

## 第一章、前言

隨著生物醫藥科技的進步，壽命的延長再加上工業發展造成的環境污染，使得癌症的死亡率在許多國家中都是十大死因的首位。而我國癌症的死亡率也早在民國 71 年就已經位居第一位而且蟬連至今。而癌症的治療方式，也隨著生物醫藥科技的進步，有許多的進展。手術、化學及放射治療、免疫療法、基因療法、分化療法等都是癌症現在治療的模式。然而中醫藥的療法，根據傳統的經驗以及近來的發現，一直被認為應該佔有一席之地。

傳統的化學及放射治療是經由對惡性癌細胞產生抑制細胞生長或細胞毒殺作用來達到抑制惡性癌細胞的增生，所以利用化學及放射治療可以大大地改善癌症患者的預後。例如小兒急性淋巴性白血病( Acute Lymphocytic Leukemia) ，合併使用化學及放射治療可以使其五年存活率達到百分之六十至八十<sup>1</sup>。但是這種治療因為缺乏對細胞的選擇性，所以會使正常細胞有嚴重的副作用。特別是正常生理狀況下會快速週轉的細胞，而產生例如脫髮或黏膜炎、腹瀉等的副作用。更何況這些療法，在大多數人類癌症中無法給予較好的治癒率，所以發展新的治療方法便成為一個重要的課題。

急性前骨髓性白血病的治療，從西元 1986 年起就有些學者利用維甲

酸( Vitamin A)的活性代謝物- ATRA，在體內及體外實驗中發現，其可以使急性前骨髓白血病細胞走向分化<sup>2,3</sup>。而臨床上可以使全部緩解率達到 85-90%。但因為大多數的病人會有抗藥性的產生，所以無法維持長期的無疾病的緩解期<sup>2,4</sup>。CDA-2 是由新鮮人尿萃取出來的抗癌物，而人尿萃取物被認為是人類自然產生抗癌的化學成分，具有誘導癌細胞分化、凋亡及抗轉移等的效果。然而這種多靶性的藥物在人體的使用之副作用極為少數且是可忍受的<sup>5</sup>。所以 ATRA 合併使用 CDA-2 能否增加全反式維甲酸之抗癌效果，減少 ATRA 的副作用，是一個很令人期待的療法。

維他命 C 是一種人類體內不可或缺的維生素，也是一種抗癌的重要物質<sup>6</sup>。其在體內及體外的實驗中，有極強的細胞毒殺作用<sup>7,8</sup>及誘導癌細胞凋亡的作用<sup>9,10</sup>。所以 CDA-2 是否對維他命 C 的抗癌效果也有加強的效果，其機轉為何，都是值得進一步的研究。

## 第二章、文獻探討

### (一)中醫文獻探討

#### 壹．白血病

白血病是造血組織的原發性腫瘤。其在骨髓及造血組織中會有廣泛的白血病細胞異常增生以及向全身各組織浸潤破壞的情形。臨床主要症狀為貧血、出血症狀，發熱感染，肝脾淋巴結種大等。其中醫的領域中可能屬於積聚等範圍<sup>12</sup>。

積聚之病，首載於《內經》<sup>13</sup>。該書對於本證的病因、病機及治則有所論述。如《靈樞·百病始生》篇指出：“積之始生，得寒乃生。”“若內傷於憂怒，則氣上逆，氣上逆則六輸不通，溫氣不行，凝血蘊裡而不散，津液澀滲，著而不去，而積皆成矣。”《素問·六元正紀大論》則指出其治則：“堅者削之，客者除之，結者散之，留者攻之，逸者行之，堅者軟之。”對治療本證，有著根本的指導意義。

漢代，張仲景《金匱要略·五臟風寒積聚病證》篇提到：“積者，臟病也，終不移；聚者，腑病也，發作有時，展轉痛移，為可治<sup>14</sup>。”不僅指出了積與聚臨床上的特點，並且根據病情的輕重，判斷其預後。和現代醫學由對白血病的分期，來決定其預後，有著許多相似之處。

隋代，巢元方於《諸病源侯論》中也記載：“積者，臟病也，陰氣所生

也；聚者，腑病也，陽氣所成也。虛勞之人，陰陽傷損，血氣凝澀，不能宣通經絡，故積聚於內也。”明白地創立了虛勞致積的理論學說<sup>15</sup>。

明代醫家張景岳在其所著的《景岳全書·積聚論治》中，對於其病因及病機有更全面的認識：“積聚之病，凡飲食、血氣、風寒之屬，皆能致之，但曰積曰聚，當詳辨也。蓋積者，積壘之謂，由漸而成者也；聚者，聚散之謂，作止不常者也。由此言之是堅硬不移者本有形也，固有形者曰積；或聚或散者，本無形也，故無形者曰聚，諸有形者，或以飲食之滯，或以濃血之留。凡汁沫凝聚，旋成癥塊者，皆積之類，其病多在血分，血有形而靜也。諸無形者，或脹或不脹，或痛或不痛，凡隨觸隨發，時來往者，皆聚之類，其病多在氣分，氣無形而動也。<sup>16</sup>”

而對於治療方面，清代《醫宗必讀·積聚》篇中提到：“初者，病邪初起，正氣尚強，邪氣尚淺，則任受攻。中者，受病漸久，正氣較弱，任受且攻且補。末者，病魔經久，邪氣侵凌，正氣消殘，則任受補<sup>17</sup>。”

隨著正邪勝衰的趨勢而改變其治療的方式。而扶正培本，配以去邪消積，但攻邪之藥，不可過猛，以傷正氣，造成不良的後果。

## 貳·人尿

我國古代已有使用人尿治療疾病的記載。根據東漢醫聖張仲景所著

《傷寒雜病論》：“少陰病，下利脈微者，白通加豬膽湯主之。<sup>18</sup>”是中國最早應用人尿於現代醫學的休克綜合症候群等重症的記載。

《本草拾遺》中提到：“主明目益聲，潤肌膚，利大腸，推陳致新，去咳嗽肺痿。<sup>19</sup>”《日華子本草》也論及：“人尿，止勞渴，潤心肺，療血悶熱狂，仆損瘀血運絕及困血。<sup>20</sup>”唐代醫家孫思邈也認為：“人尿乃傷科之仙藥也。”“火燒悶絕，不省人事，人尿頻服二三升良。”“金瘡出血不止，飲人尿五升癒。<sup>21</sup>”

而明代李時珍也於《本草綱目》中也對人尿有所論述：“小便性溫不寒，飲之入胃，隨脾之氣上歸於肺，下通水道入膀胱，及其歸路也。故能治肺病，引火下行。凡人精氣，清者為血，濁者為氣，濁之清者為津液，清之濁者為小便，小便與血同類也，故其味鹹陽走血，治諸血病也。”“主治寒熱頭痛、溫氣、久咳上氣失聲，症積滿腹，明目益氣，潤肌膚，利大腸，推陳致新，去咳嗽肺痿，鬼氣恐冷，止勞渴，潤心肺，療血悶熱狂，撲損，瘀血在內運絕，止吐血，皮膚皸裂，難產，胎衣不下，蛇犬咬，滋陰降火，殺蟲解毒，療瘧中暈。<sup>22</sup>”

## (二)現代文獻探討

### (壹)急性前骨髓性白血病

急性前骨髓性白血病(或 AML-M3)的診斷根據 France-America-

Britain (FAB)的分類<sup>23</sup>，約佔急性骨髓性白血病的百分之十。臨床上急性前骨髓性白血病常合併有出血症候、貧血、淋巴結腫大等。而急性前骨髓性白血病細胞大多對化學治療有敏感性，主要是 anthracyclin 及 Ara-C 類的化學治療藥物，但在緩解期的早期會有較高的死亡率<sup>23</sup>。

急性前骨髓性白血病不同於其他的急性骨髓性白血病其他亞型，因為其有第 15 對及第 17 對染色體互相轉位的特徵，而使得其有前骨髓性白血病(Promyelocytic Leukemia,PML)基因與維甲酸接受器(Retinoid Acid Receptors,RAR) 基因互相融合的特徵<sup>24</sup>。這種前骨髓性白血病基因與維甲酸- 接受器(RAR- ) 基因互相融合的基因稱之為 PML-RAR 基因，是一種控制白血病化(leukogenesis)的基因。是故表現為較積極浸潤的急性前骨髓性白血病，會有明顯的過度白血病化(hyperleukogenesis)的情形<sup>25</sup>。

#### (貳) ATRA 用於前骨髓性白血病的治療

從西元 1986 年起，一個維他命 A 的活性代謝物- ATRA，在體內及體外實驗中，發現其會誘導前骨髓性白血病細胞走向分化，且臨床上可使全部緩解率達到 85-90%，給于 3 至 4 週的 ATRA，病人的骨髓內有特異性的分化良好的顆粒球的變化<sup>3,4</sup>。但其維持全部緩解率大約只有 4 至 5 個月<sup>26</sup>，而且有相當高的復發的比例<sup>27</sup>。

另外在體外實驗中也發現 ATRA 可以增加癌細胞 G1 期的比例，引導 G1 期的停滯( G1 Arrest),使 DNA 的合成停滯以及增加 P53 基因的表現。且其抑制細胞生長作用明顯多於細胞毒殺之作用，具有調整細胞週期及化學預防( chemoprevention)的效果<sup>28</sup>。而在調控人類乳頭狀病毒( Human Papillary Virus)的複製以及轉錄， ATRA 則表現出有時間及劑量的關係，故被認為可以用於子宮頸癌的防治<sup>29,30</sup>。

而在分子生物層級上， ATRA 更直接作用於 PML-RAR 基因，調控 PML-RAR 基因的表達，使癌細胞走向分化<sup>31</sup>。

#### (參)維他命 C 用於癌症的治療

維他命 C 於急性前骨髓性白血病細胞株 - HL-60、ML-1、THP-1 中會誘導血癌細胞走向凋亡<sup>32,33,34,35</sup>。維他命 C 也會對黑色素瘤<sup>36</sup>、Ehrlich 腹水癌 373 細胞<sup>37,38</sup>、B-mel 細胞<sup>39</sup>有細胞毒殺的作用。

另外，維他命 C 對於 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene 誘發之老鼠的肝細胞癌促使其走向凋亡<sup>40,41</sup>，證實其在化學防治的角色。雖然 Pauli 提出大量維他命 C 治療癌症，尚有許多爭議<sup>42,43,44</sup>，但是大劑量維他命 C 卻會引發腫瘤戲劇性地縮小，雖然其在病人間有很大的差異性<sup>45,46,47,48,49,50</sup>。

維他命 C 合併 cisplatin 或 doxorubicin 於人類乳癌細胞上，具有協

同之細胞毒殺作用，另外維他命 C 還可以減少 doxorubicin 的心臟毒性<sup>51</sup>。也可以減少 cisplatin 對腎細胞的傷害性。而且因為維他命 C 可以藉著影響 p-glycoprotein 的表現而增加細胞內藥物的堆積，藉以強化長春花鹼類化學治療藥物的作用<sup>53</sup>。

而對於硝酸氨的致癌性，維他命 C 也有抑制的作用<sup>54</sup>，也具有抑制硝酸氨的致突變性<sup>55</sup>，更表明其防治胃癌的角色。

#### (肆) 人尿用於癌症的治療

古埃及、希臘、羅馬、印度、中國及北美洲的歷史都有使用人尿治病的記載。而於西元 1937 年就有科學家研究人尿中抑制生長的物質<sup>56</sup>。但最早從人尿萃取出抗癌的有效物質，是美國一群以 Burzynski 為首的科學家，於西元 1976 年首度發現<sup>56</sup>。它是一種人體自然產生的胺基酸及 peptide 類，可以抑制腫瘤的生長<sup>57</sup>。而這些源自於人類血液及尿液中中小體積的胺基酸及 peptide 類的衍生物，因為具有重新程序重調 (reprogram) 基因而來主控生物化學抗癌系統，進而控制腫瘤生長的特性，故將其名之為“抗癌物質”(Antineoplaston)<sup>58</sup>。

抗癌物質中最具代表性的為 A-10、AS2-1、A5。A-10 為 3-phenylacetyl-amino-2,6-piperidinedion，是 phenylacetylglutamine (PAG) 及 phenylacetic acid (PAA) 以 4:1 的比例製成，其會降低肝細

胞癌之胎兒甲蛋白的產生<sup>59</sup>，使肝癌細胞生長抑制<sup>60</sup>，尚可和 cisplatin 合併用於肝癌的治療<sup>61</sup>。增加乳癌病人體內癌細胞凋亡<sup>62</sup>。

AS2-1 是 phenylacetylglutamine(PAG) 及 phenylacetic acid(PAA) 以 1:4 的比例製成，可以抑制膠質腦瘤(glioma)細胞的生長以及使人類紅白血病( erthroleukemia)走向分化而使血色素製造增加<sup>63</sup>，也可使纖維肉瘤以及惡性黑色素瘤細胞走向分化<sup>64</sup>。另外其又可以活化肝細胞癌細胞之 p53 基因的表現<sup>65</sup>。AS2-1 也可以抑制賀爾蒙抗性之前列腺癌細胞 PC3 增生<sup>66</sup>。Samid 等人也報告 AS2-1 會使 myc 致癌基因表達快速消失，造成生長停滯；使前骨髓性白血病有正常的顆粒球分化的情形<sup>67</sup>；使膠質腦瘤(glioma)細胞 U-251 及 C6 分化增加<sup>68</sup>。

A5 也會引起 HL-60 細胞走向分化<sup>69</sup>，此外尚有調整 dopamine 接受器的過高或過低活性，進而緩解 Parkisons' 病的症狀<sup>70</sup>。尿中其他物質，OA-0.79 PP-0 也會引起 HL-60 細胞核酸去甲基化而走向分化<sup>71</sup>。而 Zvi Ram 等人則用 phenylacetate 治療老鼠的膠質肉瘤 ( gliosarcoma)，發現其有延長存活率以及抑制腫瘤生長的結果，而且其效果與劑量成正比關係<sup>72</sup>。而 Phenylacetate 也可以逆轉人類癌細胞的表型<sup>73,74,75,76</sup>。另外在長期低劑量暴露於 phenylacetate 會增加腦瘤的放射敏感性，如此可以強化放射治療細胞毒殺的作用<sup>77</sup>。

## 第三章、材料與方法

### 壹、實驗材料

一、血癌細胞株(HL-60)：急性前骨髓性白血病細胞，購自 American type culture collection。

### 二、藥品試劑

1. 人尿萃取物(Human Urine Extract, CDA-2)：購自永生製藥，由廖明徵博士發明。

2. 全反式維甲酸(All-trans Retinoid Acid, ATRA)：購自 Sigma 公司。

3. 維他命 C(Vitamin C)：購自 Merck 藥廠。

4. 細胞培養試劑 RPMI：購自 Gibco 公司。

5. NBT 試劑：購自 Sigma 公司。

6. Trypan Blue 試劑：購自 Gibco 公司。

### 三、常用儀器及材料

1. 倒立顯微鏡：Olympus IX70

2. 細胞培養箱：Formoa scientific CO<sub>2</sub> incubator

3. 冷凍離心機：Backman GS-6R

4. eppendorf 離心機：Eppendorf centrifuge 5417

5. Water bath：Zeta ZC4000

6. Mixer: Vortex 2-genie
7. 電動微量天秤: SiberHegner AT200
8. PH meter: Hanna instruments 8521
9. 流式細胞分析儀( flow cytometry) : BD FACscan

## 貳、實驗方法:

### 一. HL-60 細胞株的培養 :

將 HL-60 細胞株解凍後.培養於 RPMI 培養基,其內含有 10%FBS ,  $10^5$  unit/L penicillin , 10 ì g/ml streptomycin 及 glutamine。培養至第三代以上 , 以 Trypan Blue 染色後於倒立顯微鏡下計算其細胞數 , 並計算其倍增時間[ Doubling Time :  $\log 2 \times \text{time}/(\log \text{現有細胞數} - \log \text{原有細胞數})$  ], 連續兩代之倍增時間誤差不超過 5% , 且其連續兩代之 viability >90% ( viability:存活細胞數/總細胞數) , 始可作為本實驗所用之 HL-60 細胞株。

每次取用 15 ml 培養液內含  $5 \times 10^4$  個 HL-60 細胞於 T-75 flask , 先置於細胞培養箱培養 24 小時後,再進行下列各項實驗。

### 二. CDA-2、ATRA 及維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響

#### 1. CDA-2 對 HL-60 細胞生長的影響

將 HL-60 細胞培養於 T-75 flask 後 , 分別加入 0 ( control 組), 0.02、 0.1、 0.5、 1、 2 mg/ml 之 CDA-2 , 3 天後將各組培養基

離心後吸取上清液,並加入 15 ml 培養基,以 Trypan Blue Exclusion 方法用血球記數器計算其細胞數. 而後計算其各組的存活率。並計算其加藥組存活率 (存活率: 存活細胞數/control 組存活細胞數), 而後根據各組存活率曲線計算其 IC<sub>50</sub>。

## 2. ATRA 對 HL-60 細胞生長的影響

方法與 1 相同, 其所取之 ATRA 濃度為 0 (control 組)、 0.001、 0.01、 0.1、 1、 10、 100  $\mu$ M。

## 3. 維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響

方法與 1 相同, 其所取之維他命 C 濃度為 0 (control 組) 0.0001、 0.001、 0.01、 0.1、 1 mg/ml。

## 三. CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞生長的影響

將 HL-60 細胞植於 T-75 flask 後,分別加入 0 (control 組)、 0.02、 0.1、 0.5、 1、 2 mg/ml 之 CDA-2 以及 ATRA 濃度 0 (control 組)、 0.001、 0.01、 0.1、 1、 10  $\mu$ M; 3 天後將各組培養基離心後吸取上清液,並加入 15 ml 培養基。而後計算其各組的存活率。而後根據各組存活率曲線計算其 IC<sub>50</sub>。

## 四. CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響

將 HL-60 細胞植於 T-75 flask 後,分別加入 0 (control 組)、0.02、0.1、0.5、1、2 mg/ml 之 CDA-2 以及維他命 C 濃度 0 (control 組)、0.0001、0.001、0.01、0.1  $\mu$ M ; 3 天後將各組培養基離心後吸取上清液,並加入 15 ml 培養基。而後計算其各組的存活率。根據各組存活率曲線計算其 IC<sub>50</sub>。

#### 五. CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導分化的影響

將血癌細胞植於 T-75 flask 後,分別加入 0 (control 組)、0.02、0.1、0.5、1、2 mg/ml 之 CDA-2 及 ATRA 濃度 0 (control 組)、0.001、0.01、0.1、1、10  $\mu$ M ; 3 天後計算其各組的 NBT 陽性率(其方法見表一)。

表一:NBT 還原作用檢測

- (1) 取 200  $\mu$ l 含培養夜的細胞於離心管
- (2) 以 1000 rpm / minutes 離心,以 PBS ( without serum)清洗兩次
- (3) 加 RPMI200  $\mu$ l 而後 suspended the cell pellet
- (4) 加 NBT agent
- (5) 加 t-PA ( 12-o-tetradecanoyl phorphol-13 acetate)
- (6) Incubate sample at 37  $^{\circ}$ C , 5% CO<sub>2</sub> incubator for 30 minutes,
- (7) Counting the NBT-positive cells in hemocytometer.

## 六. CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導分化的影響

將 HL-60 細胞培養於 T-75 flask 後,分別加入 0 (control 組)、0.02、0.1、0.5、1 mg/ml 之 CDA-2 以及維他命 C 濃度 0 (control 組)、0.0001、0.001、0.01、0.1  $\mu$ M ; 3 天後計算其各組的 NBT 陽性率。

## 七. CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導凋亡機轉的探討

將 HL-60 細胞培養於 T-75 flask 後,分別加入 0 (control 組)、0.02、0.1、0.5、1 mg/ml 之 CDA-2 以及 ATRA 酸濃度 0 (control 組)、0.001、0.01、0.1、1、10  $\mu$ M ; 3 天後用流動細胞分析儀分析其各組的細胞 sub-G1 期的比率。

## 八. CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導凋亡機轉的探討

將 HL-60 細胞植於 T-75 flask 後,分別加入 0 (control 組)、0.02、0.1、0.5、1 mg/ml 之 CDA-2 以及維他命 C 濃度 0 (control 組)、0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1  $\mu$ M ; 3 天後用流動細胞分析儀分析其各組的細胞 sub-G1 期的比率。

## 參、統計方法

以 SAS 統計軟體計算 ANOVA.

## 第四章、結果

### 一、 CDA-2、 ATAR 及維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響

#### 1. CDA-2 對 HL-60 細胞生長的影響

CDA-2 對 HL-60 細胞生長的影響其結果見表二， HL-60 細胞數目呈現劑量反應相關效應( dose-dependent relationship)， CDA-2 濃度愈高， HL-60 存活細胞數愈少；以 one-way ANOVA 檢測各組間有統計學上顯著的差異。IC<sub>50</sub> 為 1.02 mg/ml。

表二 CDA-2 對體外培養的 HL-60 細胞生長抑制作用

<u>CDA-2 (mg/ml)</u>	<u>生長存活率(%)</u>
0.00	100.00
0.02	97.20±2.88
0.10	94.07±3.64
0.50	73.73±3.29
1.00	60.67±3.21
2.00	18.33±4.04
4.00	0.00

#### 2. ATRA 對 HL-60 細胞生長的影響

ATRA 對 HL-60 細胞生長的影響其結果見表三， HL-60 細胞數目呈現劑量反應相關效應； ATRA 濃度愈高， HL-60 存活細胞數愈少；以 one-way ANOVA 檢測各組間有統計學上顯著的差異。IC<sub>50</sub> 為 6 μM。

表三 ATRA 對體外培養的 HL-60 細胞生長抑制作用

<u>ATRA (<math>\mu</math> M)</u>	<u>生長存活率(%)</u>
0	100.00
$10^{-3}$	96.17 $\pm$ 1.06
$10^{-2}$	94.57 $\pm$ 1.17
$10^{-1}$	88.00 $\pm$ 0.82
1	77.23 $\pm$ 2.42
10	45.23 $\pm$ 3.59
100	0.00

### 3. 維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響

維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響其結果見表四，HL-60 細胞數目呈現劑量反應相關效應；維他命 C 濃度愈高，HL-60 存活細胞數愈少；以 one-way ANOVA 檢測各組間有統計學上顯著的差異。IC<sub>50</sub> 為 0.01 mg/ml。

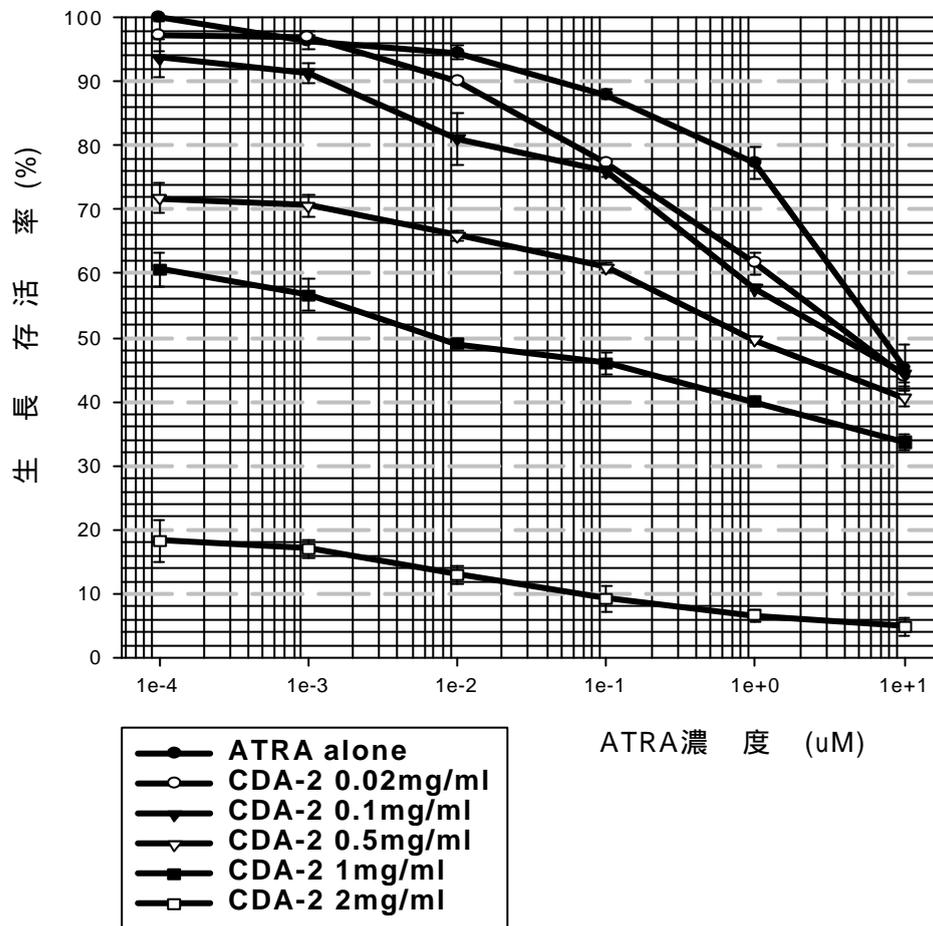
表四 維他命 C 對體外培養的 HL-60 細胞生長抑制作用

<u>維他命 C (mg/ml)</u>	<u>生長存活率(%)</u>
0	100.00
$10^{-4}$	98.77 $\pm$ 0.87
$10^{-3}$	88.73 $\pm$ 3.03
$10^{-2}$	70.40 $\pm$ 7.69
$10^{-1}$	11.10 $\pm$ 6.07
1	0.00

## 二 . CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞生長的影響

CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞生長的影響其結果見圖一 , HL-60 細胞數目呈現劑量反應相關效應 ; 以 two-way ANOVA 檢測各組間有統計學上顯著的差異。

根據圖一結果 , CDA-2 對 HL-60 細胞生長抑制的表現與 ATRA 有加成的作用。未加 CDA-2 組 , 其達到  $IC_{50}$  所需 ATRA 劑量為  $6 \mu M$ 。CDA-2 0.02 mg/ml 組 , 其達到  $IC_{50}$  所需 ATRA 劑量為  $4 \mu M$ 。CDA-2 0.1 mg/ml 組 , 其達到  $IC_{50}$  所需 ATRA 劑量為  $3 \mu M$ 。CDA-2 0.5 mg/ml 組 , 其達到  $IC_{50}$  所需 ATRA 劑量為  $0.20 \mu M$ 。CDA-2 1 mg/ml 組 , 其達到  $IC_{50}$  所需 ATRA 劑量為  $0.01 \mu M$ 。是故 CDA-2 可以加強對 ATRA 的  $IC_{50}$  影響達 1.5 600 倍。



圖一 CDA-2合併 ATRA 對 HL-60 生長抑制作用的探討

### 三. CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響

CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響其結果見圖二，細胞數目呈現劑量反應相關效應；以 two-way ANOVA 檢測各組間有統計學上顯著的差異。

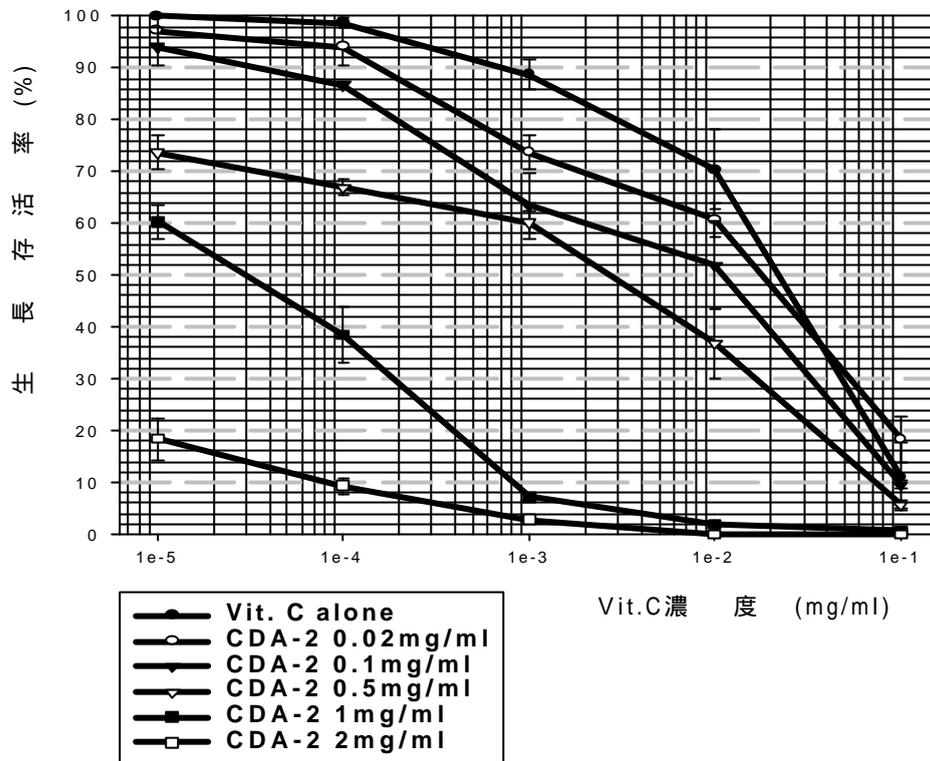
CDA-2 分別在 0.02 0.1 0.5 1 mg/ml 合併維他命 C 0.0001、

0.001、 0.01 mg/ml 對血癌細胞(HL-60) 生長抑制的表現有協同的作用。未加 CDA-2 組，其達到  $IC_{50}$  所需維他命 C 劑量為 0.01 mg/ml。CDA-2 0.02 mg/ml 組，其達到  $IC_{50}$  所需維他命 C 劑量為 0.009 mg/ml。CDA-2 0.1 mg/ml 組，其達到  $IC_{50}$  所需維他命 C 劑量為其 0.008 mg/ml。

CDA-2 0.5 mg/ml 組，其達到  $IC_{50}$  所需維他命 C 為 0.0012 mg/ml。

CDA-2 1 mg/ml 組，其達到  $IC_{50}$  所需維他命 C 劑量為 0.00012 mg/ml

是故 CDA-2 在 0.5 mg/ml 1 mg/ml 下分別可以加強對維他命 C 的  $IC_{50}$  影響達 8.3 倍以及 833 倍。



圖二 CDA-2合併 Vit.C對 HL-60生長抑制作用的探討

#### 四 . CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導分化的影響

CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導分化的影響，對其 NBT 陽性率的影響結果見圖三，HL-60 細胞 NBT 陽性率呈現劑量反應相關效應；以 two-way ANOVA 檢測各組間有統計學上顯著的差異。

各組間結果分析後，CDA-2 對 HL-60 細胞誘導分化的表現與 ATRA 有協同的作用。

CDA-2 2 mg/ml 組，可以分別加強 ATRA 在 0.01、0.1、1 μM 的劑量下誘導分化表現達 2~8 倍。

CDA-2 1 mg/ml 組，可以分別加強 ATRA 在 0.01、 0.1、 1  $\mu$ M 的劑量下誘導分化 表現達 3~16 倍。

CDA-2 0.5 mg/ml 組，可以分別加強 ATRA 在 0.01、 0.1、 1  $\mu$ M 的劑量下誘導分化 表現達 2~20 倍。

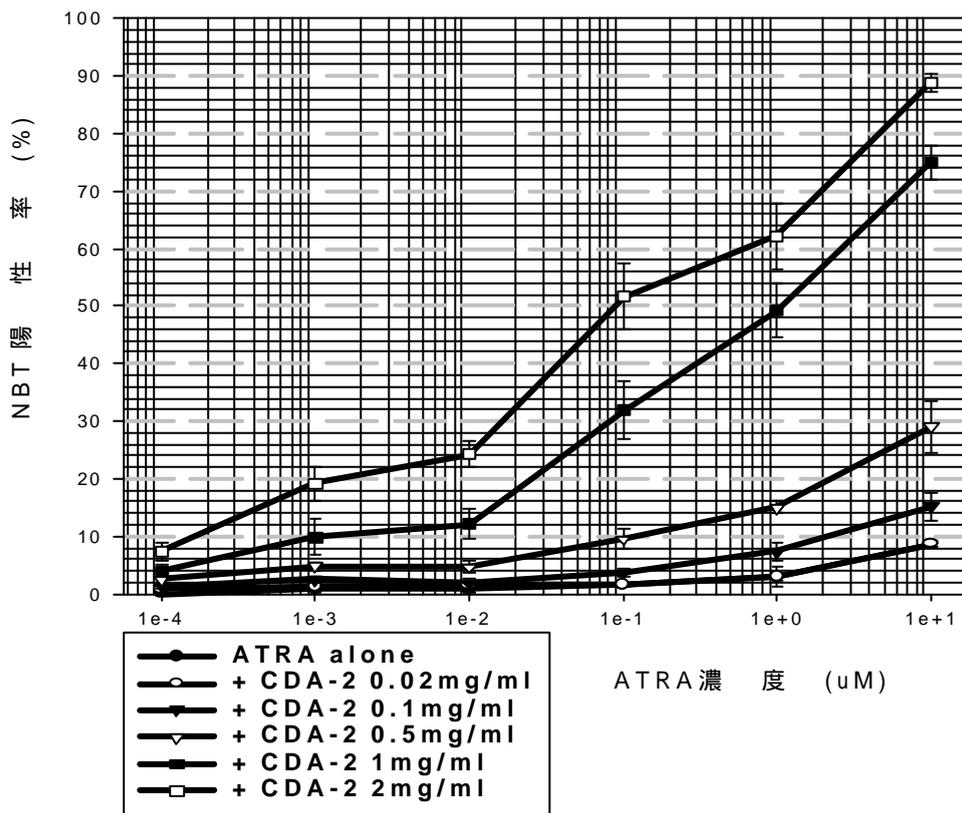


圖 三 CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 誘導分化的探討

## 五． CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導分化的影響

CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導分化的影響，對其 NBT 陽性率的影響結果見圖四，HL-60 細胞 NBT 陽性率沒有呈現劑量反應相關效應；且以 two-way ANOVA 檢測各組間沒有統計學上顯著的差異是故 CDA-2 對維他命 C 誘導 HL-60 細胞分化上沒有加強的作用。

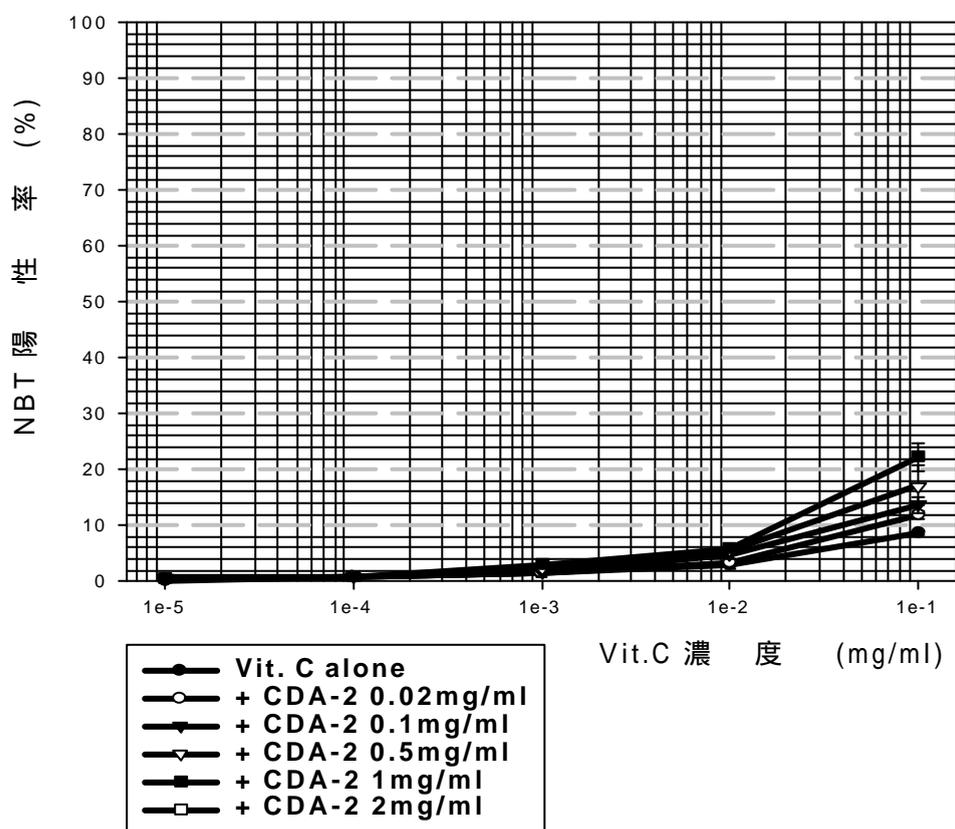


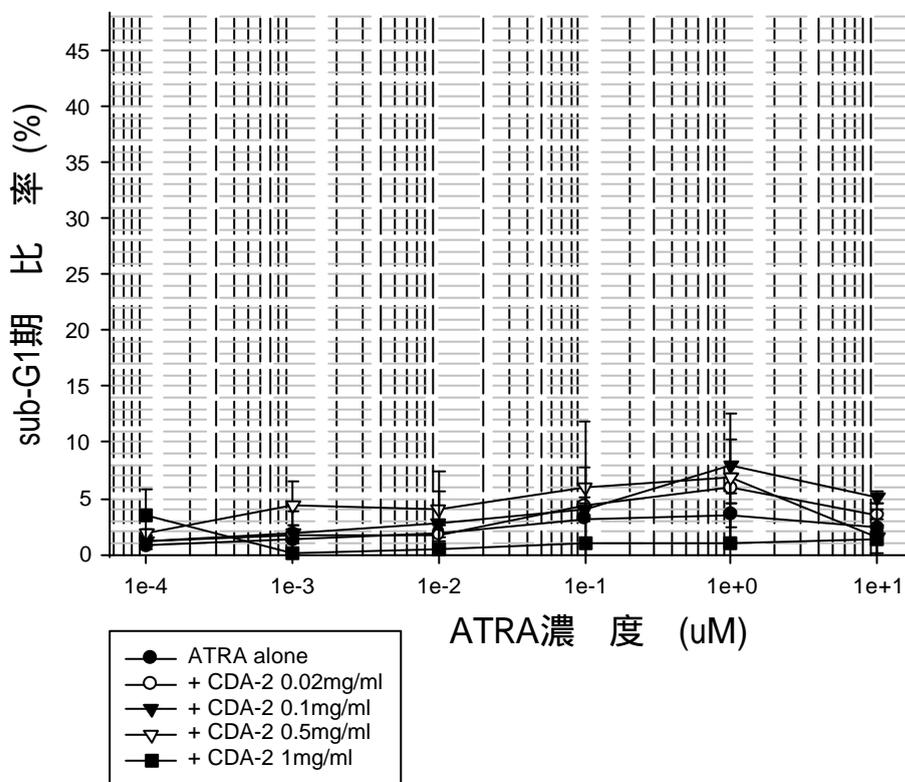
圖 四 CDA-2 合併 Vit. C 對 HL-60 誘導分化的探討

## 六． CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導凋亡機轉的探討

CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導凋亡的實驗中，用流式細胞

分析儀計算其各組的細胞 sub-G1 期的比率。其各組細胞 sub-G1 期的比率的結果見圖五。各組間 HL-60 細胞中 sub-G1 期的比率沒有呈現劑量反應相關效應；且以 two-way ANOVA 檢測沒有統計學上顯著的差異。

證實 CDA-2 對 ATRA 誘導 HL-60 細胞凋亡的表現上沒有加強的作用。



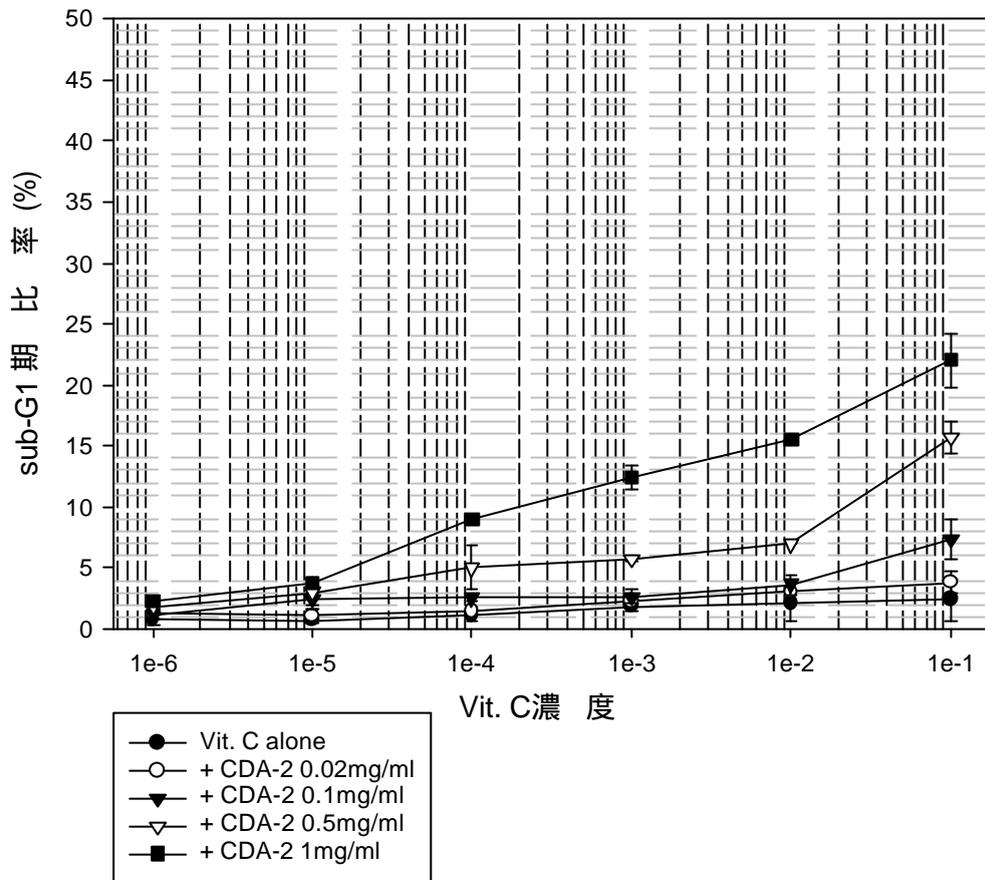
圖五 CDA-2 對 ATRA 誘導 HL-60 細胞凋亡的探討

## 七. CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導凋亡機轉的探討

CDA-2 及維他命 C 對 HL-60 細胞誘導凋亡的實驗中，用流式細胞

分析儀計算其各組的細胞 sub-G1 期的比率。其各組細胞 sub-G1 期的比率的結果見圖六。各組間 HL-60 細胞中 sub-G1 期的比率呈現劑量反應相關效應；以 two-way ANOVA 檢測有統計學上顯著的差異。各組間結果分析後，CDA-2 對 HL-60 細胞誘導凋亡的表現與維他命 C 有協同的作用。

CDA-2 1 mg/ml 組，可以分別加強維他命 C 在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 3~5 倍。CDA-2 0.5 mg/ml 組，可以分別加強全反式維甲酸在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 2.5~3.5 倍。CDA-2 0.1 mg/ml 組，可以分別加強維他命 C 在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 2~3 倍。CDA-2 0.02 mg/ml 組，可以加強維他命 C 在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 2~3 倍。



圖六 CDA-2對 Vit. C 誘導凋亡作用探討

## 第五章、討論

過去三十年來，癌症的治療著重在細胞毒殺劑的研發，但有一個現象，細胞的分化和癌症的侵犯性成反比<sup>78</sup>。細胞分化製劑具有重新指導細胞走向正常的表型、型態學上的正以及會使異常增生能力的消失，也可以逆轉或壓抑侵犯的病灶，或者防止癌症的侵犯<sup>79,80,81,82</sup>。所以細胞分化製劑是一個深具吸引力的課題。

而維甲酸源自於動物的類維生素 A (retinoids)、植物的前維生素-類胡蘿蔔素(carotenoid)，在人體腸道轉換成視黃醇(retinal)，肝臟吸收後以 retinyl palmitate 儲存，而維甲酸與白蛋白結合在身體內運輸。維生素 A 其在體內的生理作用是維持正常生長、視力、生殖及骨頭合成。缺乏維生素 A 最早表現為夜盲症，而後有抑制精子生長及致畸胎性；動物實驗中則發現缺乏維生素 A 會有較高機率的致癌性，且會增加致癌物的敏感性<sup>83</sup>。

ATRA 也可以抑制致癌物所引起膀胱癌、乳癌、肝癌、肺癌、胰臟癌以及前列腺癌<sup>84,85,86,87</sup>；另外在維生素 A 缺乏動物，會有較多機會發生胃癌<sup>88</sup>或上皮鱗狀化生<sup>89</sup>。維生素 A 也可以維持上皮組織及控制其正常分化作用。所以對舌癌、肺癌、食道癌及咽癌有初級化學預防的作用<sup>90</sup>，可以逆轉子宮頸癌、皮膚癌、口腔癌的前癌病灶<sup>91,92,93</sup>，更有大型的

臨床研究證實維生素 A 有預防頭頸癌之次發性腫瘤<sup>94</sup>。

臨床上 ATRA 主要用於急性前骨髓性白血病的治療，雖然其全部緩解率高達 90%，但全部緩解率期間大多只有維持不到六個月的時間。最近的急性前骨髓性白血病治療方式則是用 ATRA 合併化學治療，可以使全部緩解率更超過 90%，且有改善存活率的好處<sup>95</sup>；如此的作法也可能對週邊 T 細胞淋巴瘤有效。另外 ATRA 加上干擾素 也可用於治療鱗狀細胞癌<sup>96</sup>及轉移性腎細胞癌<sup>96,97,98</sup>。

ATRA 其用於癌症的治療可能機轉，見表五。而其治療前骨髓性白血病最主要機轉為藉由結合維甲酸接受器進而調控 PML-RAR 基因的轉錄，使 DNA 及 RNA 去甲基化(hypomethylation)，減少核糖體(ribosome)的產生，重新重建分化路徑，使癌細胞走向終末分化<sup>24</sup>。雖然可使全部緩解率高達 90%，但全部緩解率期間大多只有維持不到六個月的時間，而且有極高復發的比例。這可能是因為藥物濃度下降<sup>99</sup>或者因為與抗藥性的產生有關；也可能是因為長期使用全反式維甲酸會使藥物代謝如 cytochrome P450 P170 的改變，或是因為 CRABP (cellular resistant-binding protein)被強化，所以無法維持足夠藥物濃度來達成誘導細胞分化的作用，遂產生抗藥性及復發<sup>23,100</sup>。所以有的學者合併化學治療藥物或大量類固醇降地其抗藥性的產生<sup>100</sup>。也有的學者提出全反式

維甲酸合併 liarozole , 發現可以增加其血中濃度且有劑量反應相關效應<sup>101</sup> ; 也可以延長其半衰期<sup>102</sup> , 增加乳癌細胞 MCF-7 及膠質母細胞瘤的抗增生效果<sup>103,104,105</sup>。

表五 維甲酸之防癌及抗癌機轉

誘導細胞分化作用
抑制細胞增生
刺激機體免疫反應
加強細胞媒介免疫
抑制致癌基因表現
誘導凋亡
抑制血管新生
調整細胞移動、吸附、侵犯
抗氧化作用
自由基去活化
刺激腫瘤壞死因子
抑制轉化表型

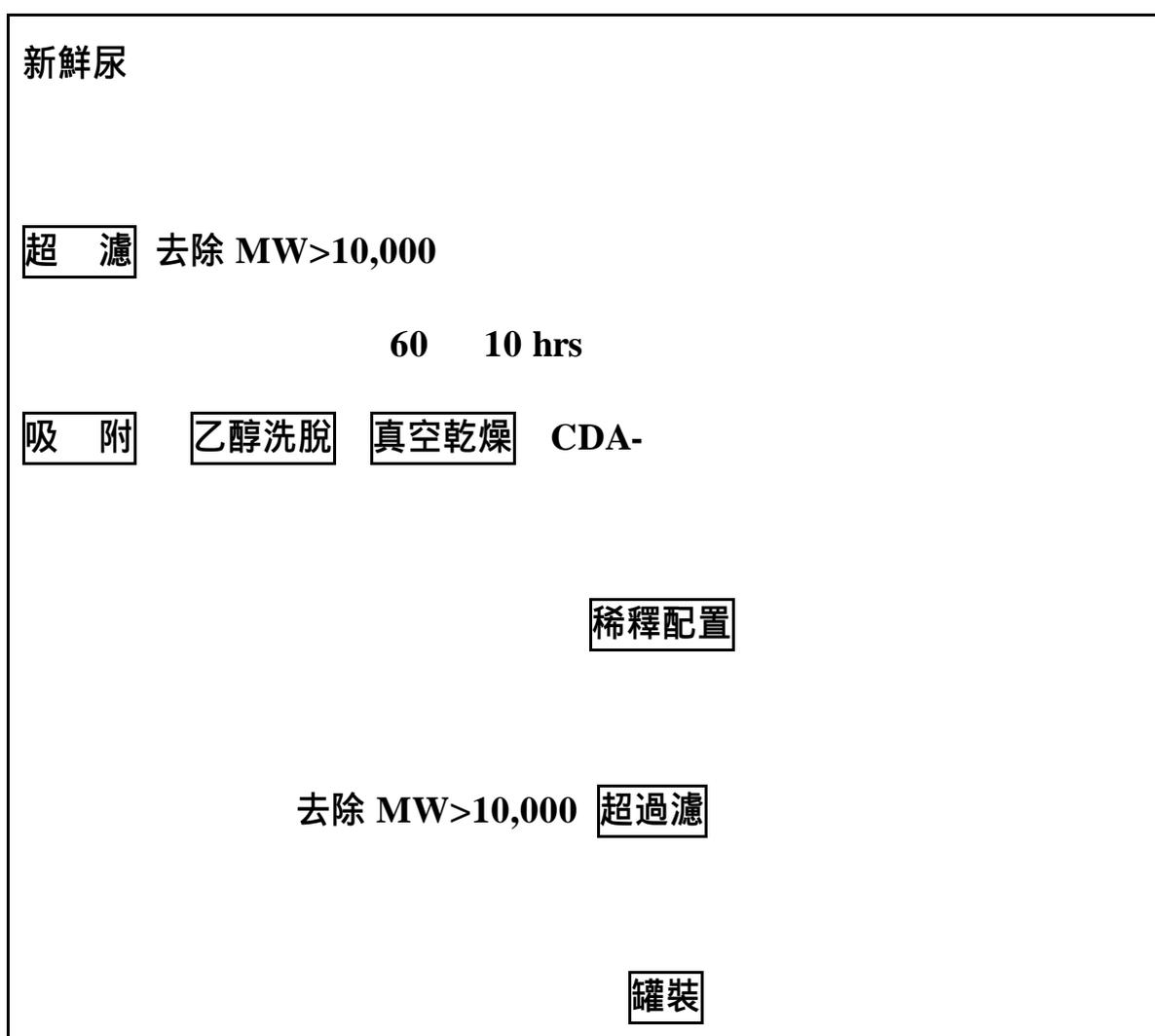
另外長期使用 ATRA 可能會有誘發次發性致癌物<sup>24</sup>及嚴重的副作用，如過度白血球增多、維甲酸症候群(發燒、肋膜積水、體重增加、肝、腎臟及呼吸衰竭)、血脂異常、乾眼、皮膚發癢及乾燥<sup>99</sup>。

本實驗則指出 ATRA 其  $IC_{50}$  為  $6 \mu M$ ，與臨床上治療的有效劑量範圍  $0.1 - 1 \mu M$  甚為接近<sup>106</sup>。所以為了減少全反式維甲酸治療的抗藥性及高復發性的產生，以及減少誘發次發性致癌物及嚴重的副作用的發生，尋找一個類似 lirazole 的藥物，既可以不必為減少誘發次發性致癌物及嚴重的副作用的發生而需減少劑量，又擔憂因為藥物濃度不足而增加 ATRA 治療的抗藥性及高復發性的產生；最主要又無毒性且有加強其分化的作用，又有其他的抗癌機轉的藥物，是一個值得努力的方向。而本實驗即以 CDA-2 來探討之，其可以加強 ATRA 對 HL-60 細胞其對  $IC_{50}$  的影響達 1.5 - 600 倍，而且其合併 ATRA 對生長抑制作用的表現呈現加成的作用。另外，HL-60 細胞分化成為成熟白血球後會具有吞噬能力，會產生 superoxide 等自由基以殺死所吞噬的外來物。利用這些 superoxide 的氧化還原作用，使黃色 NBT (nitroblue tetrazolium) 還原成藍黑色的 Formazan 沉澱物，使細胞質具有藍黑色著色，光學顯微鏡判定此為陽性細胞。由圖三結果可見，CDA-2 對 HL-60 細胞誘導分化的表現與 ATRA 有協同的作用。且有劑量反應相關效應。

在 CDA-2 2 mg/ml 組，可以分別加強 ATRA 在 0.01、 0.1、 1  $\mu$ M 的劑量下誘導分化 表現達 2~20 倍。而在 CDA-2 1 mg/ml 組，可以分別加強 ATRA 在 0.01 0.1 1  $\mu$ M 的劑量下誘導分化 表現達 3~16 倍 CDA-2 0.5 mg/ml 組，可以分別加強 ATRA 在 0.01、 0.1、 1  $\mu$ M 的劑量下誘導分化 表現達 2~8 倍。顯示其與全反式維甲酸合併使用的潛力。且 CDA-2 再較高劑量時，其對 ATRA 誘導分化的加強效果較 CDA-2 低劑量時為差，至於機轉為何，有待進一步的探討。

而 CDA-2 為廖明徵博士發明，是一種人體自然新陳代謝的產物，由新鮮尿經科學方法提煉成針劑或膠囊。人尿在收集時即加酸使其 Ph 值維持在 3 以下，以防止細菌繁殖；而收集來的尿最後 pH 值調至 2，然後經過粗過濾、超過濾將分子量大於 10,000 道爾頓的物質除去。尿中誘導分化的活性物質經疏水性吸附劑吸附後，再用有機媒回收，有機溶媒則用真空乾燥除去。殘留物質溶解於蒸餾水，以 0.45  $\mu$ m 濾模在潔淨室過濾除菌成為原料藥。這原料藥經稀釋配置後，再一次超過濾除去分子量大於 10,000 道爾頓的熱原及用 Milidisk 除菌器兩道過濾，最後在潔淨室無菌灌裝成針劑。其製作流程見表六。

表六 CDA-2 製造流程



CDA-2 其主要成分約可分為三類：

1. 細胞分化誘導劑： organic acid ( OA-0.79)、 pigment peptide ( PP-0)
2. 細胞分化誘導幫助劑： phenylacetic acid、 indole acetic acid、 uroerythrine、 ribofalvin
3. 抗惡病質劑： phenylacetylglutamine

廖明徵博士認為 CDA-2 其在分化療法上有以下的特徵<sup>106</sup>：

1. 治本療法：

藥靶是異常甲基轉移複合酵素，而異常甲基轉移複合酵素是癌症的根本病因。治本的療法一般來說會比較好的療效。

2. 絕對的選擇性：

異常甲基轉移複合酵素的癌因素是癌細胞的特殊產物，因此 CDA-2 有絕對的選擇性，不至於波及正常細胞。有選擇性就不會產生不良的副作用。

2. 恢復抗癌本能：

抗癌病質劑使病人恢復化學監察抗癌本能，治療因而事半功倍。

4. 癌症預防：

CDA-2 成分是健康人賴以抵禦癌症的化學成分，如果經常補足這些成分就不會患上癌症。

正常甲基轉移是由 MAT (methyladenosyl transferase)、MT (methyltransferase)、SAHH (s-adenosylhomocysteine hydrolase) 三個酵素結合而成的甲基轉移複合酵素所促成。正常細胞的活性完全受制於外來的促進因素：而固醇激素靶組織的細胞，在有固醇激素時，這三個成員酵素會結合在一起而形成有活性的甲基轉移複合酵素。非固醇激素

靶組織的細胞，甲基轉移複合酵素會形成有賴於生長素的刺激產生類似固醇激素的促進因素。

生長素之所以能夠調節細胞的分裂及分化，其實是透過調節甲基轉移複合酵素來完成。而其中核酸甲基轉移複合酵素才是真正支配細胞的分裂及分化的因素。甲基轉移複合酵素的活性必須配合核酸合成酵素的活性。如果甲基轉移複合酵素和核酸合成酵素不配合時，就有低甲基化狀況的發生。所以甲基轉移複合酵素和核酸合成酵素就是透過甲基化和低甲基化來調節細胞的分裂及分化。

而靜止的幹細胞受到生長素刺激進行分裂時，甲基轉移複合酵素的活性也隨著生長素而提高於是 DNA 甲基化。而當生長素不存在時，甲基轉移複合酵素的活性也隨著降低，可是核酸合成酵素仍相當穩定，這時會合成低甲基化的 DNA，然後經過兩個細胞週期後，低甲基化的 DNA 會使一些和分化有關的基因表達出來，變成有特殊功能的終末分化細胞，且不具有分裂能力。

而 rRNA 甲基化絕大部分發生在核糖體的 2' 氧位置上，而細胞在製造核糖體的過程時，是先合成分子量大於 2 倍的先驅 RNA，而後這先驅 RNA 在細胞內經過 RNA 分解 把不用的順序分解掉，有用的順序則保留下來製造核糖體。而甲基的分佈全部落在有用的順序，如果這部分

的順序低甲基化的話就會和沒有用的的順序被 RNA 分解酵素分解，所以甲基化完整的話就可以產生有用核糖體。亦即核糖體的產生取決於甲基轉移複合酵素的活性。由於核糖體的產生才能提供 cyclin 及用以複製 DNA 與細胞分裂所需的必要蛋白質；所以一旦甲基轉移複合酵素失去活性，細胞在短時間內合成低甲基化的 rRNA，如此就不能夠產生有用的核糖體，如此細胞分裂所需的必要蛋白質減少，細胞就朝向分化過程走向終末分化細胞<sup>71</sup>。

癌細胞的甲基轉移複合酵素有異常的改變，會發生在 MAT 和 SAHH 各與一特異癌蛋白質因素結合，結果就改變了甲基轉移複合酵素的活性與調節機理。而這個特異癌蛋白質因素有如生長素一般，使 MAT、MT、SAHH 三個酵素結合成非常有活性且穩定的甲基轉移複合酵素。因為癌細胞會自行產生甲基轉移複合酵素的促進因素，於是癌細胞的甲基轉移複合酵素的活性就不需依賴外來的因素而能自行維持較高的活性。促成癌細胞在分裂週期增殖，也因此阻斷終末分化。所以異常甲基轉移複合酵素是癌症的最中心問題<sup>106</sup>。

另外癌細胞的甲基轉移酵素異常活化，造成過度的甲基引進，則抑癌基因或 DNA 修復酵素基因無法表達。擴張多發性抗藥基因，使癌細胞惡化和產生抗藥性。

而在若諾比可夫腹水肝癌經 poly(I)(C)處理後，異常的甲基轉移酵素變成正常後，經過一段時間後終止細胞分裂。這是因為由 poly(I)(C)引導癌細胞產生 oligoadenylate synthetase，於是把異常的甲基轉移酵素變成正常酵素<sup>107</sup>，所以 oligoadenylate 是一個理想的分化誘導劑。其他分化誘導劑如干擾素、維生素 A、維生素 D3 都是透過引導 oligoadenylate 使癌細胞產生終末分化<sup>107,108,109,110</sup>。

而 CDA-2 中 pigment peptide-0 及 organic acid-0.79 和 oligoadenylate 一樣，將異常的甲基轉移酵素變成正常；所以癌細胞就會透過合成低甲基核酸，而進行分化。正常細胞在生長和功能則不受尿分化誘導劑的干擾，因為正常細胞沒有異常的癌蛋白質因素，所以 CDA-2 是一種有選擇性的抗癌藥。

此外，癌細胞中 AdoMet 量遠超過於正常細胞<sup>111</sup>，因為癌細胞中 MAT<sup>LT</sup> 比正常細胞 MAT<sup>L</sup> 的 km 值高出許多<sup>112</sup>。一旦癌細胞變成終末分化細胞時，AdoMet 量會下降許多，如此便可說明為何 MAT<sup>LT</sup>、SAHH<sup>LT</sup> 同時失去異常的癌蛋白質因素會變成 MAT<sup>L</sup>、SAHH<sup>L</sup>。

CDA-2 在臨床上被認為具有增加分化相關基因的表達，而後誘導終末分化，降低致癌基因所傳導的信息，增強凋亡的作用。所以是癌症治療的多靶性治療的藥物。

大多數癌症病人因為發炎使巨嗜細胞分泌 cachectin ，會使其尿中排除多於正常人的低分子量的 peptide 類，持久的過量排除，會造成體內缺乏抗癌物質，因而無法抑制癌細胞的增生，導致惡病質；且又會使其尿中排除多於正常人的低分子量的 peptide 類。如此惡性循環下去，最後使癌症病人完全失去監察能力，遂造成癌細胞不斷地增生。例如在乳癌病人的觀察，其尿中 A-10 的下降高度相對於乳癌的發生<sup>113</sup>。另外在對抗癌物質治療反應良好者，其尿中過多的 peptide 排除現象會被逆轉，也可以藉此阻斷 peptide 缺乏的惡性循環。而對抗癌物質反應不好者，其尿中過多的 peptide 排除現象會不受影響或是有增加的情形<sup>114</sup>。廖明徵博士把這種監察能力稱為天然化學監察能力( native chemosurveillance)。而 CDA-2 中抗惡病質的成分恰可以改善癌症病人本身的過量排除，恢復病人天然的監察能力，而後靠本身免疫來殺滅癌細胞。

尿液中活性 peptide 已被研究了近百年，被認為有類似賀爾蒙的效果，類似生長因子的調整生物功能的作用<sup>115,116</sup>。而 CDA-2 中的分化誘導幫助劑則是甲基轉移複合酵素各成員酵素的抑制劑。如 MAT 的競爭性抑制劑為 phenylacetic acid、 indole acetic acid。而 MT 的競爭性抑制劑為 uroerythrin、 riboflavin。另外 MAT 的競爭性抑制劑需有

mM 的劑量才有明顯的作用，而 MT 的競爭性抑制劑需有  $\mu\text{M}$  的劑量才有明顯的作用。所以 MT 的競爭性抑制劑有較好的分化誘導幫助的作用。

此外約有 5-10% 的癌細胞是處於分裂週期的細胞，此時特別容易受到分化誘導劑傷害而停頓下來，如此便不能完成兩個週期的分裂，不能完成終末分化<sup>117,118,119</sup>。所以經過一段時間的修復及休息，癌細胞又會復發。這就是為何 ATRA 其對治療前骨髓性白血病有驚人的療效，然而卻在數月後又復發的原因之一。所以在分化誘導幫助劑下，一方面促進分化，一方面可以防止分化誘導劑引起的細胞傷害，使分化完成，減少復發<sup>117,118,119</sup>。

另外 phenylacetate 是一種芳香環的脂肪酸，自然存在於人體血漿中，期可在人體中結合成為 phenylacetylglutamine、phenyacetic acid<sup>77</sup>，Burzyskii 於西元 1976 年起從人尿中萃取出抗癌物質，最主要是由 phenylacetylglutamine、phenyacetic acid 所組成。然而 L-glutamine 是 DNA、RNA 及蛋白質合成所非必需，但是卻是癌細胞所必需的<sup>120</sup>。因為癌症細胞有合成 glutamine 合成速率較慢以及快速利用的特性，所以使得癌細胞內 glutamine 減少，如此會使腫瘤細胞特別容易受影響 glutamine 的藥物作用。而 phenyacetic acid 會與 glutamine 生理性地結合形成 phenylacetylglutamine，而使其耗失 glutamine。

Phenylacetylglutamine 會與 glutamine 競爭相同的膜上載體；所以這也就是為何 phenylacetylglutamine、phenyacetic acid 同時給予會增加 phenyacetic acid 的作用<sup>121</sup>。另外紅白血病 K562 細胞在 glutamine 飢餓的情況下，也會有導致分化及生長停滯的情形<sup>122</sup>。而 phenyacetic acid 尚會增加缺氧及有氧之癌細胞的放射治療敏感性<sup>123,124</sup>。而在初級化學預防的角色方面，其可以防止 benzo pyrene<sup>125</sup>、urethane<sup>125</sup>、afaltoxin<sup>126</sup> 所誘發的腫瘤。而臨床上 CDA-2 其副作用極少且多能忍受。如發熱、關節痛、表皮肥厚等<sup>127</sup>。

所以本實驗指出 CDA-2 與 ATRA 對 HL-60 細胞的抑制生長的影響為加成的作用；而在誘導分化的影響上則表現為協同的作用。但對誘導 HL-60 細胞的凋亡的實驗中則沒有顯著的加強的作用，除了 ATRA 本身主要藉由誘導分化來達到抗癌的目的，而過去的研究中雖然指出 ATRA 能誘導 HL-60 細胞走向凋亡<sup>128</sup>，但合併使用 CDA-2 併無法增加 ATRA 誘導凋亡的作用，其機轉為何，有待進一步的探討。

由表四的結果可知，維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響，其 IC<sub>50</sub> 為 0.01 mg/ml。而人體中最大可忍受的血液濃度為 0.01 - 0.02 mg/ml，所以這樣的濃度是可以應用於臨床的治療。而由圖二的結果可知，在 CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞生長的實驗中，各組間有顯著的差

異而呈現劑量反應相關效應，濃度愈高細胞數愈少；另外 CDA-2 在 0.5 mg/ml、1 mg/ml 下分別可以加強維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響達到 8.3 倍以及 833 倍。更表明 CDA-2 其可以減少維他命 C 的用量。

CDA-2 分別在 0.02、0.1、0.5、1 mg/ml 合併維他命 C 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 對 HL-60 細胞生長抑制的表現有協同的作用。如此可以減少其副作用的產生。如此在合併使用維他命 C，可以減少 CDA-2 的使用劑量。

但由圖四的結果可以知道，CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導分化的影響，各組間 HL-60 細胞 NBT 陽性率沒有呈現劑量反應相關效應；以 two-way ANOVA 檢測沒有統計學上顯著的差異。表明合併使用時，CDA-2 其抗癌作用並不是藉由誘導分化的途徑來達成。

計劃性地死亡 (programmed cell death) 在一生中許多細胞中維持恆定上佔有一定的角色。凋亡失常會造成一些疾病，如 AIDS<sup>129</sup>、B 細胞淋巴瘤<sup>130</sup>。而凋亡的定義為染色質濃縮，其會活化特定的 endonuclease 而使 DNA 退化，遂造成核破碎。

而維他命 C 引起凋亡的機轉可能如下。維他命 C 會產生大量 ROS (reactive oxygen species)，鈣離子流入會活化 caspase 及粒腺體 demise 合併 cytochrome C 再分布，如此會引起凋亡<sup>131,132,133,134,135</sup>。Cristiano

Ferlini 等人認為在粒腺體內改變過氧化劑( prooxidant)及抗氧化劑( antioxidant)的平衡，可能是一個樞紐的角色。而粒腺體是原發 ROS 的產生處，接著會經由粒腺體的脂質過氧化作用而導致粒腺體的傷害<sup>136,137</sup>。而 X 射線也會藉由改變過氧化劑(prooxidant)及抗氧化劑(antioxidant)的平衡，改變粒腺體的脂質，也會經由喪失維持細胞膜和週圍環境的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 而降低細胞膜的潛能。而細胞膜在崩解時，過氧化作用會持續而製造大量的過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )；然而只有過氧化劑不足以啟動凋亡，只有其增加至過量且會壓倒細胞內的抗氧化劑系統，才會觸發細胞死亡途徑<sup>138</sup>。

雖維生素 C 既是抗氧化劑也是過氧化劑，然而其作用為何取決於環境中的因子及其濃度<sup>139</sup>，其在體內由腸胃道吸收，且以 pH 值 7.4 存在於血液循環中，dehydroascorbate 是身體內自血球輸出的模式，在細胞內會變成抗壞血酸鹽( ascorbate)<sup>143</sup>。在生理狀況下主要為抗氧化劑的角色<sup>140</sup>。而其在引起人類淋巴瘤及骨髓性白血病凋亡下，則為過氧化劑的角色<sup>141,142</sup>。

而在人體內大劑量使用維生素 C ( 500 mg/day)使用於健康人六週以上，會有過氧化劑的現象<sup>144</sup>。另外維生素 C 在氧化降解的過程中會產生 ascorbyl radical，其會引發 HL-60 細胞內 cAMP 以及鈣離子快速

增加；且 ascorbyl radical 是引發細胞死亡的特別角色，會引起凋亡及壞死<sup>145</sup>；且會刺激鈣離子流入細胞，此時所產生之過氧化氫也會刺激胞內鈣離子增加，核內鈣離子堆積會誘導核內  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease 活化，而引起核內 DNA 破碎<sup>146,147</sup>；如此也可觸發不同的訊息傳遞的路徑，而造成凋亡。

在 CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導凋亡的實驗中，用流式細胞分析儀分析其各組的細胞 sub-G1 期的比率。其各組的細胞 sub-G1 期的比率的結果見圖六。可以發現 HL-60 細胞 sub-G1 期的比率呈現劑量反應相關效應；以 two-way ANOVA 檢測有統計學上顯著的差異。此外結果中也表明 CDA-2 對 HL-60 細胞誘導凋亡的表現與維他命 C 有協同的作用。CDA-2 1 mg/ml 組，可以分別加強維他命 C 在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 2~3 倍。CDA-2 0.5 mg/ml 組，可以分別加強維他命 C 在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 2~3 倍。CDA-2 0.1 mg/ml 組，可以分別加強維他命 C 在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 2.5~3.5 倍。CDA-2 0.02 mg/ml 組，可以分別加強維他命 C 在 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 的劑量下誘導凋亡的表現達 3~5 倍。可以看出 CDA-2 其劑量愈高，對維他命 C 誘導凋亡的協同作用也愈強。

而 CDA-2 分別在 0.02、0.1、0.5、1 mg/ml 合併維他命 C 0.0001、0.001、0.01 mg/ml 對 HL-6 癌細胞生長抑制的表現有協同的作用。應是藉由 CDA-2 對 HL-60 細胞誘導凋亡的表現與維他命 C 有協同的作用所致。

而 CDA-2 誘導 HL-60 細胞分化,且會增加 ATRA 誘導分化的療效。但由於維他命 C 本身並不具有誘導分化的能力,所以即使 CDA-2 合併維他命 C 使用,對誘導分化的表現也不會有顯著的差異。

## 第六章、結論

本研究以 HL-60 細胞來探討 CDA-2 分別合併使用 ATRA 與維他命 C 對 HL-60 細胞株生長抑制作用，並利用 Trypan Blue Exclusion 方法，NBT 還原方法以及流式細胞分析儀探討其機轉。其結果如下：

1. CDA-2、維他命 C 與 ATRA 對 HL-60 細胞都有生長抑制的作用，且呈現劑量反應相關效應。CDA-2 其  $IC_{50}$  為 1.02 mg/ml，而 ATRA 其  $IC_{50}$  為 6  $\mu$ M。
2. CDA-2 合併 ATRA 對血癌細胞 HL-60 生長的影響，且呈現劑量反應相關效應。CDA-2 對 HL-60 細胞生長抑制的表現與 ATRA 有加成的作用。CDA-2 可以加強 ATRA 的  $IC_{50}$  影響達 1.5 - 600 倍。
3. CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導分化的影響，HL-60 細胞 NBT 陽性率呈現劑量反應相關效應。CDA-2 對 HL-60 細胞誘導分化的表現與 ATRA 有協同的作用。且 CDA-2 0.5 mg/ml 組，可以加強全反式維甲酸在 0.01、0.1、1  $\mu$ M 的劑量下誘導分化的表現達 2~20 倍。
4. CDA-2 合併 ATRA 對 HL-60 細胞誘導凋亡機轉的探討方面，證實 CDA-2 對 ATRA 誘導 HL-60 細胞凋亡上沒有加強的作用。

由此可知，CDA-2 對 HL-60 細胞生長抑制的表現與 ATRA 有加

成的作用,合併使用 CDA-2 可以減少 ATRA 對毒殺癌細胞所需的劑量。但因為 CDA-2 對 ATRA 誘導 HL-60 細胞凋亡上沒有加強的作用,所以在 HL-60 細胞生長抑制的表現上就沒有呈現協同的作用。

此外, CDA-2 對 HL-60 細胞誘導分化的表現上與 ATRA 有協同的作用。合併使用 CDA-2 可以加強 ATRA 對 HL-60 細胞誘導分化的作用,如此便可能可以應用在急性前骨髓性白血病細胞病的治療,增加誘導終末分化的療效,減少抗藥性的產生。

1. 維他命 C 其  $IC_{50}$  為 0.01 mg/ml, 而人體中最大可忍受的血液濃度為 0.01 - 0.02 mg/ml, 所以這樣的濃度是可以應用於臨床的治療。

2. CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞生長的影響呈現劑量反應相關效應。CDA-2 分別在 0.02、 0.1、 0.5、 1 mg/ml 合併維他命 C 0.0001、 0.001、 0.01 mg/ml 對 HL-60 細胞生長抑制的表現有協同的作用。而 CDA-2 在 0.5 mg/ml、 1 mg/ml 下分別可以加強對維他命 C 的  $IC_{50}$  影響達 8.3 倍以及 833 倍。

3. CDA-2 及維他命 C 對 HL-60 細胞誘導凋亡的實驗中, 各組間呈現劑量反應相關效應; CDA-2 對血癌細胞(HL-60)誘導凋亡的表現與維他命 C 有協同的作用。且 CDA-2 劑量愈高, 對維他命 C 誘導凋亡的協同作

用也愈強。

5. CDA-2 合併維他命 C 對 HL-60 細胞誘導分化的影響，各組間沒有顯著的差異，表明其抗癌作用並不是藉由誘導分化的途徑來達成。

由此可知，CDA-2 分別在 0.02、 0.1、 0.5、 1 mg/ml 合併維他命 C 0.0001、 0.001、 0.01 mg/ml 對 HL-60 細胞生長抑制的表現為協同的作用。合併使用 CDA-2 不但可以減少維他命 C 毒殺癌細胞所需的劑量，另外在 CDA-2 對維他命 C 誘導 HL-60 細胞凋亡上也有協同加強的作用，所以在 HL-60 細胞生長抑制的表現上就呈現協同的作用。也就是在臨床上使用維他命 C 細胞毒殺及誘導凋亡作用於癌症的治療上，合併使用 CDA-2 是有協同的效果。更進一步可以考慮合併使用於化學治療上。

CDA-2 會誘導 HL-60 細胞分化，且會增加 ATRA 導終末分化的療效。但由於維他命 C 本身並不具有誘導分化的能力，所以即使 CDA-2 合併維他命 C 使用，對誘導分化的表現也不會有顯著的差異。

**參考文獻:**

1. Mauer,A.M.:Hodgkin disease in:Williams hematology,5<sup>th</sup> edn.,pp.1995:1004-1016.
2. Haung,M.E.,Ye,Y.C.:Use of all trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.Blood 1988;72:567-572.
3. Chen,G.Q.,Shen,Z.X.:Pharmacokinetics and efficacy of low-dose all-trans retinoid acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.Leukemia 1996;10:825-828.
4. Chen,Z.,Brand,N.J.:Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11:17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia.J.Clin.Invest.1993;91:2260-2267.
5. Tsuda, H.Hara,H. S.:Toxicological study on antineoplaston A-10 and AS2-1 in cancer patient.The Krume medical J.1995;42:241-249.
6. Hoffman,F.A.:Micronutrient requirements of cancer patients.Cancer 1985;55:295-300.
7. Kochi M.,Ueda S.:Antitumor activity of sodium benzylideneascorbate. Progr. in Cancer Res. 1988;35:338-343.
8. Sakagami H.,Asano K.:Induction of tumor degeneration by sodium benzylideneascorbate. Anticancer Res. 1991;11:1533-1538.
9. Kuribabyashi N.,Sakagami T.:Induction of DNA fragmentation in human myelogenous leukemic cell lines by sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate and its related compounds.Anticancer Res. 1994;14:969-976.
- 10.Tauma S.,Shinokawa D.:Benzylideneascorbate induces apoptosis in L929 tumor cell.Biochem Biophys. Res. Commun.1993;194:29-35.
- 11.何紹奇：現代中醫內科學。中國醫藥科技出版社 1990: 536-539
- 12.曹炳章：中國醫學大成第一冊。中國中醫藥出版社 1997: 236-259 , 461-464.
- 13.東漢 . 張仲景:金匱教學資料。啟業書局 1984: 189-209.
- 14.張伯輿：中醫內科學。知音出版社 1992:402.

- 15.明代 . 張景岳:景岳全書。上海古籍出版社 1990:475-482.
- 16.張伯臬：中醫內科學。知音出版社 1992:403.
- 17.東漢 . 張仲景:傷寒雜病論。志遠書局 1996:203.
- 18.王輝武：中醫百家薈萃。重慶出版社 1997:5.
- 19.王輝武：中醫百家薈萃。重慶出版社 1997:6.
- 20.唐代 . 孫思邈：千金要方上。上海古籍出版社 1990:777-802.
- 21.明代 . 李時珍:本草綱目。上海古籍出版社 1990:530.
- 22.Mazza, J.:Manual of clinical hematology.2<sup>nd</sup> edition.1995:p425
- 23.Chen Z., Wang Z.Y., Chen S.J.:Acute promyelocytic leukemia:Cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis.Pharmacol. Ther.1997;76:141-149.
- 24.Barbui, T., Finazzi, G.:The impact of all-trans retinoid acid on the coagulopathy of acute promyelocytic leukemia.Blood 1998;91:3093-302.
- 25.Warrel,R.P.:Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin(all-trans retinoid acid).N.E.J.M.1991;324:1385-1393.
- 26.Bernard, J.:Acute promyelocytic leukemia:Result of treatment by daunorubicin.Blood 1973;41:489.
- 27.Bhagarthi,A.,Narayanan,E.:The effect of all-trans and 9-cis retinoid acid on the steady state level of HPV 16 E6/E7 mRNA and cell cyclin in cervical carcinoma cells.Life science 1998;63:565-573.
- 28.Hausen ,H.Z.:Molecular carcinogen 1988;1:147-150.
- 29.Hausen,H.Z.:Virology 1991;184:13.
- 30.Warrell, R.P.:Acute promyelocytic leukemia.N.E.J.M 1993;329:177.
- 31.Kuribayashi,N.,Sakagami,T.,Tanimoto,Y.:Induction of DNA fragmentation in human myelogenous leukemic cell lines by sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate and its related compounds.Anticancer Res. 1994;14:969-976.
- 32.Fujinaga,S.,Sakagami,H.:Possible role of hydrogen peroxide in

- apoptosis induction by ascorbic acid in human myelogenous leukemic cell lines. *Showa. Univ J. Med. Sci.* 1994;6:135-144.
33. Sakagami, H.: The requirement for and mobilization of calcium during induction by sodium ascorbate and by hydrogen peroxide of cell death. *Life Science* 1996;58:1131-1138.
34. Sakagami, H.: Endonuclease activity and induction of DNA fragmentation in human myelogenous leukemic cell lines. *Anticancer Res.* 1995;5:259-266.
35. Bram, S., Froussard, P., Guichard, M.: Vitamin C preferential toxicity for malignant melanoma cells. *Nature* 1980;284:629-631.
36. Scott, J.A., Kolodny, G.M.: Interaction of ionizing radiation and ascorbic acid on 3T3 mouse fibroblast. *Int. J. Vit. Res.* 1981;51:155-160.
37. L. Benade, T. Howerd. Synergistic killing of Ehrlich ascites carcinoma cells by ascorbate and 3-amino-1,2,4-triazole. *Oncology* 1984;108:160-162.
38. De Laurenzi, V., Melino, G.: Cell death by oxidative stress and ascorbic acid regeneration in human neuroectodermal cell line. *Europ. J. Can.* 1995;31:463-466.
39. Sakagami, H., Asano, K.: Induction of tumor degeneration by sodium benzylideneascorbate. *Anticancer Res.* 1991;11:1533-1538.
40. Sakagami, H., Takeda, M.: Effect of sodium benzylideneascorbate on chemically induced tumors in rats. *Anticancer Res.* 1993;13:65-72.
41. Cameron, E., Pauling, L.: Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Sci. USA* 1976;73:3685-3869.
42. Cameron, E., Pauling, L.: Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976;75:4538-4542.
43. Moertel, C.G., Fleming, T.R.: High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N. E. J. M.* 1985;312:137-141.
44. Kochi, M., Takeuchi, S.: Antitumor activity of benzaldehyde. *Cancer Treat. Rep.* 1980;64:21-23.
45. Kochi, M., Ueda, S.: Antitumor activity of benzaldehyde derivative.

- Cancer Treat. Rep. 1985;69:533-537.
46. Kochi, M., Ueda, S.: Antitumor activity of sodium benzylideneascorbate. *Progr. in cancer res. and thera.* 1988;35:338-343.
  47. Tatsumura, T., Tsujimoto, M.: 4,6-O-benzylidene-D-glucopyrose in the treatment of solid malignant tumors, and extended phase study. *Br. J. Cancer* 1990;63:436-439.
  48. Cameron, E., Pauling, L.: supplemental ascorbate in supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 1976;73:3685-3869.
  49. Wittes, R. E.: Vitamin C and cancer. *N.E.J.M.* 1985;312:178-179.
  50. Christian, M.: Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cell in vitro. *Cancer letters* 1996;103:183-189.
  51. Gemba, M., Fakuishi, N.: Amelioration by ascorbic acid of cisplatin-induced injury in cultured renal epithelial cells. *Contrib. Nephrol.* 1991;95:138-142.
  52. Chiang, C. D., Song, E. J.: Ascorbic acid increases drug accumulation and reverses vincristine resistance of human non-small-cell lung-cancer cells. *Biochem. J.* 1994;301:759-764.
  53. Gichner, T., Baedaev, S. A.: Effects of humic acids, para-aminobenzoic acid and ascorbic acid on the N-nitrosation of the carbamate insecticide propoxur and on the mutagenicity of nitrosopropoxur. *Mutation. Res.* 1990;229:37-41.
  54. Khudoley, V. C.: Mutagenicity studies in *Salmonella typhimurium* on some carcinogenic N-nitramines in vitro and in the host-mediated assay in rats. *Cancer Res.* 1981;41:3205-3210.
  55. Burzyski, S. R.: Antineoplaston: history of the research. *Drugs Under and Exper. Clin. Res.* 1986;12:1-9.
  56. Burzyski, S. R.: Antineoplaston: Biochemical defence against cancer. *Physiol. Chem. Phys.* 1976;8:275-279.
  57. Tsuda, H.: The effect of antineoplaston, a new antitumor agent on malignant brain tumor. *Krume Med. J.* 1995;42:133-140
  58. Tsuda, H.: Inhibitor effect of antineoplaston A-10 on breast cancer transplant to athymic mice and human hepatocellular carcinoma cell

- line. *Krume Med. J.* 1990;37:97-104.
59. Kumabe, T., Tsuda, H.: Antineoplaton treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 1998;5:1363-1367.
60. Tsuda, H., Sugihara, S.: The inhibitory effect of the combination of antineoplaston A-10 injection with a small dose of cis-diamminedichloroplatinum on cell and tumor growth of hepatocellular carcinoma. *Japanese J. of Cancer Res.* 1992;83:527-531.
61. Badria, F., Mabed, M.: Immune modality potentiate of antineoplaston A-10 in breast cancer patient. *Can. Let.* 2000;157:57-63.
62. Samid, D.: Interferon in combination with antitumorogenic phenyl derivatives: potentiation of interferon alpha activity in-vitro. *Br. J. Haematol.* 1991;79:81-83.
63. Samid, D., Shack, S.: Phenylacetate: A novel nontoxic inducer of tumor cell differentiation. *Cancer Res.* 1992;52:1988-1992.
64. Liau, M.C., Burzyski, S.R.: Altered methylation complex isozymes as selective targes for cancer chemotherapy. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1986;1:77-86.
65. Buchner, J.C.: Phase study of antineoplaston A10( NSC 648539) and AS2-1( NSC 620261) in patients with recurrent glioma. *May. Clin. Pro.* 1999;74:137-145.
66. Antineoplastons: request for phase trial in CNS malignancies. *CTEP Lett* 1992;10:10.
67. Stockhammer, G., Samid, D., Ram, Z.: Inhibition of proliferation and induction of differentiation in medulloblastoma- and astrocytoma-derived cell lines with phenylacetate. *J. Neurosurg.* 1995;83:672-681.
68. Ram, Z., Samid, D.: Growth inhibition, tumor maturation, and extended survival in experimental brain tumors in rats treated with phenylacetate. *Cancer Res.* 1994;54:2923-2927.
69. Juskiewicz, M., Chodkowska, A.: The influence of antineoplaston A5 on particular subtype of central dopaminergic receptor. *Drugs Under Exp. and Clin. Res.* 1995;21:153-156.
70. Lian, M.C., Lee, S.S.: Hypomethylation of nucleic acid: A key to the

- induction of terminal differentiation. *Int. J. Exp. Chem.* 1989; 2:187-199.
71. Green, S.: Antineoplaston. An unproved cancer therapy. *J.A.M.A.* 1992; 267:2924-2928.
72. Samid, D., Yeh, A.: Induction of erythroid differentiation and fetal hemoglobin production in human leukemic cells treated with phenylacetate. *Blood* 1992; 80:1576-1581.
73. Samid, D., Shack, S.: Selective growth arrest and phenotypic reversion of prostate cancer cells in vitro by nontoxic pharmacological concentrations of phenylacetate. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:2288-2295.
74. Samid, D., Ram, Z.: Selective activity of phenylacetate against malignant gliomas: resemblance to fetal brain damages in phenylketouria. *Cancer Res.* 1993; 54:891-895.
75. Weizsaecker, M., Deen, D.F.: The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model. *J. Neurol.* 1981; 224:183-192.
76. Ozawa, T., Lu, R. M.: Radiopotential of human brain tumor cells by sodium phenylacetate. *Cancer Letters* 1999; 142:139-142.
77. Sporn, M.B.: Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. *Cancer Res.* 1991; 51:6215-6218.
78. Warrell, R.P.: Differentiation agents. In Devita VT Jr., Hellman S, Rosenberg S.A., editor. *Cancer: principles and practice of oncology*. Volume 1.5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: J.B. Lippincott 1997; 483-490.
79. Lippman, S.M., Benner, SE.: Cancer chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* 1994; 12:851-873.
80. Sporn, M.B., Dunlop, NM.: Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids): *Fed. Proc.* 1976; 35: 1332-1338.
81. Moon, R.C., Mehta, RG.: Retinoids and cancer in experimental animals. In: Sporn MB, Robers AM, Goodman DS, editors. *The retinoids: biology, chemistry and medicine*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Raven Press. 1994:573-95.
82. Lotan, R.: Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.* 1996; 10:1031-1039.
83. Lotan, R.: Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980; 605:33-91.

84. Smith, M.A., Parkison, D.R.: Retinoids in cancer chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 1992;10(5):839-864.
85. Sporn, M.B., Robert, A.B.: *The retinoids: biology, chemistry and medicine*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Raven Press. 1994.
86. Bollag, W., Holdener, E.E.: Retinoids and cancer prevention and therapy. *Ann. Oncol.* 1992;3:513-526.
87. Blomhoff, R., Green, M.H.: Transport and storage of vitamin a. *Science* 1990;250:399-404.
88. Blaner, W.S., Olson, J.A.: Retinol and retinoic acid metabolism. In: Sporn MB, Robert AB, Goodman DS, editors. *The retinoids: biology, chemistry and medicine*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Raven Press. 1994:229-255.
89. Lippman, S.M., Lee, J.S.: Chemoprevention of upper aerodigestive tract cancer. *Head Neck* 1990;12:5-20.
90. Hill, D.L., Grubbs, C.J.: Retinoids and cancer prevention. *Annu. Rev. Nutr.* 1992;2:161-181.
91. Tang, G., Russel, R.M.: 13-cis-retinoid acid is an endogenous compound in human serum. *J. Lipid. Res.* 1990;30:175-182.
92. Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J.: 9-cis-retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992;68:397-406.
93. De Vries, N., Pastorino, U.: Chemoprevention of second primary tumors in head and neck cancer in Europe. *Eur. J. of Cancer* 1994;30B:367-368.
94. Degos, L., Dombert, H.: All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995;85:2643-2653.
95. Lippman, S.M., Kavanagh, J.J.: 13-cis-retinoic acid plus interferin alpha-2a: highly active systemic therapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1992;84:241-245.
96. Lippman, S.M., Parkison, D.R.: 13-cis-retinoic acid plus interferin alpha-2a: effective combination therapy for advanced squamous cell carcinoma of the skin. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992;84:235-241.
97. Szark, C.E., Grana, G.: Chemoprevention of cancer. *Curr. Probl. Cancer* 1994;18(1):6-79.
98. Miller, W. H.: The emerging role of retinoids and retinoid acid metabolism blocking agent in the treatment of cancer. *Amer. Cancer*

- Soci. 1998:1471-1482.
99. Muinidi, J., Frankel, S.R.: Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive decrease in plasma concentrations: implication for relapse and resistance in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1992;79:299-303.
  100. Smets, G.: Liraoloe, an antitumor drug, modulates cytochrome expression in the Dunning AT-6sq prostatic carcinoma through in situ accumulation of all-trans retinoic acid. *Prostate* 1995;27:29-40.
  101. Achkar, C.C., Bentel, J.M.: Differences in the pharmacokinetic properties of orally administered all-trans retinoic acid and 9-cis-retinoic acid in the plasma of nude mice. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 1994;22(3):451-458.
  102. Wouter, W.: Effect of liarozole, a new antitumoral compound, on retinoic-acid inhibition of cell growth and on retinoic acid metabolism in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1992;52:2841-2846.
  103. Van Heusden, J., Borgers, M.: Liaroloe potentiates the all-trans retinoic acid-induced structural remodeling in human breast carcinoma MCF-7 cells in vitro. *Eur. J Cancer Biol.* 1996;71:89-98.
  104. Hall, A.K.: Liarozole amplifies retinoid-induced apoptosis in human prostate cancer cell. *Anticancer Drugs* 1996;7:312-320.
  105. 廖明徵博士: 聰明的抗癌藥。世茂出版社 1991:139-214.
  106. Chapeker, M.S.: Effects of fibroblast and recombinant leukocyte interferons and double strand RNA on ppp(2' -5' ) A synthesis and cell proliferation in human colon carcinoma cell in vitro. *Cancer Res.* 1983;43:2683.
  107. Bourgeade, M.F.: Induction of 2' ,5' -oligoadenylate synthetase by retinoic acid in two transformed human cell lines. *Cancer Res.* 1984;44:5355-5360.
  108. Testa, N.: Effect of endogenous and exogenous interferon on the differentiation on human monocyte cell line U937. *Cancer Res.* 1988;48:82-90.
  109. Salzberg, S.: Interferon-independent activation of (2' -5' ) oligoadenylate synthetase in Friend erythroleukemia cell variants exposed to HMBA. *J. Cell Sci.* 1996;109:1517-1519.

110. De La Rosa, J.: Induction of interleukin 2 production but not methionine adenosyltransferase activity or S-adenosylmethionine turnover in Jurkat T-cells. *Cancer Res.* 1992;52:3361-3364.
111. Chiba, P. :S-adenosylmethionine metabolism in HL-60 cells: Effect of cell cycle and differentiation. *Biochem Biophys Acta* 1988;97:38-45.
112. Farid, Badria.: Potential utility of antineoplaston A-10 level in breast cancer. *Cancer Letter* 2000;155:67-70.
113. Liao, M.C.: Quantitate assay of plasma and urinary peptides antineoplaston therapy. *Drugs Under Exp. Clin. Res.* 1987;13:61-70.
114. Miwa, I.: Presence of three peptides in urinary kinin( substance Z) preparation. *Life Sci.* 1968;7:1339-1347.
115. Wollheim, E. :A humoral factor in the genesis of essential hypertension. *Klin. Wochenscher* 1971;49:426-433.
116. Liao, M.C.: Ribofalvin as a minor active anticancer component of antineoplaston A2 and A5. *Intl. J. Tiss. React.* 1990;120:19-26.
117. Liao, M.C.: Development of helper inducer to take part in the differentiation therapy of cancer. *Pharm. J.* 1999
118. Friend, C.: Depletion of sodim butyrate from the culture medium of Friend erythroleukemia cell undergoing differentiation. *Cancer Res.* 1987;47:378-350.
119. Weber, G.: Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy: G.H.A Clows Memorial Lecture. *Cancer Res.* 1983;43:3466-3492
120. Dorota, S.P.: Cellular accumulation of antineoplaston AS21 in human hepatoma cell. *Cancer Letter* 1995;88:107–112.
121. Erard, F.: Inhibitors of cell division reversibly modify hemoglobin concentration in human erythroleukemia K562 cells. *Blood* 1981;58:1236-1239.
122. Stockhammer, G.: Inhibition of proliferation and induction of differentiation in medulloblastoma –and astrocytoma-derived cell lines with phenylacetate. *J. Neurosurg.* 1995;83:672-681.
123. Thibault, A.: A phase 2 and pharmacokinetic study of intravenous phenylacetate in patient with cancer. *Cancer Res.* 1994;54:1690-1694.
124. Kampalath, B.N.: Chemoprevention Antineoplaston A-10 of Benzo pyrene induced pulmonary neoplasia. *Drugs Under Exp. and*

- Clin. Research 1987;13:51-55.
125. Eriguchi, N.: Chemopreventive effect of Antineoplaston A-10 on urethane-induced pulmonary neoplasm in mice. *J Jpn. Soc. Cancer Ther.* 1988;23:1560-1565.
  126. Burzyski, S.R.: Phase 2 clinical study of antineoplaston A5 injection. *Drugs Under Exp. and Clin. Res.* 1987;13:37-43.
  127. Vyas, R.C.: Probing the pathobiology of response to all-trans retinoid acid in acute promyelocytic leukemia: premature chromosome condensation/fluorescence in situ hybridization analysis. *Blood* 1996;87:218.
  128. Amisen, J.C.: Cell dysfunction and depletion in AIDS: The programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* 1991;12:102-105.
  129. Hollowood, D.K.: Reduced apoptosis cell death in follicular lymphoma. *J. Pathol.* 1991;163:337-342.
  130. Buttke, T.M.: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immuno. Today* 1994;15:7-10.
  131. Zamzami, N.: Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 1995;181:1661-1672.
  132. Vayssiere J.L.: Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in all lines constitutionally immortalized with Simian Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:11752-11756.
  133. Zamami, N.: Sequential reduction of mitochondrial trans membrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 1995;182:367-377.
  134. Golstein, P.: Controlling cell death. *Science* 1997;275:1081-1082.
  135. Papa, S.: Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implication. *Bioch. Biophys. Acta.* 1996;1276:87-105.
  136. Earnshaw, W.C.: Apoptosis lessons from in vitro system trend in cell. *Biol.* 1995;5:217-229.
  137. Ferlini, C.: Sequence of metabolic change during X-ray induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 1999;247:160-167.
  138. Sakagami, H.: Modulating factors of radical intensity and cytotoxic

- activity of ascorbate. *Anticancer Res.* 1997;17:3513-3520.
139. Carr, A.: Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB* 1998;18:2503-2506.
140. Podmore, I.D.: Vitamin C exhibits pro-oxidant properties (letter). *Nature(London)* 1998;392:559.
141. Amano, Y.: Uncoupling of incorporation of ascorbic acid and apoptosis induction. *Anticancer Res.* 1998;18:2503-2506.
142. Ferenc, P.: Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathion level by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB.* 2000;143:1352-1361.
143. Parolim, M.: The natural prooxidant activity of vitamin C. *Life Science* 1999;64:273-278.
144. Yanagisawa, S. F.: Endonuclease activity and induction of DNA fragmentation in human myelogenous leukemic cell lines. *Anticancer Res.* 1995;15:259-266.
145. Tanuma, S.: Multiple forms of nuclear deoxyribonucleas in rat thymocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun* 1994;203:789-797.
146. Nikonova, L.S.: Properties of some nuclear nuclease of rat thymocytes and their changes in radiation induced apoptosis. *Eur. J . Biochem.* 1993;215:893-901.

## ABSTRACT

**In the treatment of acute promyelocytic leukemia( APL), All-trans Retinoid Acid( ATRA) may induce APL cells into differentiation of APL.Although it has a clinically complete remission rate of 85-90% ,a longer remission period free of disease cannot maintained.CDA-2 may also induce APL cells into differentiation.In this study , we investigate the growth inhibition effect of ARTA in combination with CDA-2.We also seek to understand the mechanism via Trypan Blue Exclusion test,NBT reduction test and through the proportion of the sub-G1 phase in the flowcytometry.**

**CDA-2 potentially inhibits the growth inhibition of ATRA through an additive effect.At the same,it can lower the ATRA's cytotoxicity.However,CDA-2 dose not address the apoptosis effect in growth inhibition is present in HL-60 cells.Besides,CDA-2 address the differentiation of ATRA through synergistic effect.So in the treatment of APL,CDA-2 may increase the therapeutic efficacy and reduce the drug resistance associate with ATRA .**

**Vitamin C is known to induce apoptosis in HL-60 cells CDA-2 may also induce HL-60 cells into apoptosis effect. In this study,we also look into the growth inhibition properties of Vitamin C in combination with CDA-2.Together,they lower the cytotoxicity and synergistically inhibit growth in HL-60 cells.CDA-2 is able to increase apoptosis.But no difference was found with regards to differentiation.Thus, CDA-2 can synergistically increase the cytotoxicity and apoptosis associated with Vitamin C in the treatment of cancer.Therefore,chemotherapy in combination with CDA-2 may be better than chemotherapy alone.**