卡匣內。用 Kodak 底片進行壓片，感光時間依膜上放出的螢光亮度，決定時間長短，約需 5 秒至 60 分鐘不等。感光完成後，再放入顯影劑進行顯影，再放入定影劑中，過 90 秒後再以浸泡於清水，最後將底片晾乾，分析蛋白質表現量。

(八)二維電泳法

1. 樣品處理

- (1)三倍體積 30 % TCA (含 0.2 % DTE)混合溶液靜置整夜，12,000 rpm 4°C 離心 30 分鐘。
- (2)去上清液用 acetone 含 0.1 %DTE 打散後置於-20°C 60 分鐘 12,000 rpm 4°C 離心 30 分鐘。
- (3)去上清液用 acetone 打散後置於-20°C 60 分鐘 12,000 rpm 4°C 離心 30 分鐘。
- (4)去上清液抽乾用 Rehydration sol.回溶(Bradford test 測蛋白質濃度)

2. 一維等電點電泳法 (one-Dimensional Isoelectric Focusing Electrophoresis)

- (1) 再水合作用 (rehydration)：將處理後的蛋白樣品溶於 rehydration buffer: 8 M urea、2 % CHAPS、0.5% IPG buffer (Pharmacia, Cat. No. 17-6000-87) 及 bromophenol blue (RDH, Cat. No. 32712)，蛋白質濃度在 350 µg，總體積 250 µl，將其均勻分布於 holder 中，取 pH 3-10 之 13 公分的 IPG strip gel (Pharmacia, Cat. No. 17-6001-14)，上層覆蓋礦物油 1-2 ml 防止水分蒸散，最後將其置於 IPGphor 中 20 °C 16 小時進行再水合作用。
- (2) 電焦集法 (isoelectric focusing)：膠體經過再水合作用後進行電焦集法

電焦集法之電壓與時間

Step	Voltage	Volt-hours(Vh)
1	500	500
2	1000	1000
3	8000	32000

3. 二維 SDS-PAGE 膠體電泳

- (1) IPG strip 平衡：將一維等電點電泳法完成之膠體將其浸泡於平衡溶液(一) 15 分鐘後，再移至平衡溶液(二)內，完成平衡步驟，主要目的為先還原雙硫鍵為硫氫基，之後防止其再度氧化。平衡溶液基本成分為：6 M urea、50 mM Tris-HCl pH8.8、30 % glycerol (J.T. Baker, Cat. No. 2136-03)、2 % SDS (BIO-RAD, Cat. No. 161-0302)及 bromophenol blue，平衡溶液(一)另外加入 1 % DTT (1,4-Dithio-L-threitol, Sigma, Cat. No. D9163)，而平衡溶液(二)為加入 1 % iodoacetamide (Fluka, Cat. No. 57607)。
- (2) SDS-PAGE：將平衡過的 IPG strip 放入 12.5 % SDS-PAGE:10 % SDS、acrylamine solution (30 % acrylamine、0.8 % bisacrylamine)、10% ammonium persulphate 及 TEMED 上並以 0.5 % agarose solution 填滿空隙開始電泳。以 15 mA 15 分鐘開始接著 30 mA 電泳 4 小時。

4. 固定與染色

- (1) 把固定液放入水盆中，打開 90° 的玻璃有 gel 附著那面炮在固定液中。

- (2) 用指腹在玻璃邊緣溫柔的伸進 gel 中，360°旋轉一圈，把 gel 與玻璃放入水中搖晃，使 gel 與玻璃分開。(如果還沒分開就把手指伸進去轉 360°)
- (3) 固定液反應 30 分鐘，之後加入 STPRO®Ruby Protein Gel 反應整夜。

5. 退染與照相

- (1) 把 TPRO®Ruby Protein Gel 回收到 Re-use 的瓶子中，並註明使用日期。
- (2) R.O 水沖洗一下，加入固定液退染
- (3) 固定液 1.5 小時→固定液 2 小時→固定液 2 小時→R.O 水半小時→照相
- (4) 照相：1.把一氣開關打開、電腦打開或重開機。2.機器掃描的鏡面用試鏡紙擦拭。3.把泡在 R.O 水裡的 gel 放在塑膠薄片上，把指腹輕按在掃描機鏡面上，之後把塑膠板慢慢垂直讓 gel 自然滑落。
- (5) 打開軟體 "Typhoon Scanner Contral"&"ImageQuant5.2" 在 "Typhoon Scanner Contral" 中選取範圍(通常 sample 放在右下角)，選取 gel 面方向 "Orientation R"，"Acquisition Mode" 選擇 Fluorescence，"Steup" 中的 Image 1 選 300BP SYPRO Ruby, Rox ETBr。按下 scan，等掃描完成，按 OK。
- (6) 把塑膠板用 R.O 水沾濕，在掃描鏡面上伸進 gel 下方，用另一隻手的指腹伸進 gel 下方，把 gel 慢慢拉到塑膠板上，會有阻力，所以慢慢的拉。
- (7) 用指腹輕按薄塑膠板上的 gel，移動到檢開的塑膠袋上，下面墊有後塑膠板。把薄塑膠板稍為垂直，gel 就會把塑膠代用封口機封起來，4°C 保存。

(九) 質譜儀分析

1. 膠內水解 (In-Gel Digestion)

- (1) 本步驟都在 laminar flow hood 中操作
- (2) 收來的樣品中若含有 dd H₂O 等，並將移除。
- (3) 在 eppendorf 內將膠切成小段，銀染的樣品，須加 40 μL 的 1:1 混合液去染，在室溫下 vortex 15 分鐘後移除。
- (4) 加入 100 μL 25 mM ABC，vortex 10 分鐘，移除。加入 100 μL 25 mM ABC / 50 % ACN，vortex 10 分鐘，移除。上述動作反

覆三次。

(5)真空乾燥 10 分鐘。

(6)加入 40 μL 的 10 mM DTT / 25 mM ABC，在 56°C 加熱器 400 rpm vortex 1 小時，移除 solution 後，加入 40 μL 的 55 mM IAA / 25 mM ABC，室溫下避光 45 分鐘，移除 IAA 後，加入 100 μL 的 25 mM ABC，vortex 15 分鐘。移除溶液後，再加上 100 μL 的 100% ACN，vortex 5 分鐘移除。

(7)加入 10 μL 的 0.01 μg 的 Trypsin，以 silconized blue pestle 將膠磨碎，磨碎後 10 μL 的 25 mM ABC，把殘存在 pestle 及 eppendorf 上方的膠推到 eppendorf 底。可視膠的多寡再多加 25mM ABC，最多不超過 10 μL 。

(8)取 parafilm 封緊 eppendorf，置入 37°C 水浴槽，水浴 16 小時。

(9)16 小時後，將樣品放入高速離心機，已轉速 13000 rpm，離心 10 分鐘，取上清液至新的 0.65 mL eppendorf。

2. Recover peptides

(1)加 20 μL 的 5% FA / 50% ACN 至舊的 0.65 mL eppendorf，移至超音波震盪器震盪 20 分鐘，將剩餘膠與少許上清液中的蛋白質萃取出來。

(2)再放入高速離心機，以轉速 12000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至先前的 0.65 mL eppendorf。

(3)將 eppendorf 的蓋子打開，放入離心真空濃縮機抽乾。樣品位上機前，儲存於-20°C 冰箱，上機前加 30 μL 的 1% FA / 5% / ACN / 94% ddH₂O 回溶，vortex 5 分鐘後，再以 13500 rpm 離心 30 分鐘，即可上機。

(4)接著 LC-MS/MS 上機分析，將胺基酸片段序列上網至歐洲蛋白質序列數據資料庫 (SWISS-PROT Data Bank) 進行比對，便能得到特定蛋白質身分。

(十)統計分析

數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，數據以 student't test 進行統計比較。當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異，以(*)來表示。

參、結果

一、第一次實驗

(一)實驗動物選擇

本次實驗選用重度免疫不全症候群小鼠 (Sever Combined Immune-Deficiency, SCID mice)，此品系為慈濟大學實驗動物中心所繁殖小鼠，品系名為 NOD.CB17-Prkdc-scid/JTcu mice。隨機選用雄性，3 周齡，體重 10-15 公克左右的重度免疫不全症候群小鼠 (NOD-SCID mice) 18 隻，購買並飼養於符合無特定病原實驗室 (Specific-pathogen-free Lab.; SPF Lab.) 即 (花蓮慈濟大學實驗動物中心; Laboratory Animal Center of Tzu Chi University, Hualien, Taiwa)。

(二)給藥條件

本次實驗分成三組，分別比較對照組(不給予藥物)、5-Fu 組(單純給予 5-Fu)和中西藥合併組(5-Fu 合併使用丹參酮 IIA)，在腫瘤體積變化與蛋白質表達上是否有差異，各組給藥條件分別如下，對照組：只給與玉米油，每 10 克體重給與 0.2mL 玉米油，每日口服灌胃給藥。5-Fu 組：只給 5-Fluorouracil，每公斤體重給與 100 毫克，每日腹腔注射給藥。中西藥合併組：5-Fluorouracil 每公斤體重給與 100 毫克，每日腹腔注射給藥，之後再給與丹參酮 IIA，每公斤體重給與 20 毫克，每日口服灌胃給藥。

(三)腫瘤體積變化

小鼠分成三組，起始體積略不相同，把腫瘤最小的組編為對照組，將腫瘤最大的組編為中西藥合併組，將剩餘的組編為 5-Fu 組。因此，起始腫瘤體積大小比較，為中西藥合併組 (平均 1694mm^3) $>$ 5-Fu 組 (平均 1151mm^3) $>$ 對照組 (平均 964mm^3)。觀察 4 天，可以發現原本最小的對照組，變成腫瘤體積最大的組，而原本最大的中西藥合併組變成最小的組。

(四)腫瘤體積百分比變化

由於起始體積不相同，因此將腫瘤體積變化，換算成百分比，把各組第一天腫瘤大小當作 100%，觀察 4 天內腫瘤大小的變化。對照組從 100% 成長到 345%，5-Fu 組從 100% 成長到 180%，中西藥合併組從 100% 降低到 57%。

(五)腫瘤體積比較直方圖

比較第四天腫瘤體積百分比，並繪製成直方圖比較腫瘤體積比，以對照組當做分母，實驗組當做分子，5-Fu 組與對照組相比，

體積為對照組的 52.16%，5-Fu 組抑制腫瘤體積達 47.84%，中西藥合併組與對照組相比，體積為對照組的 36.81%，中西藥合併組抑制腫瘤體積達 63.19%。

(六)實驗動物存活率比較直方圖

連續給藥 4 天後，5-Fu 組與中西藥合併組皆出現腹瀉、脫毛、精神萎靡等症狀，因此停藥並觀察各組存活狀況，到第 10 天，5-Fu 組 6 隻皆死亡，故將全數實驗動物犧牲，第一次動物實驗。第 10 天對照組存活 4 隻、5-Fu 組 0 隻、中西藥合併組 2 隻。計算成存活率分為，對照組 67%、5-Fu 組 0%、中西藥合併組 33%。

(七)蛋白質表達

1. 細胞凋亡相關蛋白表達的影響

- (1)觀察 Bax 的蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、中西藥合併組（比值為 0.85）與 5-Fu 組（比值為 1.11）發現中西藥合併組抑制 Bax 的蛋白表達。
- (2)觀察 Fas 蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、中西藥合併組（比值為 0.82）與 5-Fu 組（比值為 0.82）發現中西藥合併組與 5-Fu 組抑制 Fas 蛋白表達。
- (3)觀察 Caspase 8 蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、合併組（比值為 1.36）與 5-Fu 組（比值為 1.43）發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆增加 Caspase 8 蛋白表達。
- (4)觀察 Caspase 3 蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、合併組（比值為 0.48）與 5-Fu 組（比值為 0.69）發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆抑制 Caspase 3 蛋白表達。

2. 轉移發炎相關蛋白表達的影響

- (1)觀察 MMP-2 蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、合併組（比值為 1.21）與 5-Fu 組（比值為 1.39）發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆增加 MMP-2 蛋白表達。
- (2)觀察 MMP-7 蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、合併組（比值為 0.92）與 5-Fu 組（比值為 0.81）發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆抑制 MMP-7 蛋白表達。
- (3)觀察 NF- κ B p65 蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、合併組（比值為 0.96）與 5-Fu 組（比值為 0.82）發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆抑制 NF- κ B p65 蛋白表達，結果如[圖 3-1-7-2-3]。
- (4)觀察 TNF- α 蛋白表達，比較控制組（比值為 1）、合併組（比值為 1.33）與 5-Fu 組（比值為 1.09）發現中西藥合併組增加

TNF- α 蛋白表達。

(5) 觀察血管新生重要相關蛋白 VEGF 蛋白表達，比較控制組(比值為 1)、合併組(比值為 0.86)與 5-Fu 組(比值為 0.65)發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆抑制 VEGF 蛋白表達。

3. 細胞複製相關蛋白

(1) 觀察 p53 蛋白表達，比較控制組(比值為 1)、合併組(比值為 0.79)與 5-Fu 組(比值為 0.62)發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆抑制 p53 蛋白表達。

(2) 觀察 p21 蛋白表達，比較控制組(比值為 1)、合併組(比值為 1.16)與 5-Fu 組(比值為 0.90)發現中西藥合併組增加 p21 蛋白表達，5-Fu 組抑制 p21 蛋白表達。

(3) 觀察 Topoisomerase I 蛋白表達，比較控制組(比值為 1)、合併組(比值為 0.54)與 5-Fu 組(比值為 0.48)發現中西藥合併組與 5-Fu 組皆抑制 Topo- I 蛋白表達。

二、第二次實驗

(一) 實驗動物選擇

本實驗選用重度免疫不全症候群小鼠 (Sever Combined Immune-Deficiency, SCID mice)，此品系為慈濟大學實驗動物中心所繁殖小鼠，品系名為 NOD.CB17-Prkdc-scid/JTcu mice。隨機選用雄性，5 周齡的重度免疫不全症候群小鼠(NOD-SCID mice) 4 隻，飼養於符合無特定病原實驗室 (Specific-pathogen-free Lab.; SPF Lab.) 即 (花蓮慈濟大學實驗動物中心; Laboratory Animal Center of Tzu Chi University, Hualien, Taiwa)，為第一次實驗控制組的小鼠。

本次實驗目的在找出適合劑量與給藥方式，且在先前的實驗已經確認，5-Fu 組能有效抑制腫瘤生長，故減少動物使用量。

(二) 給藥條件

本次實驗分成兩組，分別比較單純給予 5-Fu 和 5-Fu 合併使用丹參酮 IIA，在腫瘤體積與蛋白質表達上是否有差異，各組給藥條件分別如下：

1. 5-Fu 組：給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 50 毫克，每日以皮下注射給藥。
2. 中西藥合併組：給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 50 毫克，每日以皮下注射給藥，之後再給與丹參酮 IIA，體重每公斤給與 20 毫克，每日以口服灌胃給藥。

(三) 腫瘤體積變化

將小鼠分成二組，平均腫瘤體積較小的組編為 5-Fu 組，平均腫瘤體積較大的組編為中西藥合併組，起始腫瘤體積大小為：中西藥合併組 > 5-Fu 組。給藥 5 天，觀察發現 5-Fu 組的腫瘤體積逐日增大，中西藥合併組則仍維持原先大小。

(四) 腫瘤體積百分比變化

由於起始體積不相同，因此將腫瘤體積變化，換算成百分比，把各組第一天腫瘤大小當作 100%，觀察 5 天內腫瘤大小的變化，5-Fu 組從 100% 成長到 239%，中西藥合併組從 100% 降低到 99%。

(五) 腫瘤體積比較直方圖

比較第五天腫瘤體積百分比，並繪製成直方圖比較腫瘤體積比，以 5-Fu 組當做分母，中西藥合併組當做分子，中西藥合併組與 5-Fu 組相比，中西藥合併組抑制腫瘤體積百分比達 58.3%。

(六) 實驗動物存活率比較直方圖

連續給藥 5 天後，5-Fu 組與中西藥合併組皆出現腹瀉、脫毛、精神萎靡等症狀，因此停藥並觀察各組存活狀況。到第 7 天將全數實驗動物犧牲，第 7 天 5-Fu 組 2 隻、中西藥合併組 2 隻，存活率分別為，5-Fu 組 100%、中西藥合併組 100%。

三、第三次實驗

(一) 實驗動物選擇

本實驗選用重度免疫不全症候群小鼠 (Sever Combined Immune-Deficiency, SCID mice)，此品系為慈濟大學實驗動物中心所繁殖小鼠，品系名為 NOD.CB17-Prkdc-scid/JTcu mice。隨機選用雄性，3 周齡的重度免疫不全症候群小鼠(NOD-SCID mice) 24 隻，飼養於符合無特定病原實驗室 (Specific-pathogen-free Lab.; SPF Lab.) 即 (花蓮慈濟大學實驗動物中心; Laboratory Animal Center of Tzu Chi University, Hualien, Taiwa)。

(二) 給藥條件

本次實驗分成三組，分別比較不給予藥物、單純給予 5-Fu 和 5-Fu 合併使用丹參酮 IIA，在腫瘤體積是否有差異，各組給藥條件分別如下：

1. 控制組：對照組：給與玉米油，體重每 10 公克給與 0.2mL，每日以口服灌胃給藥。
2. 5-Fu 組：給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每星期一、三、五日以腹腔注射給藥。
3. 合併組：給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每星期一、三、五日在鼠腹部左側以腹腔注射給藥；之後再給與丹參

酮 IIA，體重每公斤給與 20 毫克，在鼠腹部右側以腹腔注射給藥。

(三) 腫瘤體積變化

將小鼠分成三組，體積不相同，將平均腫瘤體積控制組 (668.6 mm^3)，5-Fu 組 (847.7 mm^3)，而合併組 (575.3 mm^3)，起始腫瘤體積大小比較為：5-Fu 組 > 控制組 > 合併組。觀察 9 天，可以發現控制組的腫瘤體積增大速度最快，合併組與 5-Fu 組則腫瘤體積皆有變小，由於誤差線重疊，若刪除各組中體積最大與體積最小的數據，則控制組的誤差線與另外二組的誤差線不重疊。

(四) 腫瘤體積百分比變化

由於起始體積不相同，因此將腫瘤體積變化，換算成百分比，把各組第一天腫瘤大小當作 100%，觀察 9 天內腫瘤大小的變化，控制組從 100% 成長到 244%，5-Fu 組從 100% 降低到 57%，合併組從 100% 降低到 49%，由於誤差線重疊，若刪除各組中體積最大與體積最小的數據，則控制組的誤差線與另外二組的誤差線不重疊。

(五) 腫瘤重量比較直方圖

比較第九天腫瘤重量，並繪製成直方圖進行比較，控制組腫瘤重平均為 4.17 ± 2.56 公克；5-Fu 組平均為 0.49 ± 0.32 公克；合併組平均為 0.84 ± 0.37 公克。

(六) 實驗動物存活率比較

連續給藥 7 天後，5-Fu 組與中西藥合併組皆出現腹瀉、脫毛、精神萎靡等症狀，因此停藥並觀察各組存活狀況。到第 9 天將全數實驗動物犧牲，第 9 天控制組存活 8 隻、5-Fu 組 4 隻、合併組 2 隻，存活率分別為，控制組 100%、5-Fu 組 50%、合併組 25%。

四、第四次實驗

(一) 實驗動物選擇

本實驗選用重度免疫不全症候群小鼠 (Sever Combined Immune-Deficiency, SCID mice)，此品系為慈濟大學實驗動物中心所繁殖小鼠，品系名為 NOD.CB17-Prkdc-scid/JTcu mice。隨機選用雄性，6 周齡的重度免疫不全症候群小鼠 (NOD-SCID mice) 5 隻，飼養於符合無特定病原實驗室 (Specific-pathogen-free Lab.; SPF Lab.) 即 (花蓮慈濟大學實驗動物中心; Laboratory Animal Center of Tzu Chi University, Hualien, Taiwa)，為實驗三之控制組的小鼠。使用前次實驗的控制組，是因為為了減少實驗動物的使用量，且本實驗目的在於尋找適當，且不會致死的劑量。

(二)給藥條件

本次實驗分成兩組，分別比較單純給予 5-Fu 和 5-Fu 合併使用丹參酮 IIA，在腫瘤體積是否有差異，各組給藥條件分別如下：

1. 5-Fu 組：給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每週一以腹腔注射給藥。
2. 合併組：給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每週一在鼠腹部左側以腹腔注射給藥；之後每週三、五再給丹參酮 IIA，體重每公斤給與 20 毫克，在鼠腹部右側以腹腔注射給藥。

(三)腫瘤體積變化

將小鼠分成兩組，體積不相同，5-Fu 組平均腫瘤體積為 (2439 mm³)，合併組平均腫瘤體積為 (2553mm³)，起始腫瘤體積為：5-Fu 組 > 合併組。觀察 40 天，可以發現 5-Fu 組的腫瘤體積增大速度最快，合併組腫瘤體積則緩慢增加，由於樣本數未達統計學要求之數量，故觀察各組小鼠腫瘤體積的變化。

(四)腫瘤體積百分比變化

由於起始體積不相同，因此將腫瘤體積變化，換算成百分比，把各組第一天腫瘤大小當作 100%，觀察 40 天內腫瘤大小的變化，5-Fu 組從 100% 成長到 425%，合併組從 100% 成長到 245%。

(五)腫瘤重量比較直方圖

犧牲後取下腫瘤並測量腫瘤重量，繪製成直方圖進行比較，5-Fu 組為對照組平均為 9.1 公克；合併組平均為 8.0 公克。

(六)蛋白質表達

1. 細胞凋亡相關蛋白

- (1) 觀察 p53 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 1.02) 比較，發現沒有顯著差異。
- (2) 觀察 caspase 3 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 0.58) 比較，發現合併組會抑制 caspase 3 蛋白表達。
- (3) 觀察內質網壓力重要蛋白 GADD153，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 1.19) 比較，發現合併組會提升 GADD153 蛋白表達。

2. 轉移與發炎相關蛋白表達

- (1) 觀察 VEGF 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 0.87) 比較，發現合併組會抑制 VEGF 蛋白表達。
- (2) 觀察 NF- κ B p65 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 0.95) 比較，發現會無顯著差異。
- (3) 觀察 COX-2 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值

為 0.73) 比較，發現合併組會抑制 COX-2 蛋白表達。

3. 細胞複製相關蛋白

- (1) 觀察 Topoisomerase I 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 1.45) 比較，發現合併組會促進 Topoisomerase I 蛋白表達。
- (2) 觀察 EGF-R 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 0.82) 比較，發現合併組會抑制 EGF-R 蛋白表達。
- (3) 觀察 Erb-B2 蛋白表達，5-Fu 組 (比值為 1) 與合併組 (比值為 0.58) 比較，發現合併組會抑制 Erb-B2 蛋白表達。

五、第五次實驗

(一) 實驗動物選擇

本實驗選用重度免疫不全症候群小鼠 (Sever Combined Immune-Deficiency, SCID mice)，此品系為慈濟大學實驗動物中心所繁殖小鼠，品系名為 NOD.CB17-Prkdc-scid/JTcu mice。隨機選用雄性，3 周齡的重度免疫不全症候群小鼠(NOD-SCID mice) 32 隻，飼養於符合無特定病原實驗室 (Specific-pathogen-free Lab.; SPF Lab.) 即 (花蓮慈濟大學實驗動物中心; Laboratory Animal Center of Tzu Chi University, Hualien, Taiwa)。

(二) 給藥條件

本次實驗分成四組，分別比較控制組，5-Fu 組、5-Fu 合併使用低劑量丹參酮 IIA 和高劑量丹參酮 IIA，在腫瘤體積是否有差異，各組給藥條件分別如下：

1. 控制組：給玉米油，體重 10 公克給與 0.2 毫升，每週一、二、三以腹腔注射給藥。
2. 5-Fu 組：給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每週一以腹腔注射給藥。
3. 合併低劑量組：每週一給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每日在鼠腹部左側以腹腔注射給藥；之後每週三、五再給與丹參酮 IIA，體重每公斤給與 20 毫克，在鼠腹部右側以腹腔注射給藥。
4. 合併高劑量組：每週一給與 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每日在鼠腹部左側以腹腔注射給藥；之後每週三、五再給與丹參酮 IIA，體重每公斤給與 60 毫克，在鼠腹部右側以腹腔注射給藥。

(三) 腫瘤體積變化比值曲線

由於起始體積不相同，因此將腫瘤體積變化，換算成百分比，

把各組第一天腫瘤大小當作 1，觀察 10 天、17 天、31 天內腫瘤大小的變化，由於給藥 1 周後發現 5-Fu 毒性太強（小鼠出現腹瀉症狀），導致第 10 天開始有小鼠死亡，因此第 11 天開始停止給藥，繼續觀察停藥後腫瘤體積的變化。10 天，控制組>合併高劑量>合併低劑量>5-Fu 組。17 天，控制組>合併低劑量>合併高劑量>5-Fu 組。31 天，合併低劑量>控制組>合併高劑量>5-Fu 組。

(四) 腫瘤體積變化

觀察腫瘤體積的變化，分別為控制組、5-Fu 組、合併低劑量、合併高劑量，第 31 天的腫瘤體積從大到小排列下來為合併低劑量組>控制組>5-Fu 組>合併高劑量組。控制組（從 $38.5\pm 35.9\text{mm}^3$ 上升到 $981.40\pm 662\text{mm}^3$ ）；5-Fu 組（從 $94.25\pm 39.09\text{mm}^3$ 上升到 $522.75\pm 109.2\text{mm}^3$ ）；合併低劑量（從 $44.06\pm 42.05\text{mm}^3$ 上升到 $1331.0\pm 0\text{mm}^3$ ）；合併高劑量（從 $23.44\pm 15\text{mm}^3$ 上升到 $195.33\pm 206\text{mm}^3$ ）；但 5-Fu 組與合併低劑量組的樣本數，從第 10 天開始就不足 3 隻。

(五) 小鼠存活率百分比曲線圖

觀察 10 天、17 天、31 天內死亡率的變化，由於給藥 1 周後發現 5-Fu 毒性太強（小鼠出現腹瀉症狀），導致第 10 天開始有小鼠死亡，因此第 11 天開始停止給藥，繼續觀察停藥後的影響。統計 10 天存活率百分比的結果，控制組 100% > 合併高劑量 100% > 合併低劑量 60% > 5-Fu 組 40%。統計 17 天存活率百分比的結果，控制組 100% > 合併高劑量 40% > 5-Fu 組 20% > 合併低劑量 10%。統計 31 天存活率百分比的結果，控制組 90% > 合併高劑量 40% > 5-Fu 組 20% > 合併低劑量 10%。

(六) 小鼠體重變化

觀察小鼠體重變化，以第一天體重為分母，之後體重為分子，將體重比值變化繪製成曲線圖。可以發現控制組從 22 公克成長到 28 公克，5-Fu 組開始給藥後，體重不斷下降，從開始的 20 公克掉到第八天的 16 公克，停藥後體重開始上升，第 31 天達 23.5 公克，合併低劑量組從 23 公克下降到第 10 天的 19 公克，停藥後回升到 28 公克，而合併高劑量組與控制組相似，從 22 公克成長 25 公克。

(七) 小鼠腫瘤重量變化

由於給藥 1 周後發現 5-Fu 毒性太強（小鼠出現腹瀉症狀），導致第 10 天開始有小鼠死亡，因此第 11 天開始停止給藥，繼續觀察停藥後的影響，結果如[圖 3-5-7-1]。控制組瘤重：編號 1 的 2.04 公克、編號 2 的 1.92 公克、編號 4 的 4.31 公克、編號 7 的 1.83

公克、編號 8 的 2.2 公克，平均 2.46 ± 1.04 公克。5-Fu 組瘤重：編號 1 的 0.5 公克、編號 2 的 0.05 公克、編號 4 的 0.42 公克、編號 5 的 0.47 公克、編號 6 的 0.17 公克、編號 7 的 1.13 公克、編號 8 的 0.94 公克，平均 0.526 ± 0.388 公克。合併低劑量組瘤重：編號 1 的 4.81 公克、編號 3 的 0.06 公克、編號 4 的 0.21 公克、編號 5 的 0.15 公克、編號 6 的 0.03 公克、編號 7 的 0.2 公克，平均 0.91 ± 1.912 公克。合併高劑量組瘤重：編號 1 的 1.12 公克、編號 2 的 0.71 公克、編號 3 的 0.17 公克、編號 4 的 0.09 公克、編號 5 的 0.03 公克、編號 6 的 0.005 公克、編號 7 的 0.13 公克、編號 8 的 1.12 公克，平均 0.422 ± 0.485 公克。給藥與觀察期間，發現小鼠會去啃食死亡的同伴，因此控制組編號 3、5、6，5-Fu 組編號 3，合併低劑量組編號 2、8 無瘤重資料。

(八)蛋白質表達(10 天內死亡)

1. 細胞凋亡相關蛋白

- (1) 觀察 p53 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 2.07) 與合併低劑量組 (比值為 2.37) 比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組增加 p53 蛋白表達。
- (2) 觀察 GADD153 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 2.24) 與合併低劑量組 (比值為 2.42) 比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組增加 GADD153 蛋白表達。
- (3) 觀察 Caspase 8 蛋白表達，比較控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.45) 與合併低劑量組 (比值為 0.63) 比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 Caspase 8 蛋白表達。

2. 轉移相關蛋白

- (1) 觀察 VEGF 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.79) 與合併低劑量組 (比值為 0.91) 比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 VEGF 蛋白表達。
- (2) 觀察 NF- κ B p65 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0) 與合併低劑量組 (比值為 0.29) 比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 NF- κ B p65 蛋白表達。
- (3) 觀察 MMP-2 蛋白表達，比較控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0) 與合併低劑量組 (比值為 0.05) 比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 MMP-2 蛋白表達。
- (4) 觀察 MMP-7 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.39) 與合併低劑量組 (比值為 0.50) 比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 MMP-7 蛋白表達。

3. 細胞複製相關蛋白

- (1) 觀察 Topoisomerase I 蛋白表達，比較控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 0.79)與合併低劑量組(比值為 0.56)比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 Topoisomerase I 蛋白表達。
- (2) 觀察 EGF-R 蛋白表達，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 0.57)與合併低劑量組(比值為 1.36)比較，發現 5-Fu 會抑制 EGF-R 蛋白表達，但合併低劑量丹參酮 IIA 卻會增加 EGF-R 蛋白表達。
- (3) 觀察 ErbB2 蛋白表達，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 0.49)與合併低劑量組(比值為 0.78)比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 ErbB2 蛋白表達。

(九) 蛋白質表達(31 天內死亡)

1. 細胞凋亡相關蛋白

- (1) 觀察 GADD153，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 0.88)、合併低劑量組(比值為 0.71)與合併高劑量組(比值為 0.93)比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組抑制 ErbB2 蛋白表達，有顯著差異。
- (2) 觀察 Caspase 8 蛋白表達，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 1.66)、合併低劑量組(比值為 0.37)與合併高劑量組(比值為 0.90)比較發現 5-Fu 組增加 Caspase 8 蛋白表達，但是合併丹參酮 IIA 卻會抑制 Caspase 8 蛋白表達。

2. 轉移相關蛋白

- (1) 觀察 VEGF 蛋白表達，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 0.91)、合併低劑量組(比值為 0.98)與合併高劑量組(比值為 0.94)比較，發現並沒有顯著抑制 VEGF 蛋白表達。
- (2) 觀察 NF- κ B p65 蛋白表達，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 0.84)、合併低劑量組(比值為 0.82)與合併高劑量組(比值為 0.60)比較，發現顯著抑制 NF- κ B p65 蛋白表達。
- (3) 觀察 MMP-2 蛋白表達，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 0.97)、合併低劑量組(比值為 0.54)與合併高劑量組(比值為 0.65)比較，發現合併低劑量組與合併高劑量組顯著抑制 MMP-2 蛋白表達。
- (4) 觀察 MMP-7 蛋白表達，控制組(比值為 1)、5-Fu 組(比值為 1.63)、合併低劑量組(比值為 0.75)與合併高劑量組(比值為 1.87)比較，發現 5-Fu 組與合併高劑量組會增加 MMP-7 蛋白表達，但合併低劑量組抑制 MMP-7 蛋白表達。

3. 細胞複製相關蛋白

- (1) 觀察 Topoisomerase I 蛋白表達，控制組（比值為 1）、5-Fu 組（比值為 0.56）、合併低劑量組（比值為 0.37）與合併高劑量組（比值為 0.77）比較，顯著抑制 Topoisomerase I 蛋白表達。
- (2) 觀察 EGF-R 蛋白表達，控制組（比值為 1）、5-Fu 組（比值為 0.91）、合併低劑量組（比值為 1.04）與合併高劑量組（比值為 0.64）比較，發現合併高劑量組則是顯著抑制 EGF-R 蛋白表達。
- (3) 觀察 Erb-B2 蛋白表達，控制組（比值為 1）、5-Fu 組（比值為 1.09）、合併低劑量組（比值為 0.83）與合併高劑量組（比值為 0.89）比較，發現 5-Fu 組增加表達，合併低劑量與高劑量組皆會顯著抑制 Erb-B2 蛋白表達。

六、第六次實驗

(一) 實驗動物選擇

本實驗選用重度免疫不全症候群小鼠（Sever Combined Immune-Deficiency, SCID mice），此品系為慈濟大學實驗動物中心所繁殖小鼠，品系名為 NOD.CB17-Prkdc-scid/JTcu mice。隨機選用雄性，5 周齡的重度免疫不全症候群小鼠(NOD-SCID mice) 24 隻，飼養於符合無特定病原實驗室（Specific-pathogen-free Lab.；SPF Lab.）即（花蓮慈濟大學實驗動物中心；Laboratory Animal Center of Tzu Chi University, Hualien, Taiwa）。

(二) 給藥條件

本次實驗分成三組，分別比較控制組，5-Fu 組和 5-Fu 合併使用低劑量丹參酮 IIA，在腫瘤體積是否有差異，各組給藥條件分別如下：

1. 控制組：給玉米油，體重 10 公克給與 0.2 毫升，每週一、三、五腹腔注射。
2. 5-Fu 組：給 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每週一腹腔注射給藥。
3. 合併組：給 5-Fluorouracil，體重每公斤給與 20 毫克，每週一在鼠左側以腹腔注射給藥；每週三、五再給與丹參酮 IIA，體重每公斤給與 20 毫克，在鼠腹部右側以腹腔注射給藥。

(三) 腫瘤體積變化

觀察 28 天內腫瘤大小的變化，5-Fu 組>控制組>合併低劑量，以第一天體積為分母，之後的體積為分子，計算比值。控制組（從

122±73mm³ 上升到 1209±710 mm³)；5-Fu 組 (從 156±151 mm³ 上升到 2893±2903 mm³)；合併組 (從 122±159 mm³ 上升到 902±766 mm³)。若排除每組中腫瘤體積最大與最小的小鼠，則得以下數據：

控制組 (從 146 ±48mm³ 上升到 1733±1114 mm³)；5-Fu 組 (從 99±60 mm³ 上升到 1134±796 mm³)；合併組 (從 123±159 mm³ 上升到 537±437 mm³)。

(四) 小鼠腫瘤重量變化

觀察各組經治療後的腫瘤重量。控制組瘤重：編號 1 的 0.036 公克、編號 2 的 1.92 公克、編號 4 的 0.1751 公克、編號 5 的 1.7167 公克，平均 0.494±0.82 公克。5-Fu 組瘤重：編號 1 的 0.7999 公克、編號 2 的 1.3058 公克、編號 3 的 1.6591 公克、編號 4 的 1.0157 公克、編號 5 的 10.924 公克、編號 6 的 1.7565 公克，平均 2.91±3.94 公克。合併組瘤重：編號 1 的 1.6973 公克、編號 2 的 1.0505 公克、編號 3 的 0.1926 公克、編號 4 的 0.7729 公克、編號 5 的 0.4985 公克、編號 6 的 3.3259 公克，平均 1.26±1.14 公克。給藥與觀察期間，發現小鼠會去啃食死亡的同伴，因此控制組編號 3、6，無瘤重資料。

(五) 蛋白質表達

1. 細胞凋亡相關蛋白

- (1) 觀察 p53 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.48) 與合併組 (比值為 0.90) 比較，發現 5-Fu 組顯著抑制 p53 蛋白表達，合併組抑制 p53 蛋白表達較不顯著。
- (2) 觀察 p21 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 2.79) 與合併組 (比值為 3.45) 比較，發現顯著增加 p21 蛋白表達。
- (3) 觀察 Bax 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 1.11) 與合併組 (比值為 0.41) 比較，發現 5-Fu 組增加 Bax 蛋白表達，合併組會顯著抑制 Bax 蛋白表達。
- (4) 觀察 Bcl-2 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.87) 與合併組 (比值為 0.60) 比較，發現顯著抑制 Bcl-2 蛋白表達。
- (5) 觀察 Fas，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 1.13) 與合併組 (比值為 0.69) 比較，發現合併組會顯著抑制 Fas 蛋白表達。
- (6) 觀察 Pro-Caspase 8，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.78) 與合併組 (比值為 0.34) 比較，發現顯著抑制 Pro-Caspase

8 蛋白表達。

- (7) 觀察 Caspase 3 (19kDa)，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.34) 與合併組 (比值為 0.31) 比較，發現顯著抑制 Caspase 3 (19kDa) 蛋白表達。
- (8) 觀察 Caspase 3 (17kDa)，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 1.13) 與合併組 (比值為 0.65) 比較，發現 5-Fu 組增加 Caspase 3 (17kDa) 蛋白表達，合併組會顯著抑制 Caspase 3 (17kDa) 蛋白表達。
- (9) 觀察 JNK-1 (46 kDa)，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 1.02) 與合併組 (比值為 1.10) 比較，發現合併組會增加 JNK-1 (46 kDa) 蛋白表達。
- (10) 觀察 JNK-2 (54 kDa) 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 1.45) 與合併組 (比值為 1.10) 比較，發現 5-Fu 組會顯著增加 JNK-2 (54 kDa) 蛋白表達，合併組也會增加 JNK-2 (54 kDa) 蛋白表達。

2. 轉移相關蛋白

- (1) 觀察 VEGF 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 1.68) 與合併組 (比值為 0.92) 比較，5-Fu 組會顯著增加 VEGF 蛋白表達，合併組抑制 VEGF 蛋白表達。
- (2) 觀察 NF- κ B p65 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 1.47) 與合併組 (比值為 0.70) 比較，發現 5-Fu 組會顯著增加 NF- κ B p65 蛋白表達，合併組能抑制 NF- κ B p65 蛋白表達。
- (3) 觀察 TNF- α 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.37) 與合併組 (比值為 0.32) 比較，發現 5-Fu 組與合併組會顯著抑制 TNF- α 蛋白表達。
- (4) 觀察 MMP-2 (Inactive form) 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.65) 與合併組 (比值為 0.31) 比較，發現 5-Fu 組與合併組會顯著抑制 MMP-2 (Inactive form) 蛋白表達。
- (5) 觀察 MMP-2 (Active form) 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.13) 與合併組 (比值為 0.11) 比較，發現 5-Fu 組與合併組會顯著抑制 MMP-2 (active form) 蛋白表達。
- (6) 觀察 MMP-7 蛋白表達，控制組 (比值為 1)、5-Fu 組 (比值為 0.87) 與合併組 (比值為 0.42) 比較，發現 5-Fu 組與合併組會顯著抑制 MMP-7 蛋白表達。

3. 細胞複製相關蛋白

- (1) 觀察 Topoisomerase I 蛋白表達，控制組（比值為 1）、5-Fu 組（比值為 0.83）與合併低劑量組（比值為 0.15）比較，發現 5-Fu 組與合併組會顯著抑制 Topoisomerase I 蛋白表達。
- (2) 觀察 Erb-B2 蛋白表達，控制組（比值為 1）、5-Fu 組（比值為 0.98）與合併低劑量組（比值為 0.65）比較，發現合併低劑量組會顯著抑制 Erb-B2 蛋白表達。

4. 細胞複製相關蛋白

- (1) 觀察產生抗藥性的重要蛋白 p-Glycoprotein 蛋白表達，控制組（比值為 1）、5-Fu 組（比值為 1.36）與合併低劑量組（比值為 0.72）比較，發現 5-Fu 組增加 p-Glycoprotein 蛋白表達，合併低劑量組會顯著抑制 p-Glycoprotein 蛋白表達，抑制 5-Fu 增加的表達。
- (2) 觀察增加癌細胞對藥物耐受性調控機制的細胞自噬重要標記蛋白 LC3B 蛋白表達，控制組（比值為 1）、5-Fu 組（比值為 1.93）與合併低劑量組（比值為 1.67）比較，發現 5-Fu 組與合併低劑量組增加 LC3B 蛋白表達，合併低劑量組會抑制 5-Fu 造成的增加 LC3B 蛋白表達。

(六) 二維電泳與 LC-MS/MS 探勘

由 colo 205 xerograft tumor 萃取的蛋白質利用二維電泳法，經退染與掃瞄照相，完成比對。選擇明顯變化的點，膠內水解 In-Gel Digestion)，還原胜肽(Recover peptide)，接著 LC-MS/MS 上機分析，將胺基酸片段序列上網至歐洲蛋白質序列數據資料庫 (SWISS-PROT Data Bank) 進行比對，便能得到特定蛋白質身分。

1. 控制組與 5-Fu 組比較

- (1) 5-Fu 較控制組表達高兩倍以上的蛋白質，分別有編號 12 的 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1/ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2/ NCK-associated protein 1, isoform CRA_a，編號 17 的 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/ L-lactate dehydrogenase A isoform 1/ aldolase A，編號 10 的 tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, zeta polypeptide/ heat shock 70kDa protein 5，gamma-actin/ alpha-actin/ isocitrate dehydrogenase (NADP+)，編號 13 的 sterol carrier protein 2, isoform CRA_b/vesicle amine transport protein 1/ human rab GDI。
- (2) 5-Fu 較控制組表達低的蛋白質，其中減少一半以上的，有編

號 11 的 gamma-actin/beta-actin/alpha-tubulin；編號 18 的 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/malate dehydrogenase precursor/Annexin A2/L-lactate dehydrogenase A isoform 1；編號 24 的 myosin light chain 2。

2. 5Fu 和 Tan-IIA 合併用藥與控制組的比較

(1) 5Fu 和 Tan-IIA 合併用藥組與控制組比較，合併用藥組表達較控制組高 3 倍的蛋白質，有編號 12 的 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1/ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2/ NCK-associated protein 1, isoform CRA_a，編號 10 的 tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, zeta polypeptide/ heat shock 70kDa protein 5，編號 20 的 Porin 31HM/ voltage-dependent anion channel 1，編號 04 的 WD-repeat protein/ beta-actin/ alpha-actin/ gamma-actin。

(2) 合併組表達較控制組低 2.5 倍以上的蛋白質有，編號 14 的 enolase 1，編號 18 的 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/ malate dehydrogenase precursor/ Annexin A2/ L-lactate dehydrogenase A isoform 1，編號 16 的 Chain A, Human Muscle Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase Complexed With Fructose 1,6-Bisphosphate/ sorbitol dehydrogenase，編號 24 的 myosin light chain 2，編號 15 的 Chain A, Human Muscle Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase Complexed With Fructose 1,6-Bisphosphate/ sorbitol dehydrogenase。

3. 5Fu 和 Tan-IIA 合併用藥與 5-Fu 組比較

(1) 合併組比 5-Fu 組表達高 2 倍的蛋白質，有編號 12 的 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1/ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2/ NCK-associated protein 1, isoform CRA_a，編號 20 的 Porin 31HM/ voltage-dependent anion channel 1/ voltage-dependent anion channel 1，編號 08 的 guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit/ Chain B, Human Pyruvate Dehydrogenase，編號 07 的 ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit/beta-actin/alpha-actin/ gamma-actin，編號 06 的 SET nuclear oncogene。

(2) 合併組表達較 5-Fu 組低的蛋白質，其中減少一半以上的，有編號 21 的 peroxiredoxin 1/Porin 31HM/voltage-dependent anion channel 1/peroxiredoxin 4；編號 14 的 enolase 1。

肆、討論

本研究計畫共執行六次動物實驗，由結果顯示，第一次動物實驗，連續給藥 4 天後，5-Fu 組與中西藥合併組皆出現腹瀉、脫毛、精神萎靡等症狀，因此只給藥 4 天，並觀察各組實驗動物狀況，到第 10 天，5-Fu 組 6 隻實驗動物皆死亡，故將全數實驗動物犧牲。5-Fu 組(5-Fu, 100 mg/Kg, I.P, Q.D)抑制腫瘤體積達 47.84 %；中西藥合併組(5-Fu, 100mg/Kg, I.P, Q.D + Tan-IIA, 20 mg/Kg, P.O, Q.D)抑制腫瘤體積達 63.19%。第 10 天存活率分別為，對照組 67%、5-Fu 組 0%、中西藥合併組 33%，顯示合併使用 5-Fu 和 Tan-IIA，可明顯增效及減毒。第二次動物實驗，給藥 5 天，5-Fu 組(5-Fu, 50 mg/Kg, S.C, Q.D)腫瘤體積變化從 100%成長到 239%，中西藥合併組(5-Fu, 50 mg/Kg, S.C, Q.D + Tan-IIA, 20 mg/Kg, P.O, Q.D)腫瘤體積變化從 100%降低到 99%，中西藥合併組抑制腫瘤體積百分比達 58.3%，顯示合併使用 5-Fu 和 Tan-IIA，比單獨使用 5-Fu 可明顯增加抑制腫瘤的功效。第三次動物實驗，每星期一、三、五日給藥，7 天後停藥並觀察各組存活狀況。控制組腫瘤體積從 100%成長到 244%，腫瘤重平均為 4.17 ± 2.56 公克；5-Fu 組(5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, Q.D) 腫瘤體積從 100%降低到 57%，腫瘤重平均為 0.49 ± 0.32 公克；合併組(5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, Q.D + Tan-IIA, 20 mg/Kg, I.P, Q.D)腫瘤體積從 100%降低到 49%，腫瘤重平均為 0.84 ± 0.37 公克。顯示合併使用 5-Fu 和 Tan-IIA，或單獨使用 5-Fu 可明顯增加抑制腫瘤的功效。到第 9 天將全數實驗動物犧牲，第 9 天控制組存活 8 隻、5-Fu 組 4 隻、合併組 2 隻，存活率分別為，控制組 100%、5-Fu 組 50%、合併組 25%，可能是因為 5-Fu 和 Tan-IIA 給藥皆採腹腔注射，導致死亡。第四次實驗使用第三次動物實驗的控制組，給藥 40 天，5-Fu 組(5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1)腫瘤體積變化從 100%成長到 425%，腫瘤重量平均為 9.1 公克；中西藥合併組(5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1 + Tan-IIA, 20 mg/Kg, I.P, QW3,5)腫瘤體積變化從 100%成長到 245%，腫瘤重量平均為 8.0 公克，顯示合併使用 5-Fu 和 Tan-IIA，比單獨使用 5-Fu 可明顯增加抑制腫瘤的功效。

第五次動物實驗，分成四組，分別比較控制組，5-Fu 組(5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1)、5-Fu 合併使用低劑量丹參酮 IIA (5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1 + Tan-IIA, 20 mg/Kg, I.P, QW3, 5)和高劑量丹參酮 IIA (5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1 + Tan-IIA, 60 mg/Kg, I.P, QW3, 5)，給藥 1 周後發現 5-Fu 毒性太強(小鼠出現腹瀉症狀)，導致第 10 天開始有小鼠死亡，因此第 11 天開始停止給藥，繼續觀察停藥後腫瘤體積的變化。第 10 天，腫瘤體積增加比值，控制

組>合併高劑量>合併低劑量>5-Fu 組。第 17 天，腫瘤體積增加比值，控制組>合併低劑量>合併高劑量>5-Fu 組。第 31 天，腫瘤體積增加比值，合併低劑量>控制組>合併高劑量>5-Fu 組。統計 10 天存活率百分比的結果，控制組 100% >合併高劑量 100% >合併低劑量 60% > 5-Fu 組 40%。統計 17 天存活率百分比的結果，控制組 100% >合併高劑量 40% > 5-Fu 組 20% >合併低劑量 10%。統計 31 天存活率百分比的結果，控制組(90%) >合併高劑量(40%) > 5-Fu 組(20%) >合併低劑量(10%)。顯示合併使用 5-Fu 和高劑量 Tan-IIA，比單獨使用 5-Fu 和合併使用 5-Fu 和低劑量 Tan-IIA，可明顯增加存活率，表示合併使用高劑量 Tan-IIA，可以減少使用 5-Fu 化療的毒副作用。但合併使用 Tan-IIA 並沒有增加 5-Fu 抑制腫瘤的功效。檢討原因可能是因為 SCID mice 周齡太小(3 周齡)，無法承受對 5-Fu 化療的毒副作用，給藥 1 周後即停藥，所以效果沒有如第四次實驗。所以再次進行第六次動物實驗。

第六次動物實驗，隨機選用雄性，5 周齡的重度免疫不全症候群小鼠(NOD-SCID mice) 24 隻，本次實驗分成三組，分別比較控制組；5-Fu 組(5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1)；5-Fu 和 Tan-IIA 合併使用組(5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1 + Tan-IIA, 20 mg/Kg, I.P, QW3,5)，觀察 28 天內腫瘤大小的變化，控制組(從 $122 \pm 73 \text{mm}^3$ 上升到 $1209 \pm 710 \text{mm}^3$)；5-Fu 組(從 $156 \pm 151 \text{mm}^3$ 上升到 $2893 \pm 2903 \text{mm}^3$)；合併組(從 $122 \pm 159 \text{mm}^3$ 上升到 $902 \pm 766 \text{mm}^3$)。以第一天體積為分母，之後的體積為分子，計算比值，結果 5-Fu 組>控制組>合併組。若排除每組中腫瘤體積最大與最小的的小鼠，則控制組從 $146 \pm 48 \text{mm}^3$ 上升到 $1733 \pm 1114 \text{mm}^3$ ；5-Fu 組從 $99 \pm 60 \text{mm}^3$ 上升到 $1134 \pm 796 \text{mm}^3$ ；合併組從 $123 \pm 159 \text{mm}^3$ 上升到 $537 \pm 437 \text{mm}^3$ ，結果控制組>5-Fu 組>合併組。但犧牲後，將瘤體剝下秤重，控制組瘤重平均 0.494 ± 0.82 公克，5-Fu 組瘤重平均 2.91 ± 3.94 公克，合併組瘤重平均 1.26 ± 1.14 公克。結果顯示在治療大腸癌方面，5-Fu 合併使用 Tan-IIA 比單獨使用 5-Fu，可明顯降低腫瘤的成長。在分子機轉方面，2F2T (5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1 + Tan-IIA, 20 mg/Kg, I.P, QW3, 5) 並沒辦法增強 5-Fu (5-Fu, 20 mg/Kg, I.P, QW1) 所誘導的凋亡，包括 TNF- α 、Fas、Caspase 8, 3、Bax、JNK，但是能提高 p53 的表達，降低 Bcl-2，對於 p21 無顯著的影響。TNF- α 、Fas、Caspase 8 的表達被抑制，代表死亡受體路徑無法被活化而 Bax 被顯著的降低，更意味著粒線體凋亡路徑被抑制且 JNK-1/2 表達不如 5-Fu，無法有效誘導凋亡產生，最後凋亡關鍵蛋白 Caspase 3 無法表達。但是 2F2T 比 2F 能夠抑制抗藥性蛋白的表達，包括 P-Gp、LC3-II。抗藥性蛋白 P-Glycoprotein (MDR)，為大分子通道蛋白，

是癌症細胞將 5-Fu 藥物排除產生抗藥性的關鍵[48]，合併給與 Tan IIA 能有效降低該蛋白的表達，減少藥物被排出細胞外的可能。LC3-II 為細胞自噬重要標靶，在文獻指出細胞自噬被認為是癌細胞對 5-Fu 產生的抗藥性反應[49]，丹參酮 IIA 能夠抑制 5-Fu 所造成的 LC3-II 表達增加，進而降低抗藥性。2F2T 能夠抑制的多種和癌細胞侵襲和轉移能力有關的蛋白，包括 MMP -2、MMP -7、VEGF。監測 MMP 蛋白，能夠知道癌細胞轉移侵襲能力，5-Fu 合併給與丹參酮 IIA 能夠更有效的減少 MMP-2 與 MMP-7 的表達，降低癌細胞轉移侵襲的能力。VEGF 是血管新生重要的因子，為癌細胞所分泌，能夠促使附近血管新生出微血管來提供腫瘤組織的營養與氧氣等需求，抑制 VEGF 亦為目前癌症治療中重要的標靶之一，亦有文獻指出低劑量 5-Fu 會造成血管新生[50]，合併使用丹參酮 IIA 能夠有效抑制 VEGF 的產生。2F2T 能夠抑制促生長蛋白的表達，包括 Topoisomerase I、ErbB 2。Topoisomerase I, Topo I 中文譯作拓撲異構解旋酶第一型，當細胞週期進行到 S 前期時，細胞會大量表達 Topoisomerase，以協助 DNA 合成加速，若能有效抑制該蛋白的表達將能夠有效減緩細胞週期的運轉，進而細胞生長遲緩，合併給與丹參酮 IIA 能夠有效抑制 Topoisomerase I 的表達。ErbB 2 是生長因子接受器，共有四種亞型 ErbB-1~4，雖然 Erb-B2 (HER-2/ neu)被認為是乳癌治療的重要標靶，在其他癌症細胞中確不一定存在，但 2009 年有文獻報告指出，Erb-B2 (HER-2/ neu)在大腸癌細胞亦扮演重要的角色[51]，合併給與丹參酮 IIA 能有效減少 Erb-B2 (HER-2/ neu)的表達量。所以本實驗結果顯示，合併使用丹參酮 IIA (20 mg/Kg/Q.W3,5)可增強化療藥物 5-Fu (20 mg/Kg/Q.W1)對人類大腸癌 colo205 cells 的治療效果(表 4-1, 4-2)。經由抑制抑制抗藥性蛋白(P-Gp、LC3-II)的表達，抑制侵襲和轉移能力有關的蛋白(MMP -2、MMP -7、VEGF)的表達，抑制促生長蛋白(Topoisomerase I、Erb-B2)的表達(表 4-3)。但是化療藥物 5-Fu 的劑量必須在 20 mg/Kg/per week 以上，或 5-Fu 的劑量在 20 mg/Kg/per week，但能持續使用六週以上。

伍、結論與建議

雖然合併給與丹參酮 IIA 無法提高凋亡程度，甚至降低多種凋亡蛋白的表達。卻能減少抗藥機制的產生，例如降低 p-Gp、LC3-II 表達量，減少抗藥能力的產生。並且能增強 5-Fu 的抗轉移侵襲的能力，經由降低 MMP-2 與 MMP-7 的表達、降低血管新生因子 VEGF 的表達。另外經由降低細胞分裂所需要的 Topoisomerase I 的表達、降低生長因子受器 Erb-B2 的表達量，也能夠促使癌細胞生長趨緩。雖然凋亡沒有被增強，這不一定是不好的現象，減少凋亡可能是減少化療藥物副作用的主要機制，許多具有保護心臟毒性、肝臟毒性的藥物，都是減少凋亡，提高抗氧化的能力。5-Fu 合併使用丹參酮 IIA 能夠降低人類大腸癌細胞 COLO205 異種皮移殖裸鼠的死亡率、這可能是因為減弱凋亡能力，使化療毒副作用降低。加強 5-Fu 抑制大腸癌細胞 COLO205 異種皮移殖腫瘤的生長，可能是經由抑制血管內皮生長因子(VEGF)和拓撲異構解旋酶第一型(Topo-I)的蛋白表達和且降低大腸癌細胞 COLO205 表面的上皮細胞生長因子接受器 Erb-B2 所致。

所以本實驗結果顯示，合併使用丹參酮 IIA 可增強化療藥物 5-Fu 對人類大腸癌 colo205 cells 的治療效果。經由抑制抑制抗藥性蛋白的表達，抑制侵襲和轉移能力有關的蛋白的表達，抑制促生長蛋白的表達。但是化療藥物 5-Fu 的劑量必須在 20 mg/Kg/per week 以上，或 5-Fu 的劑量在 20 mg/Kg/per week，但能持續使用六週以上。

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CCMP97-RD-041 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. 行政院衛生署 97 年公務統計年報 2008; pp.33。
2. Stewart BW, Kleihues P, eds. World cancer report. Lyon, France: IARC Press, 2003; pp.198-202.
3. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000 CA: J Cancer Clinic. 2000; 50: 7-33.
4. Ries LAG, Eisner MP, Bethesda, MD, Kosary CL: SEER Cancer Statistics Review, 1973–1999. Natl Cancer Inst. 2002.
5. Atlanta, GA, American Cancer Society: Cancer Facts and Fig. 2004.
6. 湯釗猷：現代腫瘤學，上海醫科大學出版社，上海 1993；pp. 425 -625.
7. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH: Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. N Eng J Med. 1990; 322: 352–358.
8. NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA. 1990; 264: 1444-1450.
9. O’Connell JB, Maggard MA, KO CY. Colon cancer survival rates with the new. American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst 2004; 96: 1420-1425.
10. Graham S, Marshall J, Haughey B. Dietary epidemiology of cancer of the colon in western New York. Am J Epidemiol.1988; 128: 490-503.
11. Cummings JH, Bingham SA, Heaton KW, Eastwood MA. Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fibers). Gastroenterology.1992; 103: 1783-1789.
12. Haskell CM, ed. Cancer treatment, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1990.
13. Dorr RT, Fritz, eds. Cancer chemotherapy handbook. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1980; pp.435 - 449.
14. James K, Eisenhauer E, Christian M, Terenziani M, Vena D, Mudal A. Measuring response in solid tumors: unidimensional versus bidimensional measurement. J Nat. cancer inst. 1999; 91: 523 - 528.
15. Dorr RT, Fritz WL, eds. Cancer chemotherapy handbook. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1980.

16. Perry MC, Ed. The chemotherapy sourcebook. Baltimore: Williams & Wilkins. 1992; pp.94.
17. Zittoun J, Marquet J, Pilorget JJ, Tonetti C, De Gialluly E. Comparative effect of 6S, 6R and 6RS leucovorin on methotrexate rescue and on modulation of 5-fluorouracil. *Br J Cancer*. 1991; 63: 885-888.
18. Therasse P, Arbuck S G, Eisenhauer E A., Wanders J, Kaplan R S, Rubinstein L, Verweij J, Glabbeke M V, Oosterom A V, Christian MC, Gwyther SG. New guide lines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92: 205 - 216.
19. Wiseman LR, Adkins JC, Plosker GL, Goa KL. Oxaliplatin: a review of its use in the management of metastatic colorectal cancer. *Drugs Aging* .1999; 14: 459-75.
20. Misset J.L, Bleiberg H, Sutherland W, Bekradda M, Cvitkovic E. Oxaliplatin clinical activity: a review. *Critical Reviews in Oncology-Hematology*. 2000; 35: 75-93.
21. Becouarn Y, Rougier P. Clinical efficacy of oxaliplatin monotherapy: phase II trials in advanced colorectal cancer. *Semin Oncol*.1998; 25: 23 -31.
22. Watanabe H, Yamamotos S, Kunitoh H, Sekine I, Yamamoto N, Ohe Y, Tamura T, Kodama T, Sugimura K and Saijo N. Tumor response to chemotherapy: the validity and reproducibility of RECIST guide-line in NSCLC patients. *Cancer Sci*. 2003; 94: 1015 - 1020.
23. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs C S, Ramanathan R K, Williamson S K, Findlay B P, Pitot HC, Alberts SR. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 23-30.
24. Susannah Motl. Bevacizumab in combination chemotherapy for colorectal and other cancers. *Am J Health-Syst Pharm*. 2005; 62: 1021-1032.
25. 包素珍：中藥複方三根湯結合化療治療中晚期大腸癌 120 例。遼寧中醫雜誌 1992; 7: 31.
26. 沈漢澄：腸必安抗大腸癌術後轉移的研究。 *Bull Med Res*.2002; 31: 26.
27. 黃智芬、黎漢忠、劉俊波、黃常江、施智嚴：健脾消積湯配合化療治療晚期大腸癌療效觀察。 *中國中西醫結合雜誌* 2005; 14: 1281-1282.
28. 劉 靜、王維平、周奕陽、方震宇、侯鳳剛：健脾活血中藥聯合化療治

- 療大腸癌術後患者的療效觀察。中國中西醫結合雜誌 2005; 25: 207-209.
29. 劉靜、王維平、周奕陽、方震宇、侯鳳剛：健脾活血中藥聯合化療治療對大腸癌術後患者免疫和血液流變學的影響。江蘇中醫藥 2005; 26: 13-14.
30. 陳小東、梁啟廉、李小英、張英、李建文、梁柱：複方丹參滴丸聯合化療治療 47 例大腸癌。中國中西醫結合外科雜誌 2005; 11: 300-302.
31. 曹洋、劉展華、陳志堅：陳銳深教授治療大腸癌的經驗。中醫藥學刊 2005; 23: 1750-1751.
32. Lai J P, He XW, Jiang Y, Chen F. Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Ait by molecularly imprinted solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem.* 2003; 375: 264-269.
33. 黃建、張鳴傑、邱福銘：苦參鹼抑制大腸癌 HT-29 細胞環氧化酶-2 表達的研究。中國中西醫結合雜誌 2005; 25: 240-243.
34. 金梅：絞股藍提取液對人直腸腺癌細胞系的影響。現代應用藥學 1992; 9: 49-53.
35. 徐振武、吳裕新：天花粉蛋白抗結腸癌體內實驗研究。海峽藥學 1997; 9: 1211-1214.
36. 章榮華、張仲苗、耿寶琴：白頭翁對二甲基胍誘發小鼠大腸癌的防治作用和機理研究。中藥藥理與臨床 1999; 15: 33-37.
37. 蔣英麗、宋今丹：新疆紫草素誘導人大腸癌細胞的調亡。癌症 2001; 20: 1355-1359.
38. 郭濟賢. 丹參的研究與臨床應用. 北京：中國醫藥科技出版社，1992，37～106.
39. 楊春欣. 丹參素的藥理研究進展. 中國藥理學通報, 1997, 13 (4) : 298.
40. Wu WL, Chang WL, Chen CF Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines. *Am J Chin Med.* 1991; 19(3-4): 207-16.
41. Tang Z, Tang Y, Fu L. Growth inhibition and apoptosis induction in human hepatoma cells by tanshinone II A. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2003; 23(2): 166-8, 172.
42. Yuan SL, Wei YQ, Wang XJ, Xiao F, Li SF, Zhang J. Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2004 Jul 15; 10(14): 2024-8.
43. Zhang P, Pei Y, Qi Y. Influence of blood-activating drugs on adhesion and

- invasion of cells in lung cancer patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1999 Feb; 19(2): 103-5.
44. Liu MZ, Huang YS, Xiao WQ. No promoting effects of sodium tanshinone II-A sulfonate on growth and metastasis of Lewis carcinoma. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1991 Nov; 12(6): 534-7.
45. Su CC, Chen GW, Kang JC, Chan MH. Growth Inhibition and Apoptosis Induction by Tanshinone IIA in Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Planta Med* 2008; 74: 1357–1362.
46. N Leigh Anderson, et al. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Current Opinion in Biotechnology* 2000, 11: 408–412.
47. Rong Xiang, et al. 2D LC/MS Analysis of Membrane Proteins from Breast Cancer Cell Lines MCF7 and BT474. *J. Proteome Res.*, 3 (6), 1278 -1283, 2004
48. Robey RW, Shukla S, Finley EM, et al. Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1((R)). *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 1302-12.
49. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16: 761-71.
50. Albertsson P, Lennernas B, Norrby K. Low-dose continuous 5-fluorouracil infusion stimulates VEGF-A-mediated angiogenesis. *Acta Oncol*. 2009; 48: 418-25.
51. Wu WK, Tse TT, Sung JJ, Li ZJ, Yu L, Cho CH. Expression of ErbB receptors and their cognate ligands in gastric and colon cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2009; 29: 229-34.

