

編號：CCMP 95-RD-212(2-1)

抗肝癌方劑之資源開發與作用機轉之探討：傳統方劑對人類肝癌細胞之體內及體外抑制增生、腫瘤入侵、血管新生作用和誘發細胞程式死亡機制之探討(2-1)

林俊清
高雄醫學大學

摘要

本研究目標乃從生命科學發展迅速的分子生物學理論與傳統中國醫藥方劑之作用相互配合，深入探索其抗肝癌之活性機轉，如此不僅可增加西方醫學對中國醫藥作用的接受度，並賦與中國醫藥複方藥效的現代化意義。癌症目前為威脅人類健康的頭號敵人，雖然全世界各國都投入大量的資源進行研究，但目前仍有許多困難仍需克服：其中包括許多化療藥物上不能完全殲滅癌症細胞。再者，對於一些具轉移性及複發性的癌細胞會發展出高度的抗藥性，造成治療的失敗。除此，透過血管新生的作用，癌細胞會隨血行轉移至他處，而造成癌細胞的快速擴散進而造成病人的死亡。

藥物對細胞增生的抑制活性以 XTT 方式測得；細胞週期的分佈則是以核酸染料將 DNA 染色後以 flow cytometry 的方式分析；Apoptosis 的偵測以瓊膠電泳和 TUNEL 方法分析；粒腺體膜電位以 JC-1 染色。p21 的表現以 ELISA 方式測得；caspase 的活性以 caspase activity assay kit 分析。NF- κ B 活性以 TransAM ELISA kit 分析。其他蛋白質的表現以 Western blot 的方式偵測；in vivo 的活性評估以 nude mice 的實驗方式評估。

研究發現傳統方劑黃連解毒湯和散腫潰堅湯對人類肝癌細胞株 HepG2 和 PLC/PRF/5 細胞具有良好的細胞增生抑制效果。在濃度 500 μ g/ml 的濃度可達最好的增生抑制效果。黃連解毒湯和散腫潰堅湯對抗 HepG2 細胞增生的 IC₅₀ 值分別為 192.3 和 303.4 μ g/ml；對抗

PLC/PRF/5 細胞增生的 IC_{50} 值分別為 160.9 和 333.2 $\mu\text{g/ml}$ 。

在黃連解毒湯的作用機轉方面，細胞以黃連解毒處理 12 小時後可促使 HepG2 和 PLC/PRF/5 的細胞週期停滯於 S-G2/M 期，此一效果隨著劑量增加而增加。再者，以瓊膠電泳和 TUNEL 染色的方法也發現黃連解毒湯會誘發細胞進行細胞凋亡，此一效果隨著劑量和處理時間增加而增加。在分子機制方面，黃連解毒湯可以透過 p53-independent 的方式增加 p21 的表現。黃連解毒湯也會抑制 cyclin A、cyclin B、cdc2、cdc25C 的表現以及促使 cdc2 和 cdc25 保持於不活化的磷酸化狀態，進而抑制細胞週期的演進。再者，黃連解毒湯也會改變 proapoptotic 和 antiapoptotic Bcl-2 蛋白的比值進而啟動粒線體相關的 apoptosis 路徑，包括粒腺體膜電位的改變、caspase-9 的活化而造成細胞死亡。相較於細胞細胞死亡路徑，黃連解毒湯也會抑制細胞生存路徑 NF- κ B 的轉位、活性以及下游分子 Bcl-XL 的表現而促進細胞的死亡。最後，利用 in vivo 的實驗模式也證實黃連解毒湯在動物體也具有腫瘤抑制的效果。

關鍵詞：黃連解毒湯，肝癌，細胞凋亡，NF- κ B

編號：CCMP 95-RD-212(2-1)

The mechanism of the anti-proliferative, anti-invasive, anti-angiogenesis and apoptotic effects of Traditional Chinese Medicinal Prescription (TCMP) in human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*.(2-1)

Chun-Ching Lin
Kaohsiung Medical University

ABSTRACT

The incidence of cancer is increasing worldwide and it is the single most common cause of deaths in both developed and developing countries. Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal malignancies, and is also one of the four most prevalent malignant diseases of adults in China, Taiwan, Korea, and sub-Africa. Several etiologic factors have been classified as high-risk factor in association with HCC, including exposure to aflatoxin B1, and infection with hepatitis B virus and hepatitis C virus. Our laboratory focuses on the integration of traditional Chinese traditional medicines (CTM) with molecular biology to further study the active mechanism their anti-liver cancer activity. This allows a better appreciation of CTM in the modern era and also a better understanding of its underlying potential for therapy, thus increasing its acceptance in Western medicine.

Cell proliferation inhibition was assay by XTT. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Quantitative assessment of apoptosis was analyzed by agrose electroporsis and TUNEL method. The p21 level was assay by ELISA kits. The activity of caspases was measured by caspase activity assay kits. The mitochondraol membrane potential was assessed by JC-1. The activity of NF-κB was assessed by Trans AM

ELISA kit. The tumor growth of SZKJT was assessed by *In vivo tumor xenograft study*.

Our study reports here for the first time the anticancer effect of HLJDT in two human liver cancer cell lines, Hep G2 and PLC/PRF/5. The results indicated that HLJDT inhibited the proliferation of Hep G2 and PLC/PRF/5 cells by inducing apoptosis and blocking cell cycle progression in the S-G2/M phase. Immunoblot assay showed that HLJDT significantly increased the expression of inactivated phospho-Cdc2 protein and phospho-Cdc25C, and decreased the levels of Cyclin A, Cyclin B1, Cdc2, and Cdc25C, thereby contributing to the cell cycle arrest. Apoptosis induced by HLJDT in both Hep G2 and PLC/PRF/5 cells was determined by electrophoresis and TUNEL assay. In investigating the detailed mechanism, HLJDT increased the expression of Bax and Bak, but decreased the level of Bcl-2 and Bcl-XL, and subsequently triggered the mitochondrial apoptotic pathway (mitochondrial membrane potential loss and caspase-9 activation).

In addition, HLJDT also inhibited cell survival signaling by enhancing the amount of I κ B α in the cytoplasm, reducing the level and activity of NF- κ B in the nucleus, and subsequently attenuating the expression of Bcl-XL in Hep G2 and PLC/PRF/5 cells. The inhibitory effect mediated by HLJDT on cell growth was also demonstrated in a nude mouse model, in which the liver cancer cells-induced tumor xenograft shrunk considerably following treatment with HLJDT. Taken together, these results suggest a potential anticancer effect of HLJDT against human liver cancer cells.

Keywords : Huang-Lian-Jie-Du-Tang; liver cancer; apoptosis; NF- κ B

壹、前言

本計畫依據行政院衛生署中醫藥委員會九十五年研究重點，研究項目一、1-1；研究目的為將生命科學發展迅速的系統生物學與中醫藥之作用相互配合，如此可增加西方醫學對中醫藥作用的接受度，以達中醫藥現代化的目標，並將中醫藥推廣到世界各國，進一步促進全球人類的健康。

根據世界衛生組織的統計，全球約有一百萬人死於與肝癌相關的病症¹。在台灣，從民國八十年起，每年約有五千人死於肝癌，其中在女性的致死惡性疾病中排名第二，在男性則更高居第一名²。除此，根據研究報告指出，B 型肝炎病毒表面抗原的帶原者罹患肝癌的機率比非帶原者高出二百二十三倍³，而依據台灣官方的統計，台灣至少有三百萬人為 B 型肝炎的帶原者²，因此肝癌乃為傷害國人健康的頭號殺手之一。

肝癌是一種實質性的惡性腫瘤，罹患此一疾病的高危險群以 45 歲以上的中年人為主，在初期並無特殊的徵兆，病人會出現上腹部不舒服、食慾差、容易疲勞等，當摸到有硬塊時，通常已進入病程的晚期了。目前，臨床上肝癌的治療仍以手術為主，必須注意的是若病人合併有肝硬化、嚴重黃疸或腹水等大都不能開刀，所以大多數的病人並不適用以外科切除的方式治療；再者，以手術切除後的病人其復發率約有 40%。因此，以侵入性的治療方式處理仍無法很有效的對抗此一疾病。在化學藥物的治療上亦面臨了瓶頸，肝癌對於現行使用的抗癌藥其敏感性都不高，治療效果通常也不佳，且以肝動脈灌注化學藥物治療時所引起的副作用最大⁴。所以，尋求一個能有效且安全的治療藥物或是能預防手術後再發的有效藥物乃當務之要。在天然藥物的研究上，過去幾年已發現一些可抗肝癌的方劑、生藥及其純化成分等，如小柴胡湯、lanostanoids、baicalein、solamargine、10-hydroxycamptothecin 等⁵⁻⁹，但是部分成果仍處在一些初步的研究，尤其是在機轉的建立上仍有許多的未知，不過對於天然藥物的開發仍是孕育新藥產生的最大搖籃。

細胞凋亡(apoptosis or programmed cell death)在正常的發展(development)上為一種必要的生理過程，其能維持組織生理的平衡及參與免疫防禦系統^{10,11}。除此，它也與一些病理的反應有相當大的關聯性，如急性的神經傷害(acute neurological injuries)、退化性神經性疾病(neurodegenerative disease)、心血管疾病(cardiovascular disease)、免

疫疾病(immunological disease)、AIDS 和癌症¹²。被定義為 Apoptotic death 的特徵包括 cell collapse、membrane blebbing, cell shrinkage、chromatin condensation、DNA fragmentation, 最後細胞會裂解為 apoptotic body 而受到鄰近細胞或吞噬細胞的吞噬。相較於壞死(necrosis), apoptosis 不會引起細胞膜在早期就失去完整性而將細胞內容物釋放至細胞間質中而引發發炎反應, 故一般認為誘發細胞進行 apoptosis 是一種較好的抗癌機制, 藉此減少藥物可能引起的副作用¹³。在 apoptosis 的過程中, caspase 位居於中心的角色, 目前已知在哺乳類動物中至少有十四種 caspase 參與 apoptosis。其中可分為 effector(下游的)caspases, 和 initiator(上游的) caspases^{11,14}。Effector caspases 包括有 caspase 3、6、7, 這幾個 caspase 為細胞受到瓦解的主要執行者; 相對的, initiator caspases 則為下游 caspase 的活化者, 這類的 caspase 包括 caspase 8、9 和 10。目前已知的 caspase 受質已有上百種¹⁴, 當這些受質受到 caspase 的切裂時, 細胞就會呈現 apoptotic 的死亡特徵, 如 caspase 3 可將 nuclease 的抑制劑—ICAD (inhibitor of CAD)切除而放出 CAD(caspases-activated Dnase), 此時 CAD 的活化會將 DNA fragmentation^{15,16}。另外, 一些細胞骨骼、細胞生存因子、DNA 修復系統等也都是 caspase 的受質^{14,17-19}。

Fas/FasL (ligand)系統為啟動細胞進行 apoptosis 重要的機制之一^{20,21}。Fas receptor 為 TNF (tumor necrosis factor) receptor 家族中的 type I 膜蛋白, 當其被活化時, receptor 會進行 trimerization, 並吸納 adaptor molecule FADD(Fas-associated death domain protein)結合至 receptor 位於細胞質中的 domain; 另一方面, FADD 會進一步吸納多分子的 procaspase 8 形成所謂的 DISC (death-inducing signaling complex), 此時 procaspase 8 會因構形的改變和濃度的提高而活化成 caspase 8, 具有完整活性的 caspase 8 可活化 caspase 3 和 caspase 7, 而 caspase 3 會再活化 caspase 6, 這些 effector caspase (包括 caspase 3、6、7)會進一步去影響一連串的 caspase substrate, 最後使細胞 apoptotic death²²。Fas receptor 已被證實分佈於許多的器官中, 包括胸腺、心臟、肺臟和肝臟中^{23,24}。它的活化必須要有 ligand (FasL)與其結合才得以進行, FasL 為 TNF family 的 type II membrane protein, 其可分為兩種形式²⁵: 一為 soluble Fas Ligand (sFasL), 另一為 membrane-bound FasL (mFasL)。sFasL 乃是經由 metalloprotease-like enzyme 切斷 mFasL 所產生的²⁶。sFasL 的生理功能近來備受爭議, 有些文獻認為不論是 sFasL 或 mFasL 都會活化 Fas receptor 進而啟動 apoptosis, 但是相較於 mFasL, sFasL

是一種較弱的 apoptosis 誘導²⁷，低濃度的 ethanol 也被證明會誘導 sFasL 的增加而促使肝癌細胞進行 apoptosis²⁸；但另一方面，也有研究認為肝癌細胞會經由增加 sFasL 的表現而使 Fas receptor 去敏感化，以致於癌細胞能逃避免疫系統的偵測，因此 sFasL 量可用來做為評估 cancer 的指標^{29,30}。除此，Fas receptor 的表現被向下修正也是另一個癌細胞得以逃過免疫防禦機制的主因之一²⁹。所以 Fas receptor 和 FasL 包括 sFasL 和 mFasL 對於藥物的作用佔有一席之地。事實上，愈來愈多的證據證實許多抗癌藥的作用機轉是透過活化 Fas/FasL 系統，且細胞 Fas receptor 的表現也會影響癌細胞對於抗癌藥物的敏感性^{31,32}。因此，本研究也針對受測藥物在 Fas receptor 及 Fas ligand 包含 sFasL 和 mFasL 的探討。

另一個會啟動細胞 apoptosis 反應的 pathway 是經由粒腺體 (mitochondrion)^{10,11,33} 途徑，當細胞受到一些細胞內或細胞外的 stress 如缺氧、放射線傷害、DNA 傷害時，cytochrome *c*、Apaf-1、AIF (apoptosis inducing factor)、Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP-binding protein with low PI) 等會由粒線體中釋放出來，其中 cytochrome *c* 和 Apaf-1 會與 procaspase 9 在 dATP 的存在下形成 apoptosome，此時 procaspase 9 得以活化成 caspase 9，並且再進一步的活化一連串 caspase cascade，最後使細胞凋亡。而此一 apoptosis 訊息的活化，尤其是 cytochrome *c* 的釋放，最主要受到 Bcl-2 family 的調節控制³⁴，Bcl-2 family 的成員依照其結構相似度和功能可次分為三類：第一類為具有抗 apoptosis (antiapoptotic member) 的能力，此類的 protein 大多侷限於粒腺體的表面，如 Bcl-2、Bcl-X_L；第二類和第三類的 protein 則為促進 apoptosis 的分子 (proapoptotic member)，包括 Bax、Bak、Bid 等，不像第一類的成員，這兩類的 protein 會穿梭於細胞質和胞器間，當其接受到 apoptosis 的訊息才會集中至粒線體^{10,35}。Bcl-2 家族同類的成員可進行 homodimerize。另外，antiapoptotic 和 proapoptotic 的 protein 也會形成 heterodimers，透過此一機制，proapoptotic member 和 antiapoptotic member 可以互相制衡彼此的功能。所以，細胞是否會進行 apoptotic death，決定於 antiapoptotic 和 proapoptotic member 的量，當 antiapoptotic member 多於 proapoptotic member 時，細胞存活；反之，細胞則進行 apoptosis^{10,36}。近來已有文獻證明 Bcl-2 family 間成員的表現比例會影響細胞的增生，造成細胞的癌化^{37,38}，更甚之，其亦會影響癌細胞對抗癌藥物的敏感性^{39,40}。所以，當藥物能降低 Bcl-2 或 Bcl-X_L 的表現

時，則必能幫助提高藥物毒殺癌細胞的有效性；相對的，若藥物能提升 proapoptotic member 的表現，也有助於癌細胞進行 apoptotic death。

另一個在抗癌藥的抗癌機制中佔有極大份量的因子為腫瘤抑制因子 p53。而現今有愈來愈多的證據顯示，在人類的癌症中有 80% 的癌症與 p53 的突變有關⁴¹，其中也包含肝癌。p53 參與許多生理反應的調節，包括細胞週期控制、DNA 修復、genome 的穩定、apoptosis、分化、老化和血管新生⁴²⁻⁴⁴。在正常細胞中，p53 的含量極低，但是當細胞受到一些 stress，如放射線傷害、缺氧、營養物缺乏、DNA 受損時則會引起 p53 的活化⁴²。一旦活化 p53 後，透過 p53 的 transactivation function 影響一些下游分子，可能會使細胞出現兩種結果。一為細胞週期(cell cycle)停止，細胞可藉此啟動 cell checkpoint 和 DNA 修復機制，使細胞在複製前可將受損的 DNA 修復。p53 所引導的細胞週期停止可能於前期(G1 phase)或後期(G2/M phase)^{45,46}，其中 cell cycle 停止於 G1 phase 被研究的較為透徹。在此 pathway 中，p53 影響幾個分子的表現，如 Gadd45、cyclin G 和 p21⁴²。其中 p21 乃為一種 CDK (cyclin-cdk complex)的抑制劑，其在 p53 所引導的 cell cycle arrest 扮演了關鍵性的角色。在一般正常的狀況下，細胞要從 G1 phase 進入 S phase 時，必須要有活化的 CDK complex 將 Rb 磷酸化，被磷酸化的 Rb 失去與 E2F 的結合能立即放出游離的 E2F，此時細胞可由 G1 phase 進入 S phase。所以，當 CDK complex 受到 p21 的抑制時，未磷酸化的 Rb 會增多，使 E2F 無法被釋出，因此細胞便停止於 G1 phase^{42,45}，即無法進入 S phase。相較於 G1 checkpoint，cell cycle 停止於 G2/M phase 的真正機轉則仍存在較多的未知，近來研究認為，被 p53 影響的下游分子可能包括 p21、14-3-3 protein、Gadd 45、cdc 2 和 cyclin B 等⁴⁶⁻⁴⁸。類似地，p21 也會抑制 cdc2 和 cyclin B 所組成的 CDK complex 使其無法運作而致細胞停滯在 G2 phase。

另一個完全不同於細胞週期停止的反應結果是 apoptosis⁴²。此一結果的成因是來自於 p53 可調節許多分子的表現，p53 可增加幾個 proapoptotic factor 的表現，包括前述的 Fas receptor、Bax、PIG3 和 IGF-BP3。IGF-BP3 可拮抗細胞生存因子 insulin-like growth factor-1 的作用⁴⁹，而 PIG3 (p53-inducing gene)則會造成細胞處在氧化 stress 的環境下，使細胞死亡⁵⁰。除了向上調整的功能，p53 也會向下修正 antiapoptotic factor 的表現，如 Bcl-2^{42,51}。如此一來，整個細胞的環境乃處於 apoptotic 訊息大於細胞生存訊息的條件，細胞因此便會啟動細胞程式死亡即 apoptosis。至於在 p53 活化後所表現出的結果是細胞週

期停止或是進行 apoptosis 則須視更多條件而定，如刺激因子的種類、細胞的種類、DNA 的傷害程度、細胞環境中生存因子的量和活化的 p53 之多寡等⁴²。但無論是細胞週期停止或是引發 apoptosis，抗癌藥都可藉此抑制癌細胞的增生。所以也有愈來愈多的文獻證明，當細胞的 p53 突變後對於抗癌藥的敏感性將低於 p53 未突變的細胞株^{52,53}。

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 為 reticuloendotheliosis (Rel) family protein 所組成的 transcriptional factor，已經被證實參予調控許多細胞的生理活性，包括發炎反應、免疫調節、細胞的存活、增生、凋亡等^{54,55}。NF- κ B 也被證實和癌症的 invasion 和 metatasis 有極大的關係性^{54,55}。Rel family 可分為兩種 subfamily protein，第一種包括 Rel A、Rel B 和 c-Rel。另一種則包括 NF- κ B1 (p105) 和 NF- κ B2 (p100)。在正常的情況下，inhibitor of κ B (I- κ B) protein 會與 NF- κ B 結合使 NF- κ B 侷限於細胞質中而其活性受到抑制。但是當細胞受到刺激，包括 cytokines、pathogen、stress 等，I- κ B kinase (IKK) 會將 I- κ B 磷酸化而使 I- κ B 被代謝掉而失去抑制 NF- κ B 的能力。游離出的 NF- κ B 隨即由細胞質轉位至細胞核，並進一步的影響許多基因的表現。NF- κ B 對於細胞凋亡的調控扮演多重的角色^{54,55}。一方面已有文獻證實它會透過增加許多 antideath factor 如 FLIC、antiapoptotic Bcl-2 protein (A1/BFL1、Bcl-XL)、c-IAP 的表現而抑制細胞凋亡⁵⁶。另一方面，也有文獻證明 NF- κ B 亦可能透過增加 death receptor Fas、Fas ligand 和 TRAIL 的表現而促進 apoptosis 的發生^{57,58}。除了對細胞凋亡的影響，NF- κ B 也被證實參與腫瘤的增生、invasion、metatasis 和 angiogenesis。NF- κ B 會增加 cyclinG 和 cyclinD 的表現而促使細胞週期的演進。另外，NF- κ B 也會透過家數種 chemokines 如 IL-8、MMPs 和 VEGF 的分泌進而促使腫瘤侵入、轉移及血管新生^{59,60}。

本計劃預計以三個階段開發出三種抗肝癌的治療藥物策略：第一階段以直接性腫瘤毒殺的方劑為主，探討該方劑對於肝癌細胞的細胞週期及細胞凋亡誘導之效，並深入探討其對細胞週期調控（包括 p53、p21、cyclins、cdks）、細胞凋亡啟動（包括 Bcl-2 family protein、caspases）以及相關細胞存活機制（包括 NF- κ B）的影響。

貳、材料與方法

(一) 傳統中藥方劑之組成及來源

1. 散腫潰堅湯《蘭室秘藏》

昆布 2.5g、黃柏 4g、知母 2.5g、栝樓根 2.5g、桔梗 2.5g、三稜 1.5g、莪朮 1.5g、連翹 1.5g、黃連 1g、黃芩 4g、葛根 1.5g、升麻 1.5g、柴胡 2.5g、當歸尾 1g、甘草 1.5g、龍膽草 2.5g、白芍 1g。

2. 柴胡清肝湯《醫宗金鑑》

柴胡 3g、生地黃 3g、當歸 4g、赤芍 3g、川芎 2g、連翹 2g、牛蒡子 3g、黃芩 2g、山梔子 2g、栝樓根 2g、甘草節 2g、防風 2g。

3. 黃連解毒湯《外台秘要》

黃連 6g、黃芩 6g、黃柏 6g、山梔子 6g。

(二) 傳統中藥方劑之製備

將各個方劑 (200g)，分別用一公升的沸水煮沸達二小時然後過濾，如此重覆三次且合併三次濾液，經減壓濃縮後再以真空冷凍乾燥，計算產率。分別放入瓶內且置於微電腦除濕保管箱，以備每次實驗所需。

(三) 傳統中藥方劑抗肝癌之分子機轉研究

1. 細胞培養

人類肝癌細胞 Hep G2、PLC/PRF/5 和 Hep 3B 培養於 DMEM 培養液中。其含 10% 牛血清(Fetal calf serum)及含 100units/ml penicillin G、100μg/ml streptomycin 和 0.25μg/ml amphotericin B，培養在 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內。每三天更換一次培養基溶液，當長至培養瓶單層長滿 (confluent)，便做繼代培養(subculture)。實驗期視實驗目的，以血球計數器計算細胞數，再取細胞數目作分析。

2. 細胞增生抑制作用分析

XTT(sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)方法測定原理是利用細胞內粒線體上的脫氫酵素(dehydrogenase)，可將四錯鹽(tetrazolium salt)還原反應產生一水溶性、無毒性、橘紅色

螢光的 Formazan 之現象。先處理細胞將之種於 96Well 內使得每一 Well 最終為 10×10^3 個細胞，於培養箱培養 24 小時後重新注入新的培養液 90 μ l 並加入不同濃度的藥物 10 μ l。所使用之藥物濃度為 300, 150, 50 及 25 μ g/ml。所設定的時間經處理後，則加入 50 μ l 的 XTT labeling mixture 在每個 well 內。放置於 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內過 4 至 6 小時，以波長 492nm 及 690nm 測其光學活性(optical density, O.D.)而求得藥物所能抑制 50% (IC₅₀)癌細胞生長之濃度。

3. 細胞週期分析

將以藥物處理過的細胞取出，取 4×10^6 個細胞均勻打散，以 PBS 清洗一次，加入 300 μ l 的 PBS，再將細胞均勻打散，緩和加入 700 μ l 的絕對酒精來固定細胞，然後置於 4°C 下 30 分鐘。待細胞固定完成後，離心去除上清液，並加入含 0.5% Triton、0.05% RNase 之 PBS 於 37°C 下作用 1 小時，再加入含 50 μ g/ml PI(Propidium iodide)之 PBS 於 4°C 下放置 15 至 30 分鐘。離心去除上清液，加入 500 μ l PBS，使細胞懸浮於其中，以流式細胞儀(flow cytometry)分析。

4. 細胞凋亡(apoptosis)分析

細胞以藥物處理過後，以 trypsin 的方法取下細胞，並以 TUNEL kit 進行雙重染色，再以 flow cytometry 分析之。細胞以藥物處理過後，以細胞刮杓將細胞取下，再以 DNA lysis 及 chloroform/phenol 將 DNA 抽出，並以 2% agarose 分離後以 EB 染色即可得到結果。

5. 藥物對於粒線體膜電位的改變

細胞以藥物處理過後，以 PBS 清洗兩次，再加入 25 μ M JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)於暗室中培養一小時。以波長分別為 490 nm (excitation)/540 nm (emission) and 540 nm (excitation)/590 nm (emission)測量吸光值並與控制組做比較。

6. 核蛋白的抽取

經藥物處理過的細胞收集後以 Hypoionic buffer 溶解細胞膜後以 14000 rpm 離心 30 秒分離出細胞核。沉澱物加入 complete lysis buffer 培養 30 分鐘後離心，取的隻上輕液即為 nuclear extraction。以上述蛋白質定量方法訂出蛋白質濃度。

7. 藥物對於 Bcl-2 protein、NF- κ B、p27、cyclins、cdks 的影響

(1)細胞蛋白質含量測定

配置 0.1mg/ml 的 BSA (Bovine serum albumin), 在每個 Well 內分別加入 0、6、12、18、24、30、36、42 μ l 的 BSA 後, 再加入 240、234、228、222、216、210、204、198 μ l 的去離子水, 最後在各 Well 中加入 Dye reagent blue, 於室溫靜置 5 分鐘後以波長 595nm 由 ELISA reader 分析。即得 0、2、4、6、8、10、12、14 μ g/ml 的標準曲線。得到標準曲線後, 則加入 2 μ l 細胞萃取液, 再加入 238 μ l 去離子水及 60 μ l Dye reagent solution, 於室溫作用 5 分鐘, 以 ELISA reader(592nm)定量分析。

(2) SDS-PAGE 電泳之偵測

將細胞取下, 以冰 PBS 洗二次後, 立即加入 Lysis buffer(0.32M sucrose、20mM Tris-HCl、pH7.5、2mM EDTA、5mM EGTA、50 μ g/ml Leupeptin、0.2mM PMSF、0.1% α -Mercaptoethanol), 用超音波震碎機(sonicator)將細胞均質化, 再以 800g, 4 $^{\circ}$ C 離心 15 分鐘, 則得上清液為細胞質層, 沉澱物為細胞膜層。另將細胞膜層加入含 1%NP-40 之 Lysis buffer 後, 經超音波震碎機均質化, 使沉澱物溶解即可。得到的蛋白質取 50-100 μ g 加入定量 Sample buffer(0.5M Tris-HCl、pH6.8、Glycerol、10% SDS、2- α -Mercaptoethanol、0.05% Bromophenol blue)及 10% α -Mercaptoethanol 後加熱 100 $^{\circ}$ C, 5 分鐘, 再依序加到各 Well 中。將電壓設定在 66 伏特進行電泳, 待 SDS-PAGE 中的染劑跑出 SDS-PAGE 後則關掉電源。

(3)SDS-PAGE 上之蛋白質轉移到 PVDF membrane

PVDF membrane 需浸潤在 Transfer buffer(20mM Tris-base、Glycin、0.1% SDS、10% Methanol)內備用。將 SDS-PAGE 層覆蓋於 PVDF 上, 並在其上下各加二張 3 mm Filter paper, 使成似“三明治”(sandwich)夾層狀。將“三明治”(sandwich)夾層置於 Transfer buffer 中, 電流設定在 53 微安培 3 小時完成, 然後取出。

(4)西方點漬法(Western blotting)

PVDF membrane 加入適量 Blocking buffer (5%脫脂奶於 TBS-T (20mM Tris-base、137 mM Sodium chloride、Hydrochloric acid、0.1% Tween-20)內)於 4 $^{\circ}$ C 下進行 Blocking 一夜, 之後以 Washing buffer (TBS-T)連續洗 30 分鐘(5 分鐘 6 次), 然後加入稀釋好的 Primary antibody 均勻覆蓋在 PVDF membrane 上作用

2 小時，而後再以 Washing buffer 持續洗 30 分鐘。再將 Secondary antibody 稀釋到合適濃度，均勻倒在 PVDF membrane 上反應 1 小時。最後再以 Washing buffer 洗 30 分鐘，再加入 Detection buffer 1 分鐘，待略乾後壓片、洗片即可完成。Primary antibody 為抗 Bcl-2 protein 之抗體。

8. nude mice (in vivo) 抗癌活性評估

將 PLC/PRF/5 移入 nude mice 背部並使之長至一定大小，後以口服給藥 28 天。實驗組和控制組各 15 隻，實驗組給予 1000mg/kg 黃連解毒湯，控制組投與等量體積的生理食鹽水，每天測量腫瘤大小及老鼠體重。實驗終了取出老鼠內臟加以秤重。

參、結果

(1) 黃連解毒湯、散腫潰堅湯和柴胡清肝湯對於肝癌細胞株 Hep G2 和 PLC/PRF/5 之增生抑制效果

研究結果發現傳統方劑湯黃連解毒湯對人類肝癌細胞株 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞具有良好的細胞增生抑制效果。在濃度 300 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度可達最好的增生抑制效果：黃連解毒湯和散腫潰堅湯對抗 Hep G2 細胞增生的 IC_{50} 值分別為 192.3 和 303.4 $\mu\text{g/ml}$ ；對抗 PLC/PRF/5 細胞增生的 IC_{50} 值分別為 160.9 和 333.2 $\mu\text{g/ml}$ (圖 1A、B、C 和 D)。但是相對的，柴胡清肝湯對於兩株肝癌細胞則不具有意義性的增生抑制作用 (圖 1E 和 F)。其它方劑，包括小柴胡湯、四逆散、血府逐瘀湯和紫根牡蠣湯對兩株肝癌細胞之細胞增生皆無明顯之影響 (圖 1G)。在初步篩選時針對黃連解毒湯、散腫潰堅湯和柴胡清肝湯的細胞增生活性進行 72 小時的評估，結果發現 48 小時和 72 小時的培養並不會有極大的活性差異，因此本研究選用 48 小時作為實驗終點。

由於黃連解毒湯的效果最佳，因此研究亦進一步分析黃連解毒湯對於抑制細胞菌落生成的影響，以左為評估藥物對於腫瘤細胞生存的長期作用。結果發現，黃連解毒湯對於 Hep G2 和 PLC/PRF/5 的菌落生成具有明顯的抑制效果 (圖 1G)，顯示黃連解毒湯對於肝癌細胞的抑制作用具有長期的效果。

為了評估黃連解毒湯對於腫瘤細胞是否具有選擇性，特以老鼠肝臟細胞 BNL-CL.2 和人之纖維母細胞 IMR-90 做為正常細胞對照。結果顯示無論是黃連解毒湯在劑量高達 500 $\mu\text{g/ml}$ 無論是

對 BNL-CL.2 或是 IMR-90 仍不具有意義性的細胞增生抑制作用，因此推論黃連解毒湯對於腫瘤有高度的選擇性(圖 1H 和 I)。

(2)黃連解毒湯促使 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞週期停滯 S-G2/M

在黃連解毒湯的作用機轉方面，以 flow cytometry 分析發現細胞以黃連解毒湯處理 12 小時後可促使 Hep G2 和 PLC/PRF/5 的細胞週期停滯於 S-G2/M 期，此一效果隨著劑量增加而增加(圖 2A 和 B)。當劑量為 300 μ g/ml 時，黃連解毒使 Hep G2 細胞的 S 期的細胞比例由 12.5% 提高至 22.5%；G2/M 由 23.3 提高至 30.4%；PLC/PRF/5 細胞的 S 細胞比例則由 9.2% 提高至 19.5%；G2/M 由 19.6% 提高至 29.7%。

(3)黃連解毒湯促使 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞進行細胞凋亡

在細胞凋亡的誘導方面，Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞以 150、300、450 和 600 μ g/ml 黃連解毒培養 48 小時後，可偵測到典型的細胞凋亡特徵—DNA fragmentation 的情形 (圖三 A)。

另外以 TUNEL 方式分析細胞內 DNA 的斷裂量作為定量細胞凋亡分析的實驗方面發現 300 μ g/ml 黃連解毒湯可以有效的誘導 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞進行細胞凋亡，且隨著時間的增加，其效果漸增 (圖三 B)。300 μ g/ml 的黃連解毒湯在 24 小時就能有效的誘發 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞 DNA 的斷裂比為 7.3% 和 9.1%。在 48 小時則增加為 33.1% 和 36.8%。

(4)黃連解毒湯對細胞週期相關調控因子的影響

由於黃連解毒湯對於 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞的細胞週期演進具有抑制作用，因此進一步探討黃連解毒湯對於 S-G2/M 細胞週期相關的調控因數包括 p21/WAF1、cyclins (cyclin A、cyclin B) 和 cdc2 的影響。首先，在 p21 方面，無論是 150 或 300 μ g/ml 的黃連解毒湯在作用 3 至 12 小時後可增加 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞 p21 的表現。其中 300 μ g/ml 的效果優於 150 μ g/ml，且在培養 3 小時後就有效的增加 p21/WAF1 的表現，在 12 小時到達最高峰(圖四 A 和 B)。由於黃連解毒湯在 12 時有效的使肝癌細胞的細胞週期停滯於 S-G2/M 期，因此推論 p21/WAF1 參與黃連解毒湯所造成的細胞週期停滯。

在 cyclins 的表現方面，由圖四 C 的結果顯示，無論是對 HepG2 或是 PLC/PRF/5 細胞，200 μ g/ml 的黃連解毒湯會降低 cyclin A、cyclin B1、cdc2 和 cdc25C 的表現，此一抑制作用由 1-3

小時開始一直持續到 12 小時。再者，由於黃連解毒湯在 1 小時就會增加 cdc25C 的磷酸化，而在 3 小時增加 cdc2 的磷酸化，因此，推亂黃連解毒湯乃透過抑制 cdc25C 的磷酸化而促使 cdc2 累積於無活性的磷酸化狀態。因此透過這些機制，散腫潰堅湯促使細胞週期停滯於 G0/G1 期。

(5)黃連解毒湯啟動 mitochondria pathway 的影響

接下來分析細胞凋亡相關機制-粒線體細胞凋亡路徑 (mitochondrial apoptotic pathway)。首先分析黃連解毒湯對 Bcl-2 family proteins 包括 proapoptotic factors Bax、Bak 和 antiapoptotic factors Bcl-2、Bcl-XL 表現的影響。結果發現無論是在 HepG2 或是 PLC/PRF/5 細胞，300 μ g/ml 的黃連解毒湯會增加 Bax 和 Bak 的表現，此一效果起始於 6 小時並延續至 36 小時 (圖五 A)。而在 antiapoptotic factor 方面，黃連解毒湯會將低 Bcl-2 和 Bcl-XL 的表現，此一作用在兩個細胞株都可以被明顯的觀察到，其發生始於 12 小時並延續至 36 小時。因此，黃連解毒湯對於 Bcl-2 family protein 而言，其不只會抑制它的表現，更可以藉由增加 proapoptotic Bcl-2-Bax 和 Bak 的表現而使細胞朝向 proapoptosis 的方向進行。

啟動粒線體細胞凋亡途徑最大的特色是使粒線體中的膜電位下降。因此，藉由專一性的粒腺體染料 JC-1，可以藉此觀察粒腺體膜電位改變的情形。結果發現，無論是在 Hep G2 或是 PLC/PRF/5 細胞，經 150 或 300 μ g/ml 黃連解毒湯經 12 小時的作用後，可以發現粒線體膜電位顯著下降的含量降低(圖五 B 和 C)。由於黃連解毒湯在 12 小時開始就會改變 Bax/Bcl-2 的比例，而 proapoptotic Bcl-2 family 在粒線體的作用會促使粒腺體膜電位下降，因此推論黃連解毒湯乃透過調控 Bcl-2 family protein 的表現啟動粒線體細胞凋亡路徑。

當粒線體路徑啟動後會促使一些 proapoptotic factor 釋放至細胞質後使 Apaf-1 和 procaspase-9 在 dATP 的存在下形成複合物 (complex)稱為 apoptosome。此時，procaspase-9 藉由自我分解作用形成活化型的 caspase-9。由圖五 D 和 E 的結果顯示，無論是在 Hep G2 或是 PLC/PRF/5 的細胞，150 和 300 μ g/ml 黃連解毒湯皆可以有效的促使 caspase-9 的活化。活化作用由 12 小時開始，於 36 小時達到最高峰。

接下來更進一步以 caspase-9 抑制劑評估粒腺體路徑對於黃

連解毒湯所誘導細胞凋亡的重要性。細胞先以 20 μM 的 LEHD-CHO 培養 1 小時後再加入 300 $\mu\text{g/ml}$ 黃連解毒湯並連續培養 48 小時後測定細胞凋亡的比例。結果顯示，caspase-9 inhibitor 並不會造成細胞死亡，而 300 $\mu\text{g/ml}$ 黃連解毒湯分別會造成 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞 31.4% 和 37.1% 的 apoptosis。當合併使用 300 $\mu\text{g/ml}$ 黃連解毒湯和 caspase-9 inhibitor 後，黃連解毒湯的細胞凋亡效果明顯受到抑制：在 Hep G2 只剩 15.2%；PLC/PRF/5 則剩 18.2% (圖五 F)。因此，推論粒腺體路徑對於黃連解毒湯所造成的細胞凋亡扮演重要的角色。

(6) 黃連解毒湯抑制 NF- κ B 的轉位

接下來研究分析黃連解毒湯對於細胞存活路徑 NF- κ B 的影響。結果顯示，無論是在 Hep G2 和 PLC/PRF/5，300 $\mu\text{g/ml}$ 黃連解毒湯皆會增加 I- κ B α 的表現，此一作用於 3 小時開始，並持續至 24 小時。相對的，300 $\mu\text{g/ml}$ 黃連解毒湯則使細胞質中 NF- κ B 的量提升，而細胞核中 NF- κ B 的量減少，此一作用於 3 小時開始，並持續至 24 小時(圖六)。因此，推論黃連解毒湯可以藉由增加 I- κ B α 的表現，而使 NF- κ B 滯留於細胞質中而無法轉位至細胞核中發揮轉錄因子的活性。

(7) 黃連解毒湯抑制 NF- κ B 的 DNA binding activity

由於黃連解毒湯會抑制 NF- κ B 的轉位，因此研究進一步的分析黃連解毒湯對於 NF- κ B 的活性是否有所影響。結果顯示，無論是在 Hep G2 和 PLC/PRF/5，150 和 300 $\mu\text{g/ml}$ 黃連解毒湯皆會降低 NF- κ B 的 DNA 結合活性，此一作用於 3 小時開始，並持續至 24 小時 (圖七 A 和 B)。

(8) 黃連解毒湯之 in vivo 抗癌活性

最後進行 in vivo 活性評估。結果發現，每日投與 1000 mg/kg 的黃連解毒湯，連續投與 28 天，可以有效的抑制肝癌細胞 PLC/PRF/5 在 nude mice 的生長高達 50% (圖八 A 和 B)。

再者，在連續投藥的過程中，相較於控制組，黃連解毒湯對於老鼠的體重並無明顯的影響(圖八 C)。實驗終點時，比較控制組和實驗組的各個臟器重量(心、肝、肺、腎、脾)也發現黃連解毒湯對於這些臟器的重量並無明顯的改變。因此確認散黃連解毒湯對於實驗老鼠並無明顯之毒性。

再者，研究亦將腫瘤進行切片並以 TUNEL 染色以確定黃連解毒湯在 in vivo 的條件下亦是藉由誘導 apoptosis 來降低腫瘤細

胞的生長。由圖八 D 圖顯示，相較於餵食生理食鹽水的老鼠腫瘤，餵食黃連解毒湯的老鼠腫瘤明顯出現 DNA 斷裂的情形。因此確認在 *in vivo* 的條件下，黃連解毒湯乃藉由誘導 apoptosis 來降低腫瘤細胞的生長。

(9) 黃連解毒湯之抗乳癌活性

由於前面的結果確立黃連解毒湯對於肝癌細胞具有良好抗癌活性，因此研究進一步分析黃連解毒湯對於乳癌細胞是否同樣具有效果。由圖九結果顯示，黃連解毒湯對於乳癌細胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 醫樣具有良好之抗增生效果。黃連解毒湯對 MCF-7 的 IC₅₀ 為 370.9 μ g/ml，對 MDA-MB-231 則為 304.5 μ g/ml。

肆、討論

肝癌是台灣最常見的惡性腫瘤之一²⁻⁴。本研究中首度發現黃連解毒湯和散腫潰堅湯可以有效的抑制肝癌細胞株 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞的生長。黃連解毒湯抑制癌細胞生長的作用主要是透過抑制細胞週期的演進和誘發細胞進行程式性死亡。除此，黃連解毒湯對於正常老鼠肝臟細胞細胞的存活不具有意義性的抑制作用，因此推測該方劑對腫瘤細胞具有高度選擇性。

由於腫瘤細胞的細胞週期檢查站 (cell cycle checkpoint) 功能上的不完整使其相較於細胞週期檢查站功能完整的正常細胞對化療藥物會有較高的敏感性⁵⁸⁻⁵⁹。因此，調控細胞週期相關分子的活性及表現可以成為抗癌的策略之一。在經黃連解毒湯培養過的 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞中發現，黃連解毒湯可以藉由調整幾個細胞週期相關調控因子促使 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞的細胞週期停滯於 S-G2/M phase。黃連解毒湯 無論是對 p53-wt Hep G2 或是 p53-mt PLC/PRF/5 皆會增加 p21/WAF1 的表現，因此推斷黃連解毒湯對於 p21/WAF1 的表現乃是透過 p53-independent 的機制。除此之外，黃連解毒湯亦可透過幾個機制抑制 Cdc2 的活性：首先，黃連解毒湯所增加的 p21/WAF1 會與 Cdc2 形成不活性型的結合物。再者，黃連解毒湯亦會降低 cyclinB1 和 cyclinA 的表現，因此藉由增加 WAF 的抑制功能及降低 cyclins 的表現可以有效的降低 Cdc2 與 cyclinB1 或 cyclinA 形成活性型的 CDK/cyclin complex。最後，黃連解毒湯不但會降低 Cdc25C 和 Cdc2 的表現量，也會藉由增加 Cdc25C 的磷酸化而使 Cdc25C 的

phosphatase 活性下降，無法將 Cdc2 的 Tyr15 位磷酸基移除，進而使 Cdc2 維持在過度磷酸化的不活化狀態。因此，綜合對 CDK inhibitor 的向上調控、cyclins 的表現的抑制以及 Cdc25C 及 Cdc2 的活性調節作用，a 黃連解毒湯有效的抑制肝癌細胞 Hep G2 和 PLC/PRF/5 細胞週期的演進。

粒腺體的路徑已經被證實在細胞死亡的過程中扮演相當重要的角色。研究結果顯示黃連解毒湯改變 Bax、Bak 和 Bcl-2、Bcl-XL 的平衡使之偏向 proapoptotic Bcl-2 family protein。因此綜合上述對 Bcl-2 family protein 的調節作用，黃連解毒湯得以啟動粒線體的細胞凋亡機制—促使粒腺體膜電位下降，並進一步的活化 caspase-9。再者由於 caspase-9 inhibitor 可以降低黃連解毒湯所誘導的細胞凋亡，因此確認粒腺體相關的細胞凋亡路徑在黃連解毒湯所造成細胞死亡扮演重要的角色。因此，綜合對 Bcl-2 family proteins 的調整作用和 caspase-9 的活化作用，黃連解毒湯有效的啟動肝癌細胞 Hep G2 和 PLC/PRF/5 進行細胞凋亡。

NF- κ B 路徑已經被證實和細胞的存活有極大的關連性。另外，亦有許多研究證實多種癌細胞可透過促使 NF- κ B 的過度活化或過度表現而產對化學治療劑產生抗藥性。因此，抑制 NF- κ B 路徑不但可能促進細胞的死亡，更有可能降低腫瘤抗藥性的發展。研究結果發現，黃連解毒湯可藉由增加 I- κ B 的表現而促使 NF- κ B 滯留於細胞細胞質中進而抑制 NF- κ B 的轉位作用而使其喪失轉錄因的活性。再者，黃連解毒湯也會降低 NF- κ B 的 DNA binding activity，因此使 NF- κ B 無法驅動基因的表現而降低細胞生存訊息的傳遞。除此，研究結果也顯示 NF- κ B 下游因子 Bcl-XL 的表現也受到黃連解湯的抑制。因此綜合以上結果，無論是在 Hep G2 和 PLC/PRF.5 細胞，黃連解毒湯皆可藉由將低 NF- κ B 細胞生存路徑而造成細胞的死亡。

在 in vivo 的試驗模式中亦顯示每日投與 1000 mg/kg 的黃連解毒湯，連續投與 28 天，可以有效的抑制肝癌細胞 PLC/PRF/5 在 nude mice 的生長高達 50%，因此確認黃連解毒湯在動物體亦具有對抗腫瘤生長的活性。除此，相較於餵食生理食鹽水的老鼠腫瘤，餵食黃連解毒湯的老鼠腫瘤明顯出現 DNA 斷裂的情形。因此確認在 in vivo 的條件下，黃連解毒湯乃藉由誘導 apoptosis 來降低腫瘤細胞的生長。

伍、結論與建議

本研究結果切確證明傳統方劑黃連解毒湯湯可有效的抑制肝癌細胞之細胞增生。其中黃連解毒湯主要是透過幾種機制：(a)藉由增加 p21 和降低 cyclinA、cyclin B、cdc2、cdc25 的表現以及增加磷酸化的 cdc2 和 cdc25C 進而抑制細胞週期的演進；(b)藉由調控 Bcl-2 family 的表現及啟動粒線體相關的細胞凋亡途徑而造成乳癌細胞的死亡；(c)抑制 NF- κ B 的轉位及降低 NF- κ B 的 DNA 結合活性而降低細胞存活訊息的傳遞。除此，由於 nude mice 的結果也證明黃連解毒湯可以有效的抑制腫瘤在裸鼠身上的生長，因此證明黃連解毒在 in vivo 的條件下亦具有抑制腫瘤生長的活性。因此，更進一步的人體實驗以及相關的實驗可更深入評估黃連解毒湯在臨床的使用價值和安全性。

致謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(計畫編號 CCMP 95-RD-212)提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此致謝。

陸、參考文獻

1. Beaugrand M. Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1994;20(1):65-71
2. 中華民國行政院衛生署網站: <http://www.doh.gov.tw/>
3. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2(8256):1129-33
4. Okuda K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 1992;15(5):948-63
5. Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, 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* 1994;54(2):448-54
6. Gan KH, Fann YF, Hsu SH, Kuo KW, Lin CN. Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae*

- through apoptosis and cell cycle. *J Nat Prod* 1998;61(4):485-7
7. Chen CH, Huang LL, Huang CC, Lin CC, Lee Y, Lu FJ. Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines: a potential medicine for hepatoma. *Nutr Cancer* 2000;38(2):287-95
 8. Kuo KW, Hsu SH, Li YP, Lin WL, Liu LF, Chang LC, Lin CC, Lin CN, Sheu HM. Anticancer activity evaluation of the solanum glycoalkaloid solamargine. Triggering apoptosis in human hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60(12):1865-73
 9. Zhang XW, Qing C, Xu B. Apoptosis induction and cell cycle perturbation in human hepatoma hep G2 cells by 10-hydroxycamptothecin. *Anticancer Drugs* 1999;10(6):569-76
 10. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6
 11. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256(1):42-9
 12. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407(6805):810-6
 13. Mukhtar H, Ahmad N. Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;158(3):207-10
 14. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424
 15. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000 Apr 10;256(1):12-8
 16. Zamzami N, Kroemer G. Condensed matter in cell death. *Nature* 1999;401(6749):127-8
 17. Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996;135(6 Pt 1):1441-55
 18. Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 1997;90(2):315-23
 19. Talanian RV, Brady KD, Cryns VL. Caspases as targets for anti-inflammatory and anti-apoptotic drug discovery. *J Med Chem* 2000;43(18):3351-71
 20. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*

- 1995;267(5203):1449-56
21. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407(6805):789-95
 22. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;256(1):27-33
 23. Tanaka M, Suda T, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S. Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* 1997;158(5):2303-9
 24. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995;182(5):1223-30
 25. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75(6):1169-78
 26. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995;182(6):1777-83
 27. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998;187(8):1205-13.
 28. Castaneda F, Kinne RK. Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas-receptor pathway. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127(7):418-24
 29. Lee SH, Shin MS, Lee HS, Bae JH, Lee HK, Kim HS, Kim SY, Jang JJ, Joo M, Kang YK, Park WS, Park JY, Oh RR, Han SY, Lee JH, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32(3):250-6.
 30. Kushlinskii NE, Britvin TA, Abbasova SG, Perevoshchikov AG, Prorokov VV, Kostanyan IA, Knysh VI, Lipkin VM. Soluble Fas

- antigen in the serum of patients with colon cancer. *Bull Exp Biol Med* 2001;131(4):361-3.
31. Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997;99(3):403-13.
 32. Jiang S, Song MJ, Shin EC, Lee MO, Kim SJ, Park JH. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Hepatology* 1999;29(1):101-10.
 33. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91(4):479-89.
 34. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000;256(1):50-7
 35. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139(5):1281-92
 36. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381):1322-6
 37. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228(4706):1440-3
 38. Hockenbery DM. bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci Suppl* 1994;18:51-5
 39. Gao G, Dou QP. G(1) phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2000;58(5):1001-10
 40. Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001;34(1):55-61

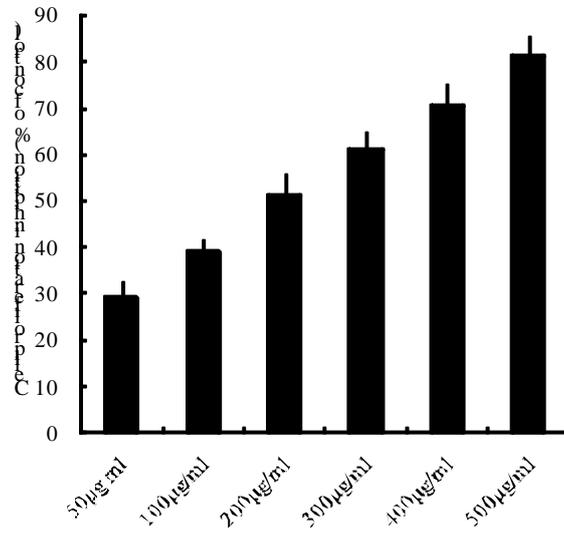
41. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411(6835):342-8
42. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18(53):7621-36
43. Wynford-Thomas D. Cellular senescence and cancer. *J Pathol* 1999;187(1):100-11
44. Bouck N. P53 and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287(1):63-6
45. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000;407(6805):777-83
46. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001;20(15):1803-15
47. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997;1(1):3-11
48. Zhan Q, Bae I, Kastan MB, Fornace AJ Jr. The p53-dependent gamma-ray response of GADD45. *Cancer Res* 1994;54(10):2755-60
49. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995;377(6550):646-9
50. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389(6648):300-5
51. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996;10(1):1-15
52. Falette N, Paperin MP, Treilleux I, Gratadour AC, Peloux N, Mignotte H, Tooke N, Lofman E, Inganas M, Bremond A, Ozturk M, Puisieux A. Prognostic value of P53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 1998;58(7):1451-5
53. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999;59(7):1391-9
54. Wu JT, Kral JG. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a

- molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res.* 2005 Jan;123(1):158-69.
55. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005 Jan;30(1):43-52.
56. Aggarwal BB, Takada Y. Pro-apoptotic and anti-apoptotic effects of tumor necrosis factor in tumor cells. Role of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Cancer Treat Res.* 2005;126:103-27.
57. Legembre P, Barnhart BC, Zheng L, Vijayan S, Straus SE, Puck J, Dale JK, Lenardo M, Peter ME. Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep.* 2004 Nov;5(11):1084-9.
58. Kim HS, Chang I, Kim JY, Choi KH, Lee MS. Caspase-mediated p65 cleavage promotes TRAIL-induced apoptosis. : *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6111-9.
59. Takada Y, Kobayashi Y, Aggarwal BB. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappaB activation by inhibiting IkappaBalpha kinase activation, thereby suppressing NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17203-12.
60. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004 Sep;6(3):203-8. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. : *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1911-2.

柒、圖、表

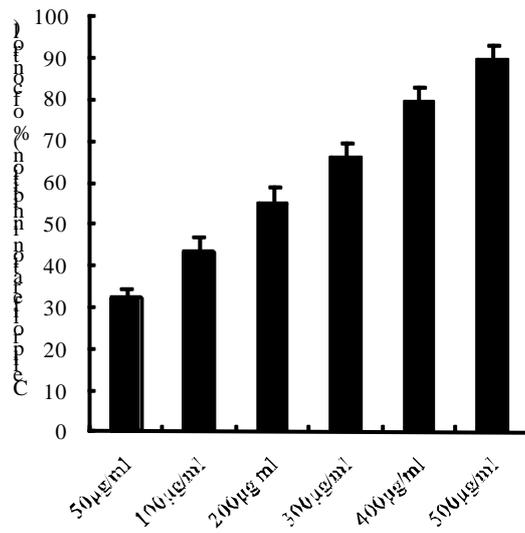
A.

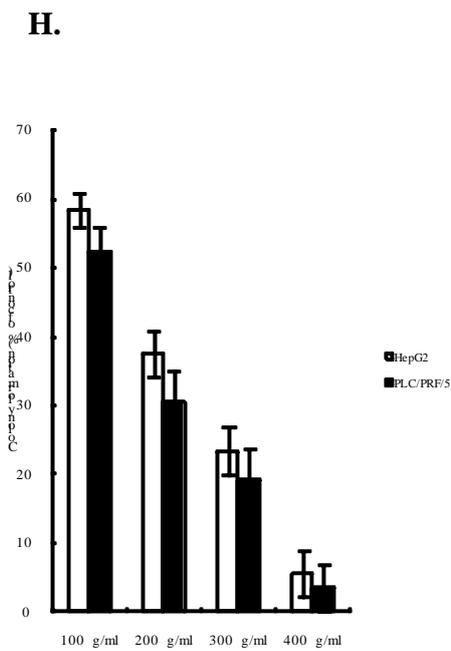
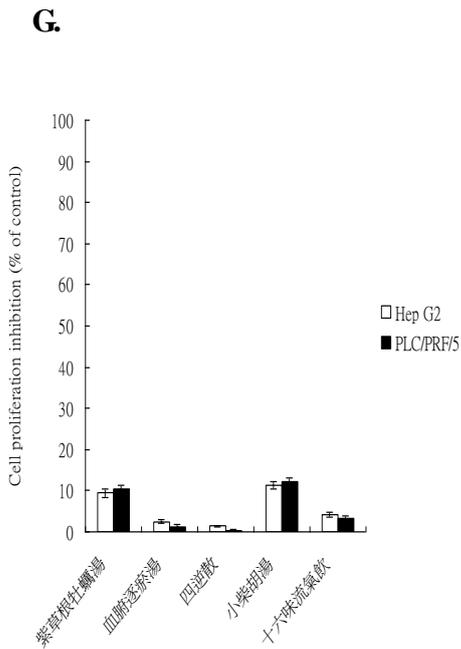
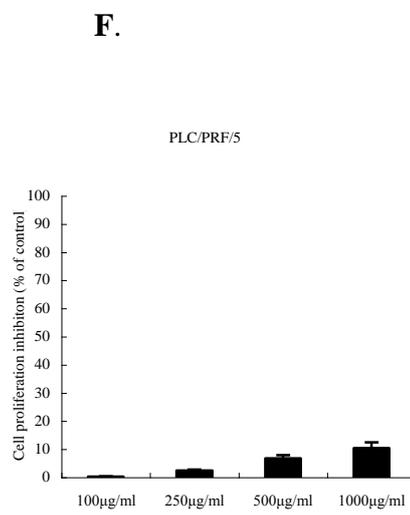
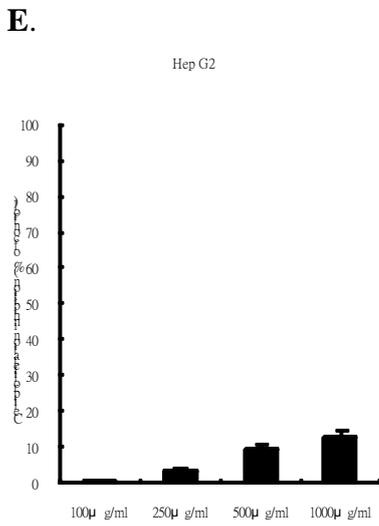
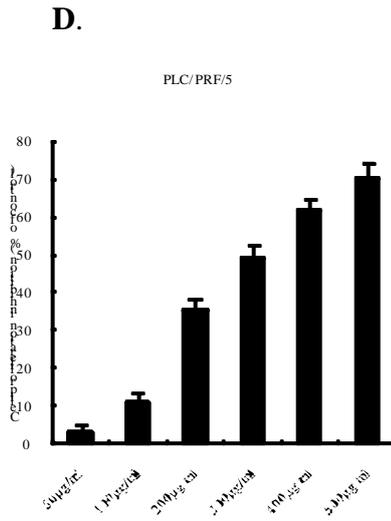
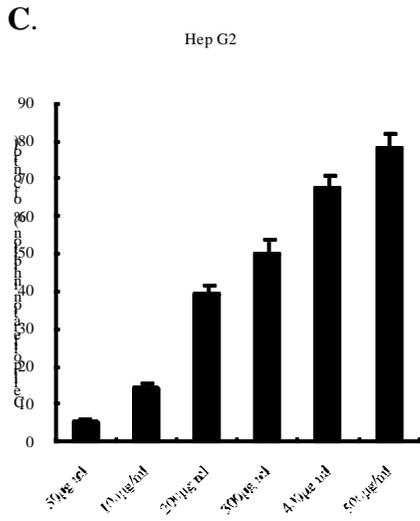
Hep G2



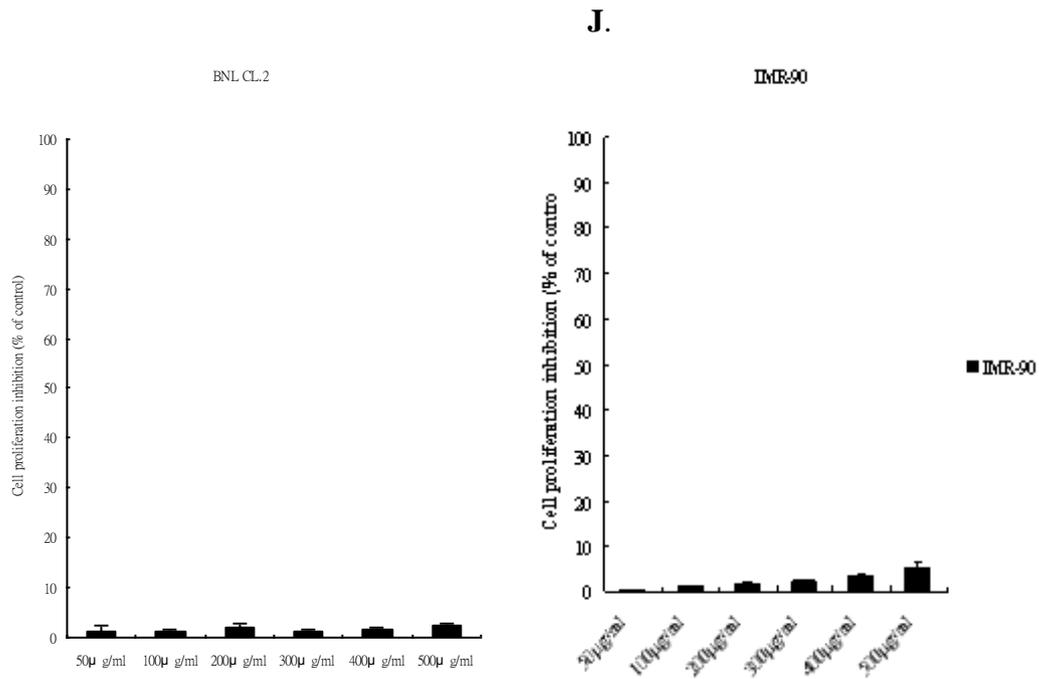
B.

PLC/PRF/5

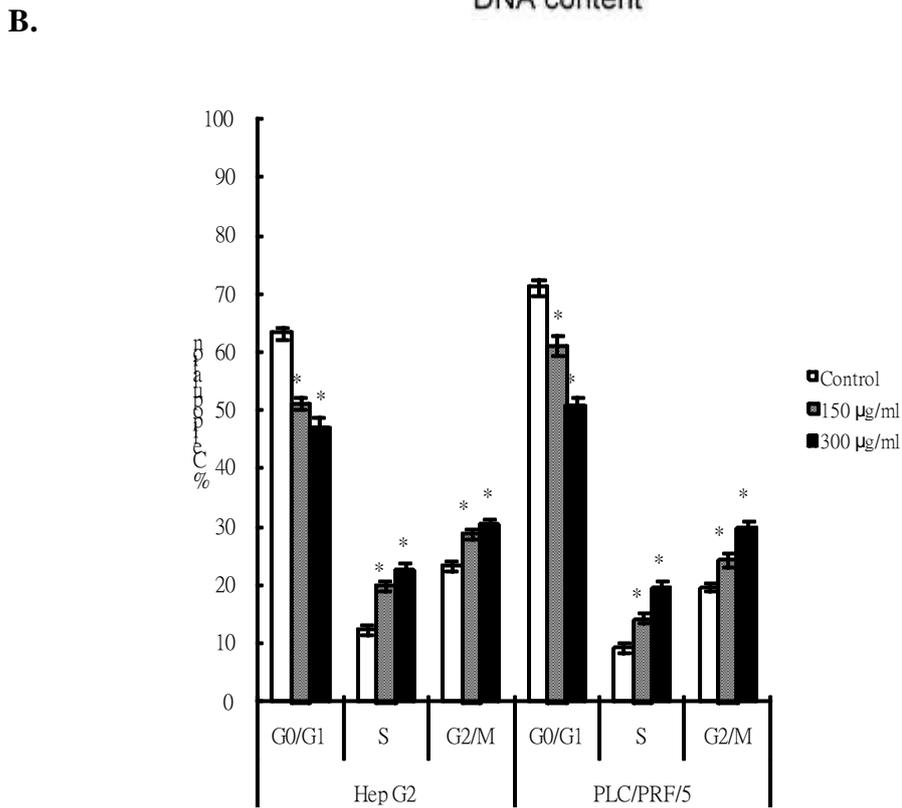
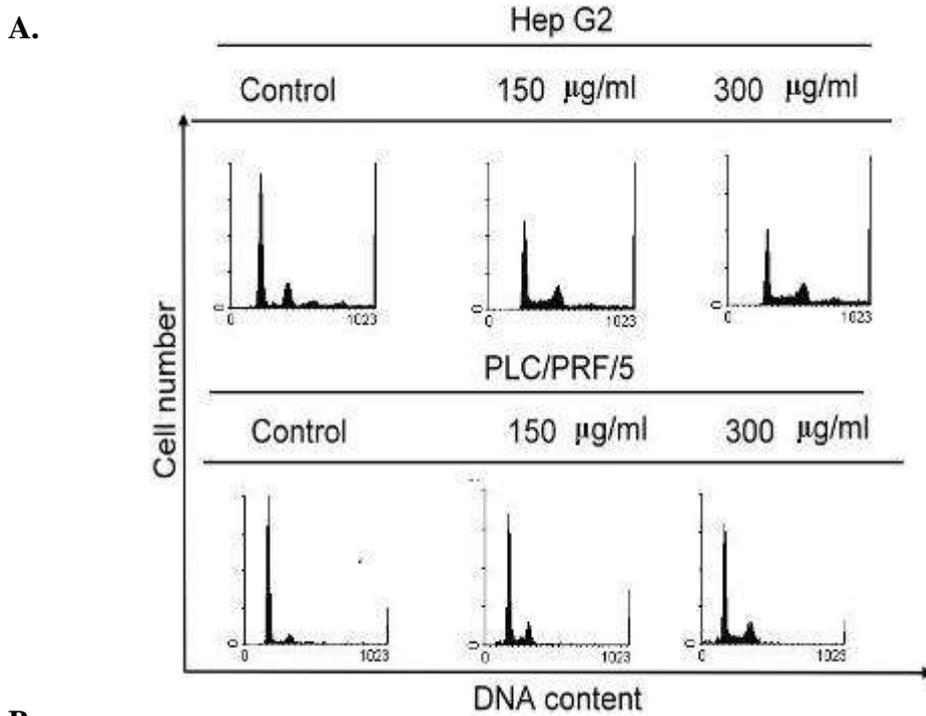




I.

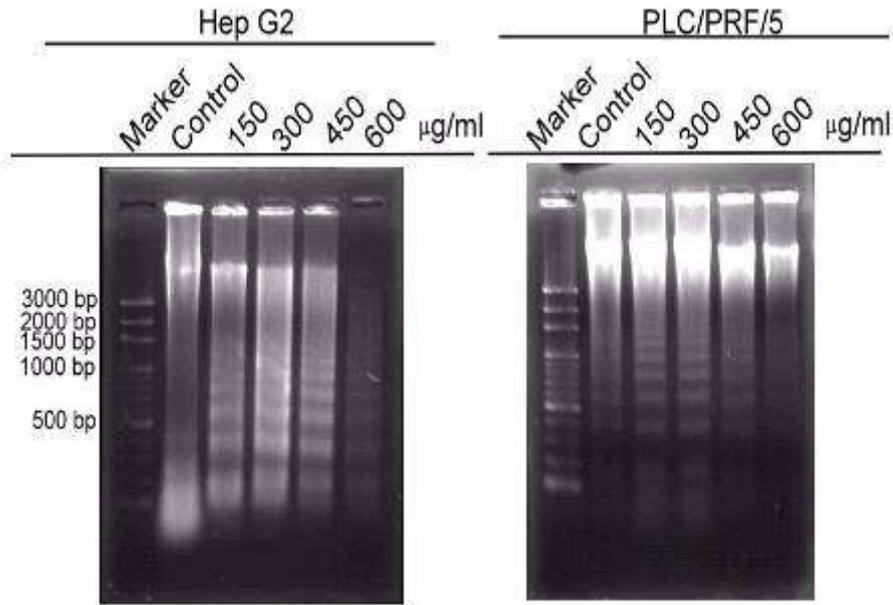


圖一、傳統方劑之抗肝癌細胞增生抑制作用。黃連解毒湯抑制 Hep G2(A)PLC/PRF/5(B)細胞增生；散腫潰堅湯抑制 HepG2(C)和 PLC/PRF/5(D)細胞增生；柴胡清肝湯抑制 Hep G2(E)和 PLC/PRF/5(F)細胞增生；其他方劑對 HepG2 和 PLC/PRF/5 之細胞增生影響 (G)。黃連解毒湯抑制肝癌細胞菌落形成 (H)。黃連解毒湯湯不影響正常老鼠肝臟細胞 BNL-CL. 2(I) 和人類纖維母細胞 IMR-90 (I)的細胞存活。結果表現為之平均 (mean) ±標準偏差 (S.D.)。每次實驗皆為三重複 (n=3)。

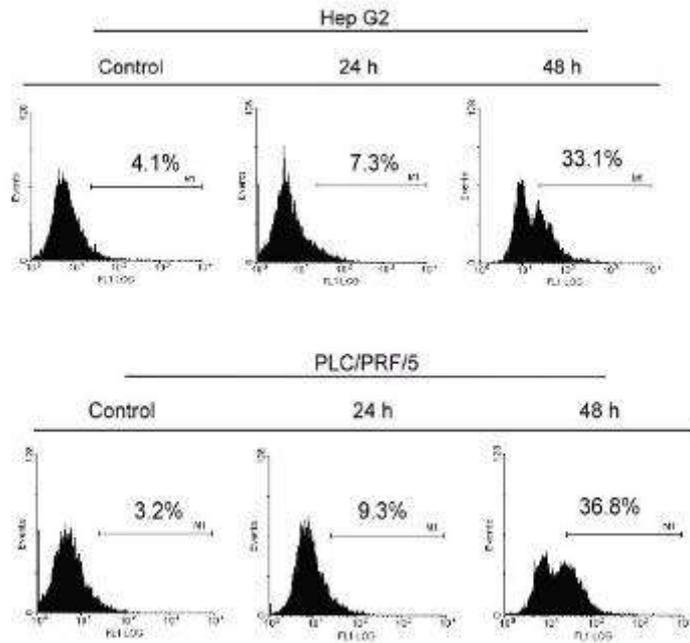


圖二、黃連解毒湯對肝癌細胞株細胞週期分佈之影響。(A) Flowcytometry 分析圖 (B)數據統圖。結果表現為之平均 (mean) ±標準偏差 (S.D.)；* 代表實驗組和控制組具有統計學上之差異(p<0.05)。每次實驗皆為三重複 (n=3)。

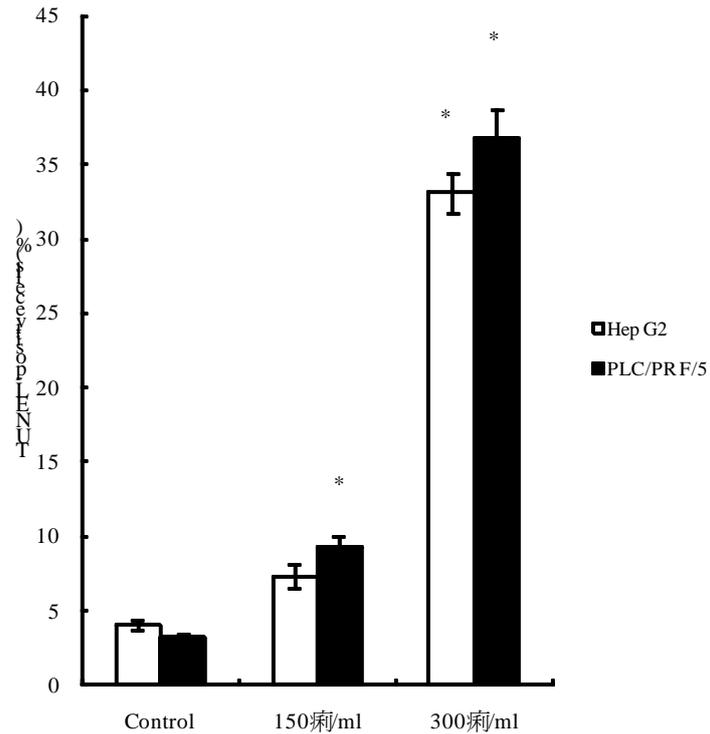
A.



B.

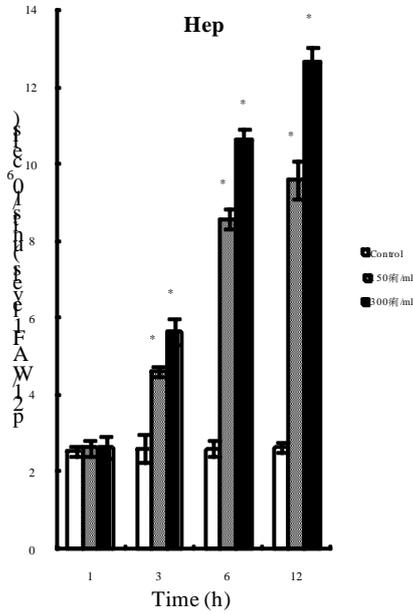


C.

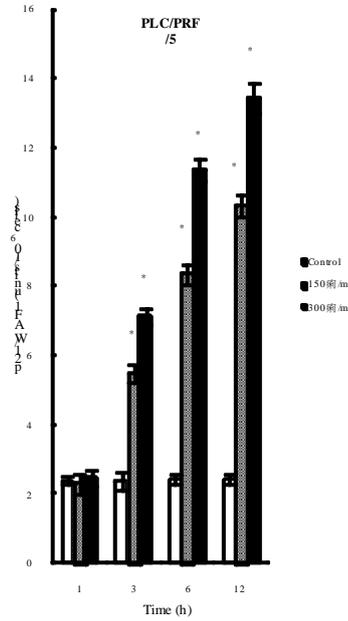


圖三、黃連解毒湯誘發肝癌細胞進行細胞凋亡。(A)以 DNA 瓊膠電泳偵測 DNA fragmentation；(B)以 TUNEL 染色分析黃連解毒湯對 Hep G2 和 PLC/PRF/5 的細胞凋亡誘導作用。結果表現為之平均 (mean) ±標準偏差 (S. D.)；* 代表實驗組和控制組具有統計學上之差異(p<0.05)。每次實驗皆為三重複 (n=3)。

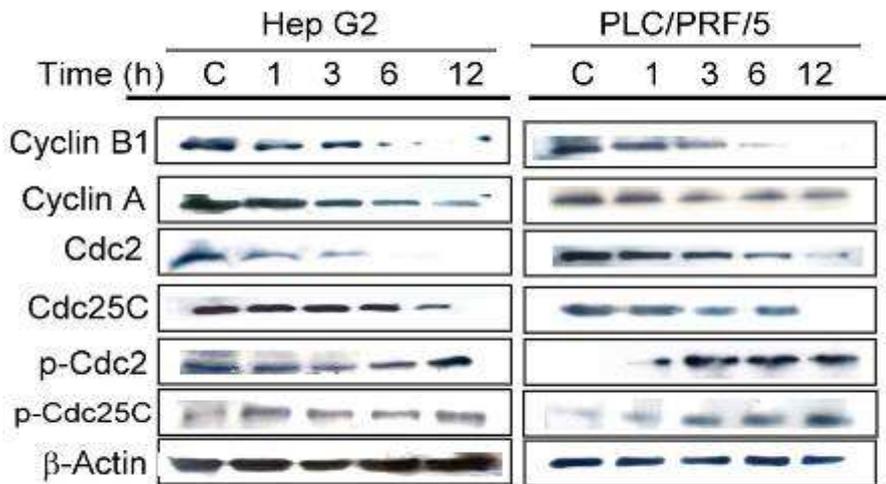
A.



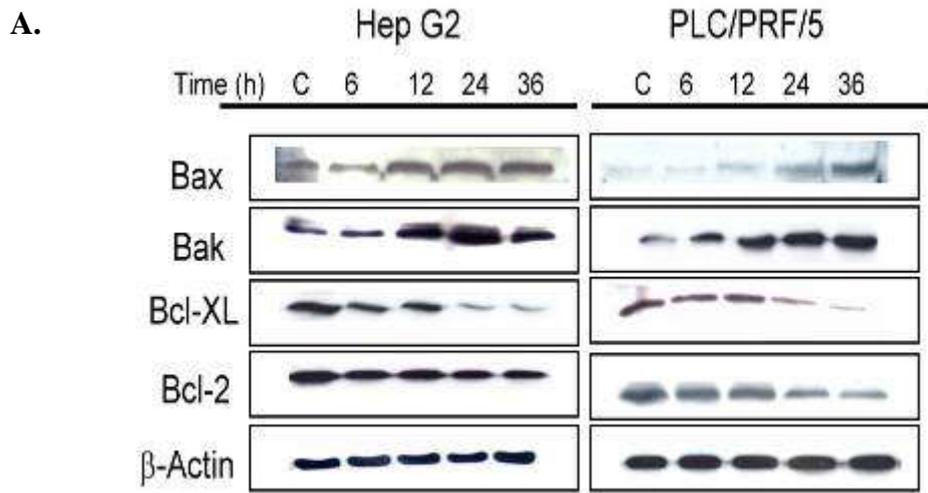
B.



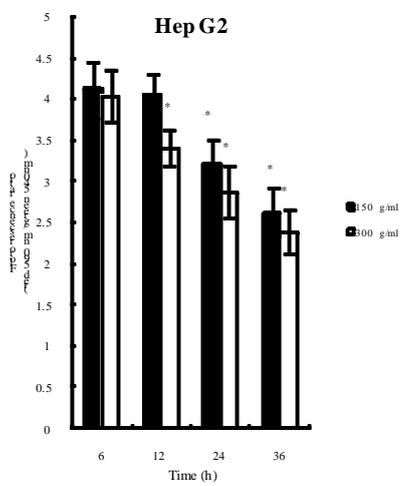
C.



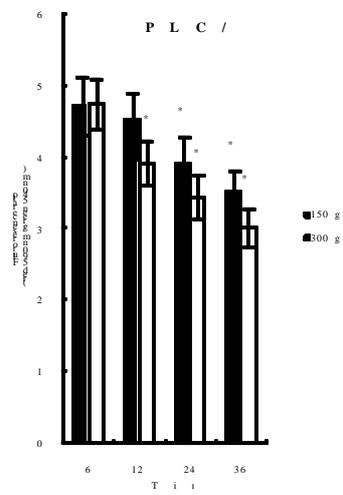
圖四、黃連解毒湯對肝癌細胞之細胞週期調控因子的影響。(A) 黃連解毒湯對 Hep G2 的 p21 蛋白表現影響；(B) 黃連解毒湯對 PLC/PRF/5 的 p21 蛋白表現影響；(C) 黃連解毒湯對肝癌細胞的 cyclins 蛋白表現影響。結果表現為之平均 (mean) ± 標準偏差 (S.D.)；* 代表實驗組和控制組具有統計學上之差異 (p<0.05)。每次實驗皆為三重複 (n=3)。

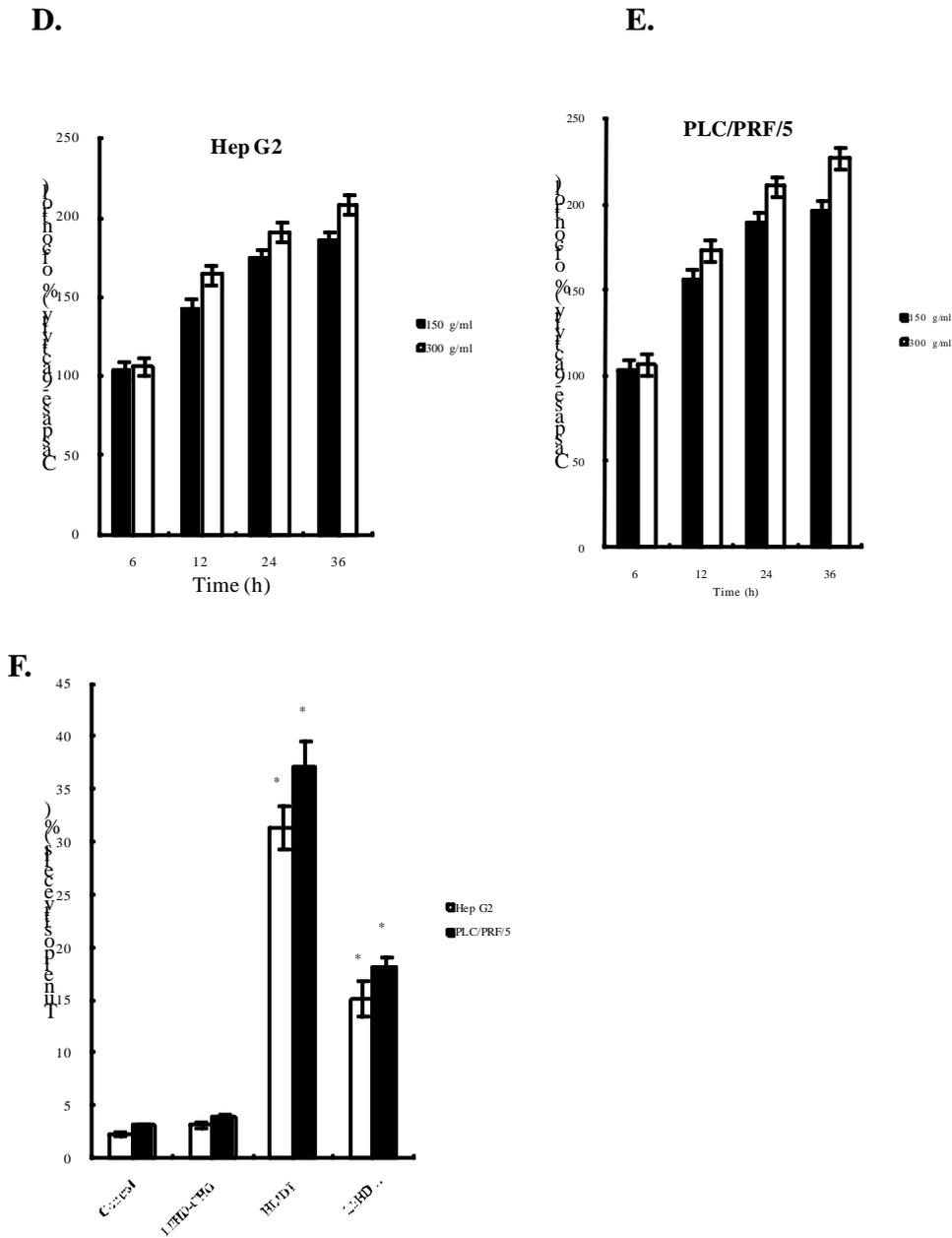


B.



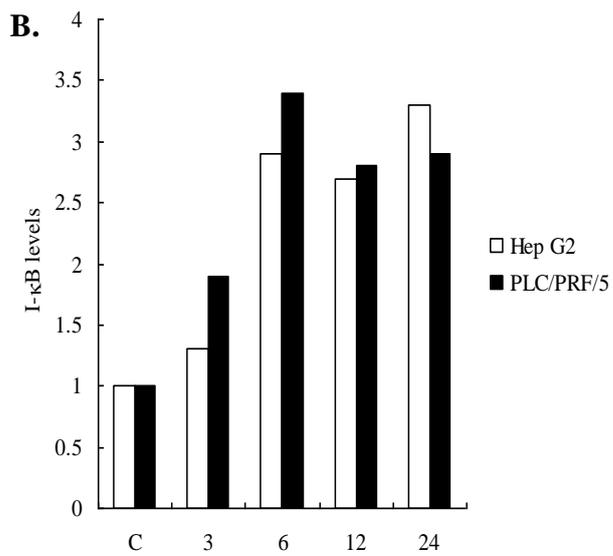
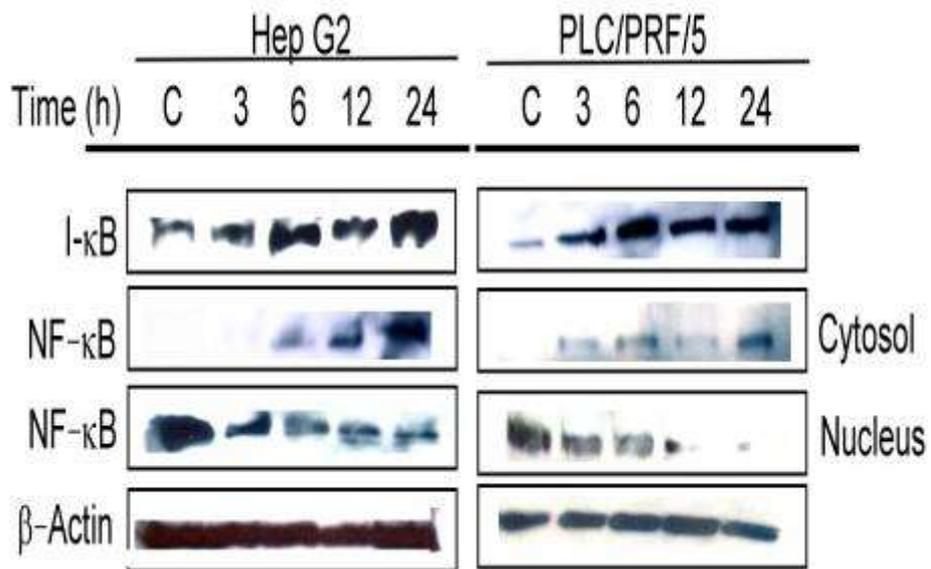
C.

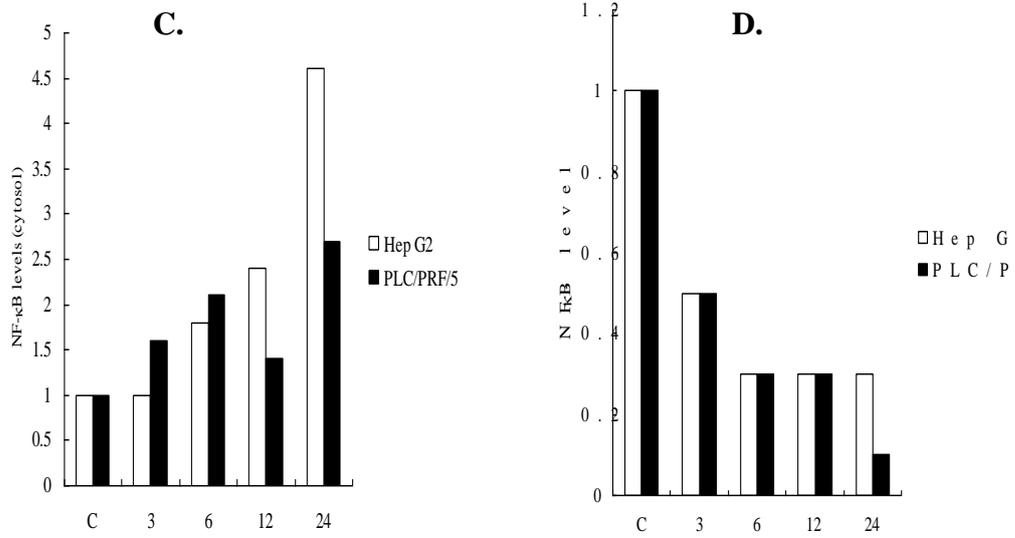




圖五、黃連解毒湯對粒線體路徑的影響。(A) 黃連解毒湯對 Bcl-2 family proteins 表現的影響；(B) 黃連解毒湯造成 Hep G2(B) 和 PLC/PRF/5 (C) 粒線體膜電位的改變；黃連解毒湯活化 HepG2(D) 和 PLC/PRF/5 細胞 caspase-9 (E) 活化；(F) caspase-9 inhibitor 抑制黃連解毒湯所誘發的細胞凋亡。結果表現為之平均 (mean) ±標準偏差 (S.D.)；* 代表實驗組和控制組具有統計學上之差異(p<0.05)。每次實驗皆為三重複 (n=3)。

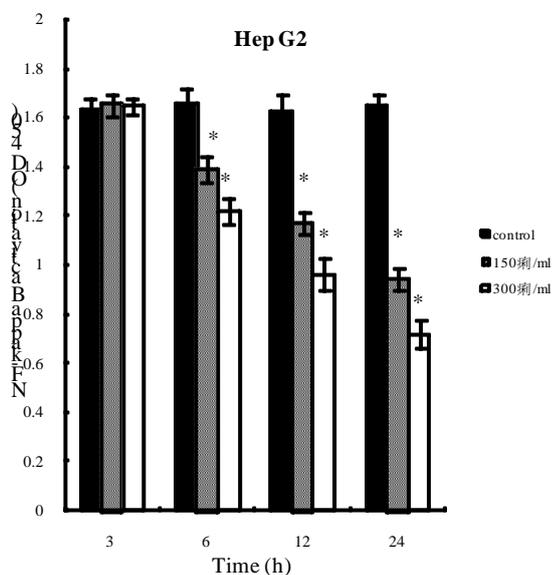
A.



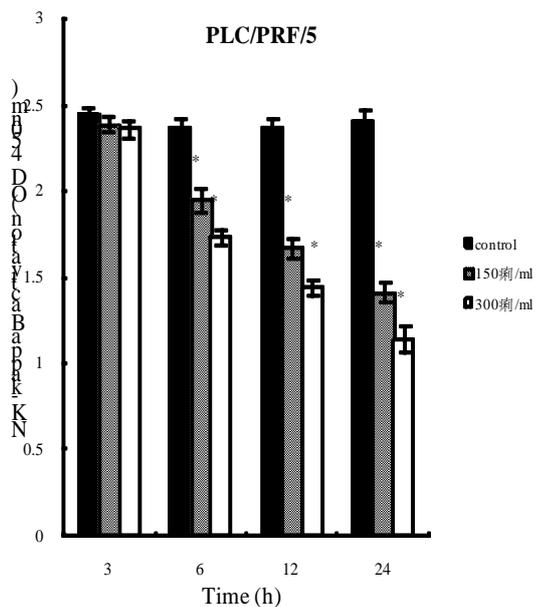


圖六、黃連解毒湯抑制 NF- κ B 的轉位。柱狀圖為 Western blot 之量化結果。

A.



B.



圖七、黃連解毒湯抑制 NF- κ B DNA activity。(A)黃連解毒湯抑制 Hep G2 細胞存活訊息 NF- κ B 的 DNA 結合活性。(B) 黃連解毒湯抑制 PLC/PRF/5 細胞存活訊息 NF- κ B 的 DNA 結合活性。結果表現為之平均 (mean) \pm 標準偏差 (S.D.); * 代表實驗組和控制組具有統計學上之差異($p < 0.05$)。每次實驗皆為三重複 ($n=3$)。

A.



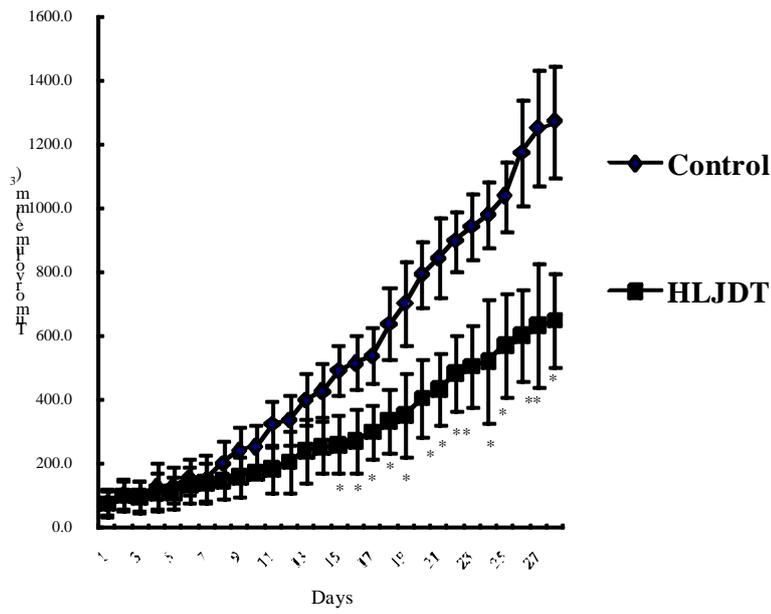
Control



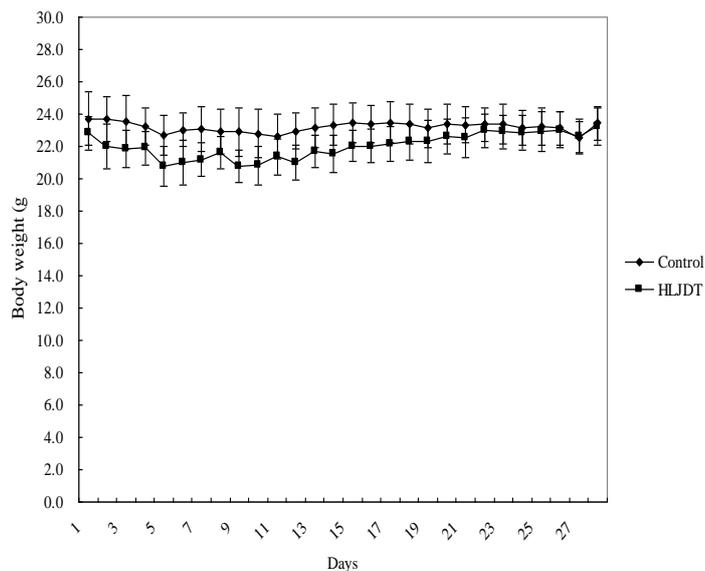
HLJDT

1000 mg/kg,po

B.

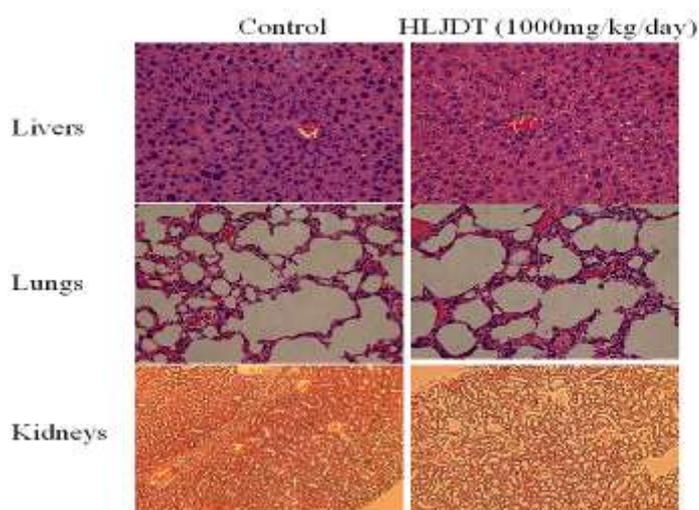


C.

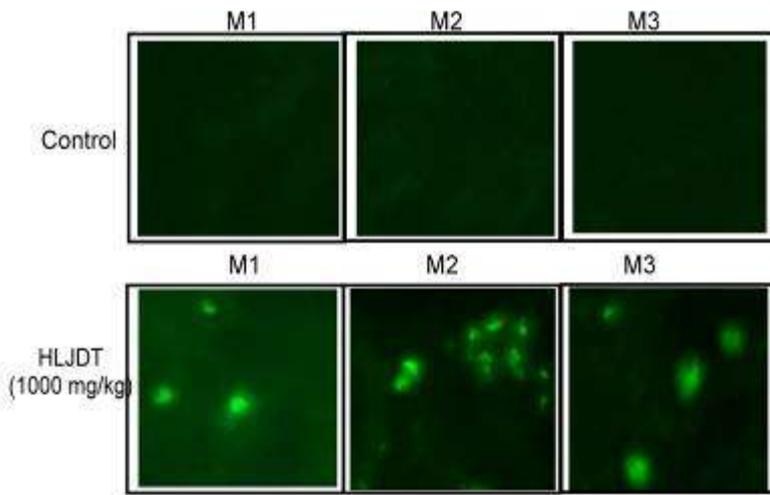


D.

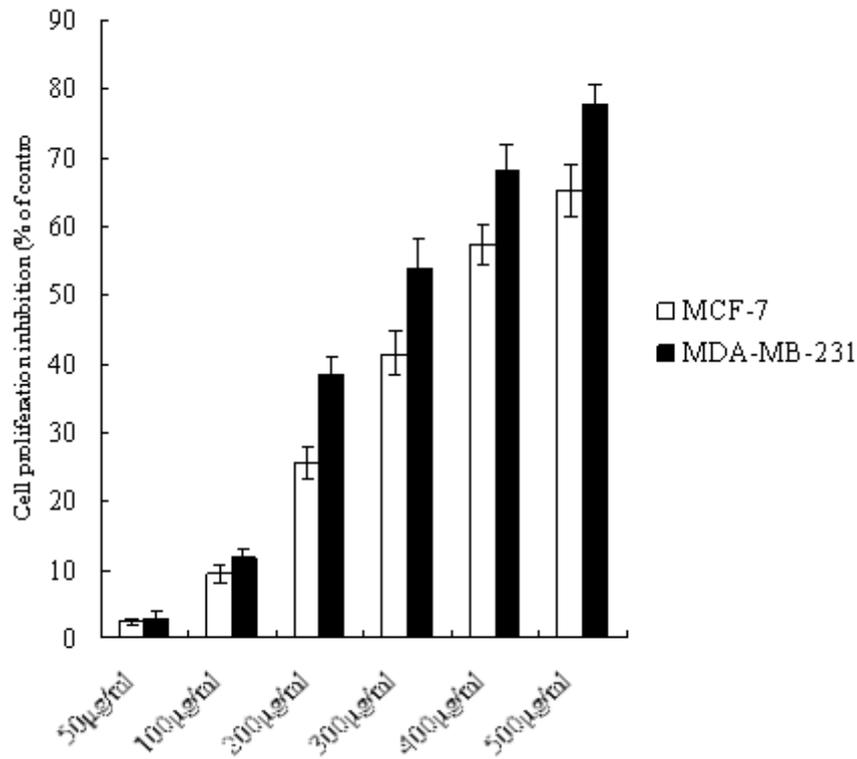
	Control	黃連解毒湯(1000 mg/mkg/day)
心	0.11 ± 0.03 g	0.11 ± 0.02g
肝	1.21 ± 0.2 g	1.11 ± 0.02g
脾	0.18 ± 0.03g	0.15 ± 0.04g
肺	0.17 ± 0.02g	0.14 ± 0.04g
腎	0.29 ± 0.05g	0.27 ± 0.05g



E.



圖八、黃連解毒湯 in vivo 活性評估。(A) 黃連解毒湯(HLJDT)抑制 PLC/PRF/5 細胞在 nude mice 身上的生長；(B)未給藥及給予黃連解毒湯的 nude mice 其 PLC/PRF/5 腫瘤生長情形；(C) 黃連解毒湯對老鼠體重的影響；(D) 黃連解毒湯對老鼠臟器的影響。(E) 黃連解毒湯在老鼠腫瘤誘發細胞凋亡。結果表現為之平均 (mean) \pm 標準偏差 (S.D.)；* 代表實驗組和控制組具有統計學上之差異($p < 0.05$)。每次實驗皆為三重複 ($n=3$)。



圖九、傳統方劑之抗乳癌細胞增生抑制作用。黃連解毒湯抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞增生。結果表現為之平均 (mean) ±標準偏差 (S. D.)。每次實驗皆為三重複 (n=3)。