

天然產物抗人類肝細胞癌活性之研究： 芸香科生物鹼之篩選

Screening of natural products with antitumor activity on human hepatocellular carcinoma: rutaceous alkaloids

蔡榮發

高雄醫學院醫學系內科

摘要

肝細胞癌(以下簡稱肝癌)是國人最常見癌症死因之一。肝癌的治療效果仍然不盡理想，缺少有效抗癌藥物是一大主因。因此，抗癌藥物的研發，重要性不言可喻。運用現代進步的基礎與臨床醫學資訊，與生物科技以從事天然植物抗癌或防癌成分之研究，終將為癌症的治療帶來新希望。本研究的目的，就是要篩選出具治療肝癌潛力的芸香科生物鹼。

本研究利用肝癌細胞株做為研究對象，加入不同濃度 (0, 0.05, 0.5, 5, 50, 及 500 nmole)之純化芸香科生物鹼(共60種)，研究下列數種抗肝癌活性：1) 抑制肝癌細胞增生；2) 抑制肝癌細胞去氧核糖核酸合成；3) 促進肝癌細胞 apoptosis (並進行細胞週期分析)；4) 促進肝癌細胞壞死 (測定 lactate dehydrogenase)；5) 抑制肝癌細胞 topoisomerase I 活性；6) 對肝癌細胞甲型胎兒蛋白的濃度的影響。結果發現13.3%純化之芸香科生物鹼(包括 Dictamine、 γ -fagarine、robustine、zanthosimuline、toddaquinoline、2H-isoterihanine、toddaliamide、及 canthin-6-one)對肝癌細胞增生及肝癌細胞去氧核糖核酸合成有抑制作用，這些抑制作用與生物鹼濃度成正比。且能使

肝癌細胞去氧核糖核酸產生裂解現象。肝癌細胞加入生物鹼前後LDH濃度無差異，表示這8種生物鹼只會讓肝癌細胞發生apoptosis(預設性細胞死亡)，而不會讓肝癌細胞發生急性細胞毒性(cytopathy)，產生壞死(necrosis)。但因所有芸香科生物鹼均無抑制第一型拓撲酶活性能力，表示apoptosis基轉與第一型拓撲酶無關，確實基轉有待進一步探討。建議：對於能造成apoptosis的芸香科生物鹼，值得進一步作其毒理研究與臨床試驗，以決定其成為抗癌新藥之可能性。

關鍵詞：芸香科生物鹼，肝細胞癌，預設性細胞死亡

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most frequent cancers in Taiwan. The poor survival was due to lack of specific anti-cancer drugs. It is imperative to develop new drugs for efficient therapy. This study aims to screen rutaceous alkaloids with anti-tumor activity for HCC. Different concentrations of purified rutaceous alkaloid were added to hepatoma cells in culture to evaluate the anti-cancer activity. The following anti-cancer activities will be assessed in 60 kinds of purified rutaceous alkaloids: inhibition of hepatoma cell proliferation, inhibition of DNA synthesis, induction of apoptosis, inhibition of topoisomerase I activity, evaluation of necrosis by determining the level of lactate dehydrogenase in the culture medium, and determination of alpha-fetoprotein in the cultured medium. The results are as follows: Eight (13.3%) of 60 kinds of rutaceous alkaloid had inhibition on cell proliferation and DNA synthesis of hepatoma cells. The activity of inhibition correlates with alkaloid concentration. These alkaloids included Dictamine, g-fagarine, robustine, zanthosimuline, toddaquinoline, 2H-isoterihanine, toddaliamide and canthin-6-one. DNA fragmentation assay

indicated that these alkaloids had apoptosis phenomenon, but without causing immediated cell necrosis (as evidenced by normal LDH activity). There is no inhibitory activity on topoisomerase I, suggesting that apoptosis derived from mechanisms other than topoisomerase inhibition. In conclusion, this study indicated that some rutaneous alkaloids can cause apoptosis of hepatoma cells and without cytopathy. We suggest to screen other rutaceous alkaloids for anti-cancer activity of HCC . Moreover, toxicological study and clinical research about rutaceous alkaloids with apoptosis is necessary.

Key words: hepatocellular carcinoma, rutaceous alkaloid, apoptosis

壹、前言

肝細胞癌(以下簡稱肝癌)是全世界男性第七位、女性第九位最常見癌症[1,2]。在國內，自從民國七十年代以來，肝癌一直高居男性第一位、女性第三或第四位最常見癌症死因[3]。肝癌的治療，外科手術或肝臟移植仍是目前能夠根治肝癌的療法，但因百分之八十以上肝癌病人常合併肝硬化或慢性肝細胞疾病，或因腫瘤太大，或因腫瘤已合併其它器官轉移，手術切除率大多低於10-20%，術後5年存活率則介於20%至50%之間 [1,2]。即使是小於2公分的肝癌，成功的手術切除5年後，幾乎百分之百再發 [4]。因此，其他的治療方法，如冷凍手術、經皮酒精注射、放射線治療、免疫刺激治療、經導管肝動脈栓塞併化學藥物治療、荷爾蒙治療、基因治療等姑息性療法就成為目前最常被使用的非外科療法 [1,2,4]。

肝癌的化學治療藥物，包括 alkylating agents、抗腫瘤抗生素、植物生物鹼(plant alkaloids)、以及其它試劑如 platinum 衍生物、procabazine、及 emetine 等。這些藥物，不管是單獨使用，或合併療法，對肝癌的療效大多低於20% [1,2]。因此，單一化學藥物治療肝癌，效果不彰；多種藥物合併療法，效果也有限。

最近三十年來，運用現代化學與生物科技以從事天然植物抗癌

或防癌成分之研究雖已獲得相當輝煌之成果 [5-8]，但其臨床應用仍成效不大。對至於以中藥治療肝癌，目前中藥單一藥物治療肝癌，或中藥合併其它療法，效果不彰 [9]。因此，開發新的中藥來治療肝癌，就成為當務之急。另一方面，科學家希望找出或開發可以預防或終止癌化過程的天然的或合成的物質。例如食物中的蔬菜、水果，維生素A及其衍生物、維生素C、維生素E、 β -carotene、及retinoid等。這就是癌症的化學預防 (chemoprevention) [6]。肝癌的化學預防，臨床報告不多，似也略有成效 [10,11]。因此，從各種藥用植物篩選具抗肝癌或可做為肝癌的化學預防藥物之研究，便成為癌症醫學的一大重要領域。

根據文獻報告及我們自己的臨床經驗，西藥中的 doxorubicin 是被用來治療肝癌藥物中效果比較好的藥物 [1,2]。Doxorubicin 是一種拓撲酶 (topoisomerase) 抑制劑 [12]。因此，拓撲酶抑制劑在肝癌治療上擔當的角色，值得深入研究。Topoisomerase 在細胞染色體的複製、轉錄、以及去氧核糖核酸修復上扮演很重要角色。超螺旋去氧核糖核酸在進行複製時，須將互相纏繞的雙螺旋體結構拉開，才能繼續進行下去。這個工作就靠 topoisomerase 來完成。抑制 topoisomerase 的藥物，就是阻止斷裂口兩端的去氧核糖核酸連接，因而不能恢復原來的雙螺旋體去氧核糖核酸。結果使得去氧核糖核酸複製失敗，終將導致細胞死亡。

甲型胎兒蛋白 (α -fetoprotein; AFP) 是肝癌細胞產生的一種蛋白質，有促進肝癌細胞生長的作用。能分泌甲型胎兒蛋白的肝癌細胞株，受到抑癌物質作用時，甲型胎兒蛋白的濃度也會下降，且與抑癌物質濃度有劑量相關，因此，甲型胎兒蛋白的濃度也可做肝癌細胞為生長的一種指標。

肝癌組織的生長調控，取決於癌細胞之細胞增生能力強弱與癌細胞破壞間之平衡。前者可藉細胞增生實驗 (cell proliferation assay) 及去氧核糖核酸合成實驗 (DNA synthesis assay) 來評估。至於癌細胞破壞可經由壞死 (necrosis) 及預設性細胞死亡 (apoptosis) 來評估。本研究的目的，就是要篩選出具治療肝癌潛力的芸香科生物鹼，以便進一步作其毒理研究與臨床試驗，以決定其成為抗癌新藥之可能性。

貳、材料與方法：

一、純化之芸香科(Rutaceae)生物鹼共60種(由陳益昇教授提供)：

(一) *Zanthoxylum schinifolium* (2種)

dictamnine, skimmianine

(二) *Zanthoxylum simulans* (12種)

γ -fagarine, robustine, 4-methoxy-1-methyl-2-quinolone, zanthosimuline, simulanoquinoline, N-acetylanonaine, N-acetylnornuciferine, chelerythrine Cl, 2H-chelerythrine, 6-acetonyl dihydrochelerythrine, zanthobungeanine, edulitine

(三) *Toddalin asiatica* (12種)

haplopine, toddaquinoline, toddaliamide, N', N',-dicyclohexylamide, N', N'-dicyclohexylurea, cyclohexylamine, norchelerythrine, oxychelerythrine, bocconoline, oxynitidine, oxyavicine, 2H-nitidine

(四) *Melicope semecarpifolia* (4種)

confusameline, kokusaginine, evomerrine, heliparvifoline

(五) *Zanthoxylum integrifoliolum* (19種)

platydesmine, integriamide, 4H-berberine, integriquinolone, arnottianamide, decarine, nitidine Cl, avicine Cl, 2H-avicine, 6-methoxychelerythrine, chelerythrine pseudocyanide, α -allocryptopine, pseudoprotopine, canthin-6-one, atanine, γ -sanshool, hydroxy- γ -sanshool, rutaecarpine, 14-formyldihydrorutaecarpine

(六) synthetic rutaceous alkaloids (11種)

2H-isoterihanine, N-methyl decarine Cl, isoterihanine, fagaronine Cl, terihanine Cl, isopropylfagaronine Cl, isopropylisoterihanine Cl, isopropylterihanine Cl, 2H-terihanine, tetramethoxybenzo[c]phenanthridinium Cl, 2H-tetramethoxybenzo[c]phenanthridine

二、細胞株: Hep3B

三、方法

(一)、細胞培養

所有細胞均培養於含10%胎牛血清 (fetal calf serum; FCS)的MEM (minimal essential medium) 培養基中，並培養於37℃，含5% CO₂培養箱中。

(二)、去氧核糖核酸合成實驗 (DNA synthesis assay)

利用 DNA synthesis assay，能夠看出各生物鹼對肝癌細胞去氧核糖核酸合成有沒有抑制作用。詳細步驟如下：24孔細胞培養盤中，各種入 20×10^4 個細胞於1 ml 含10%胎牛血清 (fetal calf serum; FCS)的培養液中培養24小時後，再換成含1%胎牛血清培養液培養72小時。細胞以磷酸緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)清洗兩次，換成不含胎牛血清培養液繼續培養24小時。再加入不同濃度 (0, 0.05, 0.5, 5, 50, 及500 nm)之純化生物鹼溶液(溶於100% DMSO)。繼續培養24小時後，各加入2 μ Ci/ml 氚標幟胸腺嘧啶(³H-thymidine)，於37℃繼續培養4小時後，吸除培養液，並以4℃磷酸緩衝液 (內含1 μ g/ml thymidine) 清洗兩次，溶於0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 37℃作用30分鐘。取800 μ l 細胞溶出液，加入100 μ l 5% trichloroacetic acid，利用Whatman濾紙過濾以收集沉澱物。濾紙乾後，利用貝他計測儀 (β -counter) 來偵測放射性強度。每一生物鹼濃度都同時測定三次，取其平均值做為結果之判定。

(三)、細胞增生實驗 (cell proliferation assay)

利用 cell proliferation assay，能夠看出各生物鹼對肝癌細胞增生有沒有抑制作用。詳細步驟如下：在6孔細胞培養盤中，各種入 10×10^4 個細胞於1 ml 含10%胎牛血清(FCS)的培養液中培養24小時後，細胞以磷酸緩衝液(PBS)清洗兩次，換成不含胎牛血清培養液繼續培養24小時。再加入不同濃度(0, 0.05, 0.5, 5, 50, 及500 nm/ml)之純

化生物鹼溶液，繼續培養72小時(培養液在48小時後更換一次)，再以 trypan blue exclusion test 的方法計算存活及死亡之細胞數。每一生物鹼濃度都同時測定三次，取其平均值做為結果之判定。

(四)、去氧核糖核酸裂解實驗 (DNA fragmentation assay)

利用 DNA fragmentation assay，能夠看出各生物鹼是否可使肝癌細胞發生預設性細胞死亡 (apoptosis)。詳細步驟如下：細胞培養於75 ml 培養瓶中，先使用含10%胎牛血清(FCS)的養液，待細胞快長滿時，細胞以磷酸緩衝液(PBS)清洗兩次，換成不含胎牛血清培養液。接著加入各種純化生物鹼溶液。繼續培養32小時後，漂浮的細胞以離心沉澱，而附著的細胞以括勺括下，混合收集以上細胞。將細胞溶於4% formaldehyde/PBS，使

每 ml 含 100×10^4 個細胞，在室溫作用10分鐘。細胞以離心沉澱，將細胞溶於80%乙醇，使每 ml 含 100×10^4 個細胞。再將300 μ l 被固定的細胞置於載玻片上。以下步驟則依去氧核糖核酸裂解試劑組 (DNA fragmentation detection kit; Oncogene Science, USA)操作說明。

(五)、去氧核糖核酸(DNA)萃取及洋菜膠水平電泳分析(agarose gel horizontal electrophoresis)

細胞培養於75 ml培養瓶中，先使用含10%胎牛血清的培養液，待細胞快長滿時，細胞以磷酸緩衝液清洗兩次，換成不含胎牛血清培養液。接著加入各種純化生物鹼溶液。繼續培養32小時後，漂浮的細胞以離心沉澱，而附著的細胞以括勺括下，混合收集以上細胞。再以 trypan blue exclusion test 的方法計算存活及死亡之細胞數目。計算死亡細胞的比例後，加入溶解細胞的緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1 M EDTA, 1% SDS, 500 ug/ml proteinase K) 以分解細胞，37℃作用4小時後，去氧核糖核酸以同體積經水飽和的 phenol/chloroform (1:1)及chloroform/isoamyl alcohol (24:1)各萃取一次，收集水層部份加入2.5倍體積的酒精(內含0.3 M sodium acetate)來沉澱去氧核糖核酸。接著，在4℃下，離心 12000 g 20分鐘，收集乾

燥去氧核糖核酸。再以 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA) 溶解。去氧核糖核酸溶液加 50 ug/ml Rnase A 於 30°C 處理 1 小時，再加入 50 ug/ml proteinase K 於 50°C 處理 3 小時，再次萃取去氧核糖核酸。然後以 1.2% 洋菜膠在 TE buffer (90 mM Tris-HCl, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0) 中進行水平電泳分析。去氧核糖核酸以 0.5 ug/ml ethidium bromide 染色，並於紫外燈下觀察照相。

(六)、利用 Flow cytometry 做細胞週期分析

在 6 孔細胞培養盤中，各種入 10×10^4 個細胞於 1 ml 含 10% 胎牛血清的培養液中培養 24 小時後，細胞以磷酸緩衝液清洗兩次，換成不含胎牛血清培養液繼續培養 24 小時。再加入不同濃度 (0, 0.05, 0.5, 5, 50, 及 500 m/ml) 之純化生物鹼溶液，繼續培養 72 小時 (培養液在 48 小時後更換一次)。將細胞以 trypsin/EDTA 緩衝液溶下，細胞以磷酸緩衝液清洗兩次，再加入磷酸緩衝液，使細胞濃度成約 10^6 cells/ml。將細胞放在 1.5 ml 微離心管中以含有 70% 乙醇的磷酸緩衝液固定 (冰溫下，30 分鐘)。接著，735 xg 離心 3 分鐘。倒掉上清液，細胞以磷酸緩衝液清洗。再如上述離心一次後，倒掉上清液再加入含有 40 ug/ml propidium iodide, 0.1 mg/ml Rnase 的磷酸緩衝液，使固定後的細胞懸浮在此溶液中，37°C 作用 30 分鐘。再以 FACScan TM flow cytometer (Becton-Dickinson, USA) 做細胞週期分析。

(七)、第一型拓撲酶活性抑制能力的測定 (Determination of topoisomerase I inhibitory activity) [7]

取 40.5 ul 之緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA)，加入 0.25 ug pBR322 DNA, 0.5 ul 之純化生物鹼 (溶於 100% DMSO 中)，再加入 3 unit topoisomerase I，在 37°C 作用 30 分鐘。接著，加入 5 ul 11% SDS (溶於 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 中) 以停止反應，並隨即加入 2.5 ul Proteinase K (25 mg 溶於 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol 中)，在 37°C 作用 30 分鐘。然後以 1.2% 洋菜膠進行水平電泳分析。去氧核糖核酸以 0.5 ug/ml ethidium bromide 染色，並於紫外燈下觀察

照相。照相時選用拍立得665之底片，快門選用B，光圈4.5，時間2分鐘。將底片浸於40g/500 ml之亞硫酸鈉水溶液中，除去藥劑，烘乾，並以定性與定量之。純化生物鹼抑制 topoisomerase I活性的測定，依下式計算：

酵素殘存活性 (%) = 100 % - [(實驗組在洋菜膠上 supercoil form 所佔百分比) - (對照組在洋菜膠上 relaxed form 所佔百分比)]%
抑制 topoisomerase I能力以 IC₅₀ (50% inhibitory concentration) 表示。

(八)、甲型胎兒蛋白(α -fetoprotein; AFP)測定

在24孔細胞培養盤中，各種入 10×10^4 個細胞於1 ml 含10%胎牛血清的培養液中培養24小時後，細胞以磷酸緩衝液清洗兩次，換成不含胎牛血清培養液繼續培養24小時。再加入不同濃度(0, 0.05, 0.5, 5, 50, 及500 nm/ml)之純化生物鹼溶液，繼續培養72小時(培養液在48小時後更換一次)。利用放射免疫分析法(α -feto RIA BEAD; Abbott, Chicago, IL, USA)測定培養基中的甲型胎兒蛋白。

(九)、Lactate dehydrogenase (LDH)測定

若生物鹼對肝癌細胞有細胞毒性(cytopathy)，肝癌細胞會necrosis而釋出LDH。方法如下：在24孔細胞培養盤中，各種入 10×10^4 個細胞於1 ml 含10%胎牛血清(FCS)的培養液中培養24小時後，細胞以磷酸緩衝液(PBS)清洗兩次，換成不含胎牛血清培養液繼續培養24小時。再加入不同濃度(0, 0.05, 0.5, 5, 50, 及500 nm/ml)之純化生物鹼溶液，繼續培養72小時(培養液在48小時後更換一次)。利用LDH試劑組測定培養基中的LDH。

參、結果

一、細胞增生實驗 (cell proliferation assay)

利用 cell proliferation assay，能夠看出各生物鹼對肝癌細胞增生有沒有抑制作用。結果如圖一所示，只有 Dictamine、 γ -fagarine、

robustine、zanthosimuline、toddaquinoline、2H-isoterihanine、toddaliamide、及 canthin-6-one 對肝癌細胞增生有抑制作用。對肝癌細胞增生抑制作用與生物鹼濃度成正比。

二、去氧核糖核酸合成實驗 (DNA synthesis assay)

利用 DNA synthesis assay，能夠看出各生物鹼對肝癌細胞去氧核糖核酸合成有沒有抑制作用。利用 Hep3B 加入不同濃度之純化生物鹼(共60種)，結果顯示有些芸香科生物鹼能抑制肝癌細胞去氧核糖核酸合成(圖二及圖三)。當培養基中加入胎牛血清時(圖二)抑制肝癌細胞去氧核糖核酸合成較不加入胎牛血清時(圖三)抑制肝癌細胞去氧核糖核酸合成為差。對肝癌細胞去氧核糖核酸合成抑制作用與生物鹼濃度成正比。每一生物鹼濃度都同時測定三次(triplicate)，取其平均值做為結果之判定。

三、去氧核糖核酸(DNA)萃取及洋菜膠水平電泳分析(agarose gel horizontal electrophoresis)

利用 Hep3B 加入不同濃度之純化植物成分(共60種)，細胞培養後，去氧核糖核酸萃取及洋菜膠水平電泳分析，結果顯示 Dictamine、 γ -fagarine、robustine、zanthosimuline、toddaquinoline、2H-isoterihanine、toddaliamide、及 canthin-6-one 能使肝癌細胞去氧核糖核酸產生裂解(DNA fragmentation)現象(圖四)。

四、去氧核糖核酸裂解實驗 (DNA fragmentation assay)

由於置於載玻片上的固定的肝癌細胞量不夠，去氧核糖核酸裂解實驗的結果不佳。

五、利用 Flow cytometry 做細胞週期分析

結果如圖五所示。Dictamine、 γ -fagarine、robustine、zanthosimuline、toddaquinoline、2H-isoterihanine、toddaliamide、及 canthin-6-one 雖能使肝癌細胞去氧核糖核酸產生裂解(DNA fragmentation)(圖四)，但在 Flow cytometry 上，雖然 G0/G1 peak 較對

照組(不加生物鹼)為低，但sub G0/G1 peak 並不明顯。

六、第一型拓撲酶活性抑制能力的測定

所有60種芸香科生物鹼均無抑制第一型拓撲酶活性能力(圖六)。

七、甲型胎兒蛋白(α -fetoprotein; AFP)測定

Hep3B 加入生物鹼前後甲型胎兒蛋白濃度都 <20 ng/ml。

八、Lactate dehydrogenase (LDH)測定

Hep3B 加入生物鹼前後LDH濃度無差異。

肆、討論

本研究發現60種純化之芸香科生物鹼中，Dictamine、 γ -fagarine、robustine、zanthosimuline、toddaquinoline、2H-isoterihanine、toddaliamide、及canthin-6-one等8種(13.3%)生物鹼對肝癌細胞增生有抑制作用(圖一)、對肝癌細胞去氧核糖核酸合成有抑制作用(圖二及圖三)，這些抑制作用與生物鹼濃度成正比。且能使肝癌細胞去氧核糖核酸產生裂解(DNA fragmentation)現象(圖四)。肝癌細胞加入生物鹼前後LDH濃度無差異，表示這8種生物鹼只會讓肝癌細胞發生apoptosis(預設性細胞死亡)，而不會讓肝癌細胞發生急性細胞毒性(cytopathy)，產生壞死(necrosis)。但因所有芸香科生物鹼均無抑制第一型拓撲酶活性能力，表示apoptosis基轉與第一型拓撲酶無關，確實基轉有待進一步探討。這八種生物鹼彼此兼並無構造活性關係(structure activity relationship)。

對於能造成apoptosis的芸香科生物鹼，值得進一步作其毒理研究與臨床試驗，以決定其成為抗癌新藥之可能性。其理如下：

影響癌組織的生長調控因子雖多，總不外取決於癌細胞之細胞增生能力強弱與癌細胞破壞間之平衡[13]。癌細胞破壞可經由壞死(necrosis)及apoptosis(預設性細胞死亡)兩種途徑。細胞壞死常由於環境因素(如創傷或疾病導至血液循環喪失)引起，細胞曝露於非生理狀

態所致，通常會造成一群細胞死亡。Apoptosis 雖然也是一種細胞死亡現象，但確源自細胞內源性的機轉，通常只會造成散在性細胞死亡。它的最明顯特徵是細胞死亡時，會自動活化細胞核內一種特殊的核酸分解酶(endonuclease)，作用於細胞核的 internucleosome 部位，將去氧核糖核酸裂解 (DNA fragmentation)，成為約含180 - 200 鹼基的去氧核糖核酸片斷。同時也出現細胞質萎縮及染色體變得較緻密 (chromatin condensation)等現象。Apoptosis 可認為是細胞內源性的自殺程式被啟動所造成，故又稱為預設性細胞死亡(programmed cell death)。通常藉細胞內某些基因的表現引導細胞死亡，此為正常細胞在細胞週期的調控方式。近年來，發現肝癌細胞也有 apoptosis 現象 [14-17]。因此，如果能發展出促進肝癌細胞 apoptosis 的方法，或者是抑制肝癌細胞分裂的方法，或可提供對肝癌細胞較具選擇性，對人體傷害較小的治療方式。通常，癌前病灶的細胞 (如肝硬化) 或細胞增生快速的細胞比正常細胞對 apoptosis 的感受性強 [17]。如果能發展出促進癌前細胞 apoptosis 的方法，對肝硬化病人或可當做是肝癌的化學預防方法。中藥小柴胡湯對肝癌細胞的抗腫瘤作用，apoptosis 被認為是最重要的機轉 [18]。最近，日本的學者發現小柴胡湯所含的 baicalein，會強烈抑制三種肝癌細胞株肝癌細胞 topoisomerase II 活性及肝癌細胞增生。但只有一種肝癌細胞株肝癌細胞死亡是由於 baicalein 濃度增加導致 apoptosis，另二種肝癌細胞株肝癌細胞死亡是由於 baicalein 濃度增加導致細胞壞死引起 [16]。Soini 等學者的研究，發現若肝癌細胞細胞增生能力強但細胞壞死及 apoptosis 能力弱的肝癌病人，預後較差，存活率較短 [19]。利用測定肝癌病人肝癌細胞表面促進或抑制 apoptosis 物質的研究，Hamazaki 等學者認為 apoptosis 的誘發，或可用於肝癌的治療 [20]。Retinoid (一種抗氧化劑維他命)也是經由 apoptosis 機轉導致肝癌細胞株肝癌細胞死亡 [17]。Galle 等學者認為感染B型肝炎肝細胞之被 T 淋巴球破壞清除，也是經由 apoptosis 機轉 [21]。

伍、結論與建議

本研究發現13.3%純化之芸香科生物鹼(包括 Dictamine、 γ -fagarine、robustine、zanthosimuline、toddaquinoline、2H-isoterihanine、toddaliamide、及 canthin-6-one)對肝癌細胞增生及肝癌細胞去氧核糖核酸合成有抑制作用，這些抑制作用與生物鹼濃度成正比。且能使肝癌細胞去氧核糖核酸產生裂解現象。肝癌細胞加入生物鹼前後LDH濃度無差異，表示這8種生物鹼只會讓肝癌細胞發生apoptosis (預設性細胞死亡)，而不會讓肝癌細胞發生急性細胞毒性(cytopathy)，產生壞死(necrosis)。但因所有芸香科生物鹼均無抑制第一型拓撲酶活性能力，表示apoptosis基轉與第一型拓撲酶無關，確實基轉有待進一步探討。對於能造成apoptosis的芸香科生物鹼，值得進一步作其毒理研究與臨床試驗，以決定其成為抗癌新藥之可能性。

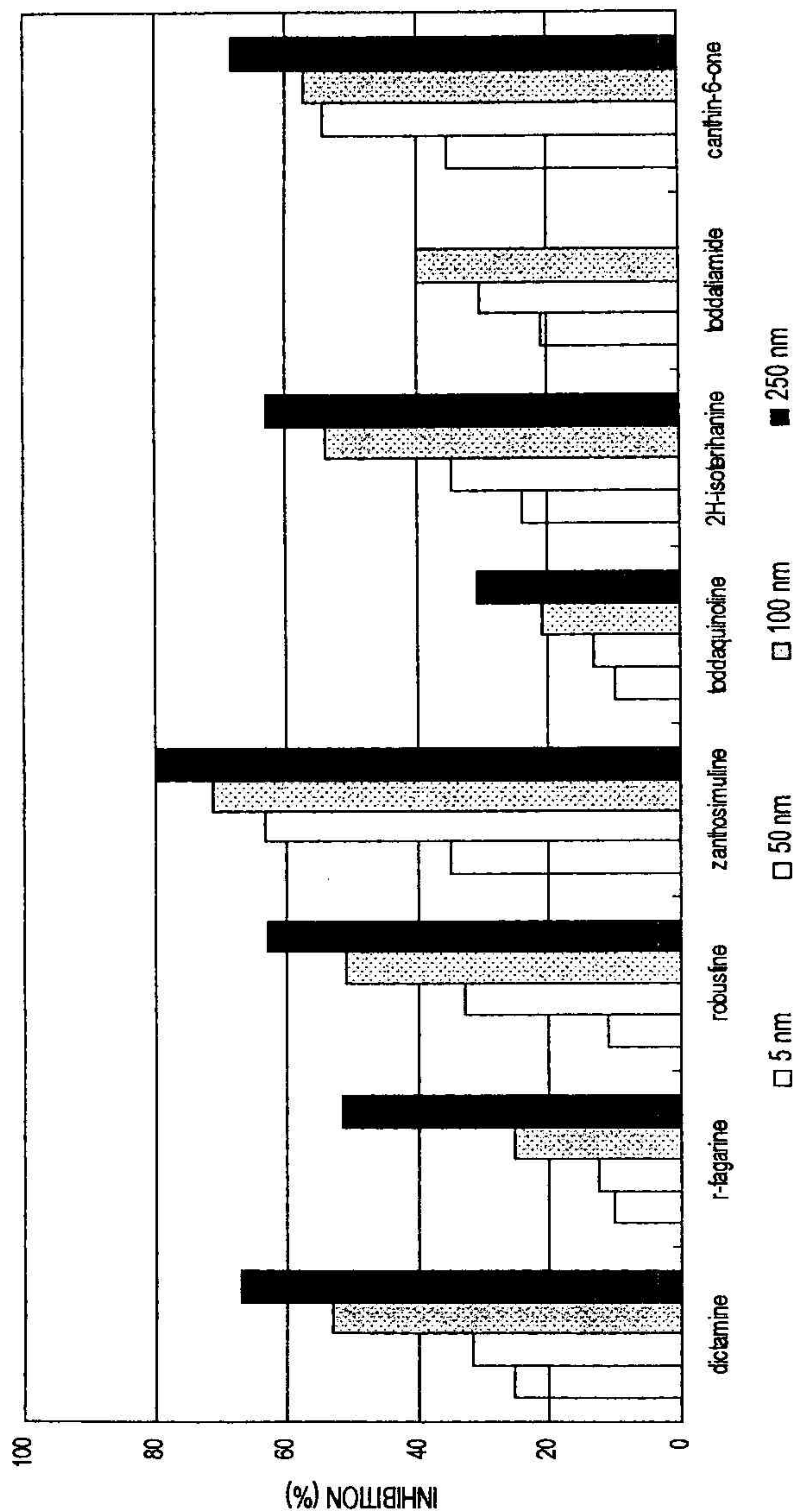
陸、參考文獻

1. Kew MC. Tumor of the liver. In: Zakim D, Boyer TD, eds. Hepatology: a textbook of liver disease. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996: 1513-47.
2. Fong Y, Blumgart LH : Surgical therapy of liver cancer. In: Zakim D, Boyer TD, eds. Hepatology: a textbook of liver disease. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996: 1548-64.
3. Department of Health, Executive Yuan, Republic of China: Health Statistics: Vital Statistics of the Republic of China. Taipei: Department of Health, ROC, 1994: 79-80.
4. Tanikawa K: Noninvasive treatment for hepatocellular carcinoma. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, eds. Viral hepatitis and liver disease. Tokyo: Springer-Verlag, 1994; 774-7.
5. Gerster H : Intermediate cancer biomarkers and their use in beta-

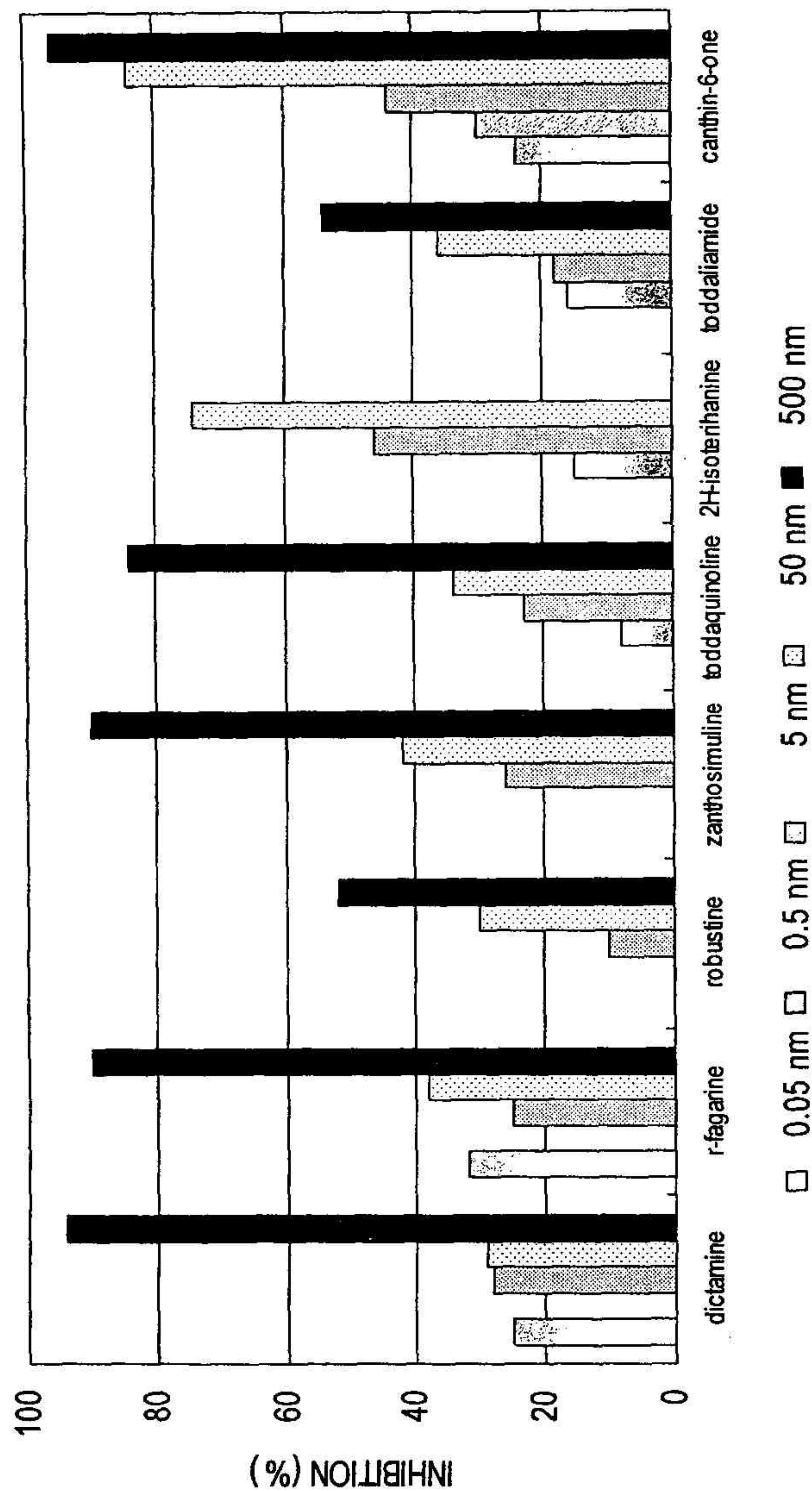
- carotene studies in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 1996;66:3-18.
6. Greenwald P: Chemoprevention of cancer. *Sci Am* 1996;275:96-9.
 7. 林榮耀，劉昭麟：抗癌中藥之研究(I)：中藥對拓撲酶活性抑制之分析。中醫藥年報，中華民國行政院衛生署中醫藥委員會編印。1996:235-47.
 8. 劉宗榮：評估中藥中有化學預防肝癌成分之方法(一)。中醫藥年報，中華民國行政院衛生署中醫藥委員會編印。1996:277-95.
 9. Haranaka K, Sakurai A, Satomi N, Ono T, Haranaka R: Combination therapy with traditional Chinese medicines and *Streptococcus pyogenes* products (OK 432) for endogenous tumor necrosis factor therapy. A preliminary report. *Cancer Biother* 1995;10:131-8.
 10. Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, et al.: Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group *N Engl J Med* 1996;334:1561-7.
 11. Shafritz DA: Synthetic retinoids for the secondary prevention of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1996;334:1600-1.
 12. Hellman S, Vokes EE: Advanceing current treatment for cancer. *Sci Am* 1996;275:118-23.
 13. Reed JC: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
 14. Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ: The retinoblastoma gene product inhibits TGF-beta1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7 hepatoma cells. *Oncogene* 1996;12:1909-1919.
 15. Ho YS, Wang YJ, Lin JK : Induction of p53 and p21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells. *Mol Carcinog* 1996;16:20-31
 16. Matsuzaki Y, Kurokawa N, Terai S, et al.: Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer*

Res 1996;87:170-177.

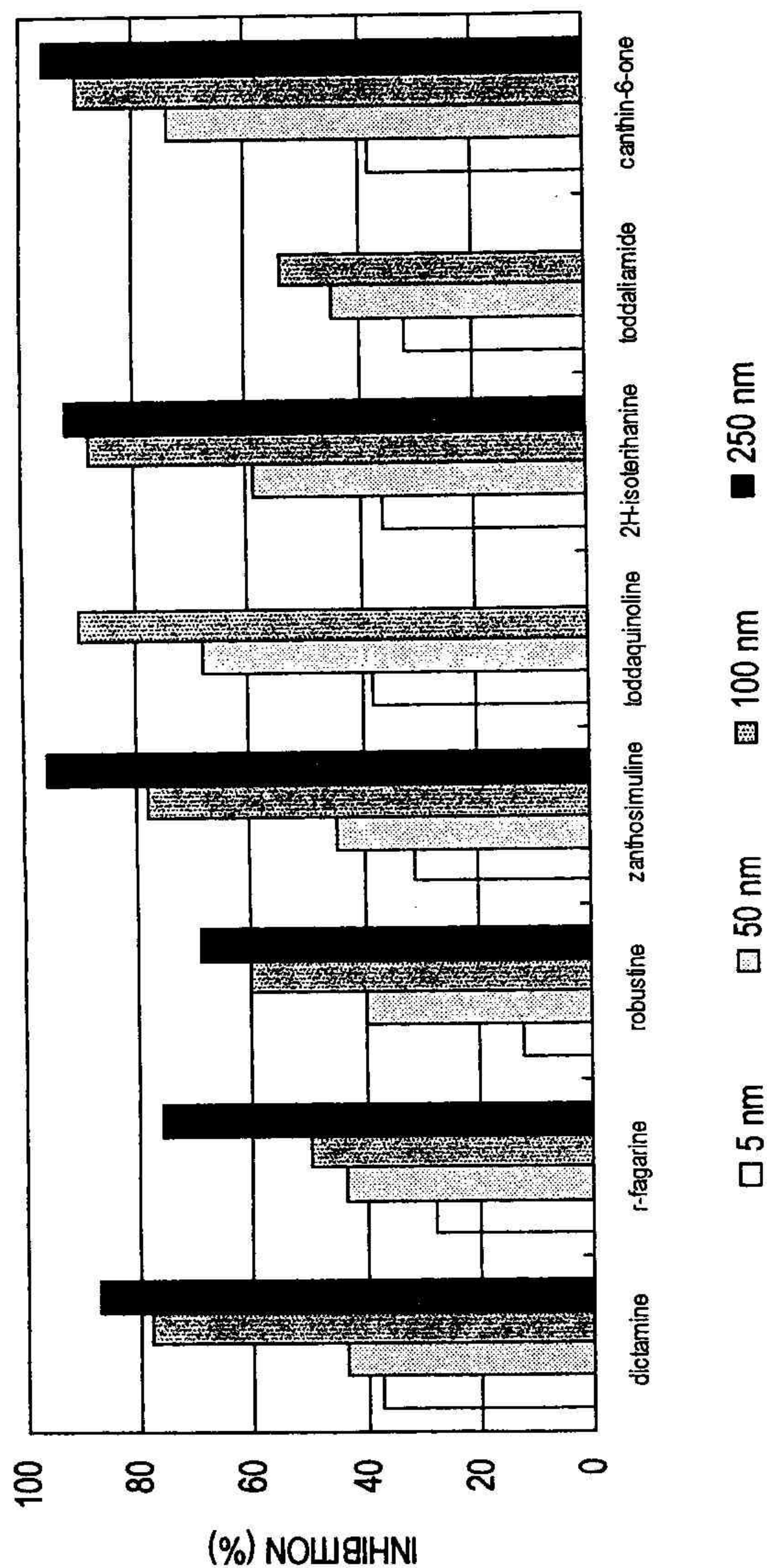
17. Nakamura N, Shidoji Y, Yamada Y, et al.: Induction of apoptosis by acyclic retinoid in the human hepatoma-derived cell line, HuH-7. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:382-8.
18. Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, et al.: The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res* 1994;54:448-54.
19. Soini Y, Virkajarvi N, Lehto VP, Paakko P: Hepatocellular carcinomas with a high proliferation index and a low degree of apoptosis and necrosis are associated with a shortened survival. *Br J Cancer* 1996;73:1025-30.
20. Hamazaki K, Gochi A, Matsubara N, Mori M, Orita K: Expression of Fas antigen and Bcl-2 protein in hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama* 1995;49:227-30.
21. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, et al.: Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995;182:1223-30.



圖一 芸香科生物鹼抑制肝癌細胞增生實驗。每一生物鹼濃度為三次實驗之平均值。



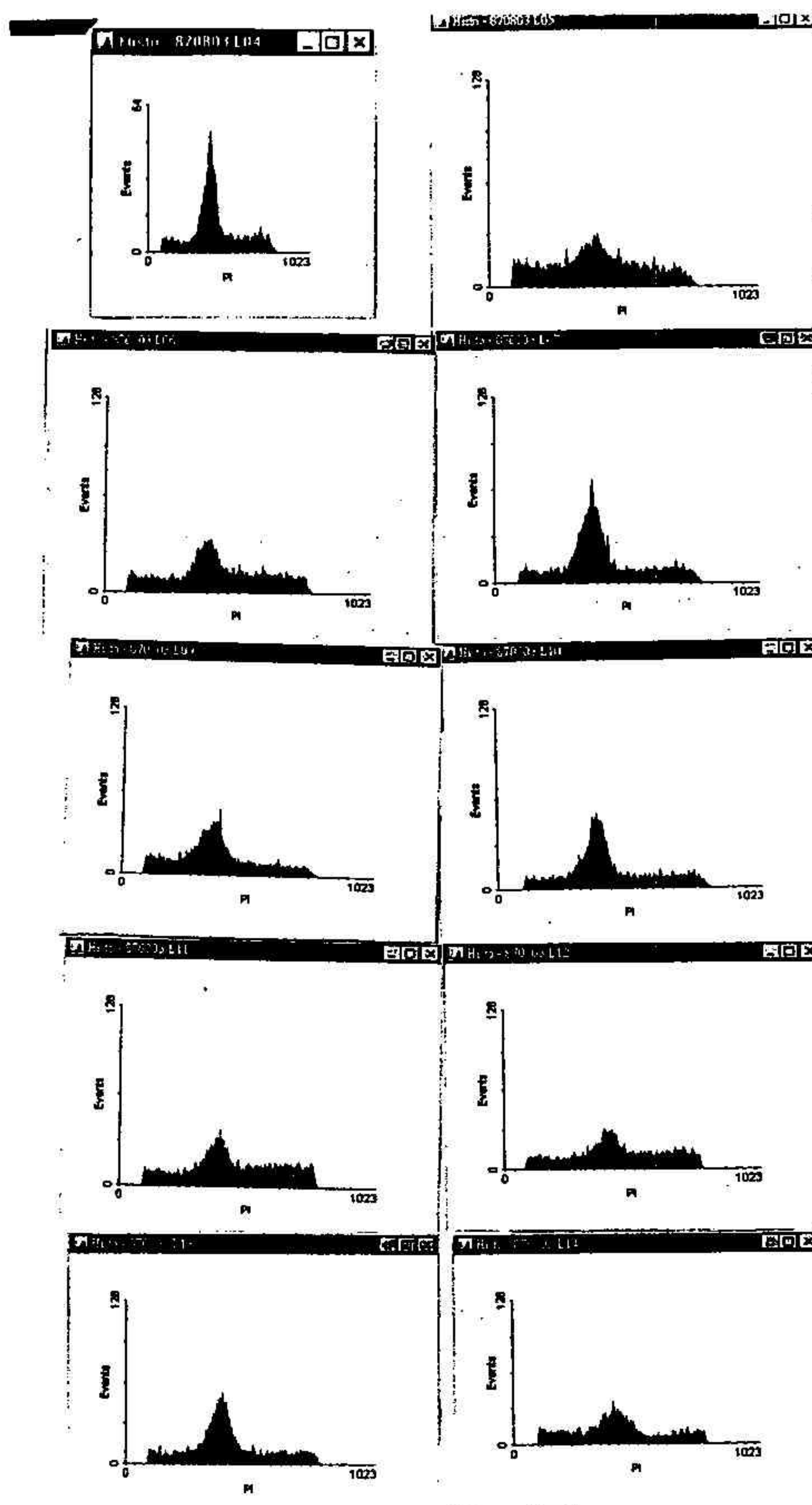
圖二 芸香科生物鹼抑制肝癌細胞去氧核醣核酸合成實驗。每一生物鹼濃度為三次實驗之平均值。生物鹼加入肝癌細胞時培養液加血清。



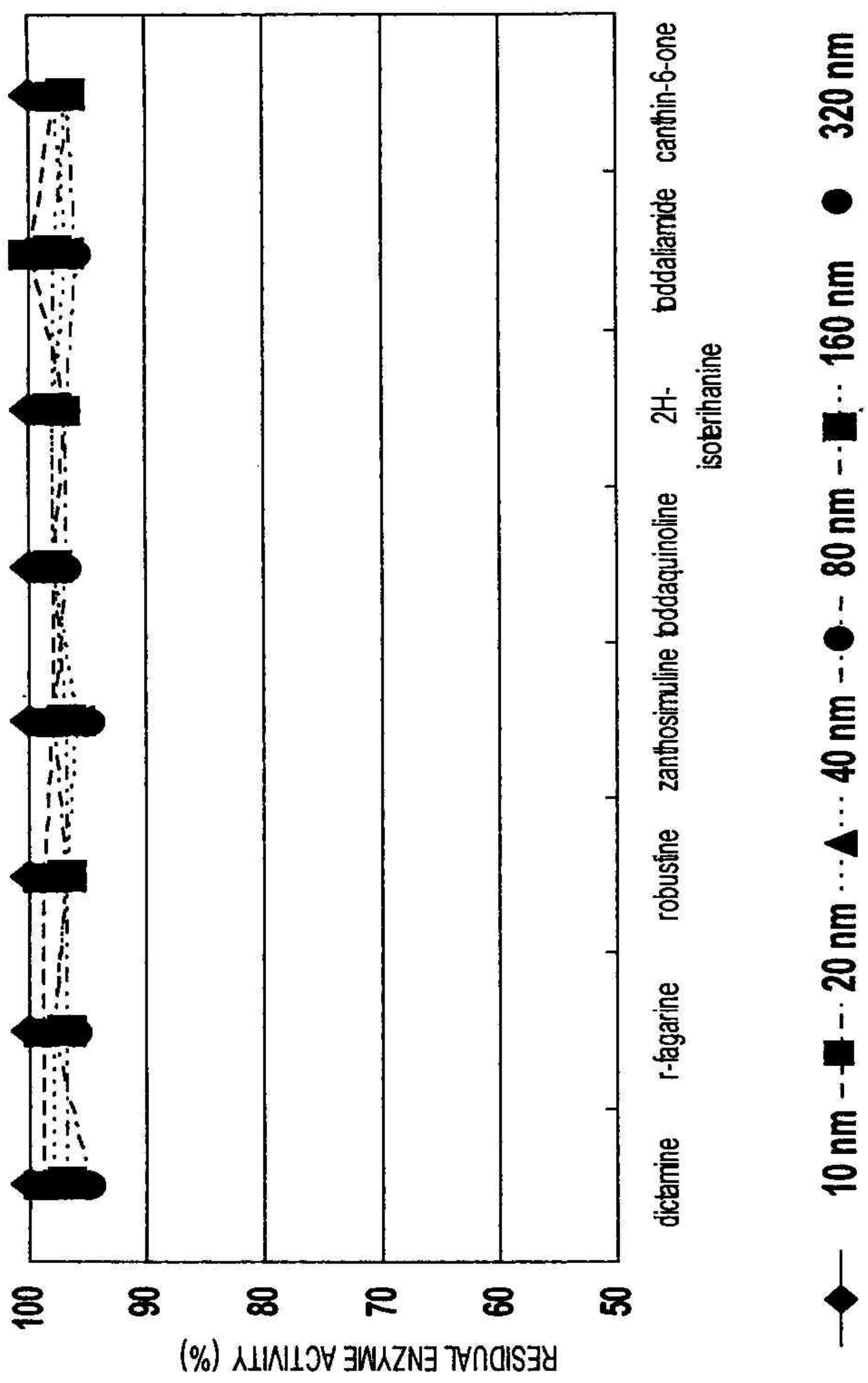
圖三 芸香科生物鹼抑制肝癌細胞去氧核糖核酸合成實驗。每一生物鹼濃度為三次實驗之平均值。生物鹼加入肝癌細胞時培養液不加血清。



圖四 洋菜膠水平電泳分析(agarose gel horizontal electrophoresis)測定肝癌細胞去氧核糖核酸裂解(DNA fragmentation)。Lane 1: 100 basepair DNA ladder (50 ug); Lane 2: control; Lane 3: dictamine (100 nmole); Lane 4: γ -fagarine (100 nmole); Lane 5: robustine (100 nmole); Lane 6: zanthosimuline (25 nmole); Lane 7: toddaquinoline (100 nmole); Lane 8: 2H-isoterihanine (25 nmole); Lane 9: toddaliamide (100 nmole); Lane 10: canthin-6-one (100 nmole); Lane 11: 100 basepair DNA ladder (300 ug)



圖五 利用 Flow cytometry 做細胞週期分析測定肝癌細胞去氧核糖核酸裂解(DNA fragmentation)。Left panel (from up to bottom): control, γ -fagarine (100 nmole), zanthosimuline (25 nmole), 2H-isoterihanine (25 nmole), toddaliamide (100 nmole). Rt panel (from up to bottom): dictamine (100 nmole), robustine (100 nmole), toddaquinoline (100 nmole), 2H-isoterihanine (50 nmole), canthin-6-one (100 nmole).



圖六 芸香科生物鹼對肝癌細胞第一型拓樸酶活性抑制能力的測定。
每一生物鹼濃度為三次實驗之平均值。

