

編號：CCMP96-RD-204

# 人類癌症基因體以驗證探討抗癌中草藥 子計畫二、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(2-2)

吳永昌  
高雄醫學大學

## 摘 要

### 研究目的：

肝癌為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 測試中草藥複方及單味藥萃取物對人類肝癌細胞株的毒殺及生長抑制作用。以 flow cytometry 研究中草藥對肝癌細胞之細胞週期及凋亡的影響。並以 Western blot 等技術來測試細胞週期與細胞凋亡的相關蛋白質表現以進一步確認藥物作用機轉。同時，我們也以化學成分分離、鑑定的方法，並配合生物活性分析來確定中草藥的有效成分。

### 主要發現：

我們以 MTT assay 完成 6 種單味中草藥對人類肝癌細胞株 HepG2 及 Hep3B 的細胞毒殺與生長抑制作用之研究。其中，箭葉鳳尾草具有較佳之藥效。箭葉鳳尾草的水萃物可造成 HepG2 細胞週期停滯於 G2/M 期，並引發 caspase 相關之細胞凋亡。進一步以管柱層析及 HPLC 由箭葉鳳尾草水萃物分離出十個純化合物，並以各種分析分法鑑定其化學結構及含量。最後，經由生物活性分析，我們推論

Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 為主要活性成分之一。

**結論：**

箭葉鳳尾草水萃物與其活性成分 Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 具有抗肝癌活性，有潛力繼續研究開發以成為新的抗癌藥物。

**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 2, Studies on the Anticancer Activity of Chinese Herbs: Regulation of Growth Factors-related Genes (2-2)**

Wu, Yang-Chang  
Kaohsiung Medical University

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies in Taiwan. 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. We also examined the effects of herb extracts on cell cycle and apoptosis by using flow cytometry and Western blot. The effective herb extracts were further subjected to chromatography to isolate the constituents. The chemical structures of the pure compounds were identified by NMR and IR. Finally, the pure compounds were subjected to the bioassay to determine which compounds were responsible to the anticancer effect of the herb extracts.

## **Results:**

We have tested six Chinese herbs for their cytotoxicity and anti-proliferative effect on the human liver cancer HepG2 and Hep3B cells. Among them, Sword Brake Fern (SBF) exerted more potent antitumor effect in the MTT assay. HepG2 cells treated with the SBF extract resulted in cell cycle arrest at G2/M phase and the induction of caspase-dependent apoptosis. In this study, 10 compounds have been isolated from the SBF extract and identified for their chemical structure. Among these compounds, kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (KRG) represents one of the major active constituent.

## **Conclusion:**

Our results suggest that SBF extract and KRG have the potential to be developed as new drugs for cancer treatment.

**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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。

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<sup>[3-5]</sup>，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，先前很少以「基因體」或「蛋白質體」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。在本年度計畫中，我們針對荊三稜，馬齒莧，紅花，細葉碎米蕨，山梔子，劍葉鳳尾草的水萃物對人類肝癌細胞 HepG2 及 Hep3B 的細胞毒性進行測試，再針對有效的中草藥以 flow cytometry，Western blotting，及蛋白質體(proteomics)的技術來探討其抗癌分子機轉。此外，在本計畫中我們也將利用層柱分析法與光譜鑑定，配合生物活性的評估，分離鑑定中草藥的有效成分。

## 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, Hep3B)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 100 µg/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% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 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 IC<sub>50</sub> (50% Inhibition Concentration) 即代表藥物能抑制 50% 癌細胞生長之毒殺濃度。

#### (二) 細胞週期與細胞凋亡測定

癌細胞以受測藥物處理後，以 trypsin-EDTA 將細胞切下，洗滌離心後，隨即以 70% 酒精固定，並置於 4°C 隔夜。之後將細胞離心，去除上清液，並加入含有 25 µg/ml RNase 與 0.5% Triton-X100 的 phosphate-buffered saline (PBS)，將細胞均勻打散，於 37°C 靜置 1

小時。接著將細胞以 50  $\mu\text{g/ml}$  propidium iodide 染色，並以 flow cytometry 測定分析細胞週期（G0/G1, S, G2/M）與細胞凋亡（sub G1）。

### （三）西方點墨法

癌細胞以受測藥物處理後，以 trypsin-EDTA 將細胞切下，洗滌離心後，以 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton-X100, 20  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM sodium fluoride, and 5,000U/ml aprotinin) 將細胞溶破，並以 Bio-rad 蛋白質染劑測定蛋白質含量。將定量之蛋白質檢體與等量的 2X Laemmli's buffer 混和，並於 95°C 加熱 5 分鐘。接下來以 SDS PAGE (7.5-12% polyacrylamide) 將上述樣品中的蛋白質分開，隨即以轉漬器將膠片中的蛋白質轉漬到 nitrocellulose 上。將轉漬後的 nitrocellulose 置於含 10% bovine serum albumin (BSA) 的 TBST (含 0.1% Tween 20 之 Tris-buffered saline) 於 4°C 放置隔夜。之後以 primary antibody 反應 1 小時，以 TBST 洗去多餘的 primary antibody (6 次，每次 5 分鐘)。接著以 horseradish peroxidase-conjugated ovine anti-mouse IgG antibody (1:10,000 in TBST) 反應後，以 TBST 洗去多餘的 antibody。最後以 enhanced chemoluminescence reagent 作用，並以底片感光偵測。

### （四）二維蛋白質電泳(2D-SDS-PAGE)

1. 檢體處理：癌細胞以受測藥物處理後，以 trypsin-EDTA 將細胞切下，洗滌離心後，以 lysis buffer 溶解，再加入 ice-cold acetone/11% w/v trichloroacetic acid (TCA)/20 mM DTT，於 -20°C 至少 30 分鐘。於 4°C 以 12000 rpm、10 min 離心。Pellet 用含有 DTT (20 mM) 的 cold acetone 洗滌兩次，接著以風乾的方式移去殘餘的 acetone。最後的 pellet 以適量的 rehydration buffer (7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer, 20 mM DTT) 溶解。以 Bradford method 測定 protein 濃度。
2. 等電點聚焦電泳 (IEF)：IEF 使用 Ettan IPG phor II System (Amersham Biosciences)。將上述蛋白質檢體(約 100  $\mu\text{g}$ )與 100  $\mu\text{l}$  sample buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer pH 3 - 10 NL, 100 mM DeStreak reagent 以及微量的 bromophenol blue) 混勻，以 cup-loading 的方式於 IPG 的正極端，IEF 於下列 condition 完成：300 V, step and hold, 3 h; 600 V,



gradient, 1 h; 1000 V, gradient, 1 h; 8000 V, gradient, 1.5 h ; 8000 V, step and hold, 3 h, giving a total of 16000 Vh。IEF 結束後立即進行 second-dimensional electrophoresis 。

3. 2D SDS-PAGE：第二方向的電泳以 SDS-PAGE 進行，使用的是 12% w/v separation gel。將 First dimension IPG gel strips 置於 the second dimension vertical gels (16 × 18 × 0.01 cm) 的頂端，再用 0.5% agarose 封膠，加入 running buffer ( 0.025 M Tris base, 0.192 M glycine, 0.1% w/v SDS, pH 8.3) 跑膠 (condition : constant voltage of 70 V for 0.5 h, and 120 V for 12 h) 。完成 SDS-PAGE 後，將 separation gels 使用 silver staining 顯影。圖上的點以 Image Master 2D Platinum 軟體分析。

## 參、結果與討論

### 一、細胞毒性及細胞生長抑制

在 MTT assay 中，我們分別就荊三稜，馬齒莧，紅花，細葉碎米蕨，山梔子，劍葉鳳尾草的水萃物對人類肝癌細胞 HepG2 及 Hep3B 的細胞毒性進行測試。如表一顯示，經 72 小時藥物處理，除了荊三稜與馬齒莧在最高濃度下對人類肝癌細胞生長無顯著作用，其他 4 種中草藥萃取物均可抑制人類肝癌細胞生長，其中又以劍葉鳳尾草效果最為顯著，因此我們後續的機轉研究及有效成分的分離與鑑定主要針對劍葉鳳尾草萃取物。劍葉鳳尾草水萃物對 HepG2 與 Hep3B 的生長抑制的  $IC_{50}$  相近(3.6 mg/ml vs. 3.8 mg/ml)，由於 HepG2 具有 wild type p53，而 Hep3B 則具有 mutant p53，因此可初步推論劍葉鳳尾草萃取物的細胞生長抑制作用為 p53 非依賴性。後續研究將針對劍葉鳳尾草萃取物在 HepG2 是否引起 p53 表現增加來進一步證實此項推論。接著，我們進一步探討劍葉鳳尾草萃取物細胞生長抑制作用的時間依存性，發現其以時間與濃度相關的方式抑制 HepG2 的細胞生長（圖 1）。

### 二、細胞週期停滯與凋亡

由於劍葉鳳尾草水萃物可抑制人類肝癌細胞的生長，我們進一步探討此作用是否藉由引起細胞週期停滯與細胞凋亡產生。以 propidium iodide 染色及 flow cytometry 分析的方式，發現劍葉鳳尾草萃取物濃度相關的方式造成 HepG2 細胞週期停滯於 G2/M 期，並使 sub G1 期細胞比例增加，顯示藥物引起細胞凋亡(圖 2)。

### 三、Caspases 活化與 Bcl-2 減少

由於 caspases 是細胞凋亡的重要媒介酵素，因此我們接著探討劍葉鳳尾草萃取物是否造成 caspases 活化。圖 3 顯示，劍葉鳳尾草水萃物以濃度與時間相關的方式造成 procaspase-3, -8, 及 -9 的減少，顯示其發生 proteolytic activation。由於 caspase-8 與 caspase-9 分別媒介 external death pathway 與 internal death pathway<sup>[6, 7]</sup>，顯示此二種細胞死亡途徑均可被劍葉鳳尾草水萃物引發。

另外，Bcl-2 family proteins 對細胞凋亡的調控扮演重要的角色<sup>[8, 9]</sup>。我們分別測定劍葉鳳尾草水萃物對 Bcl-2, Bcl-xL, Bid 的影響。圖 4 顯示，劍葉鳳尾草水萃物以濃度與時間相關的方式造成 HepG2 細胞 Bcl-2 含量減少，對 Bcl-xL 與 Bid 則無顯著影響。

有關劍葉鳳尾草水萃物對 Hep3B 細胞是否也會引起類似的細胞週期停滯以及細胞凋亡機轉，將在後續研究中繼續探討，以比較兩種細胞對藥物

的反應機制。

#### 四、劍葉鳳尾草水萃物對 HepG2 蛋白質體的影響

為了進一步探討劍葉鳳尾草水萃物的抗癌分子機轉，我們將 HepG2 以藥物處理 24 小時後，將細胞溶破，取其均質液針對劍葉鳳尾草水萃物對 HepG2 蛋白質體的分析，初步結果發現有 16 種蛋白質濃度在藥物處理後發生較明顯變化（圖 5）。經選取 10 種較大量蛋白質進行鑑定，並檢驗出其中 4 種蛋白質身份，包括 high density lipoprotein binding protein (HDL)，lysyl-tRNA synthetase，asparaginyl-tRNA synthetase，及 nonhistone chromosomal protein HMG-1。除了 HDL 外，後面 3 種蛋白質與 tRNA 合成與 DNA 複製有關。因此，我們認為劍葉鳳尾草水萃物可能經由調降 (down-regulation) 這些蛋白質，進而抑制肝癌細胞生長。有關劍葉鳳尾草水萃物影響這些蛋白質的機制，將在後續的研究中探討。這些資訊將有助於進一步闡明劍葉鳳尾草水萃物抗癌機轉。

#### 五、劍葉鳳尾草萃取物的有效成分分離

我們接著以管柱層析法及光譜分析，由劍葉鳳尾草水萃物中分離並鑑定出 10 種化合物（圖 6），分別為 1. kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-7-O- [ $\alpha$ -D-apiofuranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside], 2. kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, 3. 7-O-caffeoylhydroxymaltol O- $\beta$  - D-glucopyranoside, 4. 7-O-coumaroylhydroxymaltol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, 5. hispidin 4-O- $\beta$  -D-glucopyranoside, 6. caffeic acid, 7. *p*-coumaric acid, 8. 5-caffeoylquinic acid, 9. 3,5-di-caffeoylquinic acid, 10. 4,5-di-caffeoylquinic acid。我們分別就其中化合物 2, 3, 4, 6, 7 進行對 HepG2 細胞的 72 小時生長抑制作用分析，由圖 7 顯示，化合物 2 與 7 具有較佳活性，其 IC<sub>50</sub> 分別為 143.9 與 155.1  $\mu$ g/ml。進一步以 HPLC 分析上述 5 種化合物在劍葉鳳尾草水萃物的含量顯示（表二），化合物 2 含量約為化合物 7 的七倍，因此推論化合物 2 可能為劍葉鳳尾草水萃物的主要有效成分之一，其活性約較劍葉鳳尾草水萃物強 23 倍。

## 肆、結論

在本計畫中，我們完成 6 種中草藥水萃物對人類肝癌細胞株 HepG2 及 Hep3B 的細胞生長抑制作用之研究，其中以劍葉鳳尾草水萃物具有較強的活性。由於劍葉鳳尾草水萃物抑制 HepG2 與 Hep3B 生長的  $IC_{50}$  相似，推論其抗癌作用應與 p53 無關。機轉探討證明劍葉鳳尾草水萃物可引起 HepG2 細胞週期停滯於 G2/M 期，並可誘發細胞凋亡。其促凋亡機轉可能為調降 Bcl-2，進而引起 caspase 活化。此外，我們由劍葉鳳尾草水萃物分離出 10 種化學成分，並針對其中 5 種成分進行 HepG2 細胞毒性分析，結果發現化合物 2 (kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) 與化合物 7 (*p*-coumaric acid) 具最強活性。由於化合物 2 在劍葉鳳尾草水萃物含量為化合物 7 的七倍，且化合物 2 的抗癌活性較水萃物強 23 倍，因此我們推論化合物 2 可能為劍葉鳳尾草水萃物之主要有效成分之一。此外，我們也針對劍葉鳳尾草水萃物對 HepG2 蛋白質體的分析，初步結果發現有 16 種蛋白質濃度在藥物處理後發生較明顯變化，目前正進行鑑定中。

## 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。

## 伍、參考文獻

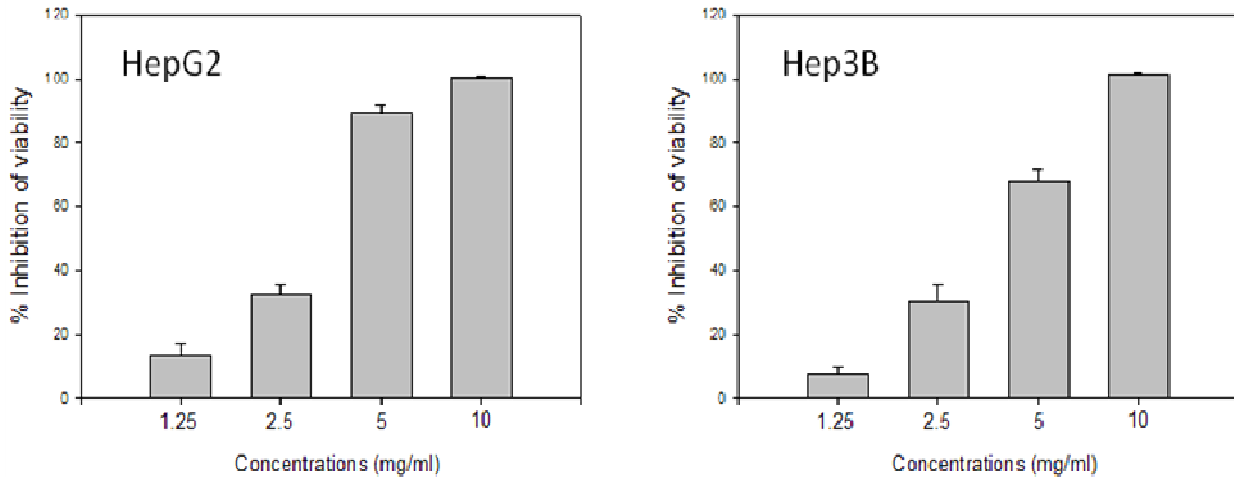
1. <http://www.bhp.doh.gov.tw/letter/service/service03.asp>
2. Marrero JA. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006; 22: 248-53.
3. 臺灣常用藥用植物圖鑑第一、二、三冊，行政院中醫藥委員會，2006。
4. 原住民藥用植物圖鑑，行政院中醫藥委員會，2002。
5. *Oriental Material Medica*, 許鴻源, Oriental Healing Arts Institute, 2005.
6. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 178-94.
7. Dai Y, Grant S. Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery. *Cancer Res.* 2007; 67: 2908-11.
8. Verdine GL, Walensky LD. The challenge of drugging undruggable targets in cancer: lessons learned from targeting BCL-2 family members. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 7264-70.
9. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007; 26: 1324-37.

## 陸、圖、表

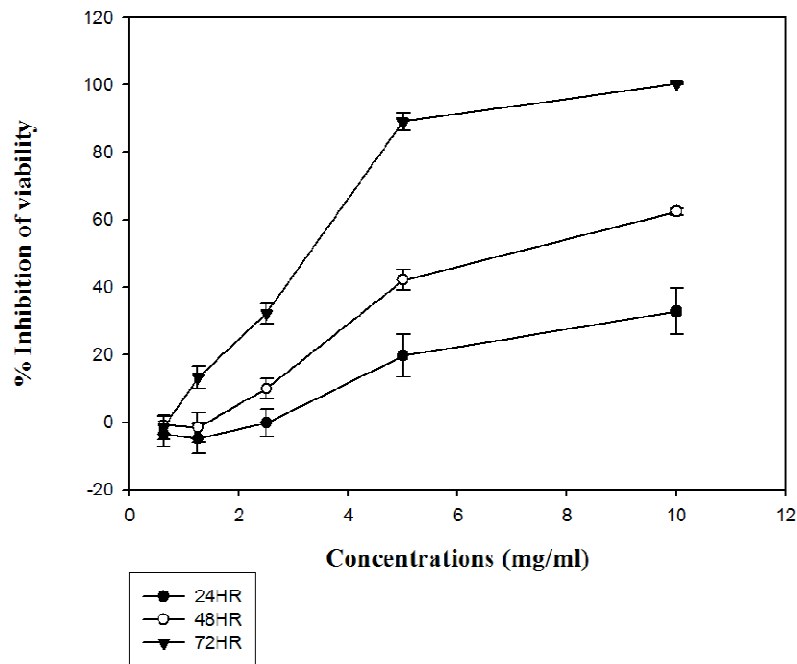
表一、六種中草藥水萃物對人類肝癌 HepG2 細胞與 Hep3B 細胞的生長抑制作用。在培養的人類肝癌細胞加入不同濃度之藥物處理 72 小時。之後以 MTT 方法測定 540 nm 的吸光度，並計算藥物抑制細胞生長的  $IC_{50}$ 。n=3.

藥物	$IC_{50}$ (mg/ml)	
	HepG2	Hep3B
荊三稜	> 10	8.1
馬齒莧	6.7	6.9
紅花	4.7	7.8
細葉碎米蕨	9.3	7.1
山梔子	> 10	> 10
劍葉鳳尾草	3.6	3.8

A.



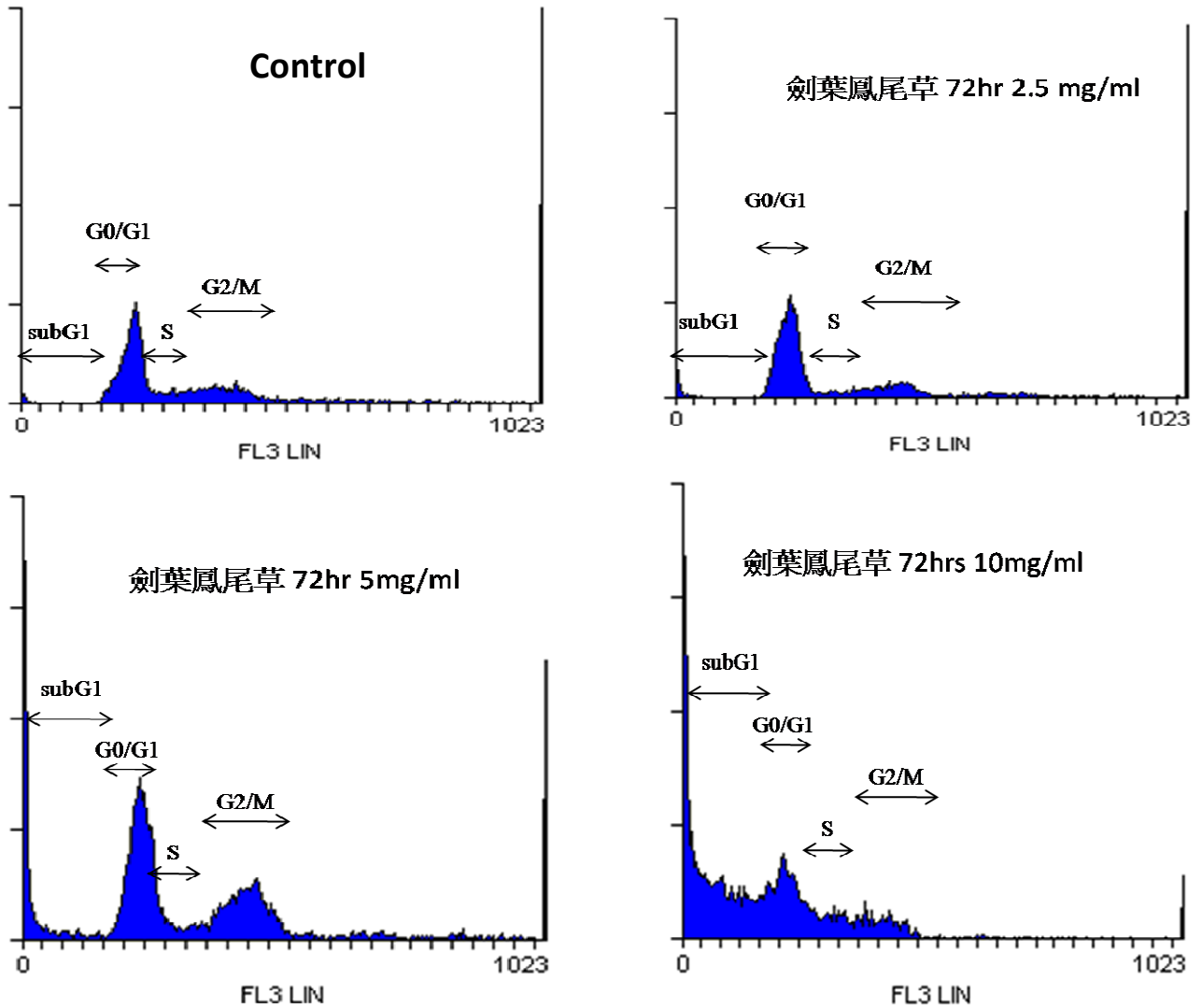
B.



圖一、劍葉鳳尾草水萃物對人類肝癌 HepG2 細胞與 Hep3B 細胞的生長抑制作用。

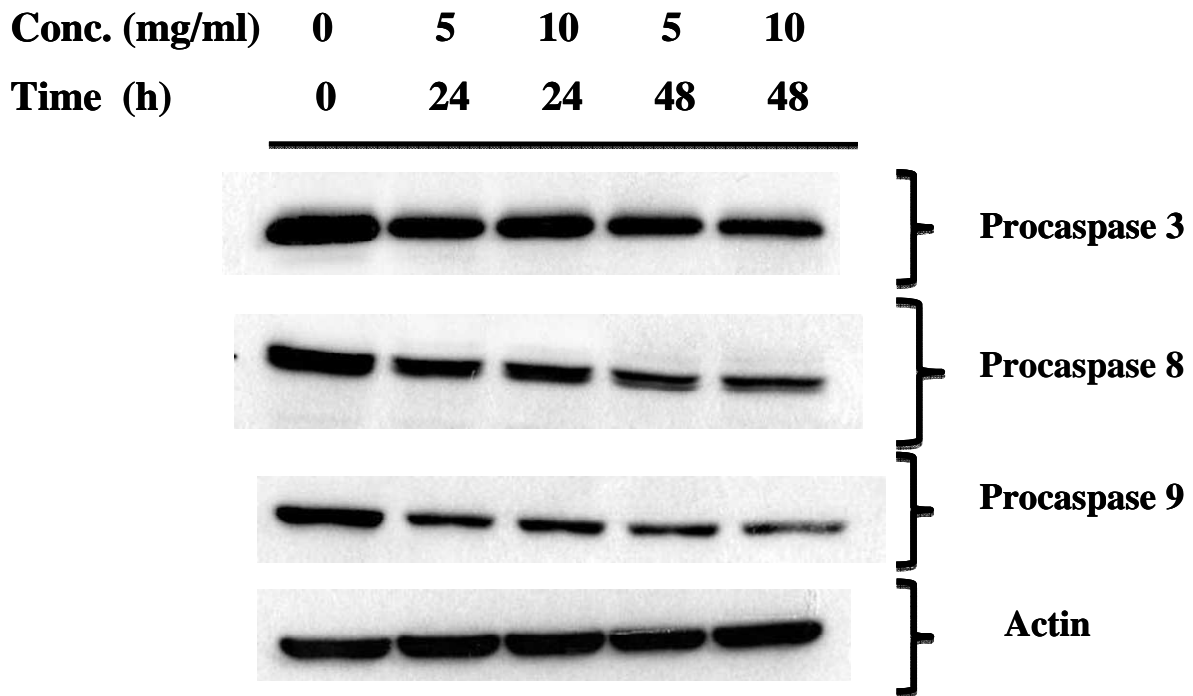
(A)在培養的人類肝癌細胞加入不同濃度之藥物處理 72 小時。

(B)在培養的 HepG2 細胞加入不同濃度之藥物分別處理 24、48 及 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生長的百分比。n=3.

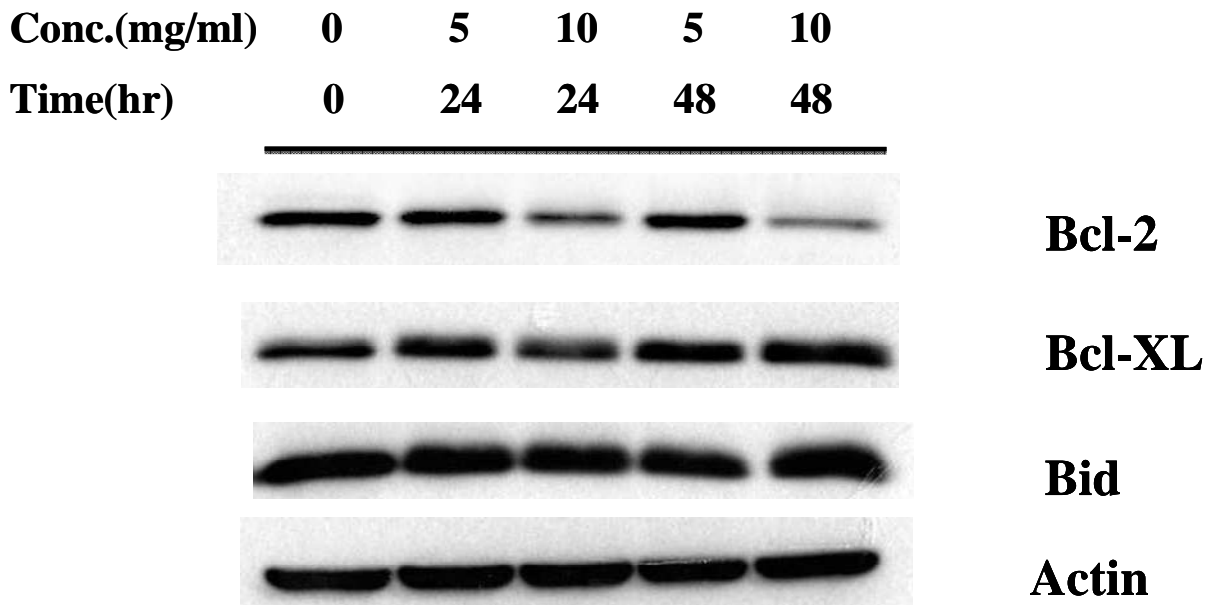


圖二、劍葉鳳尾草水萃物引發人類肝癌 HepG2 細胞週期停滯與凋亡。癌細胞以不同濃度劍葉鳳尾草水萃物處理後 72 小時收集，隨即以 70% 酒精固定隔夜，之後加入含有 25  $\mu$ g/ml RNase 與 0.5 % Triton-X100 的 PBS，於 37°C 靜置 1 小時。接著將細胞以 50  $\mu$ g/ml propidium iodide 染色，並以 flow cytometry 測定分析細胞週期(G0/G1, S, G2/M) 與細胞凋亡 (sub G1)。

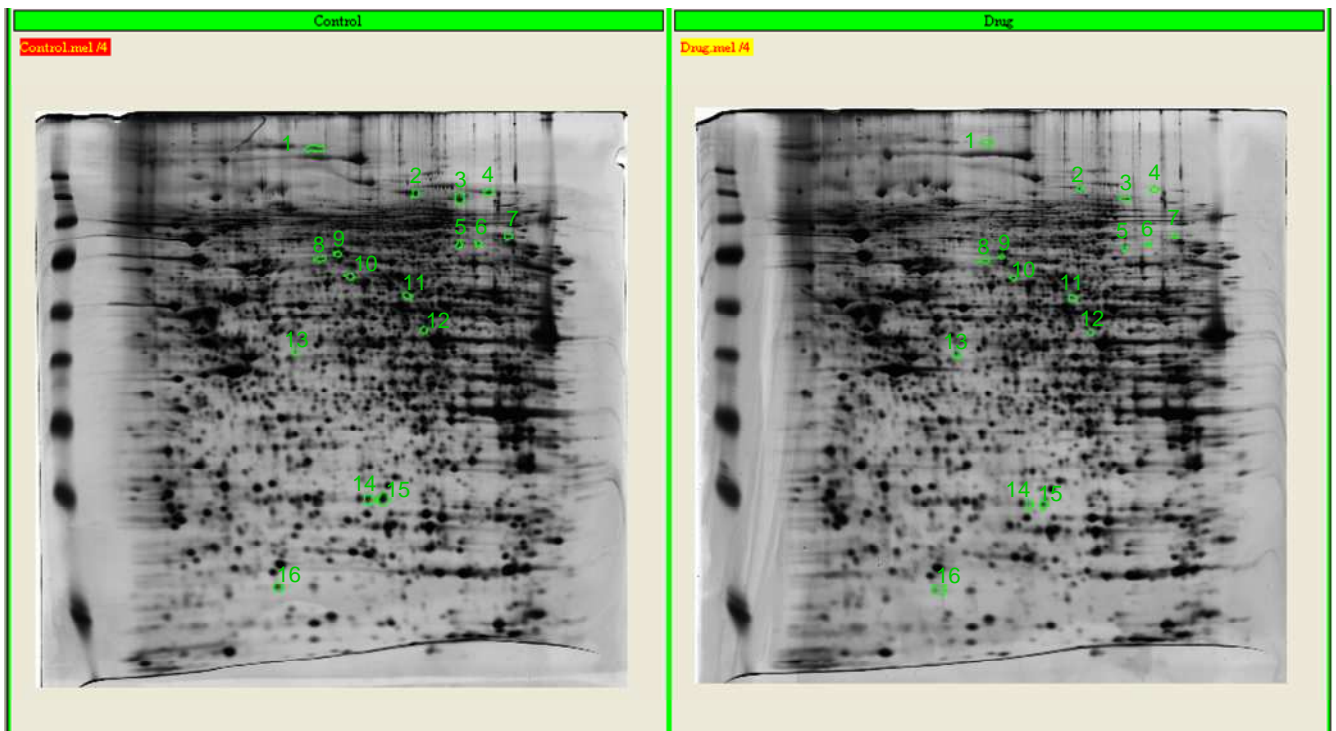




圖三、劍葉鳳尾草水萃物引發人類肝癌 HepG2 caspase 活化。癌細胞以不同濃度劍葉鳳尾草水萃物處理 24 及 48 小時後收集，並以 lysis buffer 溶解，取定量蛋白質進行 Western blot。

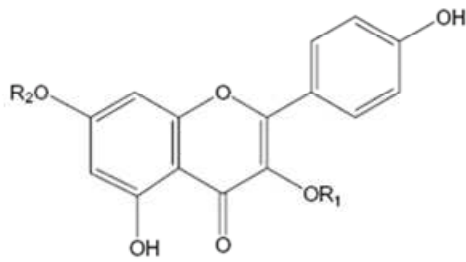


圖四、劍葉鳳尾草水萃物對 HepG2 細胞 Bcl-2 family proteins 的影響。癌細胞以不同濃度劍葉鳳尾草水萃物處理 24 及 48 小時後收集，並以 lysis buffer 溶解，取定量蛋白質進行 Western blot。



圖五、劍葉鳳尾草水萃物對 HepG2 細胞蛋白質體的影響。癌細胞以劍葉鳳尾草水萃物 (10 mg/ml) 處理 24 小時後收集，並以 lysis buffer 溶解，取定量蛋白質進行 2D-SDS-PAGE，並進行染色。圖中圈出的點代表加藥後，濃度有明顯變化的蛋白質。

Sample number	Protein name	Up- or down-regulation
45-1	high density lipoprotein binding protein	Down
498	undetectable	Down
1012	undetectable	Down
1113	lysyl-tRNA synthetase	Down
1161	undetectable	Down
1391	asparaginyl-tRNA synthetase	Down
1759	undetectable	Down
2593	nonhistone chromosomal protein HMG-1	Down
2611	1. keratin 9 2. unnamed protein product	Down
2886	1. keratin 1 2. keratin 9 3. unnamed protein product	Down

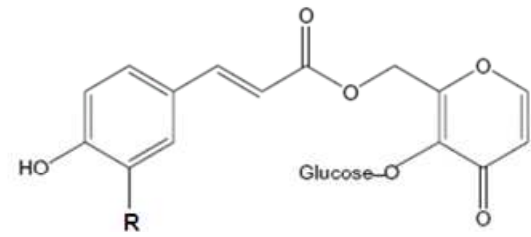


1. R<sub>1</sub> = rha R<sub>2</sub> = glc (2-1) api

Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-7-O-[ $\alpha$ -D-apiofuranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside]

2. R<sub>1</sub> = rha R<sub>2</sub> = glc

Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

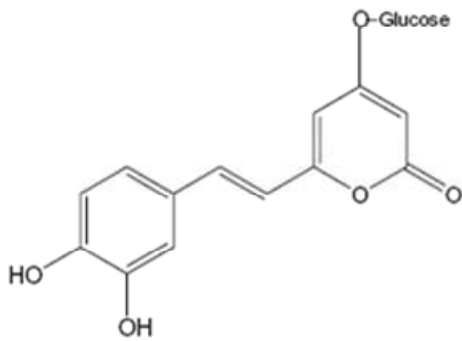


3. R = OH

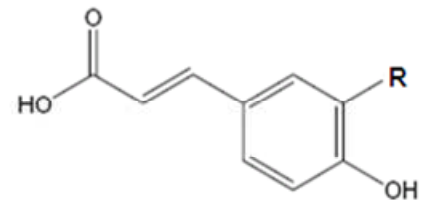
7-O-Caffeoylhydroxymaltol O- $\beta$ -D-glucopyranoside

4. R = H

7-O-coumaroylhydroxymaltol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside



5. Hispidin 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

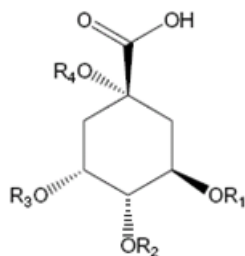


6. R = OH

Caffeic acid

7. R = H

*p*-Coumaric acid



8. R<sub>1</sub> = Caffeoyl R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H R<sub>4</sub> = H

5-caffeoylquinic acid

9. R<sub>1</sub> = Caffeoyl R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Caffeoyl R<sub>4</sub> = H

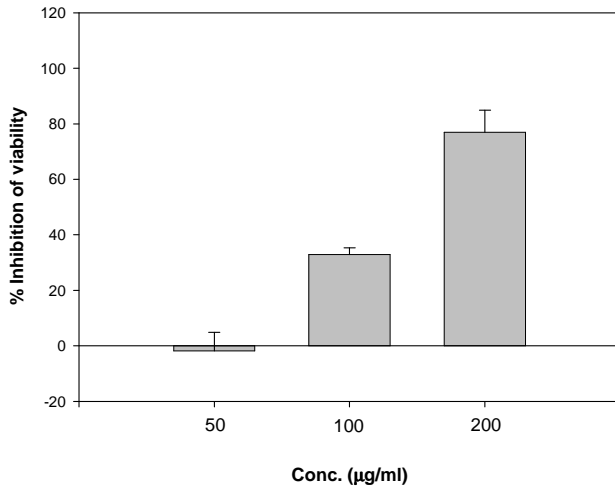
3,5-di-caffeoylquinic acid

10. R<sub>1</sub> = Caffeoyl R<sub>2</sub> = Caffeoyl R<sub>3</sub> = H R<sub>4</sub> = H

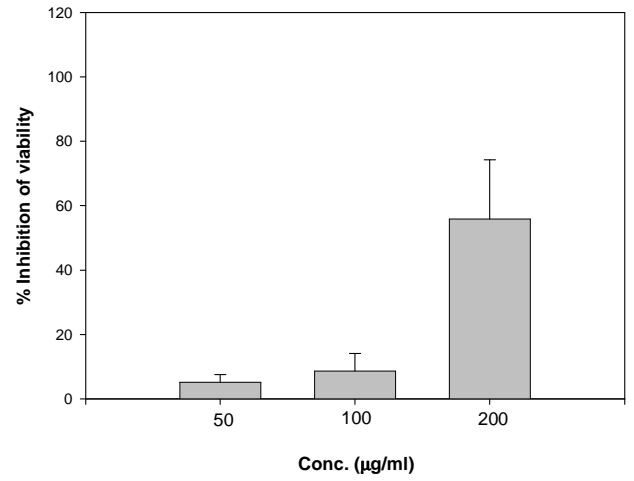
4,5-di-caffeoylquinic acid

圖六、由劍葉鳳尾草水萃物中分離出的化合物。

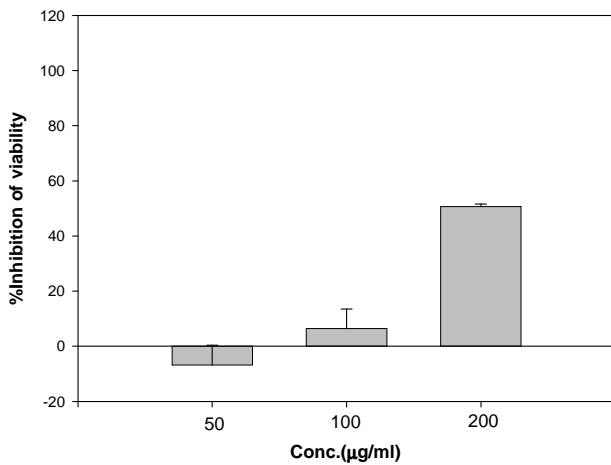
**Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**



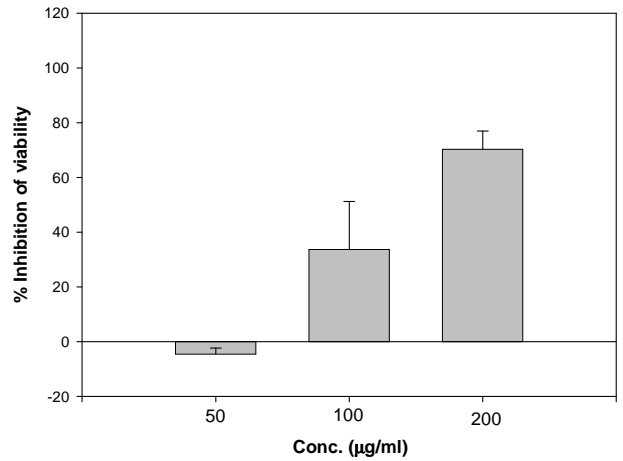
**7-O-coumarolhydroxymaltol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**



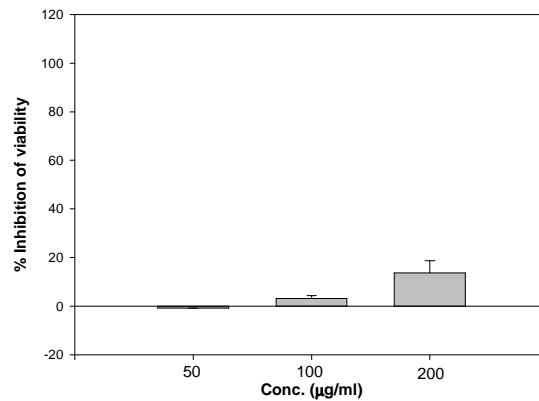
**7-O-caffeoylhydroxymaltol 3-O- $\beta$ -glucopyranoside**



**p-Coumaric acid**



**Caffeic acid**



圖七、由劍葉鳳尾草水萃物分離之化合物對對人類肝癌 HepG2 細胞的生長抑制作用。在培養的人類肝癌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生長的百分比。n=3.

表二、劍葉鳳尾草水萃物分離之化合物含量。

Compounds	Amounts (mg/g dry aqueous extract)
Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	2.62 $\pm$ 0.02
7-O-Caffeoylhydroxymaltol O- $\beta$ -D-glucopyranoside	9.99 $\pm$ 0.17
7-O-coumaroylhydroxymaltol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	1.71
Caffeic acid	2.64 $\pm$ 0.23
<i>p</i> -Coumaric acid	0.37