

編號：CCMP96-RD-205

人類癌症基因體以驗證探討抗癌中草藥 子計畫四、中草藥調節血管新生基因、癌細胞轉移、侵潤基因對抗肝癌機制的探討(2-2)

方 剛

國立臺灣師範大學

摘 要

研究目的：

長久以來，傳統中草藥被認為具有抗肝癌功效的。衛生署基因體中醫藥科技專案計畫的目標是：探討中草藥對人類肝癌腫瘤之療效，運用基因體技術分析其作用基因及探討其機轉，並進一步探討這些作用的相關基因層次機轉與細胞功能性研究。研究發現若干藥材會藉由影響細胞制 VEGF 表現以及 MMP-9 的活性以降低肝癌細胞的侵犯與血管新生能力。初步結果顯示，複方藥材中，包括黃連解毒湯與香蘇散最能有效抑制肝癌細胞的增生，另外，單方藥物：夏枯草、鴨膽子、苦參與黃獨均能抑制肝癌細胞生長制肝癌細胞的生長與抑制肝癌細胞的侵犯與血管新生作用。

研究方法：

這些有效中草藥對肝癌腫瘤細胞之作用，包括：抑制細胞生長速率、抑制由血清誘發之細胞侵襲與血管新生。未來仍應進一步由動物模式證實細胞株產生之血管新生作用及侵潤的現象，由活體腫瘤確認主要的作用基因蛋白質降低之過程，釐清活體反應機制的一致性。

結果與討論：

中醫中藥治療肝癌是從整體出發，有攻癌，有扶正，症狀改善較顯著，副反應小，療效較緩慢持久，但也存在著消除瘤體作用遲緩，針對性差等缺點。這個計畫的執行，對釐清這些中草藥主要組成分作用機轉是對於未來用在臨床上的應用，提供非常重要的依據。然而對於鑑定更多中草藥抗癌方面之作用機轉與如何更有效應用仍有很大的空間，相信在中醫藥委員會繼續支持下，將使得國家所投

資發掘中藥材治療肝癌，讓研究計劃更趨完備，持續擴大醫療資源，廣受世人接納。

關鍵詞：中草藥、肝癌、細胞轉移

Number: CCMP96-RD-205

Evidence-based Studies on Anticancer of Chinese Herbs by Genomic Medicine- Subproject 4: Studies on the Anticancer Activity of Chinese Herbs: Regulations of Angiogenesis and Metastasis-related Genes (2-2)

Kang Fang

National Taiwan Normal University

ABSTRACT

Aim:

For centuries, a lengthy list of Chinese traditional herb medicines has been conventionally used in curing liver cancer. Effective as they are, their comprehensive action mechanisms remained not understood. The cache when uncovered promises good opportunity for developing novel and potential effective aspect to improve current liver cancer treatment. The purpose of this work is to find out the biological activities as well as learning the relevant mechanistic knowledge and recognize metastatic inhibition potential from a panel of Chinese herbal medicine including combined formula and single herb with an eye on those capable of suppressing angiogenesis and metastasis in hepatocarcinoma cells. The genomic research using the extracts of the available Chinese medicine herbs ought to provide in-depth evidence-based information on those that are effective in inhibiting growth and blocking migration of cells. The work is expected to expand current scopes in treating hepatocacinoma that are prevalent in populations in Taiwan and in the Southeastern China.

Method:

Through hepatocarcinoma cells HepG2 and Huh7, we found that Cyperus & Perilla Formula (香蘇散) and Coptis & Scute Combination (黃連解毒湯) as well as their corresponding single herb components *Perilla frutesens* L. (紫蘇葉) and *Coptis chinensis* FRANCH (黃連) are effective in suppressing cell growth and invasion. in

dose- and time-dependent manners. As far as single formula herb medicines were concerned, both *Prunella vulgaris* L. (夏枯草) and *Dioscorea bulbifera* L. (黃獨) were shown suppressing VEGF expression, whereas *Brucea javanica* (鴨膽子) and *Sophora tomentosa* L. (苦參) reduced MMP-9 expression and its zymography.

Results & Discussion:

The work also provided evidence-based data of the traditional herb medicines that are vastly circulated within the Chinese populations. The mechanisms associated with the inhibitory effect in cancer cell angiogenesis that provided a good rationale for future validation in animal models and developing more liver cancer therapy.

Keywords: Chinese herb medicine, hepatocarcinoma, metastasis

壹、前言

近二十年來全世界的癌症死亡率正快速上升，而行政院衛生署統計（行政院衛生署，九十六年衛生統計資料），癌症為臺灣十大死因之首，肝癌在男性為第一位，在女性則為第二位。肝癌最棘手之處便是病因複雜，肝硬化或是病毒性肝炎可能是肝癌的先兆，也可能是造成肝癌之原因（Gomaa *et al.*, 2008）。且肝癌病程進展快，極具侵襲性，有時肝臟本身無症狀，等到轉移發生在肺、淋巴結及骨骼，方才被診斷為肝癌（Kim *et al.*, 2008）。

一、癌細胞增生、轉移與血管新生的關係

（一）血管新生在癌細胞中扮演的角色

癌症是因細胞調控異於正常細胞，增生繁殖成為癌細胞，癌細胞因增殖快速，需要足夠的營養和氧氣（Wu *et al.*, 2007），因此，必須侵蝕周圍正常細胞並新生血管提供癌細胞增長的良好環境，更可能經由血液和淋巴系統擴散至其他組織器官，即所謂的轉移（Pepper and Skobe *et al.*, 2003），這是造成罹癌患者的主要徵候，也是臨床治療中最難以根治的（Li *et al.*, 2008）。

（二）癌症血管新生的進程

腫瘤內皮細胞（endothelial cells）增生速度一般比正常組織的內皮細胞快 20 倍以上（Denekamp, 1984）。無論是生理或病理狀態下，血管新生是發生於低氧（hypoxia）或是缺血（ischemic）的情況下（Mirzoeva *et al.*, 2008）。組織釋放大量的血管內皮細胞生長因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）至鄰近的血管中，與血管內皮細胞上之接受體結合（Byrne *et al.*, 2005），進而活化內皮細胞產生一連串的訊息傳遞，引發內皮細胞進行增生（proliferation）、移行（migration），所產生初期的管路必須進行細胞外基質再塑造（extracellular matrix remodeling），進而暴露出 $\alpha v \beta 3$ integrin，最後產生 tube 和 loop 直至血管穩定化為止，形成一個血管網路之血管新生（Cristofanilli *et al.*, 2002）。

癌症血管新生的機制可分為以下幾種形式：1. 芽生性血管新生（sprouting angiogenesis）。2. 內摺性血管新生（intussusceptive angiogenesis）。3. 吸引內皮前驅細胞（Endothelial progenitor cells）。4. 血管共構（vessel co-option）。5. 血管生成擬態（vasculogenic mimicry）。6. 淋巴血管新生（lymphangiogenesis）（Hillen *et al.*, 2007）。其中，芽生性血管新生最為普遍研究，經由血管內皮細胞上的促血管新生的生長因子，如：纖維母細胞生長因子（fibroblast

growth factor, bFGF) 或 VEGF 被激活，活化的內皮細胞釋放蛋白酶以降解胞外基質和基底膜，內皮細胞得以遷移增殖形成周圍芽狀結構，芽狀構造擴大成環形，最後形成完整的血管腔 (Paku, 1998)。而血管生成擬態的途徑藉由增加 hypoxia-induced factor 1 α (HIF-1 α)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9 及 VEGF 的基因表現為模式 (Sun *et al.*, 2007)。

(三)癌症轉移 (metastasis) 的階段

癌細胞的轉移分為幾個階段：第一個階段稱為侵犯 (invasion)，此時上皮細胞 (epithelial cells) 會鬆開與癌細胞之間的連接，讓癌細胞能移動到鄰近組織。第二個階段稱為內滲 (intravasation)，癌細胞穿過血管或淋巴管的內皮進入循環系統。第三個階段稱為外滲 (extravasation)，這個階段的癌細胞由循環系統讓細胞穿越微血管而蔓延到其他的組織。形成具轉移性的惡性腫瘤 (Jing *et al.*, 2004)。

二、影響血管新生的相關蛋白質

(一)VEGF

VEGF 是調控血管內皮細胞增生、血管新生、脈管生成和血管通透 (permeability) 最主要的一個調控因子。(Klagsbrun and D'Amore, 1996)。VEGF 的成員包括：VEGF-A, placenta growth factor (PGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 以及 VEGF-E。其分子結構是由單一 VEGF 的基因(含有八個 exon)所組成，VEGF mRNA 會經由選擇性剪裁 (alternative splicing)，剪裁成多個不同長短之 mRNA，這些不同長短之 mRNA 會編碼 (encode) 出不同長度 VEGF 的胺基酸序列 (Tischer *et al.*, 1991; Houck *et al.*, 1991,1992)。VEGF-A 又分為幾種異構：VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189 和 VEGF-A206，其中最含量最多研究也最廣泛的是 VEGF-A165 (Zachary and Gliki, 2001)。VEGF 於缺氧的腫瘤細胞、巨噬細胞和免疫有關的細胞被大量製造，為一最具效力促血管新生的 mitogen (Brown *et al.*, 1997)，當 VEGF-A 表現被抑制時，則會造成血管形成的缺陷與胚胎死亡 (Carmeliet *et al.*, 1996)，VEGF-A, VEGF-B 與微小血管生成有關，參與惡性腫瘤的移行轉移，VEGF-C 和 VEGF-D 則為淋巴管生成因子，與腫瘤淋巴腺轉移密切相關並可判斷腫瘤治療的預後情形 (Joukov *et al.*, 1998)。增加 VEGF 的表現會使血管內皮細胞活動力突出 (protrusive activity)，VEGF 和 VEGF receptor 的信息傳遞調控血管內皮細胞突

出的活動力，是決定血管形態改變的重要關鍵(Drake *et al.*, 2000)。

(二)基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)

癌症的復發或轉移也和 MMP 的過度表達呈正相關(McGowan and Duffy, 2008)。MMP 是一群帶有二價金屬離子鋅的蛋白酶素 (Amalinei *et al.*, 2007)。其中，MMP-9 被歸類為明膠酶 (gelatinase)，主要參與細胞外基質分解的機制，以進行侵襲轉移。提供惡性腫瘤生長的血管增生 (Tu *et al.*, 2008)。

細胞外基質主要由膠原蛋白 (collagen)、彈性蛋白 (elastin)、醣蛋白 (glycoprotein) 和蛋白多醣 (proteoglycan) 四種組成分子組成，不同組織器官，各種組成成分比例不同 (Yurchenco and Schittny, 1990)。當腫瘤細胞從原發腫瘤分離脫落，必須降解細胞外基質，穿透原發腫瘤周邊的宿主結締組織才能進入血管系統 (Fidler *et al.*, 2002)。MMP 降解細胞外基質及基底膜，促進了惡性腫瘤的侵襲與轉移。並且使病人預後不良 (Folberg *et al.*, 1993)。

MMP 對於原位的增殖性腫瘤到侵襲轉移癌的演進過程，扮演重要的角色，瞭解 MMP 對腫瘤發生的影響，應可以研究開發出抑制 MMP 作用的藥物以治療癌症血管新生。而本計畫著重在 72kDa 與 92kDa 的明膠酶 (gelatinase) 和金屬彈性蛋白酶 (metalloelastase)，它們分別是 MMP-2 和 MMP-9 (又稱 gelatinase B)，此種明膠酶可分解 IV、V 型基底層 (basal lamina) 非纖維狀膠原質，也可分解 VII 型的膠原質、纖維結合蛋白 (fibronectin)，X 型的短鏈膠原質、彈性蛋白和金屬蛋白酶 (Tapia *et al.*, 2008)。

MMP 的分解能力與酵素分泌時間和其內生性抑制劑有關。而關節炎、硬化症與癌症都與酵素和抑制劑之間的不平衡有關，這些不平衡使得細胞外基質分解 (Tu *et al.*, 2008)。但是，並非所有種類癌細胞都使用 MMP 來分解基質，其他的蛋白水解酵素，如：尿激酶型纖維蛋白溶酶原活化因子 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 也在惡性腫瘤中發現與病人預後呈負相關 (Grondahl *et al.*, 1993)。

(三) β -catenin

芽生型血管新生會促進 VEGF 與 MMP-9/2 的表現，又 VEGF 會使內皮細胞的 E-cadherin 的酪胺酸高度磷酸化，使 E-cadherin 與調控細胞生長增殖的蛋白質 β -catenin 結合能力降低 (Esser *et al.*, 1998)，以利 β -catenin 進入細胞核內，與轉錄因子 Tcf/Lef 結合並改變其立體結構使調控細胞週期的因子 (如 c-myc、cyclin D1) 及

MMP-7 的基因啟動子區域結合，製造蛋白質，增加細胞的增殖與分解細胞外基質的能力。(王，2002)。

上述三類阻斷血管新生的相關蛋白 VEGF、MMP-9 或 β -catenin 表現的藥物，可以間接減殺癌細胞，亦能在癌症擴散時作為良好的阻斷劑的發展目標，以降低肝癌細胞的惡性慢蔓延。

三、中草藥與肝癌防制

中藥以四氣五味作為分類，四氣：寒、熱、溫、涼四種藥性，藥性的寒、熱、溫、涼，是藥物作用於人體發生的反應歸納出來的；五味：辛、甘、酸、苦、鹹五種不同的滋味，主要是味覺，或是根據臨床治療中反映出來的效果而確定的。歸經是藥物對於人體某些臟腑、經絡有著特殊的作用（許，1985）。

肝癌的臨床特徵：多表現為肝脾同病、氣滯血瘀、濕熱毒邪內蘊之徵，晚期多表現為陰液枯竭、瘀毒互結、水濕內停之候，臨床辨治當捉住「肝脾」二臟病生理變化。中醫認為肝癌的發生與感受濕熱邪毒、長期飲食不節、嗜酒過度以及七情內傷等引起機體陰陽失衡有關。感受邪毒、飲食損傷、脾氣虛弱、肝氣抑鬱是肝癌的主要病因，而正氣虧虛、臟腑失調則是發病的內在條件（謝，1996）。

肝癌中醫治則的現代研究主要有以下幾種：1.健脾理氣法 2.活血化癥法 3.清熱解毒法 4.疏肝理氣法 5.扶正補虛法（葉，2008）。

中藥治療肝病（歸肝經）主要有解表藥—紫蘇、柴胡；清熱瀉火藥—夏枯草、山梔子，清熱燥濕藥—黃連、黃芩、黃柏、苦參；理氣藥—香附、陳皮、厚朴；補虛藥—甘草，清熱解毒藥—鴨膽子（三七健康網）。本計畫就是針對這些、這些複方與單方的藥物探討它們對肝癌細胞侵潤與血管新生新生的可能發展機制。

四、研究目的

中草藥是世界華人數千年來累積的智慧結晶，也被公認為臺灣在生物科技發展方面的指標，也是最有希望及潛力的領域之一，政府積極推動中草藥的發展的層級越來越高。衛生署及經濟部都有專職推動中草藥發展的部門，顯示如何加速國內中草藥具備國際性競爭力成為國內產官學界積極努力的課題。中醫藥基因體相關研究計畫為任務導向，利用中醫與基因體學及其相關基因表現研究之結果，瞭解中醫與基因表現之關係及中藥對基因表現效應，以建立中醫理論之實證基礎，加速中醫藥之現代化；並作為同病異治、異病同治之依據，促進中西醫學相輔成。

在臨床上也已將中草藥應用於癌症病人的臨床治療（謝及林，2006；張及林，2002），但目前關於這些藥物之科學研究證據仍不足，其有效成

分和相關的作用機轉至今仍付之闕如。中藥無法廣泛為世人所普遍接受，最大的原因即是作用機制的不明確性和缺少科學證據。傳統中藥雖有初步之科學證據顯示其預防癌症之功效，惟其抗癌機制，仍有賴進一步的研究。衛生署基因體中醫藥科技專案計畫徵選的主題之一是要利用新穎的基因體技術，探討中藥作用機制以基因表現的分析以了解不同藥間特性的相關基因，將此尖端生物醫學研究方式應用於更深入印證中醫理論，促進中醫發揚光大。

本子計畫是藉由「基因體」研究方式，探討各種中草藥對肝癌治療的新方向。計畫是利用利用肝癌細胞，探討中草藥與血管新生相關基因表現的變化，同時藉著實驗數據分析的結果，深入瞭解中藥對肝癌血管新生與轉移作用機制，藉由不同單方與複方，瞭解藥間特性的相關基因調控。由這些實驗結果，應該可以篩選出更多有效中草藥物，以對抗肝癌蔓延，並且對肝癌相關血管新生調控有更深入的認識。這種利用近代生物醫學研究，可以在短時間內彙集血管新生調控的數據，迅速對草藥與肝癌細胞侵潤與移轉有深入的認識，對協助建立「證據基礎」的中醫理論，會收到立竿見影之效。更重要的是，這項研究結果，不僅能夠拓展中草藥治療肝癌的視野，這項研究成果也將吸引更多產業與學界投入持續開發。這種藉由基因體研究中醫藥，可以漸次建立中醫藥研究的技術平台，對於我國中醫新藥開發，將創造更多新契機，提昇我國中醫藥產業的國際競爭力與可見度。

本計畫主要以肝癌細胞為模式，配合細胞分子生物學方法試驗中藥材複方及單方組成物對血管新生及轉移調節因子表現之調控，並釐清各種不同牽涉的機制。期待能夠運用現代化藥物研發技術，達到驗證中草藥功能的目標。

貳、研究方法及材料

一、細胞培養

不同細胞株選擇不同培養基培養，人類肝癌細胞（Hepatocellular carcinoma, HCC）HepG2（p53 野生型），Huh 7（p53 突變型，Y220C）（Lin *et al.*, 1995）及 Hep3B 分別培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）high glucose（Biosera, L0103/500）培養液中，在 HepG2 細胞株中添加 10% 去活化的胎牛血清（fetal bovine serum, Nalgene）、1% 非必須胺基酸（nonessential amino acid, Hyclone, SH30238.01）、100 units/ml 青黴素（Penicillin）及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鏈黴素（Streptomycin, Invitrogen, 15140-122）、在 Huh 7 細胞株中較上述培養液多添加 1% 麩胺酸（L-glutamine 100, Invitrogen）後，以 37°C 恆溫培養箱含 95% 空氣/5% 二氧化碳及飽和濕度培養之。

二、RNA 萃取

將 100-mm 培養盤上的細胞，以 PBS（phosphate buffered saline；0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 ）漂洗 2 次，加入 1ml Trypsin-EDTA（T4174, Sigma）於室溫下靜置 5 分鐘。收取細胞後，加入 0.5 ml TRIzol（Invitrogen, 15596018）裝於 1.5ml 微量離心管混合均勻使之均質化後，加入 0.5 ml 氯仿，混合均勻，並靜置冰上 10 分鐘，在 4°C 下，以 10,000 rpm 離心 15 分鐘後，取上層水液層至新的離心管，加入 0.5 ml 異丙醇混合均勻後，於 -20°C 靜置 4 小時後。再於 4°C，以 10,000 rpm 離心 15 分鐘，將 RNA 離心至管底，此時為白色膠狀物，移除上層液後加入 300 μl diethylpyrocyanate-treated water (DEPC- H_2O) (AMRESCO；Solon, OH)、30 μl 3M 醋酸鈉（pH 4.6）及 750 μl 95% 酒精，混合後置於 -80°C 冰箱中沉澱至少 30 分鐘。取出後，在 4°C，以 10,000 rpm 離心 15 分鐘，後用 100 μl 70% 酒精（溶於 DEPC- H_2O ）洗去鹽類，在 4°C 下，以 10,000 rpm 離心 15 分鐘後，吸淨上層液，置於抽風櫥中乾燥 20 分鐘後，溶於 100 μl DEPC- H_2O 中。以 10 μl 10 \times DNase buffer（100 mM Tris-HCl pH8.0；50 mM NaCl；10 mM MgCl_2 ；10 mM CaCl_2 ）、5 U DNase（Promega Madison, WI）及 1 μl 10U RNase inhibitor（Invitrogen; Gaithersburg, MD），於 37°C 水浴作用約 2 小時，加入等體積 phenol/chloroform（1:1）混合，冰上靜置 10 分鐘，在 4°C 下，離心 15 分鐘後，取上清液加入 0.1 倍體積之 3 M 醋酸鈉（pH 5.2）及 2.5 倍體積之 95% 酒精，在 4°C 下，以 10,000 rpm 離心 15 分鐘後，吸淨上層液，加入 100 μl 70% 酒精（溶於 DEPC- H_2O ），混合後置於 -80°C 中沉澱至少 30 分鐘，取出，在 4°C 下，以 10,000 rpm 離心 15 分鐘後，吸淨上層液，置於

抽風櫥中乾燥 20 分鐘，溶於適量（約 30 μ l）的 DEPC- H₂O 中並讀取波長 260 nm 吸光值定量，最後取 1 μ g RNA 於 0.6% 瓊脂電泳檢視 RNA 完整性後，儲存於 -20°C。

三、反轉錄聚合酵素鏈反應

將 1 μ g total RNA 用 DEPC-H₂O 將體積稀釋至 12.5 μ l，加入 200 ng random hexamer primer (Promega; Madison, WI)，加熱至 70°C，5 分鐘後立即放在冰上，並加入 4 μ l 5 \times reverse transcriptase buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM DTT)、250 nM dNTP、1 μ l 18 U recombinant RNase inhibitor 及 1 μ l 100 U MMLV reverse transcriptase (Invitrogen; Gaithersburg, MD)，混合均勻，靜置於 37°C 作用 1 小時，以進行 cDNA 的合成再加熱至 95°C，5 分鐘以停止 cDNA 的合成反應，放在冰上冷卻，保存至 -20°C。

利用 PCR 方式放大 GAPDH 以及 MMP-9 片段，取 2 μ l cDNA 加入 2.5 μ l 10 \times buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8; 500 mM KCl; 1.2 mM MgCl₂; 1% Triton-100)，14.5 μ l 去離子水、2 μ l 5 mM dNTP、2 μ l GAPDH 引子 (5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3'; 5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3')，MMP-9 引子 (5'-CGGAGCACGGAGACGGGTAT-3'; 5'-TGAAGGGGAAGACGCACAGC-3') (Chung *et al.*, 2004)。

利用 Taq DNA polymerase 進行 PCR，大量複製 GAPDH 與片段。其反應過程簡述如下：反應混合液先至 95°C 熱浴 5 分鐘，再於 95°C 進行第一階段裂解反應 (denature) 1 分鐘，之後進行 59°C 作用 40 秒黏合反應 (annealing)；第三階段則於 72°C 進行 50 秒之延伸反應 (extension)，如此重覆此 3 階段反應共 35 個週期，最後追加 72°C 延伸反應 5 分鐘後，於 8°C 終止反應。GAPDH 放大的片段為 256 bp，MMP-9 放大的片段為 537bp，以 6% polyacrylamide 電泳分析 PCR 產物。

四、蛋白質之萃取及定量

將 1×10^6 細胞培養於 60mm 培養皿中。把培養皿中的培養液吸除，以 PBS 清洗兩次，加入 50 μ l RIPA 裂解緩衝液 (50 mM, Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 0.5% sodium deoxycholate, 1% triton X-100, 10 μ g/ml leupeptin, 20mM sodium phosphate, pH 7.0)，混合均勻後，用刮勺將培養皿內的細胞刮下，在 4°C 下，離心 12,000 轉，1 小時後，收取上清液即得細胞蛋白質。

根據 Bradford 法，以微量讀數儀測定萃取所得細胞蛋白質濃度。先將固定體積不同濃度 (62.5, 125, 175, 250 及 500 μ g/ml) 之胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 標準樣品置於內含 295 μ L 蛋白質染劑

（PIERCE protein assay dye reagent）的 96-well plate 中，欲測濃度之細胞蛋白質樣品亦加入同體積於 96-well plate 中，以微量讀數儀（microplate reader）測量波長 590 nm 之吸收值，比較其 595 nm 之蛋白質最大吸光波峰吸光度，由固定體積不同濃度（62.5，125，250，500，1,000 及 2,000 $\mu\text{g/ml}$ ）之 BSA 標準樣品，作成一條標準迴歸曲線，求得線性方程式（ $r^2 > 0.95$ 方可採用）。將欲測濃度之細胞蛋白質樣品所測得之吸光值代入公式以內插法換算其實際濃度。

五、西方轉漬法（western blot）偵測血管新生調節因子

以西方轉漬法鑑定細胞週期調控蛋白表現變化，實驗包括分析 MMP-9、 β -catenin 及 VEGF 等相關因子的調控情形。細胞經中藥複方或單方 1/100 及 1/50 倍稀釋處理後，分別於 24、48 及 72 小時處理後，吸除培養液，再用 PBS 清洗細胞兩次，以洗除殘餘的培養液。將細胞加入適量 RIPA 裂解緩衝液溶解後，使用細胞刮取器取下所有的溶解液，在 4°C 下，以 12,000 rpm 離心 30 分鐘，上清液即為蛋白質萃取液，先以 4 μl 進行定量，其餘蛋白質分裝後保存於 -20°C。

（一）膠體製備

10% separating gel, 30% acrylamide (Sigma, A3574-100ML), ddH₂O, 1.5M Tris-HCl, pH8.8 (AMRESCO, J831), 10% SDS, 10% APS (Research Organics, 9530A-1), TEMED (AMRESCO, 0761) 及 5% stacking gel (30% acrylamide, ddH₂O, 0.5M Tris-HCl, pH6.8 (AMRESCO, J832), 10% SDS, 10% APS (Research Organics, 9530A-1), TEMED。

（二）電泳轉漬

取 20 μg 蛋白質加入樣品緩衝液 (3 \times sample buffer, 350mM Tris-HCl, pH 8.8; 12% SDS; 0.02% bromophenol blue; 35% glycerol; 30% β -mercaptoethanol) 後以 95°C 煮沸 5 分鐘，置入 Stacking gel，先以電壓 50 伏特進行 30 分鐘後，再將電壓調至 120 伏特再進行電泳 90 分鐘。

（三）免疫呈色

以 transfer unit 裝置 (HOEFER; Amersham Pharmacia) 於固定電壓 45 伏特 45 分鐘後，將蛋白質由膠體轉移到硝化纖維膜 (nitrocellulose blotting membrane, BioScience) 後，將膜取出並浸泡於 blocking solution (5% skim milk in PBS-T)，於室溫下作用 1 小時後，以 PBS-T (PBS -0.5% Tween-20) 清洗 2 次，加入 1:3,000 稀釋的一級抗體，4°C 下作用 18 小時後，以 PBS-T 清洗 3 次，並

加入 1:2,000 稀釋的二級抗體，於室溫下作用 1 小時後，以 PBS-T 清洗 3 次，最後加入 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 試劑組 (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate : Luminol reagent 500 μ L + Peroxide solution 500 μ L) 避光作用 5 分鐘後，以冷光儀 (Fuji , LAS-3000) 顯影。

六、中草藥複方或單方樣品的來源

由 GMP 藥廠提供，複方內容及單方萃取液詳見附錄一。

七、細胞存活率 (MTT assay) 與分析

將 1×10^6 細胞培養於 96-well 的孔盤內，隔夜培養待細胞貼附後，加入不同濃度之中草藥萃取液，以完全培養基為溶劑稀釋中草藥為 1/1000、1/500、1/100、1/50 和 1/20 倍 (濃度經換算後分別為 1、2、10、20、50 mg/mL，唯黃連解毒湯分別為：0.5、1.1、5.4、10.1、25.2；黃連分別為：0.1、0.3、1.4、2.7、6.8；紫蘇葉分別為：0.3、0.6、2.9、5.7、14.3 mg/mL)，培養 24、48 及 72 小時後，加入 5 μ l 3- (4,5-dimethyl thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT : 5mg/mL in PBS , Sigma , M2128)，在 37°C 反應 3 小時，將孔盤內培養液吸出，再加入 100 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO , Sigma , D5879) 溶解，利用 OD₅₇₀ 測量吸光值，並以未加入細胞只加 DMSO 的孔當作空白背景值。

八、半數抑制濃度 (IC₅₀) 計算

由細胞存活率分析中得到的生長曲線圖，作成條標準迴歸曲線，求得線性方程式 ($r^2 > 0.95$ 方可採用)，同一藥物，不同時間以迴歸曲線分析。將半數細胞存活率數值 (50%) 代入公式，再以內插法換算其藥物半數抑制濃度。算出相同時間內，不同藥物之 IC₅₀ 差異。

九、細胞侵犯能力試驗 (invasion assay)

取 100 μ l Matrigel (Becton-Dickinson ; Mountain View , CA , 354234) 置於 24-well inserts (BD , 353097) 上，於 37°C 培養 30 分鐘，使其膠體活化並凝結，次將 5×10^4 細胞接種於 Matrigel 上，並在 insert 內外各加入 500 μ l 完全培養基，置入培養箱，待細胞穩定後，加入測試藥物，經 24 小時後收取下層細胞，以 trypan blue 計數。實驗結果與並與僅有溶液未加藥的控制組比較。

十、明膠酶譜法 (gelatinase zymography)

由於 matrix metalloproteinase (MMP) 具有明膠酶活性的特點，於 SDS-PAGE 中加入明膠作為其基質，利用電泳依分子量大小分離後，並去除 SDS 後，加入酵素反應緩衝液隔夜培養，後經 Coomassie Brilliant Blue

R250 染色，最後以退染劑退染，在可見光下顯影。藉以偵測 MMP-9、MMP-2 的活性。

(一)蛋白質收取與定量

將 1×10^6 細胞培養於 60 mm 培養皿中，隔夜培養後，加入適當濃度之待測藥物，藥物處理一天後，收取培養液，在 4°C 下以 1000 轉離心，收取上清液即得所需之蛋白質。

(二)膠體製備

內含 0.1% 明膠 (Sigma, G3144-100G) 的 10% separating gel (配方如前述)。

(三)電泳

取 5 μl 蛋白質加入樣品緩衝液 (4 \times sample buffer, 1 Tris-HCl, pH6.8, 40% SDS, 0.5% Bromophenol blue, 20% Glycerol)，混和均勻並以 55°C 活化 5 分鐘後放在冰上靜置 5 分鐘，置入 Separating gel，以電壓 85 特進行 2 小時 30 分鐘電泳。

(四)呈色

電泳結束後取出膠片，以 2.5% Triton X-100 在室溫下搖晃清洗 30 分鐘，後加入 100 μl 反應緩衝液 (0.05 M Tris-HCl, pH 8.8, 5 mM CaCl_2 , 0.02% NaN_3) 在 37°C 恆溫箱作用 16 小時，取出膠片以 Coomassie Brilliant Blue R250 染色 3 小時，後以退染劑 (45% ethanol, 10% acetic acid) 退染，最後用二次水清洗並浸泡，以可見光顯影。

十一、資料分析 (data analysis)

利用 SigmaPlot 統計軟體 (Ver 8.0) 利用 student *t*-test 分析，當 $p < 0.05$ 表具顯著差異。

參、結果

一、中草藥複方對肝癌細胞增生的影響

(一) 小柴胡湯

由 MTT assay 測試細胞相對存活率的結果顯示，分別使用小柴胡湯水萃取液（圖一（A））1、2 和 10 mg/mL 處理 24、48 小時後，HepG2 細胞生長約增加 20% ($p>0.5$)，但是當濃度增至 20 及 50 mg/mL 後，細胞生長漸受抑制。當以 50 mg/mL 處理 24、48、72 小時之後，細胞存活率僅有 38%、20% 及 15% ($p<0.001$) 的。其 IC_{50} 亦隨時間增加由 36.7mg/mL 降至 25.8mg/mL（表一）。

次以 1 和 2mg/mL 小柴胡湯酒精萃取（圖一（B））處理 24、48 及 72 小時之後，也會讓 HepG2 細胞增生 30% ($p>0.5$)，但分別以 10、20 及 50 mg/mL 處理 48 小時後細胞存活率均降至 50% 以下 ($p<0.01$)。而 IC_{50} 隨時間增加由 49.4mg/mL 降至 36.5mg/mL。

(二) 柴胡加龍骨牡蠣湯

使用柴胡加龍骨牡蠣湯（圖一（C））1 和 2 mg/mL 處理 24 小時後也會讓 HepG2 細胞生長率增加至 32% ($p<0.05$)，但分別以 10、20 及 50 mg/mL 處理 72 小時，其存活率則逐漸遞減至 60% 以下 ($p<0.01$)。其 IC_{50} 從 24 小時的 61.9mg/mL 略增至 63.3mg/mL。

(三) 核桃承氣湯

使用核桃承氣湯（圖一（D））2 和 10 mg/mL 處理 24 小時後，HepG2 的生長率分別增加 40% ($p<0.05$) 及 22% ($p<0.001$)，而以 1、2、10mg/mL 處理 24、48 及 72 小時後，細胞存活率則維持在 80%。但以 10 和 20mg/mL 處理 72 小時後，其存活率逐漸遞減 50% 以下 ($p<0.05$)。因此可以估計， IC_{50} 隨時間增加由 156.4mg/mL 降至 51.5mg/mL。

(四) 半夏厚朴湯

使用半夏厚朴湯（圖一（E））1、2、10 和 20mg/mL 處理 HepG2 細胞 24、48 及 72 小時後，細胞存活率仍停滯於 70%，但以 50mg/mL 處理 48 小時後，其存活率逐漸遞減至 50% 以下 ($p<0.01$)。 IC_{50} 亦隨時間增加由 47.2mg/mL 降至 27.4mg/mL。

由複方實驗結果顯示，使用小柴胡湯、柴胡加龍骨牡蠣湯、核桃承氣湯及半夏厚朴湯可以抑制 HepG2 細胞生長，而且其效應隨時間與劑量的增加都有明顯的效應，但在低劑量時，則反而會促進細胞生長。

二、由肝癌細胞增生與血管新生因子的變化，鑑定中草藥複方所含的有效單方

(一)香蘇散的鑑定：

使用複方香蘇散（圖一（F））1、2 mg/mL 時處理 24、48 小時，會使 HepG2 細胞生長增加 20% ($p>0.5$)，但是使用 10 mg/mL 處理 24、48 或 72 小時後，細胞存活率降為 50% 以下，且生長抑制效應隨時間與濃度的增加而顯著下降 ($p<0.01$)，而以 50mg/mL 處理 72 小時存活細胞僅剩餘 10% ($p<0.05$)。其 24、48 及 72 小時之 IC_{50} 皆低於 35mg/mL。但是 Huh 7 細胞（圖二（A））以 1mg/mL 的香蘇散處理 24、48 及 72 小時後，細胞生長抑制情形不明顯 ($p>0.5$)，但是以 2mg/mL 處理 48 小時後細胞存活率為 82% ($p<0.01$)，但當濃度增至 10mg/mL 處理 24 小時後，細胞存活率會降至 32% 以下，其效應隨濃度與時間的增加呈顯著的變化 ($p<0.001$)。但以 20mg/mL 時細胞存活率，於不同時間均停滯在 8-15% 之間 ($p<0.001$)。 IC_{50} 隨時間增加由 26.5mg/mL 降至 21.3mg/mL (表三)。

實驗也以加入香蘇散 (20mg/mL)，觀察 HepG2 (圖三) 與 Huh 7 細胞 (圖五) 的細胞侵犯能力的變化，這可以利用細胞通過 MatriGel 與 8 μ m 的孔隙穿透至孔盤下層貼附情形作比較。相較於控制組，細胞處理 24 小時後，其穿透率分別降至 45% (HepG2, $p<0.01$) 和 48% (Huh 7, $p<0.01$)。

由西方轉漬法顯示，以香蘇散 (10mg/mL) 處理 HepG2 細胞 24 及 48 小時後，VEGF 與 MMP-9 表現有隨時間而遞減 (圖六)。但是對於 Huh 7 細胞則其表現無明顯變化 (圖八)。實驗也顯示香蘇散抑制 MMP-9 之 RNA (圖十)。實驗也利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之 MMP-9 和 MMP-2 活性變化。香蘇散也會抑制這兩種酵素活性 (圖十一)。

(二)香蘇散的有效單方是紫蘇葉

香蘇散之單方紫蘇葉在低濃度 (2.9 mg/mL 的紫蘇葉相當於 10 mg/mL 香蘇散中的含量) 處理後，HepG2 細胞存活率隨時間增加而遞減，其中以 5.7、14.3mg/mL 紫蘇葉處理 48 小時後，細胞存活率就已經低於 50% ($p<0.05$)，而以 14.3mg/mL 處理 24、48、72 小時，細胞存活率分別降至 45% ($p<0.001$)，38% ($p<0.001$) 及 18% ($p<0.01$)。而香蘇散的其餘單方物質，包括香附、炙甘草和陳皮則不具生長抑制的能力 (結果未呈現)。紫蘇葉無論 24、48 及 72 小時處理之後，其生長抑制增至 60%，其 IC_{50} 小於 12mg/mL (表

二)。

實驗也利用 Huh 7 細胞株（圖二（C）），由結果顯示，於低濃度（1 mg/mL 以下）處理 48 小時後，細胞生長約增加 10% ($p < 0.05$)，但是在 2.9mg/mL 處理後，細胞存活率會隨濃度增加，生長抑制的情形會愈為顯著 ($p < 0.01$)；以 5.7mg/mL 處理 24 小時，細胞存活率降至 85% ($p < 0.01$)；以 14.3mg/mL 處理 24、48 和 72 小時細胞存活率分別為 39% ($p < 0.001$)、21% ($p < 0.01$) 及 17% ($p < 0.01$)。IC₅₀ 變化與 HepG2 細胞類似（表三）。

分析細胞侵犯能力的變化，分別加入紫蘇葉（5.7 mg/mL）至 HepG2 與 Huh 7 細胞處理 24 小時後，細胞轉移速率分別為控制組的 25% ($p < 0.01$ ，圖三) 和 51% ($p < 0.01$ ，圖五)，香蘇散其餘單方物質：炙甘草（2.8mg/mL）及陳皮（1.4mg/mL）（圖三（B））則細胞穿透率降至 59% 和 64% ($p < 0.01$)。與單方陳皮相較，紫蘇葉中的香蘇散有顯著抑制肝癌細胞侵犯的能力。

檢視明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶（MMP-9 和 MMP-2）活性分析結果，發現紫蘇葉也能抑制此兩種明膠酶之前驅物相對活性（圖十一）。而西方轉漬法結果顯示 HepG2 細胞（圖六）以紫蘇葉（2.9mg/mL）處理 24 及 48 小時後，VEGF 的表現有隨時間的增加而遞減。對於 Huh 7 細胞同樣能抑制 β -catenin 的表現。

(三)黃連解毒湯的有效物質是黃連

以 5.4 及 25.2mg/mL 黃連解毒湯處理 HepG2 細胞 24 小時之後，細胞存活率分別降至 83% ($p < 0.01$) 和 15% ($p < 0.001$)（圖一（G））；處理 48 小時以後細胞存活率則低於 75%，而且隨著濃度的增加而遞減 ($p < 0.05$)。此外以 1.1 和 10.1 mg/mL 處理 72 小時後存活率均降至 55% 以下 ($p < 0.01$)：以 25.2mg/mL 處理 HepG2 細胞 24、48 和 72 小時後，細胞存活率分別為 15%、10% 和 5% ($p < 0.001$)。

以 0.5mg/mL 黃連解毒湯處理 Huh 7 細胞株 24 小時後細胞存活率降至 80% 以下（圖二（B）），其效應隨濃度與時間的增加，愈見明顯 ($p < 0.05$)；以 5.4mg/mL 處理 24 小時後細胞存活率就已經低於 60% ($p < 0.05$)，而 72 小時之細胞存活率降至 40% 以下 ($p < 0.05$)。IC₅₀ 變化與 HepG2 細胞相似。此外 HepG2（圖三）與 Huh 7 細胞（圖五），加入黃連解毒湯（10.1mg/mL）處理 24 小時後，細胞侵犯能力分別降低為控制組的 50% ($p < 0.01$) 和 59% ($p < 0.01$)。

由西方轉漬法結果顯示 Huh 7 細胞（圖八）以黃連解毒湯

(5.4mg/mL) 處理 24 及 48 小時後， β -catenin 的表現有隨時間的增加而遞減。此外利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶 (MMP-9 和 MMP-2) 活性 (圖十一)，發現以黃連解毒湯 (5.4mg/mL) 處理 48 小時後，使此兩種明膠酶的活性也會降低。

(四)黃連的分析

黃連能顯著地抑制 HepG2 細胞之生長，以 0.1mg/mL 處理 24 小時細胞存活率僅剩 60%，當濃度增至 1.4、2.7 及 6.8mg/mL 後，其存活率分別下降至 31% ($p<0.05$)、21% ($p<0.001$) 及 8% ($p<0.001$)。其效應隨時間與濃度增加有顯著的變化 (圖一 (I))。其單方成分山梔子則不具生長抑制效力 (結果未呈現)。以黃連處理 24、48 及 72 小時，各時間之 IC_{50} 皆低於 3mg/mL。

此外利用 Huh 7 細胞株以不同濃度處理 24 小時後，細胞存活率降至 80% 以下 (圖二 (D))；48 小時處理後細胞存活率降至 40% 以下 ($p<0.01$)；72 小時處理後細胞存活率降至 25% 以下 ($p<0.01$)。以 1.4mg/mL 處理 24 小、48 及 72 時後，細胞存活率分別降至 68% ($p<0.01$)、38% ($p<0.01$) 及 19% ($p<0.001$) 其效應隨濃度與時間的增加，呈顯著的變化。 IC_{50} 變化與 HepG2 細胞相近。

分別以黃連 (2.7mg/mL)，HepG2 (圖三) 與 Huh 7 細胞 (圖五) 處理後細胞侵犯能力的改變，24 小時分別是控制組的 55% ($p<0.01$) 和 47% ($p<0.01$)。

由西方轉漬法結果顯示 HepG2 細胞 (圖六) 與 Huh 7 細胞 (圖八) 以黃連 (1.4 mg/mL) 處理 24 及 48 小時後，能降低 β -catenin 與 MMP-9 的表現，且具時間增加而遞減。利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶 (MMP-9 和 MMP-2) 活性 (圖十一)，發現以黃連處理 48 小時後，這兩種蛋白質的活性會降低。

三、中草藥單方對肝癌細胞增生與血管新生的影響

(一)石上柏

以石上柏 (圖一 (J)) 2 mg/mL 處理 HepG2 細胞 48 小時後，細胞存活率降至 60% 以下，其效應隨時間與濃度的增加而有顯著的影響 ($p<0.05$)。 IC_{50} 亦隨時間增加由 47.3mg/mL 降至 7.5mg/mL (表二)。

此外使用 Huh 7 細胞 (圖二 (E)) 則是 20 及 50 mg/mL 處理後，細胞存活率降至 72% 以下，以 50 mg/mL 處理 72 小時後，存活細胞率降至 38% ($p<0.001$)，且生長抑制的效應隨時間與濃度的增加而有顯著的變化 ($p<0.05$)。因此可以推斷 IC_{50} 隨時間增加由

71.5 mg/mL 降至 38.5mg/mL（表三）。

加入石上柏（20mg/mL）至 HepG2（圖四）與 Huh 7 細胞（圖五），處理 24 小時後，可以推斷細胞侵犯能力分別是控制組的 56.3%（ $p<0.01$ ）和 60%（ $p<0.01$ ）。

由西方轉漬法顯示 HepG2 細胞（圖七）與 Huh 7 細胞（圖九），以石上柏（10mg/mL）處理 24 及 48 小時後，VEGF、MMP-9 與 β -catenin 的表現程度皆沒有顯著變化，因此可以推論石上柏的生長抑制與細胞血管新生的關聯性較低。

（二）夏枯草

以夏枯草（圖一（K））1mg/mL 處理 HepG2 細胞 48 小時後，細胞存活率即可至 60% 以下，其效應隨時間與濃度的增加而有顯著的變化（ $p<0.05$ ）。且 72 小時之後，不同濃度均可使細胞存活率下降至 40% 以下（ $p<0.01$ ）。 IC_{50} 隨時間增加由 33.1mg/mL 降至 21.3mg/mL。而以 2mg/mL 夏枯草處理 Huh 7 細胞（圖二（F））48 和 72 小時後細胞存活率降至 82% 和 78%（ $p<0.05$ ），不同施藥濃度處理 48 小時後細胞存活率降至 80% 以下，其中 10mg/mL 處理後細胞存活率降至 50% 以下，其效應隨時間與濃度的增加有顯著的變化（ $p<0.01$ ）。可以推測 IC_{50} 亦隨時間增加由 38.8mg/mL 降至 25.3mg/mL。

以夏枯草（20mg/mL）處理 HepG2（圖四）與 Huh 7 細胞（圖五）24 小時後，細胞的侵犯能力分別是控制組的 63.4%（ $p<0.01$ ）和 64%（ $p<0.01$ ）。

由西方轉漬法顯示，夏枯草（10mg/mL）處理 24 及 48 小時後，HepG2 細胞（圖七）與 Huh 7 細胞（圖九），VEGF 的表現皆隨時間的增加而遞減。

（三）鴨膽子

以不同濃度鴨膽子（圖一（L））處理 HepG2 細胞，24 小時後細胞存活率會降到低於 80%（ $p<0.01$ ），處理 48 及 72 小時後，所有濃度皆會使細胞存活率低於 40%（ $p<0.001$ ），但抑制細胞生長之存活率維持於 30-40% 之間。其 IC_{50} 隨時間的增加由 52.8mg/mL 降至 27.6 mg/mL。

鴨膽子（圖二（G））1mg/mL 處理 Huh 7 細胞 24、48 及 72 小時使細胞存活率分別降至 50%（ $p<0.05$ ）、42%（ $p<0.001$ ）及 20%（ $p<0.001$ ）以下，以不同施藥濃度處理 48 小時後，細胞存活率降至 40% 以下（ $p<0.001$ ），並隨時間與濃度的依賴關係遞減。 IC_{50} 也

隨時間增加從 31mg/mL 降至 2.1mg/mL。

鴨膽子（20mg/mL）處理 24 小時後，HepG2 細胞（圖四）的侵犯能力（細胞穿透率）是控制組的 48%（ $p < 0.01$ ）。

由西方轉漬法結果顯示，鴨膽子（10mg/mL）處理 24 及 48 小時後，HepG2 細胞（圖七）與 Huh 7 細胞（圖九）MMP-9 及 β -catenin 的表現有隨時間而遞減。進一步利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶（MMP-9 和 MMP-2）活性（圖十二），發現以鴨膽子處理 48 小時後，明膠酶活性接受到抑制抑制。

(四)山慈菇

以山慈菇（圖一（M））處理 HepG2 細胞 24 小時後，所使用各個濃度皆對細胞生長均有不同程度的抑制（ $p < 0.01$ ），以 20mg/mL 處理 48 小時後細胞存活率降至 55% 以下，其效應隨時間與濃度的增加有顯著的改變（ $p < 0.01$ ）。 IC_{50} 隨時間增加由 48.2mg/mL 降至 27.3mg/mL。對於 Huh 7 細胞（圖二（H）），除了以 50mg/mL 處理 72 小時細胞存活率降低至 82%（ $p < 0.05$ ）以外，其餘濃度與時間均無生長抑制的效應。估計 IC_{50} 隨時間增加由 140.9mg/mL 改變為 120mg/mL。

當使用 HepG2 細胞，加入山慈菇（20mg/mL）處理 24 小時後，侵犯能力沒有顯著差異（ $p > 0.5$ ）（圖四）。

由西方轉漬法結果顯示，山慈菇（10mg/mL）處理 24 及 48 小時後，對於 HepG2 細胞（圖七）與 Huh 7 細胞（圖九）MMP-9 及 β -catenin 的表現沒有變化。

(五)苦參

以苦參（圖一（N））處理 HepG2 細胞 24 小時後各個濃度均具生長抑制之效果（ $p < 0.05$ ）。實驗以 10、20 和 50mg/mL 處理 48 小時後細胞存活率至 60% 以下，其效應隨時間與濃度的增加而有顯著的變化（ $p < 0.05$ ）。以 50mg/mL 處理 72 小時後細胞存活率為 28%（ $p < 0.01$ ）、26%（ $p < 0.01$ ）及 18%（ $p < 0.001$ ）。 IC_{50} 隨時間增加由 32.1mg/mL 降至 25.5mg/mL。

對於 Huh 7 細胞（圖二（I））處理 24 小時，細胞無顯著生長抑制之效（ $p > 0.5$ ），以 2mg/mL 處理 48 小時後，細胞存活率降低至 85% 以下，至 50mg/mL 時隨時間增加細胞存活率降低至 45% 以下（ $p < 0.05$ ），其效應隨時間與濃度的依賴關係遞減（ $p < 0.05$ ）。 IC_{50} 由 41.4mg/mL 降至 26.8mg/mL。

以苦參（20 mg/mL）處理 24 小時後，HepG2 細胞（圖四）的

侵犯能力（細胞穿透率）為控制組的 49% ($p < 0.01$)。

由西方轉漬法結果顯示，苦參 (10mg/mL) 處理 24 及 48 小時後，對於 Huh 7 細胞 (圖九) 的 MMP-9 及 β -catenin 表現隨時間依賴的關係而呈遞減的趨勢。進一步利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶 (MMP-9 和 MMP-2) 活性 (圖十二)，發現苦參處理 48 小時後，能抑制明膠酶的活性。

(六)黃獨

以 10mg/mL 黃獨 (圖一 (O)) 處理 HepG2 細胞在 24 小時後，其存活率降低至 60% 以下，其生長抑制現象會隨著濃度與時間的增加而愈見顯著 ($p < 0.01$)。以 10mg/mL 黃獨處理 72 小時後，細胞存活率分別為 26%、18% 及 21% ($p < 0.001$)。IC₅₀ 隨時間增加由 47.7mg/mL 降至 25.2mg/mL。此外以黃獨 (圖二 (J)) 處理 Huh 7 細胞 48 小時後，細胞存活率降至 82% 以下，其中以 50mg/mL 處理 72 小時後，細胞存活率會低於 30%，與 HepG2 細胞相似，其效應隨時間與濃度的增加而有顯著的變化 ($p < 0.01$)。IC₅₀ 亦隨時間增加由 71mg/mL 降至 34.4mg/mL。

以 20mg/mL 黃獨處理 HepG2 細胞 24 小時後，(圖四) 其侵犯能力改變，與控制組比較，細胞穿透率會低於 52% ($p < 0.01$)。

由西方轉漬法結果顯示，以 10mg/mL 黃獨處理 24 及 48 小時後，對於 HepG2 細胞 (圖七) 的 VEGF 與 β -catenin 表現量會隨處理時間的增加而遞減。

肆、討論

一、小柴胡湯

過去的研究顯示，由動物模式證明，小柴胡湯能減緩肝發炎以及纖維化的程度，但卻無法改善嚴重的肝硬化（Kusunose *et al.*, 2002）。此外小柴胡湯抑制肝臟星狀細胞活化，避免胞外基質修飾造成的肝傷害與纖維化作用（Yoshiji *et al.*, 2003）。另有研究指出，小柴胡湯能與細胞色素（cytochrome P450, CYP）的CYP3A4, CYP2C9 and CYP1A2作用（Takahashi *et al.*, 2003）。

本實驗以過去已知對於肝病有所助益的小柴胡湯作為控制組，早先實驗首先顯示，小柴胡湯無論以水或酒精萃取均能達到抑制肝癌細胞生長的能力，IC₅₀皆有顯著的變化（數據未附）。證明小柴胡湯也能抑制肝癌細胞生長及MMP-9表現的能力，可能具有抑制肝癌侵犯轉移的能力。

二、香蘇散

香蘇散可以有效抑制肝癌細胞生長，這可以由顯著IC₅₀的變化看出來（<35mg/mL）。亦可降低其侵犯能力，另一等量單方物質香附則無法使細胞存活率降至50%，炙甘草與陳皮亦同。因此，推論紫蘇葉為香蘇散中有效單方物質。而香蘇散中單方萃取物炙甘草與陳皮雖無法顯著的抑制肝癌細胞生長，但也能抑制細胞侵犯能力。

由MMP-9的RNA、蛋白質及活性的表現測試，推論香蘇散是具有抑制血管新生潛力的中草藥物，透過抑制細胞MMP-9之RNA、蛋白質表現量以及其活性，同時也可以抑制MMP-2活性，以達到抑制侵犯和轉移的功能。

利用HPLC分析香蘇散成份亦得到數種自然存在的多酚物質，如：1.咖啡酸（Caffeic acid，來自紫蘇葉），2.迷迭香酸（Rosmarinic acid，來自紫蘇葉）3.甘草素（Liquiritigenin，來自炙甘草），4.甘草甜素（Glycyrrhizin，來自炙甘草），5.甘草苷（Liquiritin，來自炙甘草），6.柚皮元（Narirutin，來自陳皮），7.柑橘類黃酮（Hesperidin，來自陳皮）（Hayasaki *et al.*, 2007），其中，咖啡酸能促進結腸癌細胞凋亡（Xiang *et al.*, 2006），藉由阻斷STAT3相關的路徑以抑制腎癌細胞VEGF表現（Jung *et al.*, 2007），並促進肝癌內皮細胞凋亡以抑制血管新生（Xu *et al.*, 2006），此外，可能由於炙甘草和陳皮中含有多種多酚物質（如：甘草素、甘草苷或柚皮元、柑橘類黃酮），雖無法抑制HepG2細胞生長但仍可降低侵犯能力。

從香蘇散含有數種多酚物質可知除抗氧化的能力外，未來應可研究其對於抑癌及血管新生相關路徑的影響。

三、紫蘇葉

本實驗顯示，紫蘇葉之IC₅₀值低於香蘇散，IC₅₀小於12mg/mL，且紫蘇

葉的侵犯能力抑制幅度大於香蘇散，與陳皮相比亦有顯著差異。紫蘇葉為單方萃取物中抑制細胞侵犯力最為顯著之草藥。紫蘇葉雖沒有明顯抑制MMP-9蛋白質的效應，但可降低MMP-9和MMP-2的活性，亦能抑制VEGF蛋白質表現，以達到抑制侵犯和轉移的功能。推論紫蘇葉為對抗血管新生的潛力中藥。

過去文獻顯示，紫蘇葉萃取物於105 mg/mL可以增加肝癌細胞細胞凋亡相關基因表現（Lin *et al.*, 2007），本研究顯示，以紫蘇葉14.3 mg/mL處理24小時後，使細胞存活率低於50%，推測也是由於啟動細胞凋亡相關的機制。

另有研究指出，紫蘇葉與夏枯草內含的迷迭香酸這類多酚物質具有保肝、抑制癌細胞生長的藥理潛力（al-Sereiti *et al.*, 1999）並能抑制活性氧屬（reactive oxygen species, ROS）生成，治癒因黃麴毒素誘發引起的肝傷害（Renzulli *et al.*, 2004）還可以抑制肝癌生長及促進細胞凋亡的功能（Lin *et al.*, 2007）且為uPA抑制劑的一種（Jankun *et al.*, 2006）。此外，紫蘇葉（Banno *et al.*, 2004）與夏枯草（Zhang *et al.*, 2008）亦含具抑癌作用的三萜類（triterpenoid）物質。

本實驗中顯示，紫蘇葉除能抑制肝癌細胞生長外也是抗血管新生的潛力藥物。未來，可進一步純化分離紫蘇葉萃取出高純度之迷迭香酸等化合物以利研究之用。期待亦能有效延緩並治療其他癌症。

四、黃連解毒湯

本實驗證明，黃連解毒湯對於HepG2與Huh 7細胞株生長抑制效力顯著，IC₅₀均小於4mg/mL，IC₅₀值隨時間增加而下降。深入探討複方中有效物質之後發現，黃連之IC₅₀值低於黃連解毒湯，且IC₅₀值小於4mg/mL，另一單方山梔子於72小時實驗中均無法有效使細胞存活率低於50%，因此推論黃連為黃連解毒湯之有效單方物質。黃連解毒湯不止能抑制肝癌細胞生長亦可藉由降低β-catenin的表現以抑制細胞侵犯能力。

過去利用細胞及動物的實驗均證明，黃連解毒湯能肝癌生長停滯並促進細胞凋亡（Hsu *et al.*, 2008）。從黃連解毒湯中分離出的黃芩素Baicalein，亦能抑制骨髓瘤細胞增生與促進細胞凋亡（Ma *et al.*, 2005）。本實驗亦有相似結果，顯示黃連解毒湯為一抗癌潛力藥物，除了黃芩以外，黃連亦能具相明顯的生長抑制能力。

未來可就其對於肝病方面的改善，與各個單方物質做進一步的比較，探討其作用機轉。

五、黃連

本實驗中，黃連除了能抑制肝癌細胞生長，對於細胞侵犯能力改變幅度與黃連解毒湯相近。針對血管新生相關蛋白質表現部分，黃連亦能抑制

肝癌細胞MMP-9的表現，且能抑制Huh 7細胞 β -catenin的表現以達到降低細胞侵犯能力的效應。

過去研究指出，黃連中的植物鹼（alkaloid）能抑制因幽門螺旋桿菌引起的正常胃壁上皮細胞凋亡（Lu *et al.*, 2007）。黃連萃取物在無細胞毒性的劑量下對於由VEGF誘發血管內皮細胞的生長、通透性、移行能力、管狀型態形成能力等血管新生作用皆有抑制效果（成，2006），也具有抑制Akt及ERK的磷酸化作用及促使NF- κ B luciferase reporter的活化，達到抑制蝕骨細胞形成的效果（Hu *et al.*, 2008）。以HPLC 分析黃連發現，其中的黃連素（berberine），能促進神經瘤細胞停滯於G1期，藉由粒線體途徑導致細胞凋亡（Eom *et al.*, 2008）並能減少hypoxia induced factor-1 α （HIF-1 α ）表現以抑制肝癌血管新生（Lin *et al.*, 2004），本研究也證明，黃連能有效抑制肝癌細胞生長並且具有高度敏感性。主要以降低MMP-9與 β -catenin表現以減緩血管新生之進程。但是，對於VEGF的抑制效應並不明顯，可能由於施藥濃度較低或是實驗時間不足。

未來可針對黃連能抑制基質侵犯之特性，深入分析並探討其他基因或是相關路徑的機制，透過實證醫學的進步開發出具抑制血管新生潛力的中藥。

六、夏枯草

本研究發現，夏枯草之IC₅₀值略高於紫蘇葉，IC₅₀小於39mg/mL，但亦能抑制細胞生長與侵犯能力。可能不需經過p53依賴就能抑制兩種肝癌細胞株增生。亦可透過降低HepG2細胞之VEGF表現，以抑制血管新生。

過去對於夏枯草研究多半在免疫相關的研究，包括：作為免疫抑制劑（Fang *et al.*, 2005）、抗疱疹病毒（Ryu *et al.*, 2000）及抗氧化的研究（Liu *et al.*, 2000）。並能對抗多環性芳香化合物誘發的突變性（Lee and Lin *et al.*, 1988），本實驗顯示夏枯草對於肝癌細胞株也有高敏感性，但隨時間增加IC₅₀值差異不大。施藥時間需超過72小時方能顯著的抑制生長。

未來可就與紫蘇葉成分相同之迷迭香酸與三萜類等化合物，進一步利用分子與細胞生物學的技术，證明抑制血管新生的相關路徑。

七、鴨膽子

本研究顯示，鴨膽子對於肝癌細胞株有抑制細胞增生的效果。過去研究指出，鴨膽子有抑癌效應（Lee *et al.*, 1984）可以抑制非小細胞型肺癌、肝癌及乳癌細胞增生，且透過活化caspase-3的粒線體路徑達到細胞凋亡的效應（Lau *et al.*, 2005），鴨膽子也能誘發胰腺癌細胞凋亡並具細胞毒性（Lau *et al.*, 2008）。亦有研究自鴨膽子分離出十種生物活性成分，包括：flazin，bruceine（鴨膽子苦素），yadanziolide，bruceoside（鴨膽子甙），yadanziolide，

yadanzigan, glycerol 1,3-bisoleate (1,3-甘油油酸雙酯), azelaic acid (杜鵑花酸), (+/-)-8-hydroxyhexadecanoic acid ((+/-)-8-羟基十六酸) 以及 vanillin (香蘭素), 這些成分均能促進血癌細胞分化, 以及抑制 cyclooxygenase-1 (COX-1)、-2 (COX-2) (Su *et al.*, 2002), 另外含有 quassinoid glucoside 可抑制 KB、A-549、RPMI 與 TE-671 癌細胞生長 (Fukamiya *et al.*, 1992)。

本研究顯示鴨膽子能抑制肝癌細胞株生長, 於 HepG2 與 Huh 7 細胞之 IC_{50} 分別小於 31 和 52.8 mg/mL, 因此可以推斷鴨膽子可能不需經過 p53 依賴就能抑制肝癌細胞株增生。此外研究顯示細胞侵犯能力也降低至 60%, 這種現象可能是藉由抑制 MMP-9 與 β -catenin 達到抑制轉移與侵犯的效應。未來應自動物模式對鴨膽子抑制血管新生有更清晰的認識。

未來, 可由鴨膽子中數種化合物逐一分析與篩選出具有抑癌轉移的物質及完整的動物模式探討, 發展更完整的中藥實證。

八、山慈菇

山慈菇能抑制肝癌 HepG2 細胞株增生, 其 IC_{50} 小於 48.2 mg/mL, 但是對於 HepG2 細胞侵犯能力的改變不明顯。而對 Huh 7 幾乎沒有任何效應, IC_{50} 約在 178 mg/mL, 可能示 p53 表型的差異, 造成生長效果的不同。

九、苦參

苦參能抑制肝癌細胞株生長, HepG2 與 Huh 7 之 IC_{50} 分別小於 37.5 和 41.4 mg/mL, 兩細胞株間 IC_{50} 差異不大, 細胞侵犯能力約降至 55%, 同時藉由抑制 Huh 7 之 MMP-9 與 β -catenin 達到抑制轉移與侵犯的效應。

過去文獻, 自苦參分離出十種異戊烯基黃烷酮 (prenylflavanones), 這些成分具有抗菌、抗病毒也有腫瘤特異性的細胞毒性, 顯示異戊烯基黃烷酮類化合物具醫藥上的價值 (Shirataki *et al.*, 2001), 本研究顯示苦參可能藉由此類化合物達到抑制肝癌細胞生長, 以及抑制 Huh 7 細胞 MMP-9 之活性與表現。

未來, 可由苦參之異戊烯基黃烷酮逐一分析與篩選出具有抑癌轉移的成分, 或進一步加強度模式的研究, 發展出更完整的中藥實證。

十、黃獨

黃獨能抑制肝癌 HepG2 與 Huh 7 細胞株生長, HepG2 與 Huh 7 之 IC_{50} 分別小於 47.7 和 75.5 mg/mL, 對於 HepG2 細胞較為敏感, 細胞侵犯能力約降至 45%, 同時藉由抑制 HepG2 之 MMP-9 與 VEGF 達到抑制侵犯與血管新生的效應。

動物實驗證明, 以石油醚萃取黃獨所分離出的疏水性物質具有抗肝癌作用且對肝癌細胞有毒性 (Yu *et al.*, 2004)。黃獨分離出的多醣體亦能抑制癌細胞生長 (Zhang *et al.*, 2007), 黃獨可能藉由此種多醣體, 達到抑制肝癌

細胞生長、侵犯與血管新生的效應。

未來，可以不同溶劑萃取黃獨，並分離純化其中化合物，深入分析並探討是否能以其他基因或是相關路徑的機制，達到抑癌的功效。

相關血管增生因子的變化

實驗結果顯示，黃連會抑制HepG2與Huh7兩種細胞 β -catenin的表現與MMP-9的活性，而黃連也會抑制Huh7細胞MMP-9的表現與活性。因此可以推測黃連抑制不同肝癌細胞所引發得的機制不同，在野生型p53的HepG2細胞，其抑制轉移機制以降低MMP-9活性為主。但是在突變型p53的Huh7細胞，其抑制轉移效應，以降低 β -catenin表現為主。

實驗結果也顯示，單方試劑，包括夏枯草與黃獨會抑制會抑制 HepG2細胞VEGF的表現，而鴨膽子與苦參會抑制HepG2與Huh7兩種細胞MMP-9之表現，這可以說明這兩種單方對MMP-9活性改變的原因，此外與細胞轉移相關的 β -catenin也相對降低，這也許說明了鴨膽子與苦參為什麼會抑制肝癌細胞移轉速率降低的原因。未來宜再做進一步分析，可對中草藥血管影響增生因子的調控有進一步瞭解。

伍、結論與建議

由草藥或可食用植物萃取具有預防癌症的化合物，蘊含廣大的潛力。由於目前臨床使用之化療藥物費用昂貴且副作用大，而抗血管新生藥物屬 cytostatic 藥物，其作用方式異於抗癌之化學治療藥物(屬 cytotoxic 藥物)，急性副作用較低，也能避免抗藥性的問題，此外中草藥亦為藥膳食補的一種，細胞毒性較低，示一個值得投入的研究領域，更是適合東方人療效的發展目標。由目前研究結果顯示，中藥單方的紫蘇葉、夏枯草、苦參及鴨膽子能對抗肝癌細胞增生、轉移侵犯與血管新生的能力有顯著效果，未來，可以探討其抑癌作用相關機轉，並進一步分離純化其有效化合物，發展更清晰血管新生的細胞模式，期待能進入動物實驗與臨床應用，並從食用植物中分離出潛力化合物。

利用現代基因科技研發有醫療功效的中草藥，探討中草藥與癌症的交互作用、並以細胞及分子生物學研究印證中醫藥理論，可作為新興醫藥研究發展方向。

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-205 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. Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, and Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs* 1997; 79: 233-69.
2. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, and Harmey JH: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9: 777-94.
3. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, and Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D: Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383: 73-5.
4. Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, and Kim CH: Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *Faseb J* 2004; 18: 1670-81.
5. Cristofanilli M, Charnsangavej C, and Hortobagyi GN: Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 415-26.
6. Denekamp J: Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* 1984; 23: 217-25.
7. Drake CJ, LaRue A, Ferrara N, and Little CD: VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. *Dev Biol* 2000; 224: 178-88.
8. Eom KS, Hong JM, Youn MJ, So HS, Park R, Kim JM, and Kim TY: Berberine induces G1 arrest and apoptosis in human glioblastoma T98G cells through mitochondrial/caspases pathway. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 558-62.
9. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, and Risau W: Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 13): 1853-65.
10. Fang X, Chang RC, Yuen WH, and Zee SY: Immune modulatory effects of *Prunella vulgaris* L. *Int J Mol Med* 2005; 15: 491-6.
11. Fidler IJ: The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 2002; 70: 498-505.

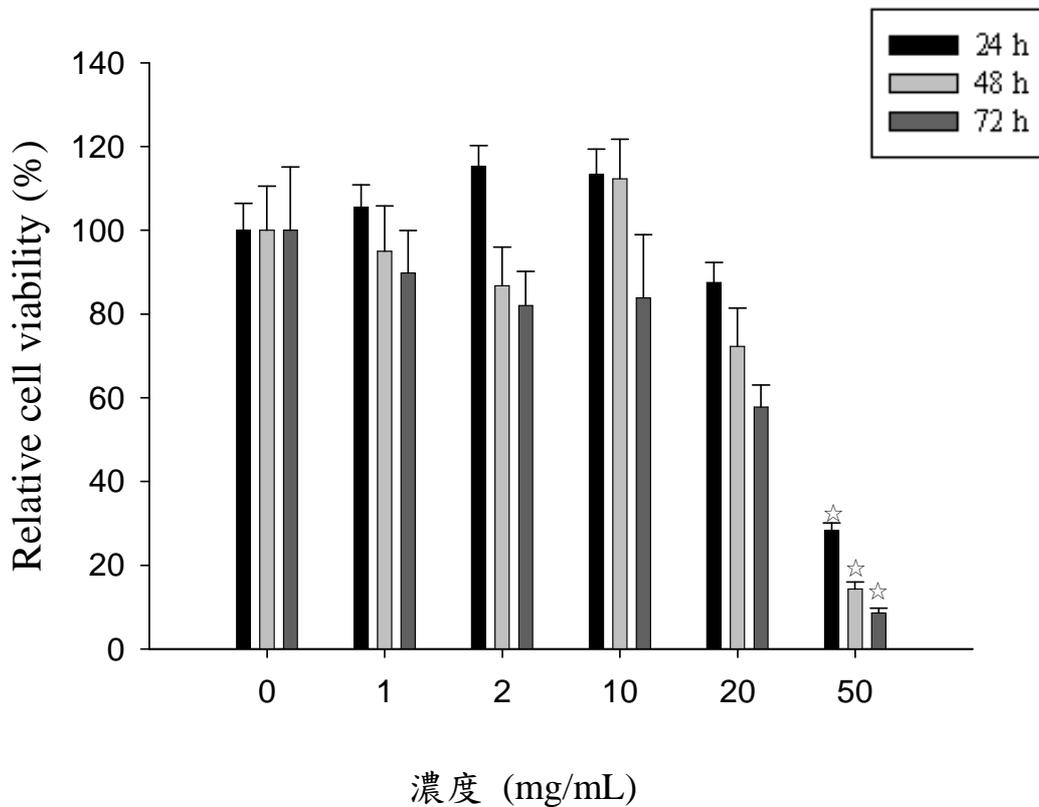
12. Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, Hwang T, Woolson RF, Pe'er J, and Gruman LM: The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 1993; 100: 1389-98.
13. Fukamiya N, Okano M, Miyamoto M, Tagahara K, and Lee KH: Antitumor agents, 127. Bruceoside C, a new cytotoxic quassinoid glucoside, and related compounds from *Brucea javanica*. *J Nat Prod* 1992; 55: 468-75.
14. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, and Taylor-Robinson SD: Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4300-8.
15. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, and Blichert-Toft M: High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1993; 53: 2513-21.
16. Hillen F and Griffioen AW: Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 489-502.
17. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, and Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1806-14.
18. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, and Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267: 26031-7.
19. Hsu YL, Kuo PL, Tzeng TF, Sung SC, Yen MH, Lin LT, and Lin CC: Huang-lian-jie-du-tang, a traditional Chinese medicine prescription, induces cell-cycle arrest and apoptosis in human liver cancer cells in vitro and in vivo. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 290-9.
20. Hu JP, Nishishita K, Sakai E, Yoshida H, Kato Y, Tsukuba T, and Okamoto K: Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF-kappaB and Akt pathways. *Eur J Pharmacol* 2008; 580: 70-9.
21. Jankun J, Selman SH, Aniola J, and Skrzypczak-Jankun E: Nutraceutical inhibitors of urokinase: potential applications in prostate cancer prevention and treatment. *Oncol Rep* 2006; 16: 341-6.

22. Jing L, Liu L, Yu YP, Dhir R, Acquafondada M, Landsittel D, Cieply K, Wells A, and Luo JH: Expression of myopodin induces suppression of tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 2004; 164: 1799-806.
23. Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, and Alitalo K: A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 1998; 273: 6599-602.
24. Jung JE, Kim HS, Lee CS, Park DH, Kim YN, Lee MJ, Lee JW, Park JW, Kim MS, Ye SK, and Chung MH: Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1780-7.
25. Kim SU, Kim DY, Park JY, Ahn SH, Nah HJ, Chon CY, and Han KH: Hepatocellular carcinoma presenting with bone metastasis: clinical characteristics and prognostic factors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1377-84.
26. Klagsbrun M and D'Amore PA: Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-70.
27. Kusunose M, Qiu B, Cui T, Hamada A, Yoshioka S, Ono M, Miyamura M, Kyotani S, and Nishioka Y: Effect of Sho-saiko-to extract on hepatic inflammation and fibrosis in dimethylnitrosamine induced liver injury rats. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1417-21.
28. Lau FY, Chui CH, Gambari R, Kok SH, Kan KL, Cheng GY, Wong RS, Teo IT, Cheng CH, Wan TS, Chan AS, and Tang JC: Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of *Brucea javanica* extract on human carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2005; 16: 1157-62.
29. Lee H and Lin JY: Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat Res* 1988; 204: 229-34.
30. Li R, Walvekar RR, Nalesnik MA, and Gamblin TC: Unresectable hepatocellular carcinoma with a solitary metastasis to the mandible. *Am Surg* 2008; 74: 346-9.
31. Lin CS, Kuo CL, Wang JP, Cheng JS, Huang ZW, and Chen CF: Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of *Perilla frutescens* extract on human hepatoma HepG2 cells. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 557-67.
32. Lin S, Tsai SC, Lee CC, Wang BW, Liou JY, and Shyu KG: Berberine

- inhibits HIF-1alpha expression via enhanced proteolysis. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 612-9.
33. Lin Y, Ong LK, and Chan SH: Differential in situ hybridization for determination of mutational specific expression of the p53 gene in human hepatoma cell lines. *Pathology* 1995; 27: 191-6.
 34. Liu F and Ng TB: Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci* 2000; 66: 725-35.
 35. Lu JS, Liu YQ, Li M, Li BS, and Xu Y: [Protective effects and its mechanisms of total alkaloids from rhizoma *Coptis chinensis* on *Helicobacter pylori* LPS induced gastric lesion in rats]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2007; 32: 1333-6.
 36. Ma Z, Otsuyama K, Liu S, Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Obata M, Li FJ, Zheng X, Maki Y, Miyamoto K, and Kawano MM: Baicalein, a component of *Scutellaria radix* from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells. *Blood* 2005; 105: 3312-8.
 37. McGowan PM and Duffy MJ: Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann Oncol* 2008.
 38. Mirzoeva S, Kim ND, Chiu K, Franzen CA, Bergan RC, and Pelling JC: Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Mol Carcinog* 2008; 47: 686-700.
 39. Paku S: Current concepts of tumor-induced angiogenesis. *Pathol Oncol Res* 1998; 4: 62-75.
 40. Pepper MS and Skobe M: Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biol* 2003; 163: 209-13.
 41. Renzulli C, Galvano F, Pierdomenico L, Speroni E, and Guerra MC: Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2). *J Appl Toxicol* 2004; 24: 289-96.
 42. Ryu SY, Oak MH, Yoon SK, Cho DI, Yoo GS, Kim TS, and Kim KM: Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med* 2000; 66: 358-60.
 43. Shirataki Y, Motohashi N, Tani S, and Sakagami H, Satoh K, Nakashima H,

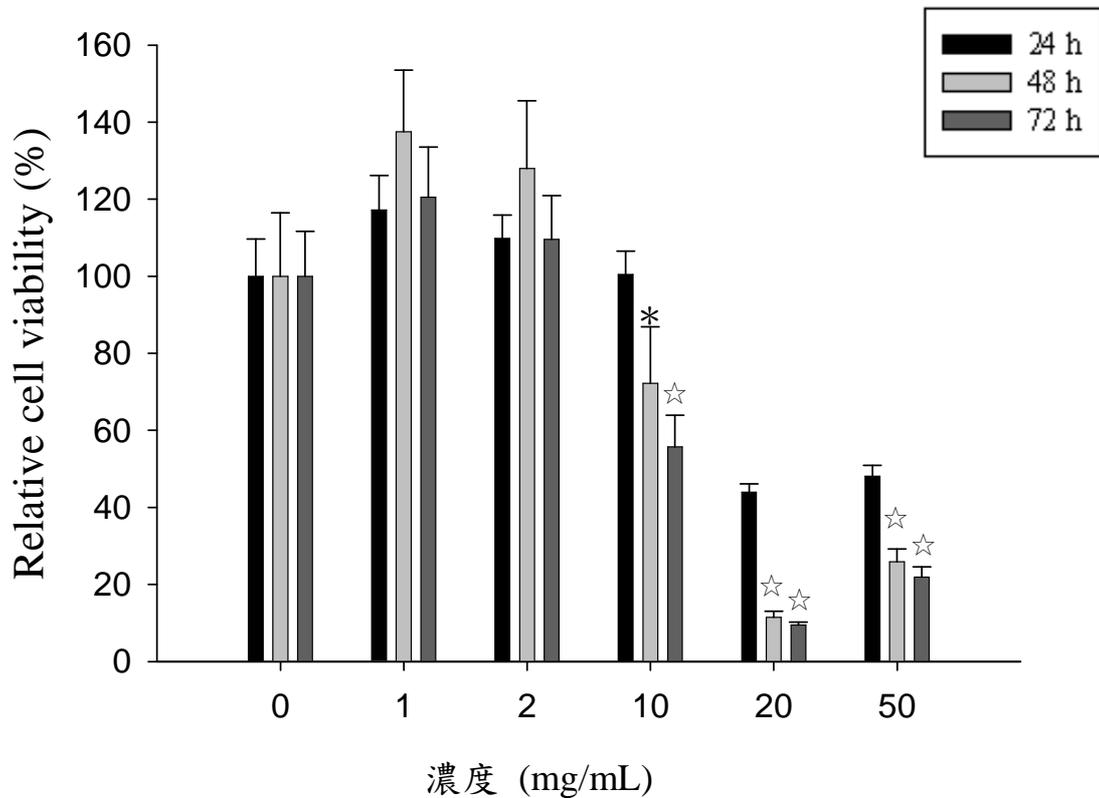
- Mahapatra SK, Ganguly K, Dastidar SG, Chakrabarty AN: In vitro biological activity of prenylflavanones. *Anticancer Res* 2001; 21: 275-80.
44. Su BN, Chang LC, Park EJ, Cuendet M, Santarsiero BD, Mesecar AD, Mehta RG, and Fong HH, Pezzuto JM, Kinghorn AD: Bioactive constituents of the seeds of *Brucea javanica*. *Planta Med* 2002; 68: 730-3.
45. Sun B, Zhang D, Zhang S, Zhang W, Guo H, and Zhao X: Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett* 2007; 249: 188-97.
46. Takahashi K, Uejima E, Morisaki T, Takahashi K, Kurokawa N, and Azuma J: In vitro inhibitory effects of Kampo medicines on metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J Clin Pharm Ther* 2003; 28: 319-27.
47. Tapia A, Salamonsen LA, Manuelpillai U, and Dimitriadis E: Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum Reprod* 2008; 23: 1724-32.
48. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, and Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-54.
49. Tu G, Xu W, and Huang H, Li S: Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem* 2008; 15: 1388-95.
50. 王昌俊：中藥介入治療原發性肝癌現狀與展望，中國中醫藥學雜誌。2002；9：84-88。
51. 成佳憲，行政院衛生署，中醫藥委員會 95 年度計畫編號：CCMP95-RD-210 中藥材黃連組成物對肺癌及肝癌放射線治療動物模式之免疫調控因子基因表現。
52. 許鴻源（1985）：簡明藥材學，新醫藥出版社(臺灣)。
53. 謝明村（1996）：中藥學概論，中國古典醫籍新解叢書（台北市）。
54. 謝文全及林宜信(2006)：「臺灣常用藥用植物圖鑑」vol. I、vol. II，行政院中醫藥委員會。
55. 張永勳及林宜信(2002)：「臺灣原住民藥用植物圖鑑彙編」，行政院中醫藥委員會。
56. 行政院衛生署，衛生統計資料
(http://www.cichb.gov.tw/sta_information/sta_informations.asp)

柒、圖、表



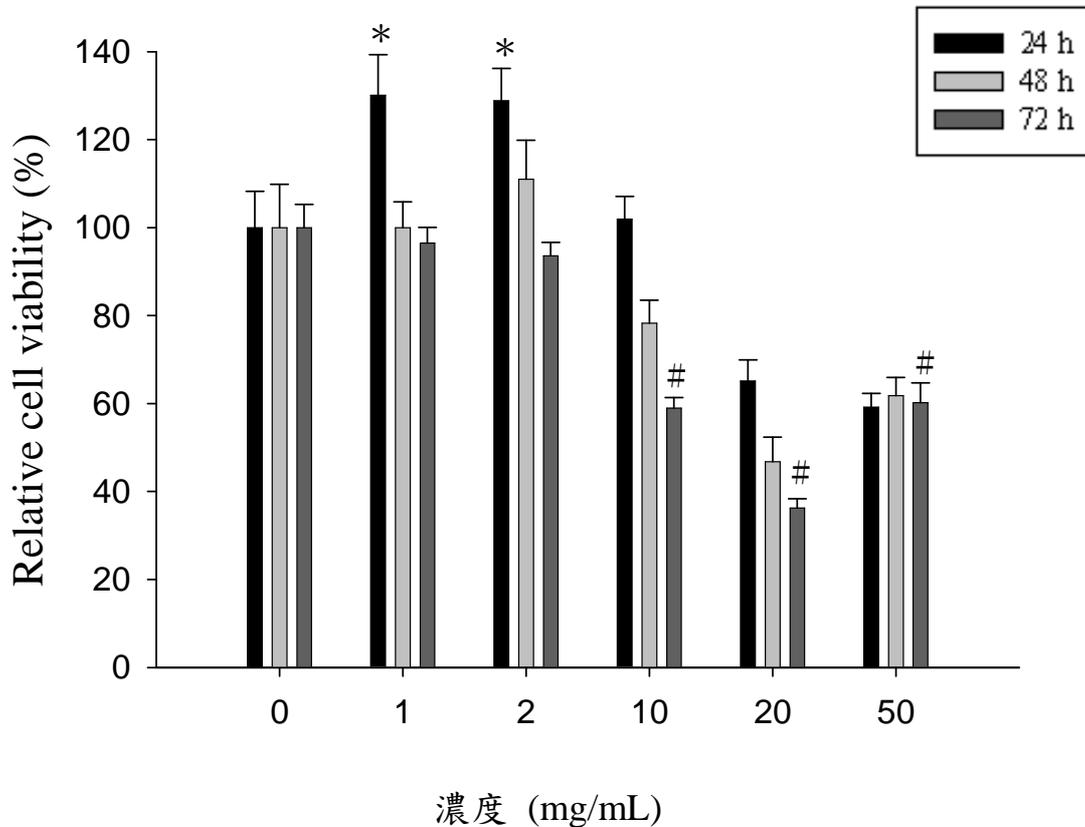
圖一、(A) 小柴胡湯(水萃取)處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入小柴胡湯（水萃取）濃度分別為1、2、10、20及50 mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



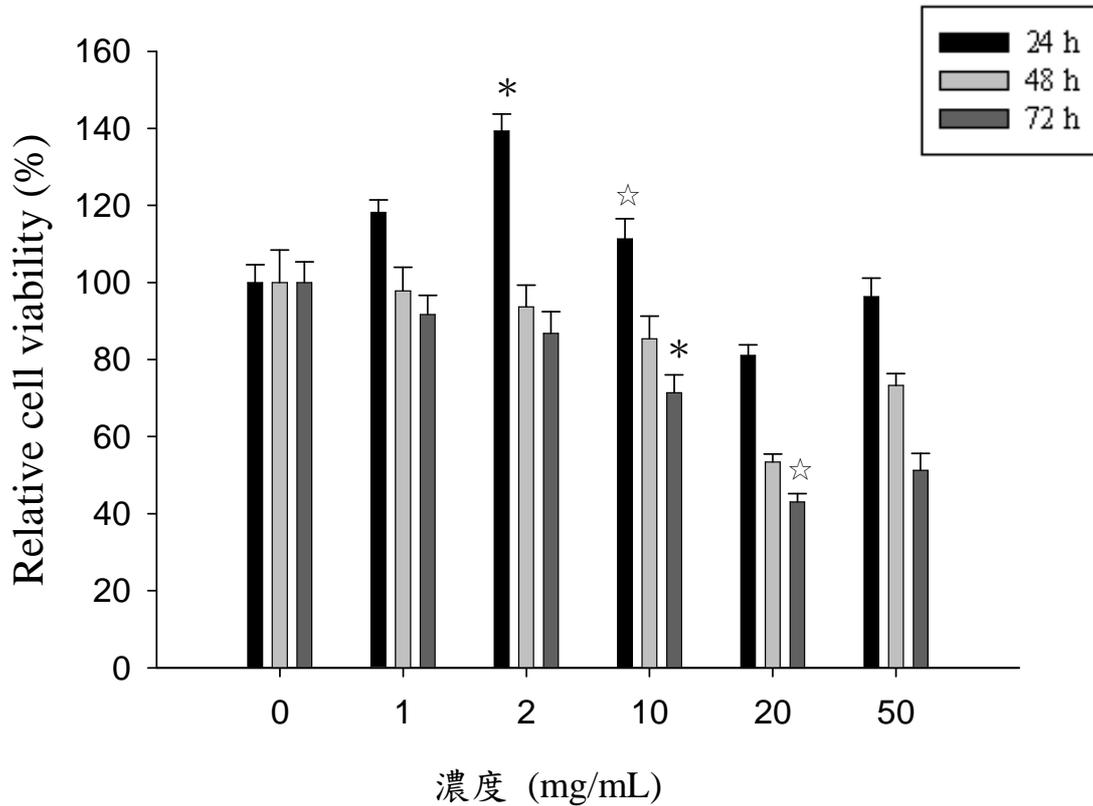
圖一、(B) 小柴胡湯（70%酒精萃取）處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入小柴胡湯（酒精萃取）濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control（100%），於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors（*， $p < 0.05$ ；#， $p < 0.01$ ；☆， $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果）。



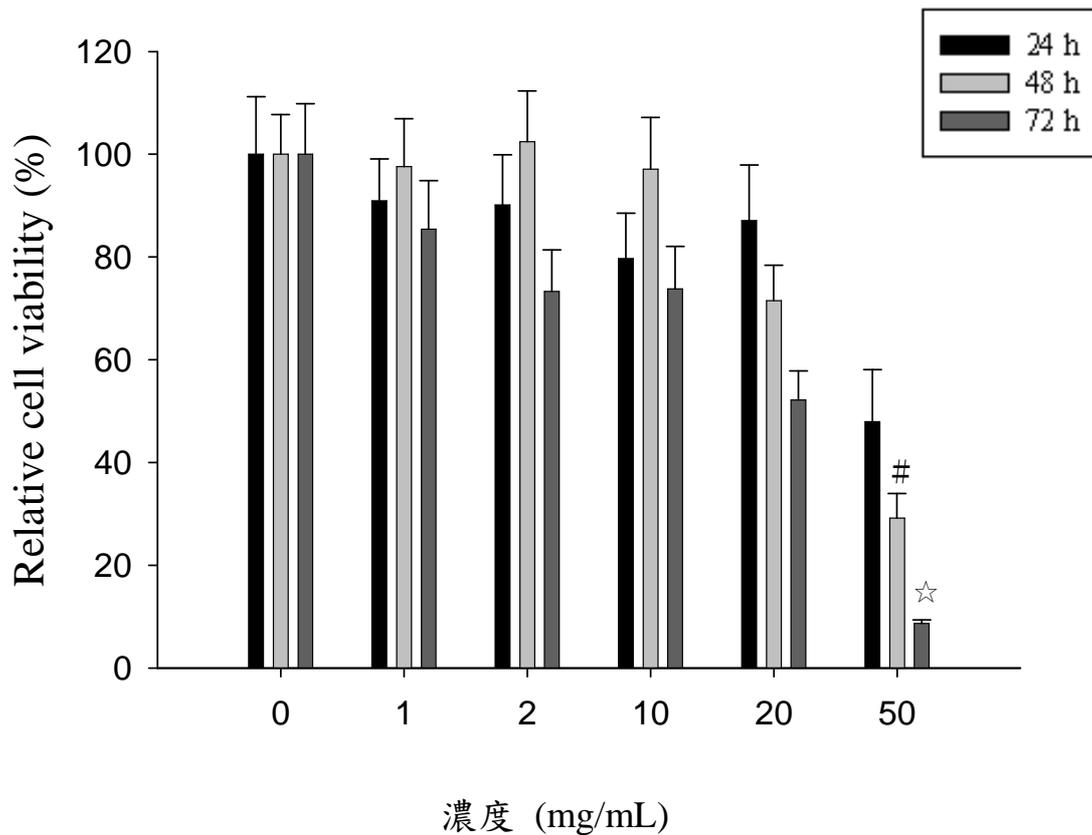
圖一、(C) 柴胡加龍骨牡蠣湯處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入柴胡加龍骨牡蠣湯，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



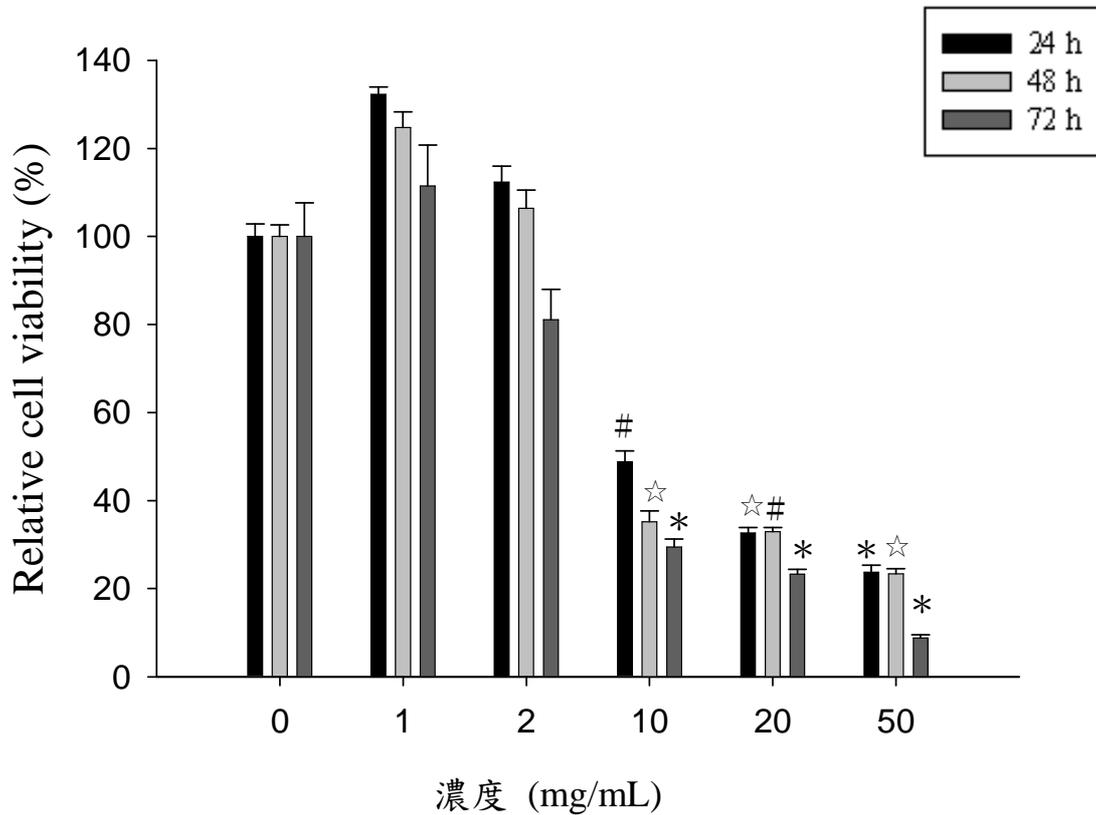
圖一、(D) 核桃承氣湯處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入柴胡加核桃承氣湯，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



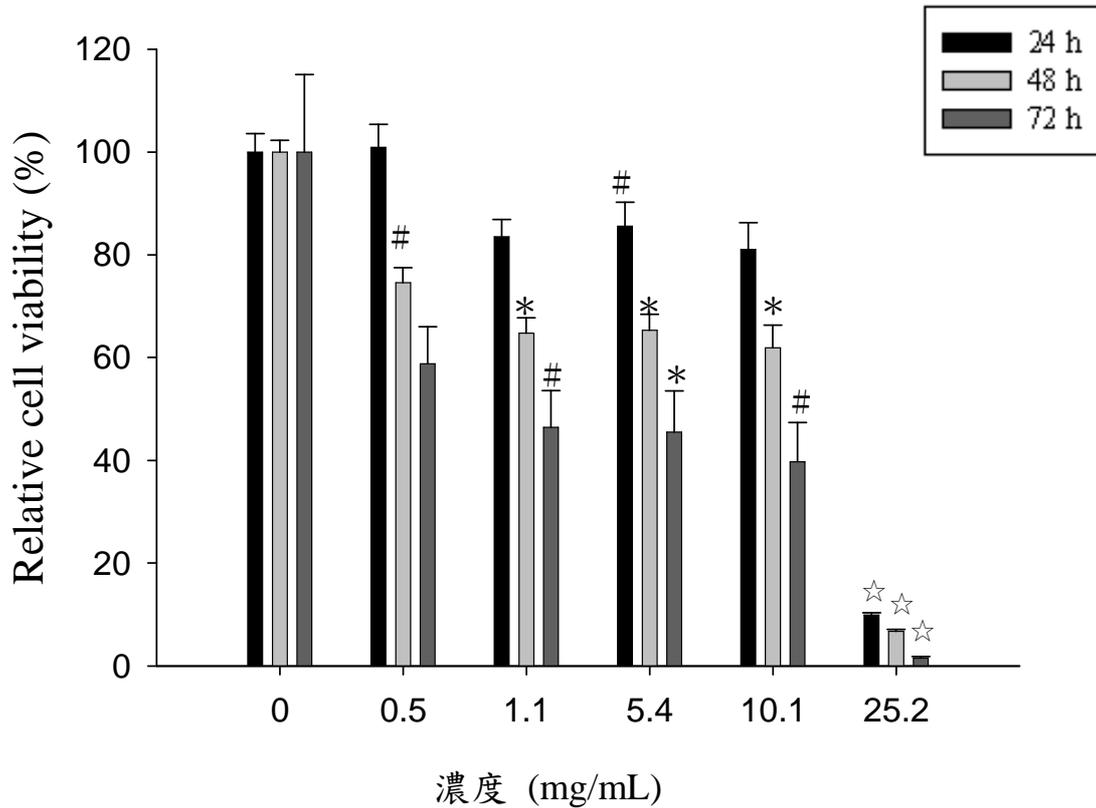
圖一、(E) 半夏厚朴湯處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入半夏厚朴湯，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (#, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



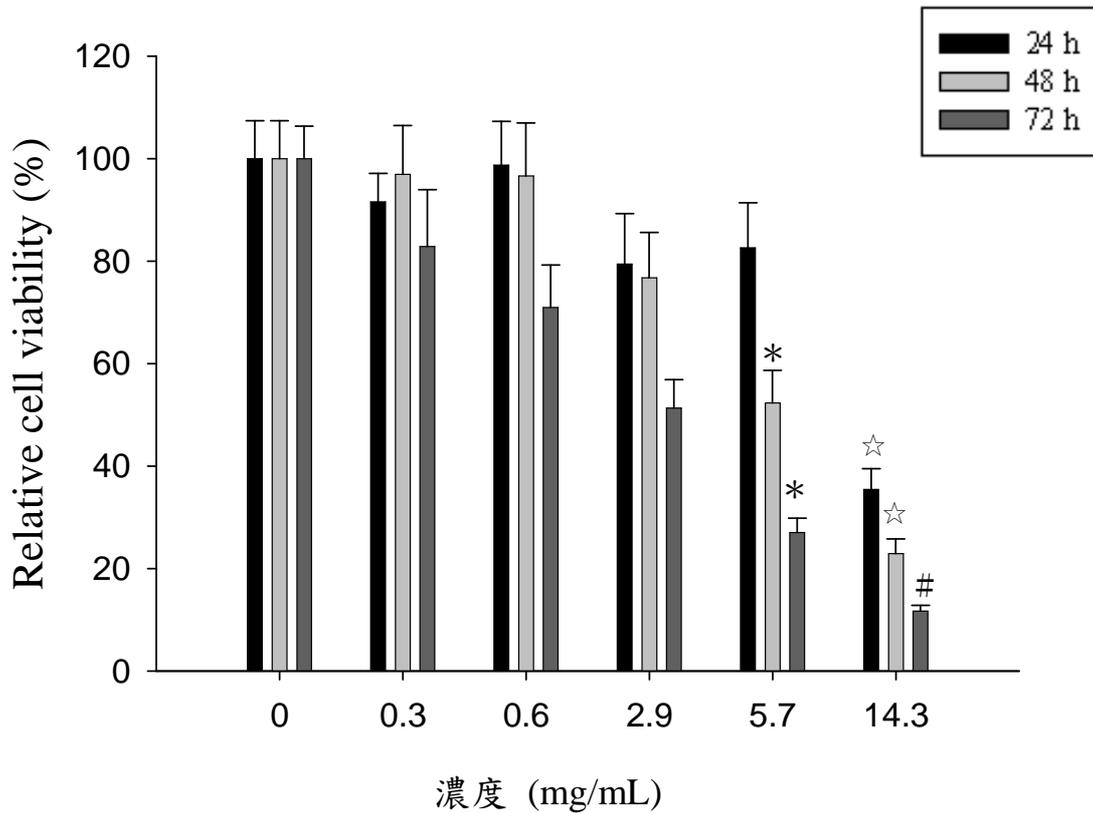
圖一、(F) 香蘇散處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入香蘇散，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



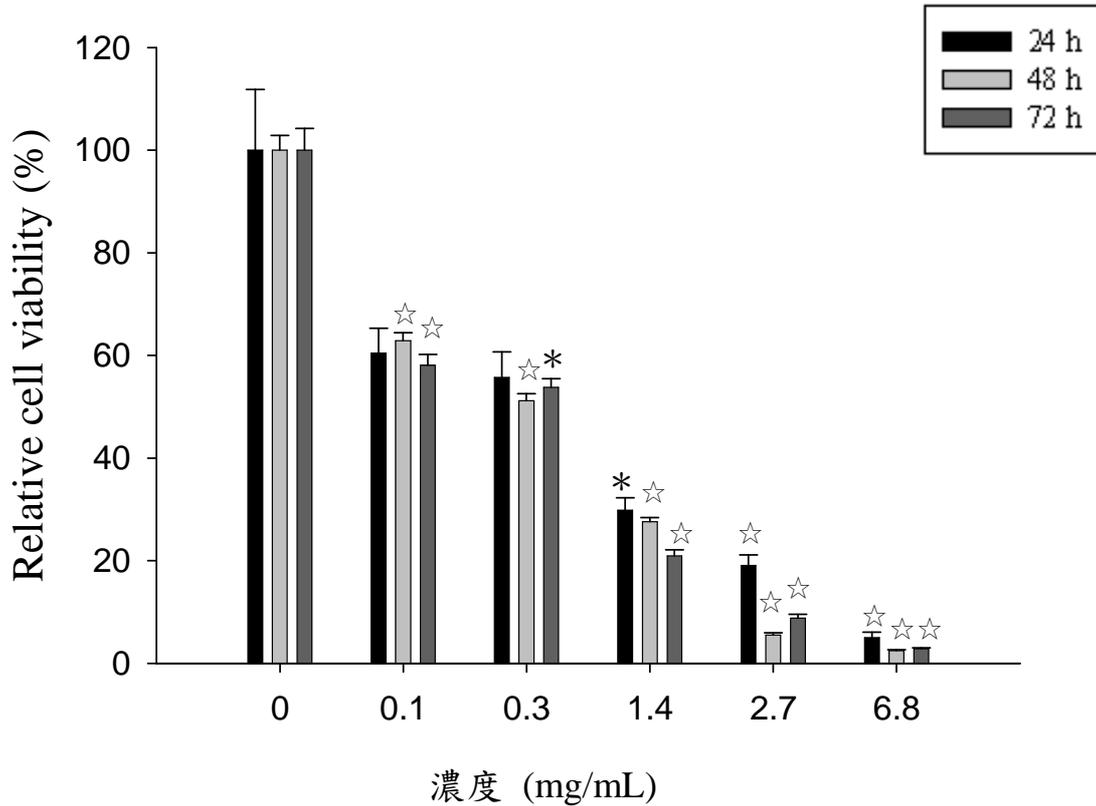
圖一、(G) 黃連解毒湯處理 HepG2 細胞株之生長曲線

唯濃度分別為0.5、1.1、5.4、10.1及25.2mg/mL，實驗方法同前述。於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入黃連解毒湯，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



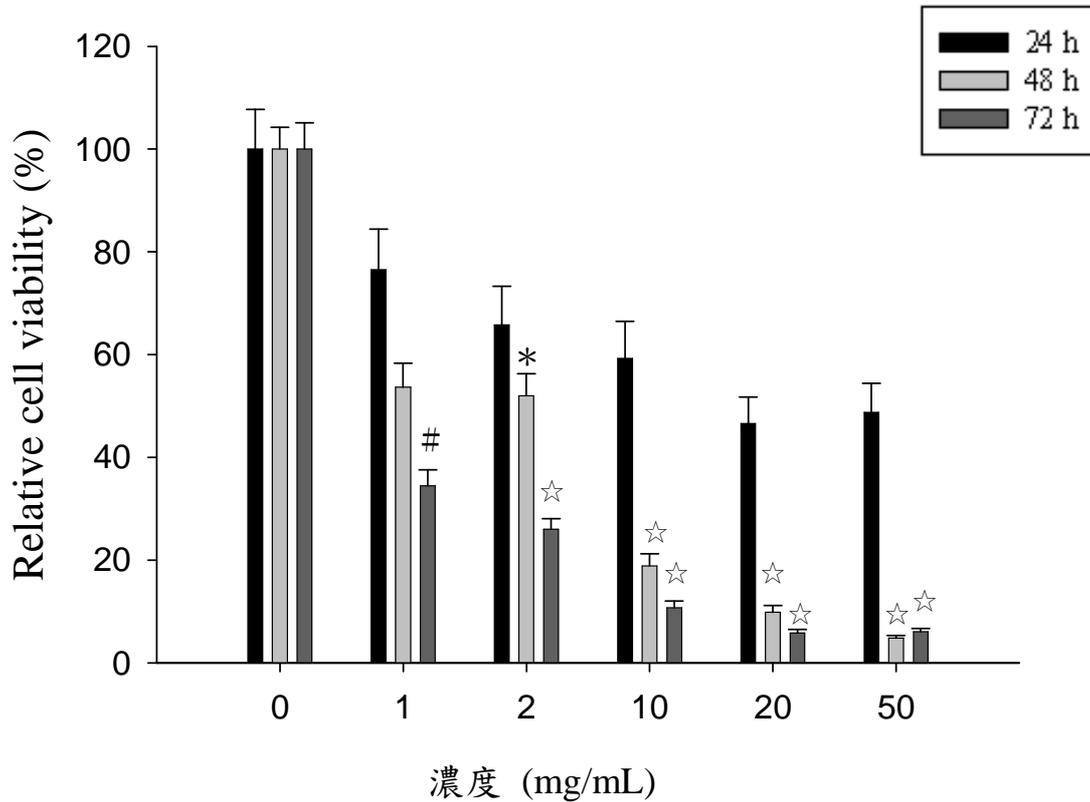
圖一、(H) 紫蘇葉處理 HepG2 細胞株之生長曲線

唯濃度分別為0.3、0.6、2.9、5.7及14.3mg/mL，實驗方法同前述。於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入紫蘇葉，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



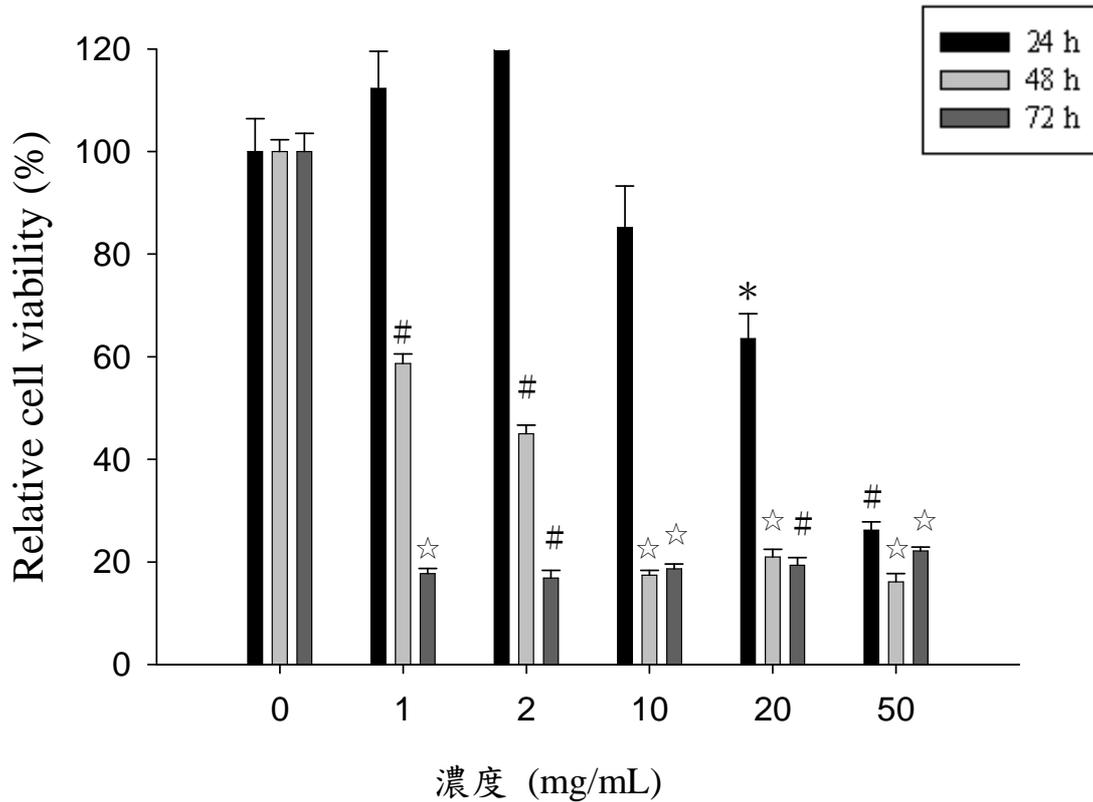
圖一、(I) 黃連處理 HepG2 細胞株之生長曲線

唯濃度分別為0.1、0.3、1.4、2.7及6.8mg/mL，實驗方法同前述。於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入黃連，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



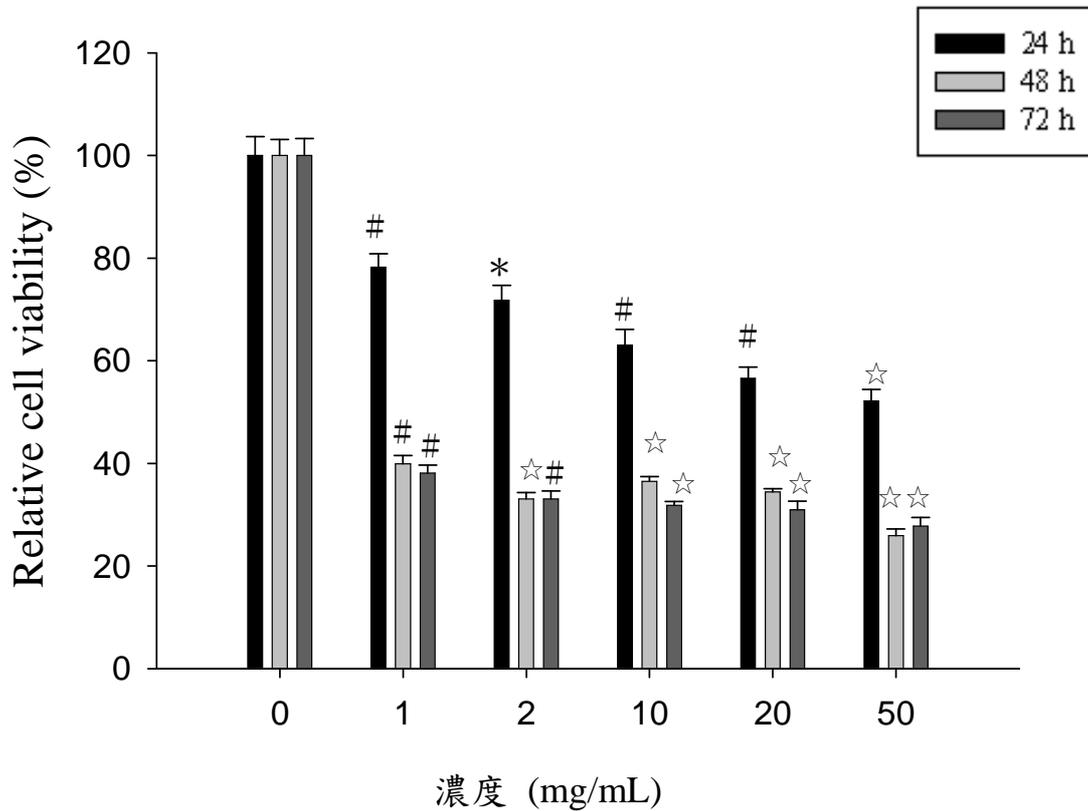
圖一、(J) 石上柏處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入石上柏，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



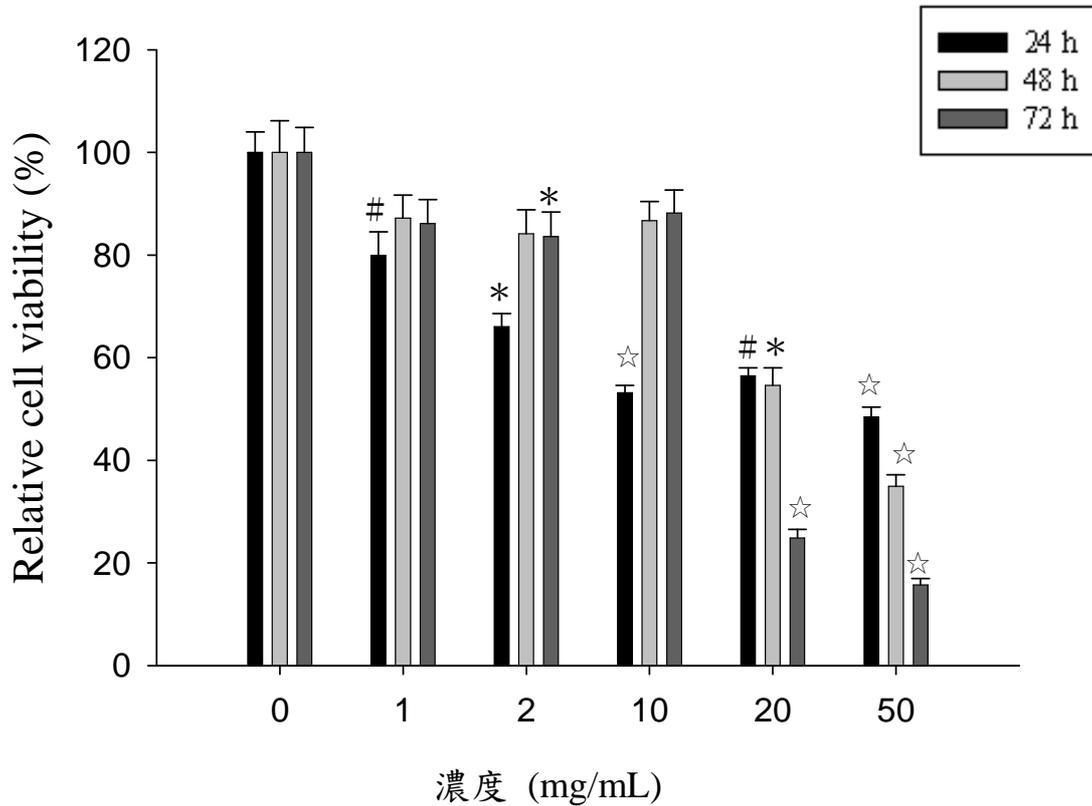
圖一、(K) 夏枯草處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入夏枯草，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



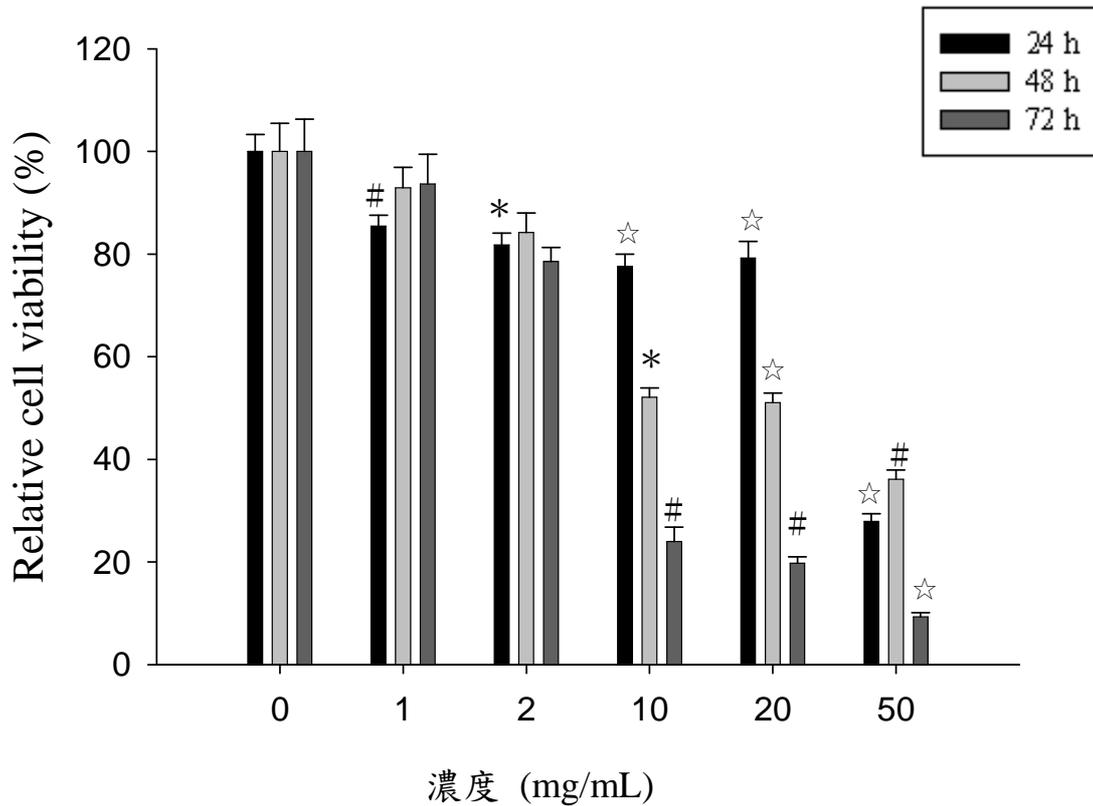
圖一、(L) 鴨膽子處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入鴨膽子，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



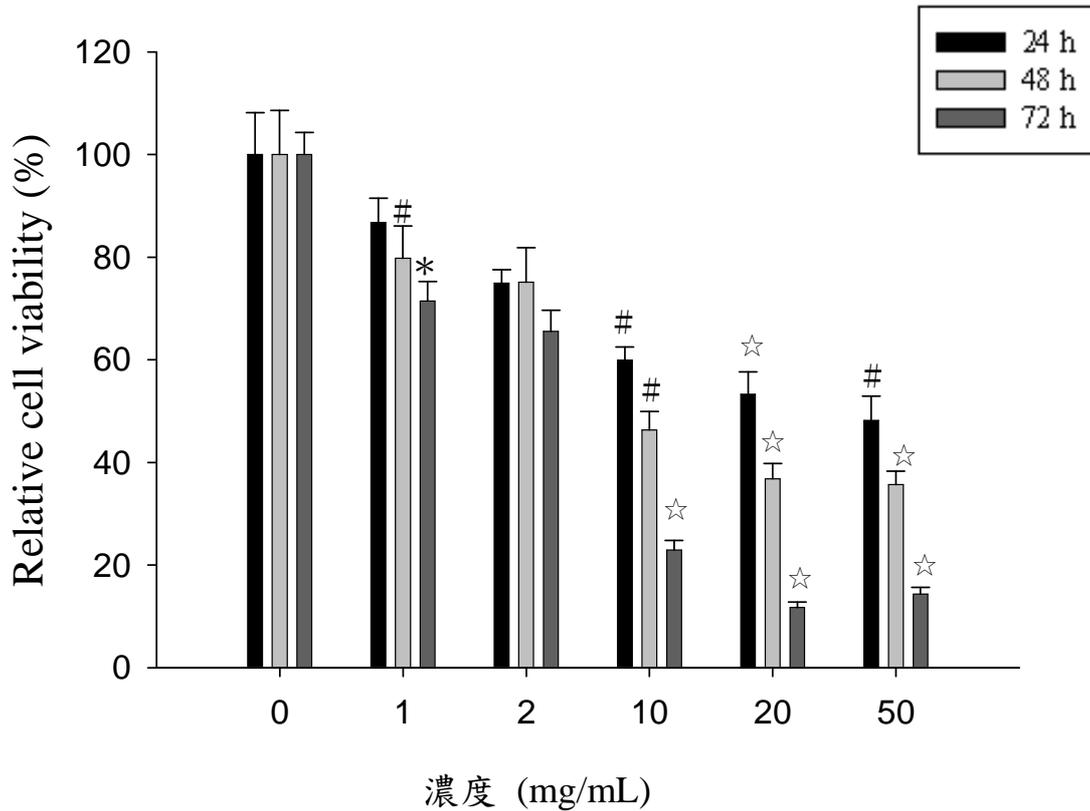
圖一、(M) 山慈菇處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入山慈菇，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



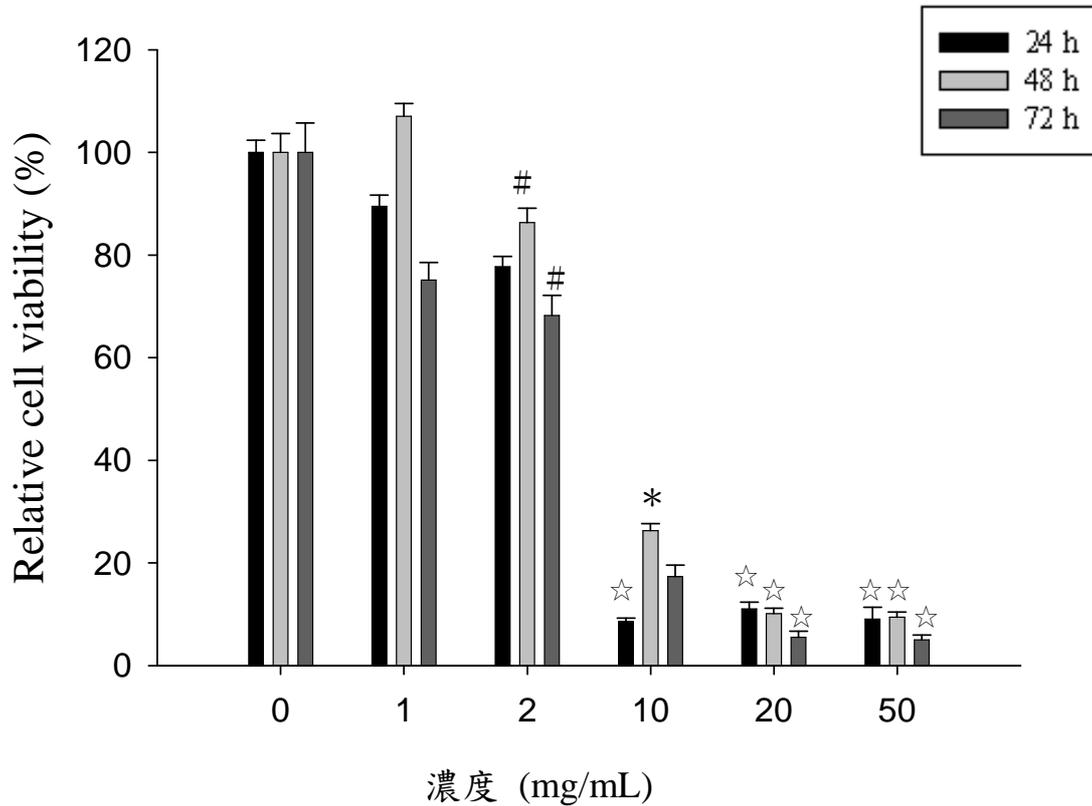
圖一、(N) 苦參處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入苦參，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



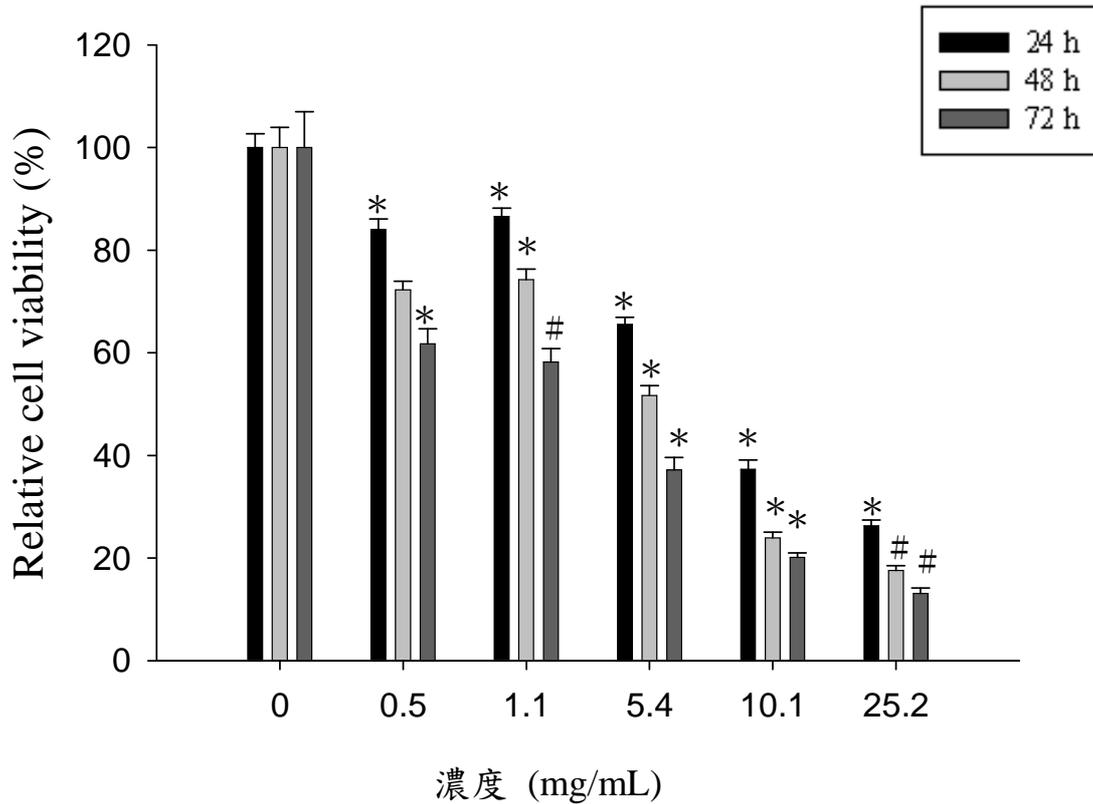
圖一、(O) 黃獨處理 HepG2 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 HepG2細胞，經隔夜培養貼附之後，加入黃獨，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



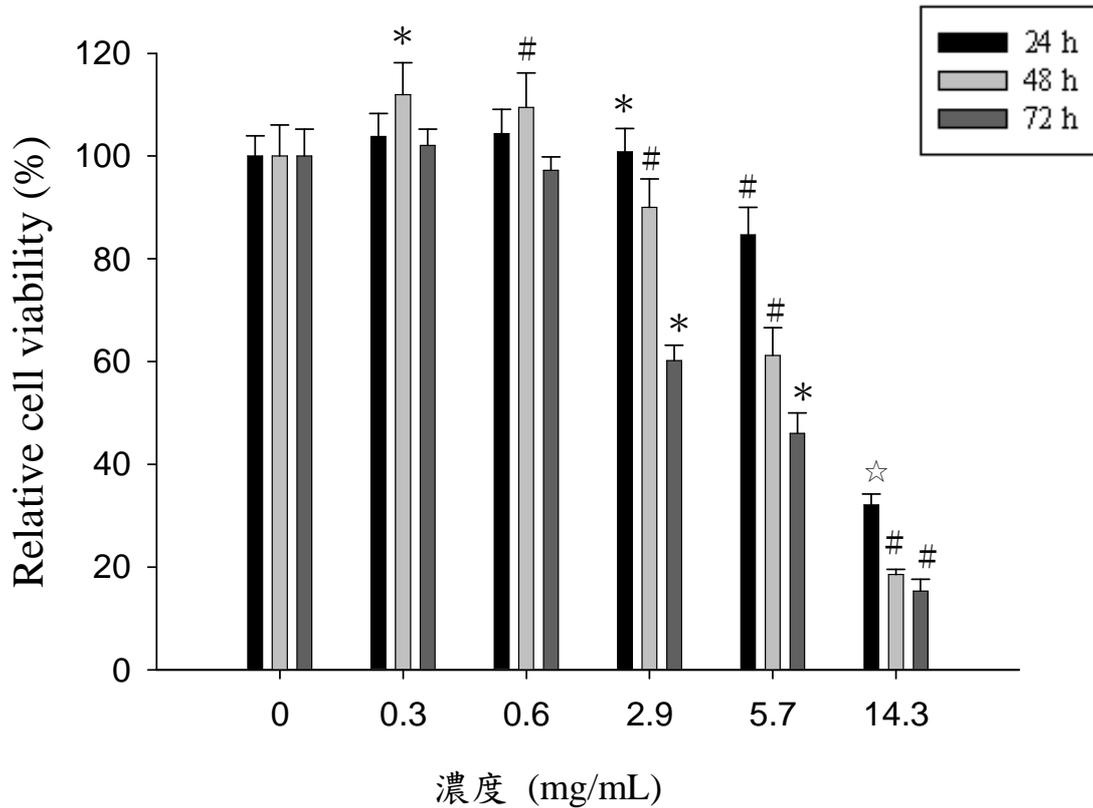
圖二、(A) 香蘇散處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7 細胞，經隔夜培養貼附之後，加入香蘇散，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



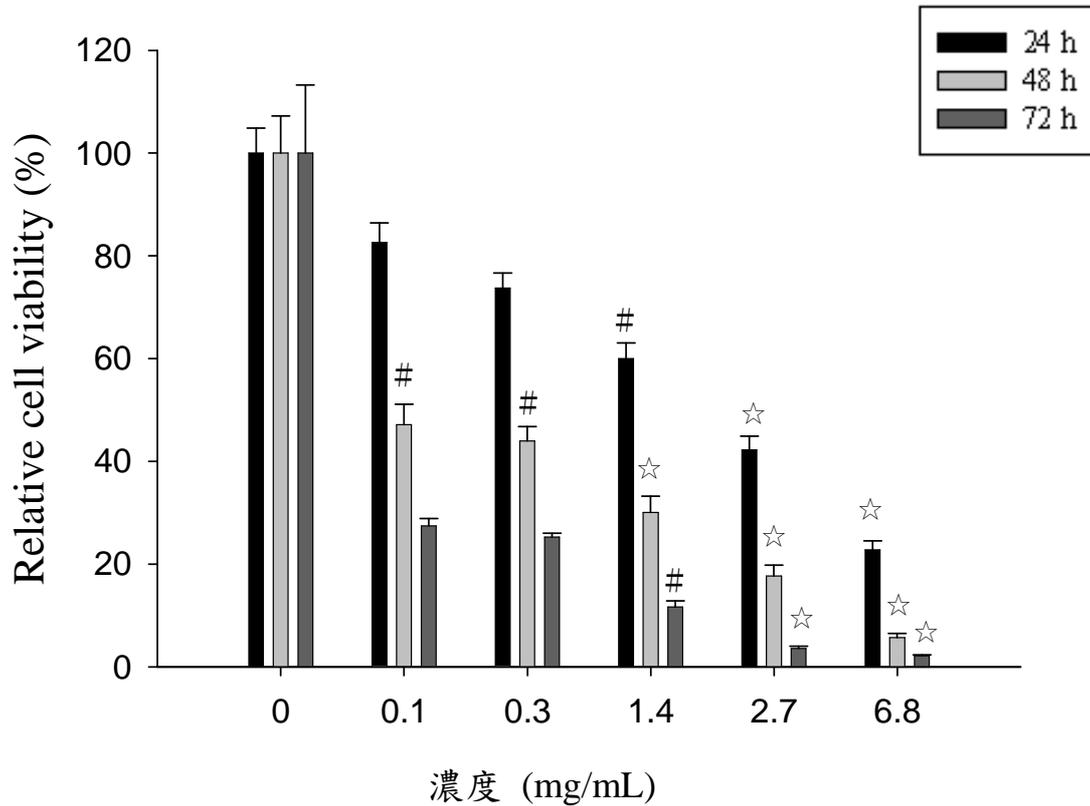
圖二、(B) 黃連解毒湯處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入黃連解毒湯，濃度分別為0.5、1.1、5.4、10.1及25.2mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



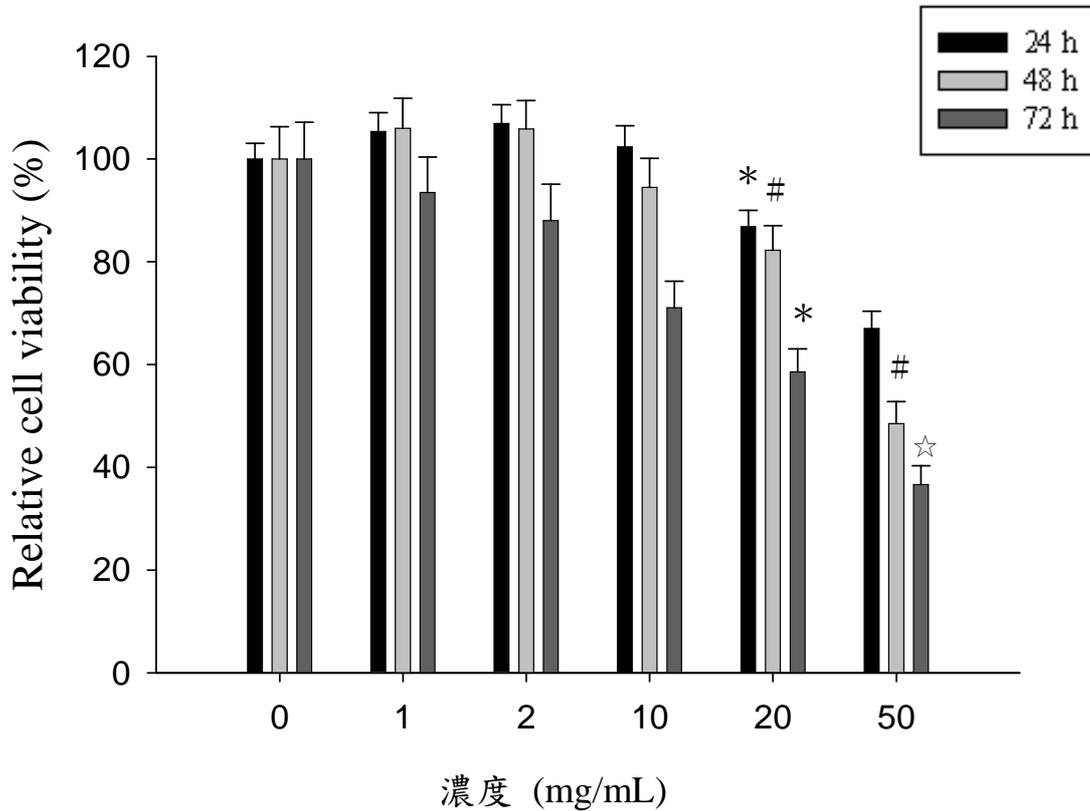
圖二、(C) 紫蘇葉處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入紫蘇葉，濃度分別為0.3、0.6、2.9、5.7及14.3mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



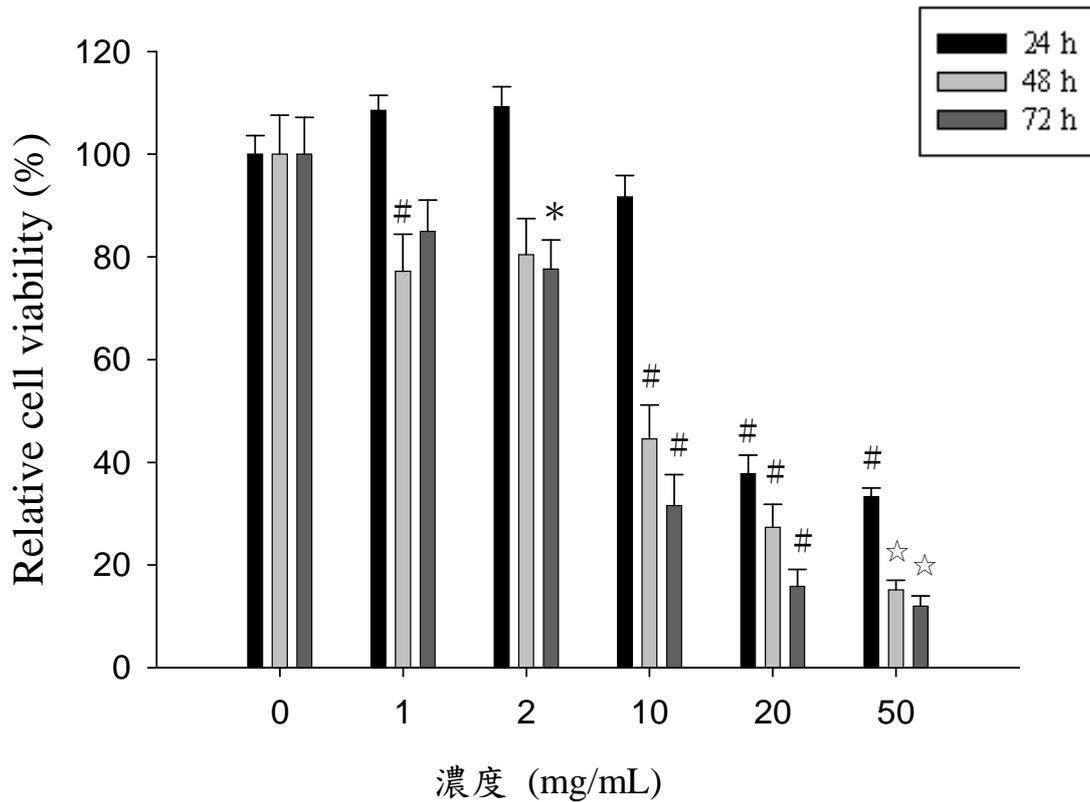
圖二、(D) 黃連處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入黃連，濃度分別為0.1、0.3、1.4、2.7及6.8mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



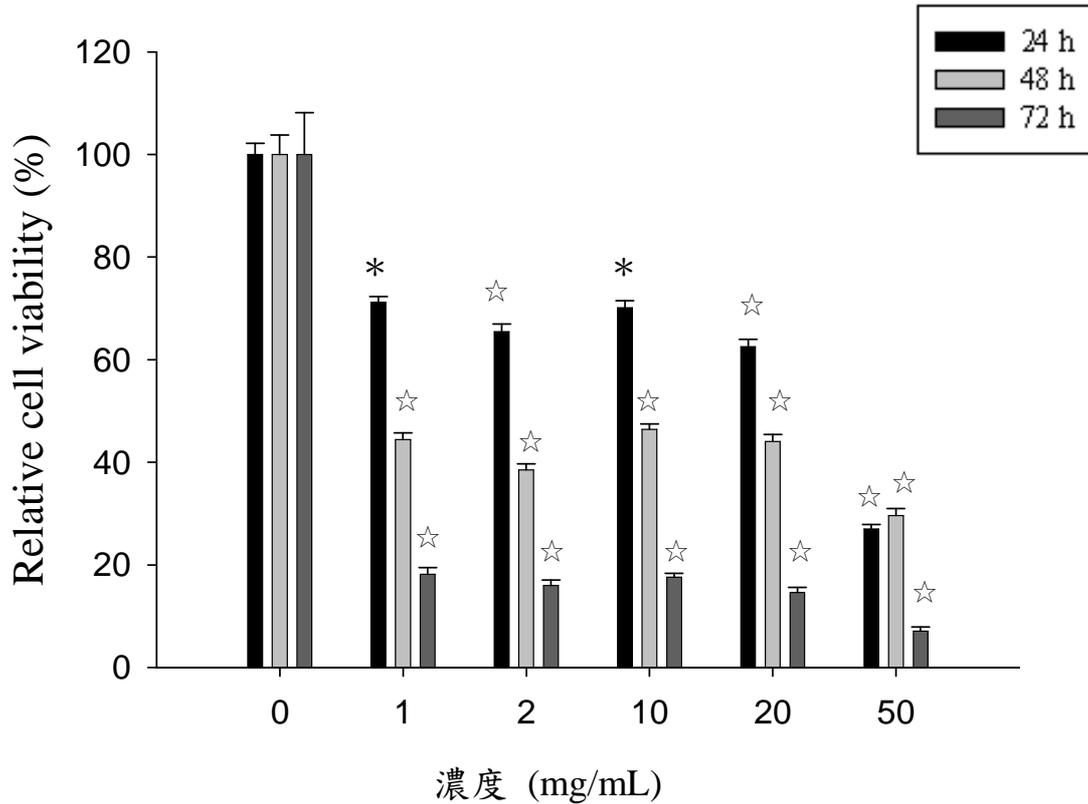
圖二、(E) 石上柏處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入石上柏，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



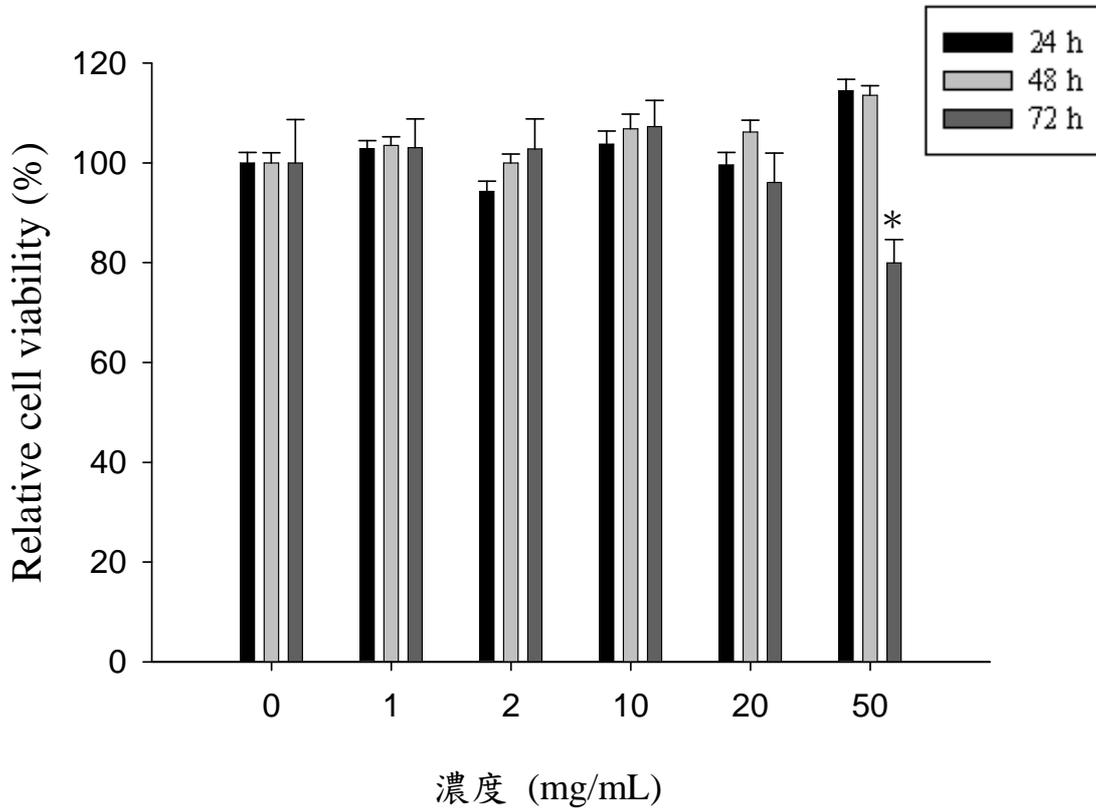
圖二、(F) 夏枯草處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入夏枯草，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



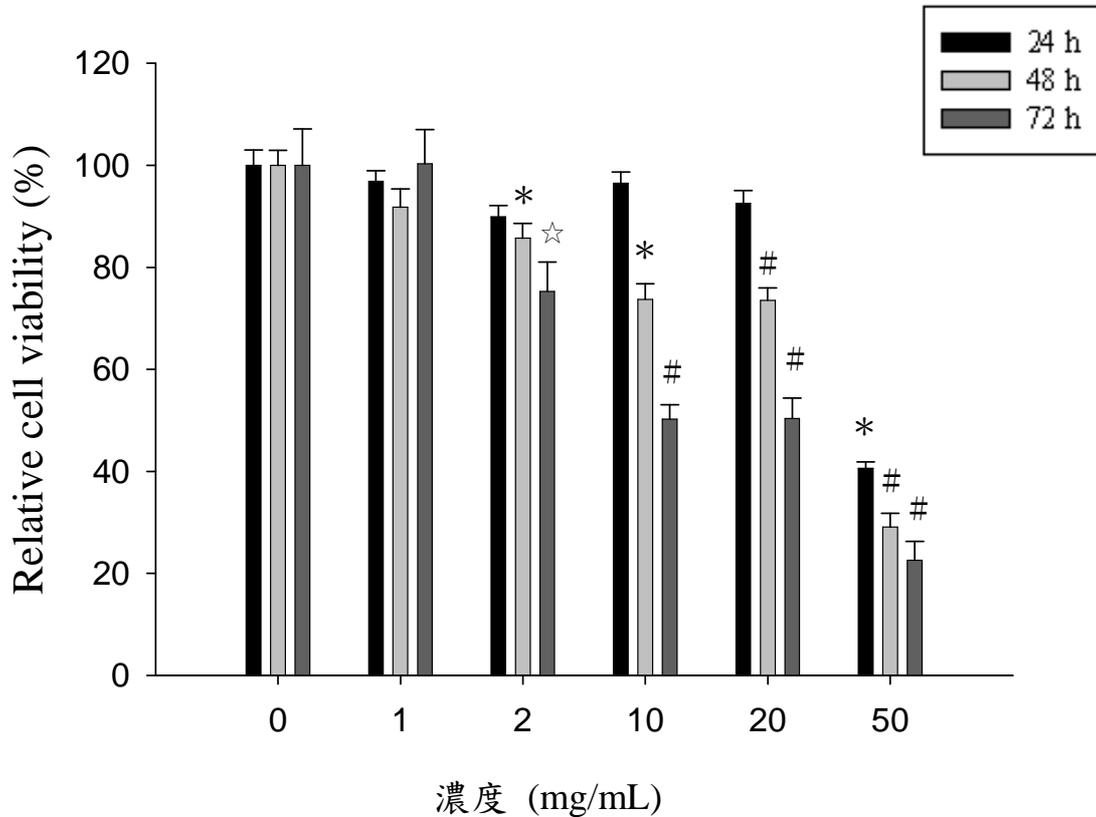
圖二、(G) 鴨膽子處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入鴨膽子，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



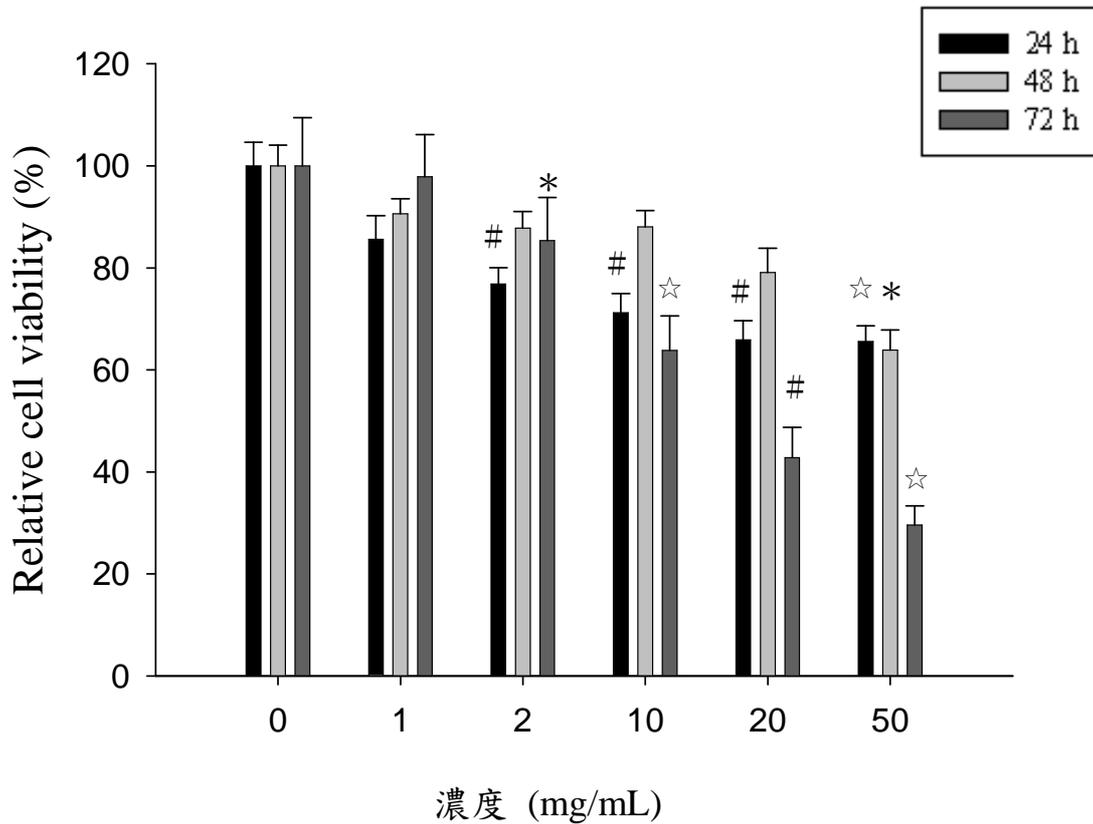
圖二、(H) 山慈菇處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入山慈菇，使用濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，處理時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$ 代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



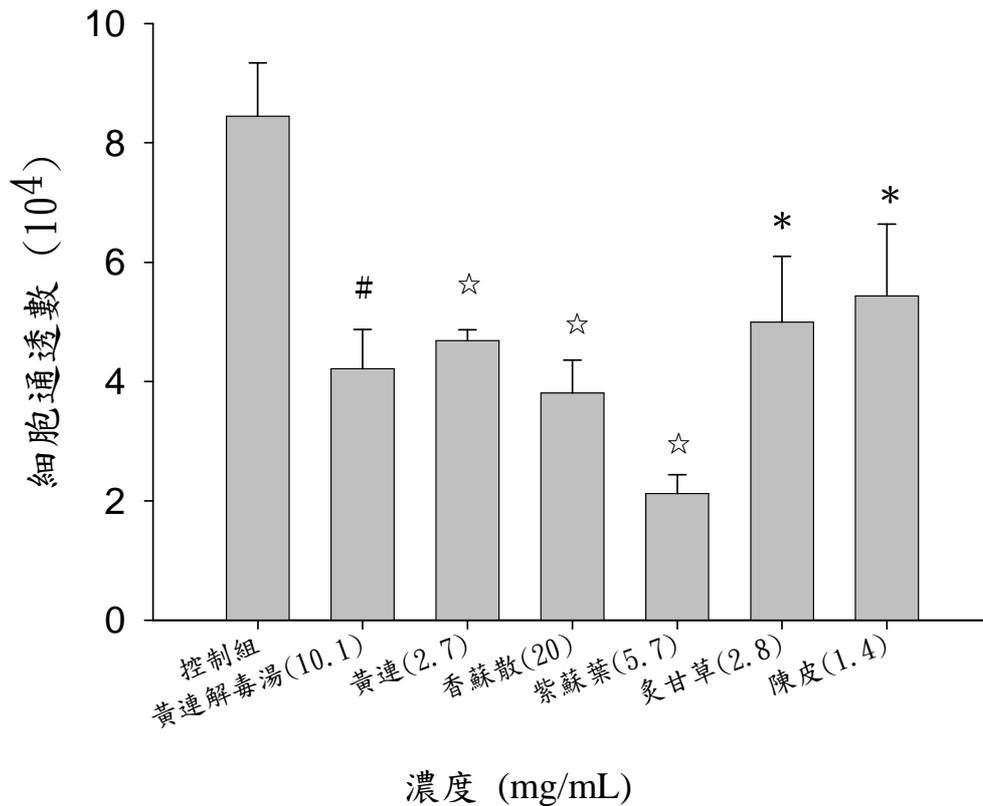
圖二、(I) 苦參處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7細胞，經隔夜培養貼附之後，加入苦參，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。



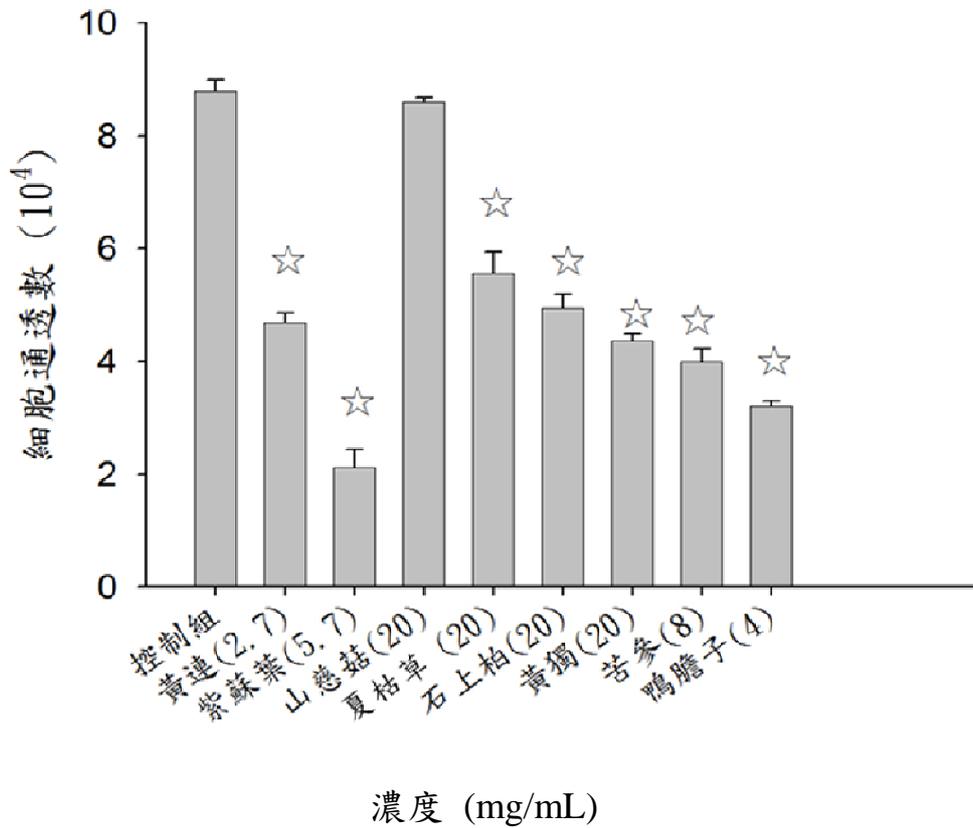
圖二、(J) 黃獨處理 Huh 7 細胞株之生長曲線

於96孔盤上每孔接種 1×10^4 Huh7 細胞，經隔夜培養貼附之後，加入黃獨，濃度分別為1、2、10、20及50mg/mL，時間分別為24、48及72小時，當實驗到達各待測時間點時，於每孔加入5 μ l MTT，並於37°C下反應3小時，次將孔盤內培養液吸出，再加入100 μ l DMSO以完全溶解紫紅色結晶物，利用OD₅₇₀測量吸光值，並以未加入細胞只加DMSO的孔當作空白背景值，以藥物處理之細胞存活率作為vehicle control (100%)，於相同施藥時間，不同濃度間之存活率換算為百分比，平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, p<0.05; #, p<0.01; ☆, p<0.001分別代表由student t-test所換算出具統計意義的結果)。



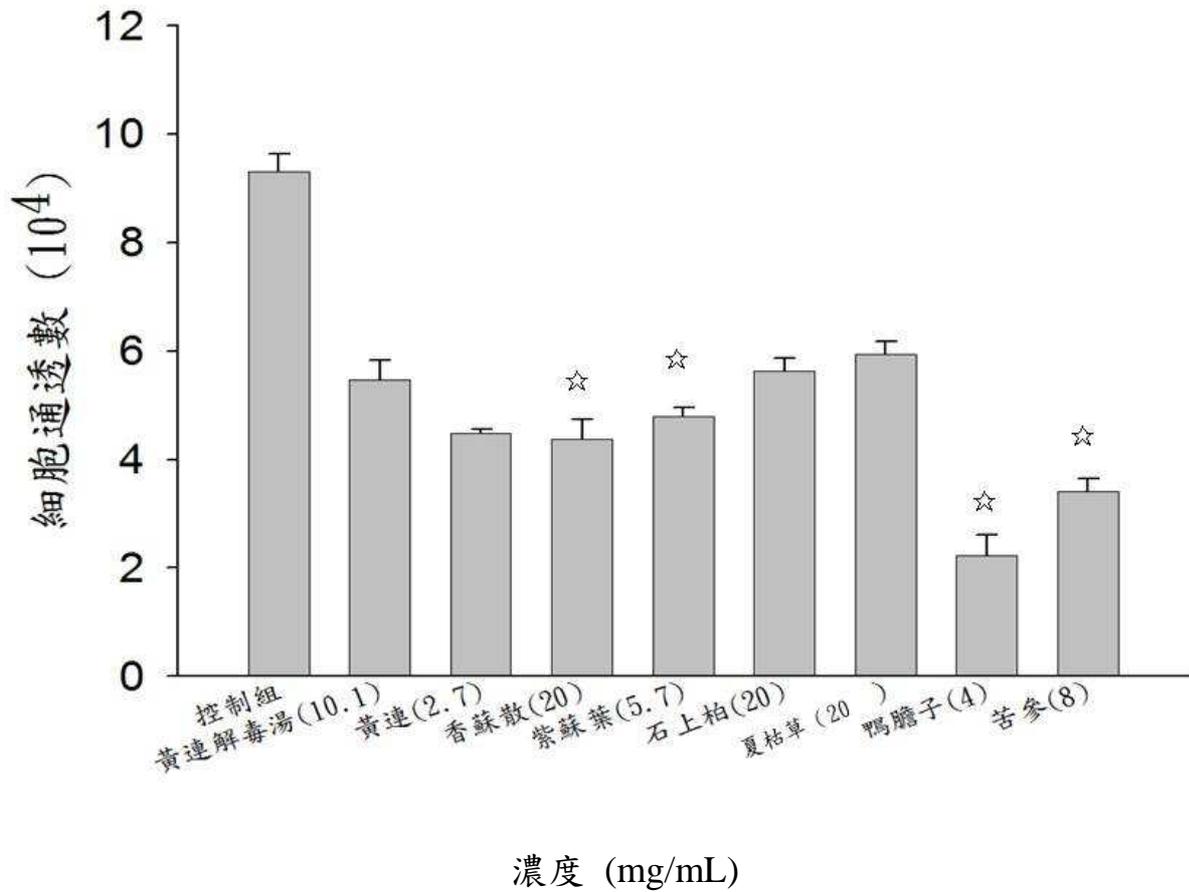
圖三、HepG2 細胞侵犯能力實驗結果

接種 5×10^4 HepG2 細胞於100 μ l Matrigel (Becton-Dickinson)上隨後一起置入insert內，於24孔盤隔夜貼附培養，加入黃連解毒湯(2.7 mg/mL)、黃連10.1 (mg/mL)、香蘇散(20 mg/mL)、紫蘇葉5.7 (mg/mL)、炙甘草(2.8 mg/mL)及陳皮1.4 (mg/mL)，施以藥物24小時後，收取下層貼附於孔盤的細胞，與未加藥物之控制組相比可得知細胞侵犯力及活動能力的情形。平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。統計分析以控制組與不同藥物間相比所得之結果。



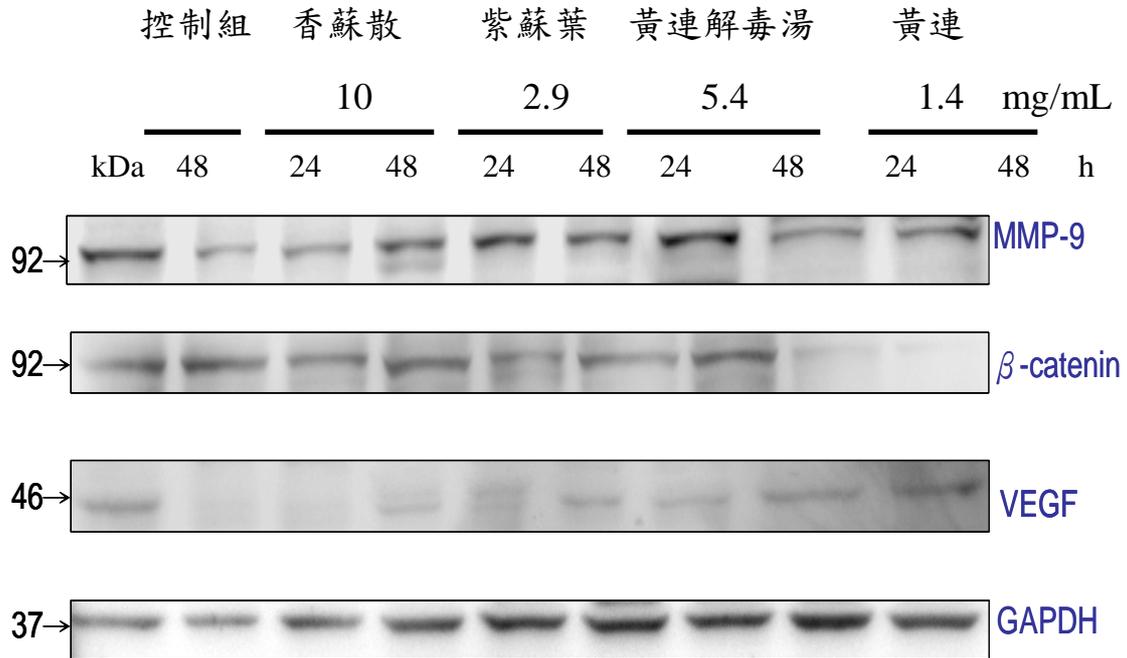
圖四、利用 HepG2 細胞評估中藥單方侵犯能力

接種 5×10^4 HepG2細胞於100 μ l Matrigel (Becton-Dickinson)上隨後一起置入insert內，於24孔盤隔夜貼附培養，分別加入石上柏、夏枯草、黃獨、山慈菇萃取液(濃度均為20 mg/mL)、黃連(2.7 mg/mL)、鴨膽子(4 mg/mL)、苦參(8 mg/mL)、及紫蘇葉(5.7 mg/mL)，24小時後，收取下層貼附於孔盤的細胞，與未加藥物之控制組相比可得知細胞侵犯力及活動能力的情形。平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar為standard errors (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.01$; ☆, $p < 0.001$ 分別代表由student *t*-test所換算出具統計意義的結果)。統計分析以控制組與不同藥物間相比較所得之結果。



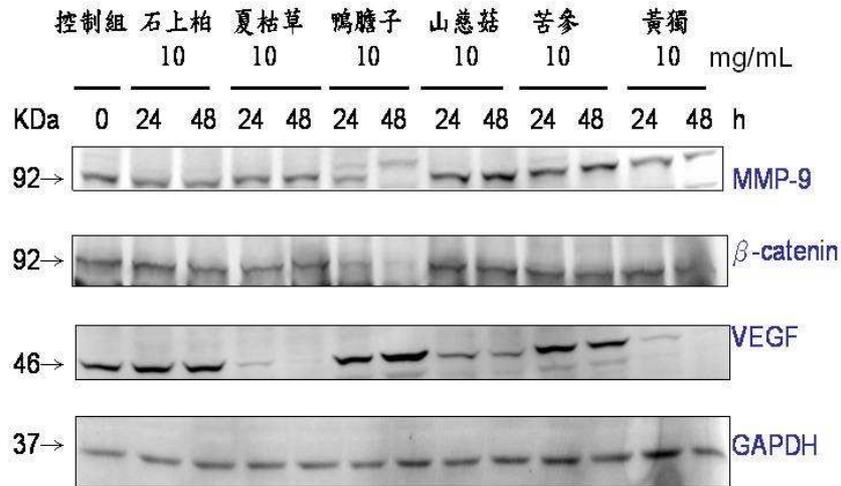
圖五、利用 Huh 7 細胞評估中藥單方侵犯能力果

接種 5×10^4 Huh 7 細胞於 100 μ l Matrigel (Becton-Dickinson) 上一起置入 insert 內，在 24 孔盤內隔夜貼附培養，加入萃取液。包括黃連解毒湯 (10.1 mg/mL)、黃連 (2.7 mg/mL)、香蘇散 (20 mg/mL)、紫蘇葉 (5.7 mg/mL)、鴨膽子 (4 mg/mL)、苦參 (8 mg/mL)、石上柏及夏枯草 (20 mg/mL)。當施以藥物 24 小時後，收取並且計算下層貼附於孔盤的細胞，與未加藥物相比可得知細胞侵犯力及活動能力的情形。平均值為三次獨立實驗的換算結果，error bar 為 standard errors (☆, $p < 0.001$ 分別代表由 student *t*-test 所換算出具統計意義的結果)。統計分析以控制組與不同藥物間相比較所得之結果。



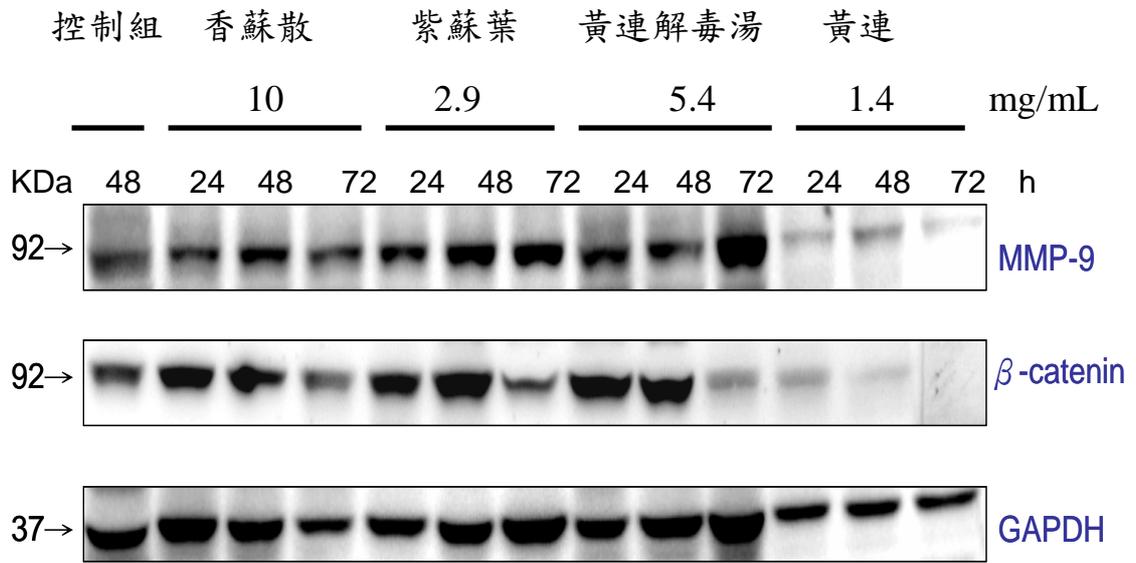
圖六、複方及其有效單方處理 HepG2 之血管新生相關蛋白表現

接種 1×10^6 HepG2 細胞於 6 公分培養盤內。施以香蘇散 10mg/mL、紫蘇葉 2.9mg/mL、黃連解毒湯 5.4mg/mL 及黃連 1.4mg/mL 後，於 24 及 48 小時萃取蛋白質，經 SDS-PAGE 轉漬到 Nitrocellulose transfer membrane 上，以 MMP-9、 β -catenin、VEGF 及 GAPDH 抗體雜交，後以 goat-anti-rabbit 二級抗體雜交，再以 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 呈色並以冷光儀顯相。



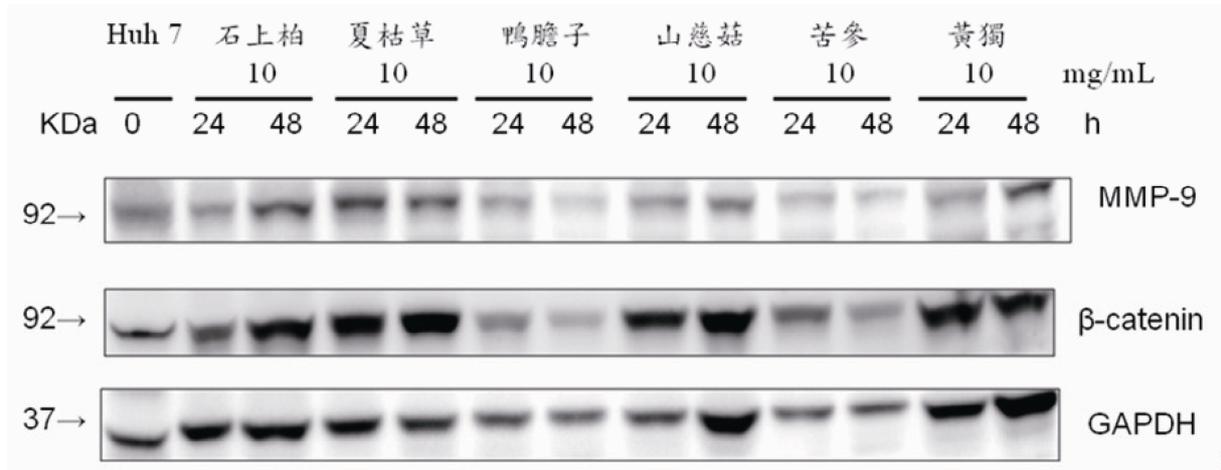
圖七、中藥單方處理 HepG2 之血管新生相關蛋白表現

接種 1×10^6 HepG2 細胞於 6 公分培養盤內。施以石上柏、夏枯草、鴨膽子、山慈菇、苦參及黃獨濃度均為 10mg/mL 後，於 24 及 48 小時萃取蛋白質，經 SDS-PAGE 轉漬到 Nitrocellulose transfer membrane 上，以 MMP-9、β-catenin、VEGF 及 GAPDH 抗體雜交，後以 goat-anti-rabbit 二級抗體雜交，再以 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 呈色並以冷光儀顯示呈色結果。



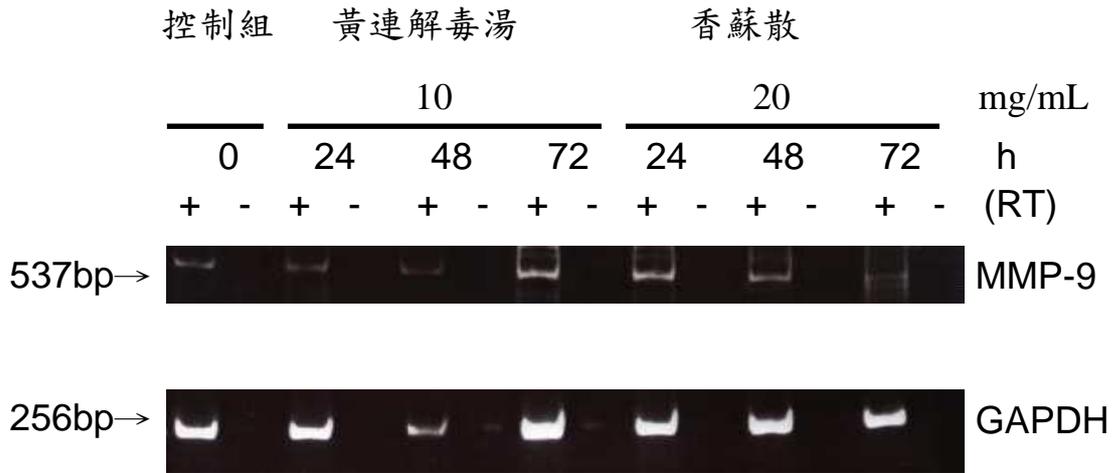
圖八、複方及其有效單方處理 Huh 7 之血管新生相關蛋白表現

接種 1×10^6 Huh 7 細胞於 6 公分培養盤內。施以香蘇散 10mg/ml、紫蘇葉 2.9mg/mL、黃連解毒湯 5.4mg/mL、黃連 1.4mg/mL 後，於 24、48、72 小時萃取蛋白質，經 SDS-PAGE 轉漬到 Nitrocellulose transfer membrane 上，以 MMP-9、 β -catenin 及 GAPDH 抗體雜交，後以 goat-anti-rabbit 二級抗體雜交，再以 ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 呈色並以冷光儀偵測顯影的結果。



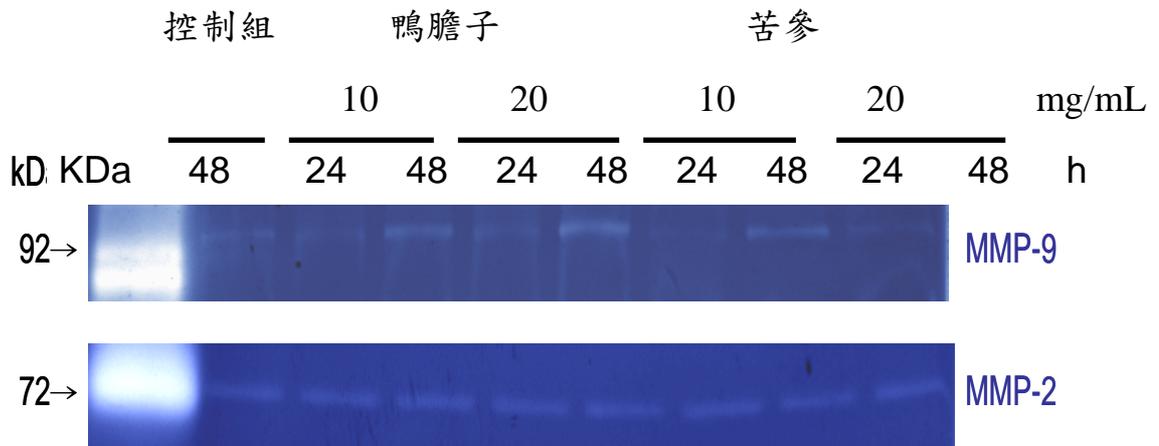
圖九、中藥單方處理 Huh 7 之血管新生相關蛋白表現

接種 1×10^6 Huh 7 細胞於 6 公分培養盤內。施以石上柏、夏枯草、鴨膽子、山慈菇、苦參及黃獨以 10 mg/mL 後，於 24 及 48 小時萃取蛋白質，經 SDS-PAGE 轉漬到 nitrocellulose transfer membrane 上，以 MMP-9、 β -catenin 及 GAPDH 抗體雜交，後以 goat-anti-rabbit 二級抗體雜交，再以 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 呈色並以冷光儀顯示染色結果。



圖十、中藥複方對於 HepG2 MMP-9 轉移因子 RNA 表現之變化

接種 2×10^6 HepG2細胞於10公分培養盤內。分別施以黃連解毒湯10 mg/mL、香蘇散20mg/mL後，培養24、48、72小時後，萃取RNA，利用MMP-9、GAPDH primers經PCR放大後，以6% polyacrylamide電泳分析PCR產物。



圖十二、鴨膽子與苦參對於 HepG2 之 MMP 活性測試

接種 1×10^6 HepG2細胞於6公分培養盤內。施以鴨膽子10和20 mg/ml 及苦參10和20mg/mL，經24、48小時後，收取細胞培養液 經SDS-PAGE後以2.5% Triton X-100清洗膠體以除去SDS，加入反應緩衝液於37°C作用18小時，再以Coomassie Brilliant Blue R250，染色並退染，最後利用Fuji Image Reader LAS-3000拍照顯影。

表一、中草藥複方萃取物處理 HepG2 之 IC₅₀

複方草藥	IC ₅₀ (mg/mL)		
	24	48	72 小時
黃連解毒湯 Coptis & Scute Combinatio (Huang Lian Jie Du Tang)	13.9	12.3	11
香蘇散 Cyperus & Perilla Formula (Xiang Su San)	34.6	35.1	27.2
小柴胡湯 (水萃取) (Xiao Chaihu Tang)	36.7	29.4	25.8
小柴胡湯 (70%酒精萃取)	49.4	31.5	34.5
半夏厚朴湯 (Banxia Houpo Tang)	47.2	37.5	24.7
核桃承氣湯 (Hetao Chengqi Tang)	156.4	97.3	51.5
柴胡加龍骨牡蠣湯 (Chaihu LongGu Muli Tang)	61.9	64	63.3

表二、中草藥單方萃取物處理 HepG2 之 IC₅₀

單方草藥	IC ₅₀ (g/mL)		
	24	48	72 小時
黃連 <i>Coptis chinensis</i> FRANCH (Huang Lian)	2.8	2.7	2.2
紫蘇葉 <i>Perilla frutesens</i> L. (Zi Su Ye)	10.7	9	6.9
石上柏 <i>Selaginella doederleinii</i> (Shishangbo)	47.3	15.2	7.5
夏枯草 <i>Prunella vulgaris</i> L. (Xiakucao)	33.1	18.7	15.3
鴨膽子 <i>Brucea javanica</i> (Yadanz)	33.3	15.2	7.5
山慈菇 <i>Pseudobulbus Cremastrae seu</i> <i>Pleiones</i> (Shancigu)	48.2	36.5	27.3
苦參 <i>Sophora tomentosa</i> L. (Kushen)	32.1	37.6	25.5
黃獨 <i>Dioscorea bulbifera</i> L. (Huang du)	44.7	36.9	25.2

表三、中草藥萃取物處理 Huh 7 之 IC₅₀

草藥名稱	IC ₅₀ (μg/mL)		
	24	48	72 小時
黃連解毒湯	17.4	14.2	10
香蘇散	26.5	27.5	21.3
黃連	3.9	1.7	1.6
紫蘇葉	11.5	8.9	8.5
石上柏	71.5	48.8	38.5
夏枯草	38.8	25.8	25.3
鴨膽子	31	3.8	2.1
山慈菇	140.9	178.3	120
苦參	41.4	34	26.8
黃獨	49.7	45.5	34.4

附錄一、中草藥萃取液來自 GMP 藥廠開發部複方：

小柴胡湯（水萃取） 批號 RV7401001	
處方	一日藥材量（g）
柴胡	8.0
黃芩	3.0
人參	3.0
炙甘草	3.0
半夏	5.0
生薑	3.0
大棗	2.0
小計	27.0
1.成品乾燥減重：73.11% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：73.4% 3.成品 pH：4.58 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

小柴胡湯（70%酒精萃取） 批號 RV7401002	
處方	一日藥材量（g）
柴胡	8.0
黃芩	3.0
人參	3.0
炙甘草	3.0
半夏	5.0
生薑	3.0
大棗	2.0
小計	27.0
<p>1.成品乾燥減重：88.23%</p> <p>2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：86.39%</p> <p>3.成品 pH：4.54</p> <p>4.每 1g 成品等於 1g 藥材</p>	

黃連解毒湯（水萃取） 批號 RV7401015	
處方	一日藥材量（g）
黃連	6.0
黃芩	6.0
黃柏	6.0
山梔子	6.0
小計	24.0
<p>1.成品乾燥減重：87.06%</p> <p>2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：89.32%</p> <p>3.成品 pH：4.62</p> <p>4.每 1g 成品等於 0.54g 藥材</p>	

半夏厚朴湯 批號 RV7401016	
處方	一日藥材量 (g)
半夏	8.0
厚朴	4.5
茯苓	6.0
生薑	7.5
紫蘇葉	3.0
小計	29.0
<p>1.成品乾燥減重：86.76%</p> <p>2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：88.2%</p> <p>3.成品 pH：4.31</p> <p>4.每 1g 成品等於 1g 藥材</p>	

核桃承氣湯（水萃取） 批號 RV7401033	
處方	一日藥材量（g）
桃仁	5.0
桂枝	5.0
大黃	10.0
芒硝	5.0
炙甘草	2.5
小計	30.0
1.成品乾燥減重：63.63% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：65.84% 3.成品 pH：4.95 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

柴胡加龍骨牡蠣湯 批號 RV7401034	
處方	一日藥材量 (g)
半夏	3.0
大棗	2.0
柴胡	5.0
生薑	2.0
人參	2.0
龍骨	2.0
桂枝	2.0
茯苓	2.0
大黃	2.5
牡蠣	2.0
黃芩	2.0
小計	26.5
<p>1.成品乾燥減重：79.79%</p> <p>2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：81.13%</p> <p>3.成品 pH：5.2</p> <p>4.每 1g 成品等於 1g 藥材</p>	

香蘇散 批號 RV74010058	
處方	一日藥材量 (g)
蔥白	3.0
陳皮	4.0
香附	8.0
紫蘇葉	8.0
炙甘草	2.0
生薑	3.0
小計	28.0
1.成品乾燥減重：81.74% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：82.43% 3.成品 pH：4.83 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

中草藥萃取液來自 GMP 藥廠開發部單方：

香蘇散/紫蘇葉（水萃取）RV7401061	
處方	一日藥材量（g）
紫蘇葉	8.0
小計	8.0
1.成品乾燥減重：94.58% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：95.08% 3.成品 pH：5.16 4.每 1g 成品等於 0.28g 藥材	

香蘇散/香附（水萃取）RV7401060	
處方	一日藥材量（g）
香附	8.0
小計	8.0
1.成品乾燥減重：96.01% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：96.89% 3.成品 pH：4.9 4.每 1g 成品等於 0.28g 藥材	

香蘇散/陳皮（水萃取）RV7401059	
處方	一日藥材量（g）
陳皮	4.0
小計	4.0
1.成品乾燥減重：95.75% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：96.16% 3.成品 pH：4.09 4.每 1g 成品等於 0.14g 藥材	

香蘇散/炙甘草（水萃取）RV7401062	
處方	一日藥材量（g）
炙甘草	2.0
小計	2.0
1.成品乾燥減重：98.05% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：97.94% 3.成品 pH：5.11 4.每 1g 成品等於 0.07g 藥材	

黃連解毒湯/黃連（水萃取）RV7401041	
處方	一日藥材量（g）
黃連	6.0
小計	6.0
1.成品乾燥減重：97.58% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：97.65% 3.成品 pH：4.97 4.每 1g 成品等於 0.135g 藥材	

黃連解毒湯/山梔子（水萃取）RV7401044	
處方	一日藥材量（g）
山梔子	6.0
小計	6.0
1.成品乾燥減重：96.78% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：96.75% 3.成品 pH：4.30 4.每 1g 成品等 0.135g 藥材	

石上柏（水萃取）RV74010184	
處方	實際稱取量（g）
石上柏	300.0
1.成品乾燥減重：81.74% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：82.43% 3.成品 pH：4.83 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

夏枯草（水萃取）RV7401083	
處方	實際稱取量（g）
夏枯草	300.0
1.成品乾燥減重：93.01% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：92.81% 3.成品 pH：5.36 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

鴨膽子（水萃取）RV7401083	
處方	實際稱取量（g）
鴨膽子	300.0
1.成品乾燥減重：90.74% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：90.46% 3.成品 pH：5.23 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

山慈菇（水萃取）RV7401083	
處方	實際稱取量（g）
山慈菇	300.0
1.成品乾燥減重：93.89% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：94.09% 3.成品 pH：4.04 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

苦參（水萃取）RV7401083	
處方	實際稱取量（g）
苦參	300.0
1.成品乾燥減重：83.97% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：84.55% 3.成品 pH：4.98 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	

黃獨（水萃取）RV7401083	
處方	實際稱取量（g）
黃獨	300.0
1.成品乾燥減重：93.16% 2.成品經離心處理之澄清乾燥液乾燥減重：92.45% 3.成品 pH：5.03 4.每 1g 成品等於 1g 藥材	