

編號：CCMP95-RD-007

# 樟芝防治癌症之重要機轉與特色 -癌症逆轉

鄧文炳

臺北醫學大學

## 摘要

所謂癌症逆轉現象(Cancer Reversion)，意指腫瘤細胞回復「部分正常」，而成為不具威脅性地可與人體共存的人癌共生現象。特定的中草藥可能藉著啟動腫瘤細胞中的逆轉作用機制，讓癌細胞不表現腫瘤特性，甚至於恢復成相當程度之類似正常細胞。

本實驗室已經建立癌症逆轉的平台技術，可以直接應用在新的標地藥物之癌症逆轉的篩選。本研究的主旨為先以固態栽培樟芝利用本實驗室之癌症逆轉之細胞模式技術平台，其研究目標為：探討樟芝對癌細胞之細胞毒性、腫瘤標誌 ALP、細胞週期、致癌基因及抑癌基因之表現影響和動物實驗。

初步實驗結果發現，固態栽培樟芝會抑制癌細胞生長，抑制腫瘤標誌，此外在基因及蛋白質層面的探討，樟芝有增強抑癌基因 p53 表現的趨勢；而對於子宮頸癌主要的 E6/E7 致病因子則有抑制的功效。在動物實驗方面，固態栽培樟芝對於腫瘤細胞生長確實有抑制的效果。以流式細胞儀技術分析固態栽培樟芝對癌細胞的影響，可能並非走細胞凋亡的路徑，因此可以更加的推斷藥物對細胞的作用是進行癌症逆轉的模式。

關鍵詞：癌症逆轉、固態栽培樟芝、子宮頸癌細胞、鹼性磷酸酵素 (ALP)、致癌基因E6/E7、抑癌基因p53

編號：CCMP95-RD-007

# **Cancer reversion model as a character of solid state cultivated *Taiwanofungus camphoratus* for cancer prevention**

**The principle investigator: Win-Ping Deng Ph.D.**

**Executive unit: Taipei Medical University**

## **ABSTRACT**

Phenomenon (Cancer Reversion) that the so-called cancer reverses, it mean tumor the cells the ' some normal ' without being replied, it but become not threatening nature can with person cancer intergrowth phenomenon where human body coexist. Function mechanism of reversion of the tumor cells that the specific Chinese herbal medicine may be made use of and started, let the cancer cell not display the tumor characteristic, even resume into a similar normal cell analogous to the degree.

This laboratory has already utilized Chinese herbal medicine *Taiwanofungus camphoratus* of medicine made of two or more ingredients to set up the platform technology that the cancer reverses, can directly person who apply new mark to screening that cancer reverses of medicine. Have HeLa surface antigen of cell , tumor of person who bring out, it have phosphoric acid activation since, it is a intestines soda phosphoric acid ferment of a kind of cell (Alkaline phosphatase, ALP), so try to analyze ALP to behave with the relation between the tumor bringing out in this laboratory . In addition the discussion in the gene aspect, the preliminary experimental result finds , Chinese herbal medicine *Taiwanofungus camphoratus* of medicine made of two or more ingredients strengthens

and restrains the trend that cancer gene p53 displays ; E6/E7 main to the cervix cancer causes the son of cause of disease to have efficiency suppressed . In animal's experiment, injecting Chinese herbal medicine *Taiwanofungus camphoratus* of medicine made of two or more ingredients will really have a result suppressed to grow to the tumor cell. In order to the flowing type Chinese herbal medicine *Taiwanofungus camphoratus* impact on cancer cell of medicine made of two or more ingredients of technological analysis of cell's appearance, may not leave in the route which the cell kills , so the function on the cell of inference medicine can be to carry on the way that the cancer reverses

Keywords: Cancer Reversion, *Taiwanofungus camphoratus*, HeLa cell, Alkaline phosphatase (ALP), E6/E7, p53

## 壹、前言

### 研究背景與現況

在癌症的治療上，傳統的化學療法及放射療法雖然可以成功地殺死癌細胞，但卻會沒有選擇性地一併殺死正常細胞；而以外科療法進行手術切除原發部位的腫瘤時，許多又會加速癌細胞的轉移。由於這些現存的副作用，使得癌症中、晚期或體質差的病患，並不適於上述療法，甚至有些病患受到放療、化療及手術之傷害，還超過其癌症本身。

有鑑於上述缺失，近十幾年所發展出來的治療方法例如免疫療法、基因療法等，皆努力將其打擊的重心集中於腫瘤細胞上，而隨著生物醫學日新月異的進步，對於癌症在分子及細胞機制上有了更為深入的了解，該等療法確實已經提供人類在癌症治療上嶄新的希望以及可能性。

Daniele Brouty-Boye 等人首先提及所謂腫瘤細胞的回復現象 (Tumorigenic Cell Reversion)，概略言之，其係指腫瘤細胞回復「部分正常」，而成為不具威脅性地可與人體共存之的人癌共生現象<sup>1</sup>。文中係先將正常細胞株以病毒感染，或以致癌物或放射線進行誘導時，可使其生理狀態改變成為癌化的 Transformed(暫譯為「轉型」)狀態。該「轉型」細胞與一般細胞最明顯的差異在於細胞與細胞間之接觸抑制 (Contact inhibition) 特性之減弱，以至於細胞生長時不會互相排斥，甚至可以相互堆積。然而，令人驚異的是在某些條件下，「轉型」細胞卻可回復至部分母細胞的性狀。例如將小鼠胚胎細胞株(C3H mouse embryos)之「轉型」X2 細胞以低細胞密度培養數代，X2 細胞會表現一些母細胞的性狀，甚至喪失了腫瘤生成之能力(Tumorigenicity)，此種癌細胞性狀回復部分正常之現象，即稱為所謂的「腫瘤細胞的回復現象」。

進一步，Berger, J.等人報告中顯示，腫瘤細胞與正常細胞在表面抗原上有很大的差異，而這些差異可被利用成為癌細胞偵測與辨認上的指標<sup>2</sup>。例如具腫瘤誘發性的 HeLa 細胞的表面抗原 p75/150，其具有自磷酸化(Autophosphorylation)活性，而此特性則為許多致癌基因相關之生長因子受體的共同重要特徵。由於在具腫瘤誘發性的子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞中被高度表現，且經由胺基酸序列、限制酵素圖譜、溫度測試等，顯示該 p75/150 係一種 HeLa 細胞的鹼性磷酸酵素

(Alkaline phosphatase, ALP)<sup>3</sup>，因此研究者乃嘗試解析 ALP 表現與腫瘤誘發性之間的關係。其結果，發現在各種不具腫瘤誘發性之 HeLa 人類纖維母細胞的混合種(H/F cell hybrid)當中，若比較具有腫瘤誘發性的細胞株 CGL4 與不具腫瘤誘發性的細胞株 CGL-SD 時，發現前者的 ALP 活性及 mRNA 表現量明顯優於後者，而且，若將 ALP 的 DNA 重新送入該不具腫瘤誘發性的細胞株 CGL-SD 中，則又會使 CGL-SD 的 IAP 活性升高並具有腫瘤誘發性。

另外，該研究並顯示 HeLa 細胞的 ALP 基因之抑制基因，有可能存在於第 11 號染色體上。亦即，失去一條第 11 號染色體的非腫瘤誘發性 H/F 細胞混合種後代，可導致 ALP 的不正常表現與具有腫瘤誘發性。但是，若將第 11 號染色體重新送入腫瘤誘發性的 H/F 細胞混合種後代，則又會再度抑制 ALP 表現與腫瘤生成。由此種 ALP 表現與腫瘤誘發性的高度相關性顯示，抑制腫瘤誘發性的基因可能會影響 ALP 的調控，或者調控該二種性狀之基因係位於同一條染色體距離極相近的位置上。

在此同時，Marc. S. Mendonca 等人分析腫瘤生成之指標則發現，ALP 活性不一定與腫瘤生長的速度成正比，腫瘤達到遲滯期 (Lag phase, 即  $500\text{mm}^3$ ) 所需之時間，在低 ALP 活性 (小於 20% 相對活性) 狀態下會明顯增長<sup>4</sup>。這可能是腫瘤之形成只需高於某個限制門檻的 ALP 活性表現，而若將一個低 ALP 表現的細胞 GIM-1B 作腫瘤再重組(Tumor reconstitution)，結果發現腫瘤雖快速增生但並不伴隨著 ALP 之高度表現。另外，送入高度表現載體(Highly expression vector)之細胞株 GIM-1B，雖然表現大量的 ALP，但其腫瘤遲滯時間(Tumor lag time)並未減少。由此，推測 ALP 在腫瘤增生過程中係必要但非充分之條件，當中應另有其他相關基因的參與。

再者，Vadim A. Lavrovsky 等人在以 UVC 射線誘導 CGL-SD 突變為腫瘤誘發性細胞(UV-12)的研究中，成功地以低密度的培養篩選出 UV-12 的回復株(UV-12-RM-1)<sup>5-7</sup>，如先前所述，回復株 (UV-12-RM-1) 可回復部分的 CGL-SD 的性狀 (如外觀、非腫瘤性、及 ALP 活性之降低)，但從 UV-12-RM-1 的子代選殖株中，則又可篩選出具有高 ALP 活性與高腫瘤誘發性的細胞，推測這可能是由於放射線所誘導的腫瘤細胞乃處於遺傳的不穩定狀態，因此才會因為環境的改變 (Epigenetic control) 而造成回復、逆回復等表現型轉移之現象。

在此同時，近年來開始有研究嘗試將中草藥應用在癌症之治療上<sup>11</sup>。研究人員並進一步發現特定的中草藥可能具有某種抗癌效果，但

發現在經過一定量的藥物處理過後會出現細胞內縮、染色質聚集、核酸片段化、及產生不可溶性殼(insoluble shell)等細胞程式性死亡(Apoptosis)特徵<sup>8-10</sup>。此外，並針對藥物處理後細胞的細胞週期進行分析，發現細胞被停滯在 G0/G1 期。此顯示此藥物的抑癌作用，初期係誘發細胞程式性死亡，而後期則將細胞週期捕捉並使其停滯於 G0/G1 期。因此，上述先前所使用的小柴胡湯以及補中益氣湯之抗癌策略係誘致細胞程式性死亡以殺死細胞，並未思及誘使腫瘤細胞回復至某種正常狀態，而以相當程度的正常細胞狀態繼續存活。如此一來，就與前述傳統的化學療法或放射療法的缺點相去不遠矣。

據上所述，潛藏於癌細胞中之回復能力，強烈暗示了一不同於傳統「直接殺死癌細胞」的癌症治療方法。亦即，考慮是否可以利用某種方法，來啟動腫瘤細胞中之回復作用機制，讓癌細胞不表現腫瘤特性，甚至於恢復成相當程度之正常細胞。然而，究竟利用何種藥物或何種機制方可達到上述目標，則至今尚無任何人提出相關之見解。

### 研究目的

本研究的主旨為本年度先以樟芝利用本實驗室之癌症逆轉之細胞模式來建立之癌症逆轉為中草藥特色評估模式。

其研究的目標：

1. 測試樟芝對於癌細胞之細胞毒性。
2. 測試樟芝對於癌細胞之腫瘤標誌 ALP 之影響。
3. 探討對樟芝於癌細胞逆轉性狀產生之現象。
4. 利用流式細胞儀來分析樟芝對於癌細胞之細胞週期之影響。
5. 利用流式細胞儀來分析樟芝對於癌細胞之細胞自然死亡之評估。
6. 探討樟芝對癌細胞逆轉在動物模式活體實驗之評估。

實驗組別共分為五組：

- 第一組：以注射等量的 CGL1 細胞作為 negative control 實驗；每 48 小時給予餵食等量的 ddH<sub>2</sub>O。
- 第二組：將人類子宮頸癌細胞先以樟芝(1500 µg/ml)處理 48 小時後再注入後肢大腿皮下(10<sup>6</sup> cells in 100 µl PBS)。
- 第三組：將人類子宮頸癌細胞(10<sup>6</sup> cells in 100 µl PBS)注入後肢大腿皮下，每 48 小時給予餵食樟芝(75 µg)。
- 第四組：將人類子宮頸癌細胞(10<sup>6</sup> cells in 100 µl PBS)注入後肢大腿皮下，每 48 小時給予餵食樟芝(150 µg)。
- 第五組：以注射等量的人類子宮頸癌細胞作為 positive control 實驗；

每48小時給予餵食等量 ddH<sub>2</sub>O。

7.以 DNA 聚合酶連鎖反應來探討樟芝對癌細胞基因表現的影響。

## 貳、材料與方法

### 一、藥物製備：

固態栽培樟芝乾燥粉末由臺北醫學大學蘇慶華老師所提供(樟芝為台灣特有種)。取固態栽培的樟芝含培養基材及菌層，將其烘乾之後，磨粉後以甲醇20V/W過濾，經濃縮後再加水溶解，再過濾水可溶物質，再予以凍乾。在經由凍乾後成為乾燥的褐色粉末，置放於-20℃保存。使用時將粉末充分攪拌溶解在二次水裡，配製成濃度為10 mg/ml的藥物溶液。再以0.22 μm的濾膜過濾，成為無菌狀態。藥物溶液則置於-20℃保存。

### 二、細胞存活率試驗：

#### 1.MTT反應分析：

MTT 是一種水溶性的tetrazolium salt，當溶解於PBS緩衝液中，會形成淡黃色溶液。利用活細胞粒腺體(dehydrogenase)活性，可以切斷MTT結構上的tetrazolium ring，將之轉換成藍紫色水不溶性的formazan結晶<sup>12</sup>。當結晶形成後，加入可將結晶溶解之溶液(如10% SDS 溶液)後，MTT formazan之生成量便可由波長570nm之吸光值測得，細胞內酵素活性越高，反應生成之formazan量越多，吸光值也越高。比較實驗組與對造組之吸光值，可反映細胞經藥物處理後之存活狀態。

2.實驗步驟：各種細胞株依造 $5 \times 10^4$ /well 之密度種殖於24-well的培養皿，經過12小時靜置培養後，加入含各種不同濃度之樟芝之新鮮培養液，經48小時培養，將含藥之培養液吸除並以PBS緩衝液洗去殘留之培養液後，加入由PBS緩衝液配製的MTT 溶液(濃度為0.5 mg/ml，每個well 0.2 ml)，於37℃培養4小時後，再加入0.15 ml之10% DMSO，以便將結晶溶解，測定570 nm 之吸光值。

### 三、鹼性磷酸酵素 (Alkaline phosphatase, ALP) 分析

將樟芝處理過之細胞從中取 $5 \times 10^4$ 個細胞種植於24井盤中4小時。以磷酸緩衝鹽溶液(PBS)洗滌二次，加入0.6毫升之對-硝基酚(16mM)至各井中。在第60分鐘，由各井中取得100 μl並測量405nm之吸光度。

基於對-硝基酚之減少係數，一單位之鹼性磷酸酵素活性被定義成標準反應60分鐘、0.6毫升時， $A_{405} = 1.0$ 之情形<sup>4,7</sup>。

#### 四、腫瘤細胞回復(Reversion rate)分析

細胞株以前述不同劑量之樟芝處理48小時之後，收取細胞並種植於新鮮的各培養基中，並使濃度為500細胞/培養基。約10天後可形成細胞之群落。為使細胞群落易被染色起見，以PBS潤洗細胞二次再以2%對甲醛固定。在每一培養盤中加入2.5毫升之威斯頓藍，並妥為覆蓋其表面達3分鐘以成功染色。其後，移除威斯頓藍並以蒸餾水洗淨二次後，計算該藍色之細胞群落數目。進一步，加入3毫升之結晶紫後靜置3分鐘，再水洗、計算全部的紫色落數目<sup>13</sup>。

#### 五、流式細胞儀技術：

流式細胞儀技術是腫瘤生物學研究的主要工具之一，被廣泛地應用於臨床樣品檢查分析，為腫瘤的先期診斷、藥效評估和預後診斷提供重要訊息。流式細胞儀之設計可以針對單一細胞進行偵測，若配合適當染劑，更可同時執行多種功能之評估，集準確與快速之優點，可以更有效率的整合藥物處理細胞後的影響。Propidium iodide (PI)是一種螢光染劑，可專一性的鍵結到核酸(nucleic acids)而廣泛應用於流式細胞儀技術；正常狀況下，細胞膜維持完整，PI無法自由穿透細胞之細胞膜，故可以併入其他實驗(如：與FITC 標記之annexinV 共同偵測，以區別存活、壞死或凋亡之細胞)或者與其他活細胞染劑共同使用，評估細胞存活狀態。若以酒精將細胞膜加以打洞固定後，進入細胞內之PI 則可與核酸進行鍵結，利用流式細胞儀偵測PI所發出之螢光，則可以反映細胞內DNA狀態或進行細胞週期的分析<sup>13</sup>。

實驗步驟：將人類子宮頸癌細胞  $1.0 \times 10^6$ /dish之密度種殖於100-mm的培養皿，經過12小時靜置培養後，加入含樟芝之新鮮培養液，經48小時培養，將含藥之培養液移至離心管中，細胞以PBS緩衝液清洗細胞二次後，經2ml Trypsin-EDTA置於37°C培養箱處理2分鐘後，輕拍培養皿底部，使細胞飄起，加入新鮮的培養液以中和trypsin-EDTA之作用，以吸量管小心抽吸數次使細胞成為單一顆粒，再將所有液體裝到離心管內，室溫1000×g 離心5分鐘。去除上清液後，以PBS緩衝液清洗，1000×g 離心5分鐘(重複此步驟一次)，去除上清液後，將細胞懸浮於1ml的PBS緩衝液，再加入5 ml 的70%酒精以固定細胞(一滴一滴緩慢加入離心管使細胞均勻懸浮於酒精中)，置於

4°C或-20°C至少30分鐘以上。將固定好的細胞以1000×g離心5分鐘，去除上清液後，以PBS緩衝液清洗，1000×g離心5分鐘(重複此步驟一次)，去除上清液後，輕震離心管使細胞沈澱成為單一細胞懸浮，加入0.5ml含propidium iodide (PI, 50 mg/ml)的PBS緩衝液做為染色液，再加入已回溫的RNase-DNase free 溶液(最終濃度為4mg/ml)，小心震動離心管使細胞均勻懸浮，將離心管置於室溫，保持避光狀態40分鐘後，將此細胞懸浮液裝到康氏管內，以FACSCalibur流式細胞儀分析每個樣品的細胞週期。

## 六、蛋白質西方墨點法

轉印好蛋白質的 PVDF membrane 先置於 blocking solution 中，於 4°C 冰箱中均勻振盪 18 小時，競爭掉非特異性的蛋白質結合反應。以 Washing buffer 清洗二次，再以 blocking solution 作為溶劑，將一次抗體稀釋液加至 PVDF membrane 中，使其均勻的覆蓋於 membrane 上，於 4°C 冰箱中均勻振盪 12 小時，此時蛋白質已接上一次抗體。以適量的 0.05 % PBST 清洗六次，每次 15 分鐘。依不同的一次抗體，加入特異作用的二次抗體稀釋液，稀釋倍數為 5000 倍。於室溫下作用 60 分鐘。反應之後，同樣以適量的 0.05 % PBST 清洗六次。由於所使用的二次抗體上連結的是 horse- radish peroxidase，故使用 enhanced-chemiluminescence (ECL)的酵素系統來偵測訊息的強弱。將 ECL 溶液 (ECL1 及 ECL2)以體積 1：1 等比例混合，並將含有蛋白質之 PVDF 正面沾染混合好之 ECL 溶液，務必完全浸潤，同時以保鮮膜完整包裹，使用 Kodak BioMax light film 壓片、洗片。以此方法來檢視細胞內各個欲測蛋白的變化量<sup>13</sup>。

## 七、動物實驗

本研究中使用之雌性非肥胖性糖尿病之嚴重免疫不全老鼠 (Non Obese Diabetes Severe combined immunodeficient, NOD-SCID mice、C.B.17/ICR 背景、6-8週週齡、每隻老鼠體重約 $20 \pm 2$ 公克)購自台灣大學或慈濟大學實驗動物中心。在整段實驗期間，所有飼養籠需先經高溫高壓滅菌後方可使用，而且動物均養在無特定病原菌(Specific Pathogen Free, SPF)之環境，並維持恆溫(22-24°C)、恆濕(60-80%)及12小時光照/黑暗週期。動物可以自由攝食經滅菌之動物飼料及去離子水。

實驗設計及流程：將 NOD-SCID 母鼠均分成五組(6 隻/組)，在所

有實驗動物的後肢大腿皮下殖入腫瘤細胞( $10^6$  cells in 100 $\mu$ l)，實驗組動物每 48 小時口服方式給予樟芝；控制組動物則給予等量去離子水。連續觀察一個月以上。每隔七日測定一次老鼠之體重及腫瘤生長大小，並隨時觀察動物行為是有異狀<sup>13</sup>。

## 八、DNA 聚合酶連鎖反應

聚合酵素鏈鎖反應(PCR)是一個利用酵素對特定基因做體外或試管內大量合成的技術。其原理是先在要擴增的 DNA 片段兩端分別設計一個前置引子(forward primer)和反置引子(reverse primer)，然後將溫度提高使得雙股的目標 DNA 變性成單股，在將 primer 與已變性的單股目標 DNA 配對結合後，利用 DNA 聚合酵素(DNA polymerase)以目標 DNA 的兩股分別做為模板(template)來合成新的 DNA 股，如此週而復始，就造成了產物以  $2^n$  的速率增加。以此方法來檢視細胞內各個欲測基因受到不同藥物濃度處理後基因表現的變化程度<sup>13</sup>。

## 參、結果

### 一、細胞存活率(MTT assay)試驗：

圖表的橫座標代表的樟芝藥物濃度；縱座標則代表 O.D.595nm 吸光值所換算出的比值。樟芝處理腫瘤細胞的 IC50 值約落在 1000 $\mu$ g/ml 左右(圖一、A)，之後的細胞存活率也大致維持了一定的存活程度，不會有大量死亡的情形發生，所以一般而言樟芝對細胞的殺傷力是穩定的。(圖一、B)則是說明在類正常細胞(CGL1)在 48 小時之內不同樟芝濃度的藥物對細胞所產生的影響。如此的結果，說明了樟芝在特定的藥物濃度對癌細胞有一定程度的影響，但在影響癌細胞的同時，在特定的藥物濃度及特定的藥物處理的時間點的條件下不致於同時傷害到正常的細胞。

### 二、鹼性磷酸酵素分析：

(圖二、A)的橫座標代表樟芝的藥物處理時間；縱座標則代表 O.D.405nm 吸光值所換算出的比值。HeLa 0400 細胞鹼性磷酸酵素的活性有隨著樟芝濃度的上升有逐漸下降的趨勢。

### 三、腫瘤細胞回復(Reversion rate)分析：

(圖二、B)的橫座標代表樟芝的藥物濃度；縱座標則代表計算出的

腫瘤細胞回復百分比。經過樟芝處理過後，癌細胞逆轉的效果有相當明顯上升的趨勢。而在高濃度的藥物處理下腫瘤細胞回復能力幾乎可以到達百分之百。而且在短時間內逆轉的比例是快速上升的，或許可以推測樟芝對腫瘤細胞的作用，在一定的藥物濃度下在短時間內就會產生明顯的效果，同時腫瘤細胞回復能力隨著藥物濃度提升並趨於穩定。

#### 四、流式細胞儀技術(Flow Cytometry)：

(圖三. A)則是根據 PI 所染到的細胞分析各個不同濃度的樟芝對細胞週期(cell cycle)所產生的影響。以對照組為標準的細胞週期作為基準，再用相同的標準套用在各個實驗組，再換出各個細胞週期(G0、G1、S 及 G2/M phase)實驗組與對照組之間的比值(圖三. B)。結果發現樟芝對細胞週期無明顯影響。

圖表的橫座標(FL1-H)代表染劑 A-V 所染到的細胞；縱座標(FL2-H)則代表 PI 染劑所染到的細胞。根據流式細胞儀(圖三、C)的結果，HeLa cells 經由樟芝處理後，以 PI 及 A-V 雙染法，有細胞毒殺的效果產生，因此可以推測，樟芝對癌細胞的影響，可能並非完全行細胞凋亡的路徑，因此可以更加的推斷樟芝對細胞的作用是進行癌症逆轉的模式。

#### 五、蛋白質西方墨點法(Western Blot)：

HeLa 細胞 p53 有隨著樟芝濃度上升而有明顯的表現趨勢(圖四、A)，但 CGL1 不受樟芝影響(圖四、B)。如此的結果間接證明樟芝能夠強化細胞 p53 路徑抑癌作用的表現。而樟芝對抑癌作用的相關蛋白 p21 不具有影響能力。這樣的結果與流式細胞儀所探討的結果(藥物並非完全誘導細胞行細胞凋亡的路徑)是相符合的。

在探討 HPV E6/E7 主要的致癌基因方面，E6 蛋白及 E7 蛋白均受藥物濃度藥物處理時間而有產生抑制的效果。因此可以判斷，在特定的藥物濃度及作用時間點對癌細胞能夠產生最大的影響力(圖五、B)則是以 Total Lab 程式所換算出實驗組與對照組蛋白質表現量的比值。

#### 六、DNA 聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)：

根據 cDNA 產物的表現量(圖五、A)顯示出樟芝對 HPV-E6 及 E7 基因確實產生抑制的效果。而 E7 基因所受樟芝的抑制情形相較於 E6 基因所受藥物的抑制情形顯得明顯許多。HPV-E6 及 E7 基因是 HPV

最主要的兩個致病基因，E6 及 E7 基因受到藥物作用因而受到抑制，因此樟芝在抑制病毒致病因子的層面，產生一定的影響力。

#### 七、動物實驗：

樟芝應用於治療子宮頸癌的癌症逆轉模式：在一個月內，老鼠體內腫瘤生長的情況，在施打樟芝的組別都有明顯的腫瘤生長抑制效果將整體結果作分析發現樟芝對於腫瘤細胞生長確實是有抑制的效果，而且在特定的藥物濃度及特定的藥物作用時間下，抑制的情況是良好的(圖六)。此外，在全程的實驗過程中，實驗動物的活力及進食情況及體重，並不會因為餵食藥物而有所改變。因此可以推斷，以樟芝作為癌症的治療用藥，在治療的同時，產生危害到實驗動物的副作用似乎很微弱。

### 肆、討論

經由本實驗室已建立的癌症逆轉模式：細胞存活率試驗(MTT 反應)分析、腫瘤細胞回復率(Reversion rate)分析、鹼性磷酸酵素分析、流式細胞儀技術、蛋白質西方墨點法、DNA 聚合酶連鎖反應、動物實驗等實驗法，結果發現樟芝對惡性腫瘤子宮頸癌細胞能有效的緩減其致癌作用，並能產生癌症逆轉的機制。其癌症逆轉的作用機制可能是經由抑制致癌基因 E6 及 E7 的致癌作用及強化抗癌基因 p53 的抗癌作用。藉由探討鹼性磷酸酵素(ALP)活性分析定義出樟芝對於子宮頸癌細胞增殖產生抑制作用並彰顯其癌症逆轉的功效。樟芝對腫瘤細胞的影響部分誘導細胞循細胞毒殺的途徑，而非走向細胞凋亡和造成細胞週期停止。在鹼性磷酸酵素(ALP)活性分析實驗方面結果顯示以樟芝誘導癌細胞的鹼性磷酸酵素(ALP)活性降低的同時，間接加強癌細胞的逆轉作用，因此降低其致癌活性。

於基因層面的探討方面，本研究探討樟芝對於子宮頸癌主要的致癌基因 E6/E7 表現的影響及 p53 抑癌基因的重要抑癌途徑，而非 RB 路徑。結果顯示子宮頸癌細胞經由樟芝處理後 p53 蛋白質表現有增強的趨勢，在此同時 E6 基因則受到抑制。高危險型 HPV E6 蛋白主要是利用 ubiquitin proteasome pathway 將 p53 蛋白水解，當細胞正常功能被抑制時，E6 可以降解 p53。

## 伍、結論與建議

### 結論

本研究闡明了樟芝能夠修復正常的 p53 抑癌作用途徑，並且同時抑制 E6 致癌基因的表現。而樟芝同時也具有抑制 E7 致癌基因表現的功能。因此可以推測，樟芝深具修復抑癌作用機制的潛力。子宮頸癌主要致癌基因 E6/E7 表現一但受到抑制其致病力及侵略性便會大量縮減，經由本研究得知樟芝確實對 E6/E7 有抑制的影響，因此樟芝確實對子宮頸癌能產生一定程度的療效。此外，樟芝適合當作長期治療疾病的用藥，因其在治療疾病的同時，並不會同時傷害到正常細胞的運作，也不同于一般化療藥所具有的嚴重副作用。

在模擬臨床試驗的動物實驗的結果顯示：在樟芝應用於治療子宮頸癌的癌症逆轉模式方面：對腫瘤生長外觀而言發現在適當的藥物施打劑量條件下對腫瘤生長就能產生明顯的抑制效果。治療期間實驗動物的活動力、食慾、外觀及體重並沒有太大的差異性，如此的結果迥異於傳統的化學療法及放射療法所產生的副作用。

### 建議

計畫從開始進行至計畫結束過程尚順利。實驗上的困難皆已排除，並已發現具體的研究成果。中醫藥委員會在計畫進行中及計畫結束時所舉行的口頭報告，能夠及時給予討論及建議並隨時修正計畫進行的方向，對每一個計畫都有非常大的助益。因此建議今後也能如此舉辦口頭期中及期末報告，以利計畫順利進行。

### 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(CCMP95-RD-007)提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

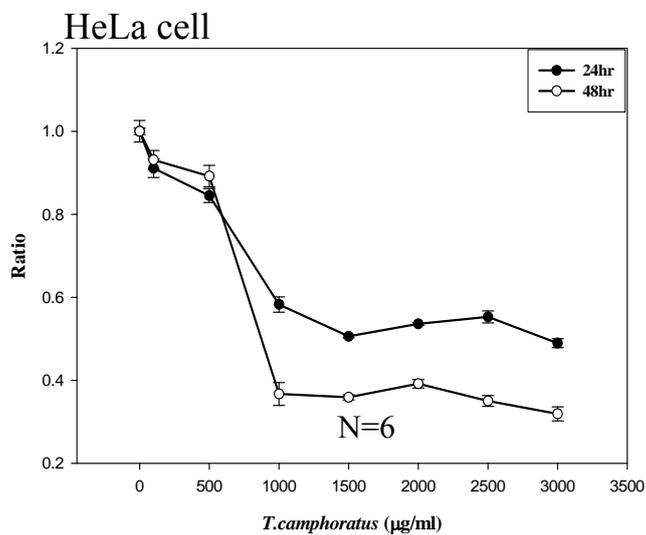
## 陸、參考文獻

1. Brouty-Boye, D., Gresser, I., and Baldwin, C. Reversion of the transformed phenotype to the parental phenotype by subcultivation of X-ray-transformed C3H/10T1/2 cells at low cell density. *Int.J.Cancer*, 24: 253-260, 1979.
2. Berger, J., Garattini, E., Hua, J. C., and Udenfriend, S. Cloning and sequencing of human intestinal alkaline phosphatase cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84: 695-698, 1987.
3. Latham, K. M. and Stanbridge, E. J. Identification of the HeLa tumor-associated antigen, p75/150, as intestinal alkaline phosphatase and evidence for its transcriptional regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 87: 1263-1267, 1990.
4. Mendonca, M. S., Antoniono, R. J., Latham, K. M., Stanbridge, E. J., and Redpath, J. L. Characterization of intestinal alkaline phosphatase expression and the tumorigenic potential of gamma-irradiated HeLa x fibroblast cell hybrids. *Cancer Res.*, 51: 4455-4462, 1991.
5. Lavrovsky, V. A., Guvakova, M. A., and Lavrovsky, Y. V. High frequency of tumour cell reversion to non-tumorigenic phenotype. *Eur.J.Cancer*, 28: 17-21, 1992.
6. Shu-Hung Lin, I.-C. C. C.-N. W. C.-M. C. Effects of a Chinese Herbal Medicine Yi-Kang-Kong on TGEV Infectivity in Tissue Culture . *J.Chinese Society of Veterinary Science*, 26: 110-116, 2000.
7. Sun, C., Antonionio, R. J., and Redpath, J. L. Reversion of UVC-induced tumorigenic human hybrid cells to the non-tumorigenic phenotype. *Eur.J.Cancer*, 32A: 322-327, 1996.
8. Tamaki, T., Naomoto, Y., Kimura, S., Kawashima, R., Shirakawa, Y., Shigemitsu, K., Yamatsuji, T., Haisa, M., Gunduz, M., and Tanaka, N. Apoptosis in normal tissues induced by anti-cancer drugs. *J.Int.Med.Res*, 31: 6-16, 2003.
9. Yano, H., Mizoguchi, A., Fukuda, K., Haramaki, M., Ogasawara, S., Momosaki, S., and Kojiro, M. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res.*, 54: 448-454, 1994.

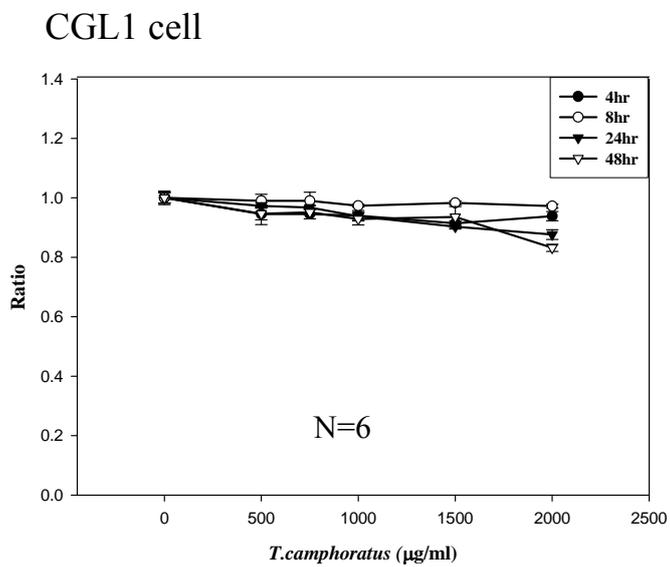
10. Kao, S. T., Yeh, C. C., Hsieh, C. C., Yang, M. D., Lee, M. R., Liu, H. S., and Lin, J. G. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. *Life Sci.*, 69: 1485-1496, 2001.
11. Normile, D. Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine. *Science*, 299: 188-190, 2003.
12. H.Hu, N.S. Ahn, X. Yang, Y.S. Lee, K.S. Kang, Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell, *Int. J. Cancer* 102 (2002)250–253.
13. Win-Ping Denga, Ming-Wei Chaoa, Wen-Fu Laia, Correction of malignant behavior of tumor cells by traditional Chinese herb medicine through a restoration of p53. *Cancer Letters* (2005) 1–13

圖、表

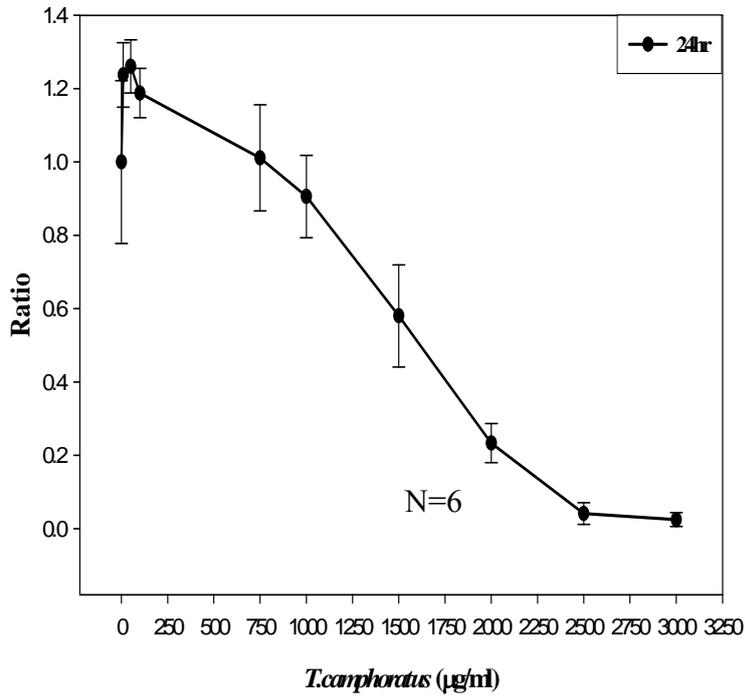
圖一、A



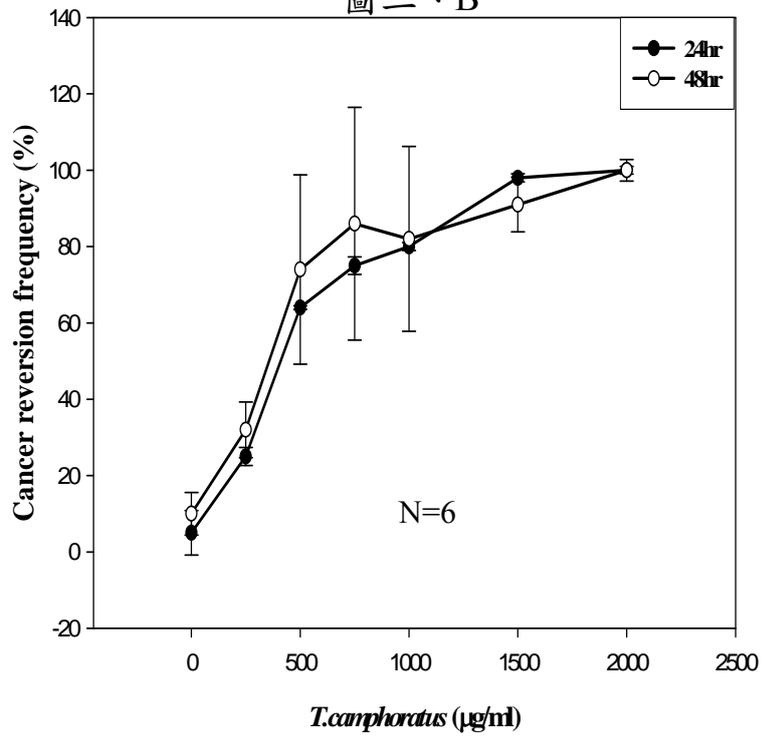
圖一、B



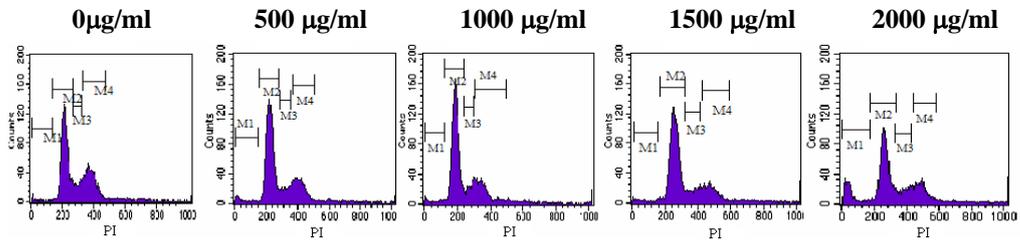
圖二、A



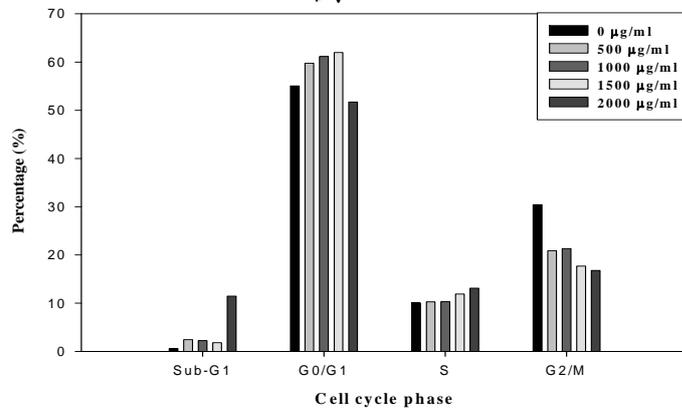
圖二、B



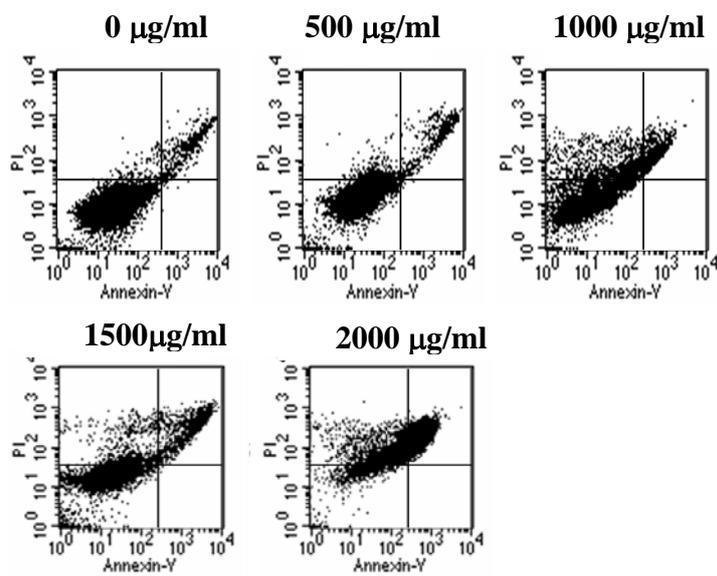
圖三、A



圖三、B



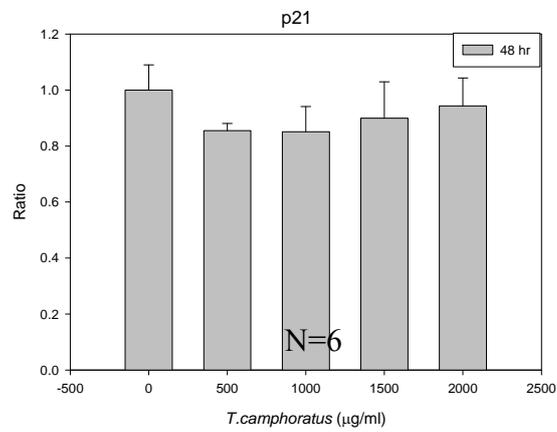
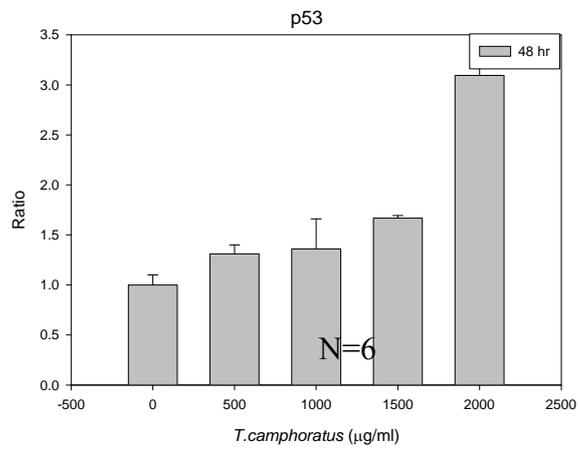
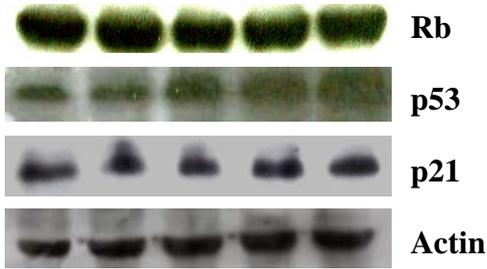
圖三、C



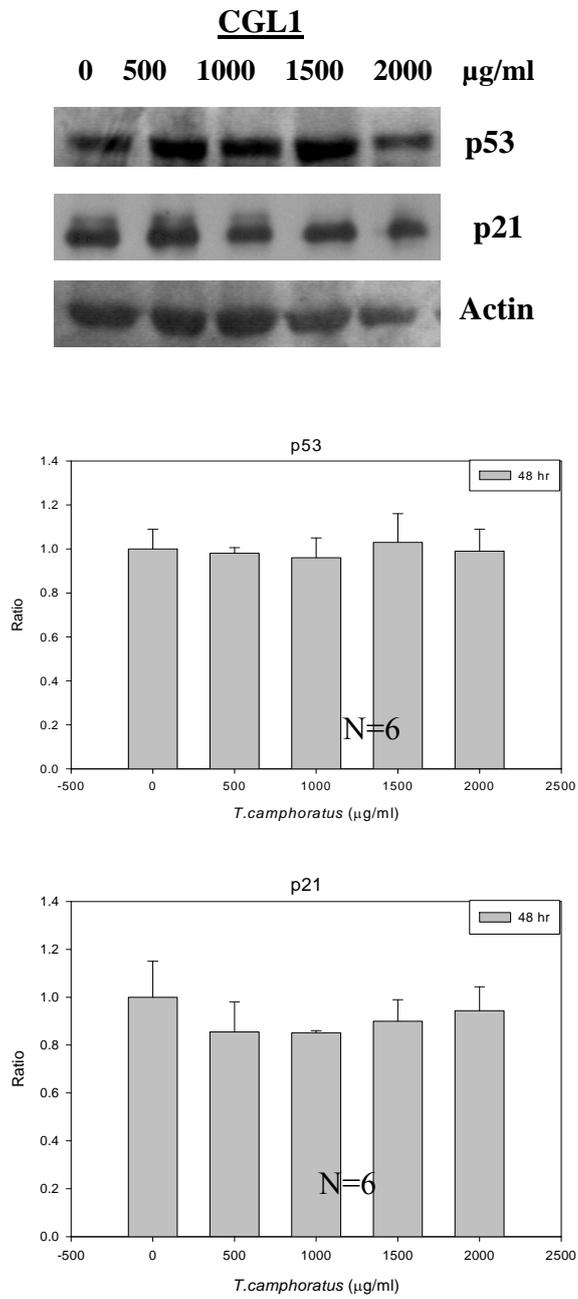
圖四、A

**HeLa**

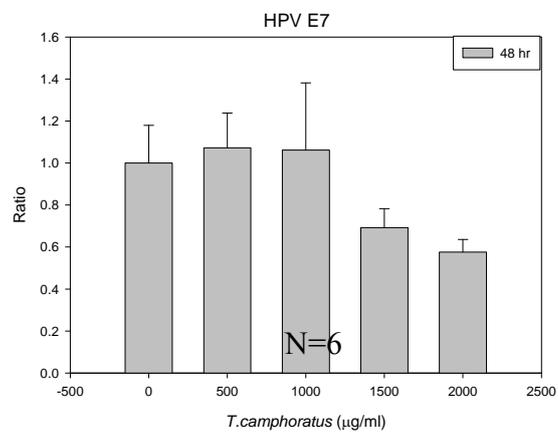
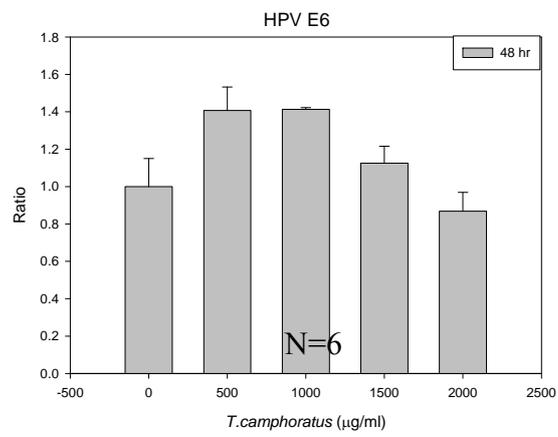
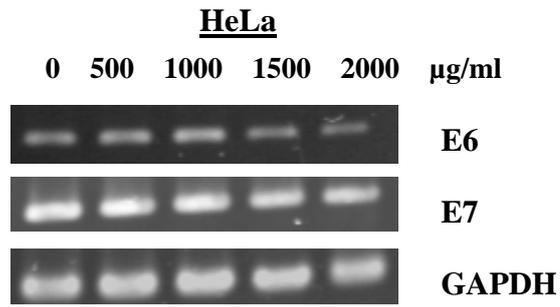
0 500 1000 1500 2000  $\mu\text{g/ml}$



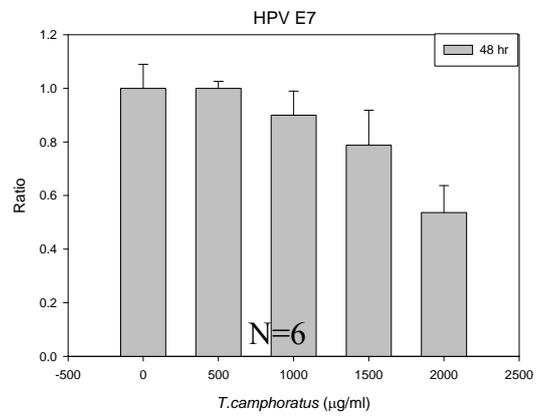
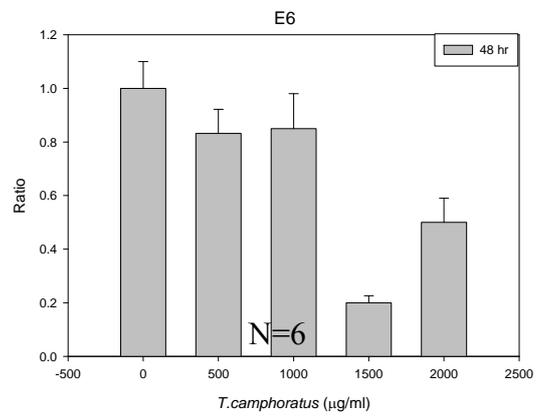
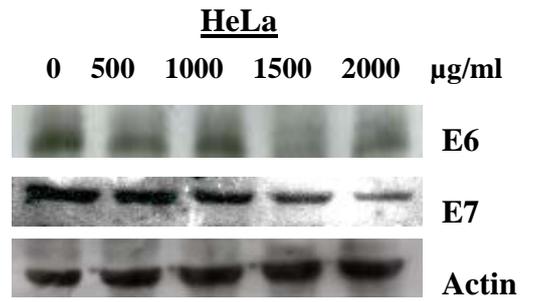
圖四、B



圖五、A



圖五、B



圖六

