

編號：CCMP94-RD-016

中藥材黃連併用於惡性腫瘤放射線治療之 輔助性功能研究

成佳憲

國立台灣大學

摘 要

放射線治療為探討中藥材在腫瘤治療輔助性角色應用上最佳的模式。主要原因包括放射線為安全性高的非侵入性治療，而且本身即具有一定的治療效果，不必考慮測試藥物產生不可預知的作用。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。發炎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發炎反應可能對腫瘤細胞有利但卻對正常組織有害。在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腫瘤、抗血管新生、抗發炎、殺菌等作用。學理上而言，十分適合運用於抑制腫瘤放射線治療引發的發炎反應的輔助性治療。本計畫所提出之中藥材黃連，組成份已在各個領域明確的被研究分析出，使得其作用機轉與藥理作用易於被科學性的驗證，本計畫運用本實驗室在腫瘤放射治療之研究模式，由先測試動物模式的有效性再進入機轉探討。包含第一部分為利用動物模式探討黃連及黃連萃取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 IL-6 及 PGE-2 的變化為評估標準，結果呈現黃連及黃連萃取物雖無法使放射線對腫瘤的控制有更多的加強，但確實造成動物血清發炎反應分子的降低。第二部分為利用細胞模式探討黃連及黃連萃取物是否改變腫瘤細胞與正常細胞對放射線處理的敏感性，結果呈現黃連及黃連萃取物並未增加腫瘤細胞的放射線敏感性。第三

部分為利用血管內皮細胞模式探討黃連萃取物是否改變 VEGF 對血管內皮細胞的各種血管新生效應，結果呈現黃連較黃連萃取物更能改變 VEGF 對血管內皮細胞的通透性與移行能力。第四部分為利用分子生物學方法探討黃連萃取物是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理時細胞內重要的訊息傳遞分子的活化，以 PI3K/Akt、MAPK/p38、MAPK/ERK 的磷酸化變化及轉譯分子 NFκ-B 及 HIF 的 leuciferase reporter activity 變化為評估標準，結果呈現黃連較黃連萃取物更能抑制訊息傳遞分子的活化，但效果有限。由於黃連係混合物且黃連主要萃取物效果均不如黃連的綜合效果，未來應朝向分析黃連主要萃取物以外的其他成份應用於輔助腫瘤放射線治療的可行性及其分子機轉。

關鍵詞：中藥材、黃連、放射線治療、腫瘤輔助性治療

Number: CCMP94-RD-016

Adjunct Therapeutic Effect of Chinese Herb *Coptis Chinensis* in Combination with Radiotherapy on Cancer

Chia-Hsien Cheng

National Taiwan University

ABSTRACT

Radiation biology experiment is the best model for the adjunct therapeutic test, because of its safe, noninvasive characteristics and effectiveness. In radiation model we do not have to consider the interaction between the test drug and the other drugs. In radiation biology for cancer, the ways to enhance cancer cell sensitization and to reduce the damage of normal tissue from radiation are the most important issues to be addressed. Inflammation is being highly recognized as one of the keys to these two physiological responses. On the other hand, radiotherapy induced inflammation may be beneficial for tumor cells but harmful for normal tissue. This concept has been accepted and several clinical trials of anti-inflammatory drug combined radiotherapy are ongoing. Chinese herb *Coptis chinensis* has been used for anti-inflammation and anti-bacterial traditionally. We tested its potential role of adjunct therapeutic effect in combination with radiotherapy on cancer treatment. In this study we investigated the adjunct therapeutic effect of *Coptis chinensis* in an animal model and evaluate the anti-inflammation effect by detecting serum level IL-6 and PGE2. We found that *Coptis chinensis* did not enhance radiation related tumor control, but was associated with the suppression of inflammatory markers in serum. Radiosensitization effect on cancer cells and normal cells from *Coptis chinensis* and its extracts was not shown. These herbs and extracts were not cytotoxic. *Coptis chinensis* showed more effects than its extracts on VEGF mediated HUVEC

angiogenic response, permeability, migration and tube formation. *Coptis chinensis* partially inhibited radiation induced signal transduction mediators such as PI3K/Akt, MAPK/P38, MAPK/ERK and the activities of NF-kB and HIF by leuciferase reporter activities. The effects were more potent in *Coptis chinensis* than its extracts. Since *Coptis chinensis* is a combination and is more potent in several effects than its main extracts, the future investigation needs to focus on the other extracts than the main extracts of *Coptis chinensis* for the anti-cancer effects.

Keywords : Chinese herb, *Coptis chinensis*, radiotherapy, cancer adjuvant therapy

壹、前言

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。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，發炎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發炎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慢性發炎反應被認為與癌症的產生有關⁽¹⁾，主要的理論包括：一、發炎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⁽²⁾。二、腫瘤細胞在癌化過程中轉型為能利用發炎反應分子的形式⁽³⁾。三、發炎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⁽⁴⁻⁵⁾。以上的研究結果顯示發炎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。近年來的研究顯示，發炎反應分子 IL-6 不僅能透過誘發抗凋亡分子 Mcl-1 使癌細胞更具抗凋亡能力，也具有誘發促腫瘤血管新生的分子 VEGF 增強促腫瘤血管新生能力^(6, 7)。此外，發炎反應分子 Cox-2 亦有透過誘發 VEGF-C 來促進淋巴血管新生的能力⁽⁸⁾。部分對於發炎反應分子的研究也發現，過度的增強免疫反應對腫瘤治療可能是弊大於利⁽⁹⁾。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發炎反應與病患的惡質化 (cachexia) 有高度相關性⁽¹⁰⁻¹²⁾這樣的理論已經逐漸被接受並已有利用抗發炎藥物與放射線治療併用的臨床測試進行中⁽¹³⁾。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腫瘤、抗血管新生、抗發炎、殺菌等作用。學理上而言，十分適合運用於抑制腫瘤放射線治療引發的發炎反應與感染的輔助性治療。本計畫所提之中藥材輔助性治療運用概念與中醫藥徵求重點相符合，而計畫中所欲探討的主題黃連在中醫學上運用已有好幾千年的歷史，黃連的組成份目前已經被研究出，中國大陸在國家基本中藥材的認定上已經肯定其安全性並收錄於國家藥典中，因此為中藥材中運用於腫瘤放射線治療之輔助性功能角色探討十分有發展潛力的藥材。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

中藥材作為腫瘤輔助性治療的最佳切入點。

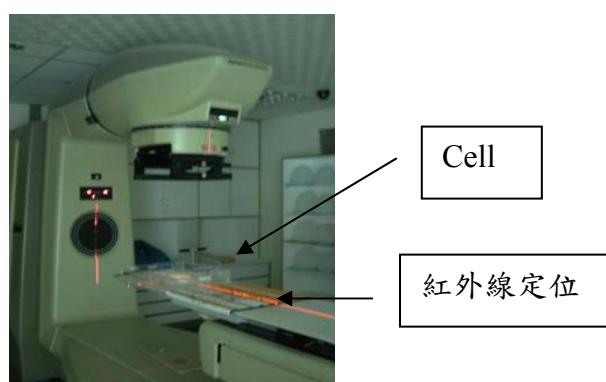
黃連為一般民眾熟知的中藥材而且其價格不高屬於人人皆有能力使用的經濟實惠中藥材。基於黃連具有：一、抗腫瘤。二、抗血管新生。三、抗發炎。四、殺菌的作用等生物效應因此我們認為黃連十分適合運用於抑制腫瘤放射線治療引發的發炎反應與感染的輔助性治療。黃連的名稱由來根據古書所記載為，其“根株叢延蔓相屬，有數百株共一莖者，故名連。黃連的英文名稱為 *Coptis Root* 或 *Chinese Goldthread* 是極有價值之藥用植物其特色為苦聞天下，黃連的根莖裡大約含有 7% 的黃連素，為其苦味的來源。黃連主要產於中國的四川、西藏、湖北、江西、陝西、山西等地其中四川的產量占 80% 以上。黃連在植物學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。黃連植物型態上（圖二）的特徵為多年生草本。葉由基部生長呈羽狀深裂，邊緣有銳鋸齒也具側生裂片；葉柄長 5-12cm。花的特性為聚傘花序頂生；5 片萼片，顏色為黃綠色，花瓣為倒披針形，長約為萼片的 1/2，中央有蜜槽；雄蕊多數。果實具細柄。花期 2-4 月，果期 3-6 月。最適生長於海拔 1000-1900m 的山谷涼濕隱蔽密林中。黃連的組成成分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. 非洲防己鹼（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）。本計畫所提之黃連其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之抗腫瘤、抗血管新生、抗發炎、殺菌等功用的特性，因此在此計畫中我們由細胞生物學及動物腫瘤放射線治療模式探討黃連是否能適用於抑制腫瘤放射線治療引發的發炎反應與感染的輔助性治療。

貳、材料與方法

一、實施方法及進行步驟

(一) 放射源

本研究計畫主要將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（如下圖）。



(二) 黃連

一次向中藥公會理監事張慶恭先生購得整個計畫所需的量。

(三) 黃連萃取物

由台大食科所張鴻民教授提供備製方法。

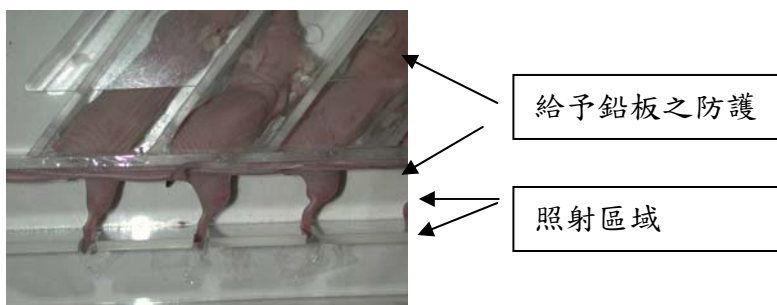
(四) 黃連熱水萃取物之製備

將黃連樣品以均質機磨成粉狀物（小於 20mesh）後，加入十倍量（w/v）之蒸餾水，利用迴流系統進行三次熱萃（100°C, 2hr），濾液以六層紗布過濾後離心（10,000g, 30min），取得的上清液經減壓濃縮、凍乾後即為熱水萃取物。回收率平均為 10g 黃連粉狀物萃出熱水萃取物 4mg。

(五)黃連乙醇萃取物的製備

將黃連以均質機磨成粉狀物（小於 20mesh）後，加入十倍量之（w/v）80%乙醇，在室溫下萃取 24 小時。利用迴流系統進行三次熱萃（100℃, 2hr），濾液以六層紗布過濾後重覆萃取三次後取得的總濾液以六層紗布過濾後離心（10,000g, 30min），取得的上清液經減壓濃縮、凍乾後即為乙醇萃取物。回收率平均為 10g 黃連粉狀物萃出乙醇萃取物 2.2mg。

動物試驗的鼠種：C57BL/6 由台大醫學院動物繁殖中心提供，裸鼠由國科會國家動物繁殖中心提供，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均通過台大醫學院動物試驗倫理委員會審查。利用 Nude mice 或 SCID 小鼠培養於無菌實驗室，將人類腫瘤細胞直接植於小鼠小腿、我們所建立的動物模式會在第二週產生腫瘤、我們將在腫瘤大於 5mm（直徑）時開始進行療程，運放射線能量，僅對小鼠腿部進行放射線治療（如下圖）。



第一部分為利用動物模式探討黃連及黃連萃取物及小蘗鹼（berberine）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 IL-6 及 PGE-2 的變化為評估標準。

研究設計及方法：此部分我們將分別以老鼠腫瘤細胞與人類腫瘤細胞進行動物試驗。

第一種為老鼠腫瘤細胞動物放射線治療模式為哈佛大學 Folkman 及 O'Reilly 兩位教授發表於 Cancer Res. 2001 Mar 1；61(5)：2207-11 的研究模式，將 Lewis lung carcinoma (LLC-LM) 腫瘤細胞植入 C57BL/6 小鼠腿部後第七天，開始給予如同臨床

使用之放射線治療（每天照射 10Gy 共五天）。我們將設計在不同時間及給予黃連或黃連萃取物，再由小鼠之腫瘤生長曲線統計黃連或黃連萃取物是否具有對腫瘤放射線治療的輔助性效果。在實驗過程中我們會同時紀錄小鼠體重變化、食慾、活動力等健康情況。此外，實驗過程中我們也將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 IL-6、PGE-2 的變化。

第二種為人類腫瘤細胞動物放射線治療模式，將人類肝癌細胞株（HepG2）植入裸鼠腿部後第七天，開始給予如同上述之放射線治療，此模式使用之裸鼠在免疫功能上有缺失因此只能就腫瘤生長曲線進行統計。但此模式可直接反映出人類肝癌細胞對黃連輔助性效果的反應。

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，一部分立刻以 OCT 加以包埋或直接經液態氮放入攝氏零下 70 度加以保存，以避免組織中的蛋白質或 mRNA 被分解。一部分則以福馬林固定，以利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萃取物及小蘗鹼（berberine）是否改變腫瘤細胞與正常細胞對放射線處理的敏感性，以細胞存活率及細胞群落形成（colony formation）的變化為評估標準。

研究設計及方法：腫瘤細胞培養：源自 ATCC 的 2 株肝癌（HepG2、Hep3B），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，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% CO₂ 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萃取物後以放射線處理，細胞存活率及生長曲線的變化分別利用 MTT 方式及錐蟲藍染色計數法（Trypan Blue exclusion）測定。第三部分為利用血管內皮細胞模式探討黃連萃取物及小蘗鹼（berberine）是否改變 VEGF 對血管內皮細胞的各種血管新生效應，以生長曲線、通透性、移行能力、管狀型態形成能力的變化為評估標準。

二、研究設計及方法

(一) 血管內皮細胞的生長測試 (Cell growth)

在 96-well plate 上接種 5×10^3 個人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVEC)，加入 50ng/mL VEGF 及 2%胎牛血清，處理不同濃度之黃連萃取物後在 37°C 下培養。經過 3、5、7、9 天生長後以 MTT 方式，利用 570nm 吸光值。畫出生長曲線測試黃連萃取物是否影響 VEGF 誘發血管內皮細胞的生長。

(二) 血管內皮細胞間隙通透能力測試 (In vitro permeability test)

人類臍靜脈血管內皮細胞培養於孔徑為 0.4 μ m 的 Boyden chamber 中至九分滿，以 PBS 清洗數次後處理不同濃度之黃連萃取物及 20ng/mL VEGF 2%胎牛血清並加入 HRP 分子，並在 37°C 下培養。一小時之後，測試通透過血管內皮細胞在 Boyden chamber 下層的 HRP 分子濃度。加入受質後利用 450nm 吸光值。測試黃連萃取物是否影響 VEGF 誘發血管內皮細胞的通透性。

(三) 血管內皮細胞移動能力測試 (In vitro wound healing)

人類臍靜脈血管內皮細胞，在 12-well plate 上培養至九分滿，以吸管末端在 plate 中刮出一道空白區域並以 PBS 將刮除之細胞洗去後加入不同濃度之黃連萃取物及 20ng/mL VEGF 及 2%胎牛血清，並在 37°C 下培養。六小時之後，透過倒立式位相差顯微鏡觀察並拍攝紀錄細胞的移動情況，以測試黃連萃取物是否影響 VEGF 誘發血管內皮細胞的移動能力。

(四) 在 Matrigel 中血管內皮細胞管狀形態生成分析 (Tube formation assay)

在 24-well microtiter plate well 中放置 100 μ L 未經聚合作用的 Matrigel 且讓其聚合 37°C 一小時。在每個 well 中接種 2×10^5 個人類臍靜脈血管內皮細胞，加入不同濃度之黃連萃取物及 50 ng/mL VEGF。經過 5% CO₂ 及 37°C 下培養六小時之後，透過倒立式位相差顯微鏡觀察並拍攝紀錄黃連萃取物是否影響 VEGF 誘發血管內皮細胞管狀形態生成效應。

第四部分為利用血管內皮細胞模式探討黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 是否改變 VEGF 對血管內皮細胞的各種血管新生效應。結果顯示黃連萃取物並不能顯著抑制血管內皮細胞受 VEGF 誘發之生長曲線，但在通透性、移行能力、管狀型態形成能力的變化上具有抑制作用。其中小蘗鹼 (berberine) 對於移行能力有顯著之效果。

第四部分為利用分子生物學方法探討黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理時細胞內重要的訊息傳遞分子的活化，以 PI3K/Akt、MAPK/P38、MAPK/ERK 的磷酸化變化及轉譯分子 NF κ -B 及 HIF 的 leuciferase reporter activity 變化為評估標準。

以西方墨點法分析 PI3K/Akt、MAPK 的磷酸化變化，分離經過不同濃度之黃連萃取物及處理放射線後一小時的實驗組控制組細胞蛋白質依照預偵測分子大小以適當濃度 SDS-PAGE 分離，轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane，利用不同的專一性抗體作免疫墨點法。利用含過氧化酶的二級抗體偵測一級抗體，最後用加強性的化學螢光法偵測系統偵測黃連萃取物是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理時細胞內 Akt、P38、ERK 的磷酸化程度。

以 leuciferase reporter activity 測試法分析轉譯分子 NF κ -B 及 HIF 的活性利用轉植入 NF κ -B 或 HIF leuciferase reporter plasmid 的肝癌細胞株加入不同濃度之黃連萃取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，計算出黃連萃取物是否轉譯分子 NF κ -B 及 HIF 的活性。

參、結果

本研究計畫內容主要規劃為五個部分，以下針對五個部分之研究結果分別進行結果描述：

第一部分為利用動物模式探討黃連及黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 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 IL-6 及 PGE-2 的變化為評估標準。

分別以老鼠腫瘤細胞與人類腫瘤細胞進行動物試驗。第一種為老鼠腫瘤細胞動物放射線治療模式 (詳述於研究方法)，第二種為人類腫瘤細胞動物放射線治療模式，將人類肝癌細胞株 (HepG2) 植入裸鼠腿部後第七天，開始給予如同上述之放射線治療。此模式可直接反映出人類肝癌細胞對黃連輔助性效果的反應。然而在本研究執行期間國家動物中心與本院實驗動物中心在 SCID 小鼠的繁殖與代養上分別爆發感染事件。我們考量時效與裸鼠在免疫功能上有缺失可能無法提供無整實驗結果與研究經費等因素之下，決定只用老鼠腫瘤模式進行此部分研究。Lewis lung carcinoma (LLC-LM) 腫瘤細胞植入 C57BL/6 小鼠腿部後第七天，開始給予如同臨床使用之放射線治療 (每天照射 10Gy 共五天)。在此劑量下小鼠腿部的腫瘤可獲得良好的控制。實驗設計在放射線治療前三天開始以管餵方式及給予黃連 (20mg/kg/day) 或黃連萃取物 (黃連熱水萃取物 2mg/kg/day, 黃連乙醇萃取物 2mg/kg/day) 以及由本計畫審查委員建議之黃連成份物質小蘗鹼 (berberine) 2mg/kg/day。餵食時程共 14 天。原先之構想為量測腫瘤的生長曲線然而受限於小鼠的腿毛濃密會造成很大的誤差，因此僅以在第三十五天將小鼠犧牲，手術取下腫瘤後以秤重方式量化各組腫瘤大小以釐清黃連或黃連萃取物小蘗鹼是否具有對腫瘤放射線治療的輔助性效果。實驗結果如圖一，顯示在此使用之放射線劑量能有效控制腫瘤的生長，然而黃連或黃連萃取物 (黃連熱水萃取物及黃連乙醇萃取物) 以及小蘗鹼 (berberine) 的餵食給予對於放射線治療對腫瘤大小的控制上並無顯著的加強作用。在實驗過程中我們同時紀錄小鼠體重變化實驗結果如圖二，顯示在有使用放射線治療的組別中，小鼠的體重會略微下降。然而管餵黃連或黃連萃取物 (黃連熱水萃取物及黃連乙醇萃取物) 以及小蘗鹼 (berberine) 的組別中小鼠體重的變化與單純放射線治療的組別並無顯著的差異。另一群單純管餵黃連或黃連萃取物 (黃連熱水萃取物及黃連乙醇萃取物) 以及小蘗鹼

(berberine) 的組別中，所觀察到的體重上升，我們認為是源自於小鼠腿上腫瘤生長的原因。在此部分的研究結果中雖然在黃連或黃連萃取物（黃連熱水萃取物及黃連乙醇萃取物）以及小蘗鹼（berberine）加入放射線治療的組別中均觀察不到有意義的增強治療效果，此外我們所選擇的濃度並無造成老鼠死亡及活動力的改變因此在此劑量內應屬合理之劑量。然而為了釐清黃連傳統上被認定的抗發炎功效我們選定黃連的餵食與放射線治療併用的模式，在實驗過程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 IL-6、PGE-2 的變化，實驗結果如圖三，顯示在放射線治療組中小鼠血清中發炎反應蛋白質 IL-6 及 PGE-2 會有相較於未進行放射線治療的控制組在第二週產生濃度的變化，IL-6 約 2.4 倍而 PGE-2 約 2.1 倍。這樣的發炎反應現象在臨床上也是存在的，黃連併用的給予顯示能降低放射線治療誘發的 IL-6 及 PGE-2 的上升（實驗結果顯示於圖三，藍色線條代表單純放射線治療、紅色線條代表放射線治療加黃連併用），因此在此部分研究結果雖然黃連併用的給予對於腫瘤控制無顯著作用但可能原因是此動物腫瘤模式生長之劇烈是藥物甚難控制的，另一個解釋則是 Lewis lung carcinoma (LLC-LM) 腫瘤細胞對於黃連所能抑制的發炎反應分子 IL-6 及 PGE-2 無生長調控之感受性。近年來發炎反應逐漸被研究發現與腫瘤惡性化有密切關連，我們認為在發炎反應分子具生長調控感受性之腫瘤細胞中也許黃連的併用治療能具有較顯著的功效。

第二部分為利用細胞模式探討黃連萃取物及小蘗鹼（berberine）是否改變腫瘤細胞與正常細胞對放射線處理的敏感性。

此部分之研究主要以細胞存活率及細胞群落形成（colony formation）的變化為評估標準探討源自 ATCC 的 2 株肝癌（HepG2、Huh7），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（HUVEC）在處理黃連萃取物後是否改變腫瘤細胞與正常細胞對放射線處理的敏感性以釐清黃連水萃取物及小蘗鹼（berberine）能否改變腫瘤細胞與正常細胞對放射線處理的敏感性。我們首先測試黃連萃取物（Coptis）及小蘗鹼（Berberine）使用之濃度是否即具有細胞毒性作用，實驗結果如圖四顯示在 Coptis 200 μ g/mL，Berberine 20 μ g/mL 作用細胞 72 小時的情況下並無明顯之細胞毒性效應產生，而在 Taxol 處理組各種細胞的存活率都降至 50% 左右。我們進一步選擇具有明顯細胞群落形成型態的 HepG2 細胞測試黃連萃取物後是否改變腫瘤細胞對放射線處理的敏感性。實驗結果如圖五，由七天的細胞群落形成結果顯示顯

示在 Coptis 200 μ g/mL, Berberine 20 μ g/mL 與放射線 (10Gy) 併用的情況下, 無法增加腫瘤細胞對放射線處理的敏感性。在以 Cisplatin 併用的控制組則有明顯的抑制細胞群落形成效果。Coptis 200 μ g/mL, Berberine 20 μ g/mL 單獨作用似乎不僅不具細胞毒性, 在 Berberine 組, 細胞群落形成反而有更濃密的趨勢 (實驗結果如圖五之第六圖)。因此我們認為在與放射線治療併用藥物選擇中, 檢驗藥物本身單獨作用的效果是相當重要的一環。

第三部分為利用血管內皮細胞模式探討黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 是否改變 VEGF 對血管內皮細胞的各種血管新生效應。

此部分以血管內皮細胞生長曲線、通透性、移行能力、管狀型態形成能力的變化為評估標準。探討黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 是否改變 VEGF 對血管內皮細胞的各種血管新生效應。在 96-well plate 上接種 5×10^3 個人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVEC), 加入 50ng/mL VEGF 及 2%胎牛血清, 處理不同濃度之黃連萃取物後在 37°C 下培養。Z 分別在 1、2、3、4 天生長後以 MTT 方式, 利用 570nm 吸光值。畫出生長曲線測試黃連及小蘗鹼是否影響 VEGF 誘發血管內皮細胞的生長。實驗結果如圖六顯示在 Coptis 200 μ g/mL, Berberine 20 μ g/mL 作用細胞 1、2、3、4 天的情況下雖無並無明顯之細胞毒性效應產生, 但卻會抑制由 VEGF 誘發血管內皮細胞的生長 (實驗結果顯示於圖六最底之曲線)。在此研究中我們事實上很難排除除了 VEGF 之外, 血清中所含的其他生長因子的效應, 因此我們的結論是 Coptis 200 μ g/mL, Berberine 20 μ g/mL 對血管內皮細胞的生長而言是無細胞毒性的。我們將人類臍靜脈血管內皮細胞培養於孔徑為 0.4 μ m 的 Boyden chamber 中至九分滿, 以 PBS 清洗數次後加入不含血清的培養基 M199 並處理 Coptis 200 μ g/mL, Berberine 20 μ g/mL 及 20ng/mL VEGF 2%胎牛血清並加入 HRP 分子, 並在 37°C 下培養。一小時之後, 測試通過血管內皮細胞在 Boyden chamber 下層的 HRP 分子濃度。加入受質後利用 450nm 吸光值。測試 Coptis, 是否影響 VEGF 誘發血管內皮細胞的通透性。實驗結果如圖七顯示 20ng/mL VEGF 會顯著引發血管內皮細胞的通透性增加 Boyden chamber 下層的 HRP 分子濃度, 而 Coptis 也具有抑制此 VEGF 引發血管內皮細胞的通透性的效應 (實驗結果顯示於圖七第三條 lane), Berberine 的效果則不如 Coptis 的顯著, 由於 Berberine 是 Coptis 主要成份之一, 因此由此結果我們認為黃連中應該含有除了小蘗鹼外與抑制 VEGF 引發血管內皮細胞的通透性的效應更有效力的分子。我們接著探

討黃連及小蘗鹼對 VEGF 誘發血管內皮細胞的移動能力的影響。將人類臍靜脈血管內皮細胞培養於孔徑為 $0.8\mu\text{m}$ 的 Boyden chamber 中至九分滿，以 PBS 將細胞培養機中的血清洗淨後在 Boyden chamber 上層入不含血清的培養基 M199 但含有 Coptis $200\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Berberine $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 一小時，於 Boyden chamber 的上層加入 $20\text{ng}/\text{mL}$ VEGF 而下層加入 10% 胎牛血清，並在 37°C 下培養。六小時之後，將細胞以 1% 福馬林固定並以結晶紫染色，以棉棒刮去上層細胞後再透過倒立式位相差顯微鏡計算單位面積下細胞的移動數目，以釐清黃連及小蘗鹼對 VEGF 誘發血管內皮細胞的移動能力的影響。實驗結果如圖八顯示 $20\text{ng}/\text{mL}$ VEGF 會顯著引發血管內皮細胞的移動數目，Coptis $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 Berberine $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 並不會引發血管內皮細胞的移動數目增加。儘管統計上我們看不出差異 ($p=0.08$)，然而 Coptis 具有些微抑制 VEGF 引發血管內皮細胞移動的效應，而且效果較小蘗鹼好。因此由此結果我們認為黃連中應該含有除了小蘗鹼外與抑制 VEGF 引發血管內皮細胞的移動效應更有效力的分子。

第四部分為利用分子生物學方法探討黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 是否改變血管內皮細胞受放射線處理時細胞內重要的訊息傳遞分子的活化。

近年來的研究顯示，血管內皮細胞是放射線治療反應中感受性較強的細胞，先前的研究已經知道放射線會活化細胞內訊息傳導分子使細胞產生不同的生理反應。目前已知的會被活化的分子包括有 PI3K、MAPK 的磷酸化變化及轉譯分子 NF κ -B 及 HIF。在此部分我們以西方墨點法分析 PI3K/Akt、MAPK 的磷酸化變化，探討黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 是否改變血管內皮細胞受放射線處理時細胞內重要的訊息傳遞分子的活化效應。在 6-cm well 上培養 2×10^5 個人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVEC)，經過 Coptis $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 Berberine $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 預先處理一小時後再給予放射線 (7.5Gy)。一小時後萃取各組實驗細胞之總蛋白質依照預偵測分子大小以 10% 濃度 SDS-PAGE 分離，轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane，利用不同的專一性抗體作免疫墨點法。利用含過氧化酶的二級抗體偵測一級抗體，最後用加強性的化學螢光法偵測系統偵測黃連萃取物是否改變腫瘤細胞與正常細胞受放射線處理時細胞內 Akt、MAPK 的磷酸化程度。實驗結果如圖九顯示放射線會活化 PI3K/Akt、MAPK 的磷酸化，在 PI3K/Akt 的專一性化學抑制劑 LY294002 ($50\mu\text{M}$) 與 MAPK 的專一性化學抑制劑 PD98059

(20 μ M) 的組別中 PI3K/Akt、MAPK 的磷酸化均有良好的抑制效果，而 Coptis 與 Berberine 對此磷酸化活化作用的抑制效果有限，然而由於黃連為混合物，因此由此結果我們認為黃連中應該含有除了小蘗鹼外與抑制 PI3K/Akt、MAPK 的磷酸化更有效力的分子。此外我們也以以 leuciferase reporter activity 測試法分析黃連萃取物及小蘗鹼 (berberine) 是否改變血管內皮細胞受放射線處理時轉譯分子 NF κ -B 及 HIF 的活性，利用轉殖入 NF κ -B 或 HIF leuciferase reporter plasmid 的血管內皮細胞，經過 Coptis 200 μ g/mL 與 Berberine 20 μ g/mL 預先處理一小時後再給予放射線 (7.5Gy)。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，計算出否轉譯分子 NF κ -B 及 HIF 的活性。實驗結果如圖十顯示放射線會活化 NF-kB 及 HIF 的活性，在 NF-kB 的專一性化學抑制劑 Bay 11-7082 (10 μ M) 與 HIF 的專一性化學抑制劑 LY294002 (20 μ M) 的組別中 NF-kB 及 HIF leuciferase reporter 的活化均有良好的抑制效果，Coptis 與 Berberine 對 HIF leuciferase reporter 活化作用的抑制效果有限，而 Coptis 對 NF-kB leuciferase reporter 的活化似乎具有部分抑制作用 (實驗結果顯示於圖十左圖之第三條 lane)，由於黃連為混合物，因此由此結果我們認為黃連中應該含有除了小蘗鹼外與抑制 NF-kB 活化更有效力的分子。

肆、討論

隨著三度空間定位技術的進度與直線加速器的發展，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性角色應用上最佳的模式。西方醫學在科學化的歸納整合下針對惡性腫瘤的處置可分為：外科手術、化學治療及放射線治療，是世界性的癌症治療準則，儘管目前西醫對於惡性腫瘤治療效果仍不盡理想，然而西醫建立的，由腫瘤病患血清中偵測的腫瘤生化指標及斷層掃描、骨頭掃描、超音波檢查等方式間接或直接提供治療效果的科學性驗證方法，而這樣的發展也僅有約百年的歷史。反觀中醫雖有千年的歷史但對於腫瘤的治療往往流於偏方的不科學性及不確定性，因此以科學性的方法釐清中醫藥材的藥理機轉與建立使用上的理論基礎為推動中醫藥運用於腫瘤治療全球化的開端，也是加速國內中醫藥具備國際性競爭力的最大關鍵。

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、解毒、清心除煩、殺蟲、菌痢、熱瀉腹痛、肺結核、下血、消渴、疳積、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，用幹姜、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、薑黃連、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。

黃連的生理效應及藥理作用在國內外已有相關研究其研究結果可歸類有⁽¹⁴⁻²⁵⁾：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⁽¹⁴⁾。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⁽¹⁵⁾。3.抗阿米巴：黃連煎劑和小蘗鹼均具有抗阿米巴作用⁽¹⁶⁾。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⁽¹⁷⁾。5.抗消化性潰瘍作用：黃連水抽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⁽¹⁸⁾。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⁽¹⁹⁾。7.促進學習記憶：小蘗鹼 0.4、4μg/隻側腦室注射可改善小鼠記憶障礙及促進正常小鼠的記憶保持⁽²⁰⁾。8.興奮或抑制心肌：小蘗鹼小劑量興奮心臟，大劑量則抑制心臟，其對心肌的正性肌力作用為可逆性的⁽²¹⁾。9.降血壓：小蘗鹼降血壓作用之機理與擴張血管、抗腎上腺素（epinephrine）及抑制升壓反射抑制血管運動中樞有關⁽²²⁾。10.解熱：黃連注射液對發熱模型動物有降溫作用，其作用機理與中樞 cAMP 生成有關⁽²³⁾。11.降血糖：黃連和小蘗鹼可抑制糖原新生和促進糖酵解，固有降低血糖作用⁽²⁴⁾。12.降血脂：黃連水浸液和小蘗鹼均有降低動物血清膽固醇的作用⁽²⁵⁾。

此外黃連亦被用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⁽²⁶⁾關於腫瘤抑制之研究：利用 hepatoma and leukaemia 細胞株發現黃連萃取物具有抑制此兩種 cell growth 的作用⁽²⁷⁾運用生物晶片探討中藥在抗腫瘤方面的潛力在文章所篩選的中藥中黃連是屬於抗腫瘤效果良好的藥材，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⁽²⁸⁾。國內近三年來有數篇針對黃連之相關研究之碩博士論文包括，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 公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 小鼠皮下轉殖大腸癌細胞 (CT26) 形成腫瘤，並餵食不同濃度的黃連萃取物，結果發現每公斤老鼠體重予以 400mg 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 PGE-2 的產生，進而具有抗發炎及免疫調節的作用。中國醫藥學院醫學研究所，張文正教授與蔡忠昌教授指導蔡淑理之碩士論文研究，發現具止瀉與瀉下功能的中草藥如黃連可能是藉由影響腸道上皮細胞離子運送的改變因而具有止瀉或瀉下功能。中國醫藥學院中國藥學研究所，謝明村教授與徐士蘭教授指導梁峰賓之碩士論文研究，發現黃連主要成份物質小蘗鹼對於腫瘤細胞生長的抑制作用，是透過調控細胞週期相關分子 cyclins、Cdks 和 CdkIs 的表現量，小蘗鹼可能為癌症治療提供另一新藥的來源。中國醫藥學院中西醫結合研究所，陳方周教授、陳光偉教授與徐松錕教授指導陳乃菁之碩士論文研究，以基因晶片分析中藥寒藥如黃連等培養的腎細胞的基因表達，可以發現中藥的確是多靶向、多基因的作用，可以此來解釋中藥的雙向調節的作用，說明中藥為何能利用君臣佐使的配伍及引經藥的使用，而使同樣的藥物產生不同的藥理作用。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。

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。近年來的研究也發現黃連可透過抑制血管平滑肌細胞的增殖來降低心血管阻塞機率，又有輕度降低血壓、降血糖的作用，因此對放置支架患者或施行氣球擴張術後的患者而言是減低血管再狹窄或復發，相當好的保健中藥。此外，黃連成份小檗鹼，現已應用在心律不整及心力衰竭患者做為抗心律不整，正肌性作用的藥物。中國醫藥大學中國藥學研究所副教授彭文煌已被美國 Life Sciences 期刊接受的研究則發現小檗鹼，具有抗焦慮的作用，且療效與常用藥 diazepam 和 buspirone 相當，卻沒有西藥的副作用和戒斷困擾，是研發抗焦慮藥物的新方向，也顯示其在醫療保健的重要性。

癌症是國人最主要的死亡原因，由於研究顯示罹患率會與日俱增，因此由醫療保健達到對癌症的預防與治療是十分重要的問題。因此如何運用薏苡來增強癌症治療效果或減少治療產生之副作用，成為臨床與基礎研究上值得探討的問題。

伍、結論與建議

綜合我們的基礎與動物試驗結果，我們針對本計畫成果提出之結論為：本研究計畫在動物試驗部份，一直期望能加入人類腫瘤細胞移植於動物體內的模式。然而我們第一次的動物試驗研究結果，在第一個步驟即發生問題，人類腫瘤細胞（肝癌 HepG2 及子宮頸癌 HeLa）無法在國家動物中心購得之裸鼠（共 30 隻）腿上形成腫瘤。雖然我們在 C57/BL6J 小黑鼠身上已經得到動物試驗結果，在黃連萃取物之備製上，受限於溶解度的問題我們僅能以 mg/mL 代表最初備製時的重量百分比，然而黃連之粉末構造並無法完全溶解，因此我們認為作用濃度的問題是未來需要更明確定義的問題。此問題需要中藥材研究之專家學者提供寶貴意見。

本計畫結果呈現黃連及其主要萃取物並不能有效加強放射線引發的抗腫瘤反應，但確實降低放射線造成的體內發炎反應，且效果上黃連均較其主要萃取物為佳。未來努力方向應在尋找與黃連影響之發炎反應有關的腫瘤模式，或探究黃連主要萃取物以外的其他成份的可能抗癌效果與機轉。

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 CCMP94-RD-016 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

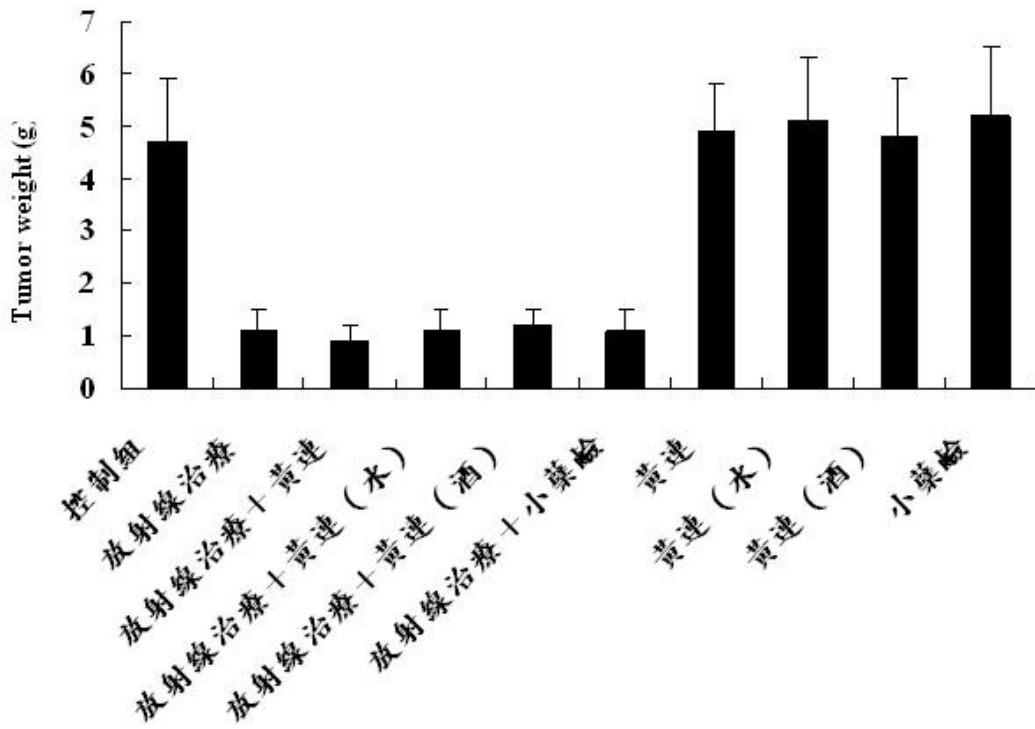
1. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004 4(7): 540-50.
2. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*. 2001; 477(1-2): 7-21.
3. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 2000; 12(6): 547-54.
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; 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; 28(3): 344-52.
6. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Cheng WF, Chang MC, Su JL, Hsieh CY. The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene*. 2001; 20(41): 5799-809.
7. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Cheng WF, Chang MC, Su JL, Hsieh CY. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 2003; 22(10): 1517-27.
8. Su JL, Shih JY, Yen ML, Jeng YM, Chang CC, Hsieh CY, Wei LH, Yang PC, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2004; 64(2): 554-64.
9. Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML, Lee YC, Yang PC. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(2): 729-37.

10. 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; 58(6): 545-9.
11. 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; 9(13): 4653-65.
12. 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; 111(4): 592-5.
13. 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; 26(4): S46-7.
14. 戴新民。1977。中藥的藥理及應用。啟業書局。台北。
15. 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。
16. 宋魯成、陳克忠、朱家雁。1996。黃連對大鼠高脂質過氧化物高脂質及體外血形成的影響。陝西中醫。17：137-138。
17. 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。
18. 莊曜禎。2001。黃連素在生物體外對人類肺癌細胞乙醯化 2-AF 與肺癌細胞生長及 SD 大白鼠體內。
19. 組織中 2-AF 代謝的影響。中國醫藥學院醫學研究所碩士論文。
20. 陳其明。1986。黃連及小蘗鹼降血糖作用的研究。藥學學報。21：401。
21. 郭樹仁、羅衛芳、劉天培。1997。小蘗鹼對小鼠學習記憶及開場行為的影響。中藥藥理與臨床。13：17-19。
22. 楊鑿英、劉燕玲、劉錫瑩。1989。中藥抗乙型肝炎病毒的實驗研究。中西

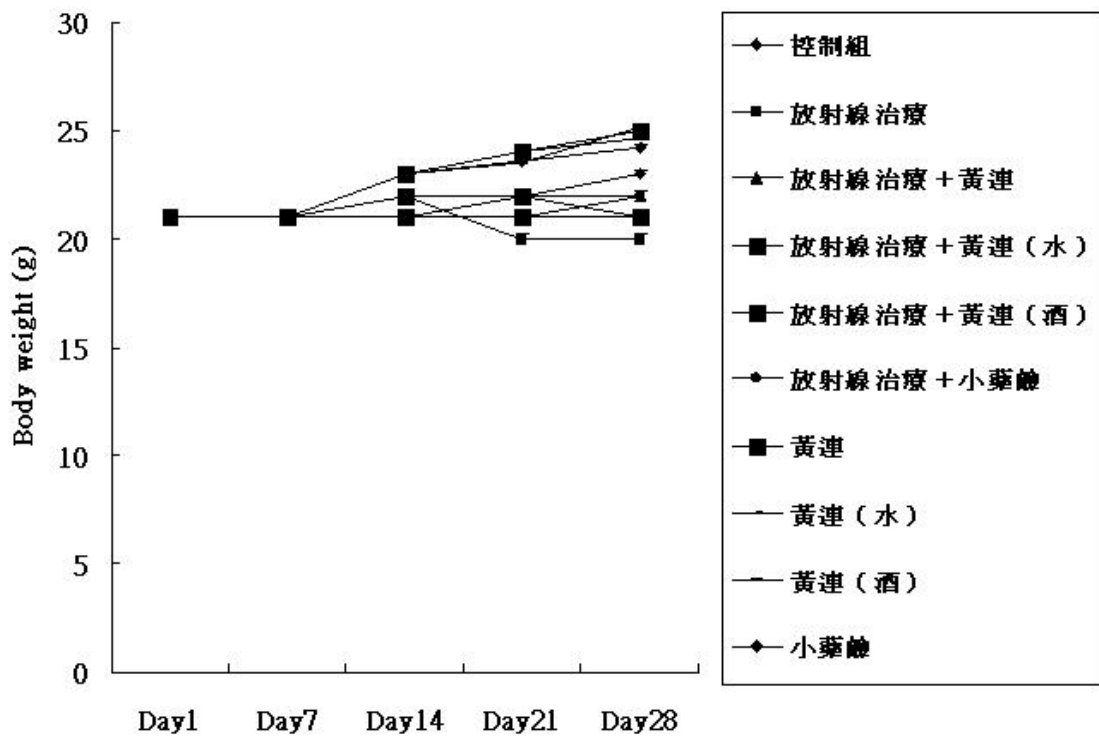
醫結合雜誌。9：494-495。

23. 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。
24. 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。
25. 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。p.54-56。
26. 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.
27. Lin CC, Ng LT, Hsu FF, Shieh DE, Chiang LC. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 31(1-2): 65-9.
28. Iizuka N, Oka M, Yamamoto K, Tangoku A, Miyamoto K, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Identification of common or distinct genes related to antitumor activities of a medicinal herb and its major component by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer.* 2003; 107(4): 666-72.
29. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(4): 1433-7.

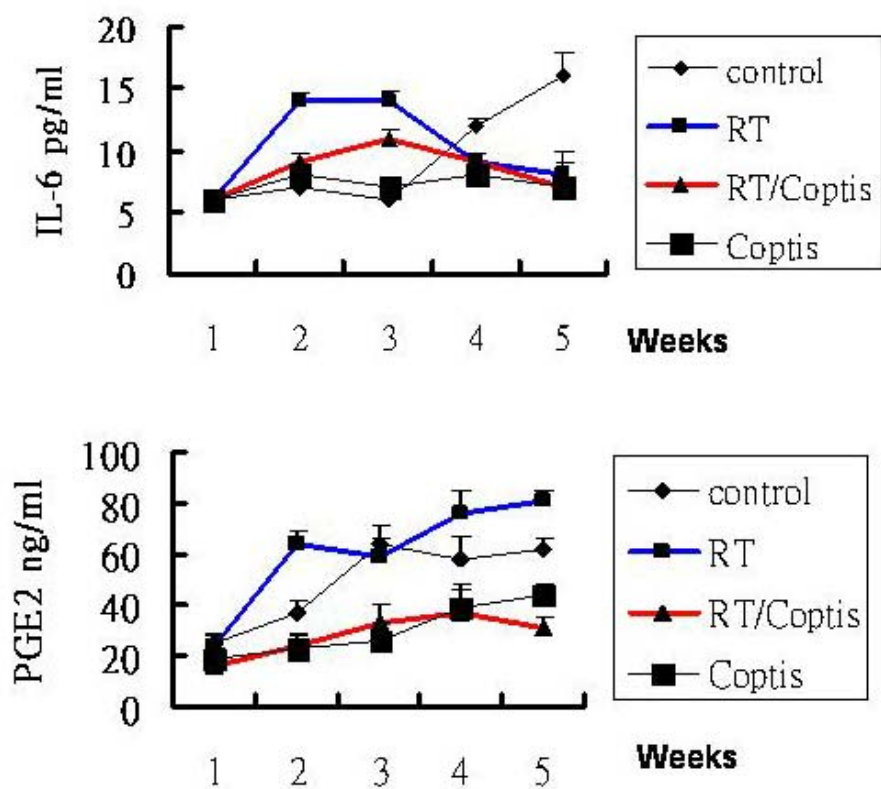
柒、圖



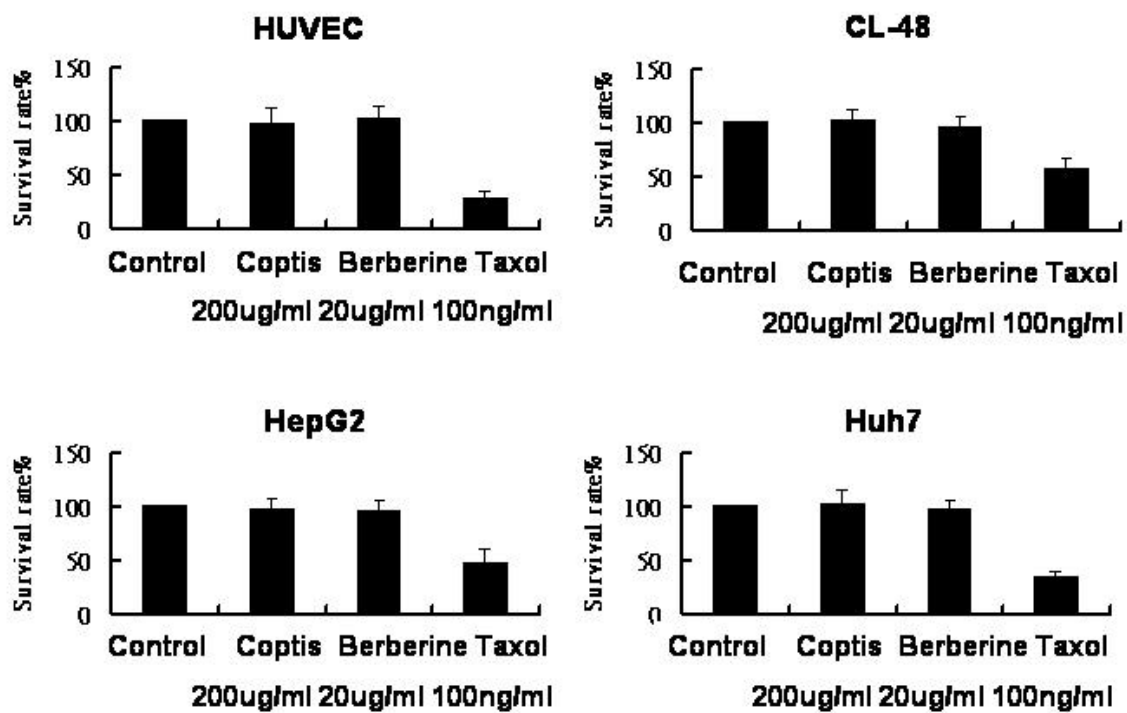
圖一



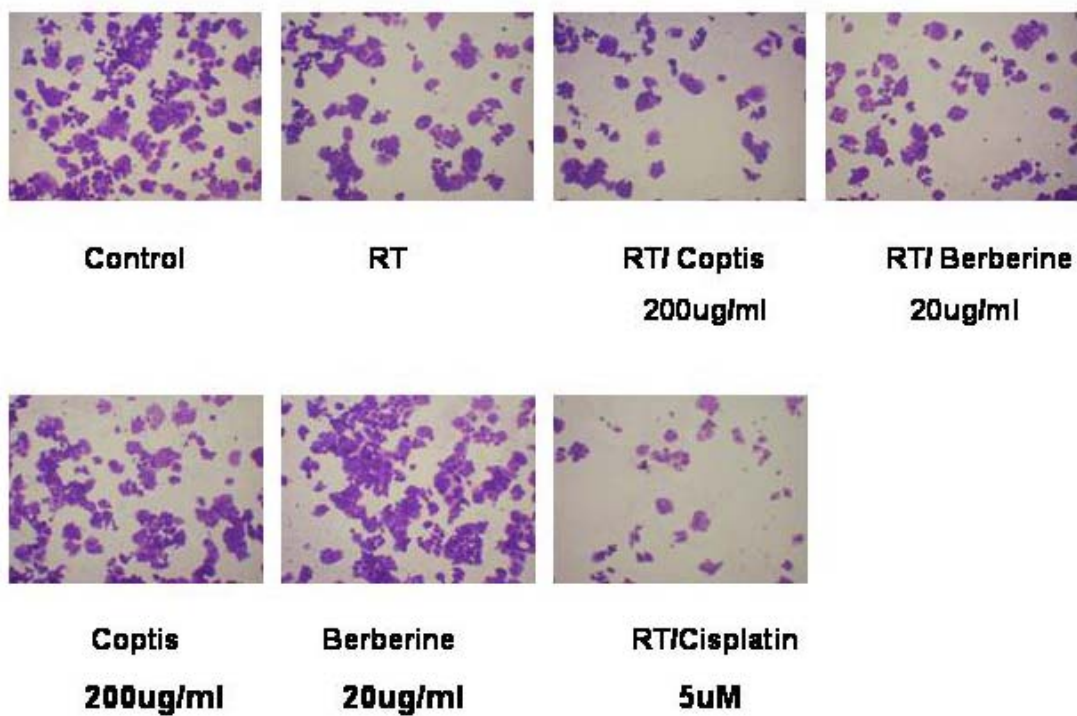
圖二



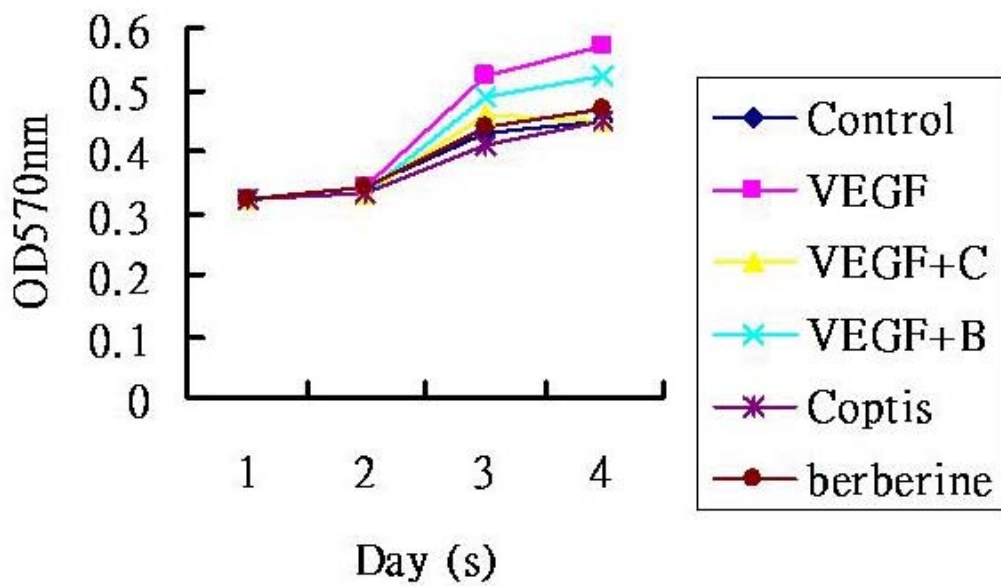
圖三



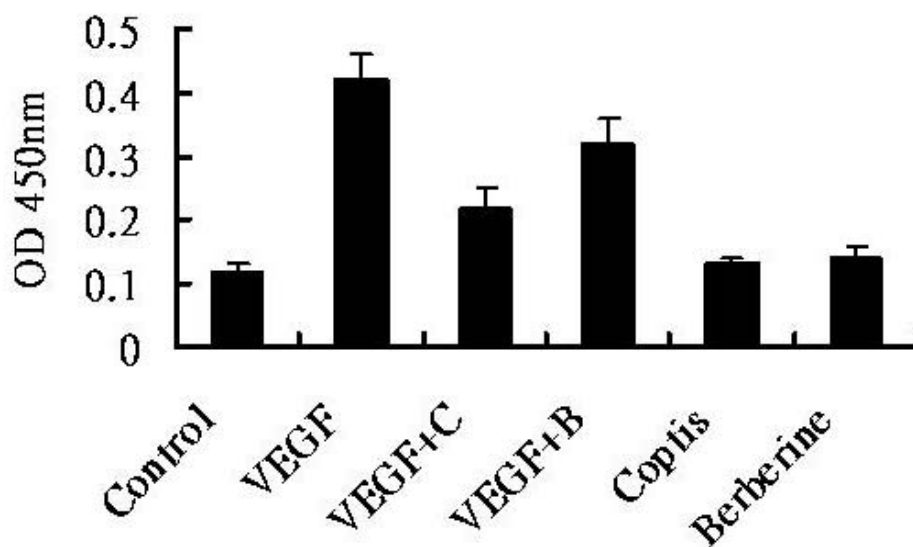
圖四



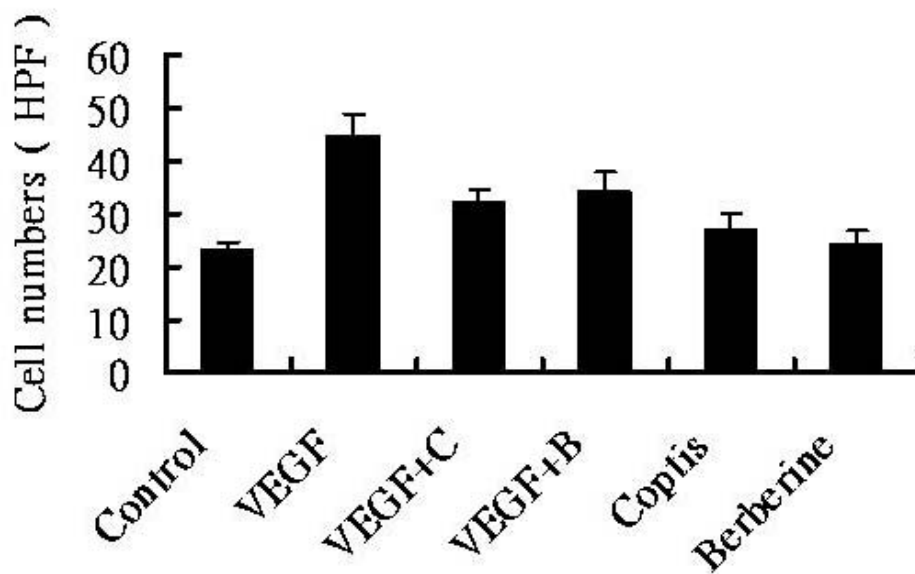
圖五



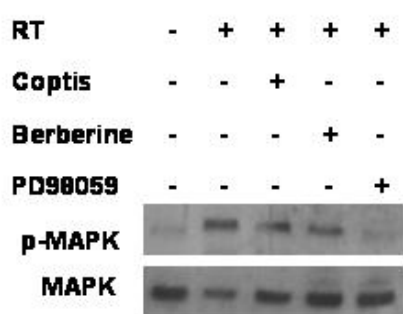
圖六



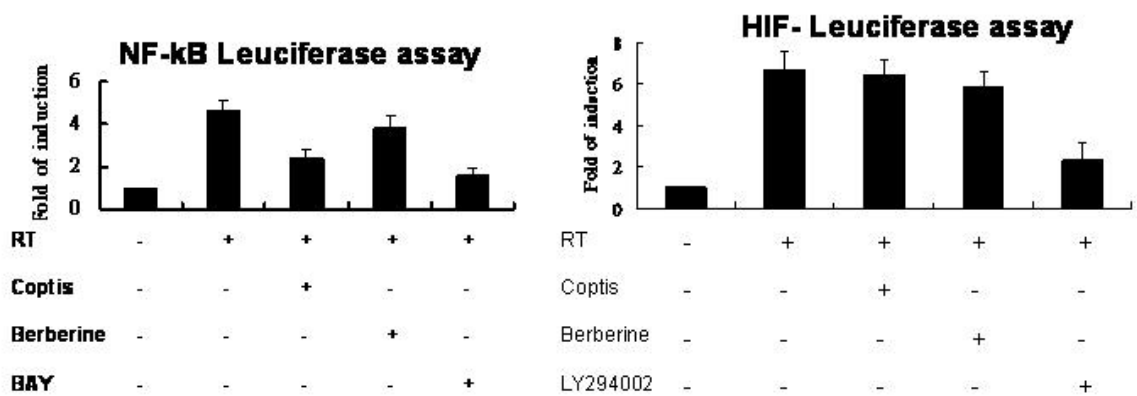
圖七



圖八



圖九



圖十

