

編號：CCMP95-RD-204

補益類中藥保護幹細胞及影響癌病患腫瘤 細胞之免疫相關之功能基因體研究 (全程總報告)

施子弼

台北醫學大學

摘 要

研究背景及目的：

延續之前探討補益類中藥具保護放射線及癌症化學醫療藥劑壓力傷害的人體正常幹細胞效果分析，本計畫應用既知具正面防護人體幹細胞之補益中藥效用資訊，探討補益中藥對受放射線醫療處理之癌細胞及正常幹細胞影響之差異，尋找中藥輔助癌症醫療應用契機。二年計畫執行期間，分別針對女性乳癌及男性前列腺癌為例，探討此補益中藥對癌症醫療輔佐應用之可能影響。第一年集中於探討補中益氣湯對乳癌組織細胞在物理化學傷害壓力下之影響；第二年探討四物湯(4D)保護人體正常幹細胞作用與對男性前列腺癌癌組織細胞之不同反應中，尋找中藥輔助癌症醫療應用契機。

研究方法：

應用細胞體外初代培養技術觀察細胞存亡或增殖以及其細胞表面標誌及受體等蛋白表達之表型變化。並用RT-PCR、分子微陣列分析評估藥物作用於癌細胞影響其基因表達探討致癌基因、腫瘤抑制基因、細胞凋亡基因、細胞週期基因、前驅細胞早期基因及生長分化訊息傳導基因之表達特性變化。

結果與討論：

本計畫執行成果已完成平行比較分析正常體幹細胞及癌衍生細胞，對補益中藥處理後的細胞及分子級藥理反應發現，補中益氣湯對正常細胞的生長有正面修復或保護效應，反之部份對乳癌衍生細胞則為負面效應。進一步分析其基因表達的變化，則可發現補中益氣湯可促進乳癌衍生細胞高量表現腫瘤抑制及移轉抑制基因，同時也會抑制乳癌衍生細胞表現血管生成相關基因。其對於乳癌細胞可降低BRCA-1及BRCA-2之表現並明顯減少帶有AC133之細胞表形，可增加抑制細胞週期之P27及細胞凋亡基因P53表現。除此之

外，在針對腫瘤轉移基因進行array分析，癌細胞抑制基因PNN及乳癌轉移抑制基因BRMS1其表現量，故其於輔助性治療上可能有正面之輔助放射線治療效用。相對性的觀察補益四物湯劑對不同前列腺癌細胞在RI(放射線)傷害壓力下顯現著不同之反應及效益。在AC133之cell surface marker之分析上，在病患檢體細胞上，則未見相同之影響作用。在基因表現的分析上，補益四物湯劑則抑制PSCA、P27之表現並促進細胞CXCR4表形增加，但其對不同癌細胞表形及細胞株作用亦有所相異。病人細胞檢體研究結果未有一致性的影響。進一步分析發現四物湯在RI(放射線)傷害壓力下對Androgenic dependent之PCC2前列腺癌細胞有明顯的失去修復之加層效益，但對Androgenic independent之前列癌細胞有明確抑制癌細胞之凋亡及促進週期基因Cyclind D等基因表之負面作用，顯示四物湯對個人癌細胞輔助醫療前分子檢測之必要，補益四物湯劑對於前列腺癌之輔助性治療應用上，仍有待探討。除外，我們對六味丸中藥之胞輔助醫可能影響亦作了初步的探討，結果發現六味丸對前列腺癌腫瘤病患細胞在RI(放射線)傷害壓力下亦有增加腫瘤基因PSCA及癌細胞之表面附著相關因子CD44表型之表現等多項負面作用，但在沒RI傷害壓力情況下反之對PCC3前列腺癌細胞有顯著的存活成長抑制效用與對正常幹細胞及未確定癌之前列腺腫病患之保護效益有顯著差異，顯示六味丸之服用效用在於保護正常細胞、防護癌之形成作用但不適用於放射醫療癌症效益，以及病症不同用藥之效果具大差異。四物湯與六味丸均顯示著補益中藥在各個病患細胞保護或修復之效用有顯著之差異。補益類對癌細胞之效用評估亦顯示著癌腫瘤細胞表型多樣性與其對藥物反之個例特異性錯綜複雜，本計畫之研究結果顯示應用細胞初代培養技術及功能基因體評估藥物影響細胞表形及其生理變化之重要性。因其可提供中藥應用於生理維護與組織修復機制及效用有效之論證並在分子藥理解析上可提供個病案例對中藥在個體幹細胞及腫瘤惡性細胞的個病案藥理較完整的資訊，唯各病患細胞表型之多樣性又礙於檢測病例數之有限未能足夠檢體建構補益類中藥應用於癌症醫療輔助之通用效益藥理評估。

關鍵詞：人體間葉幹細胞、乳癌細胞、前列腺細胞、補益類中藥、功能性基因體藥理

Number:CCMP95-RD-204

A Functional Genomic Study of Some Bu-Yi Chinese Herbs' Pharmacologic Effects on Protection of Tissue Stem/Progenitor Cells and Immuno-modulation of Patient's Cancer Cells (Final Report)

Daniel Tzu Bi Shih
Taipei Medical University

ABSTRACT

Aim:

In this proposal study, we proposed to pursue a pharmacogenomic study on Bu-Yi prescription (補中益氣湯) as a radiation therapeutic adjuvant for breast cancer and Su-Wu Tang (四物湯) for prostate cancer patient cells. The aim of this study is to analyze the distinct pharmacogenomic influences of selected Bu-Yi drugs among human normal stem cells, breast cancer and prostate cancer cells under the influence of gamma-ray irradiation stress.

Method:

The molecular pharmacologic effect on the co-cultured cell proliferation and stress/toxicity response in the primary culture of mesenchymal stem/progenitor cells and cancer cells were qualitatively and quantitatively compared at the molecular basis. Specifically, Gene expressions of oncogenes, tumor suppressor genes, apoptotic genes, cell cycle genes, early genes and Notch signal pathway genes were compared by RT-PCR analysis. Stress/toxicity pathway response genes were compared by a Real-time Q-PCR array study. Cell adhesion/interaction molecules and cancer/stem cell markers were analyzed by immunofluorescence stain. Cancer cell secreted factors (such as proinflammatory factor, cytokines and growth factors) were analyzed by cytokine protein array.

Results and Discussion:

In this study, we have compared the cellular and molecular pharmacological influences of the selective Bu-Yi drugs in human mesenchymal stem cells and breast or prostate cancerous cells, under the γ -ray irradiation stress. Most Bu-Yi drugs tested exerts both protective and repair effect to the normal MSCs, including the cell function. In contrast, the irradiation-damage effect of breast cancer cells was

found augment by the Bu-Yi prescription (補中益氣湯). Consistently, tumor suppressor Pinin, and metastasis suppressor BRMS1 genes were found largely increased in breast cancerous cells after the Bu-Yi prescription treatment, under the radiation stress condition. Interestingly, the Bu-Yi prescription was also found diminished expressions of angiogenic factors (such as VEGFR3 and VEGF-A) in breast cancerous cells. Take together, our results presented distinct pharmacogenomic influences of the Bu-Yi prescription on normal stem cell and cancerous cells. This result provides better insights on the potential benefits of the Chinese prescription supplement for breast cancer patient's irradiation therapy. On the prostate cancer drug study, however, our results showed that Su-Wu Tang (四物湯) enhances cell cycle gene Cyclin D expression, and inhibits cell apoptotic genes of prostate cancer patient tumor cells studied under the irradiation stress condition, indicating the negative effect may influence the cancer irradiation therapy. The result also showed that Su-Wu Tang (四物湯) exhibits heterogeneous responses to different prostate cancer patient cells, prostate cancer cell lines and normal MSCs. This phenomenon is also shown in the Lio-Wei Wan (六味丸) study in which it exhibits enhance PSCA gene expression and CD44 cancer cell adhesion molecule of prostate cancer cells or cell lines, but on the other hand presented more preventive and protective effects to the non-cancer detected prostate patient and normal stem cells.

Current study exemplify the benefit of traditional Chinese prescriptions as therapeutic supplements in some cases can be achieved by cell molecular biological analyses. It also warrant that the pharmacological effect is case sensitive and cancer cell phenotype dependent. By analyzed the Bu-Yi Chinese Drug's pharmacologic effect on protection and repair of tissue stem/progenitor during cancer patient tumor cells may benefit for personalized medication in use of Chinese Bu-yi drug as therapeutic adjuvant. This study was supported by NSC national research program (CCMP95-RD-204).

Keywords: Human mesenchymal stem cells, Breast cancer cells, Prostate Cancer cells, Bu-Yi prescription, Pharmacogenomic study

壹、前言

在臨床上，傳統中藥對人體疾病已有廣泛應用，而在許多重大疾病的西醫治療上，中藥亦具有輔助效果，例如目前已知中藥對於輔助癌症化療後的生理系統恢復效果明顯。然而到目前為止，對於中藥在細胞組織生理的影響，了解仍非常有限。而近年來，幹細胞的研究已顯示成體幹細胞具多組織修復再生功能，小自身體日常組織細胞之更新，大至提供個體受傷之組織再生功能，都由幹細胞主導。在人體生理恢復過程中，幹細胞之增殖分化調節顯得格外重要，特別是在組織細胞面對環境壓力時，其幹細胞更是扮演著重要角色。本計畫旨在以系統分子醫學的角度，應用藥物基因體醫學之分析，探討並比較補益類中藥對於正常組織幹原細胞與腫瘤細胞的細胞生理及分子基因層面之影響，並藉而建立補益類中藥對人體組織幹原細胞基因體表達功能影響之資訊。過去的報告中，運用幹細胞技術平台鑑定中藥功效的研究主要偏向於造血幹細胞的研究。例如1990年Ohnishi Y等人利用動物模擬造血受損的模式，發現十全大補湯有促進早期幹細胞群落CFU-S生成的作用，初步鑑定中草藥在活體之效能；接著Fujii Y.等人餵食經放射線照射減低免疫小鼠人蔘養榮湯，發現可以增加血液中幹細胞群落CFU-E、CFU-GM的數量達2-2.5倍；Hsu HY.等人也發現以四物湯餵食免疫缺失小鼠有保護其免疫功能的效果。直到1997年，Hisha, H等人進一步發現十全大補湯具有加速經放射性及癌症化學治療藥物mitomycin C處理後造血受損老鼠之造血能力恢復，而其中當十全大補湯的甲醇萃取物達 $10\mu\text{g/ml}$ 時可增加骨髓白血球系群落大小，並可使群落之數量相對性增加2.11倍。其他由人體中分離出造血幹原／前驅細胞的體外細胞培養的研究如：人參皂(GS)對較晚期的造血幹細胞具有促進增殖作用，能提高紅血球系、骨髓白血球系其前、後期群落形成細胞產率(Maximow et al)，同時具有分泌活性生長因子和類生長因子能力，能在體外協同生長因子，刺激幹原母細胞CD34細胞增殖(Till et al)。然而鮮少有報告是利用貼附性的成體間質幹細胞來探討中藥功效及其藥理機制，特別是許多成體固態腫瘤常是由間葉組織惡化形成。此外，目前也發現固態腫瘤（例如乳癌、前列腺癌）組織中有一群細胞，兼具有腫瘤惡性細胞及幹細胞的特徵，稱為腫瘤幹細胞(cancer stem cells)，目前也推測腫瘤幹細胞可能是癌症轉移或復發的根源。因此利用成體間葉幹細胞及腫瘤惡性細胞探討中藥功效及其藥理機制，應可有助於拓展中草藥於癌病患輔助療程之應用。在過去的研究中，本實驗室已建立數種人體組織幹細胞分離鑑定及培養之平台—從骨

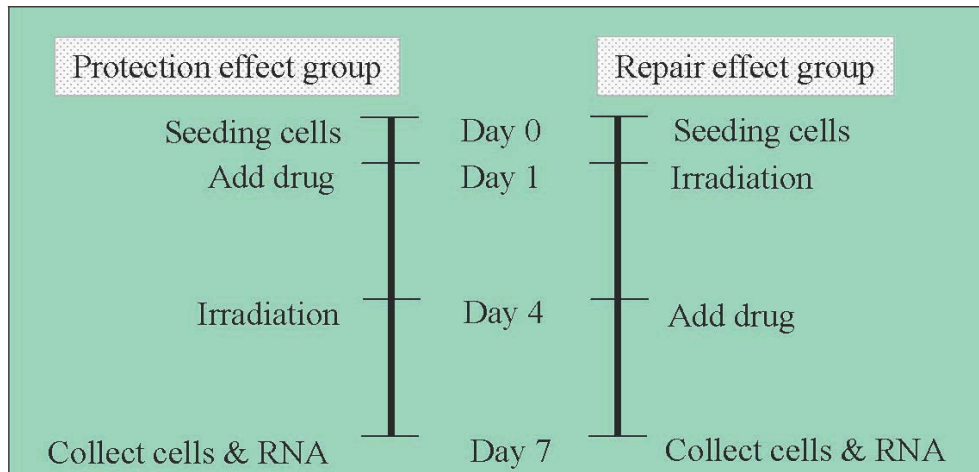
髓、脂肪、臍帶血、包皮、頭皮、羊膜等組織來源分離取得幹細胞，有效率地提供各組織幹細胞之生長、分化及分析檢測。已運用此細胞技術平台於中藥研究之計畫目標分類如下；(1)檢定分析影響造血及間質幹細胞生長及分化等細胞活性之補益中藥效：單方藥材（如黃耆、西洋參、三七、柴胡、紅景天）及複方藥劑（如人蔘養榮湯、十全大補湯及生脈散）等中藥。(2)檢定分析補益中藥對於造血及間質幹細胞受癌症醫療傷害的保護或修復性藥理：單方藥材（如黃耆、西洋參、三七）及複方藥（如補中益氣湯、四物湯及生脈散）等中藥。

本計畫執行重點為針對補中益氣湯、四物湯複方中藥，探討比較此藥方作用於正常幹原細胞（例如：間質幹細胞）與腫瘤細胞（例如：乳癌、前列腺癌初代細胞或細胞株）之細胞生理及分子基因層面之影響異同。同時亦深入研究補益中藥在放射性療程中保護或修復正常細胞、調節免疫系統及對細胞生理影響的異同性。具體上將利用細胞功能基因體學分析探討補益中藥影響前發炎因子、細胞激素、趨化激素、介白素及細胞生長因子等蛋白表達之差異分析，亦進一步研究腫瘤細胞與正常細胞附著分子，細胞間交互作用分子及受體等蛋白表達之功能基因體變化影響之差異。將同時也利用螢光免疫染色、RT-PCR、及定量PCR陣列等技術，探討致癌基因、腫瘤抑制基因、細胞凋亡基因、前驅細胞早期基因及細胞週期基因等基因體之變化。並整合細胞生長及蛋白基因體資訊以完成系統分析，藉此建立評估中藥對於正常體幹細胞及腫瘤惡性細胞生理與功能影響之資訊。本計畫之研究成果，可對中藥在個體幹細胞生理調節上有更完整的資訊，提供補益類中藥應用於癌症醫療輔助效益的評估範例，並提供中藥應用於生理維護與組織修復機制及效用提供更有效之論證。建立一現代化中藥藥理鑑定的新方向，以助中藥之國際化發展。

貳、材料與方法

我們於本計畫執行期間應用下列實驗方法執行研究。

- 一、天然藥物成分萃取及細胞放射線處理：本計畫之方劑將由國家檢驗合格之合作廠商提供標準化方劑進行研究，其製備流程遵守標準操作步驟管理，品管條件亦符合檢驗規定。製備流程及品管條件之詳細內容請參考附件。針對癌細胞給予250 μ g/ml之補益中藥水萃物，放射線劑量皆為900 rad。處理如下圖所示：



- 二、臨床病理資訊及腫瘤組織檢體：由台北醫學大學附設醫院乳癌中心陳清祥、泌尿科江漢聲、陳冠州醫師負責篩選適當臨床病人之乳癌、前列腺癌腫瘤組織檢體及病理評估，傳統醫學科戴承杰主任將負責提供病患中醫輔助療養諮詢。
- 三、人類幹原／前驅細胞及腫瘤細胞之體外培養系統：間質葉幹原／前驅細胞：我們由已建立的人類間質葉幹原前驅細胞，並於特定培養基中長期穩定培養。已知特定細胞表面吸附相關之抗原、受體之表達如CD29、CD34、CD45、Flt1、KDR、Flt-3、CD105、CD44、CD49e、CD49f、CDw90、SH2、SH4及HLA-class I等將由免疫螢光染色法鑑定，並利用分化誘導劑測試其分化為脂肪細胞、骨質細胞及軟骨細胞等多潛能特性。腫瘤細胞：收集臨床醫師所提供的腫瘤組織，經過膠原蛋白酶作用後，以F12或DMEM-low glucose medium加入無血清培養配方培養可貼附於培養皿之細胞，培養至定量細胞數後；除了利用免疫螢光染色分析細胞表面特定表達之抗原標記組成外，並利用RT-PCR鑑定各種腫瘤細胞相關表達基因。
- 四、中藥對於正常幹細胞及腫瘤細胞之體外生長影響：細胞之體外生長影響：我們利用已建立之間質葉幹細胞及腫瘤細胞培養方法，培養

穩定生長之幹細胞及腫瘤細胞培養，將檢測之中藥依不同劑量加入細胞生長培養基中，觀察並統計細胞生長曲線。

- 五、流式細胞儀鑑定細胞表面分子表現：收集經中藥處理之間質幹細胞、初代腫瘤細胞或腫瘤細胞株後，以流式細胞儀鑑定細胞表面受體之變化。將待檢測細胞收集於1XPBS中，加入欲觀測表面分子的單株抗體，避光結合反應後，洗去未結合之抗體。利用流式細胞儀觀察特定表面分子被標定細胞，使用流式細胞儀(fluorescence-activated cell sorting, FACS-Calibus; Becton Dickinson)以及CellQuest software進行定量分析。
- 六、RT-PCR分析比較基因表現特徵：收集細胞以RNeasy mini kit (Qiagen)抽取totalRNA，以反轉錄酵素合成互補DNA，使用基因特异性引子進行PCR反應以分析基因表現特性。
- 七、功能性基因體分析建立：在初步確定特定藥物成分可影響於細胞之生長分化特性後。收集經藥物刺激後之正常細胞及腫瘤細胞抽取total RNA、使用定量PCR陣列盤SuperArray (SuperArray Bioscience Corporation)進行Real-Time PCR assay以分析Stress及Toxicity pathway (APHS-033)等相關基因之變化。利用SuperArray套組所附軟體公式，計算實驗組與控制組之間的訊息差異倍數。
- 八、細胞激素蛋白微陣列：將經中藥刺激培養後之細胞培養基，與未加藥之細胞培養基，利用細胞激素蛋白微陣列(human cytokine array, RayBiotech)，進行蛋白激素表達種類與濃度測定，實驗步驟依據製造廠商操作手冊進行後，將顯影後的冷光感應底片掃後，利用Raybioanalysis tool軟體進行分析以比較細胞受中藥刺激前後所分泌蛋白的差異性。

參、結果

本計畫執行成果已完成平行比較分析正常體幹細胞及癌衍生細胞，對補益中藥處理後的細胞及分子級藥理反應。我們發現補中益氣湯對正常細胞的生長有正面修復及保護效應，反之部份對乳癌衍生細胞則為負面效應。保護組的補中益氣湯可明顯降低乳癌腫瘤細胞（包括初代細胞及乳癌細胞株）的生長速率；而修復組的補中益氣湯可明顯促進正常體幹細胞的生長，對乳癌組織衍生初代細胞雖然沒有影響，但是卻會抑制兩種乳癌細胞株的生長。由此結果推論補中益氣湯對正常體幹細胞與腫瘤異常細胞的生長調控具有相反的藥效。進一步分析其基因表達的變化，則可發現補中益氣湯可促進乳癌衍生細胞高量表現腫瘤抑制及移轉抑制基因，同時也會抑制乳癌衍生細胞表現血管生成相關基因。以 RT-PCR 分析這些細胞的細胞週期調控基因(p27)、腫瘤抑制基因(p53)、乳癌相關基因(BRCA-1,-2,erb-B2)、Notch 訊息傳導相關基因(Notch-2, -3, Jagged-1)，也發現補中益氣湯對正常體幹細胞與腫瘤異常細胞的基因表現會有不同的調控效用。進一步利用定量 PCR 陣列盤，分析比較正常幹細胞及腫瘤異常細胞在受到放射線照射的壓力時，補中益氣湯對細胞的壓力反應基因及細胞毒性基因之影響。結果發現補中益氣湯對保護組的乳癌組織衍生初代細胞，可明顯促進 PNN(pinin)及 BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1) 兩種腫瘤抑制基因的大量表現。然而對保護組的正常體幹細胞的 APC 及 BRMS1 兩種腫瘤抑制基因則略有促進表現的效用。由上述結果可發現補中益氣湯對正常細胞及腫瘤細胞都具有程度不同的調控效果，特別是對乳癌組織衍生初代細胞的腫瘤抑制基因顯示有高強度的促進效果，由上述結果推論於放射線療程前對病人施用補中益氣湯，可能有助於加強放射線對腫瘤細胞之傷害，同時可減少腫瘤細胞轉移或復發之機會。補中益氣湯處理的正常幹細胞及乳癌組織衍生初代細胞中，呈現截然不同的 stress/toxicity pathway 相關基因受調控現象。特別是參與血管新生的相關因子 FLT4 (VEGFR3) 及 VEGF-A，在乳癌組織衍生初代細胞受補中益氣湯刺激後會降低其表現量，反之在正常幹細胞 FLT4 (VEGFR3) 中則為表現量升高，由此結果推論於放射線療程前對病人施用補中益氣湯，對腫瘤組織則可能會有抑制其血管新生之現象，但可能有助正常幹細胞參與組織修復再生之作用。利用細胞激素蛋白微陣列分析補中益氣湯對乳癌組織衍生初代細胞所分泌蛋白的影響，於保護組中，未加補中益氣湯處理的乳癌組織衍生初代細胞本身即可分泌多種血管生成相關因子、生長/分化相關激素、趨化激素、組織重組調控因

子及細胞凋亡受體Fas。加入補中益氣湯處理後，對於乳癌組織衍生初代細胞分泌的蛋白因子種類影響不大，只會略為增加Angiogenin, BDNF, ENA-78, GRO-及Fas的表現量，但是會明顯減少G-CSF的表現量。其中ENA-78 及GRO-可活化吸引嗜中性白血球細胞neutrophils，Fas的表現量增加可能會導致細胞凋亡，G-CSF的表現量降低則可能會減少血管內皮細胞及造血前驅／幹細胞的增生。總論上述結果，加入補中益氣湯處理，對乳癌組織衍生初代細胞與免疫系統之間的旁泌調控機制影響不大，但是可能會影響乳癌組織衍生初代細胞與周邊組織細胞的細胞增殖及凋亡現象。但相對性的觀察補益四物湯劑對不同前列腺癌細胞在RI（放射線）傷害壓力下顯現著不同影響cell surfacemarker之表現，如AC133之表現上，大幅增加但其量隨細胞而異。在基因表現的分析上，補益四物湯劑則抑制P27之表現，雖然在觀察前列腺癌幹細胞PSCA之表現上，補益四物湯劑可降低其表現量，但在不同補益四物湯劑對前列腺癌細胞之影響，雖會降低P27之表現，但也降低癌症抑制基因及幹細胞基因之表現，並促進細胞移動分子CXCR4表形增加，因此對不同癌細胞表形及細胞株作用亦有所相異。病人細胞檢體研究結果未有一致性的影響。進一步分析發現四物湯在RI（放射線）傷害壓力下對Androgenic dependent 之PCC2前列腺癌病患細胞發現有明顯的失去修復之效益。但對Androgenic independent之前列癌細胞有明確抑制癌細胞之凋亡及促進週期基因Cyclin D等基因表之負面作用，顯示四物湯對個人癌細胞輔助醫療前分子檢測之必要因此補益四物湯劑對於前列腺癌之輔助性治療上應用，仍有待探討。除外我們對六味丸中藥對細胞之影響，初步的探討發現六味丸對前列腺癌腫瘤病患細胞在RI（放射線）傷害壓力下亦有增加腫瘤基因PSCA及癌細胞之表面附著相關因子CD44表型之表現等多項負面作用，但在沒RI傷害壓力情況下反之對PCC3前列腺癌細胞有顯著的存活成長抑制效用與對正常幹細胞及未確定癌之前列腺癌病患之保護效益有顯著差異，顯示六味丸之服用效用在於保護正常細胞、防護癌之形成作用但不適用於放射醫療癌症效益，以及病症不同用藥之效果具大差異。四物湯與六味丸均顯示著補益中藥在各個病患細胞保護或修復之效用有顯著之差異。補益類對同病症癌細胞之效用評估亦顯示著癌腫瘤細胞之表型多樣性與其對藥物反之個例特異性錯綜複雜。本計畫之研究結果顯示應用細胞初代培養技術及功能基因體評估藥物影響細胞表形及其生理變化之重要性。因其可提供中藥應用於生理維護與組織修復機制及效用有效之論證並在分子藥理解析上可提供病患案例對中藥在個體幹細胞及腫瘤惡性細胞較完整的資訊，唯各病患細胞表型之多樣性又礙於檢

測病例數之有限，未能有足夠檢體建構補益類中藥應用於癌症醫療輔助之通用效益藥理評估。具體結果各別敘述如下：

- 一、補中益氣湯方劑對乳癌腫瘤組織衍生細胞作用特徵，以及分析其對人類正常間質幹細胞與乳癌腫瘤細胞，在放射線照射壓力下之影響差異。

由女性乳癌患者之腫瘤組織中，分離培養出乳癌腫瘤組織衍生之初代貼附性細胞群，並完成鑑定其細胞特徵—發現其細胞型態（圖一）類似於纖維母細胞狀，其中部分細胞會聚集形成特定的團簇群落特徵；由細胞生長曲線（圖二）可推論乳癌組織衍生初代細胞及乳癌腫瘤細胞株(MCF-7, MDA-MB-231)具有類似的生長速率。利用單株抗體及流式細胞儀分析細胞表面分子特徵（圖三），發現乳癌腫瘤細胞株MCF-7及MDA-MB-231分別為CD44⁺CD24⁺AC133⁺及CD44⁺CD24^{Dim}AC133⁺，而乳癌組織衍生初代細胞則為CD44⁺CD24^{Dim}AC133^{Dim}。因此本計畫中使用成體脂肪組織衍生之間葉幹細胞作為人體正常初代細胞之代表，乳癌組織衍生初代細胞作為人體腫瘤初代細胞之代表，而MCF-7及MDA-MB-231則分別為Estrogen-dependent及Estrogen-independent的乳癌腫瘤細胞株。

本計畫為探討補中益氣湯方劑在放射性療程中兼具保護及修復正常組織幹細胞之補益功效，與對腫瘤異常細胞影響之差異比較。因此將補中益氣湯之效用分成保護組及修復組兩組進行實驗（圖四）。於保護組中是先加藥物處理後，再以放射線照射處理；反之於修復組中是先以放射線照射處理後，再加藥物處理。初步比較兩組實驗中的細胞生長速率（圖五），可發現在保護組實驗中，補中益氣湯對正常體幹細胞的生長速率無影響，但是可明顯降低乳癌組織衍生初代細胞及乳癌細胞株的生長速率；而在修復組實驗中，補中益氣湯可明顯促進正常體幹細胞的生長，對乳癌組織衍生初代細胞雖然沒有影響，但是卻會抑制兩種乳癌細胞株的生長。因此藉由此體外正常細胞及腫瘤異常細胞的藥物研究模式，進一步研究乳癌病患於放射性療程中，輔以補中益氣湯是否可能對正常細胞具保護修復作用及腫瘤異常細胞形成負面影響。

利用RT-PCR探討補中益氣湯對致癌基因、腫瘤抑制基因、細胞凋亡基因、細胞週期調控基因、Notch訊息傳導相關基因、幹細胞早期基因表達之影響。

- (一) 細胞週期調控基因 (圖六)：於保護組中MCF-7及MDA-MB-231乳癌細胞株受放射線處理時其p27表現量會下降，但是若先加入補中益氣湯則可維持p27表現量，對正常體幹細胞及乳癌組織衍生初代細胞則無明顯影響。四種細胞的p21及cyclin D於保護組及修復組中則無明顯變化。
- (二) 細胞凋亡基因 (圖七)：與正常體幹細胞相比較，Bcl-2在乳癌組織衍生初代細胞的表現量偏低。同時於保護組中的放射線處理也會導致正常體幹細胞、乳癌組織衍生初代細胞及MCF-7的Bcl-2基因表現量下降，但是補中益氣湯於兩組實驗的四種細胞中，對Bcl-2, Bcl-Xl及Bax的基因表現量都無明顯影響。
- (三) 腫瘤抑制基因 (圖八)：與正常體幹細胞相比較，p53在MCF-7及MDA-MB-231乳癌細胞株的表現量偏低，於修復組中的MCF-7及MDA-MB-231加入補中益氣湯反而會降低p53的表現量。PTEN在MDA-MB-231乳癌細胞株的表現量偏低，但是在受到放射線處理後可提高其表現量。四種細胞的PTEN及RB基因表現量於保護組及修復組實驗中都不會受到補中益氣湯的影響。Q-PCR Superarray所檢測的84個基因中亦包含了PTEN及p53基因，檢測結果與RT-PCR的結果相互符合，亦即乳癌組織衍生初代細胞及正常體幹細胞在受到補中益氣湯處理後，PTEN及p53基因的表達量均未受到明顯影響。
- (四) 致癌基因 (圖九)：MDA-MB-231只有表現BRCA-1, -2而不會表現Her-2, EGFR及erb-B2等基因，其他三種細胞 (包括正常體幹細胞、乳癌組織衍生初代細胞及MCF-7) 會表現所有的腫瘤相關基因。本組基因於細胞中的表現量常在受放射線刺激後明顯下降，其中包括正常體幹細胞的BRCA-1基因，乳癌組織衍生初代細胞的BRCA-1, -2及EGFR基因，MCF-7的EGFR基因。反之，唯有MDA-MB-231的BRCA-1, -2, Her-2, erb-B2等基因卻是在受放射線刺激後會明顯增加。

補中益氣湯於乳癌組織衍生初代細胞的保護組中會進一步降低erb-B2的表現量，在修復組中會進一步降低BRCA-1的表現量；補中益氣湯於MDA-MB-231的修復組中會進一步提高BRCA-2的表現量；補中益氣湯於MCF-7的保護組中也會進一步提高BRCA-2 的表現量；反之，於正常體幹細胞中，補中益氣湯對此類基因則無明顯的影響效果。

(五) 幹細胞早期基因 (圖十)：BMP-2, -4, Sox-2, Rex-1及Oct-4共計五種幹細胞早期相關基因中，Sox-2在正常體幹細胞及乳癌組織衍生初代細胞中的表現量都很低。在受到放射線處理後，乳癌組織衍生初代細胞的Sox-2, Rex-1表現量會明顯下降，MDA-MB-231的BMP-4基因則會明顯增加。但是補中益氣湯對這四種細胞的幹細胞早期相關基因都無明顯的影響效果。

(六) Notch訊息傳導相關基因 (圖十一)：此類相關基因包括四種Notch受體(Notch-1, -2, -3, -4)，五種Notch結合子(Delta-1, -3, -4, Jagged-1, -2)及Notch訊息反應基因(Hes-1)。其中Notch-1, -4, Delta-3, -4在四種細胞中都無表現。Notch受體中，Notch-2於四種細胞中都有表現，但是Notch-3於MDA-MB-231則無表現。Notch結合子中，乳癌組織衍生初代細胞不會表現任何的Notch結合子，正常體幹細胞則只會表現Jagged-1, MCF-7 只會表現Jagged-2，但是MDA-MB-231則會表現Jagged-1及Jagged-2。由上述結果中可發現這四種細胞的Notch訊息傳導相關的基因種類差異性非常大。在受到放射線照射處理後，正常體幹細胞的Jagged-1基因及

MCF-7的Notch-2基因均會明顯下降。補中益氣湯會進一步導致正常體幹細胞及乳癌組織衍生初代細胞在修復組中的Notch-2, -3基因表現量下降；也會導致MCF-7在保護組中的Notch-3基因表現量下降；但是補中益氣湯卻只會提高正常體幹細胞的Jagged-1表現量。

簡言之RT-PCR分析結果可發現，補中益氣湯對正常體幹細胞與腫瘤異常細胞的細胞週期調控基因(p27)、腫瘤抑制基因(p53)、致癌基因(BRCA-1,-2, erb-B2)、Notch訊息傳導相關基因(Notch-2, -3, Jagged-1)會有不同的調控效用。

以人類幹細胞及乳癌腫瘤細胞之分離及培養系統，以免疫染色法研究補中益氣湯細胞對於附著分子及細胞表面標記蛋白表達之影響。

於保護組實驗中，放射線照射會促使正常體幹細胞、乳癌組織衍生初代細胞及MCF-7的CD44表現量降低 (圖十二)，但對MDA-MB231則無明顯影響。但是所有細胞先行以補中益氣湯處理都無明顯影響。如圖十三結果所示，補中益氣湯會促進MCF-7細胞的CD24⁺細胞比例增加，於其他三種細胞中則無明顯影響。如圖十四結果所示，放射線照射會促使所有四種細胞的CD133早期幹細胞標記的表現量降低，而補中益氣湯則會進一步降低正常體幹細胞，

乳癌組織衍生初代細胞及MDA-MB-231的CD133⁺細胞比例。由過去的研究已得知，乳癌細胞中有一群細胞兼具有腫瘤細胞及幹細胞的特性，故稱為腫瘤幹細胞(cancer stem cell)，此類細胞的特徵為CD44⁺CD24⁺或CD133⁺。於本研究中則發現補中益氣湯可提高MCF-7的CD24⁺細胞比例，也會降低正常體幹細胞，乳癌初代細胞及MDA-MB-231的CD133⁺細胞比例。由此結果推論補中益氣湯可能具有促進細胞分化的功效。

利用定量PCR陣列套組，探討並比較補中益氣湯對於人類幹細胞及乳癌腫瘤細胞的分子藥理分析。

進一步比較正常幹細胞及腫瘤異常細胞在受到放射線照射的壓力時，補中益氣湯對細胞的壓力反應基因及細胞毒性基因之影響。我們選用Stress & Toxicity pathway基因套組的定量PCR陣列盤，比對保護組中正常體幹細胞（圖十五）及乳癌組織衍生初代細胞（圖十六）的基因表現量變化差異。加入補中益氣湯後對乳癌組織衍生初代細胞影響效果極為明顯的基因包括：(1)可加強的PNN基因表現量達1294倍，PNN (pinin)是一種類似於Desmosome的細胞附著蛋白，推測其功能可能是一種腫瘤抑制蛋白(tumor suppressor) (Shi et al)；(2)可加強的BRMS1基因表現量達154倍，已知BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1)是一種可抑制乳癌腫瘤細胞惡性移轉的蛋白(Meehan et al)。其他會受補中益氣湯影響，但是改變量較小的基因(1.5~7倍)包括：

- (一) MMP蛋白：正常體幹細胞的MMP-7, -9, -10, -11, -13受補中益氣湯影響會降低表現量；但是乳癌組織衍生初代細胞的MMP-7, -9受補中益氣湯影響會提高表現量，MMP-10則會略為下降。
- (二) FLT4受補中益氣湯影響會增加表現量，IL8RB及RORB會降低表現量；乳癌組織衍生初代細胞的TSHR，CXCR4受補中益氣湯影響會提高表現量，但是FLT4的表現量反而下降。
- (三) 細胞激素：正常體幹細胞的CCL7 (MCP-3)及IL18受補中益氣湯影響會增加表現量；乳癌組織衍生初代細胞的IGF1及VEGF-A受補中益氣湯影響則會降低表現量。
- (四) 正常體幹細胞的CDH1 (E-cadherin)受補中益氣湯影響會提高表現量；乳癌組織衍生初代細胞的CDH6 (K-cadherin)受補中益氣湯影響會提高表現量，但是ITGB3 (Integrin 3)、MCAM、CD82的表現量都會減少。

(五) 腫瘤形成相關蛋白：正常體幹細胞的APC(腫瘤抑制蛋白)受補中益氣湯影響會提高表現量，SRC則會降低表現量；乳癌組織衍生初代細胞的TP53受補中益氣湯影響也會降低表現量。

(六) HPSE (Heparanase)的表現量受補中益氣湯影響後，在正常體幹細胞會提高，但在乳癌組織衍生初代細胞則反而會降低。以人類幹細胞及乳癌腫瘤細胞之分離及培養系統，利用細胞激素蛋白微陣列或酵素連結免疫吸附分析法探討補中益氣湯對於前發炎因子、細胞激素、趨化激素、介白素及細胞生長因子等蛋白表達之影響。

利用細胞激素蛋白微陣列分析補中益氣湯對乳癌組織衍生初代細胞所分泌蛋白的影響，如圖十七所示，於保護組中，未加補中益氣湯處理的乳癌組織衍生初代細胞本身即可的乳癌組織衍生初代細胞可分泌血管生成相關因子(包括Angiogenin, VEGF, VEGF-D)，生長分化相關激素(包括BDNF, HGF, EGF, GM-CSF, G-CSF, IGFBP4, IL-6)，趨化激素(包括IL8, MCP-3, ENA-78, GRO-)，及組織重組調控因子(TIMP-1, -2)及細胞凋亡受體Fas。補中益氣湯對於乳癌初代細胞分泌的蛋白因子種類影響不大，只會略為增加Angiogenin、BDNF、ENA-78、GRO- 及Fas的表現量，但是會明顯減少G-CSF的表現量。

二、針對四物湯(4D)、六味丸(6D)等補益中藥在放射線照射(RI)傷害壓力下對幹細胞及前列腺癌腫瘤細胞之功能基因體影響之藥理差異作探討。

具體上經由正常幹細胞(PLA)與癌腫瘤細胞作各別培養、探討細胞表型螢光檢測、基因表達分析(RT-PCR或定量PCR)、以及微陣列蛋白分子變化鑑定分析等比較實驗。我們針對四物湯、六味丸等補益中藥在放射線照射壓力傷害下對於前列腺癌腫瘤病患細胞及癌腫瘤細胞株(例如PC3及DU145)之細胞表型、基因體【腫瘤基因(例如：erbB2, Muc1)、腫瘤抑制基因(例如：p53, Rb, PTEN, BRCA, p16^{INK4a}, p19^{ARF})、細胞凋亡基因(例如：Bcl2, BclXL, Bax)、細胞週期基因(例如：p21, p27, cyclin D)及前驅細胞早期基因(例如：BMP4, Sox-2, Rex-1及Oct-4)】以及120種之人體細胞激素蛋白體等影響作藥理對比差異之探討。其結果顯示如下：

(一) 細胞層次之藥物影響差異 幹細胞(e.g. BM-MSCs, PLA-MSCs)生長及分化，造血幹細胞(HSCs)分化紅血球系及髓性血球細胞系群落生長數量，其中尤其是以晚期紅血球群落(CFU-E)及

顆粒性血球細胞系群落(CFU-G)之補益作用最為明顯。本期研究以PLA-MSCs (PLA)為正常對照組探討兩種前列腺癌細胞株(PC-3,DU-145)及三個前列腺癌患者初代培養之腫瘤細胞(PCC1, PCC2及PCC3)探討補益中藥四物湯(4D)及六味丸(6D)在有無RI傷害壓力下之影響差異作比對實驗。其結果如下所述加註於Appended之圖及表：

*在正常狀態(RI-)下4D及6D對前列腺癌細胞及正常幹細胞存活數之影響比較影響培養細胞存活數均稍有促進增殖傾向但差異不很顯著。

*在受放線之照射傷害之細胞保護(protection)或修復(Repair)實驗，各組細胞存活數之反應差異顯然有別（加註圖一、二）。

四物湯(4D)對DU145及PCC2有同時抑制保護及修復癌細胞之存活率。對PCC2以及PC-3細胞顯示抑制其存活但其因由有待探討。4D對PCC3之P、R組細胞癌基因PSCA、BRCA及Bcl-2等基因表達抑制之正面效應。

六味丸(6D)在RI壓力狀態下對PCC3癌細胞之修復有顯著的促進作用之負面反應（加註圖三）。

(二) 基因體影響之藥理差異 D組：只有投以藥物(D) P組：先投以藥物再照放射線(P) R組：先照放射線之後再投以藥物(R)

*腫瘤基因：四物湯會降低PSCA的表現【PCC3(D、P)、PCC1(P、R)】，並降低BRCA-1的表現【PCC3(R)】、降低BRCA-2的表現【PCC-3(P)、PCC1(R)、PCC2(P)】。六味丸會增加erbB2基因表現【PCC1(R)、DU-145(D、P)】，也會增加PSCA表現【PC-3(D)】，和BRCA-1的表現【DU-145(D)】，和BRCA-2的表現【PCC-2(R)、DU-145(D)】。

（圖十八～圖二十二），由實驗可知，六味丸促進腫瘤基因的表達，但四物湯則多為抑制作用。但在無照放射線之下，六味丸則增加PCC3細胞PTEN (cancer inhibit gene)表現（圖二十三），顯示若單獨投以六味丸沒有照射放射線時，就會抑制癌症。另外，沒有照放射線的情況下，投以六味丸和四物湯均會抑制正常幹細胞(PLA)和大多數癌細胞生長。

*細胞凋亡基因：四物湯會增加Bax的表現【PCC3(R)、PLA(P)】，以及BclXL表現量【PCC3(P)、PLA(D)】（圖二十四），但會降低PCC3(D)未受放射線壓力組別之Bax表現（圖二十五）；六味丸對PLA細胞影響上有降低Bax表現【PLA(P)】，降低BclXL【PCC2(D、P)】（圖二十六），但會增加DU-145(D、P)及PLA(D、P)之BclXL表現（圖二十七）。

*細胞週期基因：四物湯可降低PCC1(P)、PCC2(R)之P27表現，增加PLA(R)之P21表現（圖二十八）；六味丸會降低PCC3(R)之P21表現，但對PLA則沒有影響（圖二十九），表示四物湯在RI醫療有加成效果之輔佐醫療效應。六味丸會降低CyclinD的表現【PLA(P)、DU-145(P)、PCC2(P)】，所以會降低其細胞週期的進行（圖三十）。

*前驅細胞早期基因：四物湯會降低BMP-2【PCC3(P)】，BMP-4【PLA(R)】，EGF-R【PLA(P)】這三種基因表現（圖三十一）；六味丸亦對PCC2(D)，DU145(R)，PC-3(R)之EGFR表現降低(圖三十二、三十三)，但是【PCC3(D)、DU145(R)】BMP-2基因表現增加，PC-3(P)之BMP4表現增加（圖三十三）。故四物湯在RI+下對癌細胞和PLA之早期基因作用上大致有降低早期基因表現之作用。而六味丸雖未有一致性效果，但也降低EGFR的表現。

(三) 由免疫染色法研究四物湯對於正常體幹細胞，前列腺癌腫瘤細胞初代細胞及細胞株(例如PC3及DU145)之表面附著相關分子(例如：ICAM, VCAM, integrin, MMP)，細胞間交互作用分子(例如：Hedgehog, Notch, Wnt)及受體蛋白表達之影響。本項執行目標將可探討細胞之間及細胞組織間的交互訊息，藉此可分析藥物調節組織細胞表型及功能。

*表面附著相關分子：四物湯會少許提升檢體細胞之CXCR4及AC133，在PLA方面則明顯減少CD44表現，但微量增加intergrin $\alpha 2 \beta 1$ 之表現（圖三十四）；六味丸會顯著增加PCC2之EGFR、PCC3之CD44之表現量增加PLA之 intergrin $\alpha 2 \beta 1$ 表現，對PC3之EGFR則些減少其表現量（圖三十五），但作用效果待確認。因此四物湯無顯著影響癌細胞表現相關分子之表達比例；而六味丸則增加癌細胞之表面附著相關因子之表達，效果較偏向於負面作用。

- (四) 基因毒性安全性評估：基因毒性試驗有助於預測試驗物質的致癌性，且有助於致癌性試驗的結果分析，試驗可分為體內(in vivo)與體外(in vitro)測試。為偵測試驗物質直接或間接引發的基因傷害及程度，在本次的試驗中我們選擇生物基因突變分析—沙門菌回復突變測試法：(Salmonella/Microsome Reversion Assay: Ames Test)，來做初步的試驗。實驗結果顯示，六味丸並不會誘發沙門氏菌之逆突變作用。我們初步結論六味丸在本實驗濃度與條件下不具致基因毒性作用。（如附加Summary II 註圖及表）
- (五) 由細胞激素蛋白微陣列可廣泛篩選四物湯成份，對於正常體幹細胞，前列腺癌腫瘤細胞初代細胞及細胞株(例如：PC3 及 DU145)分泌前發炎因子(例如：GRO, PARC, RANTES, ENA-78, MIP-1, MIP-3, MCP1~4, MSP等)、細胞激素(例如：IFN, Leptin, BMP, FGF, G-CSF, GM-CSF, oncostatin M等)、介白素(例如：IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12等)、細胞凋亡調控因子(例如：TNF, Fas, OPG, TRAIL等)及細胞生長因子等蛋白表達之影響。由正常體幹細胞及前列腺癌腫瘤細胞DU145對4D及6D之分泌細胞激素群作比照如註圖及表新述，4D刺激分泌較多種蛋白表達，唯在六味丸對DU-145唯有刺激之一Leptin分泌抑制。

肆、討論

最近的研究報導顯示幹細胞及癌細胞之動能活性及分化轉化走向，大受其後天微環境的刺激、誘導影響。癌症放射線治療雖可大量的摧滅其腫瘤細胞，但其副作用不但同時傷害了正常組織細胞及其幹原細胞，更會加強活化未摧毀的癌細胞之活性。相對的近來Duenas-Gonzalez's研究團隊在PloS ONE報導中顯示，應用DNA-methylation & histone deacetylase抑制劑可再活化乳癌病人之腫瘤細胞諸多基因之表達，其廣泛的含括細胞增殖、分化、凋亡、轉移、侵犯腫瘤細胞之免疫相關基因。相對的MaryHendrix於今年2007年4月美國華盛頓舉行的ExpBiology Symposium中報導，應用正常胚胎微環境物質可將具凶悍之癌細胞改變為較為正常無害之惰性細胞，顯示著後天環境化學刺激已顯示可將轉移活性的癌細胞轉化為惰性的無害細胞。因此本計畫採用溫和的補中益氣湯來減緩癌腫瘤細胞放射治療，同時傷害正常組織幹原細胞副作用之輔助醫療的策略，是有理可循的。如Summary II-2圖所示，本計畫研究發現補中益氣湯在放射線傷害壓力下，可減低乳癌細胞之存活率，其作用機制可經由降低癌細胞轉移及乳癌基因(如BRMS1、BRCA-1、BRCA-2)之表現；增加癌細胞抑制基因之表現，如PNN。同時增加細胞壞死蛋白之表現，如TNF- α 、P53。四物湯則具降低受放射線傷害前列腺癌細胞株之幹細胞表面分子(如AC133)、促細胞移動分子(如CXCR4)之表現。同時四物湯會減少細胞週期(如P27)、細胞凋亡基因(如Bax)、癌細胞抑制基因(如BRCA 2)及幹細胞基因(如BMP2、PSCA)之表現。

相較於本實驗室之前探討補中益氣湯對受放射線壓力處理之正常人體間直幹細胞(MSC)影響指出，補益一號能大量增加受放射線傷害MSC之P53和CXCR4表現，以修復受損細胞或使傷害細胞死亡，並增加細胞間之communication。而本實驗，以同樣方法針對癌細胞進行探討，發現此在乳癌細胞中有同樣之效果，至於深入研究或相關之signal pathway仍有待進一步研究。

本計畫研究結果顯示補中益氣湯在有無放射線傷害壓力下對正常組織幹細胞與不正常之乳癌病患初代培養細胞或細胞株均有不同之藥理反應。驗證著中藥對癌症後生環境應用醫療上之可循契機，更進一步對癌轉移影響機制特定提供更好之證據機會。

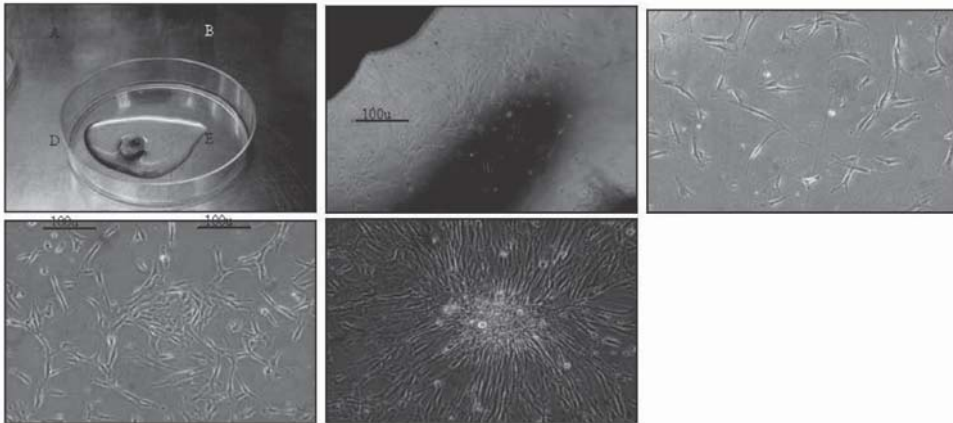
伍、結論與建議

本計畫執行成果已完成平行比較分析正常體幹細胞及乳癌衍生細胞，對補中益氣湯的細胞及分子級藥理反應。其中包括放射線壓力下的細胞生長狀況，研究發現補中益氣湯對正常細胞的生長有正面效應，反之對乳癌衍生細胞則為負面效應。分析所表達的基因則可發現補中益氣湯可促進乳癌衍生細胞高量表現腫瘤抑制及移轉抑制基因，同時也會抑制乳癌衍生細胞表現血管生成相關基因。分析其激素蛋白表達差異性時，也可發現補中益氣湯會影響乳癌組織衍生初代細胞對周邊其他組織細胞的調控效用。綜合前述結果也可發現補中益氣湯對正常體幹細胞及乳癌衍生細胞具有不同的影響效應。未來研究可進一步以動物活體實驗或是臨床試驗，驗證在放射線療程前服用補中益氣湯，對乳癌組織是否具有降低復發或減少移轉，對正常體幹細胞是否有促進再生修復的功效。

漢方補益中藥在各癌症病患間之效果各有不同，可能依各癌細胞間之表形不同有著不同影響。而本實驗選用之補中益氣湯，有顯著受用於乳癌病患輔佐醫療劑之潛能。本計畫研究針對四物湯及六味丸兩補益中藥輔佐前列腺癌細胞受放射線傷害及細胞保護、修復效應與對正常組織間質幹細胞反應之異同比較，做系統性之細胞及其功能基因體變化比對。如於Summary總括表所顯示，兩補益中藥對五種前列腺癌細胞(二種細胞株：DU-145、PC-3，三種癌病患細胞：PCC1,PCC2,PCC3)和正常幹細胞(PLA)之存活生長、表型及基因表達變化。

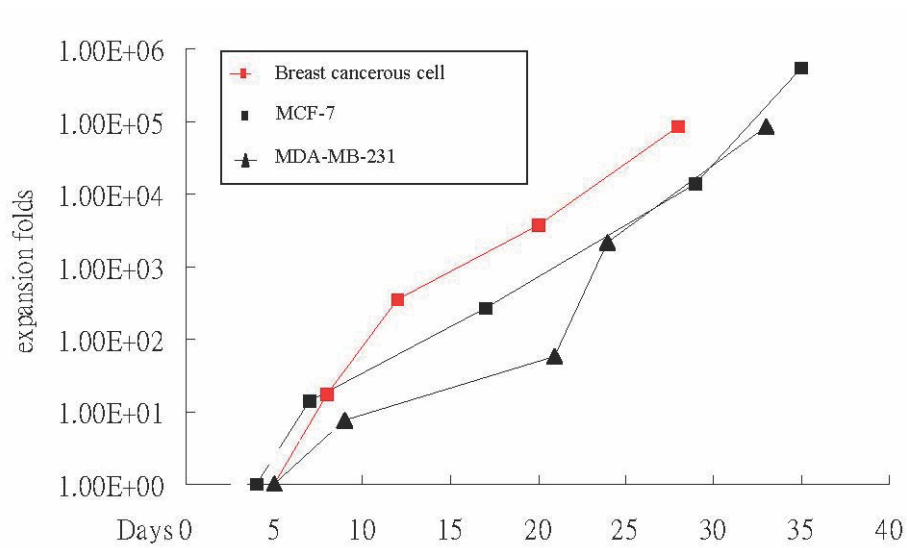
本計畫之研究成果，可對中藥在個體幹細胞及腫瘤惡性細胞的藥理調節上有更完整的資訊，提供補益類中藥應用於個人化癌症醫療輔助效益的評估範例，並提供中藥應用於生理維護與組織修復機制及效用提供更有效之論證。建立一現代化中藥藥理鑑定的新方向，以助中藥之國際化發展。

陸、圖表(乳癌)



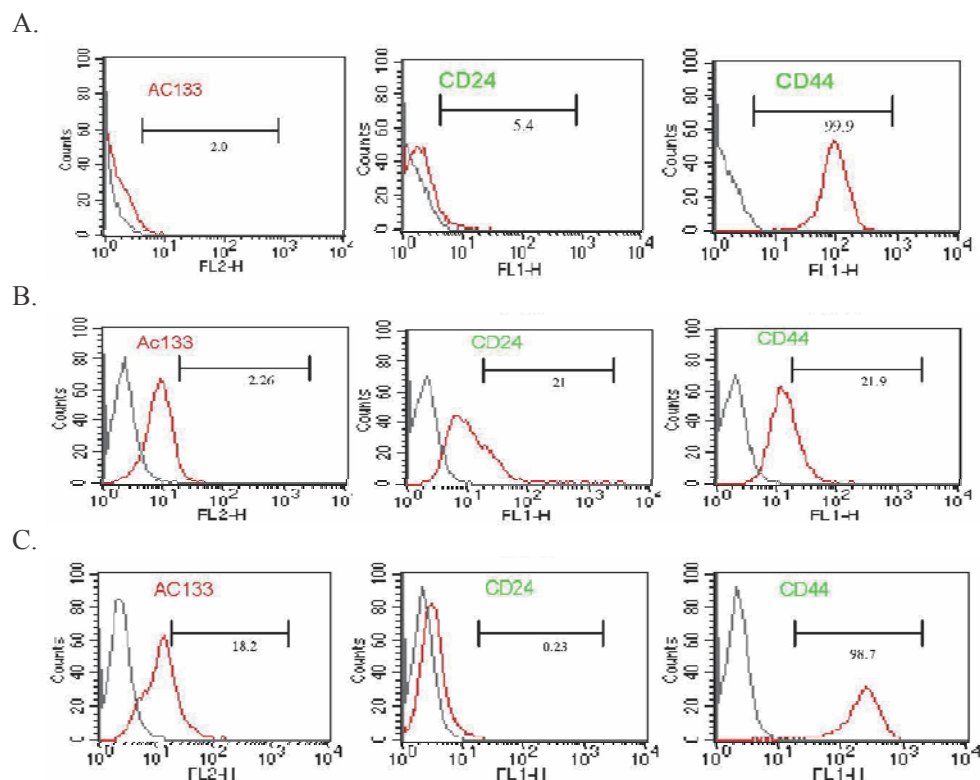
圖一 由乳癌腫瘤組織所衍生之貼附性細胞的分離步驟及細胞型態

乳癌腫瘤組織(A)在分離第17天後開始自組織團塊中向外延展生長(B)，於第24天時已可觀察到持續生長成為類似纖維母細胞狀的貼附性單層初代細胞群(C,D)，其中部分細胞會聚集形成特定的團簇群落型態(E)。



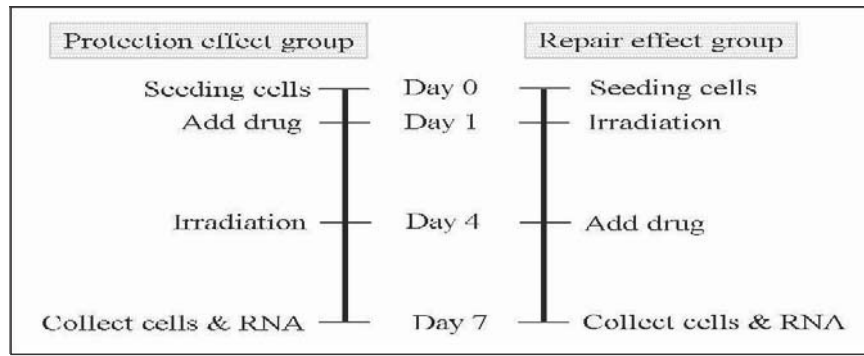
圖二 乳癌組織衍生初代細胞及乳癌腫瘤細胞株(MCF-7, MDA-MB-231)之細胞生長比較

由乳癌腫瘤組織衍生之初代貼附性細胞及乳癌腫瘤細胞株(MCF-7, MDA-MB-231)之生長曲線估計它們具有類似的生長速率。



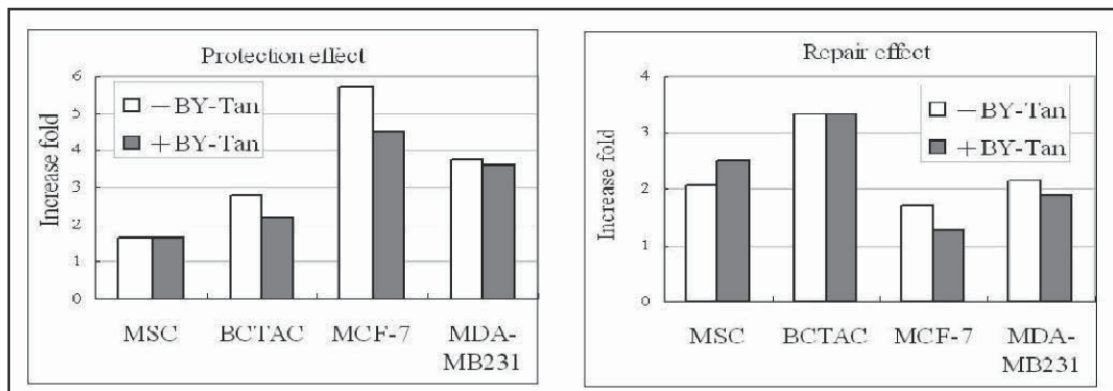
圖三 以流式細胞儀分析乳癌組織衍生初代細胞之細胞表面分子特徵

乳癌組織衍生初代細胞(A)及乳癌腫瘤細胞株MCF-7(B)，MDA-MB-231(C)分別用螢光標定的單株抗體(α AC133 mAb, α CD24 mAb, α CD44 mAb)反應後。以流式細胞儀分析其表面分子特徵。由本研究分離培養出之乳癌組織衍生初代細胞與MDA-MB-231之CD44⁺CD24⁻特性相似，但是AC133之表達則有明顯差異。



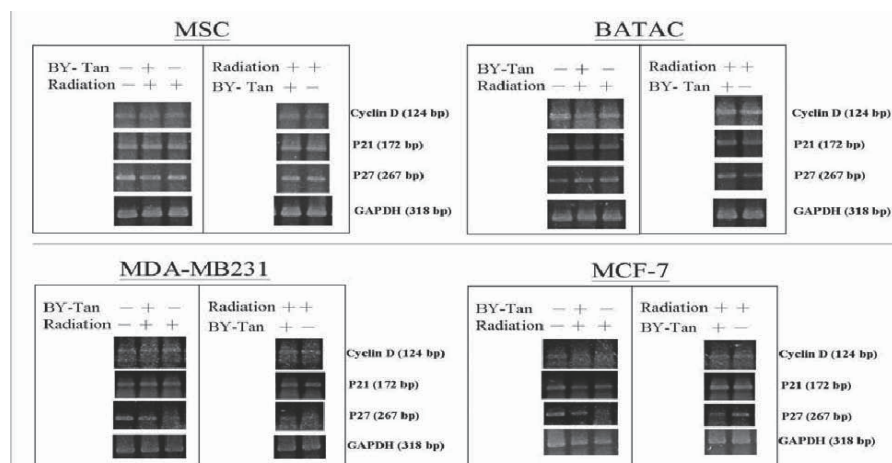
圖四 實驗流程設計

保護組 (Protection effect group; 圖四左) 於細胞穩定貼附一天後，先加入補中益氣湯(250 μ g/ml)與細胞共同培養三天後，再以900 rad的珈瑪射線照射，繼續培養三天後，收取細胞以進行細胞表面蛋白分析，或是自細胞抽取total RNA以進行RT-PCR分析。修復組 (Repair group; 圖四右) 則是先以珈瑪射線照射後，再加入藥物處理。由於本實驗室過去的研究結果中已作過補中益氣湯的劑量反應研究，因此本計畫中直接以最適濃度(補中益氣湯，250mg/ml)進行細胞性實驗。



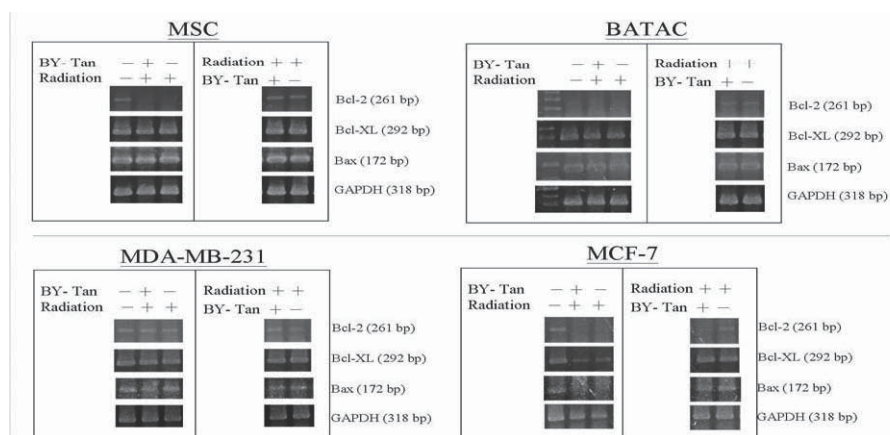
圖五 補中益氣湯與放射線處理對細胞生長的影响

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，分成保護組 (Protection, 圖五左) 及修復組 (Repair, 圖五右) 兩組，依照前述圖四中所示流程先後以補中益氣湯(BY-Tan)及900 rad照射處理後，計算細胞生長增加倍數。此結果顯示補中益氣湯對正常體幹細胞在放射線處理傷害後具有修復效果，然而對腫瘤細胞 (包括初代細胞及細胞株) 則呈現無影響或負面效應；在保護組實驗中，正常體幹細胞在補中益氣湯的保護下細胞成長不受放射線的傷害影響。然而在同樣情況下，補中益氣湯則有增加其對放射線照射傷害之腫瘤細胞的生長抵制作用。



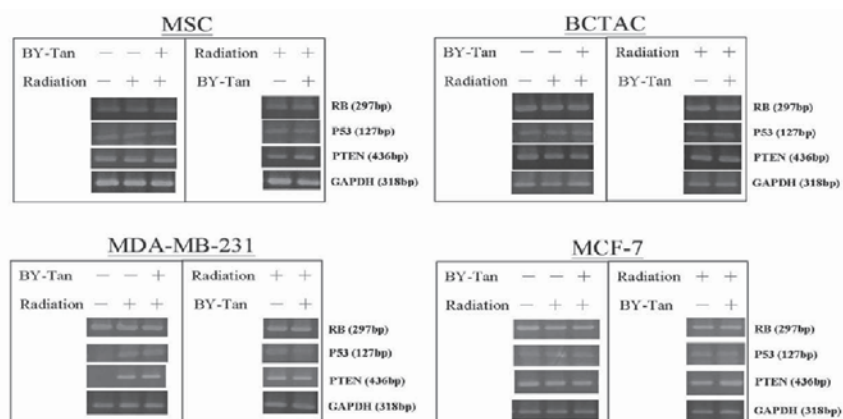
圖六 以RT-PCR 分析補中益氣湯對細胞週期調控基因的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞RNA進行RT-PCR分析比較p27、p21及cyclinD等基因之表現量，GAPDH作為internal control。本圖為重複實驗結果中的代表性結果。其結果顯示p21及cyclinD不受任何處理影響其表現量，唯有p27在腫瘤細胞株會受補中益氣湯的影響調控其表現量。



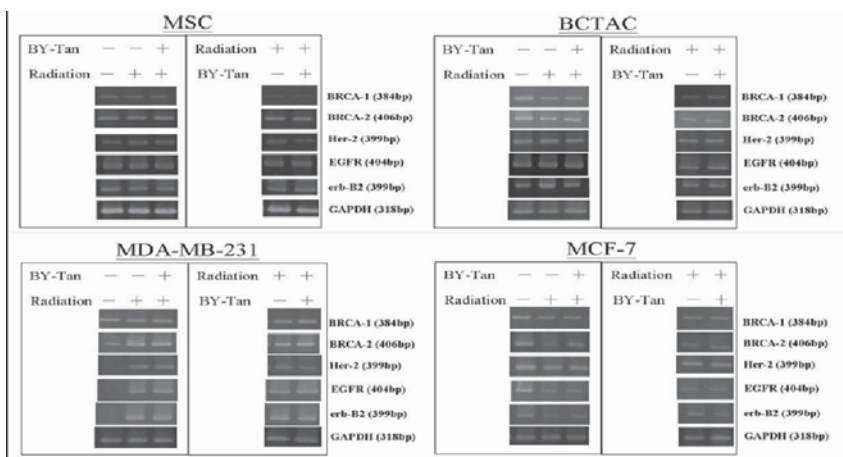
圖七 以RT-PCR 分析補中益氣湯對細胞凋亡基因的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞RNA進行RT-PCR分析比較Bcl-2, Bcl-XL及Bax等基因之表現量，GAPDH作為internal control。本圖為重複實驗結果中的代表性結果。其結果顯示Bcl-2, Bcl-XL及Bax不受補中益氣湯的影響調控其表現量。



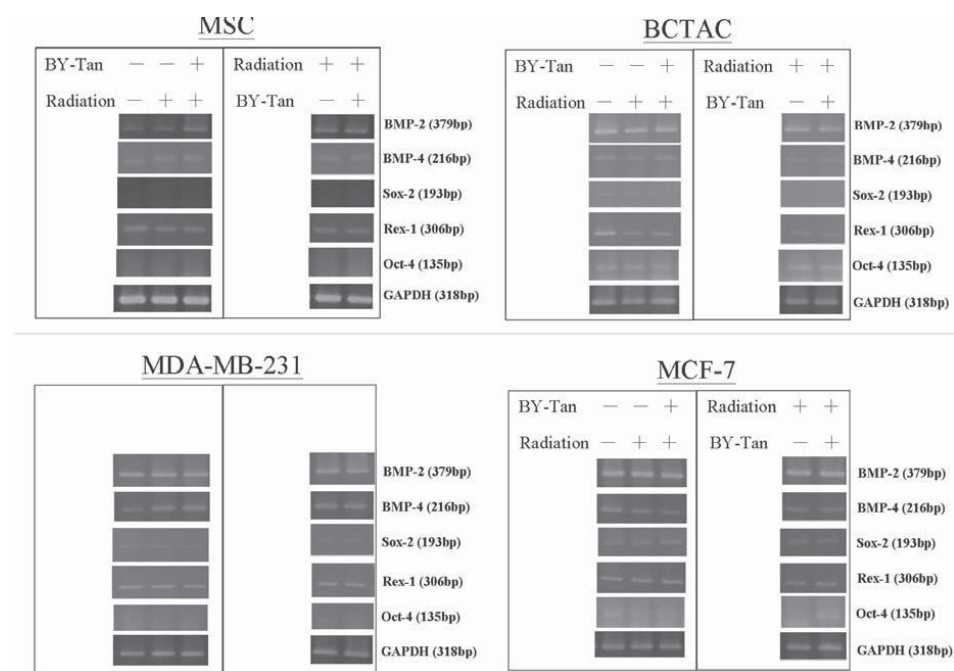
圖八 以RT-PCR 分析補中益氣湯對腫瘤抑制基因的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞RNA進行RT-PCR分析比較RB, p53及PTEN等基因之表現量，GAPDH作為internal control。本圖為重複實驗結果中的代表性結果。其結果顯示RB及PTEN不受補中益氣湯的影響調控其表現量，唯有修復組中的MCF-7及MDA-MB-231加入補中益氣湯會降低p53的表現量。



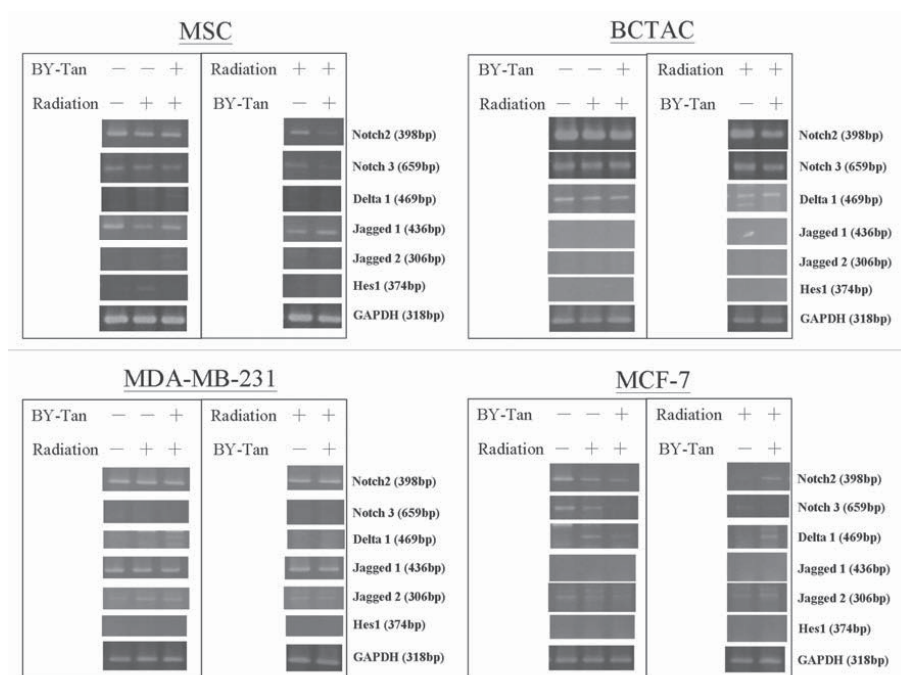
圖九 以RT-PCR 分析補中益氣湯對致癌基因的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞RNA進行RT-PCR分析比較致癌基因之表現量，GAPDH作為internal control。本圖為重複實驗結果中的代表性結果。其結果顯示補中益氣湯對正常體幹細胞的腫瘤基因無影響，然而對腫瘤異常細胞（包括初代細胞及細胞株）具有調控效果。



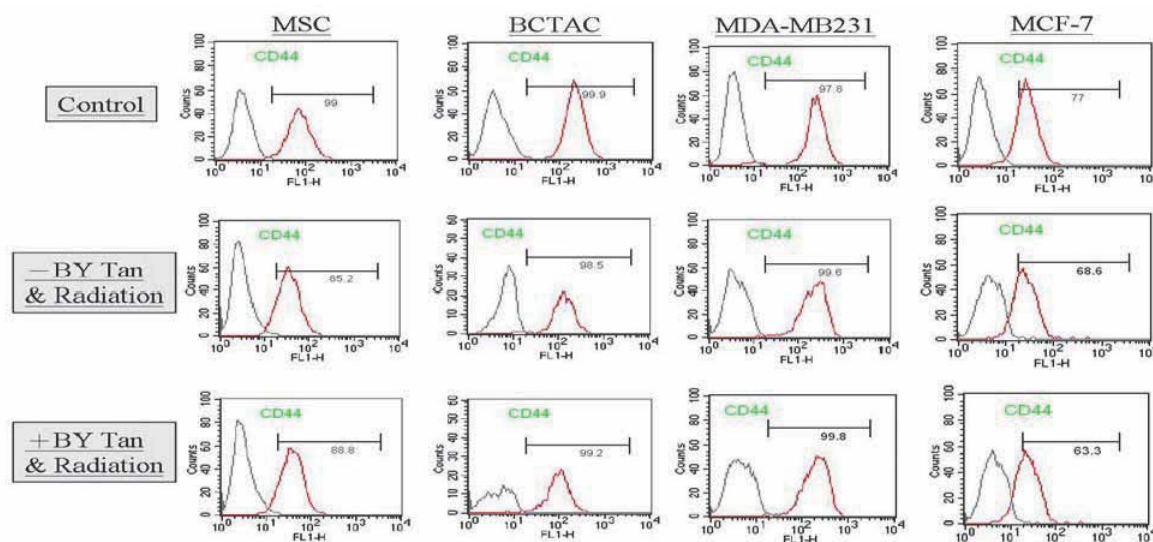
圖十 以RT-PCR 分析補中益氣湯對幹細胞早期基因的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC) 及乳癌細胞株MCF-7 與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad 照射處理後，收取細胞RNA 進行RT-PCR 分析比較幹細胞早期基因之表現量，GAPDH 作為internal control。本圖為重複實驗結果中的代表性結果。其結果顯示補中益氣湯對這四種細胞的幹細胞早期相關基因都無明顯的影響效果。



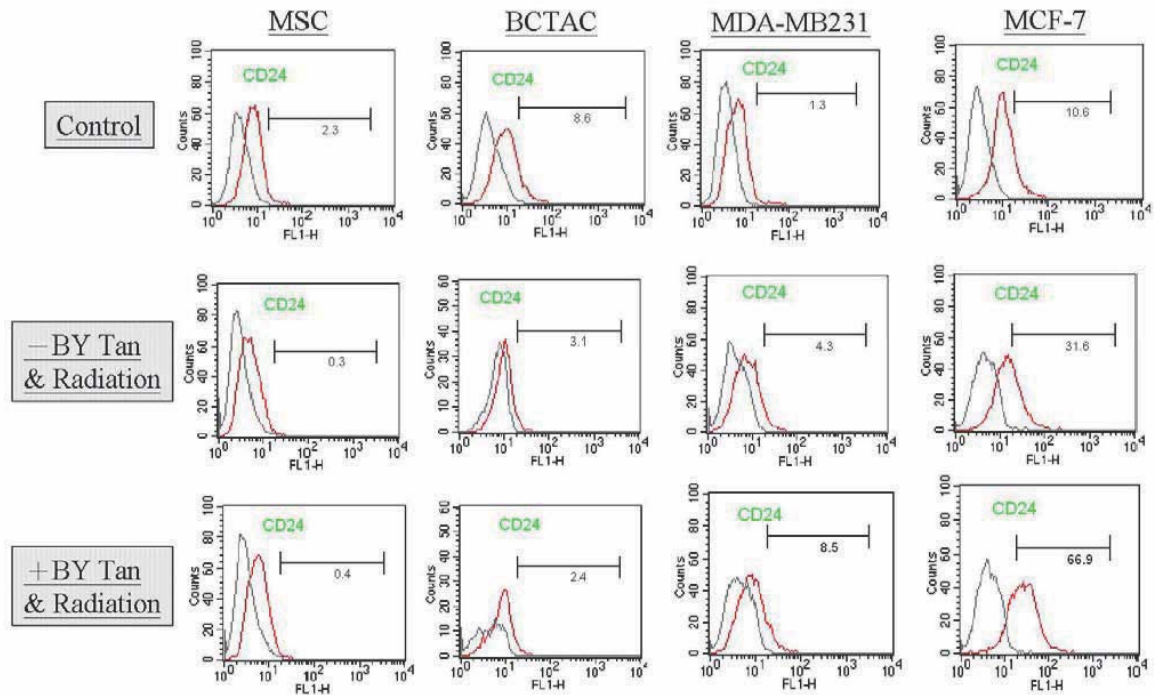
圖十一 以RT-PCR分析補中益氣湯對Notch訊息傳導基因群的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後收取細胞RNA進行RT-PCR分析比較Notch 訊息傳導基因之表現量，GAPDH作為internal control。本圖為重複實驗結果中的代表性結果。其結果顯示補中益氣湯可降低Notch受體在正常細胞及腫瘤細胞的表現量，但是唯有在正常細胞中Jagged-1結合子的表現量會增加。



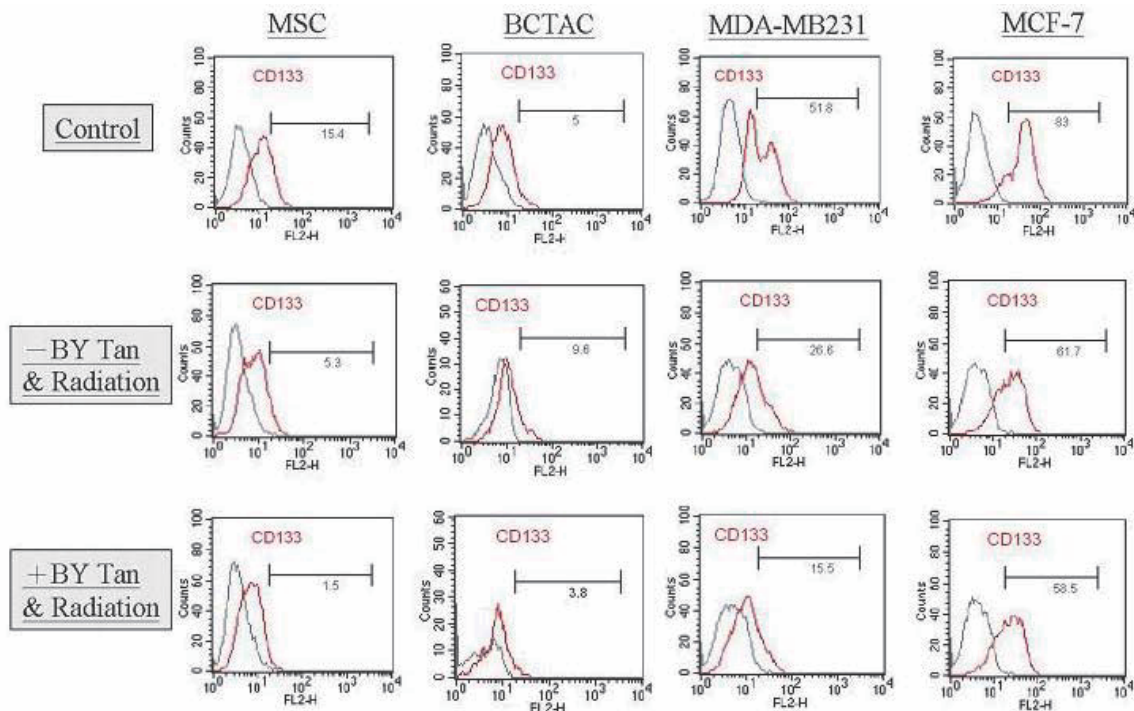
圖十二 以流式細胞儀分析補中益氣湯與放射線處理對細胞表面分子CD44表現特徵的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌腫瘤貼附性細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞以 α CD44-FITC單株抗體進行結合反應後，利用流式細胞儀進行分析。其結果顯示補中益氣湯不會影響四種細胞的CD44表面蛋白標記的表達特性。



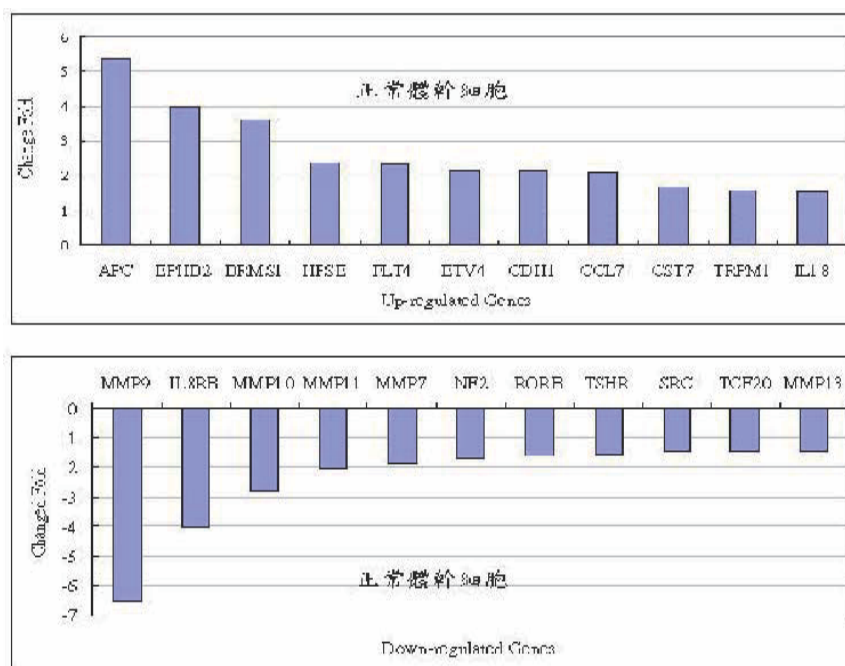
圖十三 以流式細胞儀分析補中益氣湯與放射線處理對細胞表面分子 CD24 表現特徵的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞以 α CD24-FITC單株抗體進行結合反應後，利用流式細胞儀進行分析。其結果顯示補中益氣湯會增加MCF-7的CD24⁺細胞比例。



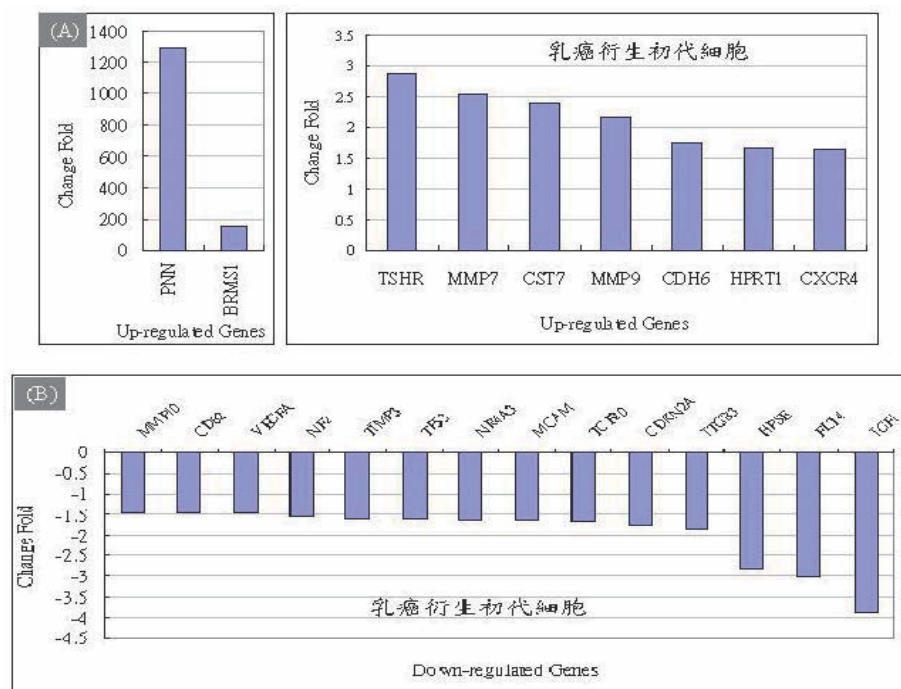
圖十四 以流式細胞儀分析補中益氣湯與放射線處理對細胞表面分子 CD133 表現特徵的影響

間葉幹細胞(MSC)、乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)及乳癌細胞株MCF-7與MDA-MB231，依照前述圖四中所示流程分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞以 α CD133-PE單株抗體進行結合反應後，利用流式細胞儀進行分析。其結果顯示補中益氣湯會降低所有四種細胞的CD133⁺細胞比例。



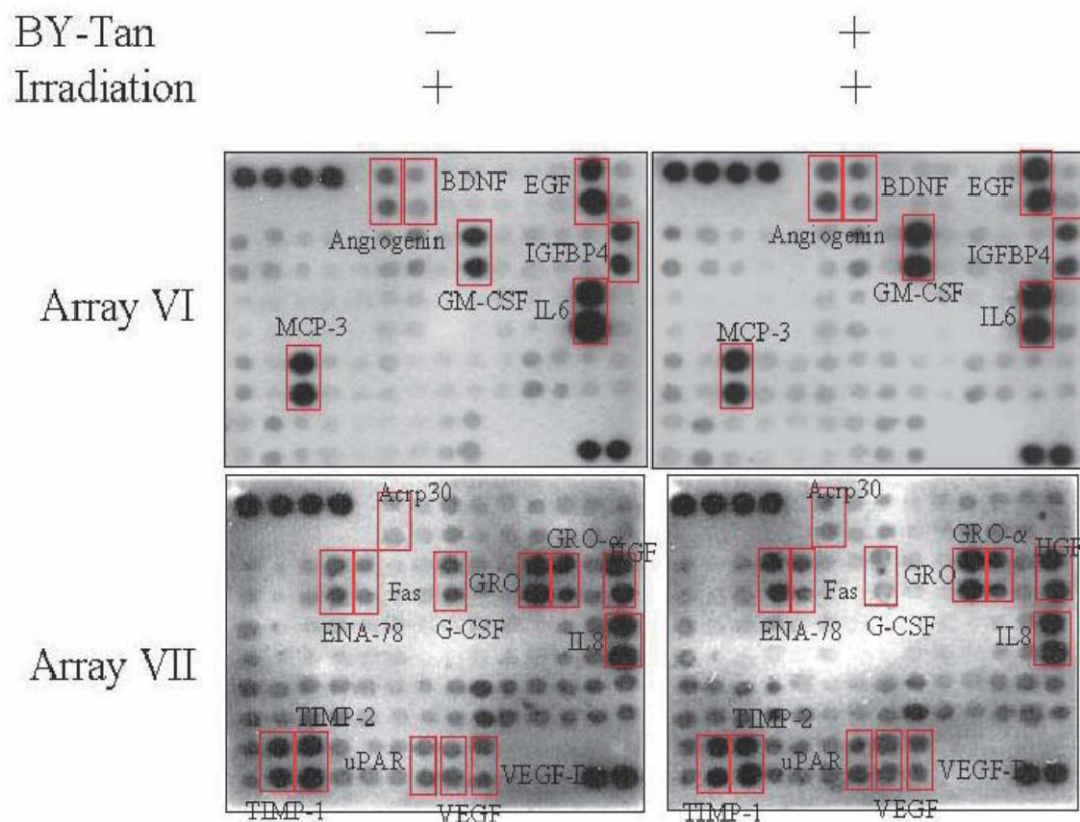
圖十五 以定量PCR 陣列分析補中益氣湯對正常體幹細胞受放射線處理stress/toxicity pathway 基因表達之影響

間葉幹細胞(MSC)依照前述圖四中保護組實驗流程，分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收取細胞RNA後。使用定量PCR陣列盤SuperArray (SuperArray Bioscience Corporation)進行Real-Time PCR assay以分析Stress及Toxicity pathway等相關基因之變化。其中控制組為未加藥但有經放射線處理之細胞，實驗組為加入補中益氣湯且有經放射線處理之細胞。依據實驗組與控制組之間的訊息強度，利用SuperArray套組所附軟體公式，計算出實驗組與控制組之間該項基因表現量的倍數差異。基因代號之說明詳見表一所列。



圖十六 以定量PCR 陣列分析補中益氣湯對乳癌組織衍生細胞受放射線處理stress/toxicity pathway 基因表達之影響

乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)依照前述圖四中保護組實驗流程，分別以補中益氣湯及900 rad 照射處理後，收取細胞RNA後。使用定量PCR陣列盤SuperArray (SuperArray Bioscience Corporation)進行Real-Time PCR assay以分析Stress 及Toxicity pathway等相關基因之變化。其中控制組為未加藥但有經放射線處理之細胞實驗組為加入補中益氣湯且有經放射線處理之細胞。依據實驗組與控制組之間的訊息強度，利用SuperArray套組所附軟體公式，計算出實驗組與控制組之間該項基因表現量的倍數差異。圖(A)為實驗組中表現量增加之基因，圖(B)為實驗組中表現量降低之基因。基因代號之說明詳見表一所列。



圖十七 以激素蛋白陣列分析補中益氣湯與放射線處理對乳癌腫瘤組織衍生細胞之影響

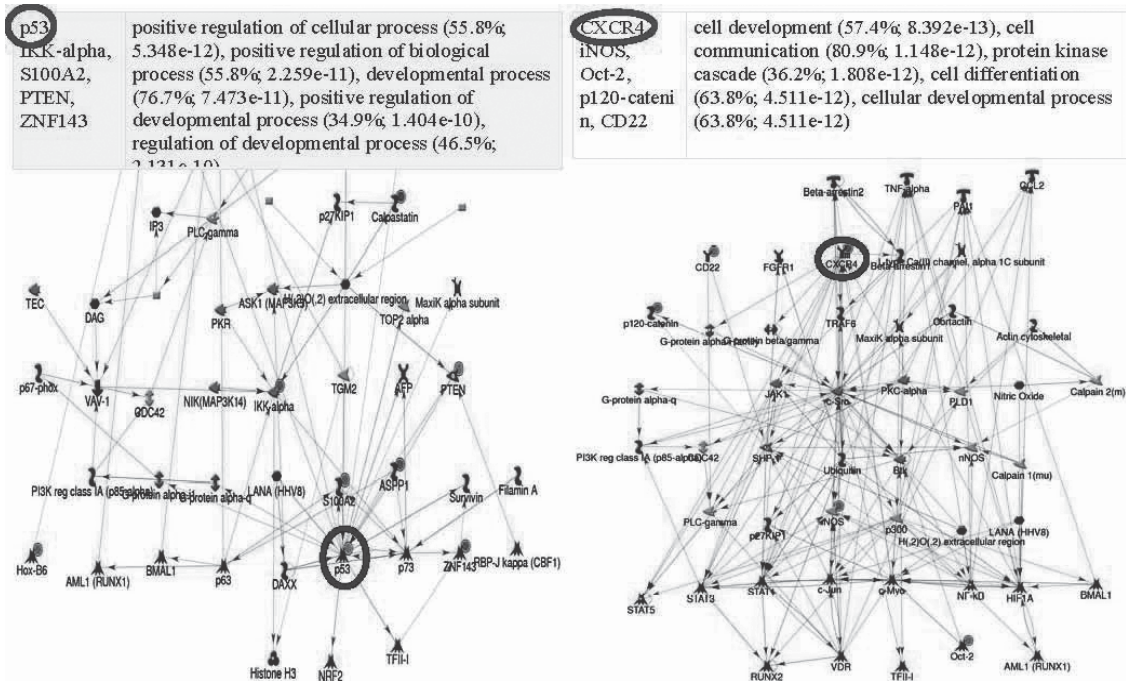
乳癌組織衍生初代細胞(Breast Cancer Tissue derived Adherent Cells; BCTAC)依照前述圖四中保護組實驗流程，分別以補中益氣湯及900 rad照射處理後，收集細胞培養液，利用激素蛋白陣列分析比較保護組中乳癌組織衍生初代細胞受到補中益氣湯處理後所分泌的激素差異性。其結果顯示補中益氣湯對於乳癌初代細胞所分泌的蛋白因子種類影響不大，只會略為增加Angiogenin, BDNF, ENA-78, GRO-a及Fas的表現量，但是卻會明顯減少G-CSF的表現量。

表一、基因名詞對照表

Symbol	Gene Name	UniGene	RefSeq	Description
AFC	DP2/DP3	Hs.158932	NM_000C38	Adenomatosis polyposis coli
BRMS1	DKFZp564A063	Hs.100426	NM_015399	Breast cancer metastasis suppressor 1
CCL7	FIC/MAREC	Hs.251526	NM_006273	Chemokine (C-C motif) ligand 7
CD82	4F9/C23	Hs.527778	NM_002231	CD82 molecule
CDH1	Arc-1/CD324	Hs.461086	NM_004360	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDH6	KCAD	Hs.171054	NM_004932	Cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)
CDKN2A	ARF/CDK4I	Hs.512559	NM_000077	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p15, inhibits CDK4)
CST7	CMAP	Hs.143212	NM_003650	Cystatin F (leukocystatin)
CXCR4	CD184/D2S231E	Hs.593413	NM_003467	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
EPH32	CAPB/DRT	Hs.523329	NM_004442	EPH receptor B2
ETV4	E1A-F/E:AF	Hs.434059	NM_001985	Ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, 31A7)
FLT4	FLT4/PCL	Hs.646917	NM_002020	Fms-related tyrosine kinase 4
HPRT1	HGPRT/HPRT	Hs.412707	NM_000094	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)
HPS3	HFA/HPK1	Hs.44227	NM_006665	Heparanase
IGF1	IGFI	Hs.160562	NM_000613	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
IL18	IGF/IL-18	Hs.83077	NM_001562	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
IL8RB	CD182/CDw:28b	Hs.846	NM_001557	Interleukin 8 receptor, beta
ITGB3	CD61/GP3A	Hs.218040	NM_000212	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
MCAM	CD146/MUC18	Hs.599039	NM_006500	Melanoma cell adhesion molecule
MMP10	SL-2/STMY2	Hs.2258	NM_002425	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
MMP11	SL-3/ST3	Hs.143751	NM_005940	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
MMP13	CLG3	Hs.2936	NM_002427	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
MMP7	MMP-7/MPSL1	Hs.2256	NM_002423	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterinase)
MMP9	CLG4E/GELB	Hs.297413	NM_004994	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
NF2	ACN/EANF	Hs.187858	NM_000263	Neurofibromin 2 (bilateral acoustic neuroma)
NR4A3	CHN/CSMF	Hs.279522	NM_006981	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
PIN1	DRS/SDK3	Hs.409965	NM_002687	Pinin, desmosome associated protein
RORB	NE172/ROR-BETA	Hs.494178	NM_006914	RAR-related orphan receptor B
SRC	ASV/SRC1	Hs.195659	NM_005417	V-src sarcoma (Schmidt-Rupprecht-A-2) viral oncogene homolog (v-src)
TCF20	AR1/SPBP	Hs.475018	NM_005650	Transcription factor 20 (AR1)
TIMP3	HSMR3222/K222	Hs.652357	NM_000362	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammation)
TP53	LFS1/TP53	Hs.408312	NM_000545	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
TRPM1	LTRPC1/MLSN1	Hs.155942	NM_002420	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1
TSHR	LGR3/MTSHR-I	Hs.160411	NM_000369	Thyroid stimulating hormone receptor
VEGFA	VEGF/VEGF-A	Hs.73793	NM_003375	Vascular endothelial growth factor A

Two Signaling network involved in BY-Tang treated up-regulated gene are related to the stem cell differentiation

cell development (57.4%; 8.392×10^{-13}), cell communication (80.9%; 1.148×10^{-12}), protein kinase Oct-2, cascade (36.2%; 1.808×10^{-12}), cell differentiation p120-catenin (63.8%; 4.511×10^{-12}), cellular developmental process n, CD22 (63.8%; 4.511×10^{-12})



Two Signaling network involved in BY-treated up-regulated gene are related to the stem cell differentiation

圖表(前列腺癌)

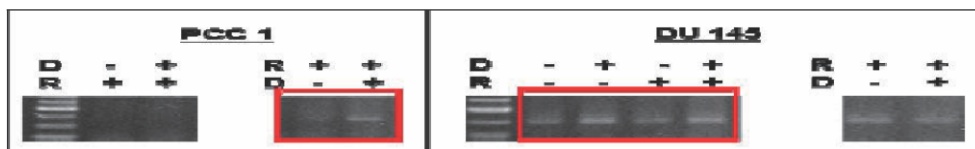


圖18 六味丸增加PCC1及DU145之erbB2表現

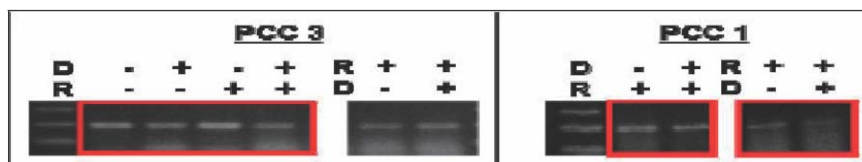


圖19 四物湯降低PCC1及PCC3之PSCA表現



圖20 六味丸增加PC3之PSCA表現

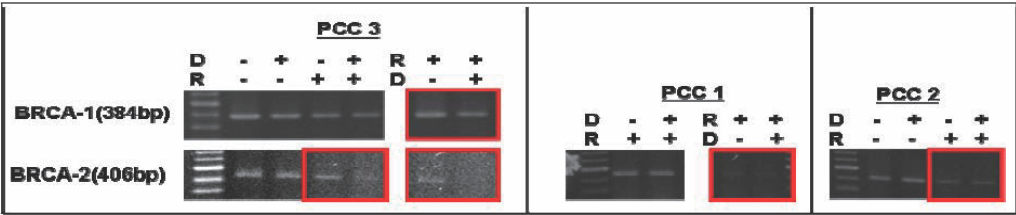


圖21 四物湯會降低PCC3之BRCA1及PCC1、PCC2、PCC3之BRCA2

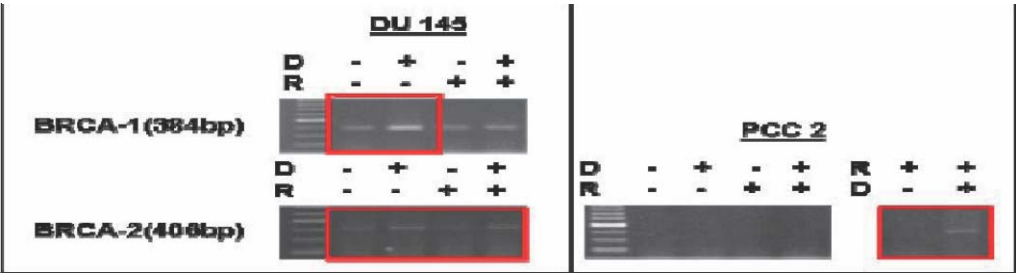


圖22 六味丸則加DU-145之BRCA1及PCC2、DU-145之BRCA2表現

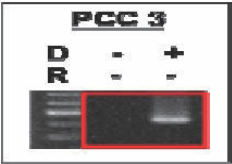


圖23 六味丸有增加PCC3之PTEN表現的趨勢

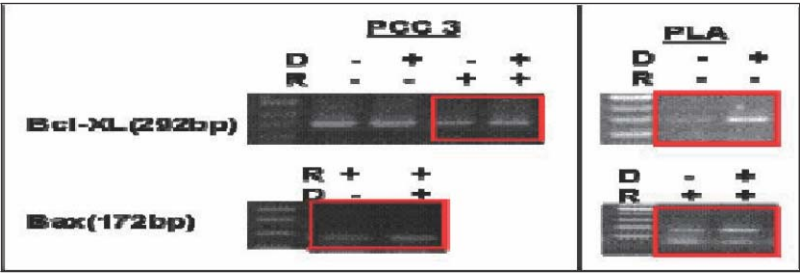


圖24 四物湯增加PCC3、PLA之BclXL及PCC3修復組、PLA之Bax表現量

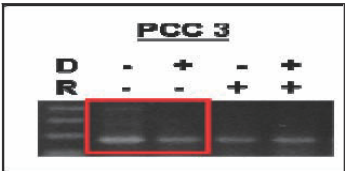


圖25 四物湯降低PCC3未受放射線壓力組別之Bax表

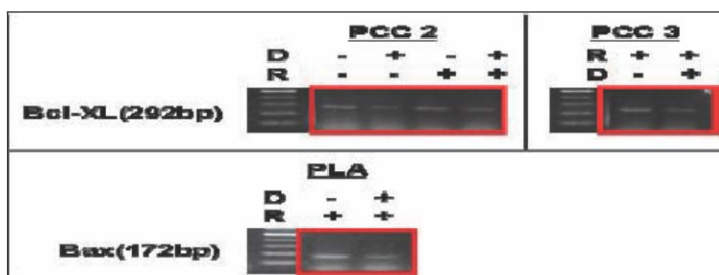


圖26 六味丸會降低PCC2、PCC3之BclXL及PLA之Bax表現

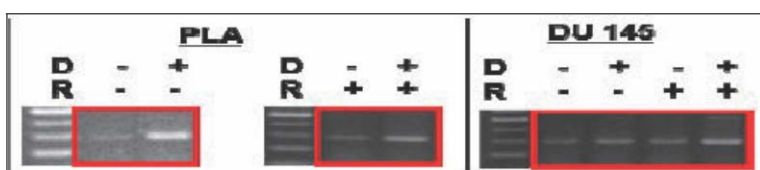


圖27 六味丸增加DU-145及PLA之BclXL表現

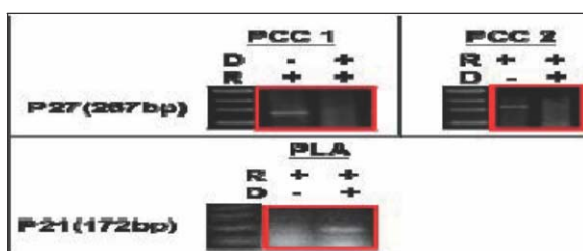


圖28 四物湯降低PCC1、PCC2之P27表現，增加PLA之P21表現



圖29 六味丸會降低PCC3之P21表現，但對PLA方面效果無顯著

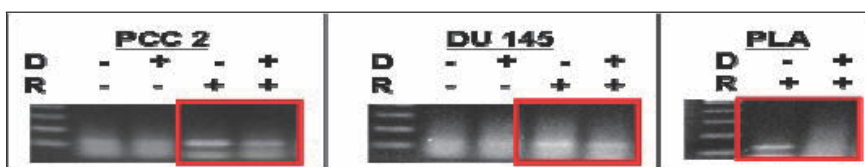


圖30 六味丸會降低PCC2及DU145之cyclin D表現

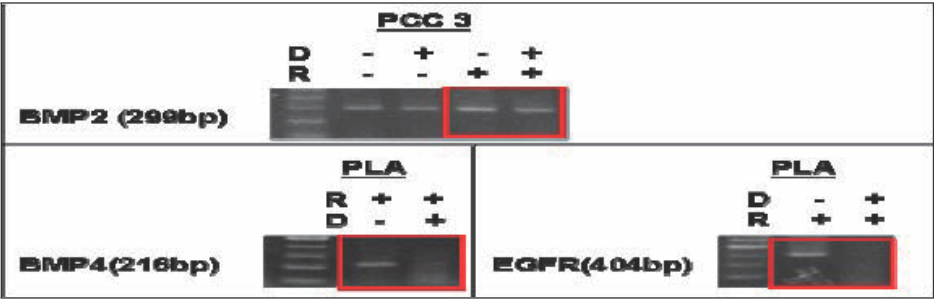


圖31 四物湯降低PCC3之BMP2、PLA之BMP4、PLA之EGFR表現

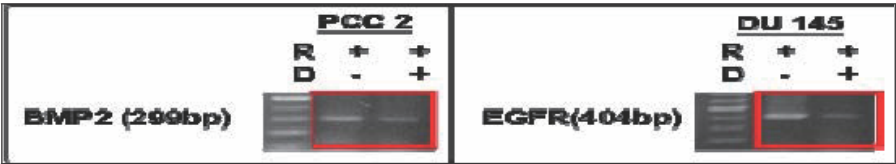


圖32 六味丸使PCC2之BMP2、DU145之EGFR表現降

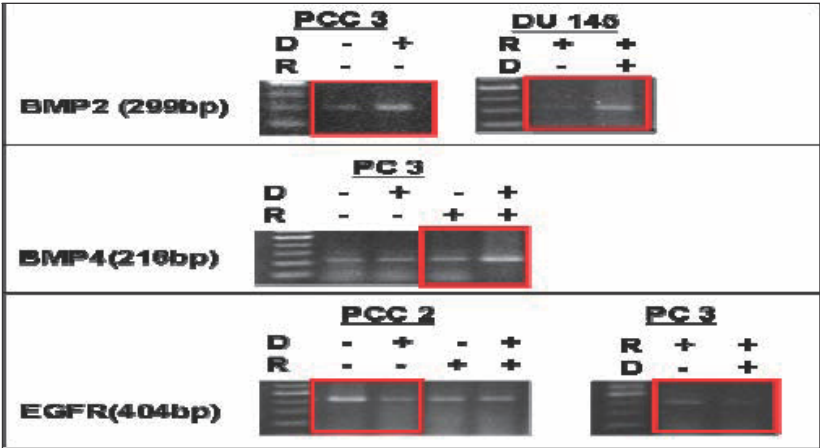


圖33 六味丸作用使PCC3、DU145之BMP2、PC3之BMP4、PCC2及PC3之EGFR表現增加

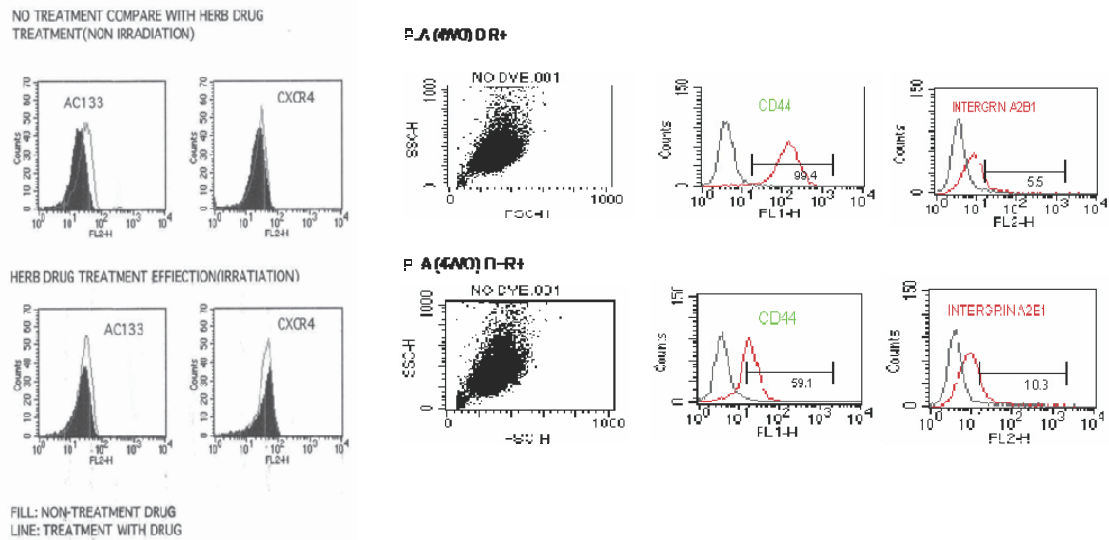


圖34 四物湯少許提升癌檢體細胞之CXCR4及AC133，在PLA方面則明顯減少CD44表現，微量增加intergrin $\alpha 2 \beta 1$ 之表現

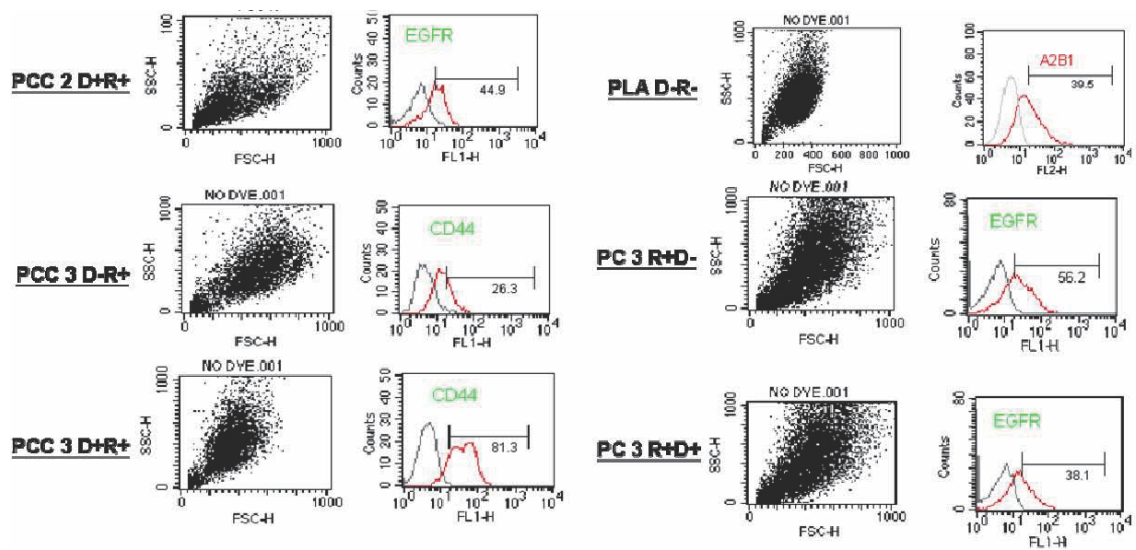
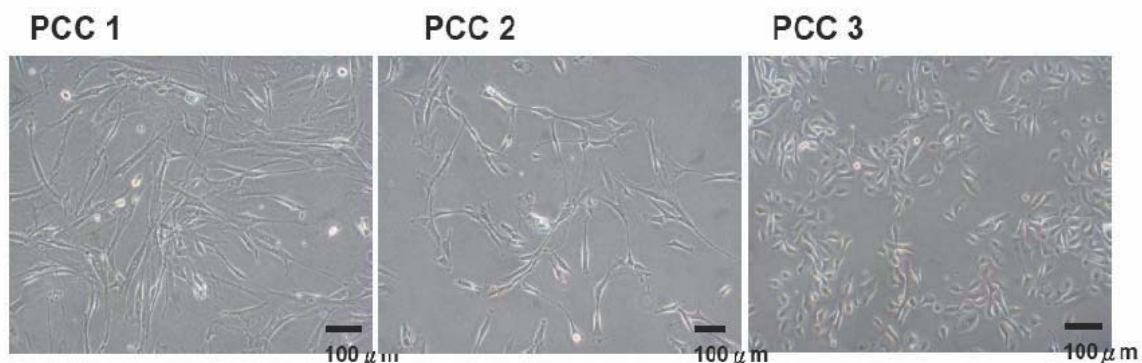


圖35 六味丸增加PCC2 之EGFR、PCC3之CD44之表現，微量增加PLA 之intergrin $\alpha 2 \beta 1$ 表現，對PC3之EGFR則些微減少其表現量

* (前列腺癌) 加註圖(一、二、三)及表

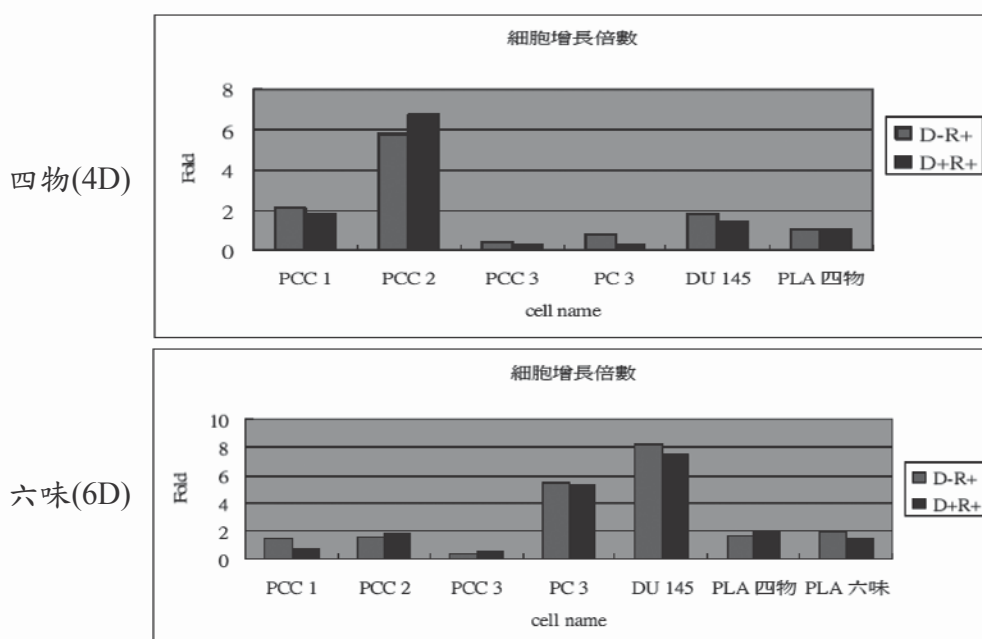


五種細胞之Cell marker 表現差異統整 (皆為未經任何處理之細胞)

Prostate cancer tumor cells	PCC 1	PCC 2	PCC 3	PC-3	DU-145
CD24	—	—	Dim+	—	+
CD44	+	+	+	+	+
CD105	+	+	Dim+	—	—
CD133	Dim+	+	+	—	—
EGFR	Dim+	Dim+	+	+	+
Integrin $\alpha 2 \beta 1$	+	+	+	+	+

Note: (—) : 0~15%, (Dim+) : 16~35%, (+) : >35%

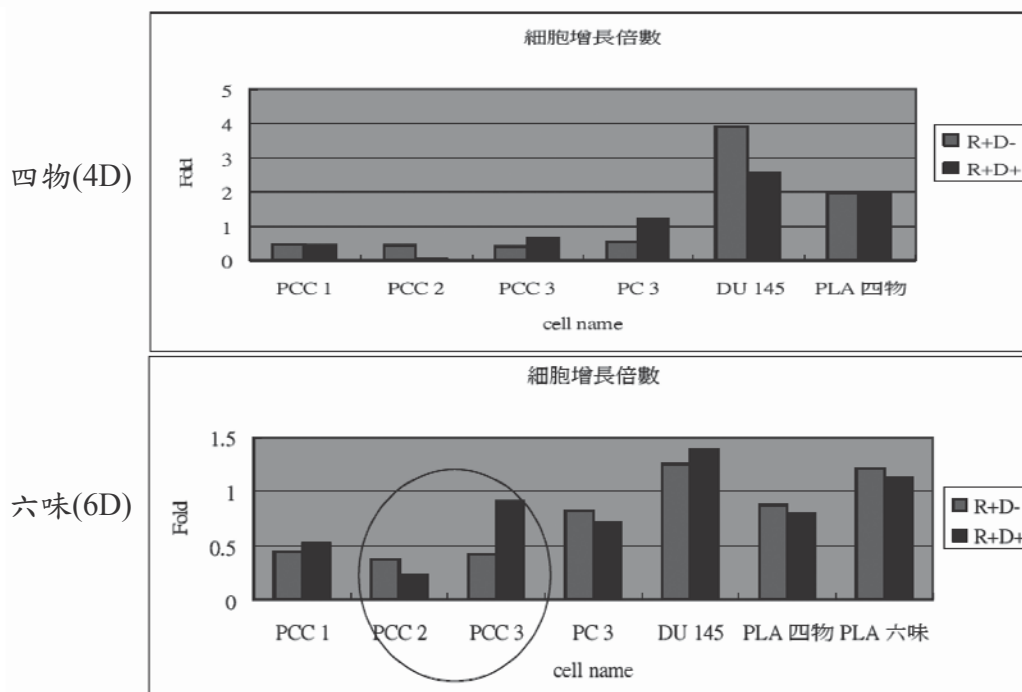
四物湯(4D)及六味區(6D)在RI前三天處理細胞(RIp)之效應



(圖二) 在RI傷害壓力下作用：

四物湯(4D)及六味丸(6D)在 RI+壓力狀態下對正常幹細胞單與癌腫瘤細胞文存活影響相較顯著不同. 顯示著6D對 癌腫瘤細胞RIp(protectio))作用影響有差異.

四物湯(4D)及六味區(6D)在RI後處理三天處理細胞(RIp)之效應



(圖三) 在RI傷害壓力下之修復作用分析：

四物湯(4D)及六味丸(6D)在 RI+壓力狀態下對正常幹細胞單與癌腫瘤細胞文存活影響相較顯著不同. 顯示著6D對癌腫瘤細胞RIr(repair))作用影響有差異.

Table : Influences of 4D vs 6D on Prostate Cancer Cells Gene Expressions.

Genes	4D / 6D	PLA	DU-145	PC-3	PCC1	PCC2	PCC3
<u>Cancer (Ca.)</u> ErbB-2	4D						
	6D		D ⁺ ,P ⁺		R ⁺		
PSCA	4D				P ⁺ ,R ⁻		D ⁻ , P ⁻
	6D			P ⁺			
BRCA1	4D						R ⁻
	6D		D ⁺				
BRCA2	4D				R ⁺	P ⁺	P ⁺ ,R ⁻
	6D		D ⁺ ,P ⁺			R ⁺	
<u>Ca. Inhibit.</u> PTEN	4D						
	6D						D ⁺
<u>Cell Apopt.</u> Bax	4D	P ⁺					D ⁻
	6D	P ⁺					R ⁻
BclXL	4D	D ⁺					P ⁺
	6D	D ⁺ ,P ⁺	D ⁺ ,P ⁺			D ⁺ , P ⁻	R ⁻
<u>Cell Cycle</u> P21	4D	R ⁺					
	6D						R ⁻
P27	4D				P ⁻	R ⁻	
	6D						
CyclinD	4D						
	6D	P	P			P	
<u>Progenitor</u> BMP-2	4D						P ⁻
	6D		R ⁺			R ⁻	D ⁺
BMP-4	4D	R ⁻					
	6D			P ⁺			
EGFR	4D	P ⁻					
	6D		R ⁻	R ⁻		D ⁻	

Note: 4D: _____; 6D: _____; D: Non RI Drug Influences; P: Protection from RI stress, R: Repairing/Healing from RI stress; + :Up regulation; -: Down regulation. (RI stress :Radioactive Gamma ray Irradiation)

Array VII

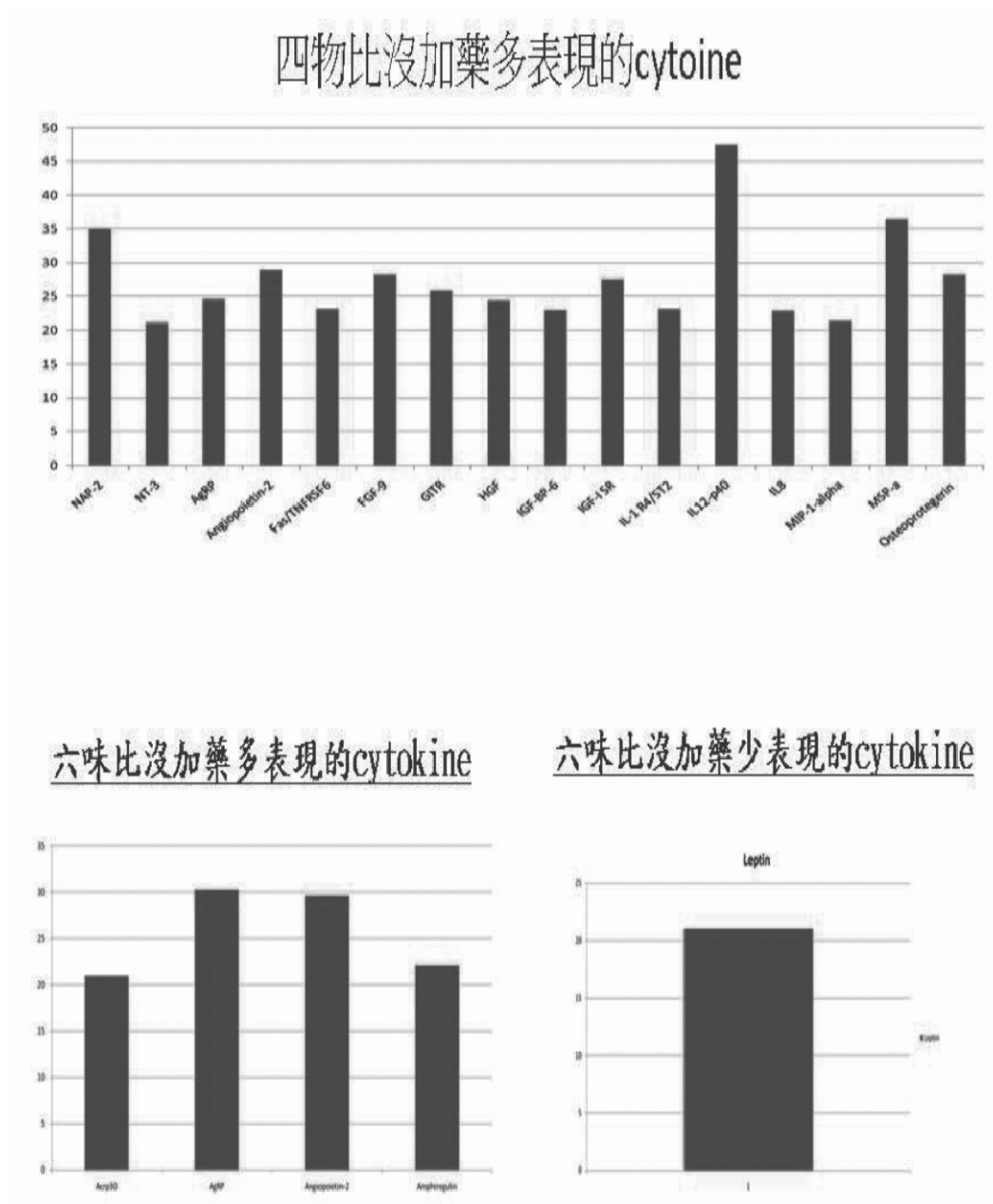
Chinese Herb
RadiationChinese Her
Radiation

75

Herb	—	—
Radiation	—	300 rad
Cytokines	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2 •Angiogenin, GRO, HGF •Leptin, PARC, RANTES, TNF α , ENA-78, Fas, GRO α , MIP-1 α , -1 β , -3 β , VEGF, VEGF-D
Herb	—	—
Radiation	—	900 rad
Cytokines	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2 •Angiogenin, GRO, HGF •BDNF, G-CSF

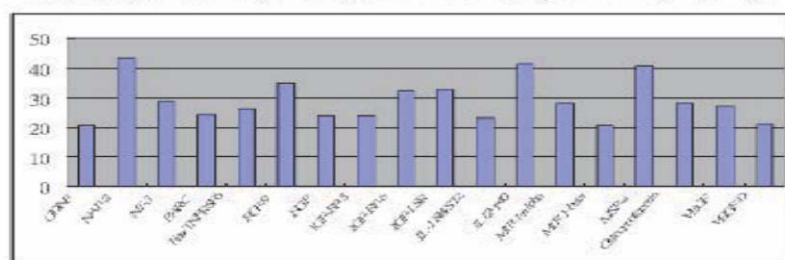
四物湯比沒加藥多表現的cytokine	NAP-2、NT-3、AgRP、Angiopoietin-2、Fas/TNFRSF6、FGF-9、GHR、HGF、IGF-BP-6、IGF-I SR、IL-1 R4/ST2、IL12-p40、IL8、MIP-1-alpha、MSP-a、Osteoprotegerin
六味丸比沒加藥多表現的cytokine	Acrp30、AgRP、Angiopoietin-2、Amphiregulin
六味丸比沒加藥少表現的cytokine	Leptin

四物表現量比六味多的cytokine	GDNF、LIGHT、NAP-2、NT-3、PARC、Fas/TNFRSF6、FGF-9、HGF、IGF-BP-3、IGF-BP-6、IGF-I SR、IL-1 R4/ST2、IL12-p40、MIP-1-alpha、MIP-1-beta、MSP-a、Osteoprotegerin、VEGF、VEGF-D
六味表現量比四物多的cytokine	BMP-4、BMP-6、IL-6、axl、bFGF、Beta-NGF

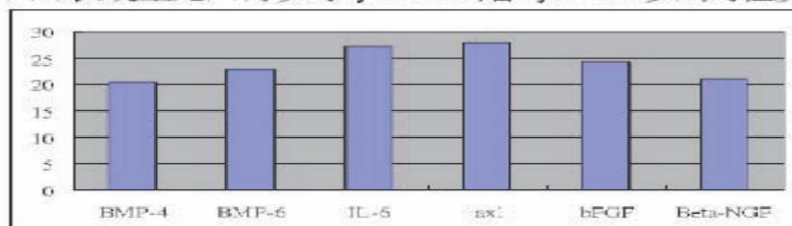


(圖四) Effects of 4D and 6D on Prostate Cancer DU-145 cell cytokine secretion

四物表現量比六味多的cytokines, 各cytokine多出的程度



六味表現量比四物多的cytokines, 各cytokine多出的程度



(圖五) Comparison of 4D and 6D effect on the cytokine secretion profile of Prostate Cancer DU-145 cells.

Summary (I)

Influences of 4D and 6D on Prostate Cancer Cells and the Normal MSCs

4d/6d Cell No.(Growth)	PLA	DU-145	PC-3	PCC1 _(g 5+)	PCC2 _(g ±)	PCC3 _(g 2+)
Control D-/Rl-	1.0	5.0	3.2	0.8	1.2	0.2
D ⁺ __4d/6d	↑ 25% / =%	↑ 35% / ↑ 10%	↑ 30% / ↑ 25%	↑ 25% / ↑ 12%	↑ 15% / ↑ 10%	↓ 25% / ↓ 18%
Rl _p ⁺ __4d/6d	↑ 10% / ↓ 9%	↓ 10% / ↓ 5%	↓ 60% / ↓ 5%	↓ 10% / ↓ 60%	↑ 15% / ↑ 10%	↓ 10% / ↑ 10%
Rl _t ⁺ __4d/6d	↓ 10% / ↓ 8%	↓ 35% / ↓ 10%	↑ 50% / ↓ 14%	0% / ↑ 10%	↓ 80% / ↓ 35%	↓ 25% / ↑ 50%
Surface Marker Change						
D ⁺ __4d/6d		↓ EGFR /	↓ AC133 /			
Rl _p ⁺ __4d/6d		↓ CXCR4 ↑ CD24 /	↓ CXCR4 ↑ AC133 /		↑ EGFR	AC133 / ↑ CD44
Rl _t ⁺ __4d/6d						↓ EGFR
Gene Express. Change						
D ⁺ __4d/6d	↑ Bcl-XL ↑ Bcl-XL ↑ Intergein α 2 β 1	↑ Bcl-XL ↑ BRCA1,2 ↑ erbB2	↑ PSCA		↓ Bcl-XL ↓ EGFR	↓ Bcl-XL, ↑ PTEN ↑ EGFR, ↑ BMP2
Rl _p ⁺ __4d/6d	↑ Intergein α 2 β 1 ↑ Bcl-XL ↓ Cyclin D ↓ EGFR ↑ Bax / ↓ Bax	↓ Cyclin D ↑ Bcl-XL ↑ BRCA 2, ↑ erbB2	↑ BMP4	↓ PSCA ↓ P27 /	↓ BRCA2 ↑ BMP2 ↓ Cyclin D ↓ Bcl-XL	↓ BMP2 ↓ BRCA2 ↓ PSCA /
Rl _t ⁺ __4d/6d	↑ P21 / ↓ P21 ↓ BMP4	↑ BMP2 ↓ EGFR	↓ EGFR	↓ BRCA2 ↑ erbB2	↓ BRCA2 ↑ BMP2 ↓ BMP2 ↑ BRCA2	↓ BRCA2 ↓ P27 ↑ Bax ↓ Bcl-XL ↓ EGFR

六味丸之Ames Test結果

Effect of D6 on Ames Test

(A) Without S9 metabolic activation		TA98	TA100
Negative	Positive	24±4 242±108**	156±3
0.312 mg/p	0.625 mg/p	1.25	28±2 28±4 22±1 22±2 25±1
mg/p	2.5 mg/p	5.0 mg/p	140±6
			149±2
			152±3
			173±6
			157±16

(B) With S9 metabolic activation		TA98	TA100
Negative	Positive	48±7	150±5
0.312 mg/p	0.625 mg/p	779±53***	835±102**
1.25 mg/p	2.5 mg/p	37±3	154±5
2.5 mg/p	5.0 mg/p	37±4	172±4
		39±7	179±9
		40±2	162±6
		33±2	138±6

1. The values were presented as Mean \pm S.E.(N \geq 3).
2. 30 μ l solvent(with10% DMSO)/plate was used as negative control.
3. Positive control in –S9 plate: TA 98, 4-Nitro-o-phenylenediamine 2.5 μ g / plate; TA 100, Sodium azide 5 μ g / plate; Positive control in +S9 plate: TA100 TA 98,2-aminoanthrene 5 μ g/plate. Significant difference between control treated group at
*p<0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs control by Student t-test.

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-RD-204提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此致謝。

柒、參考文獻

(乳癌腫瘤)

1. Fujii Y. Imamura M. Han M. Hashino S. Zhu X. Kobayashi H. Imai K. Kasai M. Sakurada K. Miyazaki T. (1994) Recipient-mediated effect of a traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-youei-to), on hematopoietic recovery following lethal irradiation and syngeneic bone marrow transplantation. *International Journal of Immunopharmacology*. 16(8): 615-22.
2. Hisha H. Yamada H. Sakurai MH. Kiyohara H. Li Y. Yu C. Takemoto N. Kawamura H. Yamaura K. Shinohara S. Komatsu Y. Aburada M. Ikehara S (1997) Isolation and identification of hematopoietic stem cell-stimulating substances from Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-taiho-to. *Blood*. 90(3): 1022-30.
3. Hsu HY. Ho YH. Lin CC. (1996) Protection of mouse bone marrow by Si-WU-Tang against whole body irradiation. *Journal of Ethnopharmacology*. 52(2): 113-7.
4. Maximow A.A. (1924) Relation of blood cells to connective tissue and endothelium. *Physiol. Rev.* 4,533.
5. Meehan WJ, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1: update. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20(1): 45-50
6. Ohnishi Y et al. (1990) Effects of juzen-taiho-toh (TJ-48), a traditional Oriental medicine, on hematopoietic recovery from radiation injury in mice. *Experimental Hematology*. 18(1): 18-22, Jan.
7. Shi Y, Ouyang P, Sugrue SP. Characterization of the gene encoding pinin/DRS/memA and evidence for its potential tumor suppressor function. *Oncogene*. 2000 Jan 13; 19(2): 289-97.
8. Till J.E. & McCulloch E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213-222.

(前列腺癌)

1. Bianchi Scarra GL, Romani M, Coviello DA, Garre C, Ravazzolo R, Vidali G and Ajmar F (1986) Terminal erythroid differentiation in the K-562 cell line by 1-b-D-arabinofurano-sylcytosine by c-myc messenger RNA decrease. *Cancer Res* 46: 6327-6332.
2. Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C. & Vescovi, A.L.

- (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283, 534-537.
3. Clarke, D.L. *et al.* (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-1663.
 4. Detmer K, Walker AN, Jenkins TM, Steele TA, Dannawi H. (2000) Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling. *Blood Cells Mol Dis*. 26(4): 360-72.
 5. Ferrari, G. *et al.* (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.
 6. Fujii Y. Imamura M. Han M. Hashino S. Zhu X. Kobayashi H. Imai K. Kasai M. Sakurada K. Miyazaki T. (1994) Recipient-mediated effect of a traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-youei-to), on hematopoietic recovery following lethal irradiation and syngeneic bone marrow transplantation. *International Journal of Immunopharmacology*. 16(8): 615-22.
 7. Gambari R, del Senno L, Barbieri R, Viola L, Tripodi M, Raschella G and Fantoni A (1984) Human leukemia K-562 cells: Induction of erythroid differentiation by 5-azacytidine. *Cell Differ* 14: 87-97.
 8. Gussoni, E. *et al.* (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
 9. Hasinoff BB, Abram ME, Barnabe N, Khelifa T, Allan WP, Yalowich JC. (2001) The Catalytic DNA Topoisomerase II Inhibitor Dexrazoxane (ICRF-187) Induces Differentiation and Apoptosis in Human Leukemia K562 Cells, *Mol Pharmacol*, Vol. 59: 453-461, 2001.
 10. Hisha H. Yamada H. Sakurai MH. Kiyohara H. Li Y. Yu C. Takemoto N. Kawamura H. Yamaura K. Shinohara S. Komatsu Y. Aburada M. Ikehara S (1997) Isolation and identification of hematopoietic stem cell-stimulating substances from Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-taiho-to. *Blood*. 90(3): 1022-30.
 11. Hsu HY. Ho YH. Lin CC. (1996) Protection of mouse bone marrow by Si-WU-Tang against whole body irradiation. *Journal of Ethnopharmacology*. 52(2): 113-7.
 12. Jackson, K.A., Mi, T. & Goodell (1999) M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 96, 14482-14486.
 13. Lagasse, E. *et al.* (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate to

- hepatocytes in vivo. *Nature Med.* 6, 1229-1234.
14. Lloyd T. Lam, Chiara Ronchini, Jason Norton, Anthony J. (2000) Capobianc, and Emery H. Bresnick, Suppression of Erythroid but Not Megakaryocytic Differentiation of Human K562 Erythroleukemic Cells by Notch-1 *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 26, 30, pp. 19676-19684, 2000.
 15. Maximow A.A. (1924) Relation of blood cells to connective tissue and endothelium. *Physiol. Rev.* 4,533.
 16. Nicoletta Bianchi, Federico Ongaro, Cristiano Chiarabelli, Licia Gualandi, Carlo Mischiati, Paola Bergamini and Roberto Gambari. (2000) Induction of Erythroid Differentiation of Human K562 Cells by Cisplatin Analogs, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 60, pp. 31-40.
 17. Ohnishi Y *et al.* (1990) Effects of juzen-taiho-toh (TJ-48), a traditional Oriental medicine, on hematopoietic recovery from radiation injury in mice. *Experimental Hematology*. 18(1): 18-22, Jan.
 18. Olaf Witt, Katrin Sand, and Arnulf Pekrun (2000) Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways *Blood* 95, 2391-2396.
 19. Petersen, B.E. *et al.* (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
 20. Rutherford TR, Clegg JB and Weatherall DJ (1979) K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature* 280: 164-165.
 21. Theise, N.D. *et al.* (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31, 235-24.
 22. Till J.E. & McCulloch E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213-222.
 23. Tomoko Iguchi, Shinji Sogo, Hiroko Hisha, Shigeru Taketani, Yasushi Adachi, Rika Miyazaki, Hajime Ogata, Seiji Masuda, Ryuzo Sasaki, Motoki Ito, Shirou Fukuhara and Susumu Ikehara (1999) HGF Activates Signal Transduction from EPO Receptor on Human Cord Blood CD34⁺/CD45⁺ Cells, *Stem Cells*, Vol. 17, No. 2, 82-91, March.
 24. Yukimasa Shiotsu, Leonard M. Neckers, Ivo Wortman, Won G. An, Theodor W. Schulte, Shiro Soga, Chikara Murakata, Tatsuya Tamaoki, and Shiro Akinaga (2000) Novel oxime derivatives of radicicol induce erythroid differentiation associated with preferential G1 phase accumulation against chronic myelogenous leukemia cells through destabilization of Bcr-Abl with Hsp90

- complex, *Blood*, 96: 2284-2291.
25. Lu X, Guo J, Hsieh TC, Wu JM (2003) Inhibition of proliferation and expression of AR/PSA by herbal supplement Equiguard in LNCaP cells cultured in androgen-proficient FBS and androgen-deficient charcoal-stripped FBS is correlated with increased serine-15 phosphorylation of the tumor suppressor gene p53. *Anticancer Res*, May-Jun; 23(3B): 2489-98.
 26. Hsieh TC, Lu X, Guo J, Xiong W, Kunicki J, Darzynkiewicz Z, Wu JM (2002) Effects of herbal preparation Equiguard on hormone-responsive and hormone-refractory prostate carcinoma cells: mechanistic studies. *Int J Oncol*, Apr; 20(4): 681-9.
 27. Kubota T, Hisatake J, Hisatake Y, Said JW, Chen SS, Holden S, Taguchi H, Koeffler HP. (2000) PC-SPES: a unique inhibitor of proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate*, Feb 15; 42(3): 163-71.
 28. Miki J, Rhim JS. (2008) Prostate cell cultures as in vitro models for the study of normal stem cells and cancer stem cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2008; 11(1): 32-9.
 29. Zhigang Z, Wenlu S. (2007) Prostate stem cell antigen (PSCA) mRNA expression in prostatic intraepithelial neoplasia: implications for the development of prostate cancer. *Prostate*, Aug 1; 67(11): 1143-51.
 30. Lam JS, Yamashiro J, Shintaku IP, Vessella RL, Jenkins RB, Horvath S, Said JW (2005) Reiter RE. Prostate stem cell antigen is overexpressed in prostate cancer metastases. *Clin Cancer Res*. Apr 1; 11(7): 2591-6.
 31. Gapter L, Wang Z, Glinski J, Ng KY (2005) Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 15; 332(4): 1153-61.
 32. Kim HS, Lee EH, Ko SR, Choi KJ, Park JH (2004) Im DS Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch Pharm Res*. Apr; 27(4): 429-35.
 33. Shen, J.-P., Ye, B.-D. & Zhou, Y.-H (2008) . Treatment of refractory severe autoimmune disease by combined therapy with Chinese drug and autohemopoietic stem cell transplantation. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* **28**, 212-215.
 34. Shepherd CJ, Rizzo S, Ledaki I, Davies M, Brewer D, Attard G, de Bono J, Hudson DL (2008) Expression profiling of CD133+ and CD133- epithelial cells from human prostate Prostate. Jun 15; 68(9): 1007-24.
 35. Lam JS, Reiter RE (2006) Stem cells in prostate and prostate cancer

- development. *Urol Oncol* Mar-Apr; 24(2): 131-40.
36. Gu G, Yuan J, Wills M, Kasper S (2007) Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. *Cancer Res.* May 15; 67(10): 4807-15.
 37. HARADA N, OKAMURA S, SHIMODA K, et al. (1992) INFLUENCE OF A TRADITIONAL CHINESE HERBAL MEDICINE REN-SHEN-YANG-RONG-TANG (JAPANESE NAME NINJIN-YOEI-TO) ON THE PRODUCTION OF INTERLEUKIN-6 FROM PERIPHERAL-BLOOD MONONUCLEAR-CELLS AND BONE-MARROW ADHERENT CELLS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY* Vo8, No3, p141-145.
 38. Gao, F. et al. (2008). In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Translational Research* 151, 293-302.
 39. Kong, D.J. et al. (2008) Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells. *Stem Cells* 26, 1425-1435.
 40. Chung, V.Q., Tattersall, M. & Cheung, H.T.A. (2004). Interactions of a herbal combination that inhibits growth of prostate cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 53, 384-390.
 41. Jensen, J.B. & Langkilde, N.C (2004). PC-SPES and ProstaSol: Chinese herbal medicine as a treatment for prostate cancer. *Ugeskr Laeger* 166, 4611-4612.
 42. Ho JW, Song JZ, Leung YK (2005) Activation of p53 by specific agents in potential cancer therapy *Curr Med Chem Anticancer Agents*. Mar; 5(2): 131-5.
 43. Shepherd CJ, Rizzo S, Ledaki I, Davies M, Brewer D, Attard G, de Bono J, Hudson DL. (2008) Expression profiling of CD133+ and CD133- epithelial cells from human prostate. *Prostate*. Jun 15; 68(9): 1007-24.
 44. 沈建忠，補中益氣湯抑制多種惡性細胞腫瘤生長機轉體外細胞與氣虛老鼠模型之先驅研究．中醫藥資訊網，CCMP93-CT-107，2004。
 45. 謝長堯，中藥材薏苡萃取物對免疫調控因子基因表現之調控對於腫瘤細胞與惡質化的影響．中醫藥資訊網，CCMP94-RD-046，2005。
 46. 沈建忠，補中益氣湯抑制腫瘤生長增加免疫力及併用免疫療法的療效分析之先驅研究．中醫藥資訊網，CCMP92-RD-027，2003。
 47. 賴易成，沙參麥冬湯對放射線治療中癌症病患之血中抗氧化及調節免疫功能之臨床評估．中醫藥資訊網，CCMP92-RD-026，2003。
 48. 林俊清，傳統中藥方劑對人類乳癌細胞增生抑制作用和細胞程式死亡機

- 制之探討．中醫藥資訊網，CCMP94-RD-045，2005。
49. 謝易修，中藥抑制癌細胞遷移和侵犯作用之系統分析研究．中醫藥資訊網，CCMP94-RD-029，2005。
50. 楊賢鴻，補中益氣湯對緩解期過敏性鼻炎患者免疫機轉影響之研究．中醫藥資訊網，CCMP88-RD-003，1999。
51. 譚世特，由中藥草中分離能提升輻射治癌效果的輻射增敏劑（3-3）．中醫藥資訊網，CCMP88-RD-029，1999。
52. 施子弼，應用幹原細胞探討中藥對人體組織修復再生功能之基因體研究．中醫藥資訊網，CCMP92-RD-021，2003。
53. 施子弼，補益類中藥及其方劑對於人體幹胞之系統分析研究．中醫藥資訊網CCMP93-RD-001，2004。