

編號：CCMP96-RD-204

人類癌症基因體以驗證探討抗癌中草藥 子計畫一、中草藥調節生長因子及其接受器 基因對抗肝癌機制的探討(2-1)

吳永昌

高雄醫學大學

摘要

研究目的：

肝癌為國人男性癌症死因第一名，但大多數肝癌病人無法以外科手術治療，且對現有化學藥物之反應及預後均不理想。因此，研發新的抗肝癌藥物乃是醫藥界迫切的目標。中草藥的豐富性及悠久的學理基礎提供現代藥物研究者最好的寶庫。本群體計畫即根據歷代中藥典籍及臺灣常用藥用植物中選出 60 種中草藥單方及複方來進行抗肝癌研究。根據本計畫總主持人林榮耀院士的研究團隊先前研究顯示，有 67 種基因在肝癌細胞有異常表現。在本子計畫中，我們擬研究中草藥對肝癌細胞的生長抑制與毒殺作用，並針對其有效者，進一步分別就其分子機轉與動物癌症模式探討其抗癌作用。

研究方法：

以 MTT assay 與 clonogenic assay 測試這些中草藥萃取物對人類肝癌細胞株的毒殺及生長抑制作用。以 promoter-reporter assay 研究中草藥對癌症生長相關基因活化及表現的影響。並以 RT-qPCR 及 Western blot 等技術來進一步確認。最後以人類肝癌異體移植之裸鼠模式進行活體藥效實驗。

在過去 3 個多月的研究期間，我們分別以 MTT assay 與 clonogenic assay 完成 6 種中草藥複方對人類肝癌細胞株 HepG2 的細胞毒殺與生長抑制作用之研究。其中，大建中湯與小建中湯具有較佳之藥效。此外，我們正在測試這些中草藥方劑對 AP-1 與 NF-kB reporter gene 的活化是否抑制作用。同時也正著手進行 quinone reductase 誘導試驗，以測試中草藥的化學防癌活性。

結論：

大建中湯與小建中湯在體外試驗中，具有抗肝癌細胞增生的作用，其分子作用機轉則需進一步探討。

關鍵詞：肝癌、中草藥、基因體

Number: CCMP96-RD-204

Evidenced-base Studies on Anticancer of Chinese Herbs by Genomic Medicine-subproject 1, Studies on the Anticancer Activity of Chinese Herbs: Regulation of Growth Factors-related Genes (2-1)

Wu, Yang-Chang
Kaohsiung Medical University

ABSTRACT

Aim:

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies in Taiwan. Most patients with HCC are not eligible for surgery and insensitive to conventional chemotherapy. The traditional Chinese herbal formulations used for the treatment of liver diseases may provide a valuable resource for the discovery of novel therapeutics of HCC. In a preliminary study, Dr. Lin has identified 67 genes which are abnormally expressed in HCC. Based on the finding, we have selected 60 herbs and complex formulations from classical Chinese pharmacopoeia and Taiwanese herb books, and we are planning to test these herb extracts for their antitumor effects on human liver cancer cell lines and in cancer animal models.

Method:

The effects of herb extracts on cell proliferation and cytotoxicity were determined by MTT assay and clonogenic assay. We also examined the effects of herb extracts on the expression of genes which regulating cancer growth by using promoter-reporter technology, qRT-PCR, and Western blot. The *in vivo* antitumor activity of herb extracts was further determined in a human cancer xenograft-nude mouse model.

Results:

In the past 3 months, we have tested 6 Chinese herbal complex formulations for their cytotoxicity and anti-proliferative effect on the human liver cancer HepG2 cells. Among them, Da Jian Zhong Tang and Xiao Jian Zhong Tang exerted more potent antitumor effect in both MTT assay and clonogenic assay. We are also testing the

effects of these herbal complex formulations on the activation of AP-1 and NF- κ B reporter genes, and the induction of quinone reductase.

Conclusion:

Our data suggest that Da Jian Zhong Tang and Xiao Jian Zhong Tang exhibit in vitro antitumor activity; further investigation of the molecular mechanism of action is needed.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, Chinese herbs, genomics

壹、前言

肝癌是全世界最常見的腫瘤之一，也是近年來國人癌症死亡的第一位（男性：第一位；女性：第三或第四位）；臺灣每年約有 5000 人死於肝癌^[1]。現代醫學對於癌症的治療方式，主要以外科手術、放射線療法及化學藥物療法。手術切除是肝癌唯一根治性的治療，然而，大多數病人在疾病發現時，因為肝功能不佳，兩側肝葉疾病，或肝外轉移而無法切除（肝癌之整體“可切除率”僅 10-25%）。而無法以外科手術切除肝癌的患者對現有化學藥物治療的藥效反應及預後均不理想。因此，研發新的抗肝癌藥物乃是醫藥界迫切的目標^[2]。

中醫學在長期的臨床醫療中對慢性肝炎與肝癌的預防與治療積累了豐富的經驗，許多行之有效的防治方法至今仍有效的使用於臨床治療，針對西藥上的缺點，美國國家衛生院（National Institute of Health）於 1999 年八月於美國馬里蘭州舉辦「Complementary and Alternative Medicine in Chronic Liver Disease」會議，會中指出傳統醫學用藥對肝癌仍有相當大的拓展及輔助的空間。

天然藥物歷來即為新藥開發的主要來源，而中草藥的豐富性及悠久的學理基礎則更是提供現代藥物研究者最好的寶庫。由歷代中藥典籍及中搜尋資料，約記載 119 種單方及 22 種複方具有抗癌及保肝作用。進一步由「臺灣常用藥用植物圖鑑第一、二、三冊」，「原住民藥用植物圖鑑」（行政院中醫藥委員會著）以及「Oriental Material Medica」（許鴻源教授著）搜尋^[3-5]，則記載 141 種藥用植物具有抗癌及保肝作用。本群體計畫即根據上述中草藥先選出 60 種中草藥單方及複方來進行研究。在單味藥方面，計有當歸，白花舌蛇草，栝蒌根，半枝蓮，莪朮，長春花，牡丹皮，喜樹，蟾酥，臺灣粗榧（三尖杉），夏枯草，石上柏，靈芝，鴉膽子，山慈菇，延命草，苦參，狗舌草，黃芩，黃獨，人參，棉花根，鬱金，過路癩，黃耆，鐵線蓮，雞血藤，龍舌癩，五味子，八角蓮，紅花，細葉油柑，山梔子，細葉碎米蕨，荊三稜，劍葉鳳尾草，酸棗仁，鳳尾草，杜仲及馬齒莧；方劑方面則有散腫潰堅湯，血府逐瘀湯，當歸芍藥散，紫草根牡蠣湯，柴胡舒肝湯，芎歸艾膠湯，四逆散，香蘇散，黃連解毒湯，半夏厚朴湯，桃核承氣湯，柴胡加龍骨牡蠣湯，桂枝加龍骨牡蠣湯，桂枝加朮附湯，桂枝茯苓丸，四君子湯，六君子湯，大柴胡湯去大黃，小建中湯，大建中湯及加味逍遙散。

上述中草藥單方或複方劑，先前絕少以「基因體」及分子生物技術分析其抗癌療效。本計畫總主持人林榮耀院士的研究團隊先前研究顯示，利用 cDNA microarray 的技術，針對肝癌細胞及正常細胞的比對分析，已經鑑

定出 67 種基因在肝癌細胞有異常表現。其中，在生長因子及其接受器基因部分，計有 ERBB2, MET 及 IGF2 (insulin-like growth factor 2) 表現量上升，TNFSF 10 (tumor necrosis factor, member 10) 表現量則下降。根據過去相關的研究文獻，ERBB2 (Her2/neu) 為 EGF (epidermal growth factor) 的受體之一，並被認為是肝癌發生的重要因子^[6]。MET 為 HGF (hepatocyte growth factor) 的唯一高親和力受體，而 HGF 又是最強的肝癌生長因子^[7]。先前的研究顯示，MET 高度表現的肝癌病人，較易產生肝內轉移，且 5 年存活率較低^[8]；因此 MET 似乎是一個有潛力的藥物標靶。IGF2 則是另一種重要的肝癌生長因子，目前已知抑制 IGF2 可抑制肝癌細胞生長，引發細胞凋亡，並增加對化學療法的敏感性^[9]。因此本子計畫將聚焦在中草藥是否能調節這些失調的生長因子與接受器，並進而產生抑制肝癌細胞生長的作用。在致癌基因方面，RAS/RAF-1/ERK/MYC pathway 的活性在許多肝癌細胞均有異常升高的表現，因此提供肝癌細胞更高的 proliferation 能力及抑制 apoptosis 的作用。這些現象可能來自 RAS/RAF-1 的突變或表現量增加，另一方面也與前述生長因子受體活化上升有關，因為 RAS/RAF-1/ERK 即為生長因子受體的主要下游訊息分子。因此我們將針對這幾種 oncogenes，研究中草藥是否能調節其異常基因表現^[10, 11]。此外，NFκB 與 AP-1 為 2 個極為重要的 transcription factors，許多 growth factors 或 cytokines 的訊息傳遞路徑均會匯集於這兩者，因此它們與癌細胞的生長、存活、侵犯與轉移能力有極為密切的關係^[12-14]。利用 promoter-reporter 技術，我們可以測試中草藥對這兩種 transcription factors 的活化是否有抑制作用。

貳、材料與方法

一、藥品購買與製備

細胞培養液(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 麩氨酸(L-glutamine), 非必須氨基酸(nonessential amino acid mixture, NEAA), 盤尼西林(penicillin), 鏈黴素(streptomycin) and amphotericin B 由 Gibco BRL 公司購得。Tris, EDTA, Triton X-100, propidium iodide (PI), DAPI, ferulic acid 由 Sigma 公司購得。Protease inhibitor cocktail 由 Roche (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) 公司購得。

中草藥萃取液之製備：中草藥之單方及複方之萃取液將由 GMP 藥廠供應。其方法為將各種藥材或方劑(200g), 用一公升的沸水煮沸達二小時然後過濾, 如此重複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, 且置於為電腦除濕保管箱, 已備每次實驗所需。如有活性成分, 不溶於 100°C 水者, 可考慮改用 70% 酒精抽取。

二、細胞株

人類肝癌細胞株(HepG2)由食品工業發展研究所購得(BCRC in Taiwan)。

三、細胞毒性及細胞生長抑制作用分析

(一) MTT assay:

先將肝癌細胞培養於 DMEM 培養液中, 其中含 10 % 胎牛血清 (FBS) 及含 100 units/ml penicillin 和 100µg/ml streptomycin, 長至培養瓶單層長滿 (confluent)時, medium 以二至五滴的 trypsin 於 37°C 中作用 2~3 分鐘, 分離出癌細胞, 經染色並置於顯微鏡下計數細胞數目, 取適量細胞置入 96 well 的培養盤 (culture plate)中, 於 95% O₂、5% CO₂ 之培養箱中培養 24 小時後, 再加入不同濃度之藥物處理 24 小時。之後將舊 medium 吸掉, 將 100 µl 含 MTT 之 medium (1: 9, final conc. 0.5 mg/ml, 不含 FBS)加入各 well, 在上述環境繼續培養 1 hrs 後吸掉 medium, 加入 100 µl DMSO, shake 使結晶完全溶解, 以 EIA reader 測定其在 540 nm 的吸光度。其 IC₅₀ (50% Inhibition Concentration)即代表藥物能抑制 50% 癌細胞生長之毒殺濃度。

(二) Clonogenic Assay:

培養並製備 HepG2 細胞懸浮液, 以每孔 1000 個細胞的數量加入 6 孔盤中, 並加入中草藥萃取物, 於 95% O₂、5% CO₂ 之培養箱中培養 14 天。之後, 去除培養液, 加入染色劑(含有 5% crystal violet

及 50%酒精)將細胞固定並染色。隨即於計算每孔中形成癌細胞聚落數目。

四、Promoter-Reporter assay

- (一) 細製備肝癌相關生長因子或接受器的 promotor-reporter gene，如 NF-kB luciferase reporter 與 AP-1 luciferase reporter。
- (二) 將上述 promotor-reporter gene 轉殖到肝癌細胞株，再以中草藥萃取物（濃度將以該萃取物之 IC_{50} 為基準）測試其對特定 promotor-reporter gene 的影響。如證明有抑制或提升之表現，再以 qRT-PCR 及 Western blot 確定其作用。

參、結果

一、細胞毒性及細胞生長抑制

在 MTT assay 中，我們分別就四君子湯，六君子湯，加味逍遙散，大柴胡湯去大黃，大建中湯與小建中湯對人類肝癌細胞 HepG2 的細胞毒性進行測試。如圖 1-3 顯示，6 個複方劑以濃度相關的方式抑制 HepG2 的細胞存活率，在 10 mg/ml 的濃度下，抑制比率分別為：35, 37, 30, 34, 46, 46 %。其中以大建中湯與小建中湯整體抑制效果較佳。

由於在 MTT assay 中，藥物處理時間僅有 3 天，無法偵測到藥物長時間的作用，因此對於藥效較弱或較晚產生效用的中草藥來說，可能無法適當評估其抗癌細胞生長作用。有鑑於此，我們同時採用 clonogenic assay 的方法，將 HepG2 以低密度種植在培養盤中，長時間(14 天)觀測 HepG2 細胞複製形成聚落(colony)，並評估在中草藥存在下，對癌細胞增生的抑制作用。如圖 4-6 所示，四君子湯，六君子湯，加味逍遙散，大柴胡湯去大黃，大建中湯與小建中湯均能明顯減低 HepG2 細胞聚落數目，其中又以大柴胡湯去大黃，大建中湯與小建中湯效果最為明顯，在 10 mg/ml 的濃度下，這三種複方藥劑均完全抑制 HepG2 細胞聚落形成；且即使將藥物濃度降低至 2.5 mg/ml，也可抑制細胞聚落數目 90%。

二、對細胞生長相關基因調控之影響

我們利用基因轉殖的方式將 NF- κ B promoter reporter gene 及 AP-1 promoter reporter gene 分別轉殖進入 HepG2 細胞。在此系統之下，當 NF- κ B 或 AP-1 活化時，可啟動相對應之 promoter reporter gene，產生 luciferase；當加入 luciferin 作為受質後，即可發生冷光。我們已完成小建中湯對 NF- κ B promoter reporter gene 的實驗，但並未發現明顯抑制作用。目前正繼續進行 AP-1 promoter reporter gene 的實驗。

肆、討論

在本階段研究中，我們測試了六種中草藥複方（四君子湯，六君子湯，加味逍遙散，大柴胡湯去大黃，大建中湯與小建中湯）對人類肝癌細胞 HepG2 的細胞毒性及生長抑制作用。在 MTT assay 中，雖然六種方劑在 10 mg/ml 的濃度下對 HepG2 的細胞存活率有 30-50% 的抑制，但其藥效(efficacy)及效價(potency)並不高。因此，我們同時以 clonogenic assay 來評估這些中草藥方劑的抗癌細胞增生作用，在這個方法中，我們可以長時間(14 天)以藥物處理肝癌細胞，所以能評估藥物的長期作用。結果顯示，在 clonogenic assay 中，所有受測的中草藥方劑的抑癌效果均較 MTT assay 為強，證實 clonogenic assay 較能評估出中草藥潛在的抗癌作用。

另外在癌症生長相關基因的測試中，我們已選定 AP-1 與 NF-kB 為先期的主要標的，因為這兩種 transcription factors 在癌細胞生長、存活、侵犯與轉移的相關基因表現與訊息傳遞網絡中扮演中心角色。因此我們已建立好 AP-1 luciferase reporter plasmid 與 NF-kB luciferase reporter plasmid，並成功在 HepG2 細胞中轉殖表現。目前正積極測試中草藥在此系統中，對 AP-1 與 NF-kB 的活化是否有抑制作用。如果受測藥物可抑制這兩者的活化，我們可進一步探討其抑制機轉。

由於許多中草藥對癌細胞的直接毒殺或生長抑制作用並不強，但或許這些藥物具有其它間接作用可以防治癌症。因此我們想開發第二項研究主題，探討中草藥是否具有化學防癌作用(chemoprevention)。目前已知許多天然物，包括蔬菜與水果的成分，可藉由誘發與提高動物體內 phase II 代謝酵素，使有毒物質，例如自由基與親核性化合物，進行減毒代謝而產生化學防癌的效果^[15,16]。在 phase II 代謝酵素中，quinone reductase 是被研究最多的酵素；也有實驗證據顯示，藥物誘發 quinone reductase 的作用與其化學防癌的能力有關，因此 quinone reductase 可作為化學防癌的生物指標(biomarker)^[17]。目前我們正積極建立 quinone reductase 的分析模式，一旦完成，便可以測試中草藥的化學防癌作用。

伍、結論與建議

在本階段的計畫中，我們分別以 MTT assay 與 clonogenic assay 完成 6 種中草藥複方對人類肝癌細胞株 HepG2 的細胞毒殺與生長抑制作用之研究。其中，大建中湯與小建中湯具有較佳之藥效。同時我們也正著手進行測試這些中草藥方劑對 AP-1 與 NF-kB reporter gene 的活化是否具有抑制作用。此外，我們積極建立以 quinone reductase 誘導為生物標記的化學防癌作用篩選方法，並測試中草藥是否具備這項特性；這將有助於研發除了癌細胞毒殺以外的抗癌策略。

誌謝

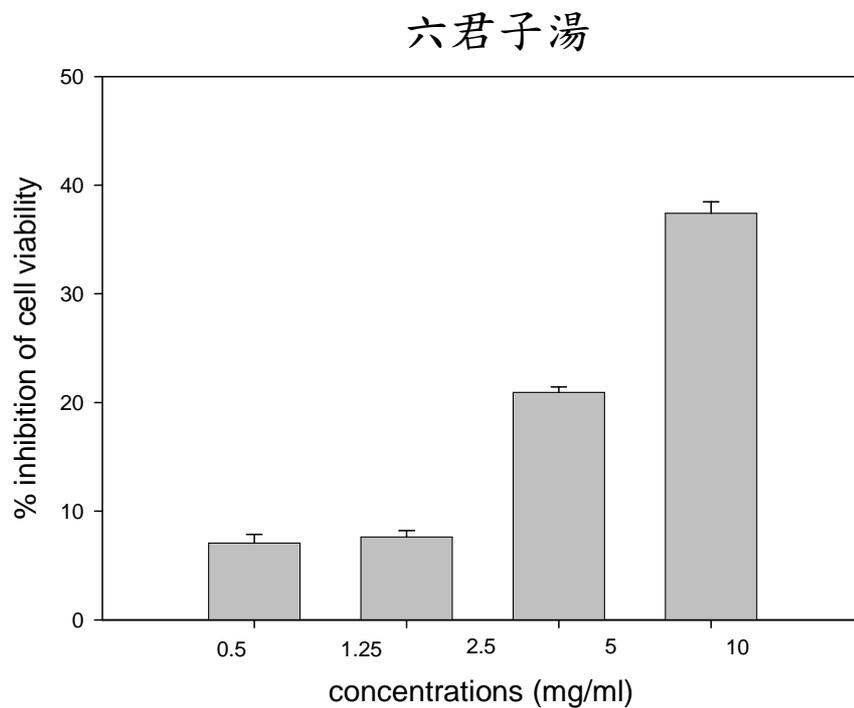
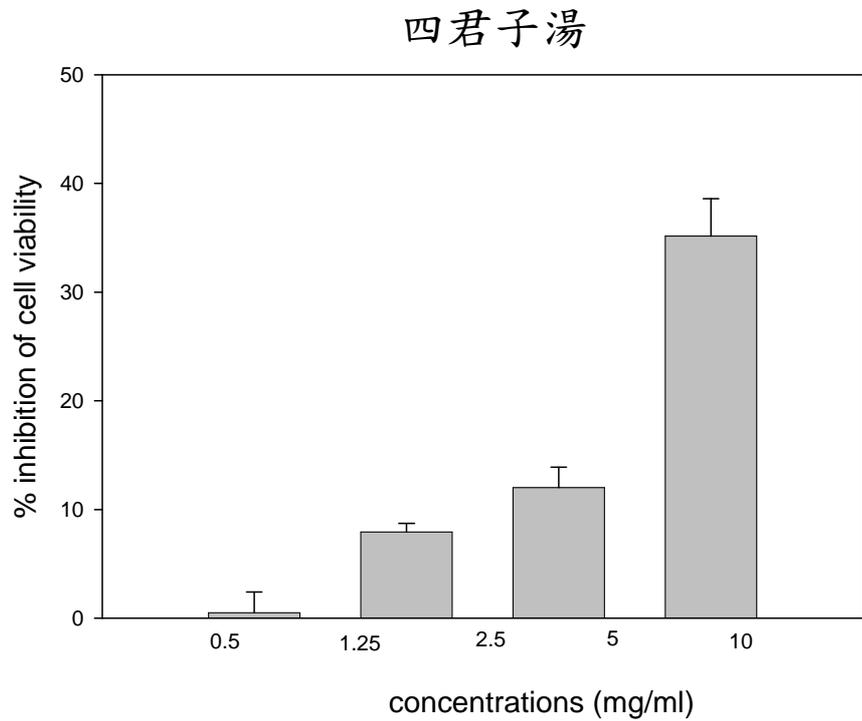
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP96-RD-204 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. <http://www.bhp.doh.gov.tw/letter/service/service03.asp>
2. Marrero JA. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006; 22: 248-53.
3. 臺灣常用藥用植物圖鑑第一、二、三冊，行政院中醫藥委員會，2006。
4. 原住民藥用植物圖鑑，行政院中醫藥委員會，2002。
5. *Oriental Material Medica*, 許鴻源, Oriental Healing Arts Institute, 2005.
6. Ukita Y, Kato M, Terada T. Gene amplification and mRNA and protein overexpression of c-erbB-2 (HER-2/neu) in human intrahepatic cholangiocarcinoma as detected by fluorescence in situ hybridization, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Hepatol.* 2002; 36: 780-5.
7. Efimova EA, Glanemann M, Liu L, Schumacher G, Settmacher U, Jonas S, Langrehr JM, Neuhaus P, Nussler AK. Effects of human hepatocyte growth factor on the proliferation of human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *Eur Surg Res.* 2004; 36: 300-7.
8. Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1997; 25: 619-23.
9. Lund P, Schubert D, Niketeghad F, Schirmacher P. Autocrine inhibition of chemotherapy response in human liver tumor cells by insulin-like growth factor-II. *Cancer Lett.* 2004; 206: 85-96.
10. Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int.* 2007 Mar; 27(2): 155-62.
11. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130: 1117-28.
12. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors.* 2007; 29: 19-35.
13. Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation- fibrosis- cancer axis. *Hepatology.* 2007; 46: 590-7.
14. Shen G, Jeong WS, Hu R, Kong AN. Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7: 1648-63.
15. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004; 134 (12 Suppl): 3479S-3485S.
16. Russo GL. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer

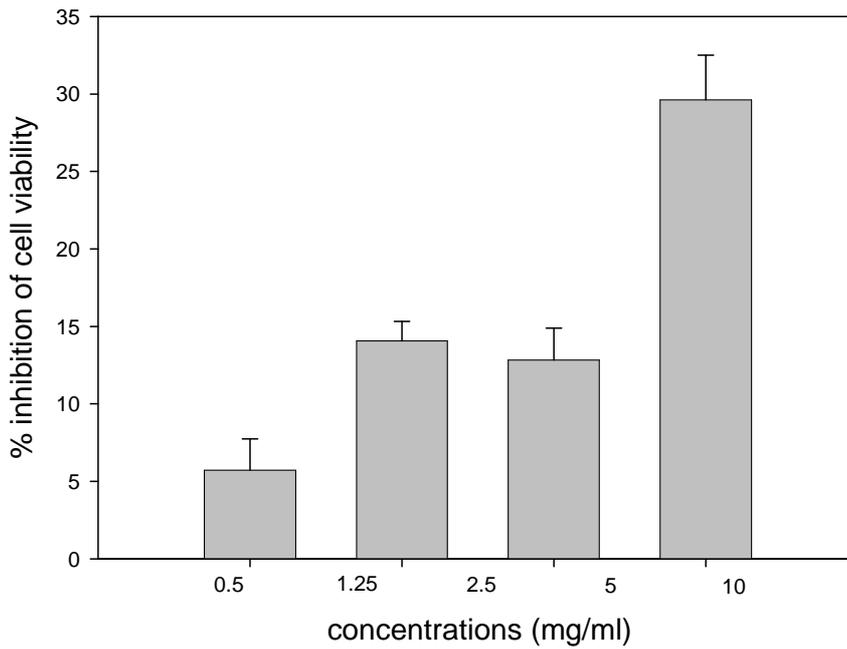
- chemoprevention. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74: 533-44.
17. Cuendet M, Oteham CP, Moon RC, Pezzuto JM. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *J Nat Prod.* 2006; 69: 460-3.

柒、圖、表

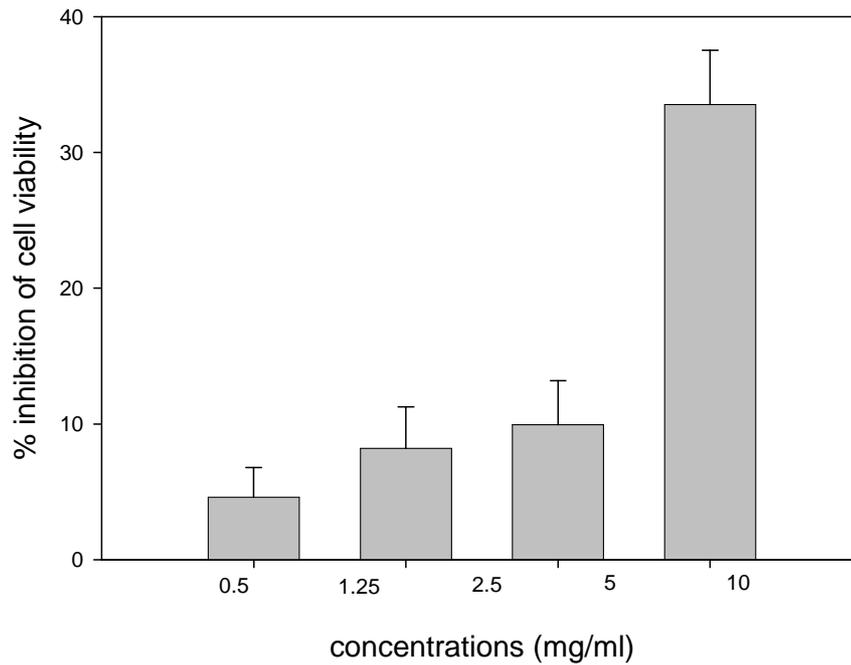


圖一、四君子湯與六君子湯對人類肝癌細胞 HepG2 的存活率抑制作用。在培養的 HepG2 細胞加入不同濃度之藥物處理 72 小時。之後以 MTT 方法測定 540 nm 的吸光度，並計算藥物抑制細胞存活率的百分比。數據表示方式：平均值 ± 標準誤差，n=3。

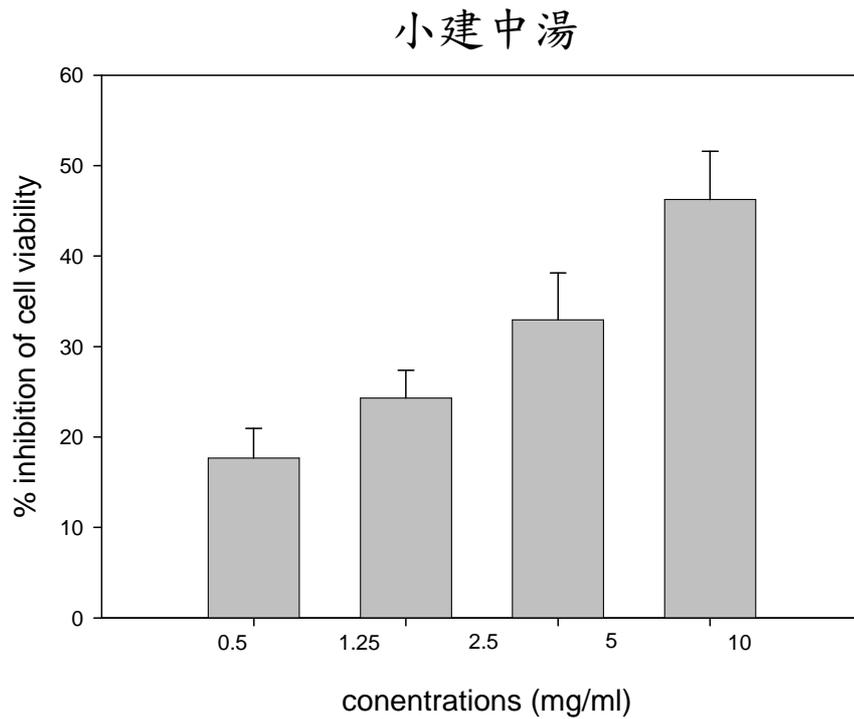
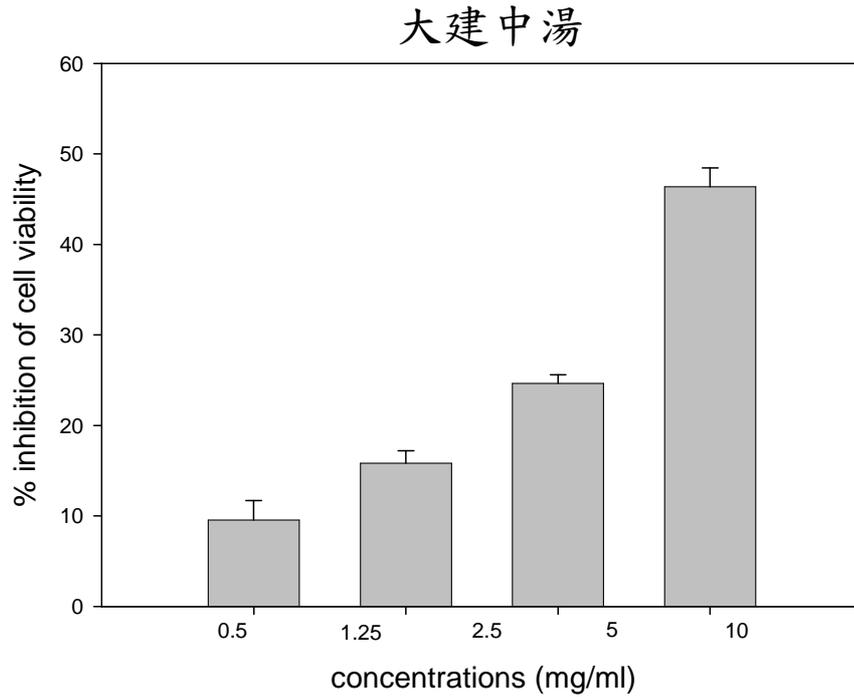
加味道遙散



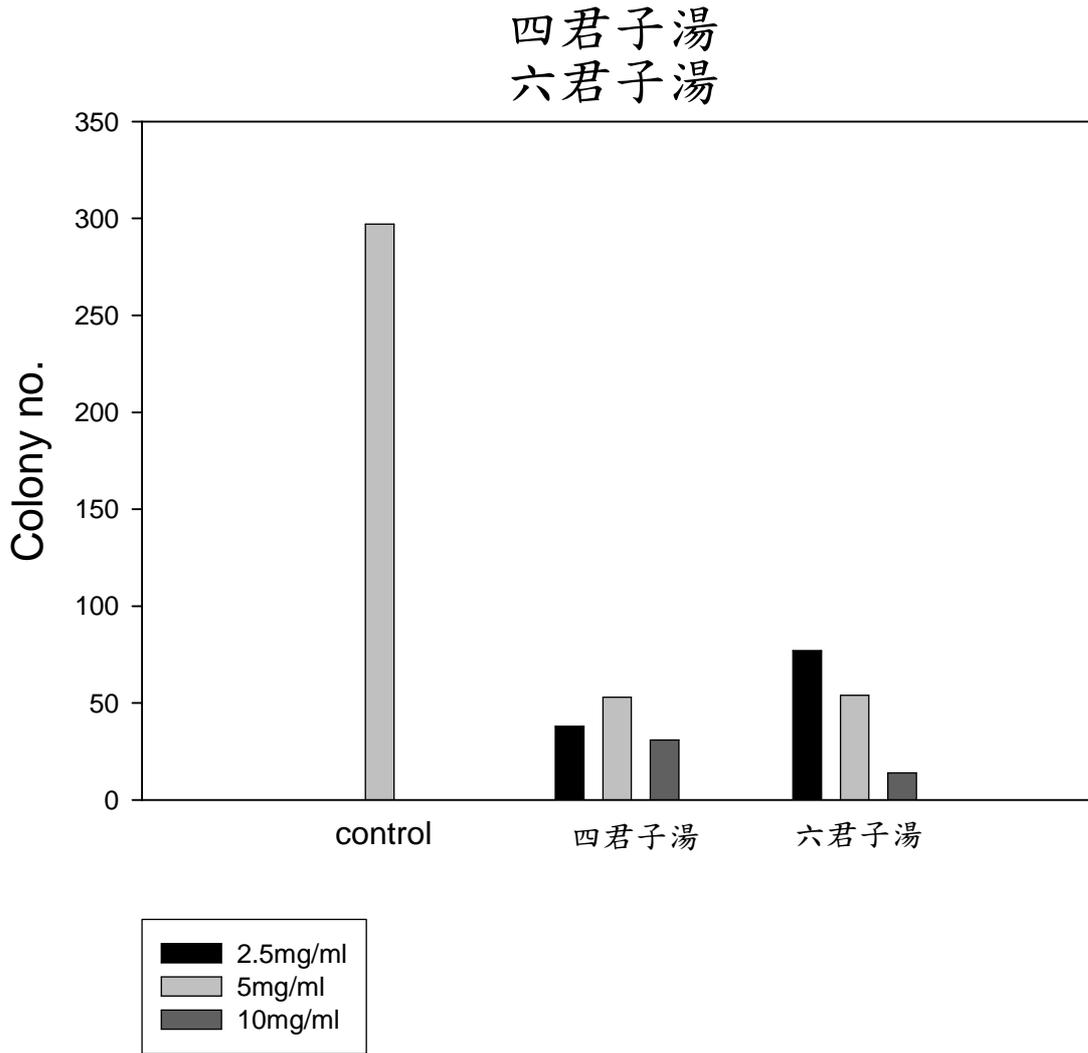
大柴胡湯



圖二、加味道遙散與大柴胡湯對人類肝癌細胞 HepG2 的存活率抑制作用。在培養的 HepG2 細胞加入不同濃度之藥物處理 72 小時。之後以 MTT 方法測定 540 nm 的吸光度，並計算藥物抑制細胞存活率的百分比。數據表示方式：平均值 ± 標準誤差，n=3。

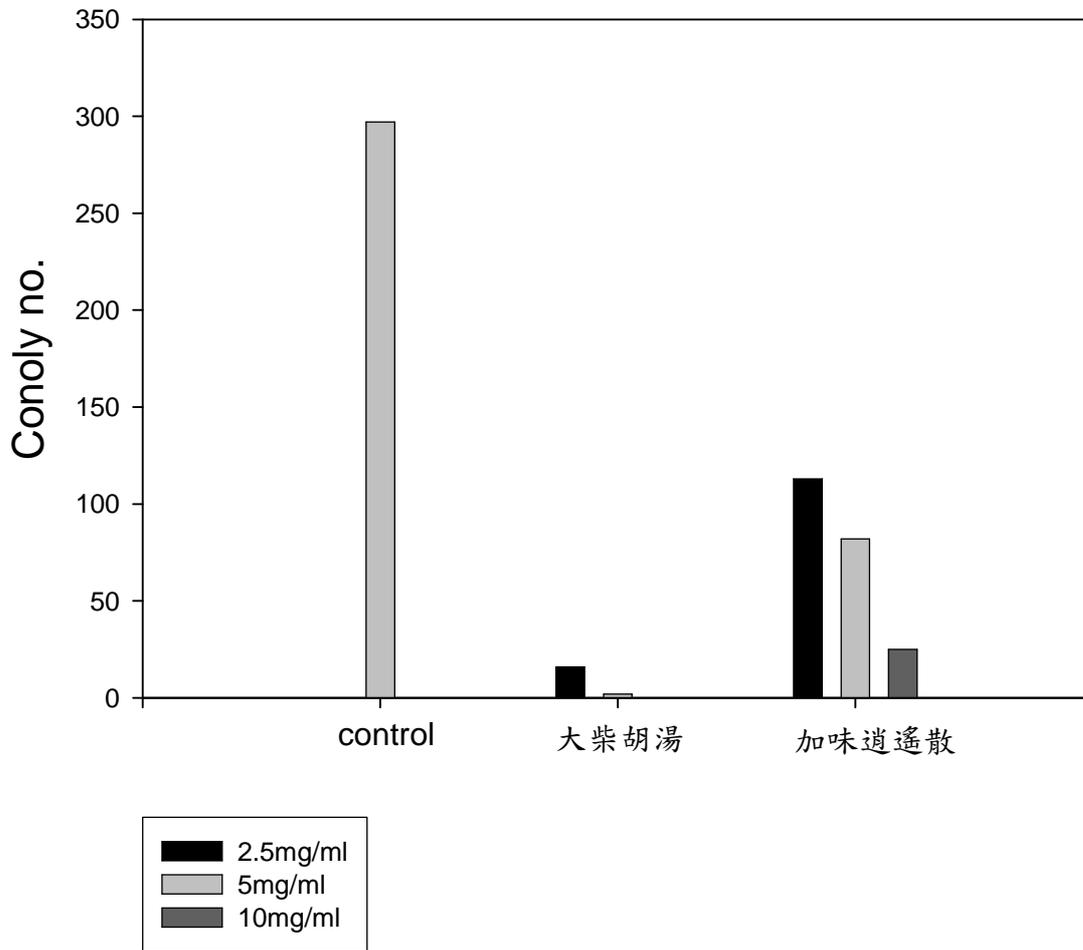


圖三、大建中湯與小建中湯對人類肝癌細胞 HepG2 的存活率抑制作用。在培養的 HepG2 細胞加入不同濃度之藥物處理 72 小時。之後以 MTT 方法測定 540 nm 的吸光度，並計算藥物抑制細胞存活率的百分比。數據表示方式：平均值 ± 標準誤差，n=3。



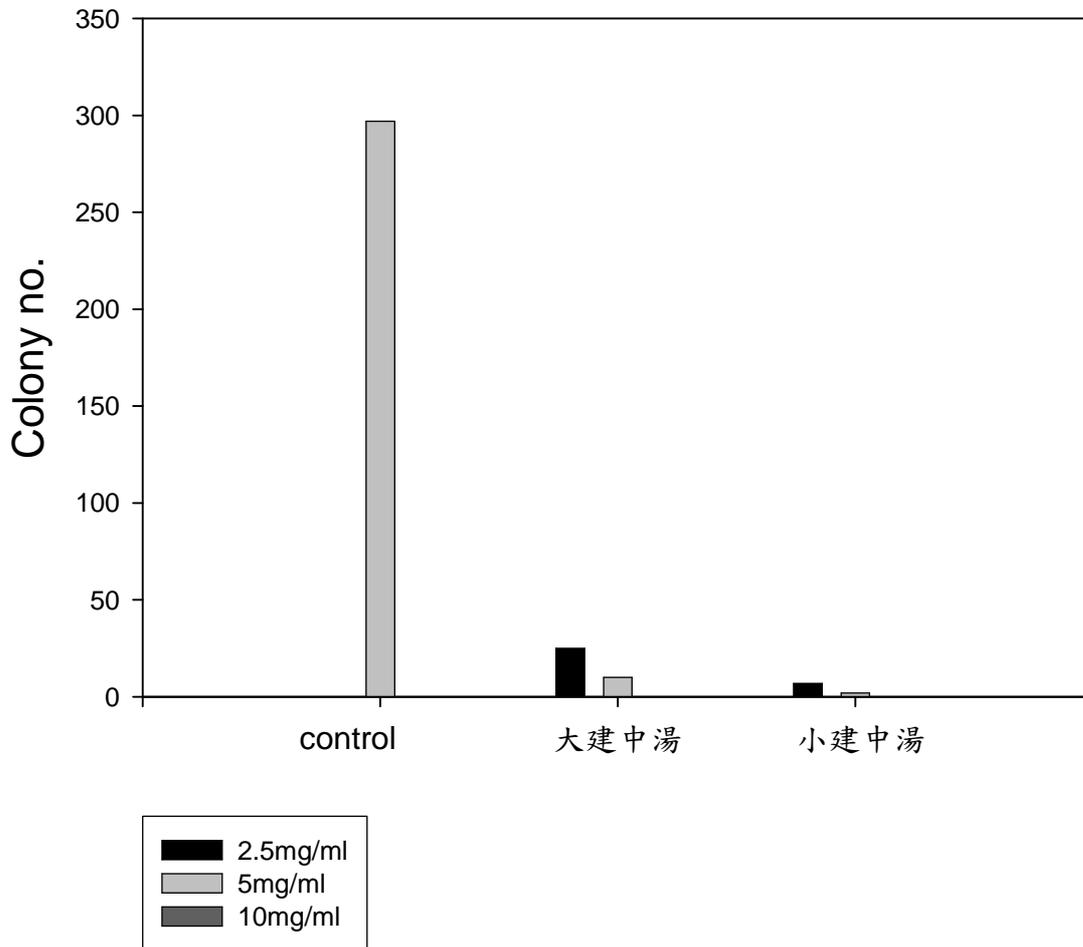
圖四、四君子湯與六君子湯對人類肝癌細胞 HepG2 的聚落形成抑制作用。以 clonogenic assay 方法，在培養的 HepG2 細胞加入不同濃度之藥物處理 14 天。之後以結晶紫酒精溶液染色，計算癌細胞聚落數目，並求出藥物抑制百分比。

大柴胡湯 加味逍遙散



圖五、加味逍遙散與大柴胡湯對人類肝癌細胞 HepG2 的聚落形成抑制作用。以 clonogenic assay 方法，在培養的 HepG2 細胞加入不同濃度之藥物處理 14 天。之後以結晶紫酒精溶液染色，計算癌細胞聚落數目，並求出藥物抑制百分比。

大建中湯
小建中湯



圖六、大建中湯與小建中湯對人類肝癌細胞 HepG2 的聚落形成抑制作用。以 clonogenic assay 方法，在培養的 HepG2 細胞加入不同濃度之藥物處理 14 天。之後以結晶紫酒精溶液染色，計算癌細胞聚落數目，並求出藥物抑制百分比。