

編號：CCMP95-TP-030

當歸萃取物與抗肝腫瘤西藥之體內外協同作用之探討與抗癌機制之研究

蘇進成

財團法人佛教慈濟綜合醫院

摘要

研究目的：

本實驗之目的是從中草藥中開發出一種能抑制惡性肝腫瘤生長並且與臨床藥物具有協同作用之抗癌藥物。由當歸丙酮萃取層得到的純物質 TZU-01 在本實驗中進一步證實 TZU-01 與臨床西藥合併使用具有協同作用。

材料與方法：

利用 CI method 進行中西藥物協同作用分析，接著以 RT-PCR 與西方墨點分析 TZU-01 與臨床西藥協同作用的抗癌機轉，最後以人類惡性肝腫瘤化學治療之動物模式之建立並評估 TZU-01 治療效果。

結果與討論：

利用 CI method 分析發現，TZU-01 與臨床烷化劑藥物 BCNU 合併治療對於 HepG2 肝癌細胞株具協同作用。此外，能抑制烷化劑藥物的 MGMT，TZU-01 能促使其啟動子的甲基化程度增加，進而抑制其 mRNA 及蛋白質生成，而提高 BCNU 在治療肝癌的效果。當利用轉殖技術在肝癌細胞中大量表達 MGMT 後，發現肝癌細胞對 TZU-01 及 BCNU 的 IC₅₀ 皆提高，因此推論 MGMT 可能是 TZU-01 的標的基因。最後，分析 TZU-01 對抑制皮下肝腫瘤生長之情形，發現 TZU-01 對裸鼠皮下肝腫瘤生長相對控制組而言有明顯的抑制效果，而隨著 TZU-01 劑量愈高效果愈顯著且無明顯的副作用。

關鍵詞：惡性肝腫瘤、協同作用、烷化劑藥物

Number: CCMP95-TP-030

To Investigate the Synergic Effect of *Angelicae sinensis* Extract with Current Chemotherapy in Human Hepatocellular Carcinoma

Su, Chin-Cheng

Buddish Tzu Chi Hospital

ABSTRACT

Aim:

The purpose of this experiment is to develop anticancer drug from Chinese herbal medicine which have cooperative effect with clinical medicine. The *Angelica sinensis* chloroform extracted, TZU-01 can inhibit malignant liver tumor growth and demonstrate the synergistic effected with the clinical chemo drugs.

Method:

By using CI method, we analyze the synergistic affected between Chinese and chemo drugs. Followed, analyze the anticancer machines of TZU-01 and clinical chemo drugs by RT-PCR and western blotting. Finally, Xerograft mice as a model system to assess the effect of combined therapy effect of TZU-01 and chemo drugs *in vivo*.

Result and Discussion:

By using CI method, TZU-01combine BCNU has synergistic effect to HepG2 cells. In addition, TZU-01 can inhibit MGMT mRNA and protein expression by increase MGMT promoter methylation. Moreover, improve the BCNU curative effect in treating hepatocarcinoma. After transformation MGMT in the liver cancer cell. We found that the IC₅₀ of TZU-01 and BCNU treated hepatocarcinoma are increase. It is indicated that MGMT may be a target gene of TZU-01. Finally, analyze TZU-01 inhibit tumor growth in Xerograft mice model. TZU-01 can inhibit tumor growth significantly and have the dose depended.

Keywords: hepatocarcinoma, synergistic effected, MGMT

壹、前言

本實驗之目的是從中草藥中開發出一種能抑制惡性肝腫瘤生長並且與臨床藥物具有協同作用之抗癌藥物，於體外利用微陣列分析藥物間的交互作用以釐清抗癌機轉。此藥物須在體內外都具有良好之腫瘤生長抑制效果。另外，此藥物的毒性必須是生理可接受。本實驗之研究策略及預定達成之目標如下：

第一年：篩選當歸中藥有效萃取層及純化物 TZU-01 並研究其體外(*in vitro*)作用機轉及合併臨床藥使用之抗癌機轉：

- 一、選擇 5-fluorouracil (5-FU)、doxorubicin、cisplatin、etoposide 等臨床用藥與當歸丙酮層(AS-AE)或 TZU-01 合併使用，進行體外肝腫瘤細胞生物活性測試(MTT cytotoxicity assay)。
- 二、利用”CI method”分析 TZU-01 與臨床藥兩者之間是否具有協同作用(Multiple drug effect analysis)，選擇療效最好及毒性最小之結果進行後續體內外實驗。
- 三、分析 TZU-01 及臨床藥合併使用對惡性肝腫瘤細胞週期(Cell cycle)之影響。
- 四、分析 TZU-01 及臨床藥合併使用對惡性肝腫瘤細胞凋亡(Apoptosis)之影響。
- 五、分析 TZU-01 臨床藥及兩者合併使用之微陣列圖譜(microarray profile)。
- 六、利用微陣列分析結果找尋藥物合併使用之標地基因(target gene)並釐清交互作用。

第二年：建立惡性肝腫瘤化學治療之動物模式(*in vivo*)建立人類惡性肝腫瘤細胞之動物(Nude mice,免疫系統不全)模式並分析 TZU-01 及臨床藥中西藥物合併使用之動物腫瘤生長抑制及存活率分析

- 一、以 PLC-PRF-5、Hep3B、HepG2、JEG-3 等肝癌細胞株植入動物皮下，腫瘤長至 100 mm³ 後在皮下連續注射不同劑量的 TZU-01、臨床藥或是兩者合併治療五天，連續觀察 200 天後比較細胞株注射前後腫瘤大小、細胞毒殺作用及存活率分析，並以免疫染色研究其分子機轉。
- 二、AS-C 與 TZU-01 的生理毒性試驗，其中包括生化儀分析腎功能(BUN、Creatinine)及肝功能(GOT、GPT)及血小板指數等。

貳、材料與方法

一、當歸藥材之選擇及萃取

此實驗之中藥材選擇以現有的、易購得、較便宜的或已有合作的，總之以快速為原則做選擇，利用化學結構之極性不同，萃取不同極性層之粗萃物。藥材之選擇，因與國防大學藥學系張溫良老師實驗室有合作之關係，當歸藥物萃取之初步流程為，將買來之藥材磨粉，以藥粉 2 倍體積之溶劑 Acetone 浸泡，約一天後，將溶劑過濾並濃縮，依此流程萃取 5 次後所得為 Acetone 層(Acetone layer)；再將殘餘物以 Methanol 浸泡，約一天後，將溶劑過濾並濃縮，依此流程萃取 3 次後所得為 Methanol 層(Methanol layer)；最後將殘餘物以水浸泡，約一天後，將溶劑過濾並濃縮，依此流程萃取 1 次後所得為水層(Water layer)，此部分為極性較大之化學成分萃取。

取部分 Acetone layer 溶於 Methanol 中，再以 1:1 比例之 n-Hexane 進行 Partition，重複 3 次並濃縮，所得為 n-Hexane 層(n-Hexane layer)，以濃縮方式將 Methanol 抽除，之後以水溶解再以 1:1 比例之 Chloroform 進行 Partition 重複 3 次並濃縮，所得為 Chloroform 層(Chloroform layer; AS-C)及水草物(Water extract; AS-W)，此部分為極性較小之化學成分萃取。因稍後之實驗結果顯示，當歸為較有效之抑制惡性肝腫瘤生長之中藥，而於動物實驗中，需用大量之當歸粗萃物，所以自己萃取一批大量之當歸。張溫良老師實驗室已經從 AS-C layer 分離出 2 種主成分為 n-Butylidenephthalide (BP, MW: 188.23, E+Z form)及 ligustilide 兩種主成分，以 MTT assay 測試後發現 BP 之抑癌效果較 ligustilide 佳，其對抗惡性肝腫瘤 HepG2 之 IC₅₀ 濃度 20.6 ug/ml，其 IC₅₀ 濃度約只有 AS-C layer 濃度之 1/10；而另一單一純化物 Ligustilide 其對抗惡性肝腫瘤之 IC₅₀> 200 ug/ml 濃度，較無抑制惡性腦瘤生長之效果，所以將選擇 BP 繼續後續實驗。

二、細胞培養及處理(Cell lines and cell culture)

此實驗使用之人類惡性肝腫瘤細胞株為 PLC-PRF-5, Hep3B, HepG2, JEG-3, (ATCC, BCRC, Taiwan)購買這些細胞為正向控制組(positive control group)；小鼠纖維母細胞株 Balb/3T3 (Mouse fibroblast cell line)及小鼠血管內皮細胞 SVEC (mouse vascular endothelia cell line)是購買自生物資源保存及研究中心(BCRC, Taiwan)，此二株細胞為永生化但未癌化之細胞株，視為正常細胞，作為此實驗中藥物對正常株之傷害；人類肝癌細胞株(Human hepatocellular carcinoma cell line, J5, 由台大醫學院 楊照雄教授等建構)。PLC-PRF-5, Hep3B, HepG2, JEG-3, HepG2 此株細胞培養於 10%胎牛血清(Fetal Calf Serum, Biowest, Nuaille, France)之 DMEM(Biowest, Nuaille, France)培養液，如上述。述所有細胞均培養於 5% CO₂ 之 37°C 培養箱

(incubator)中，每日於倒立顯微鏡下觀察細胞生長情形，並定期更換培養液，當細胞長滿時，則以 0.05%胰蛋白酶(0.05% Trypsin, 0.2% EDTA) (Biowest, Nuaille, France)將細胞分離持續培養(maintain)，另外，此實驗之細胞株以先用 Mycoplasma Removal Agent (MRA) (ICN, Osaka, Japan) 0.5 μ g/ml 處理一星期，再大量培養一批細胞，每細胞株冷凍約 50 冷凍管(vial)，冰存於液態氮桶中，此批細胞視為無黴漿菌(Mycoplasma free)污染之細胞，每管細胞解凍後，完成實驗之後即丟棄，再解凍另一管，目的是保持細胞處於相同狀態，並避免 Mycoplasma 再度感染或滋長或細胞過於老化而影響實驗結果。

三、利用 MTT (3- [4,5- dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyltetrazolium bromide)法測試細胞毒性及 “CI method” 分析藥物協同作用

MTT cytotoxicity assay 之基本原理為探測活細胞內粒線體酵素之活性，可將黃色之 tetrazolium salt 代謝而成紫色之 Formazan 針狀結晶，再以 DMSO 完全溶解後即可於 ELISA reader (Labsystems Multiskan MCC/ 340)下讀取吸光值(optical density, O.D. 550nm)，依吸光值之強弱直接代表存活細胞之多寡。測試之細胞先分種於 96 孔盤(96- well plate, Corning) (5X10³ cell/100 μ l/ well)隔天加入不同濃度之預篩選之中藥萃取物處理(若為藥物合併處理組，則將不同藥物先加入培養液中，控制 DMSO 濃度不超過 0.2% 混勻後再加入細胞中)負向控制組(Negative control)部分加入等量之培養基，於 24、48 或 72 小時後先抽去 96 孔盤中所有的培養基之後，隨即加入 100 μ l/well 含 500 μ g/ml MTT(3 - [4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl]- 2, 5- diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, MO, USA)之培養基，而後放入 37 $^{\circ}$ C，內含 5% CO₂ 之細胞培養箱中培養 1 至 4 小時至結晶形成，取出後小心的抽去黃色的 MTT 溶液，然後加入 100 μ l/ well 之 DMSO，以震盪器搖動約 10 分鐘，待 Formazan 結晶完全溶解於 DMSO 中成紫色，以 ELISA reader 於 550nm 波長讀取其吸光值。為了分析藥物協同作用，以藥物 IC₅₀ 為基準，將 BP 與臨床藥以不同濃度，等比例”混合(Ex: BP: Cisplatin=1:1; BP:Ciplatin=1:05; BP:Cisplatin=0.5:1)後進行 MTT 分析，計算細胞存活率(0-100%)後以 CalcuSyn 軟體計算 CI 值，數值大於 1 表示兩者具有拮抗作用(anatagonism)，數值小於 1 表示兩者具有協同作用 (synergism) (Chou and Talaly Adv. Enzyme Regul 22:27-55, 1984)。

四、分析當歸粗萃物及單一純化物 TZU-01 對惡性肝腫瘤細胞週期之影響以 Propidium iodide (PI) 染色法檢測分析細胞週期之變化

PI 染色之基本原理為 Propidium iodide (PI) 染劑可用於染雙股之核酸鏈，當其以嵌合的方式(intercalation)與雙股核酸鏈結合產生紅色螢光(640 nm)，但因其也與雙股的 RNA 鏈相結合，故當用於測量細胞 DNA 時必須將

細胞內之 RNA 移除，藉由 RNase 之加入可達成此目的。測試之細胞先以有效成分分別處理，並於不同時間點以 1X Trypsin and EDTA 將細胞自培養皿(Petri-Dish)打下，再以 PBS 洗一次並計算細胞數為 $0.5-1 \times 10^6$ cell/ 800 μ l/ tube 加入 1 g/ml

RNase (Merck, 64271 Darmstadt, Germany) 100 μ l 及 400 μ g/ml Propidium iodide (Sigma, MO, USA) 100 μ l，使其最終體積為 1 ml，最終濃度 100 μ g/ml RNase 及 40 μ g/ml PI，置入 4°C 冰箱下層避光保存，隔夜後取出於室溫下避光放置 30 分鐘使其回溫，而後以流動細胞分析儀讀(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA) 取其 DNA (FL2) 之含量，並以 CellQuest 軟體分析。

五、DNA的延伸(Extension)和聚合酶連鎖聚合 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 與膠體分析

細胞培養在 10 公分直徑的培養皿直到細胞增生至六分滿，將原培養液吸除後，以 PBS 沖洗細胞，接著加 20 g/ml 濃度的 BP 或 BP 合併臨床藥處理 3 或 24 小時，收集到的細胞利用上述抽取 total RNA 及將之反轉錄成 cDNA (50 pmol 的 oligo dNTP 及 50 pmol 的 random hexamers primer 將 RNA 反轉錄為 cDNA)。然後加入 1 unit ExTaq DNA polymerization、200 M dNTP、2.5 mM MgCl₂ 以及分別加入 Nurr77 (sense: 5'- CGA CCC CCT GAC CCC TGA GTT -3'; antisense: 5'- GCC CTC AAG GTG TTG GAG AAG T -3') Nurr1 (sense: 5'- CGA CAT TTC TGC CTT CTC C -3'; antisense: 5'- GGT AAA GTG TCC AGG AAA AG -3') NOR-11 (sense: 5'- TCT GCC TTC CAA ACC AAA G -3'; antisense: 5'- TGA TGG AAA GTC TGA GGA C -3')及 GAPDH (sense: 5'-TTA GCA CCC CTG GCC AAG G-3'; antisense: 5'-CTT ACT CCT TGG AGG CCA TG-3')並加水至 50 μ l。樣本放置於聚合鏈鎖反應器(GeneAmp PCR System 2400) (Perkin Elmer, USA)後將條件設定為：Denature, 94°C，30 秒；Annealing, 55, 30 秒；Extension: 94°C，60 秒；共進行 30 個循環週期，最後再經過 72°C，10 分鐘降溫至 4°C 以結束反應。所得的 PCR 產物進行 1.5% 洋菜膠電泳分析膠體於 50 伏特的電壓下進行 20 分鐘，之後將膠體置於 EtBr 染劑下染色 10 分鐘，最後膠體利用影像分析系統 Flouro-Chem imaging system (Alpha InnoTech Cooperation) 定量基因量表現的有無與強弱。

六、當歸純化物 TZU-01 與臨床化學藥物合併治療人類惡性肝腫瘤之動物模式

所有實驗之裸鼠(Nude mice)選擇條件如下：選擇 20-30g 重(約 10-12 週)之公的(male)裸鼠(Nude mice)，購買自國家動物中(National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan)並飼養於花蓮慈濟大學動物中心(Laboratory

Animal Center of Tzu Chi University, Hualien, Taiwan), 隨機選擇 6 隻一組。將已處理好之人類肝癌 HepG2 細胞種植 2.5×10^6 細胞至每隻 nude mice (2.5×10^6 cell/ 100 μ l/ mouse) 之皮下(S.C.)。分組：於細胞種植後第 3 天，將 nude mice 隨機分成 4 組，共有控制組(打溶劑: 50 mg/mL propylene glycol and 10 mg/mL Tween-80 in distilled water; Standard Chem. & Pharm., Tainan, Taiwan)、BP 單獨治療組、Cisplatin(或其他臨床藥)單獨治療組及 BP 和 Cisplatin 合併治療組四組，每組 6-8 隻。療程：於細胞種植後之第 4、5、6、7 及 8 天治療，連續治療 5 次。劑量：BP 以 BP-70, BP-150, BP-300, BP-500 mg/Kg /0.1ml/ mouse 之濃度治療配合 Cisplatin (或其他臨床藥) 1 mg/Kg /0.1ml/ mouse 合併治療。治療方式：以皮下治療(給藥位置距離腫瘤之部位約 >1.5 公分之肩背處)方式治療，之後觀察及測量每組老鼠體重及腫瘤生長情形，腫瘤體積計算方式為：長 \times 寬 \times 高 \times $\pi/6$ (mm^3)，於腫瘤體積 >1500 mm^3 時，將老鼠安樂死(以當日作為動物之存活時間)並作組織染色(H&E staining)，觀察腫瘤於體內生長情形。結果數據以平均值 \pm 標準差或標準誤差(Mean \pm SD or SE)之行式表示。統計分析以 Student's t-test 方式分析實驗數據之統計學意義。動物存活率分析以 Kaplan Meier 方式分析。統計結果之 P 值 < 0.05 視為具備統計學上之意義。

七、統計分析：結果數據以平均值 \pm 標準差表示。統計分析以 Student's t-test 方式分析實驗數據之統計學意義，統計結果之 P 值小於 0.05 視為具備統計學上之意義。

參、結果

由當歸丙酮萃取層得到的純物質 TZU-01 已由先前的報告中發現，TZU-01 能抑制腫瘤生長造成細胞凋亡，證實其具有對抗肝癌腫瘤的成效，本實驗為了進一步觀察 TZU-01 與臨床西藥合併使用是否具有協同作用，利用 CI method 分析發現，TZU-01 與臨床烷化劑藥物 BCNU 合併治療對於 HepG2 肝癌細胞株具協同作用(圖一)。此外，能抑制烷化劑藥物的 MGMT，TZU-01 能促使其啟動子的甲基化程度增加，進而抑制其 mRNA 及蛋白質生成，而提高 BCNU 在治療肝癌的效果(圖二、三)。當利用轉殖技術在肝癌細胞中大量表達 MGMT 後，發現肝癌細胞對 TZU-01 及 BCNU 的 IC₅₀ 皆提高(圖四)，因此推論 MGMT 可能是 TZU-01 的標的基因。最後，分析 TZU-01 對抑制皮下肝腫瘤生長之情形，發現 TZU-01 對裸鼠皮下肝腫瘤生長相對控制組而言有明顯的抑制效果，而隨著 TZU-01 劑量愈高效果愈顯著且無明顯的副作用(圖五、六、七)。

肆、討論

由於 MGMT 基因的過度表現是造成腫瘤抗藥性產生的主要原因之一，因此推測 TZU-01 與臨床藥合併治療有機會改善藥物反應率不佳的問題。在本研究中 TZU-01 確實能促使 MGMT 啟動子的甲基化程度增加，進而抑制其 mRNA 及蛋白質生成，而提高 BCNU 在治療肝癌的效果。因此推論 MGMT 可能是 TZU-01 的目標基因，也推測此抗癌機轉可以應用於西藥的合併治療。

伍、結論與建議

以目前結果來看，利用 TZU-01 抑制 MGMT 的表現可能有助於用於臨床西藥的合併治療。

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 CCMP95-TP-030 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

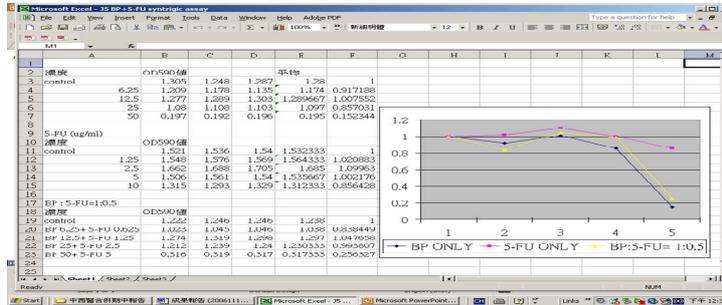
1. Bobbio PE, Porta C, Moroni M. Epirubicin and etoposide combination chemotherapy to treat hepatocellular carcinoma patients: A phase II study. *Eur J Cancer* 33:1784-1788, 1997.
2. Dominguez MH and Gaytan GS. Hepatocellular carcinoma: an update. *Ultrastruct Pathol* 25:497-516, 2001..
3. Major GN and Collier JD. Repair of DNA lesion O⁶-methylguanine in hepatocellular carcinogenesis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5:355-366, 1998.
4. Hu H, Ahn NS, Yang X, Lee YS, Kang KS. Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast. *Int J Cancer* 102:250-3, 2002.
5. Huang YC, Kuo SC, Yen CJ, Yang YK. Systemic combination chemotherapy in a case with metastatic hepatocellular carcinoma. *Formosan J Med* 9:39-46, 2005.
6. Kao ST, Yeh CC, Hsieh CC, et al. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G₀/G₁ arrest. *Life Sci* 69: 1485-96, 2001.
7. Ko WC, Charng CY, Sheu JR, Tzeng SH, Chen CM. Effect of butylidenephthalide on calcium mobilization in isolated rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 50:1365-9, 1998.
8. Ko WC, Liao CC, Shih CH, Lei CB, Chen CM. Relaxant effects of butylidenephthalide in isolated dog blood vessels. *Planta Med* 68:1004-9, 2002.
9. Ko WC, Sheu JR, Leu YR, Tzeng SH, Chen CM. Stereoselectivity of butylidenephthalide on voltage-dependent calcium channels in guinea-pig isolated ileum. *J Pharm Pharmacol* 49:1121-5, 1997.
10. Ko WC, Sheu JR, Tzeng SH, Chen CM. The selective antianginal effect without changing blood pressure of butylidenephthalide in conscious rats. *Planta Med* 64:229-32, 1998.
11. Ko WC. A newly isolated antispasmodic-butylidenephthalide. *Jpn J Pharmacol* 30:85-91, 1980.
12. Nu-Man Tsai, Shinn-Zong Lin, Chau-Chin Lee, Shee-Ping Chen, Hsuan-Chi Su, Wen-Liang Chang, Horng-Jyh Harn. The anti-tumor effects of *Angelicae Sinensis* on malignancy brain tumors *in vitro* and *in vivo*. *Clinical Cancer Research* 11:3475-3484, 2005.

13. Peng S, Qian AR, Yang TH, et al. Experimental study of anti- tumor effects of polysaccharides from *Angelica sinensis*. *World J Gastroenterol* 9:1963-1967, 2003.
14. Teng CM, Chen WY, Ko WC, Ouyang CH. Antiplatelet effect of butylidenephthalide. *Biochim Biophys Acta* 924:375-82, 1987.
15. Yeung-Leung Cheng, Wen-Liang Chang, Shih-Chun Lee, Yao-Chi Liu, Cheng-Jueng Chen, Shinn-Zong Lin, Nu-Man Tsai, Dah-Shyong Yue, Yen CY, Horng-Jyh Harn. Acetone extract of *Angelica sinensis* inhibits proliferation of human cancer cells via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Life Science*. 75:1579-1594, 2004.
16. Yang Y, Lv QJ, Yang BH, Lin RX, Wang SQ. Combined effects of Cantide and chemotherapeutic drugs on inhibition on tumor cells growth in vitro and in vivo. *World of Gastroenterol* 11:2491-2496, 2005.
17. Ye YN, Liu ES, Li Y, et al. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. *Life Sci* 69:637-646, 2001.
18. Ye YN, Liu ES., Shin VY, et al. A mechanistic study of proliferation induced by *Angelica sinensis* in a normal gastric epithelial cell line. *Biochem Pharmacol* 61:1439-1148, 2001.
19. Ye YN, So HL., Liu ES, Shin VY, Cho CH. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. *Life Sci* 72:925-932, 2003.
20. 行政院衛生署中醫藥委員會：肝病研究成果報告彙編第一冊（71-75 年度） 2000 年 5 月
21. 行政院衛生署中醫藥委員會：肝病研究成果報告彙編第二冊（80-88 年度） 2000 年 5 月
22. 行政院衛生署中醫藥委員會：急慢性肝炎 2000 年 12 月
23. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣常用藥用植物圖鑑（一） 2002 年 9 月
24. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣原住民藥用植物彙編（三版） 2002 年 11 月
25. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣中草藥整合與前瞻 2003 年 12 月
26. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣中草藥臨床試驗環境與試驗法規（93 年版） 2004 年 8 月
27. 行政院衛生署中醫藥委員會：行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果彙編（2002-2003） 2004 年 8 月
28. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣中醫藥發展策略與成果：行政院衛生署中醫藥委員會成立 10 週年特輯 2005 年 10 月
29. 行政院衛生署中醫藥委員會：中醫藥基因體研究及其核心技術訓練 DVD 光碟書（一） 2005 年 12 月

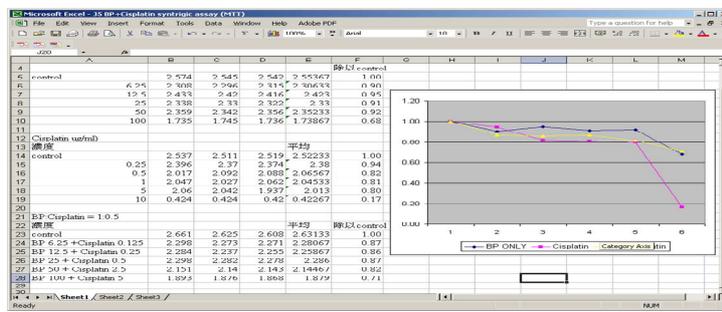
表、圖、圖

Fig. 1

(A)



(B)



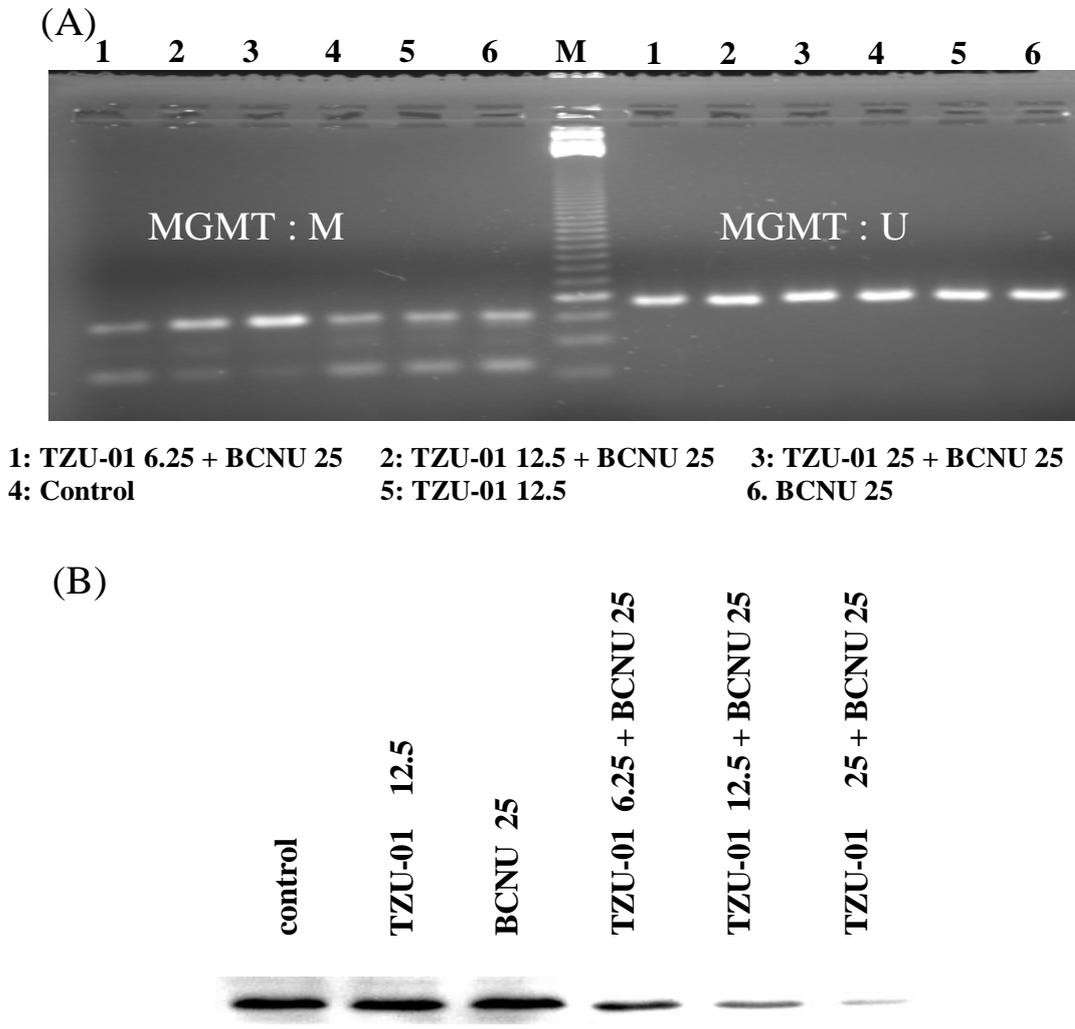
(C)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
2 control		0.989	1.234	1.322	1.337	1.3	1.406	1.364	1.197	1.268625	1
3 6.25		0.379	1.407	1.367	1.293	1.348	1.33	1.4	1.327	1.231375	0.970637501
4 12.5		1.326	1.325	1.301	0.248	1.239	1.313	1.356	1.229	1.182125	0.931815942
5 25		1.05	1.112	1.09	1.07	1.006	1.045	1.026	1.058	1.037125	0.93324067
6 50		0.627	0.735	0.787	0.836	0.803	0.87	0.702	0.716	0.75825	0.597694354
7 100		0.606	0.662	0.634	0.576	0.664	0.669	0.639	0.459	0.613625	0.483692975
8 BCNU uM											
9 control		1.269	1.361	1.382	1.352	1.371	1.416	1.451	1.479	1.68	1
10 12.5		1.292	1.331	1.331	1.298	1.3	1.252	1.26	1.309	1.206625	0.920648734
11 25		1.267	1.333	1.345	1.299	1.251	1.295	1.328	1.313	1.303875	0.825237342
12 50		1.319	1.311	1.472	1.316	1.396	1.404	1.288	1.232	1.34225	0.840525316
13 100		1.173	1.166	1.188	1.167	1.063	1.108	1.162	1.071	1.13725	0.719778481
14 200		0.748	0.715	0.713	0.827	0.875	0.875	0.825	0.717	0.788875	0.488022152
15 (A)											
16 BP (1X) + BCNU (1X)		6.25	12.5	25	50	100	200				
17 BP:BCNU=0.5:1		BCNU (uM)	12.5	25	50	100	200	400			
18 Survival rate (%)			80	72.2	56.1	36.1	24.2	21.3			
19 Lethal rate (%)			20	27.8	43.9	63.9	75.8	78.7			
20 (D)											
21 BP (0.5X) + BCNU (1X)		BP (ug/ml)	3.125	6.25	12.5	25	50	100			
22 BP:BCNU=1:1		BCNU (uM)	12.5	25	50	100	200	400			
23 Survival rate (%)			87.1	76.2	63.6	40.4	28.7	36.1			
24 Lethal rate (%)			12.9	23.8	36.4	59.6	61.3	63.9			
25 (E)											
26 BP (1X) + BCNU (0.5X)		BP (ug/ml)	6.25	12.5	25	50	100	200			
27 BP:BCNU=1:1		BCNU (uM)	6.25	12.5	25	50	100	200			
28 Survival rate (%)			71.9	71.2	64.7	50.8	43.1	36.4			
29 Lethal rate (%)			28.1	28.8	35.3	49.2	56.9	63.6			

CI 值 = 0.4

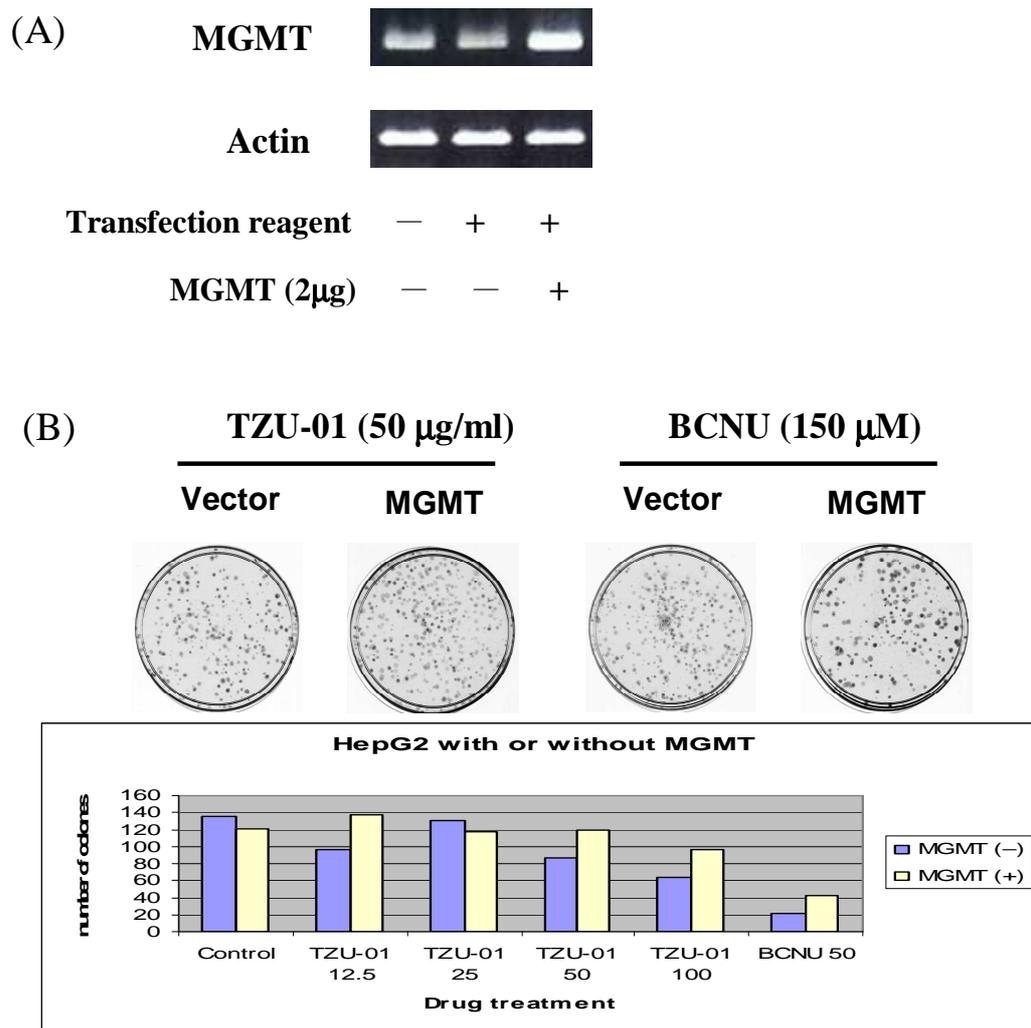
圖一、利用 CI method 進行中西藥物協同作用分析。(A)、(B)TZU-01 與臨床西藥 5-FU 及 Cisplatin 合併治療對於 HepG2 肝癌細胞株不具有協同作用。(C)TZU-01 與臨床西藥 BCNU 合併治療對於 HepG2 肝癌細胞株具協同作用。

Fig . 3



圖三、TZU-01 抑制 MGMT 表達。(A)TZU-01 造成 MGMT promoter 高度甲基化。(B)TZU-01 抑制 MGMT 蛋白質的表現。

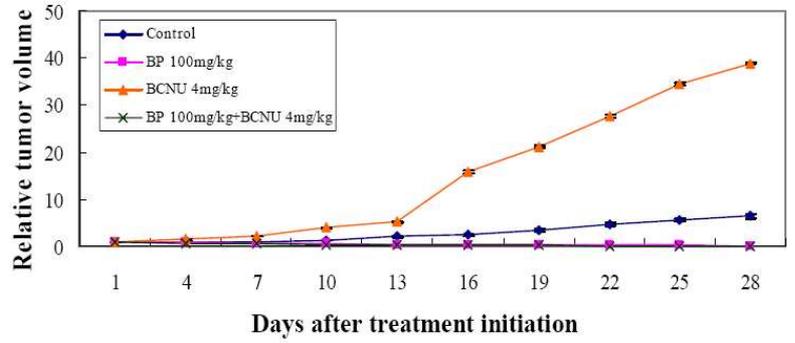
Fig . 4



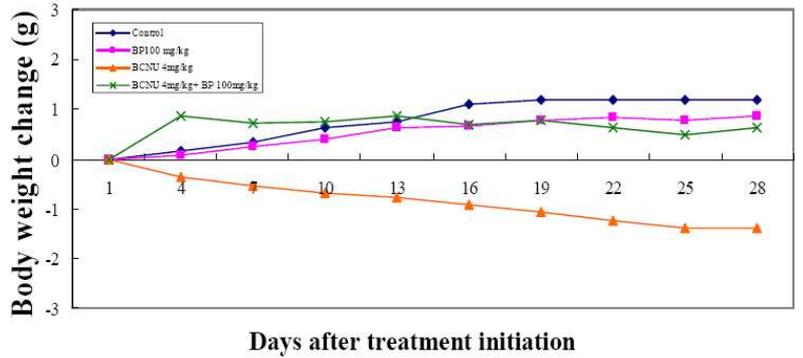
圖四、(A)MGMT 基因轉殖入肝癌細胞株，以 RT-PCR 分析 MGMT 基因表現。(B)轉殖入 MGMT 基因的肝癌細胞株，合併治療後的細胞存活率明顯比未轉殖的高。

Fig. 5

(A)

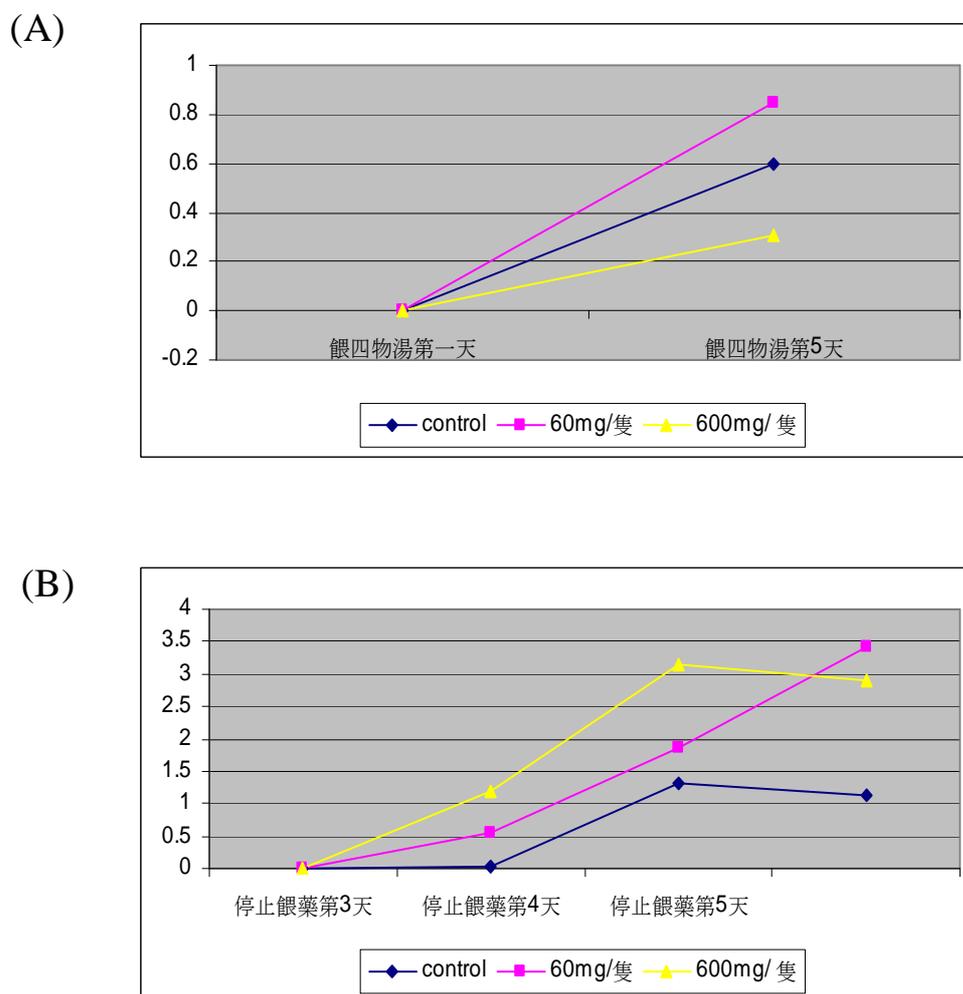


(B)



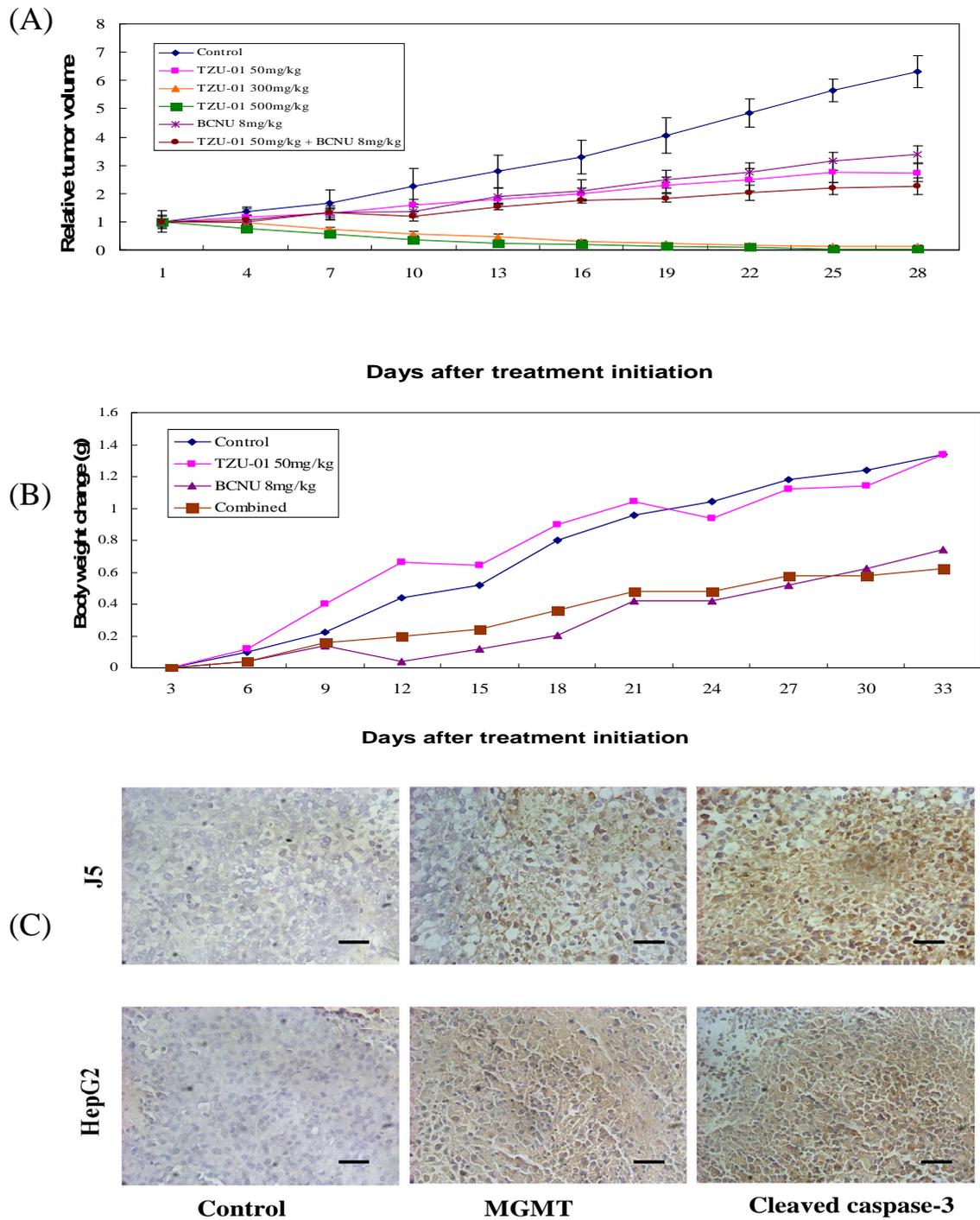
圖五、人類惡性肝腫瘤化學治療之動物模式之建立並評估 TZU-01 治療效果。(A)TZU-01 對裸鼠皮下肝腫瘤生長相對控制組而言有明顯的抑制效果，而隨著 TZU-01 劑量的提高抑制效果愈顯著。(B)TZU-01 對裸鼠無明顯的副作用。

Fig . 6

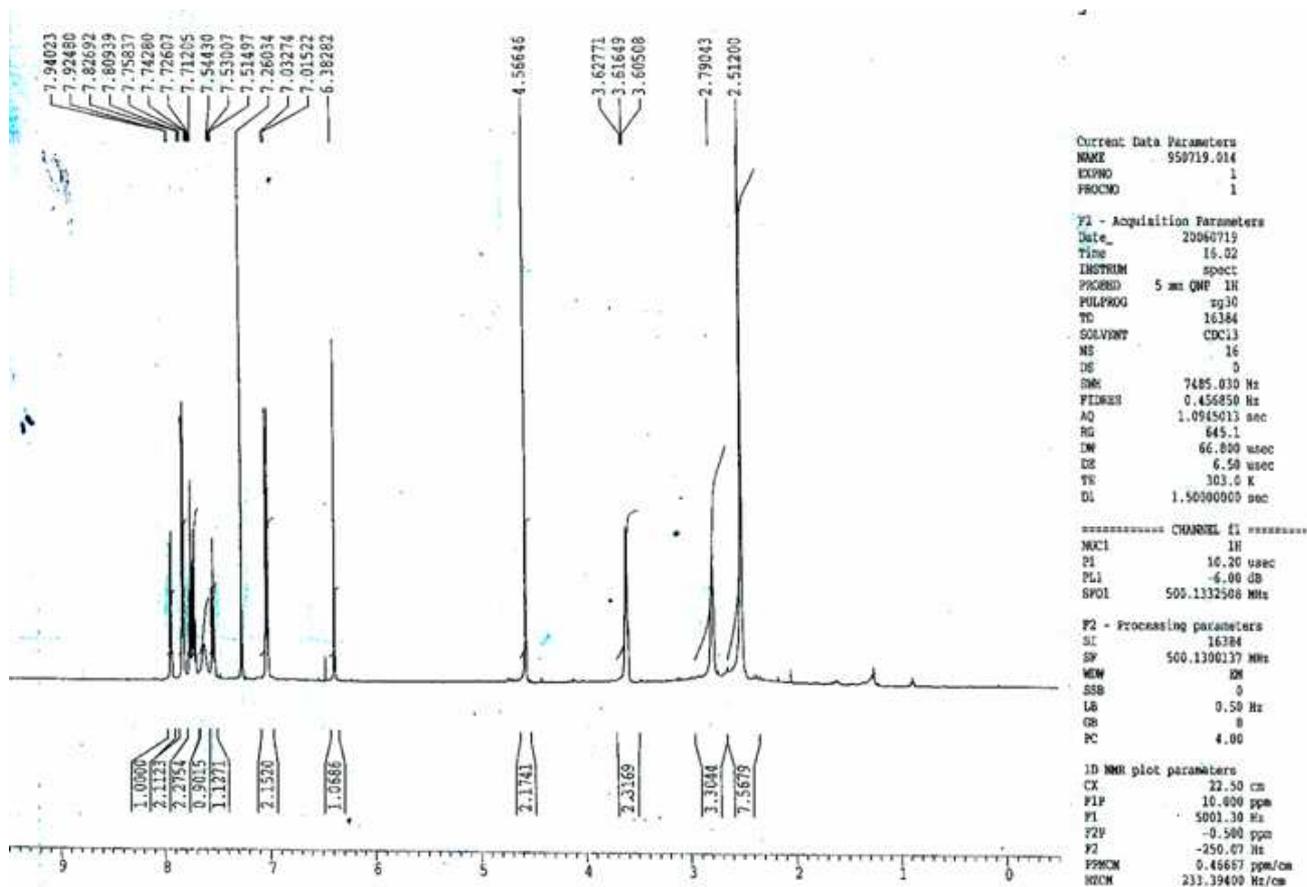


圖六、高劑量當歸萃取物有效抑制裸鼠皮下腫瘤 HepG2。裸鼠皮下注射 2×10^6 HepG2，腫瘤大小約 100 至 250 mm^3 時，經口部餵食當歸萃取物 60 mg/kg (▲)或 600 mg/kg (■)。(A)皮下腫瘤體積變化。(B)裸鼠體重變化。

Fig. 7



圖七、TZU-01 協同 BCNU 抑制肝癌細胞。裸鼠皮下注射 2X10⁶ HepG2，腫瘤大小約 100 至 250 mm³ 時，施打不同劑量合併的 TZU-01 及 BCNU。(A)皮下腫瘤體積變化。(B)裸鼠體重變化。(C)腫瘤組織切片染色。



附圖一、NMR 分析當歸純化物 TZU-01 之氫譜圖