

編號：CCMP95-RD-210

# 中藥材黃連組成物對肺癌及肝癌放射線治療動物模式之免疫調控因子基因表現

成佳憲 醫師

國立台灣大學(附設醫院腫瘤醫學部)

## 摘要

黃連為一般民眾熟知的抗發炎中藥材。先前的研究中，我們已經發現黃連萃取物對於放射線治療之動物模式具有降低發炎反應分子 IL-6 及 PGE2 的作用。在本計畫中我們進一步分析十種黃連組成分：小蘗鹼 (berberine)、黃連鹼 (coptisine)、掌葉防己鹼 (palmatine)、藥根鹼 (jatrorrhizine)、表小蘗鹼 (epiberberine)、甲基黃連鹼 (worenine)、非州防己鹼 (columbamine)、木蘭花鹼 (magnoflorine)、阿魏鹼 (ferulic acid)、氯原酸 (chlorogenic acid)，在放射線治療的輔助角色以釐清黃連應用於輔助腫瘤放射線治療之免疫調控反應的可行性及其分子機轉。第一部分利用小鼠肝癌細胞株 BNL 植入 BALBc/J 與小鼠肺癌細胞株 LLC 植入 C57BL6/J 小鼠腿部，兩種動物模式探討黃連組成物對於腫瘤放射線治療的輔助效果，實驗結果顯示黃連組成物 (100mg/kg) 管餵，對於血中發炎反應分子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 PGE-2 濃度有不同的生物效應。第二部分利用細胞模式探討黃連組成物是否改變細胞對放射線處理的敏感性，實驗結果顯示 chlorogenic acid 能增強放射線誘發 BNL 與 LLC 細胞凋亡的比例。第三部分為利用細胞模式探討黃連組成物是否改變細胞受放射線處理所引發的免疫調控因子基因表現。研究結果顯示黃連組成物對放射線直接誘發血管內皮細胞產生 IL-6 或 A549 細胞產生 PGE2 表現之效果與放射線間接誘發共同培養中的巨噬細胞 (THP-1, RAW264.7) 產生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 Cox-2 之作用不同。第四部分利用探討黃連組成物是否細胞受放射線處理時細胞內與免疫調控因子基因表現有關的訊息傳遞分子的活化。實驗結果顯示黃連組成物中確實具

有能抑制免疫調控因子 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 活化的分子存在。綜合上述動物與細胞試驗結果顯示黃連組成物中確實具有能對肺癌及肝癌放射線治療動物模式之免疫調控因子基因 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2/PGE2) 產生調節作用的分子存在，其作用機轉與調控 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 活化有關。

關鍵詞：中藥材、黃連、放射線治療、抗發炎

編號：CCMP95-RD-210

# **Effects of Chinese herb *Coptis chinensis*'s components on inflammatory cytokine regulation in animal models with radiotherapy to lung cancer and hepatoma**

Chia-Hsien Cheng

Department of Oncology, National Taiwan University Hospital  
and National Taiwan University College of Medicine

## **ABSTRACT**

Chinese herb *Coptis chinensis* has been traditionally used for anti-inflammatory and anti-bacterial purposes. In this study, we test its potential role in combination with radiotherapy for cancer treatment. We investigate the adjunct therapeutic effect of ten pure components from *Coptis chinensis*; berberine、coptisine、palmatine、jatrorrhizine、epiberberine、worenine、columbamine、magnoflorine、ferulic acid and chlorogenic acid in animal models to evaluate the mechanism of radio-sensitization and immune regulation. In the first part, the mouse hepatoma cell line BNL and lung cancer cell line LLC were injected into BALBc/J and C57BL6/J strain mice, respectively, and were administrated with different pure components from *Coptis chinensis*. The results indicated that pure components from *Coptis chinensis* had different biological effects on serum levels of TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 and PGE-2. In the second part, by using annexinV staining, we found that chlorogenic acid could enhance the radio-sensitivity through enhancing the radiation induced BNL and LLC cell apoptosis. In the third part, we clarified the effect of different pure components from *Coptis chinensis* on radiation induced HUVEC IL-6 expression and A549 cell PGE-2

expression, as well as the effect on macrophage TNF-alpha · IL-1beta · IL-6 and PGE-2 expression in co-culture system. The results showed that the pure components from *Coptis chinensis* have different effects on A549, HUVEC, and macrophage (THP-1 and RAW264.7). In the fourth part, we investigated the effect of pure components from *Coptis chinensis* on transcriptional factor NF-kB and AP-1 activities by luciferase assay. The results revealed that some pure components from *Coptis chinensis* did have inhibitory effect on radiation induced NF-kB and AP-1 activities. In conclusion, among the ten pure components from *Coptis chinensis*, some of them could inhibit the expression of inflammation cytokine TNF-alpha · IL-1beta · IL-6 and Cox-2/PGE-2 expression possibly through regulating NF-kB or AP-1 activities. Different components from *Coptis chinensis* showed the inhibition or activation effects. However, some components somehow reflect the anti-inflammatory property of *Coptis chinensis* as well as its traditional role.

Keywords : Chinese herb, *Coptis chinensis*, radiotherapy,  
anti-inflammation

## 壹、前言

放射線治療為癌症治療中安全性最高的方式。腫瘤治療效果可由腫瘤指標生化檢查或斷層掃描進行評估。由於放射線本身即具有良好的治療效果，而且不必考慮測試藥物與其他藥物產生不可預知的作用，因此放射線治療為探討中藥材在腫瘤治療輔助應用上的最佳模式。腫瘤放射線治療過程中如何增強腫瘤細胞對放射線治療的感受性與減低對正常組織的損傷是極需解決的兩大問題，免疫調控反應是目前被研究認為同時與這兩個問題有最大的關聯性的生理反應，也就是放射線治療引發的免疫調控反應可能對腫瘤細胞有利但卻對正常組織有害。近年來人體內組織的免疫調控反應被認為與癌症的產生有關（參考文獻 1），主要的理論包括：一、免疫調控反應過程中的過氧化物與自由基可能是導致基因突變的重要因素（參考文獻 2）。二、腫瘤細胞在癌化過程中轉型為能利用免疫調控反應分子的形式（參考文獻 3）。三、免疫調控反應分子與腫瘤的促血管新生能力與轉移侵襲能力具有高度的相關性（參考文獻 4, 5）。以上的研究結果顯示免疫調控反應分子可能在癌化過程的起始期(initiation)促進期(promotion)及惡性化的進展期(progression)中都具有角色。最新的臨床研究與基礎研究也顯示癌症治療過程中的過度免疫調控反應與病患的惡病質(cachexia)有高度相關性(參考文獻 6, 7, 8)這樣的理論已經逐漸被接受並已有利用免疫調控藥物與放射線治療併用的臨床測試進行中（參考文獻 9）。

黃連為一般民眾熟知的中藥材，而且其價格不高，屬於人人皆有能力使用的保健性中藥材。南朝的陶弘景曾有“久服長生”的說法。此外，黃連是中國大陸收錄於國家基本藥品目錄，是使用上非常安全的中藥材。現行腫瘤治療中，約有 60%以上的癌症患者需接受放射線治療。本計畫所提之黃連組成物不論結構或比例都很清楚明確，而且由相關文獻資料顯示其具有抗發炎、殺菌等免疫調節特性，我們期望在此科學性系統性的研究下利用黃連組成分，釐清黃連應用於輔助腫瘤放射線治療之免疫調控反應的可行性及其分子機轉。以提供其黃連是否可作為接受過腫瘤放射線治療患者長期服用之保健性中藥的科學依據。黃連的名稱由來根據古書所記載為，其“根株叢延蔓相屬，有數百株共一莖者，故名連。黃連的英文名稱為 *Coptis Root* 或 *Chinese Goldthread*，是極有價值之藥用植物其特色為苦聞天下，黃連的根莖裡大約含有 7%的黃連素，為其苦味的來源。黃連主要產於中

國的四川、西藏、湖北、江西、陝西、山西等地其中四川的產量占 80% 以上。黃連在植物學上的分類屬於毛茛科植物，學名為 *Coptis chinensis* Franch. 主要具藥效的部位為植物體的根莖。黃連早在兩千多年以前即被當做藥材、在中藥的使用上主要被認為具有瀉火，燥濕，清熱、降火、燥濕、解毒、清心除煩、殺蟲、菌痢、熱瀉腹痛、肺結核、下血、消渴、疔積、蛔蟲病、百日咳、咽喉腫痛、赤眼、口瘡、癰疽瘡毒、濕疹、湯火燙傷等多種用途，是味歷史悠久的傳統中藥，《神農本草》中就將黃連列為“上品”。黃連與其他藥材配合，可治多種疾病。如黃連配伍百草霜，可治療濕熱下痢膿血；黃連與香附，泛治氣滯諸病；黃連與蘇葉，治療濕熱互結，肺胃不和，幹惡嘔吐；配獨頭蒜，治療臟毒；配木通竹葉則清心瀉火，治療心經熱感、面赤口渴飲冷、心胸煩熱不眠、口舌生瘡、小便赤澀等症。著名醫學家李時珍總結前人用藥的經驗，概括為“黃連治目及痢為要藥，古方治痢香連丸，用黃連、木香；姜連散，用干姜、黃連；治肝火，用黃連、吳茱萸；治伏暑，用酒煮黃連；治下血，用黃連、大蒜；治口疾，等皆是一冷一熱，一陰一陽，寒因熱用，熱因寒用，主輔相佐，陰陽相濟，最得制方之妙”至今在處方用名上，還保留著黃連、姜黃連、酒黃連、吳茱萸連等傳統名稱，可見古人對使用黃連的研究已經到相當精細的程度。歷代醫學家都對黃連有很高的評價如南朝的陶弘景曾有“久服長生”之說。明代繆希雍有“病酒之仙藥，滯下之神草”的讚譽。黃連除了古籍中的用途，在免疫調控上的相關研究包含

1. 抗病原微生物：黃連及其有效成分小蘗鹼具有廣泛抗病原菌作用，對多種革蘭氏陽性及陰性菌、結核桿菌及真菌均有抑制或殺死作用，對腸內細菌群包括金黃色葡萄球菌及腸傷寒菌等也有有強殺菌、抗菌作用。黃連及小蘗鹼抗菌作用的機理可能是通過影響細菌代謝的中間過程產生的。
2. 抗病毒：黃連煎劑對流感病毒、B 型肝炎病毒皆有抑制作用；小蘗鹼對砂眼病毒具有抑制作用。
3. 抗阿米巴：黃連煎劑和小蘗鹼均具有抗阿米巴作用。
4. 止瀉作用：小蘗鹼能抑制霍亂毒素引起迴腸水分及鹽類分泌現象。
5. 抗消化性潰瘍作用：黃連水提取物以皮下注射或經口給藥，對小白鼠以水浸拘束誘發之胃潰瘍有抑制效果，三黃瀉心湯之抗潰瘍作用，將黃連除去，抗潰瘍效果即減弱。小蘗鹼對幽門結紮胃潰瘍，有抑制效果。
6. 抗發炎：黃連之甲醇提取液及小蘗鹼的抗炎作用可能與抑制中性粒細胞趨化、產生活性氧的功能，抑制自由基產生，降低 PLA2 活性，減少炎症組織中 PGE2 的產生等多種因素有關（參考文獻 10 ~ 17）。

先前的研究中，我們已經發現黃連萃取物對於放射線治療之動物模式具有降低發炎反應分子 IL-6 及 PGE2 的作用。因此，在本計畫中我們運用科學性的試驗方法，進一步分析黃連組成分（八種生物鹼：(1) 小蘗鹼(berberine)、(2) 黃連鹼(coptisine)、(3) 掌葉防己鹼(palmatine,)、(4) 藥根鹼(jatrorrhizine)、(5) 表小蘗鹼(epiberberine)、(6) 甲基黃連鹼(worenine)、(7) 非州防己鹼(columbamine)、(8) 木蘭花鹼(magnoflorine)，與兩種非生物鹼:(1) 阿魏鹼(ferulic acid)(2) 氯原酸(chlorogenic acid)，在放射線治療的輔助角色以釐清黃連應用於輔助腫瘤放射線治療之免疫調控反應的可行性及其分子機轉。

## 貳、材料與方法

放射源：本研究計畫主要運用天然放射源鈷六十為放射線能量來源，運用紅外線定位方式進行準確的放射能量照射定位，並以水盆方式使照野散射能量均勻。

黃連組成物：主要含有八種生物鹼(alkaloids) (1) 小蘗鹼(berberine,)、(2) 黃連鹼(coptisine)、(3) 掌葉防己鹼(palmatine)、(4) 藥根鹼(jatrorrhizine)、(5) 表小蘗鹼(epiberberine)、(6) 甲基黃連鹼(worenine)、(7) 非州防己鹼(columbamine)、(8) 木蘭花鹼(magnoflorine)。與兩種非生物鹼:(1) 阿魏鹼(ferulic acid)(2) 氯原酸(chlorogenic acid)。由 Sigma 公司購得。無法購得者由協同主持人台大化學系郭悅雄教授分離純化。使用之劑量將以各種黃連組成物在黃連每日合理用量比例下進行。本研究所使用之黃連組成物有五種可由 Sigma 化學藥品公司購得其品管及組成份鑑定具有一定之品質保證。另外五種無法購得者將委請協同主持人台大化學系郭悅雄教授分離純化者，由於其結構與物理化學性質均已被發表，因此在品管及純度鑑定上也將具有相當之品質保證。

動物試驗的鼠種：C57BL/6 由台大醫學院動物繁殖中心提供，實驗過程均養殖於台大醫學院動物實驗中心，整體動物實驗設計與規劃通過台大醫學院動物試驗倫理委員會審查。將小鼠肝癌細胞株 BNL 或小鼠肺癌細胞株 LLC 腫瘤細胞，兩種腫瘤細胞分別植入 BALBc/J 與 C57BL6/J 小鼠腿部、在腫瘤大於 4 mm(直徑)時開始進行療程，運用放

射線能量，僅對小鼠腿部進行放射線治療。

實驗結果統計：本研究之動物試驗每個組別以 5 隻進行，細胞與分生試驗均至少重複三次，實驗結果以 t test 進行統計分析，統計分析時以 RT(處理放射線組)為各實驗組之比較標準。定義  $p < 0.05$  為統計有意義，以“\*”標示。

#### 實驗設計

第一部分為利用動物模式探討黃連組成物對於腫瘤放射線治療的輔助性效果，以腫瘤生長曲線及動物血清中發炎反應分子 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 PGE-2 的變化為評估標準。研究設計及方法：此部分我們以老鼠肝癌及肺癌細胞進行動物試驗。

老鼠肝癌細胞株為 BNL，老鼠肺癌細胞株為 Lewis lung carcinoma (LLC)。兩種腫瘤細胞分別植入 BALBc/J 與 C57BL6/J 小鼠腿部，腫瘤直徑約 4mm 時開始管餵黃連組成物兩天後開始給予如同臨床使用之放射線治療（每天照射共五天）。由小鼠之腫瘤生長曲線統計黃連組成物是否具有對腫瘤放射線治療的輔助性效果。在實驗過程中同時紀錄小鼠體重變化、收集小鼠血液分離其血清以 EIA 的方式分析其血液中內產生之發炎反應蛋白質 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 PGE-2 的變化。

動物腫瘤組織保存：實驗結束後，所有的腫瘤組織在從手術取出後稱重記錄，以福馬林固定，進行後續石蠟包埋及組織切片染色等步驟進行。

第二部分為利用細胞模式探討黃連組成物是否改變腫瘤細胞與正常細胞對放射線處理的敏感性，以細胞存活率及生長曲線的變化為評估標準。

研究設計及方法：腫瘤細胞培養：此部份之研究將加入人類細胞株進行機轉探討。小鼠肝癌細胞株 BNL，小鼠肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma (LLC) 以及源自 ATCC 的 2 株人類肝癌 (HepG2、Hep3B)，2 株人類肺癌 (A549、CRL-5831)，1 株正常肝細胞 (CL-48) 細胞株及分離自人類臍靜脈的血管內皮細胞及纖維母細胞 (MRC-5)，人類巨噬細胞 (THP-1)，小鼠巨噬細胞 (R264.7) 不同細胞所須之培養液之組成及配製完全依照 ATCC 的規範，細胞皆在相對濕度 9.8%、37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養。腫瘤細胞與正常細胞在處理不同濃度之黃連組成物後以放射線處理，以錐蟲藍染色計數法 (Trypen Blue exclusion) 測定細胞存活率。並以流式細胞儀測定細胞凋亡分子 annexinV 的表現。

第三部分為利用細胞模式探討黃連組成物是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理所引發的免疫調控因子基因表現。

此部分主要探討人類腫瘤細胞與正常細胞株，在處理非毒殺性劑量之黃連組成物後，受放射線處理誘發之免疫調控因子基因的變化情況，我以先前研究中已知的 IL-6、PGE2 變化為標準進行篩選，許多臨床研究顯示腫瘤組織內的巨噬細胞為免疫相關基因蛋白質的產生源頭因此我們進一步以共同培養的方式，探討黃連組成物對巨噬細胞的作用，分別以人類肺癌細胞 A549 搭配人類單核球 THP-1(巨噬細胞前趨細胞)與小鼠肝癌細胞 BNL 搭配小鼠巨噬細胞 Raw264.7 之共同培養方式。A549 與 BNL 細胞經過放射線(4Gy)處理後以 transwell 方式分別與 THP-1 及 Raw264.7 共同培養(此時部分 THP-1 及 Raw264.7 已經預先處理黃連組成物 1 小時)，48 小時後測試 THP-1 及 Raw264.7 細胞中 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 mRNA 變化。

第四部分為利用分子生物學方法探討黃連組成物是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理時細胞內與免疫調控因子基因表現有關的訊息傳遞分子的活化。

轉錄分子 AP-1 及 NF-kB 的活性測試：AP-1 及 NF-kB 是調控細胞內免疫調控因子基因表現重要的轉錄因子(transcription factor)，就本研究所要探討的 proinflammatory cytokine TNF-alpha、IL-6、IL-1beta 而言 AP-1 及 NF-kB 對這些分子的調控具有重要角色(參考文獻 21、22)。我們運用 promoter reporter assay，利用轉殖入 AP-1 或 NF-kB luciferase reporter plasmid 的腫瘤細胞株加入不同濃度之黃連組成物及處理放射線或血清後一小時，將細胞溶解再加入冷光受質後由冷光儀偵測出冷光強度，計算出黃連組成物是否影響轉譯分子 AP-1 及 NF-kB 的活性。

## 參、結果

第一部分：利用動物模式探討黃連組成物對於腫瘤放射線治療的輔助效果

此部分我們以老鼠肝癌及肺癌細胞進行動物試驗。老鼠肝癌細胞株為 BNL，老鼠肺癌細胞株為 Lewis lung carcinoma (LLC)。兩種腫瘤細胞分別植入 BALBc/J 與 C57BL6/J 小鼠腿部，腫瘤直徑約 4mm 時開始管餵黃連組成物，兩天後開始給予如同臨床使用之放射線治療

(LLC 每天照射 5Gy 共五天、BNL 每天照射 4Gy 共五天)。由小鼠之腫瘤生長曲線統計黃連組成物是否具有對腫瘤放射線治療的輔助效果，實驗流程圖如圖一。對於黃連組成物餵食劑量的選定是以成人(60Kg 每日建議 6g 計算：依據明通科學中藥建議)使用劑量與本研究所用之黃連組成物含量比例(約佔 0.5~2%)，再依據人體用量與動物試驗間的安全係數 10 為係數)推算出 100mg/kg 的餵食劑量。十種黃連組成物(如圖二)對水的溶解度不同，本研究為了避免不同溶劑間的差異將十種黃連組成物全部以超音波震盪方式懸浮於 0.5%CMC(carboxymethyl cellulose)，以 100uL/天之體積進行管餵，十種黃連組成物之 CMC 懸浮液除了(D6)chlorogenic acid 的 pH 值 4.3，其餘九種 pH 值均為 7.0~7.4。在實驗過程中我們同時紀錄小鼠體重變化，C57BL6/J 品系小鼠之體重變化如圖三，BALBc/J 品系小鼠之體重變化如圖四。結果分別以單獨放射線處理組(RT)與未進行放射線處理組(sham)及單獨放射線處理組(RT)與放射線處理組加入各種藥物(D1~D10)在不同時間的體重變化，實驗結果顯示小鼠的體重變化在各種藥物處理組中皆穩定的增加，我們認為此情況主要反應了腫瘤的生長，另一方面也反應出這些藥物在此實驗條件下對 BALBc/J 與 C57BL6/J 品系小鼠不具毒性。由統計結果顯示在 C57BL6/J 品系小鼠單獨放射線處理(RT)相較於未進行放射線處理組(sham)會造成小鼠體重降低( $p < 0.05$ )，然而相較於單獨放射線處理(RT)，放射線處理組加入管餵各種藥物(D1~D10)的組別中，除了 D5(epiberberine)及 D10(jatrorrhizine)，管餵其餘 8 種藥品皆能有效緩小鼠體重降低的情況( $p < 0.05$ )，但是此現象在 BALBc/J 品系小鼠之體重變化圖中並沒有出現，可能與 BNL 於 BALBc/J 品系小鼠所生成的腫瘤對放射線治療的反應有關。

實驗過程中量測腫瘤大小所計算出的腫瘤生長曲線圖顯示，LLC 於 C57BL6/J 品系小鼠之腫瘤生長曲線(圖五)，在單獨放射線處理(RT)相較於未進行放射線處理組(sham)具有統計意義( $p = 0.01$ )，顯示放射線治療(5Gy 共五天)對此模式具有一定的治療效果，然而相較於單獨放射線處理(RT)，放射線處理組加入管餵各種藥物(D1~D10)的組別中，我們並沒有發現能有效增強放射線治療效果的藥物，值得注意的是 D10(jatrorrhizine)反而會影響放射線治療對此模式腫瘤生長的抑制作用( $p = 0.02$ )。在 BNL 於 BALBc/J 品系小鼠之腫瘤生長曲線變化實驗部分(圖六)，腫瘤生長曲線圖顯示放射線治療(4Gy 共五天)對於 BNL 於 BALBc/J 品系小鼠所生成的腫瘤並無統計學上的之抑

制效果( $p=0.13$ )，然而相較於單獨放射線處理 (RT)，放射線處理組加入管餵各種藥物(D1~D10)的組別中，我們並沒有發現能有效增強放射線治療效果的藥物，值得注意的是 D1 (magnoflorine)反而會影響放射線治療對此模式腫瘤生長的抑制作用 ( $p=0.05$ )。

實驗結束，將小鼠犧牲後，我們進一步將小鼠腿部腫瘤分離稱重的結果如圖七，解剖腿部腫瘤後實際稱重的結果顯示氯原酸 chlorogenic acid 對 BNL 與 LLC 在 BALBc/J( $p<0.05$ ) 與 C57BL6/J( $p<0.05$ ) 品系小鼠產生的腫瘤具有放射線治療的輔助效果。對於腫瘤生長曲線之統計結果 (均無  $p<0.05$  統計意義) 與將小鼠腿部腫瘤分離稱重後所得的統計結果 (chlorogenic acid 在兩種模式均有統計意義) 之差異，我們認為與量測腫瘤過程中受皮毛厚度或局部發炎腫脹等因素的干擾有關。

實驗過程中我們也收集 BALBc/J 品系小鼠血液分離其血清以 EIA 的方式分析其血清中發炎反應蛋白質 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 PGE-2 的變化。實驗結果顯示 BALBc/J 品系小鼠血清中 TNF- $\alpha$  (圖八)、IL-1 $\beta$  (圖九)、IL-6 (圖十) 及 PGE-2 (圖十一) 的皆在小鼠接受放射線治療後有上升的趨勢，其中 TNF- $\alpha$  治療後上升具統計意義。然而在十種黃連組成物中以 (D8)berberine, (D4)ferulic acid, (D6)chlorogenic acid 對治療引發之 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 PGE-2 都有抑制的趨勢，其中 (D4)ferulic acid 對 PGE-2 的抑制作用具統計意義( $p=0.03$ )。然而 (D2)coptisine, (D3)palmatine 則會增強 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的趨勢。值得注意的是 (D10)jatrorrhizine 會增強 PGE-2( $p=0.04$ )。我們也進一步以免疫組織染色觀察餵食十種黃連組成物之 BALBc/J 品系小鼠 BNL 腫瘤組織中 TNF- $\alpha$  (圖十二)、IL-1 $\beta$  (圖十三)、IL-6 (圖十四)、COX-2 (圖十五) 的表現情況。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的免疫組織染色的結果分別以 RT 組之染色圖為例圖中棕色部分為 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表現的位置，染上的部位為細胞膜與細胞間質，COX-2 的免疫組織染色的結果以 RT 組之染色圖為例，染上的部位為細胞間質。每種免疫組織染色圖下方為染色半定量分析結果，以染色程度 (棕色程度所佔單位面積百分比) 定義 sham 組為 1，RT 組為 2 (TNF- $\alpha$ ) 或 3 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2)。免疫組織染色結果顯示在未處理放射線的 sham 組與處理放射線的 RT 組腫瘤組織中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2 有表現程度的差異，這樣的結果與血清中的濃度具有相似的結果，然而 TNF- $\alpha$  在 sham 組與 RT 組差異較小，

可能的解釋為 TNF- $\alpha$  產生的細胞與腫瘤組織無關或者犧牲時間點腫瘤組織中的 TNF- $\alpha$  表現已經不明顯。我們觀察到十種黃連組成物對腫瘤組織中的 TNF- $\alpha$  表現依照染色程度定義的半定量結果為 1 的是 D3、D4、D7、D10。為 2 的是 D2、D8、D9。為 3 的是 D1、D5、D6。十種黃連組成物對腫瘤組織中的 IL-1 $\beta$  表現依照染色程度定義的半定量結果為 2 的是 D2、D3、D6、D7、D8。為 3 的是 D1、D5、D10。為 4 的是 D4。十種黃連組成物對腫瘤組織中的 IL-6 表現依照染色程度定義的半定量結果為 1 的是 D1、D4。為 2 的是 D2、D5、D6、D8、D9。為 3 的是 D3。為 4 的是 D7、D10。十種黃連組成物對腫瘤組織中的 COX-2 表現依照染色程度定義的半定量結果為 1 的是 D4、D8。為 2 的是 D1、D2、D5、D6、D10。為 3 的是 D9。為 4 的是 D3、D7。免疫組織染色半定量分析結果顯示部分黃連組成物對腫瘤組織中的 IL-6 與 Cox-2 表現具有抑制作用。

儘管免疫組織染色結果與血清中觀察到的結果有所差異，我們認為可能的解釋是動物體內腫瘤組織與免疫細胞表現 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2/PGE2 的機轉不同有關。由於我們在 LLC/C57BL6/J 腫瘤生長曲線的實驗中也觀察到黃連組成物對放射線治療的輔助效果，因此我們進一步以細胞分裂標記分子 PCNA 抗體進行免疫組織染色（圖十六），PCNA 的免疫組織染色的結果以 sham 組之染色圖為例圖中棕色部分為 PCNA 表現的位置，染上的部位為細胞核，免疫組織染色圖下方為染色半定量分析結果，以染色程度（棕色程度所佔單位面積百分比）定義 sham 組為 6，RT 組為 3，組織染色結果顯示腫瘤組織在放射治療 30 天後細胞又將開始增生表現 PCNA，然而十種黃連組成物中的 PCNA 表現依照染色程度定義的半定量結果為 1 的是 D6。為 2 的是 D1、D4。為 3 的是 D2、D3、D5、D7、D8、D9。為 6 的是 D10。其中 (D6) 氯原酸(chlorogenic acid) 餵食組，其 PCNA 的表現明顯低於其他各組，此結果與腫瘤生長曲線的實驗中的結果相符。綜合上述動物試驗結果，我們由實驗中證實黃連組成物中確實具有能抑制免疫調控因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2/PGE2) 的分子存在，而這些分子正顯現出黃連在傳統認知的抗發炎作用。

第二部分利用細胞模式探討黃連組成物是否具有細胞毒性

我們進一步以細胞學試驗探討黃連組成物是否改變腫瘤細胞與正常細胞對放射線處理的敏感性，此部份之研究除了動物試驗所用的小鼠肝癌細胞株 BNL，小鼠肺癌細胞株 LLC 也加入源自 ATCC 的 2 株人類肝癌 (HepG2、Hep3B)，2 株人類肺癌 (A549、CRL-5831)，1 株正

常肝細胞 (CL-48) 細胞株及分離自人類臍靜脈的血管內皮細胞及纖維母細胞(MRC-5)，人類巨噬細胞(THP-1)，小鼠巨噬細胞(R264.7)。首先，腫瘤細胞與正常細胞在處理不同濃度(10 及 100 $\mu$ M)之黃連組成物後 72 小時，以結晶紫染色計數法 (crystal violet staining) 測定細胞存活率的變化 (圖十七)。實驗結果顯示本計畫中所使用之黃連組成物劑量並無細胞毒性，部分組成物甚至具有促進細胞生長的作用。這樣的劑量事實上是高於黃連組成的正常比例與正常人體攝食黃連的劑量，此一結果顯示黃連使用上的安全性。在腫瘤生長曲線的實驗與組織染色結果顯示黃連組成物中的 (D6) 氯原酸(chlorogenic acid) 餵食組，其 PCNA 的表現明顯低於其他各組，我們進一步以小鼠肝癌細胞株 BNL，小鼠肺癌細胞株 LLC 體外培養模式加入 100 $\mu$ M chlorogenic acid 後再予以放射線處理，72 小時後檢測細胞凋亡情況 (圖十八)，annexinV 染色結果顯示 chlorogenic acid 能增強放射線誘發 BNL 與 LLC 細胞凋亡的比例。

第三部分利用細胞模式探討黃連組成物是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理所引發的免疫調控因子基因表現

此部分主要探討小鼠及人類腫瘤細胞與正常細胞株，在處理非毒殺性劑量之黃連組成物後，受放射線處理誘發之免疫調控因子基因的變化情況，各種細胞經過放射線刺激後皆能表現出不同程度的 IL-6 與 PGE<sub>2</sub>，其中以血管內皮細胞 HUVEC 受放射線刺激產生 IL-6 與肺癌細胞 A549 受放射線刺激產生 PGE<sub>2</sub> 之效應最為顯著，因此我們以 HUVEC 與 A549 為模式，分別測試十種黃連組成物對放射線刺激細胞產生 IL-6 與 PGE<sub>2</sub> 的效應。細胞經過 PBS 二次洗滌之後，先於不含血清的培養基中培養 16~24 小時，再預處理黃連組成物 1 小時，之後再進行放射線處理。經過 24 小時培養之後，收集培養細胞的上清液，以 EIA 量化分析 PGE-2 (圖十九) 及 IL-6 (圖二十)。實驗結果顯示十種黃連組成物對放射線刺激 HUVEC 細胞產生 IL-6 與 A549 細胞產生 PGE<sub>2</sub> 的效應不盡相同，其中 (D8)berberine, (D4)ferulic acid, (D6)chlorogenic acid 能有效抑制放射線刺激 A549 細胞產生 PGE<sub>2</sub> 的效應。(D8)berberine, (D4)ferulic acid 能有效抑制 HUVEC 細胞產生 IL-6，而(D9)columbamine 與(D1)magnoflorine 反而會增強放射線刺激 HUVEC 細胞產生 IL-6 的表現。許多臨床研究顯示腫瘤組織內的巨噬細胞為免疫相關基因蛋白質的產生源頭因此我們進一步以共同培養的方式，探討黃連組成物對巨噬細胞的作用，分別以人類肺癌細胞 A549 搭配人類單核球 THP-1(巨噬細胞前趨細胞)與小鼠肝癌細胞

BNL 搭配小鼠巨噬細胞 Raw264.7 之共同培養方式。A549 與 BNL 細胞經過放射線(4Gy)處理後以 transwell 方式分別與 THP-1 及 Raw264.7 共同培養(此時部分 THP-1 及 Raw264.7 已經預先處理黃連組成物 berberine(B), ferulic acid(F), chlorogenic acid(C) 1 小時), 48 小時後測試 THP-1 及 Raw264.7 細胞中 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 mRNA 變化(圖二十一)。實驗結果顯示放射線照射過之 A549 與 BNL 細胞皆能分別引發 THP-1 及 Raw264.7 細胞中 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 mRNA 表現, berberine(B)、ferulic acid(F)、chlorogenic acid(C)對 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 mRNA 的表現有不同的效應, 由量化分析顯示在兩種模式中也有些差異。berberine(B)、ferulic acid(F)、chlorogenic acid(C)在兩種模式中皆會促進 TNF-alpha mRNA 的表現。BNL/Raw264.7 模式中 ferulic acid(F)及 chlorogenic acid(C)較能有效抑制 IL-6 mRNA 的表現, berberine(B)、ferulic acid(F)、chlorogenic acid(C)對 Cox-2 mRNA 的表現具有抑制作用, chlorogenic acid(C)反而會促進 IL-1beta mRNA 的表現。在 A549/THP-1 模式中 berberine(B)、ferulic acid(F)、chlorogenic acid(C)能有效抑制 IL-6 及 Cox-2 mRNA 的表現, ferulic acid(F)及 chlorogenic acid(C)能有效抑制 IL-1beta mRNA 的表現。此部分之研究結果顯示黃連組成物對放射線直接誘發 IL-6 或 PGE2 表現之效果與放射線間接誘發共同培養中的巨噬細胞產生之 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 之作用不同, 可能的理由是兩種誘發調控機轉不同。

第四部分為利用分子生物學方法探討黃連組成物是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理時細胞內與免疫調控因子基因表現有關的訊息傳遞分子的活化

AP-1 及 NF-kB 是調控細胞內免疫調控因子基因表現重要的轉錄因子(transcription factor), 就本研究所要探討的 proinflammatory cytokine TNF-alpha、IL-6, IL-1beta 及 Cox-2 而言 AP-1 及 NF-kB 對這些分子的調控具有重要角色(參考文獻 21、22)。我們運用 NF-kB 或 AP-1 specific reporter assay, 利用轉殖入 AP-1 或 NF-kB leuciferase reporter plasmid 的腫瘤細胞株 A549 與正常血管內皮細胞 HUVEC 加入 100uM 之黃連組成物及處理放射線後一小時, 將細胞溶解再加入冷光受質後由冷光儀偵測出冷光強度, 計算出黃連組成物對放射線誘發 NF-kB 及 AP-1 活性的影響。實驗結果顯示, 十種黃連組成物對於放射線誘發 NF-kB 及 AP-1 活性具有不同的效應。實驗結

果顯示放射線處理能引發腫瘤細胞株 A549 (圖二十二) 與正常血管內皮細胞 HUVEC (圖二十三) 內 AP-1 及 NF- $\kappa$ B 的活化。A549 的實驗結果顯示黃連組成物(D4)ferulic acid、(D6)chlorogenic acid 能有效降低放射線處理能引發之 NF- $\kappa$ B 活化，而(D1)magnoflorine 則會促進放射線處理能引發之 NF- $\kappa$ B 活化。(D5)epiberberine、(D8)berberine 能有效降低放射線處理能引發之 AP-1 活化。就 HUVEC 的實驗結果顯示黃連組成物(D4)ferulic acid、能有效降低放射線處理能引發之 NF- $\kappa$ B 活化，(D4)ferulic acid、(D8)berberine 能部分降低放射線處理能引發之 AP-1 活化。而(D10)jatrorrhizine 能促進放射線處理能引發 HUVEC 之 AP-1 活化。綜合上述 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 活性試驗結果，我們由實驗中證實黃連組成物中確實具有能抑制免疫調控因子 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 的分子存在，而這些分子正顯現出黃連在傳統認知的抗發炎作用。

## 肆、討論

中藥材中亦有許多被公認具有良好抗發炎效果的藥材，這些藥材事實上業已經過數百甚至數千年的人體安全性試驗，以長期服用的考量上其在副作用可能比西藥更小，因此只要再予以科學性的研究建立適切的理論基礎將對於運用於腫瘤輔助性治療有很大的發展潛力。本計畫所提之黃連在傳統上及現代的研究中都被證實具有抗血管新生、抗發炎、殺菌等免疫調控作用。學理上而言，十分適和運用於抑制腫瘤放射線治療引發的免疫調控反應與感染的輔助性治療。在本研究中，我們主要以目前國人罹患率最高的肝癌及肺癌動物模式進行研究，使用免疫系統完整的小鼠品系，與各種黃連組成分與放射線治療進行併用研究。以釐清黃連應用於輔助腫瘤放射線治療之免疫調控反應的可行性及其分子機轉。實驗結果也發現黃連組成物中確實具有能抑制免疫調控因子 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 的分子存在，而這些分子正顯現出黃連在傳統認知的抗發炎作用。

國內近年來對於黃連免疫調節功能之相關研究主要以各學校之碩博士論文為主，其論文整理如下：國立臺灣大學食品科技研究所，張鴻民教授指導馬嘉贛之博士論文研究，發現黃連誘導 U937 細胞株行細胞凋亡之機制探討及對 BALB/CJ 小鼠之免疫調節作用黃連可經由抑制 Bcl-2 蛋白表現，促進 Bax、Bak、caspase-3 蛋白活性，並使粒線體中的 cytochrome c 釋放出，導致細胞凋亡誘導劑。黃連於體內

經由免疫調節方式可達到抗腫瘤的效果。在 BALB/CJ 小鼠皮下轉植大腸癌細胞(CT26)形成腫瘤，並餵食不同濃度的黃連萃取物，結果發現每公斤小鼠體重予以 400 mg 之劑量能明顯抑制腫瘤生長，同時促進脾臟細胞增生及提高脾臟中免疫細胞(T 細胞、TH 細胞、TC 細胞、B 細胞及巨噬細胞)含量。於施打腫瘤前，先餵食黃連一周，抑制腫瘤生長的效果更佳且肝腎生化指標及組織切片皆顯示黃連熱水萃取物在此劑量下對小鼠不具有毒性。高雄醫學大學醫學研究所，陳英俊博士與羅怡卿博士指導蔡佩玲之碩士論文研究，發現含有黃連成分之三黃瀉心湯具有抗 LPS 引起之低血壓及發炎作用，其作用機轉包括抑制 iNOS 及 COX-2 之表現並增加 HO-1 的表現，以及抑制細胞激素及 PGE2 的產生，進而具有抗發炎及免疫調節的作用。中山醫學大學醫學研究所，楊繼江教授指導陳崇實之碩士論文研究，發現清胃散對牙周致病菌的抑菌能力主要源於其組成生藥：黃連，由牙周病病態動物療效研究得知口服清胃散 7 日後，病態動物牙齦紅、腫、化膿、出血等症狀均得到緩解甚至消除，其研究也指出中醫治療牙周病不單只是消炎、止痛、抗菌，更進而提升自身的免疫系統來達到預防的作用。高雄醫學大學天然藥物研究所，林俊清教授指導許芬芳之碩士論文研究，針對 22 種常用生藥藥理活性進行抗氧化、免疫調節及抗腫瘤研究癌作用。發現黃連具有很強抗血癌及抗肝癌作用但並不具抗氧化及免疫增強功能。在國際級期刊中黃連免疫調節功能之研究近況則有：關於抗血管新生之研究：利用雞胚尿囊膜及血管內皮細胞增生的血管新生研究發現黃連萃取物具有抑制血管新生之作用（參考文獻 18）。黃連的成份中含有抑制微生物的分子 5'-methoxyhydronecarpin, 能夠經由抑制 multidrug pump 的功能達到抑菌的效果（參考文獻 19）。關於腫瘤與免疫調節抑制之研究：利用人類肝癌細胞株 HepG2 的研究發現 berberine 會經由抑制 nuclear factor-kappaB signaling pathway 抑制 acetaldehyde 誘發之 interleukin-1beta 及 tumor necrosis factor-alpha 產生（參考文獻 20）。

西醫在惡性腫瘤治療上的最大問題包含外科手術上的無法徹底摘除，化學治療上的組織器官毒性及免疫抑制，放射治療上的劑量極限與正常組織發炎損傷的副作用。我們認為這些問題正是具免疫調節功能之中藥材作為腫瘤輔助性治療的最佳切入點。先前的研究中我們已經由動物模式研究發現黃連併用給予能降低腫瘤放射線治療誘發小鼠血清中 IL-6 及 PGE-2 的上升，對於照射部位的皮膚損傷與掉毛的反應也有延緩的作用。細胞學的研究結果也顯示黃連萃取物在無

細胞毒性的劑量下對於由 VEGF 誘發血管內皮細胞的生長、通透性、移行能力、管狀型態形成能力等血管新生作用皆具有部分抑制效果，對於 Akt 及 ERK 的磷酸化作用及 NF- $\kappa$ B leuciferase reporter 的活化等訊息傳遞等分子層次現象也具有部分抑制效果，然而由於黃連為混合物，因此其組成物中應具有對抑制上述細胞反應或分子層次效應更有效力的分子，值得進一步探討。近年來免疫調控反應逐漸被研究發現與腫瘤惡性化有密切關連，而 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 PGE-2 是已知免疫調控機制上重要的分子，因此，我們認為釐清黃連抗發炎的組成分及其作用機轉將對黃連在併用於腫瘤之治療具有重要意義。本計畫中我們以十種黃連組成物利用動物計及細胞模式證實黃連組成物中確實具有能抑制免疫調控因子 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 的分子存在，儘管不同組成物的效果不盡相同，我們認為可能與組成物比例或同時存在時相互調和有關，而我們的研究結果顯示部分黃連組成物確實顯現出黃連在傳統認知的抗發炎作用。

## 伍、 結論與建議

綜合上述動物與細胞試驗結果顯示黃連組成物中確實具有能對肺癌及肝癌放射線治療動物模式之免疫調控因子基因 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2/PGE2) 產生調節作用的分子存在，其作用機轉與調控 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 活化有關。雖然不同黃連組成物的作用效果不盡相同，但部分黃連組成物確實顯現出黃連在傳統認知的抗發炎作用。本研究所探討的十種黃連組成物，儘管其生物效應不盡相同，但未來的研究值得進一步測試十種黃連組成物的 LD50 與 ED50，以進行 TI (Therapeutic Index, LD50/ED50) 之分析，作為研究那一種化合物具潛在性應用於抗癌及可減輕放射線治療之發炎等副作用的參考指標。實驗結果顯示黃連組成物中 chlorogenic acid 具有良好抑制免疫調控因子、抑制 NF- $\kappa$ B、增強腫瘤細胞對放射線感受等特色，因此值得進一步研究其應用。此外，富含 chlorogenic acid 之中藥材也許也值得用於免疫調控之研究與應用。

## 誌謝

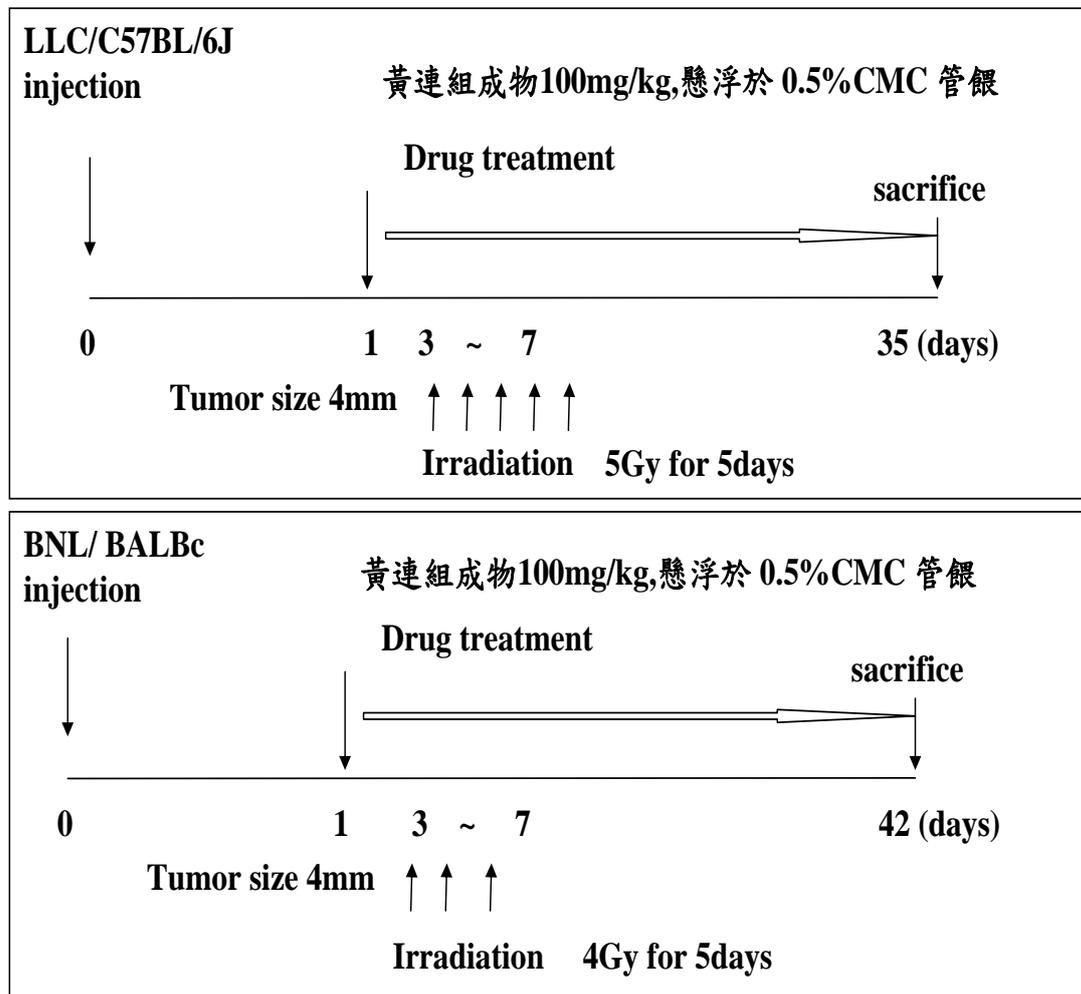
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(計畫編號：CCMP95-RD-210)提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、 參考文獻

1. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):540-50. Review.
2. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*. 2001;477(1-2):7-21. Review.
3. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 2000 Jun;12(6):547-54. Review.
4. Offersen BV, Knap MM, Marcussen N, Horsman MR, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Intense inflammation in bladder carcinoma is associated with angiogenesis and indicates good prognosis. *Br J Cancer*. 2002 Dec 2;87(12):1422-30.
5. Matsuo Y, Sawai H, Funahashi H, Takahashi H, Sakamoto M, Yamamoto M, Okada Y, Hayakawa T, Manabe T. Enhanced angiogenesis due to inflammatory cytokines from pancreatic cancer cell lines and relation to metastatic potential. *Pancreas*. 2004 Apr;28(3):344-52.
6. Dulger H, Alici S, Sekeroglu MR, Erkog R, Ozbek H, Noyan T, Yavuz M. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with gastrointestinal cancer. *Int J Clin Pract*. 2004 Jun;58(6):545-9.
7. Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res*. 2003 Oct 15;9(13):4653-65. Review.
8. Zaki MH, Nemeth JA, Trikha M. CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice. *Int J Cancer*. 2004 Sep 10;111(4):592-5.
9. Dicker AP. COX-2 inhibitors and cancer therapeutics: potential roles for inhibitors of COX-2 in combination with cytotoxic therapy: reports from a symposium held in conjunction with the Radiation Therapy Oncology Group June 2001 Meeting. *Am J Clin Oncol*. 2003 Aug;26(4):S46-7.
10. 戴新民。1977。中藥的藥理及應用。啟業書局。台北。

11. 西安醫學院附屬醫院。1958。黃連黃柏及小蘗鹼對痢疾桿菌及金黃色葡萄球菌抗生作用的觀察。西安醫學院學報。5:40-42。
12. 宋魯成，陳克忠，朱家雁。1996。黃連對大鼠高血脂質過氧化物高血脂及體外血形成的影響。陝西中醫。17:137-138。
13. 張覃沐。1957。黃連鹼及漢防己甲素之抗阿米巴作用。中華醫學雜誌。43:627-629。
14. 楊鑒英，劉燕玲，劉錫瑩。1989。中藥抗乙型肝炎病毒的實驗研究。中西醫結合雜誌。9: 494-495。
15. 劉自強，王英武，胡景新。1991。黃連注射液對家兔白細胞致熱原性發熱和腦脊液中 cAMP 含量變化的影響。中國病理生理學雜誌。7:264-266。
16. 蔣激揚，耿東升，劉發，吐爾遜江托卡依。1998。黃連素的抗炎作用與機制。中國藥理學通報。14:434-437。
17. 蔡永敏，黃黎，張國泰。1999。最新中藥藥理與臨床應用。華夏出版社。北京。pp.54-56
18. Wang S, Zheng Z, Weng Y, Yu Y, Zhang D, Fan W, Dai R, Hu Z. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sci.* 2004 ;74(20):2467-78.
19. Stermitz FR, Tawara-Matsuda J, Lorenz P, Mueller P, Zenewicz L, Lewis K. 5'-Methoxyhydnocarpin-D and pheophorbide A: Berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod.* 2000 ;63(8):1146-9.
20. Hsiang CY, Wu SL, Cheng SE, Ho TY. Acetaldehyde-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha production is inhibited by berberine through nuclear factor-kappaB signaling pathway in HepG2 cells. *J Biomed Sci.* 2005;12(5):791-801.
21. Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res.* 2005;15(1):24-7. Review.
22. Palanki MS. Inhibitors of AP-1 and NF-kappa B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Curr Med Chem.* 2002;9(2):219-27. Review.

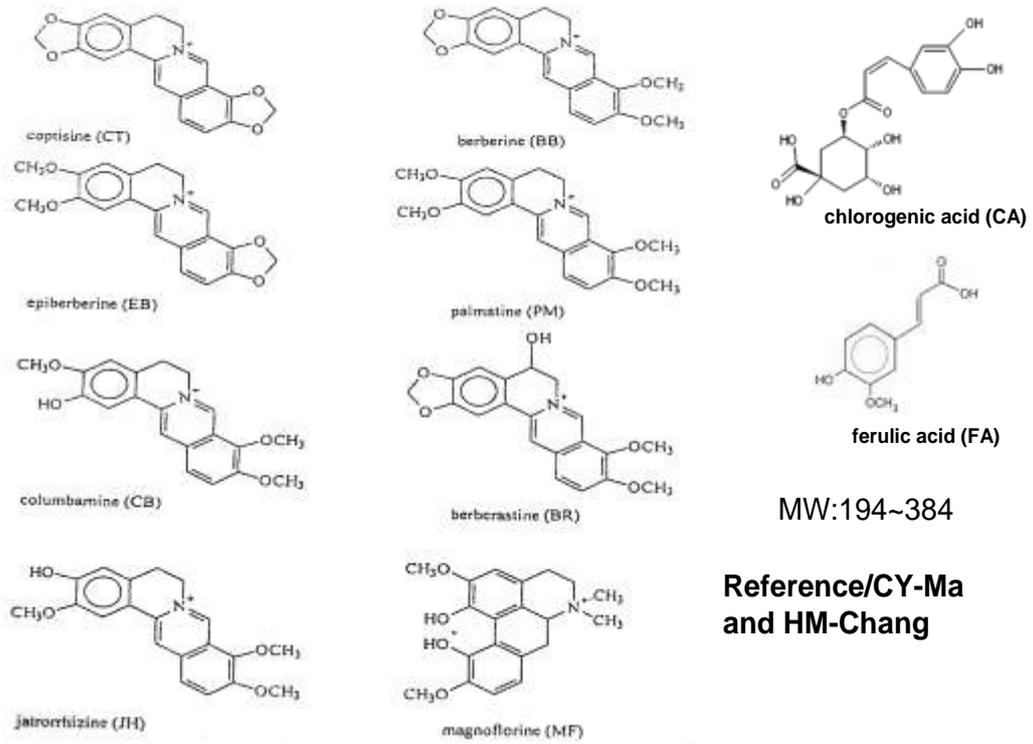
## 柒、圖表



圖一

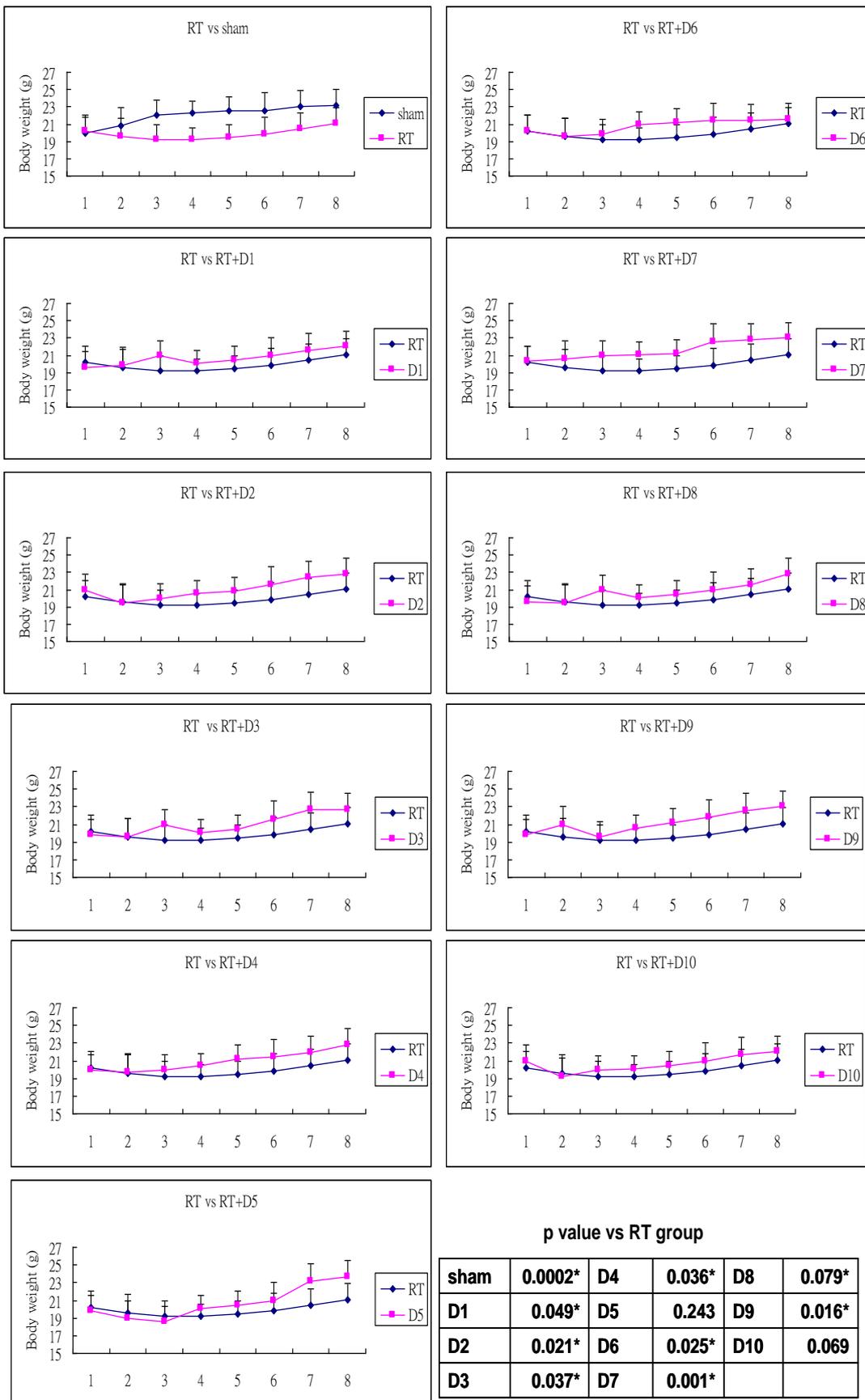
圖一、實驗流程圖。老鼠肝癌細胞株 BNL，老鼠肺癌細胞株為 Lewis lung carcinoma (LLC)。兩種腫瘤細胞分別植入 BALBc/J 與 C57BL6/J 小鼠腿部，約兩週後會產生直徑約 4mm 的腫瘤。

Pure compounds contains in *Coptis chinensis*



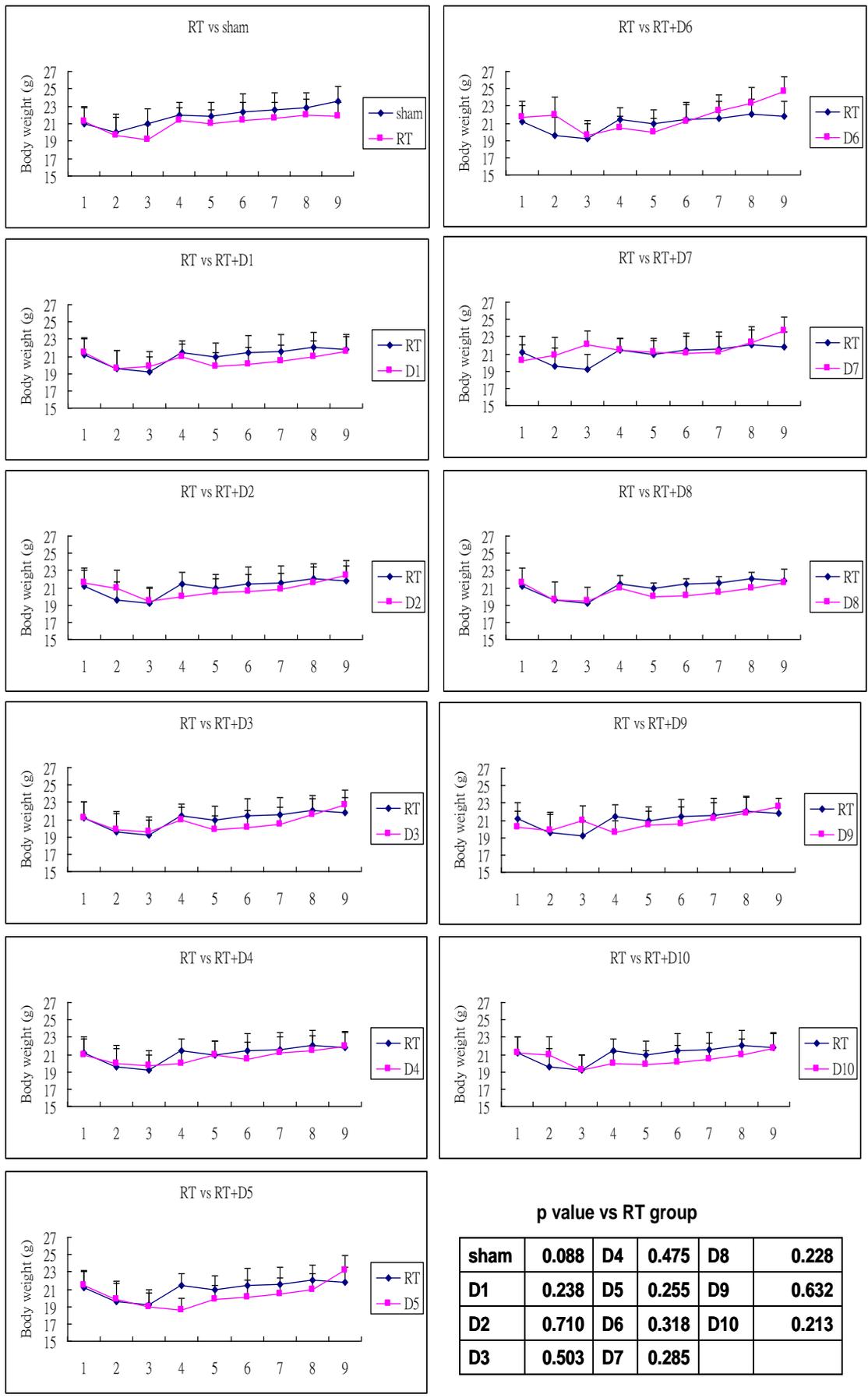
圖二

圖二、 十種黃連組成物之化學結構 (張鴻民教授提供)



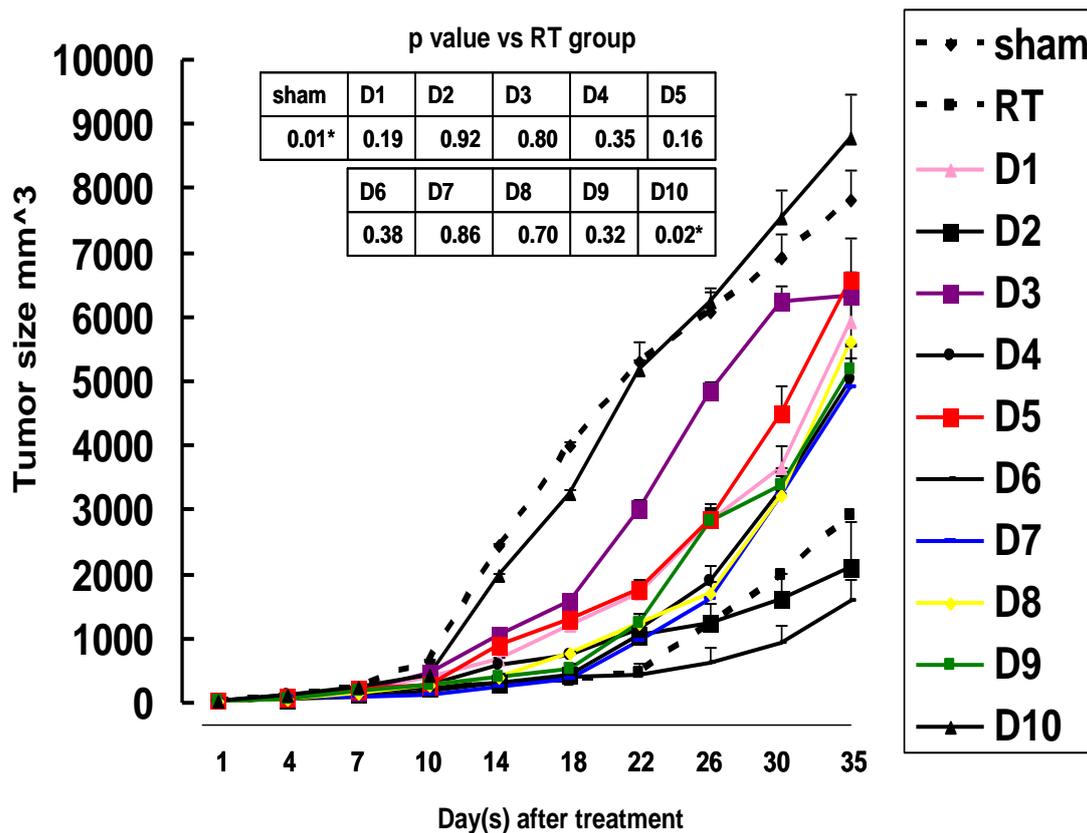
圖三

圖三、 C57BL6/J 品系小鼠之體重變化。實驗過程中每隔 5 天紀錄小鼠體重變化。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼(coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼(ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸(chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8)小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorhizine) 。圖中橫軸 1 至 8 分別表示 8 個量測小鼠的體重的時間點，圖上每個點為 5 之小鼠測試結果的平均值±標準差。圖下方為每個組別相較於單獨進行放射線治療(RT 組)的 T test 統計結果，以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義。



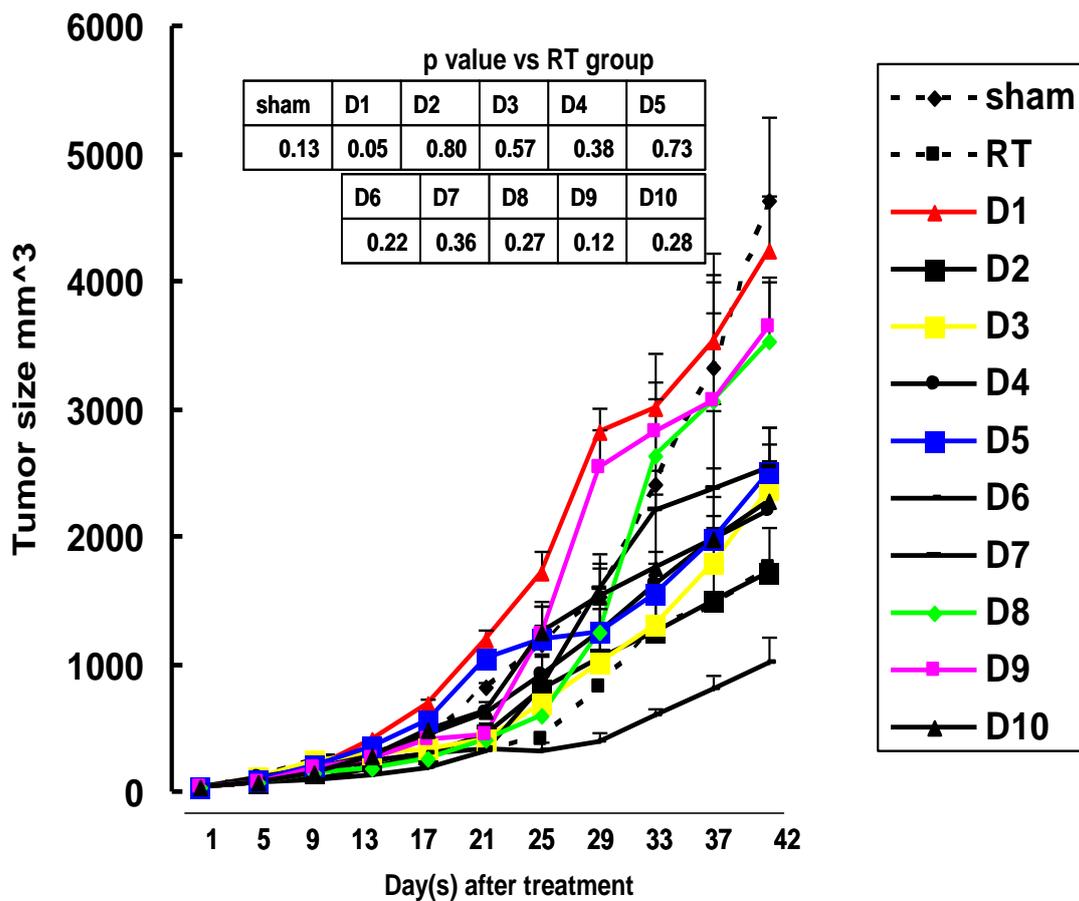
圖四

圖四、 BALBc/J 品系小鼠之體重變化，實驗過程中每隔 5 天紀錄小鼠體重變化。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼(coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼(ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸(chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8)小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorhizine) 。圖中橫軸 1 至 9 分別表示 9 個量測小鼠的體重的時間點，圖上每個點為 5 之小鼠測試結果的平均值 $\pm$ 標準差。圖下方為每個組別相較於單獨進行放射線治療(RT 組)的 T test 統計結果，以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義。



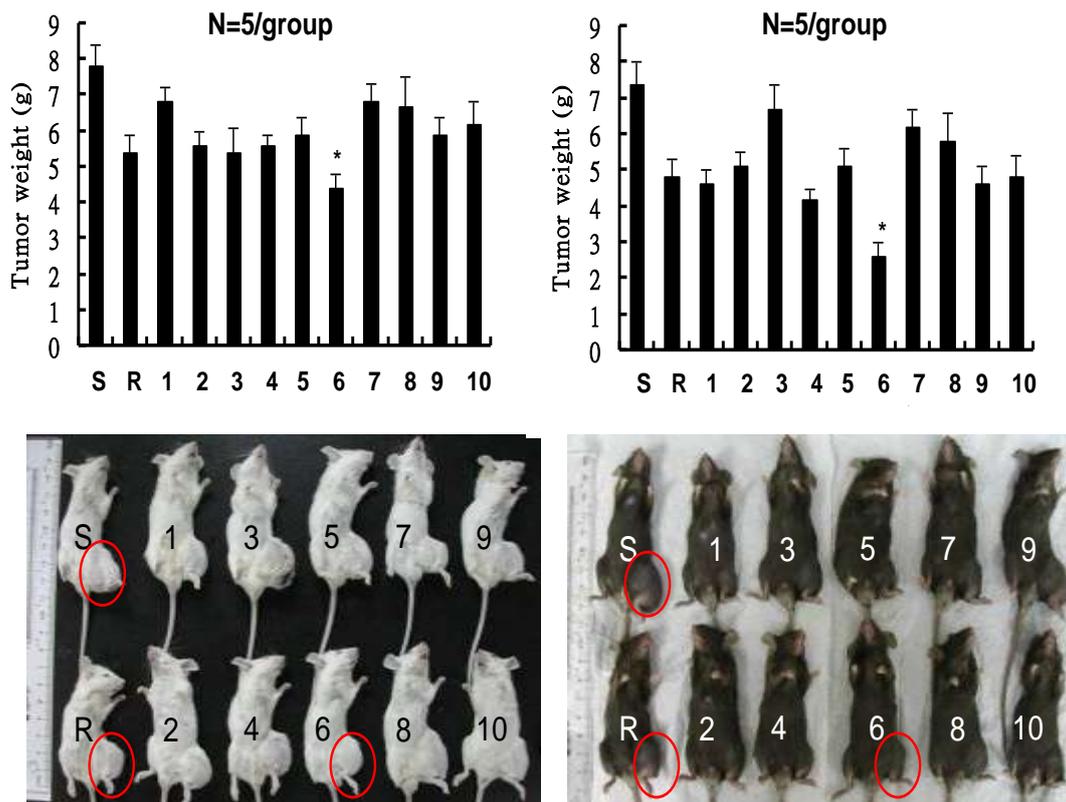
圖五

圖五、 C57BL6/J 品系小鼠之腫瘤生長曲線變化。實驗過程中每隔 3 天紀錄小鼠腫瘤大小。腫瘤體積以二分之一長徑 X 短徑平方計算。圖表上方為各種藥物相較於放射線治療組之統計結果。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼 (coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼 (ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸 (chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8)小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorrhizine) 。以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在表中以”\*”註記。



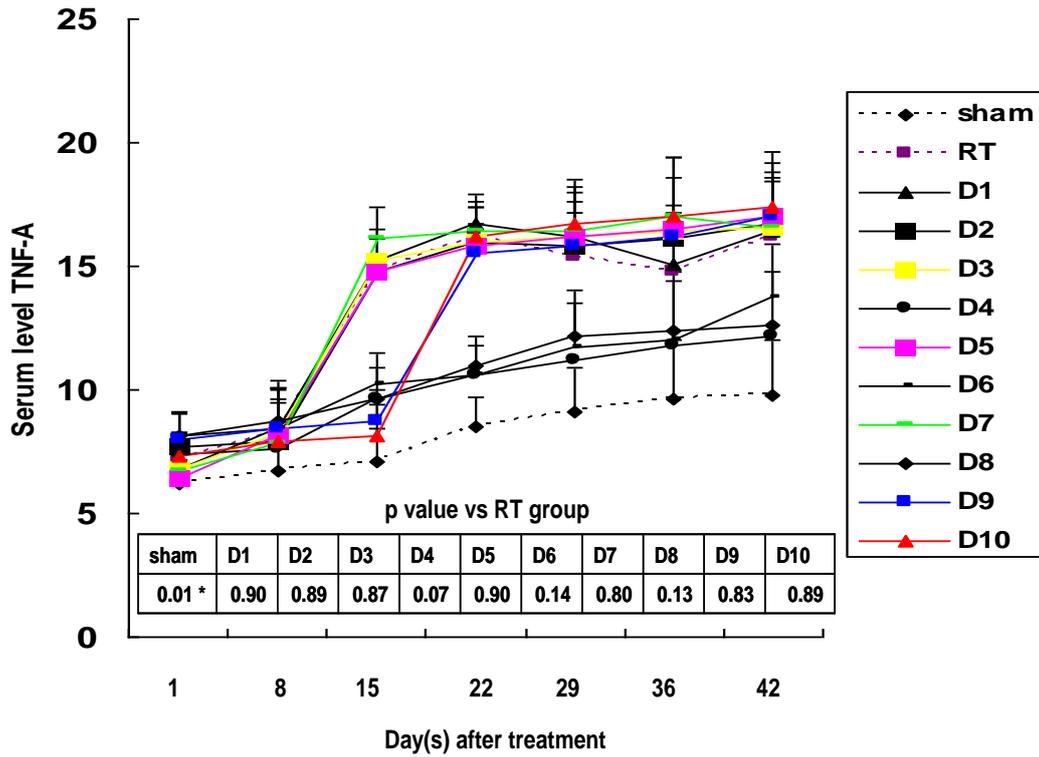
圖六

圖六、 BALBc/J 品系小鼠之腫瘤生長曲線變化。實驗過程中每隔 4 天紀錄小鼠腫瘤大小。腫瘤體積以二分之一長徑 X 短徑平方計算。圖表上方為各種藥物相較於放射線治療組之統計結果。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼 (coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼 (palmatine,) 、(D4)阿魏鹼 (ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸 (chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8)小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorrhizine) 。



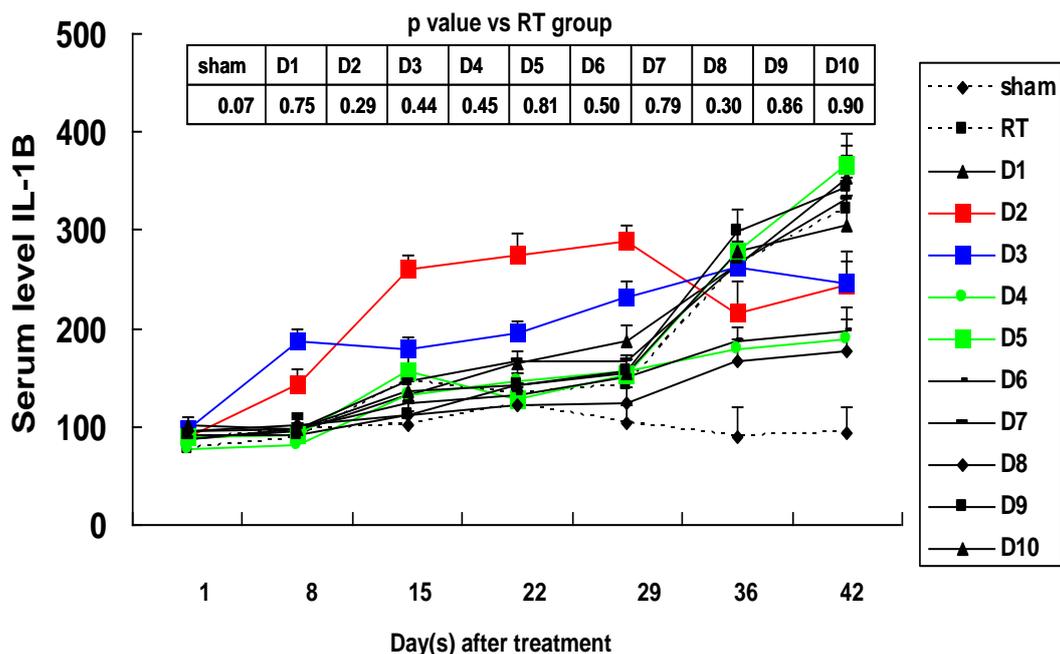
圖七

圖七、小鼠腿部腫瘤重量與實際生長圖。下圖分別為 BNL 於 BALBc/J 品系小鼠腿部（圖左下）與 LLC 於 C57BL6/J 品系小鼠腿部（圖右下）生成腫瘤之情況，分別為治療後第 35 與 42 第天。實驗終了將小鼠犧牲後，將小鼠腿部腫瘤分離稱重的結果，BNL 於 BALBc/J 品系小鼠腿部腫瘤（圖左上）與 LLC 於 C57BL6/J 品系小鼠腿部腫瘤（圖右下上）。S 為未處理放射線組，R 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(2) 黃連鹼(coptisine) 、(3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(4)阿魏鹼(ferulic acid) 、(5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(6)氯原酸(chlorogenic acid) 、(7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(8)小蘗鹼(berberine) 、(9) 非州防己鹼(columbamine) 、(10) 藥根鹼(jatrorhizine) 。以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在表中以”\*”註記。



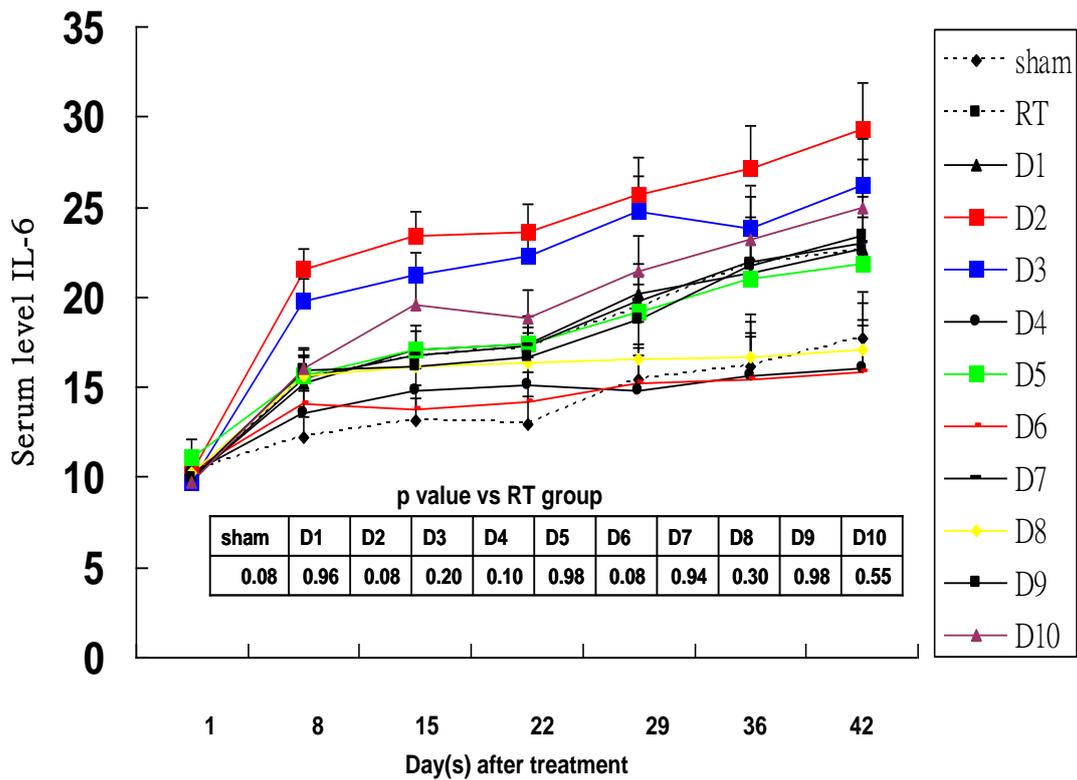
圖八

圖八、 BALBc/J 品系小鼠血清中 TNF-alpha 濃度。實驗過程中每隔 7 天由尾巴採血，分離其血清以 EIA 的方式分析其血清中發炎反應蛋白質 TNF-alpha 濃度。圖中表格為各種藥物相較於放射線治療組之統計結果。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1) 木蘭花鹼 (magnoflorine)、(D2) 黃連鹼 (coptisine)、(D3) 掌葉防己鹼 (palmatine)、(D4) 阿魏鹼 (ferulic acid)、(D5) 表小蘗鹼 (epiberberine)、(D6) 氯原酸 (chlorogenic acid)、(D7) 甲基黃連鹼 (worenine)、(D8) 小蘗鹼 (berberine)、(D9) 非州防己鹼 (columbamine)、(D10) 藥根鹼 (jatrorrhizine)。以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在表中以 "\*" 註記。



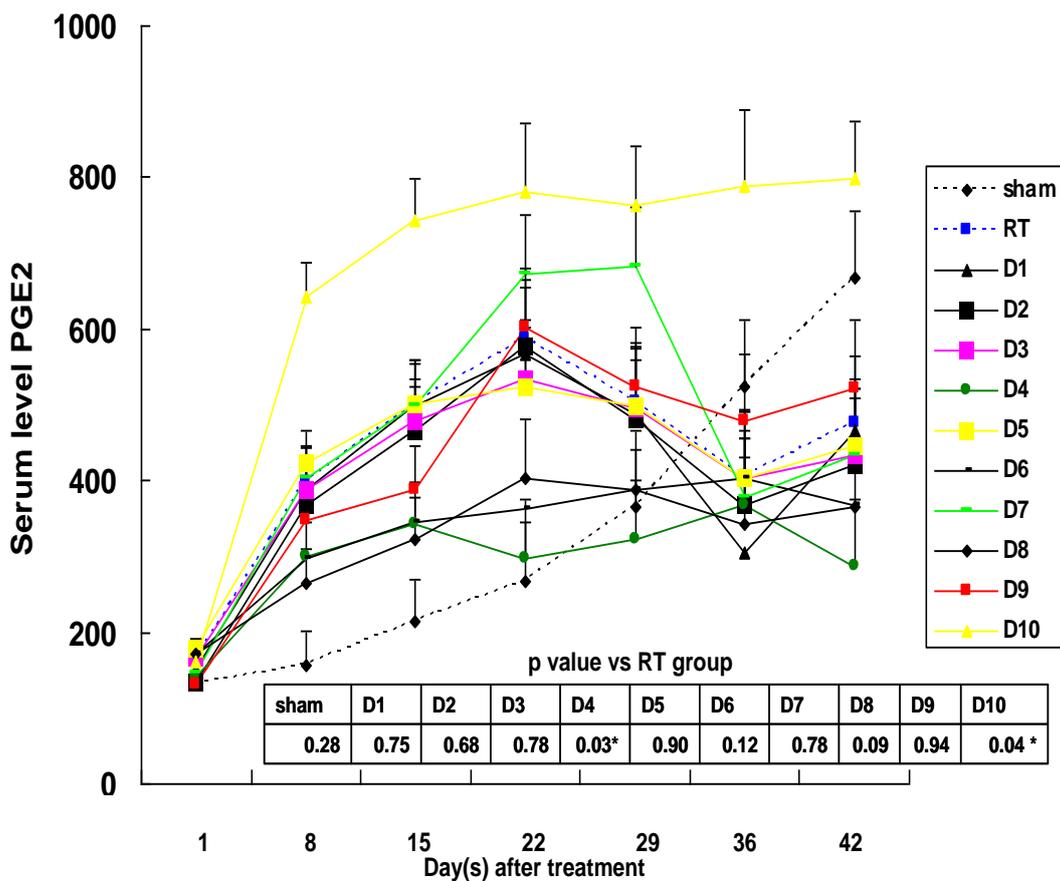
圖九

圖九、 BALBc/J 品系小鼠血清中 IL-1beta 濃度。實驗過程中每隔 7 天由尾巴採血，分離其血清以 EIA 的方式分析其血清中發炎反應蛋白質 IL-1beta 濃度。圖中表格為各種藥物相較於放射線治療組之統計結果。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1) 木蘭花鹼 (magnoflorine)、(D2) 黃連鹼 (coptisine)、(D3) 掌葉防己鹼 (palmatine)、(D4) 阿魏鹼 (ferulic acid)、(D5) 表小蘗鹼 (epiberberine)、(D6) 氯原酸 (chlorogenic acid)、(D7) 甲基黃連鹼 (worenine)、(D8) 小蘗鹼 (berberine)、(D9) 非州防己鹼 (columbamine)、(D10) 藥根鹼 (jatrorrhizine)。以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義。



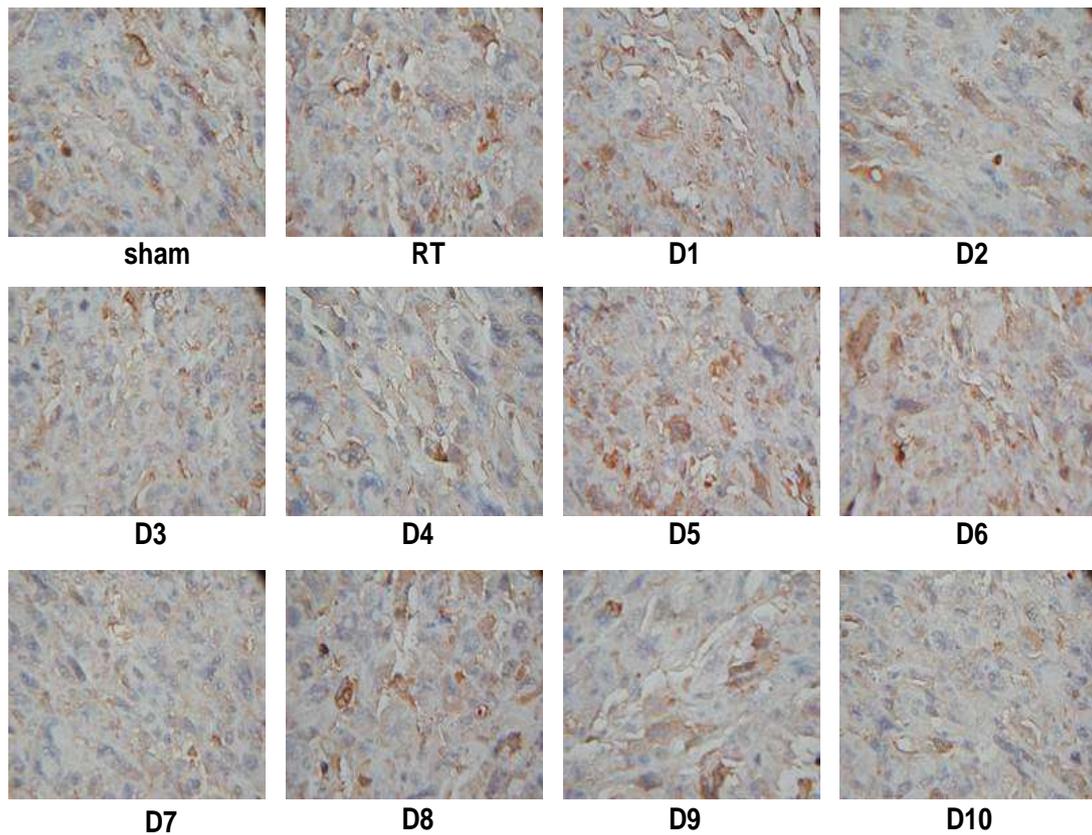
圖十

圖十、 BALBc/J 品系小鼠血清中 IL-6 濃度。實驗過程中每隔 7 天由尾巴採血，分離其血清以 EIA 的方式分析其血清中發炎反應蛋白質 IL-6 濃度。圖中表格為各種藥物相較於放射線治療組之統計結果。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine)、(D2) 黃連鹼(coptisine)、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,)、(D4)阿魏鹼(ferulic acid)、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine)、(D6) 氯原酸(chlorogenic acid)、(D7) 甲基黃連鹼(worenine)、(D8)小蘗鹼(berberine)、(D9) 非州防己鹼(columbamine)、(D10) 藥根鹼(jatrorrhizine)。以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義。



圖十一

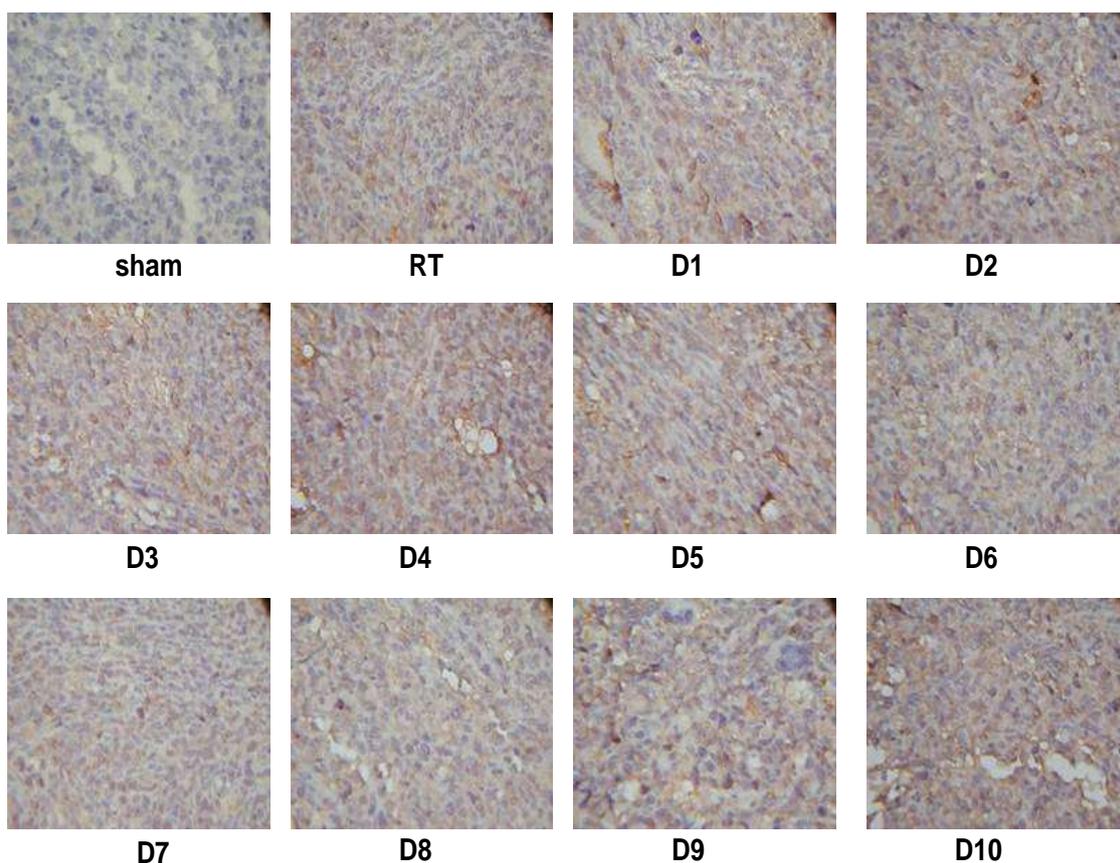
圖十一、BALBc/J 品系小鼠血清中 PGE2 濃度。實驗過程中每隔 7 天由尾巴採血，分離其血清以 EIA 的方式分析其血清中發炎反應蛋白質 PGE2 濃度。圖中表格為各種藥物相較於放射線治療組之統計結果。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼(coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4) 阿魏鹼(ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6) 氯原酸(chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8) 小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorhizine) 。以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在表中以”\*”註記。



圖十二 TNF-alpha

sham	1	RT	2	D1	3	D2	2
D3	1	D4	1	D5	3	D6	3
D7	1	D8	2	D9	2	D10	1

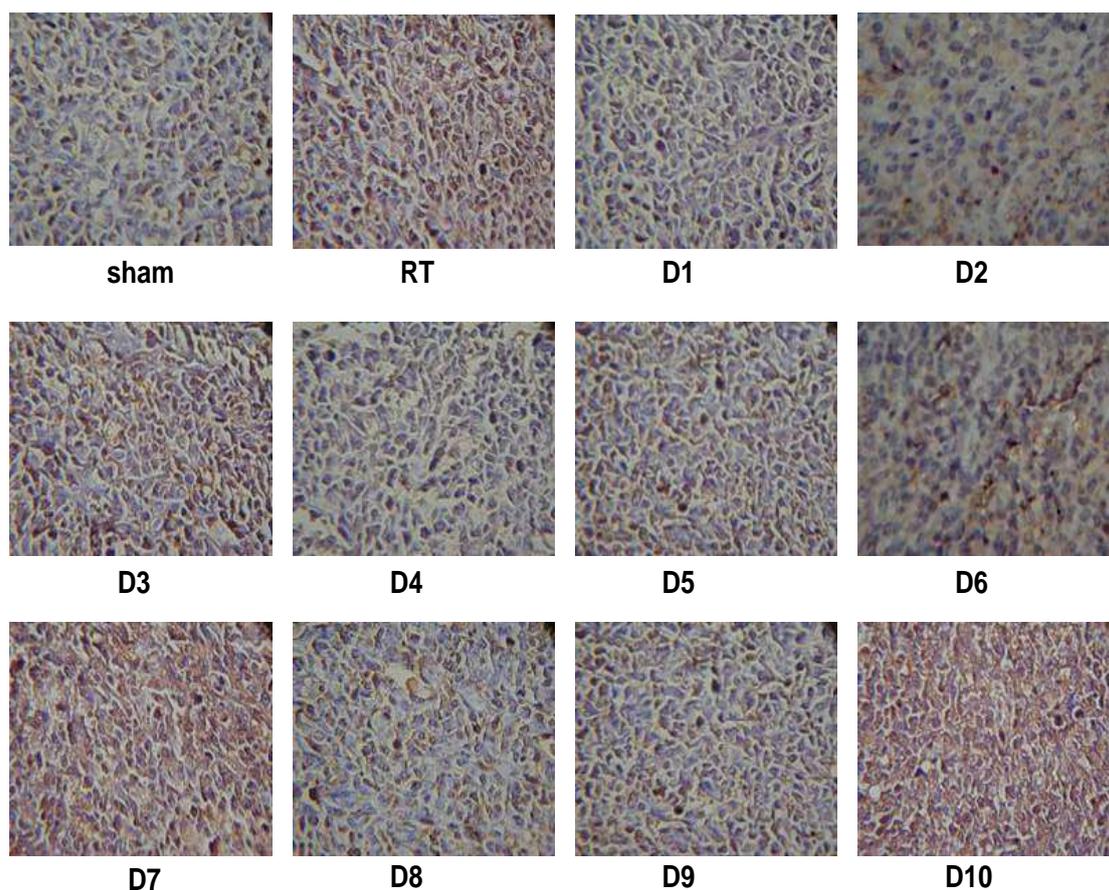
圖十二、 BALBc/J 品系小鼠 BNL 腫瘤組織中 TNF-alpha 的表現情況。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine)、(D2) 黃連鹼(coptisine)、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,)、(D4)阿魏鹼(ferulic acid)、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine)、(D6) 氯原酸(chlorogenic acid)、(D7) 甲基黃連鹼(worenine)、(D8) 小蘗鹼(berberine)、(D9) 非州防己鹼(columbamine)、(D10) 藥根鹼(jatrorhizine)。以 RT 之染色圖為例圖中棕色部分為 TNF-alpha 表現的位置，染上的部位為細胞膜與細胞間質。圖下方為免疫組織染色半定量分析結果，以染色程度(棕色程度所佔單位面積百分比)定義 sham 組為 1，RT 組為 2。



圖十三 IL-1beta

sham	1	RT	3	D1	3	D2	2
D3	2	D4	4	D5	3	D6	2
D7	2	D8	2	D9	2	D10	3

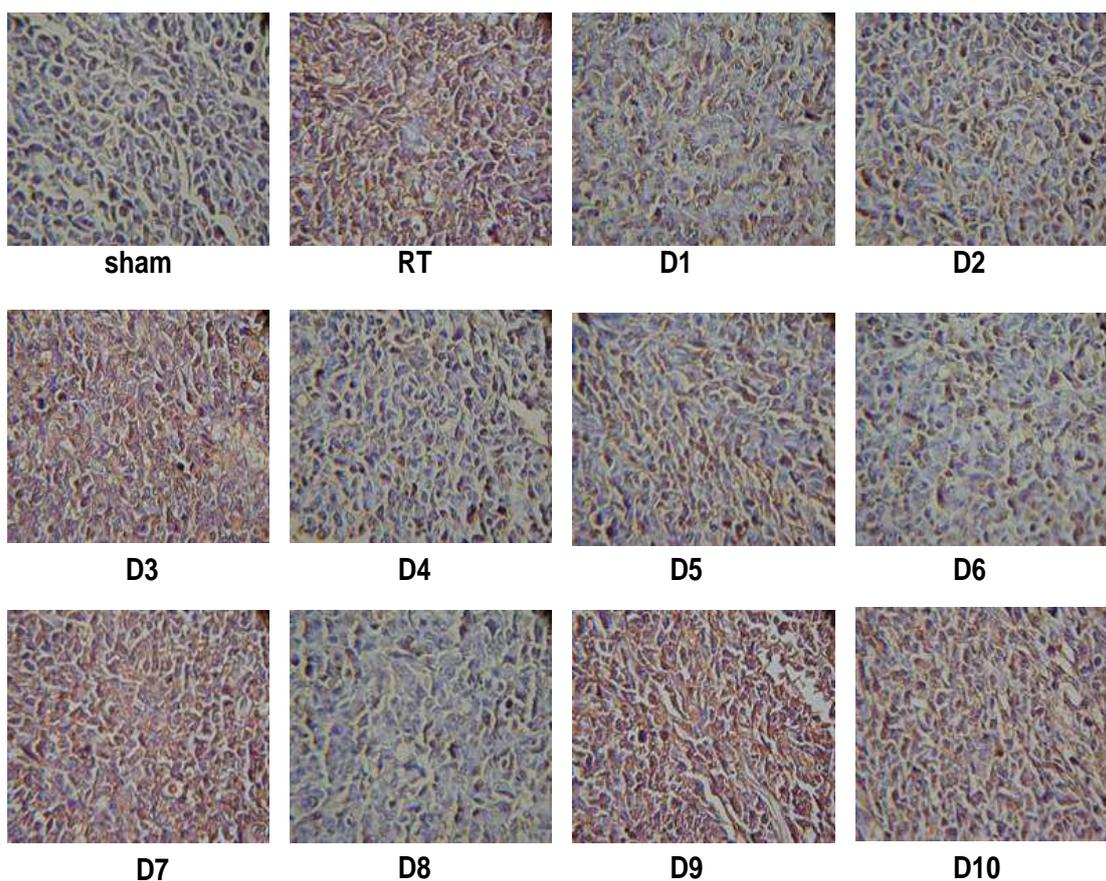
圖十三、 BALBc/J 品系小鼠 BNL 腫瘤組織中、IL-1beta 的表現情況。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼(coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼(ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸(chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8) 小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorrhizine) 。以 RT 之染色圖為例圖中棕色部分為 IL-1beta 表現的位置，染上的部位為細胞膜與細胞間質。圖下方為免疫組織染色半定量分析結果，以染色程度 (棕色程度所佔單位面積百分比)定義 sham 組為 1,RT 組為 3。



圖十四 IL-6

sham	1	RT	3	D1	1	D2	2
D3	3	D4	1	D5	2	D6	2
D7	4	D8	2	D9	2	D10	4

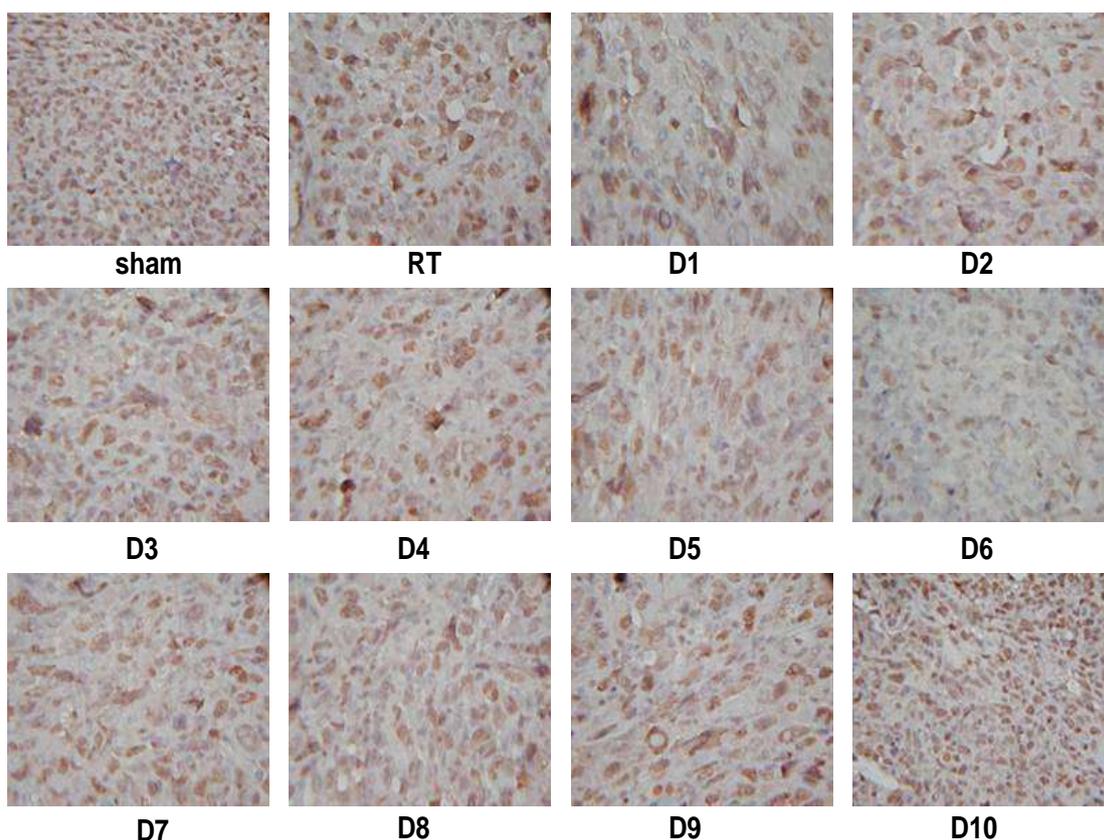
圖十四、 BALBc/J 品系小鼠 BNL 腫瘤組織中 IL-6 的表現情況。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1) 木蘭花鹼 (magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼 (coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼 (palmatine) 、(D4) 阿魏鹼 (ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼 (epiberberine) 、(D6) 氯原酸 (chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼 (worenine) 、(D8) 小蘗鹼 (berberine) 、(D9) 非州防己鹼 (columbamine) 、(D10) 藥根鹼 (jatrorhizine) 。以 RT 之染色圖為例圖中棕色部分為 IL-6 表現的位置，染上的部位為細胞膜與細胞間質。圖下方為免疫組織染色半定量分析結果，以染色程度 (棕色程度所佔單位面積百分比) 定義 sham 組為 1，RT 組為 3。



圖十五 Cox-2

sham	1	RT	3	D1	2	D2	2
D3	4	D4	1	D5	2	D6	2
D7	4	D8	1	D9	3	D10	2

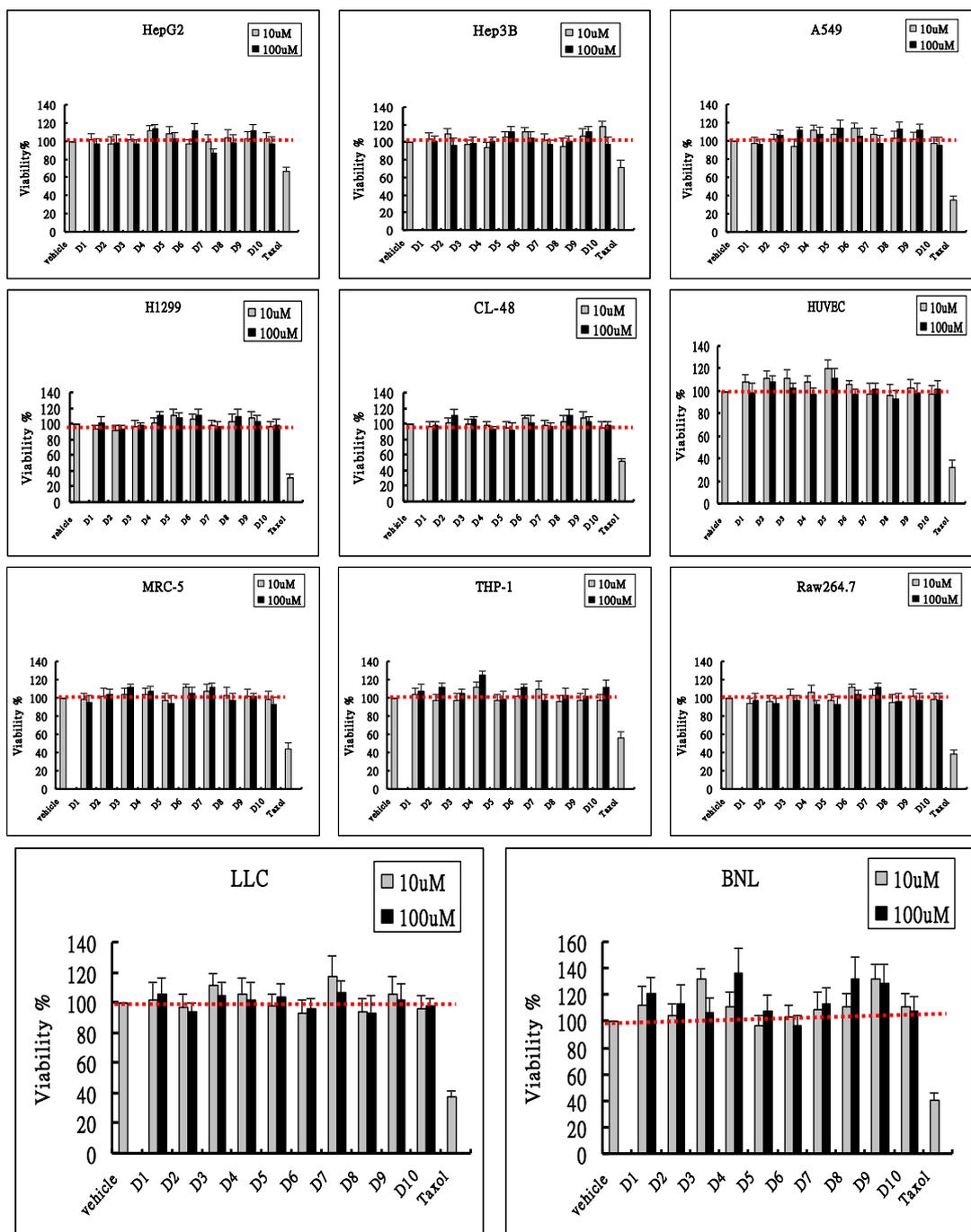
圖十五、 BALBc/J 品系小鼠 BNL 腫瘤組織中 COX-2 的表現情況。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼 (coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼 (ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸 (chlorogenic acid) 、 (D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8) 小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorhizine) 。以 RT 之染色圖為例圖中棕色部分為 COX-2 表現的位置，染上的部位為細胞質。圖下方為免疫組織染色半定量分析結果，以染色程度（棕色程度所佔單位面積百分比）定義 sham 組為 1，RT 組為 3。



圖十六 PCNA

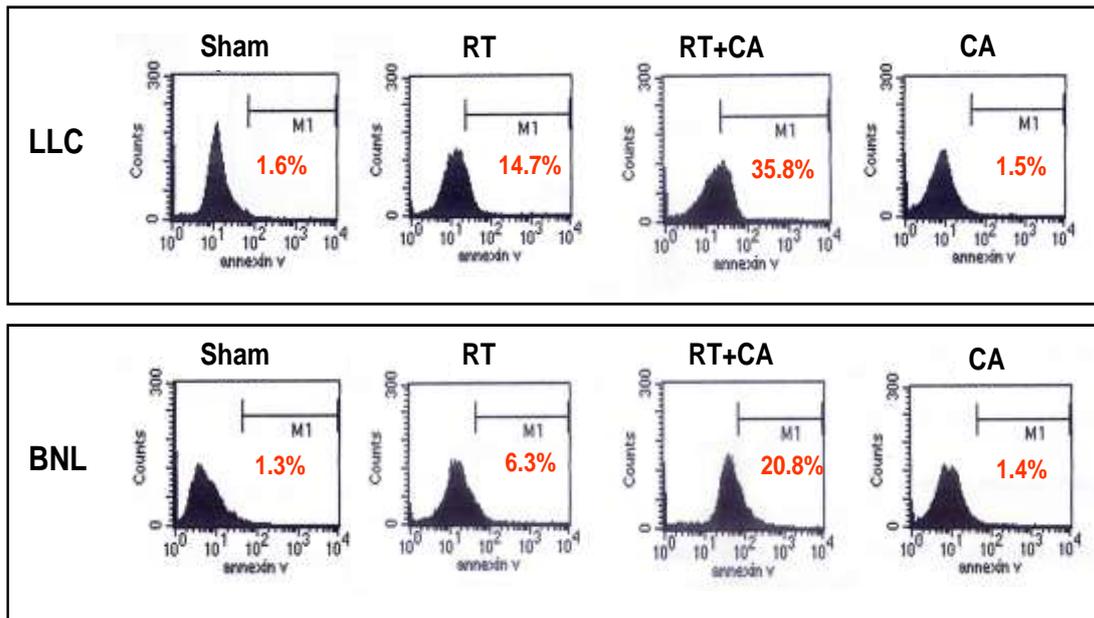
sham	6	RT	3	D1	2	D2	3
D3	3	D4	2	D5	3	D6	1
D7	3	D8	3	D9	3	D10	6

圖十六、 C57BL/6/J 品系小鼠 LLC 腫瘤組織中細胞分裂標記分子 PCNA 的表現情況。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1) 木蘭花鹼 (magnoflorine)、(D2) 黃連鹼 (coptisine)、(D3) 掌葉防己鹼 (palmatine)、(D4) 阿魏鹼 (ferulic acid)、(D5) 表小蘗鹼 (epiberberine)、(D6) 氯原酸 (chlorogenic acid)、(D7) 甲基黃連鹼 (worenine)、(D8) 小蘗鹼 (berberine)、(D9) 非州防己鹼 (columbamine)、(D10) 藥根鹼 (jatrorhizine)。以 RT 之染色圖為例圖中棕色部分為 PCNA 表現的位置，染上的部位為細胞核。圖下方為免疫組織染色半定量分析結果，以染色程度(棕色程度所佔單位面積百分比)定義 sham 組為 6，RT 組為 3。



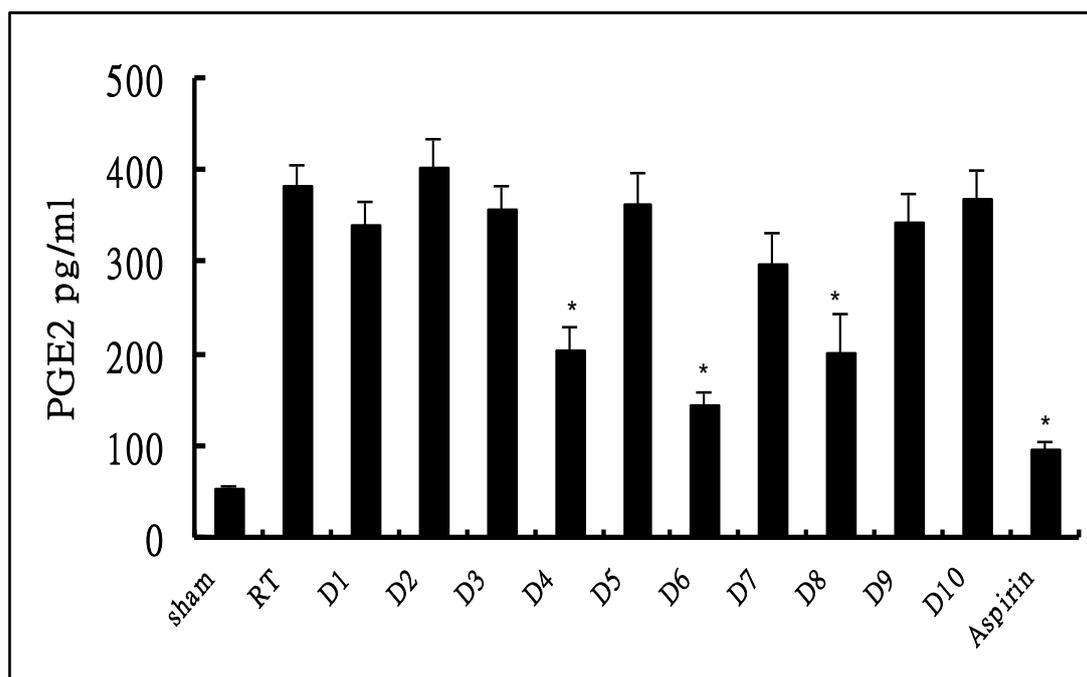
圖十七

圖十七、黃連組成物對腫瘤細胞與正常細胞之毒性測試。2 株人類肝癌 (HepG2、Hep3B)，2 株人類肺癌 (A549、CRL-5831)，1 株正常肝細胞 (CL-48) 細胞株及分離自人類臍靜脈的血管內皮細胞及纖維母細胞 (MRC-5)，人類巨噬細胞 (THP-1)，小鼠巨噬細胞 (R264.7)，小鼠肝癌細胞株 BNL，小鼠肺癌細胞株 LLC。腫瘤細胞與正常細胞在處理不同濃度 (10 及 100uM) 之黃連組成物後 72 小時，以結晶紫染色計數法 (crystal violet staining) 測定細胞存活率的變化。Taxol (500nM) 作為引發細胞毒性之控制組。



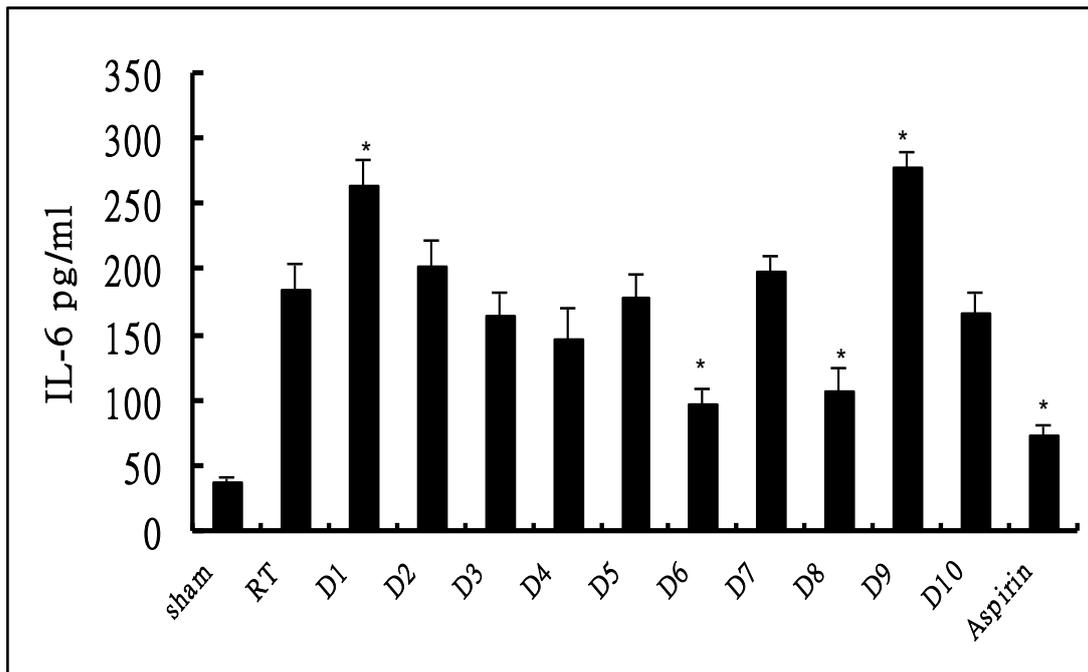
圖十八

圖十八、 chlorogenic acid 增強放射線誘發細胞凋亡情況。小鼠肝癌細胞株 BNL，小鼠肺癌細胞株 LLC 體外培養模式加入 100uM chlorogenic acid 後再予以放射線處理，72 小時後以流式細胞儀分析 annexinV 染色比例。



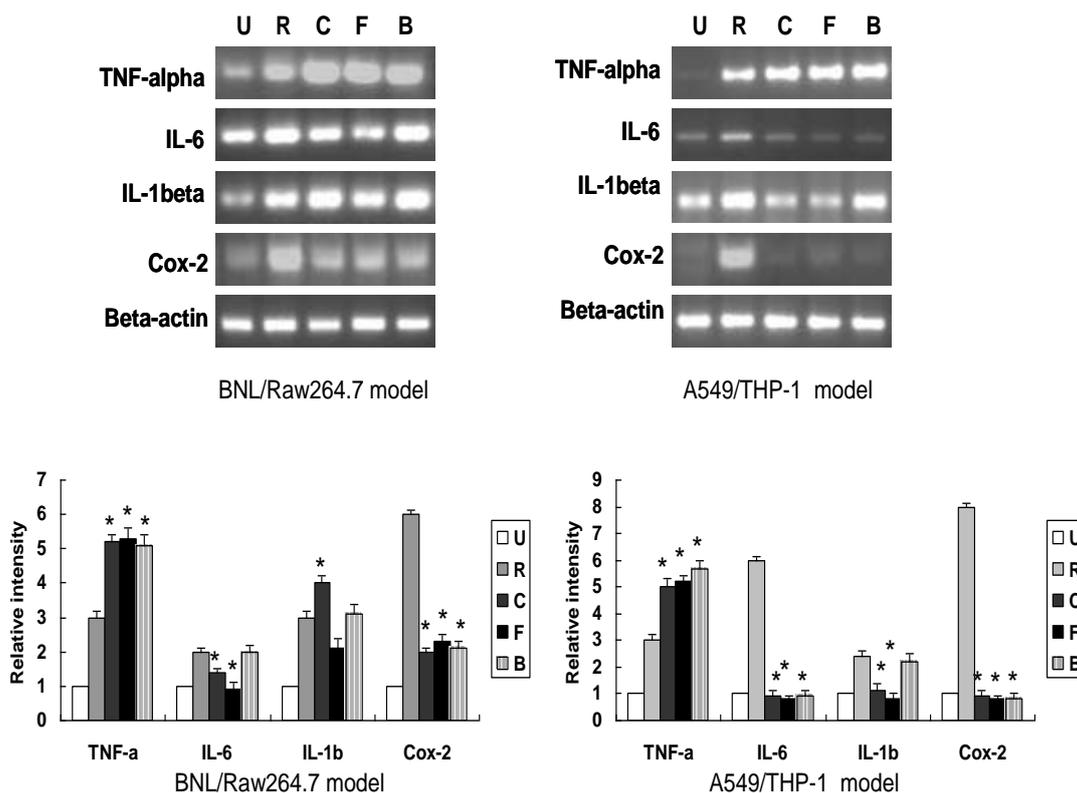
圖十九

圖十九、黃連組成物對肺癌細胞 A549 受放射線刺激產生 PGE2 之效應。細胞經過 PBS 二次洗滌之後，先於不含血清的培養基中培養 16~24 小時，再預處理黃連組成物 1 小時，之後再進行放射線處理。經過 24 小時培養之後，收集培養細胞的上清液，以 EIA 量化分析 PGE-2。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1) 木蘭花鹼(magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼(coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼(ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸(chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8)小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼(columbamine) 、(D10) 藥根鹼(jatrorhizine) 。Aspirin(10uM)為抑制 PGE2 產生之實驗對照組。P value 表示為與 RT 之比較，以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在圖中以"\*"註記。



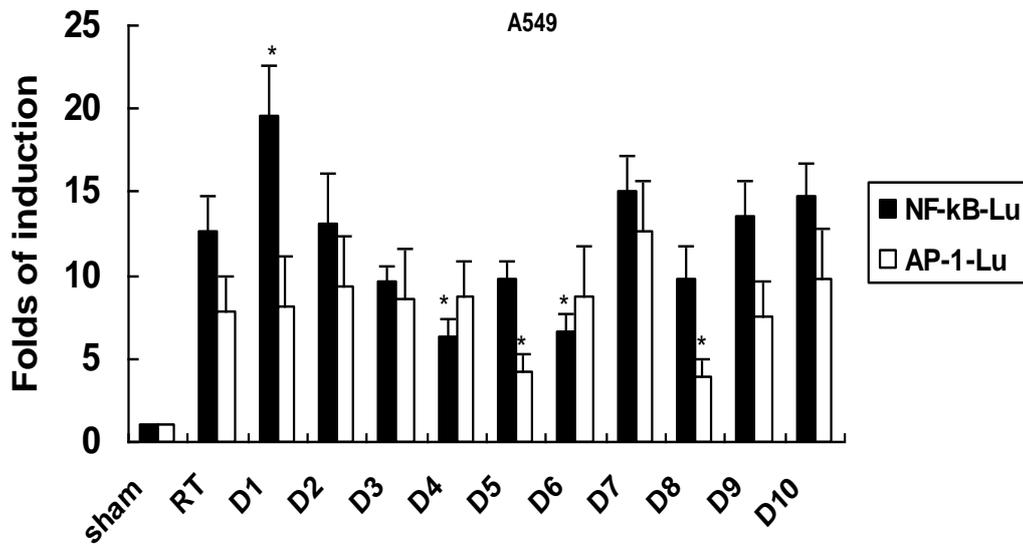
圖二十

圖二十、黃連組成物對血管內皮細胞 HUVEC 受放射線刺激產生 IL-6 效應。HUVEC 細胞經過 PBS 二次洗滌之後，先於不含血清的培養基中培養 16~24 小時，再預處理黃連組成物 1 小時，之後再進行放射線處理。經過 24 小時培養之後，收集培養細胞的上清液，以 EIA 量化分析 IL-6。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1) 木蘭花鹼 (magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼 (coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼 (palmatine) 、(D4) 阿魏鹼 (ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼 (epiberberine) 、(D6) 氯原酸 (chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼 (worenine) 、(D8) 小蘗鹼 (berberine) 、(D9) 非州防己鹼 (columbamine) 、(D10) 藥根鹼 (jatrorrhizine) 。Aspirin (10uM) 為抑制 PGE2 產生之實驗對照組。P value 表示為與 RT 之比較，以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在圖中以 "\*" 註記。



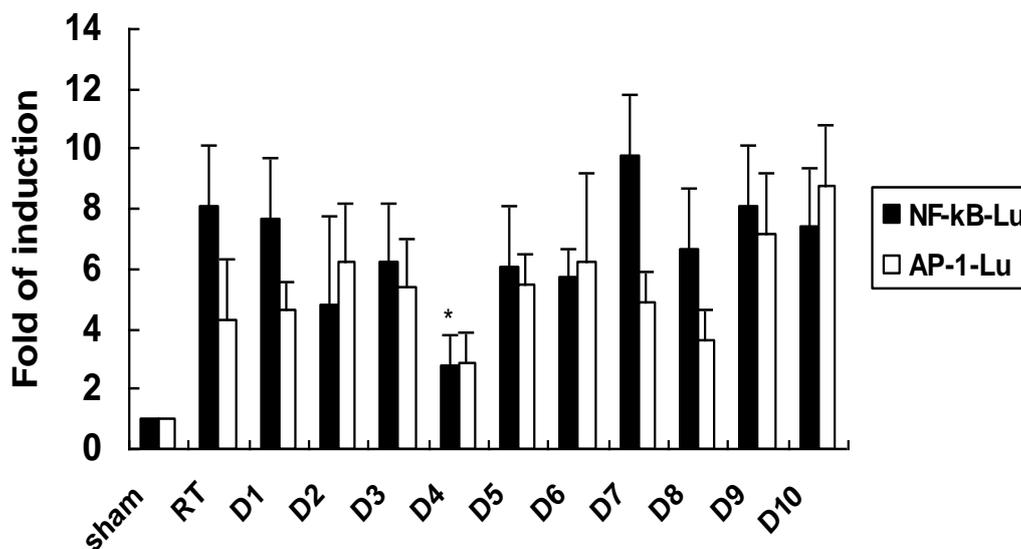
圖二十一

圖二十一、以共同培養的方式探討黃連組成物對巨噬細胞的作用，分別以人類肺癌細胞 A549 搭配人類單核球 THP-1(巨噬細胞前趨細胞)與小鼠肝癌細胞 BNL 搭配小鼠巨噬細胞 Raw264.7 之共同培養方式。A549 與 BNL 細胞經過放射線(4Gy)處理後以 transwell 方式分別與 THP-1 及 Raw264.7 共同培養(此時部分 THP-1 及 Raw264.7 已經預先處理黃連組成物 1 小時)，48 小時後測試 THP-1 及 Raw264.7 細胞中 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 mRNA 變化。上圖左為 Raw264.7 實驗情況下表現 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 mRNA 之情況，下圖左為量化圖。上圖右為 THP-1 實驗情況下表現 TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 及 Cox-2 mRNA 之情況，下圖右為量化圖。U 為未處理放射線組，R 為處理放射線組，berberine(B), ferulic acid(F), chlorogenic acid(C)。P value 表示為與 RT 之比較，以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在圖中以"\*"註記。



圖二十二

圖二十二、黃連組成物對於放射線誘發的 A549 腫瘤細胞株 NF-KB 及 AP-1 活性之效應。轉殖入 AP-1 或 NF-kB leuciferase reporter plasmid 的 A549 細胞先預處理 100uM 之黃連組成物一小時後再進行放射線刺激，一小時後將細胞溶解再加入冷光受質後由冷光儀偵測出冷光強度，以 sham 組原始數值為 1 計算出黃連組成物對放射線誘發 NF-kB 及 AP-1 活性的影響。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼 (magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼(coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼(ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸(chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8)小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼 (columbamine) 、(D10) 藥根鹼 (jatrorrhizine) 。P value 表示為與 RT 之比較，以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在圖中以”\*”註記。



圖二十三

圖二十三、黃連組成物對於放射線誘發的 HUVEC 細胞 NF-KB 及 AP-1 活性之效應。轉殖入 AP-1 或 NF-kB leuciferase reporter plasmid 的 HUVEC 細胞先預處理 100uM 之黃連組成物一小時後再進行放射線刺激，一小時後將細胞溶解再加入冷光受質後由冷光儀偵測出冷光強度，以 sham 組原始數值為 1 計算出黃連組成物對放射線誘發 NF-kB 及 AP-1 活性的影響。Sham 為未處理放射線組，RT 為處理放射線組，其餘為處理下列藥物 (D1)木蘭花鹼 (magnoflorine) 、(D2) 黃連鹼(coptisine) 、(D3) 掌葉防己鹼(palmatine,) 、(D4)阿魏鹼(ferulic acid) 、(D5) 表小蘗鹼(epiberberine) 、(D6)氯原酸(chlorogenic acid) 、(D7) 甲基黃連鹼(worenine) 、(D8)小蘗鹼(berberine) 、(D9) 非州防己鹼 (columbamine) 、(D10) 藥根鹼 (jatrorrhizine) 。P value 表示為與 RT 之比較，以 p 值小於 0.05 定義為具有統計意義，在圖中以”\*”註記。