

第一章 前言

細胞凋亡是真核細胞自然死亡的方式，就個體而言，藉細胞凋亡可以主動去除那些受傷、老化或不要的細胞，以維持生物體的發育和細胞恆定。在一些人類重要疾病，如癌症、後天免疫缺乏症候群和神經退化性疾等，細胞凋亡也扮演著關鍵角色，因此成為當前國內外研究的熱門課題。

惡性腫瘤已長年佔據台灣十大死亡原因的第一名，而肝癌則是僅次於肺癌而為癌症十大死因的第二名。由於台灣屬於全球肝癌高發生率的國家，罹患肝癌的高危險群以三十五歲以上至六十歲的成年男性居多，對家庭影響很大，而且許多肝癌患者會尋求西醫治療以外的中醫治療或服用以口相傳的偏方，加上西藥治癌藥物容易產生許多嚴重的副作用，因此醫界便期待從傳統中草藥，尋找出較良好的取代或輔助藥物。

絞股藍是一種兼俱扶正補益與清熱解毒作用的抗癌中草藥，文獻顯示其萃取物絞股藍總皂 有保肝、抗癌等廣泛功能，臨床上常用於治療肝癌的中醫複方中。近年來的研究顯示，許多抗腫瘤藥物都可以誘導腫瘤細胞凋亡，可能這些藥物具有抑制腫瘤細胞生長的功能，因此絞股藍能否透過誘導細胞凋亡的機轉對抗肝癌細胞，來保護肝臟功能，是個令人感興趣的議題。

中醫現代化是當今中醫學界推動的重點，由歷史發展亦可看出中醫學的發展是不斷在時代學術衝擊與融合中求進步。因此本研究目的是希望藉由細胞凋亡的相關實驗，來觀察絞股藍總皂 是否能誘導肝癌細胞株 HA22T/VGH 和 HepG2 產生細胞凋亡作用，並體外培養周邊淋巴細胞 CD4 指標，觀察是否對此人體正常組織細胞有無毒害作用。

第二章 文獻探討

一、細胞凋亡背景

當細胞受到缺氧或外來毒素傷害時，最常發生的死亡形式為壞死，此時細胞腫脹，膜完整性消失，細胞崩解且內容物釋出。但是在1960年代Kerr及其同僚提出研究老鼠肝門靜脈結紮後的肝細胞變化時，觀察到一種細胞縮小、胞膜完整、無發炎反應的另一種細胞死亡方式，在1972年正式命名為細胞凋亡。由於細胞凋亡小體很快被吞噬掉，不易於體內研究，且當時欠缺生化標記，因此沈寂了一陣子，直到1990年代以後得力於線蟲類(nematode)及果蠅的遺傳知識，細胞凋亡的研究遂如成後春筍般的興起。細胞凋亡是真核細胞自然死亡的方式，因為這種方式有別於壞死模式，因此又有細胞計劃性死亡(programmed cell death)之稱。就生理意義而言，生物個體藉細胞凋亡可以主動去除那些受傷、老化或不要的細胞，以維持生物體的發育、細胞恆定。例如在胚胎發育過程，差不多有一半的神經細胞與周邊組織細胞連接後，因得不到足夠周邊組織分泌的特異性神經生長因子(specific neurotrophic factor)而死亡。在病理意義上，一些人類重要疾病，如癌症、後天免疫缺乏症候群和神經退化性疾病等，與細胞凋亡作用的過亢或不足扮演著關鍵角色，因此細胞凋亡成為當前國內外研究的熱門課題⁽¹⁻³⁾。

二、細胞凋亡的研究方法

辨別細胞是否進行細胞凋亡，目前有幾種指標可以參考。首先就細胞型態而言，由於細胞凋亡活化了許多內生性的蛋白質(endogenous proteases)，導致細胞骨架的破壞(cytoskeletal disruption)、細胞萎縮(cell shrinkage)、細胞膜上會有泡狀物(membrane blebbing)的產生，並且有染色質濃縮(chromatin condensation)的現象^(4,5)。

另外就細胞核的變化而言，由於活化了細胞內核酸分解(endonuclease)，造成此酵素吸附到DNA的核間區域(internucleosomal spacer DNA regions)，使核內DNA斷裂成片段，此結果可藉由洋菜凝膠

電泳(agarose gel electrophoresis)觀察到DNA呈梯狀的排列⁽⁶⁾。以往的研究視DNA梯狀排列為細胞凋亡的正字標記，DNA斷裂過程可能分為二期，第一期是把基因體以domain cleavage的方式切成200-300及30-50 kb的斷片，此期的內核酸分解 稱為domain nuclease；第二期則由fragmentation nuclease，切位在nucleosome之間的連接處，而形成180-200 bp的DNA梯狀排列規則斷片⁽³⁾。

流式細胞儀(flow cytometry)的應用是另一項較新的技術，其配有15微瓦的氬離子電射，發射出488 nm波長的藍光，細胞樣本附著能被488 nm藍光雷射激發的螢光染料後，會發散出或綠、或橙紅、或深紅色的螢光，而被儀器所分析。常用來定量DNA的染劑為Propidium Iodide (PI)，能嵌入雙鏈DNA及RNA的鹼基對中，由於PI不能進入細胞膜，因此進行DNA分析時，需先在細胞膜上打孔，再除去細胞中的RNA，此法常用來做DNA細胞周期分析⁽⁷⁾。

正常人體的DNA是雙套的(2N)，由於凋亡細胞DNA斷裂成小片斷，因此會比正常G0/G1期細胞有較低的染色密度(stainability)，經PI染色後，可將凋亡細胞顯現出來，而在直方圖中形成sub G1 peak^(8,9,10)。同樣以凋亡細胞的DNA受內核酸分解 裂解現象，運用細胞內TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)的反應，將DNA斷裂切口的3' 端用螢光標記過的特殊核 酸BrDU來補充，這便是所謂的TUNEL(TdT-mediated dUTP-dogoxigenin nick end labeling)分析法⁽¹¹⁾。

另外在活細胞的細胞膜只有內側含有phosphatidylserine，對凋亡細胞而言，細胞膜尚未受到破壞，但會有phosphatidylserine移位到膜外側面的現象，Annexin V是一種能與phosphatidylserine結合的蛋白質，經FITC染劑可標示移位的胞膜外的phosphatidylserine，再合併以PI對胞膜破損的壞死細胞進行染色，如此可區別活細胞、凋亡細胞及壞死細胞三種細胞族群，可做為凋亡的早期變化之分析⁽¹²⁾。

三、細胞凋亡相關因子

引發細胞凋亡需外源信號和內源性基因的調控，近年來的研究顯示，許多抗腫瘤藥物都可以誘導腫瘤細胞凋亡，可能是這些藥物抑制腫

瘤細胞生長的機轉之一。實驗發現，在細胞凋亡過程中確有一些基因的表現發生了改變，另一些基因則對凋亡起調控作用，以下即一些相關的基因：

(一)細胞週期相關因子：cyclins、CDKs、CKIs

在哺乳動物細胞周期進程中，從DNA複製到分裂期的轉變，存在一系列的調節因子，例如調節G1期進到S期的cyclin 有cyclin D1-D3和E，cyclin D1會與細胞周期素依賴性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs)之CDK4、CDK6結合，活化磷酸化激酶，調節細胞周期的中期G1期；cyclin E與CDK2結合的複合物則是G1進展到S期的調節因子；至於一些MTS/INK家族p15(INK4B)、p16(INK4A/MTS1/CDK4I)、p18、p19則是cyclin D-CDK複合物的抑制因子，而p21(WAF1)、p27(KIP1)則是cyclin D-CDK4和cyclin E-CDK2的抑制因子^(13,14)。當細胞周期紊亂，出現異常失控傾向，正常細胞會察覺此現象而產生凋亡反應，但若有其它致癌因子存在下，有時會促進細胞的轉型與增殖⁽¹¹⁾。

(二)細胞凋亡的啟動者：Caspase蛋白酶家族

Caspase (Cystein-dependent ASPartase cleaving proteASE) 為一群能分解各重要結構如DNA與細胞結構體(cytoskeleton)之水解酶總稱⁽¹⁵⁾，目前被認為是起始程序死亡者。最早的元老caspase-1原稱為IL-1b converting enzyme (簡稱ICE)，是在尋找線蟲細胞凋亡重要基因ced-3 在人類之同源基因時被鑑定出來⁽¹⁶⁾。此家族目前至少已找到十個成員，原來皆呈非活化狀態，待被切斷成小單位，重組後即成為具活性之蛋白酶，可繼續分解其他之原形caspase或其他蛋白質，從而造成一個連鎖反應。在此連鎖反應中，第一個出現不是caspase而被分解的蛋白質是PARP (poly ADP-ribose polymerase)，具DNA修補及遭逢壓力下檢查基因體功能^(17,18)。接下來被分解蛋白質中有一類被稱為DNA裂解因子(DFF)，DFF受到caspase-3剪切後成為活化態，進而攻擊nucleosome間之DNA，造成典型的梯形⁽¹⁹⁾。

caspase-1與caspase-3分別代表此類酶的兩大次集團。前者是在凋

亡決定點的上游，在線蟲有ced-4，人類則為caspase-1,4,5；後者則在此決定點之下游作為執行處決者，在線蟲有ced-1,2,5,6,7,8,10，人類則為caspase-2,3,6,7,8,10⁽²⁰⁾。有強烈證據支持這兩大事件的故事主要發生在粒線體上⁽²¹⁾。而生與死兩歸途的掌握，在線蟲則是由ced-9來裁決，至於哺乳類動物則交在bcl-2家族上。

(三)生死路上之決定者：bcl-2家族

如前所述，bcl-2家族成員具有某些選擇生死之權力。這些路徑有些與caspase有關(例如與Fas-L的結合)，有些則無關(如DNA之破壞)。bcl-2 (bcl: B cell lymphoma)是此家族第一個被發現的成員，可抑制或阻斷多種因素引起的細胞凋亡，因而稱之為細胞凋亡抑制基因⁽²²⁾。同源性研究證實bcl-2與線蟲ced-9基因為同源⁽²³⁾。隨著其餘成員的被發現，現已知它們均具BH (Bcl Homology)結構，透過BH四個domain的排列組合(每一成員帶一或多個BH domain)，使它們分別具抑制或促進凋亡功能。例如Bax在細胞內過度表現時，可形成bax-bax二聚體，此時與p53基因產物一樣，促進細胞凋亡。bcl-2家族作用機制目前尚未明朗，已知部份成員具穿膜區，很可能與粒線體、內質網等膜狀結構交換物質有關。

(四)與免疫系統之互動：Fas/Fas-L

Fas (Apo-1; CD95)屬腫瘤壞死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)家族及神經生長因子(Nerve Growth Factor, NGF)的一員，是一種貫穿細胞膜的醣蛋白，以膜受體的形式存在，主要在胸腺、心、肺、肝、腎、卵巢、活化的淋巴球等表達最多。其結合子Fas-L為一種 型穿膜蛋白，屬於TNF家族。Fas-L也可能分泌或脫落至細胞外，成為一種可溶性的功能性活性分子^(24,25)。

當膜表面的Fas蛋白與其配體Fas L相結合後，可啟動細胞內一系列導致凋亡的事件發生，對免疫反應的向下調控及T細胞毒殺作用扮演樞紐的角色⁽³⁾。bcl-2對生死的調控並非很完整，例如對於caspase上游的訊號，就通常無法被bcl-2攔截。Fas/TNFR的訊號轉導系統因可直接作

用於下游之caspase，故可彌補此不足。生命體內多種組織和細胞均可表現Fas，活化的成熟T細胞及HTLV-1，HIV及EBV等病毒轉化的T細胞可大量表現Fas，某些腫瘤細胞也有Fas的表現。Fas-L的分布原只見於活化的T細胞，最近在人睪丸、眼前房基底細胞及某些神經細胞中發現Fas-L的表現。這些組織細胞可通過表現Fas-L來殺傷活化的Fas+的T細胞，從而保護這些免疫赦免部位免遭T細胞的攻擊。最近發現，某些腫瘤細胞也可表現Fas-L，在腫瘤的發生和免疫逃逸中具有重要意義⁽²⁾。

(五)其它相關因子

p53：是一種分子量53kDa的轉錄因子，在正常的情況下，p53的表現量很低，但當DNA異常時，p53蛋白及轉錄活動明顯增加，並刺激p21蛋白的表現，使細胞停留在G0/G1期而不能進入S期，以進行DNA修補；若DNA損傷嚴重無法修補時，則誘發細胞走向凋亡途徑，防止癌化。因此p53有腫瘤抑制基因之稱，許多腫瘤細胞的p53基因多發生突變，使腫瘤細胞具抗凋亡的能力，具較強的增毀及轉移能力。

myc：C-myc在一般的細胞屬於原致癌基因(proto-oncogene)，對細胞具有促進增殖及誘導凋亡的雙重作用，其機制與下游目標基因的調控路徑不同，致使細胞走向不同的命運，而其它基因蛋白對C-myc的調控也會導致不同反應，如活化C-myc會造成p53蛋白的累積，促進細胞凋亡，但與Bcl-2同時存在於時，卻會讓C-myc致癌基因活化，表現細胞不正常增殖現象⁽²²⁾。

四、肝癌簡介

惡性腫瘤已長年佔據台灣十大死亡原因的第一名，其中肝癌又是男性癌症十大死因的榜首，女性癌症十大死因的第二位。肝癌分成由肝臟本身長出來的原發性肝癌，以及由其他器官、組織轉移而來的轉移性肝癌。原發性肝癌包括常見的肝細胞癌及肝內膽管演變的膽管癌，其他較罕見的有肝臟胚細胞瘤、扁平上皮癌、類癌、膽道囊狀腺癌及血管肉瘤管⁽²⁶⁾。

就全球肝癌盛行率而言，台灣屬於高發生率的國家，與肝癌相關的

危險因子包括肝炎病毒如 B 型和 C 型肝炎病毒、各種原因的肝硬化、黴菌毒素如黃麴毒素、藥物及化學藥品毒品等。

依照肝癌細胞不同分化等級，可分為：

第一級：高度分化；癌細胞形態近似正常肝細胞。細胞體積較大，胞漿豐富，嗜酸性染色；核圓形，具明顯核仁，有少數核分裂相，核漿比例稍增大，腫瘤細胞呈小樑狀排列。

第二級：中度分化；癌細胞形態仍然與正常肝細胞相似。胞漿豐富，嗜酸性；核增大，著色深，核仁明顯，核漿比例增大，核分裂相增多，腫瘤細胞多排列成小樑狀結構，亦可見腺泡樣結構，腺腔內可見膽汁。

第三級：中度分化；癌細胞形態與正常肝細胞相距較遠。胞漿量減少，嗜酸性增強；核大而不規則，染色質粗而不均勻，核仁大，核分裂相多見，核漿比例明顯增大，見有多量的腫瘤巨細胞；腺泡樣結構和膽汁少見。

第四級：低度分化；癌細胞形態變異甚大。胞漿少而嗜鹼；核大而不規則，占據細胞大部，使核漿比例顯著增大。其細胞形態常顯多形性，有圓形、奇異形、梭形和瘤巨細胞等。核仁不明顯或不見核仁。細胞間失去連接性，排列紊亂，無一定結構⁽²⁷⁾。

西醫治療肝癌的方法，較常知的有開刀切除法、肝動脈栓塞術、局部酒精或冰醋酸注射等，有些療法如全身性化學療法、放射線療法、微波凝固壞死法、冷凍療法、免疫療法、肝臟移植等仍未普遍。另外在台灣，許多肝癌患者會尋求西醫治療以外的中醫治療或服用以口相傳的偏方治療⁽²⁸⁾。

傳統中醫學認為肝癌屬於「肝積」、「癥瘕」、「肥氣」、「膨脹」、「癰黃」等範疇。《靈樞·百病始生篇》說「積」症的成因是：「外中於寒而內傷憂怒」，而《醫宗必讀·積聚篇》則提到：「積之成也，正氣不足，而後邪氣踞之」，因此正氣虛損，邪氣乘襲，蘊結於肝，肝氣鬱結，氣機受阻，血行不暢，痰瘀相互，形成痞塊，乃致肝癌。至於治療「積聚」，《醫學心悟》提出：「治積聚者，當按初中末之三法焉。邪氣初容，積聚未堅，宜真清之，而後和之；若積日久，邪盛正虛，法從中治，須以補瀉相兼為用；若塊消積半，便以末治，即住攻擊之藥，但舌中養胃導

正經脈，俾榮衛流通，而塊自消矣。更有虛人患積者，必先補其虛，珍其脾，增其飲食，然後用藥攻其積，斯為善治，此先攻後補之法也。」

(29)

依中醫藥辨證論治治療原則，常見的肝癌證型有瘀毒不化型、熱毒蘊結型、正虛邪實型。

瘀毒不化型：主症見肝臟腫大，質地堅硬，包塊不平，肝區疼痛，胃納著減，脘腹飽脹，面色失華，手見肝掌，頸項部或前胸及面部呈現蜘蛛痣；舌有斑紫色，苔白厚，脈象沈弦。治法以化瘀解毒，消癥散結。方用大黃蟪蟲丸加減。

熱毒蘊結型：主症見腹脹肝痛，肝脾腫大，腹壁靜脈怒張，胸悶痞滿，飲食難下，不能平臥，坐臥不安，煩熱，噁心嘔吐，大便乾，小便少，口乾渴，少津液；舌質燥，苔黃膩，脈沉細弦數。治法以清熱解毒，消癥散結。方用龍膽瀉肝湯加減。

正虛邪實型：主症凡呈虛象，肝大腹脹，疲乏無力，少食懶言，精神不振，腰酸腿軟，心悸氣短，呼吸無力，轉側艱難，面色晦暗，形體消瘦，或有浮腫，尿少便溏；舌質艷紅或胖，少苔，脈沉細而弱。治法以補虛祛邪，消癥散結。方用香砂六君子湯合理中湯加減⁽³⁰⁾。

臨床上隨醫者接觸觀察到的患者不同，另歸納為肝鬱脾虛型、氣滯血瘀型、肝膽濕熱型和陰虛內熱型⁽³¹⁾。

至於常用來治療肝癌的中藥，清熱解毒類的有牛黃、地龍、半枝蓮、半邊蓮、蚤休、白花蛇舌草、龍葵、大黃、蟾蜍等；活血化瘀類的中藥有丹參、莪朮、蜈蚣、水蛭、全蠍、麝香、斑蝥等；軟堅散結類有黃藥子、澤漆等；扶正抗癌類有人參、黨參、黃耆、白朮、靈芝、龜板、甘草、補骨脂、薏苡仁等。

五、絞股藍簡介

絞股藍，依本草學文獻⁽³²⁾的敘述，其別名有五葉參、七葉膽、小苦藥、甘茶蔓、公羅鍋底等；來源為葫蘆科絞股藍屬植物絞股藍 *Genostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino，以根狀莖入藥。

形態特徵為多年生草質藤本，長約 1-1.5 米。根狀莖細長橫走，長

50-100 厘米，直徑粗長者可達 1 厘米，有分枝或不分枝，節上生鬚根。莖細長，節部具疏生細毛。葉互生，通常由 5 小葉組成鳥趾狀複葉，有時為 3 片或 7 片，小葉片卵狀長橢圓形或卵形，有小葉柄，中間小葉片長 4-8 厘米，寬 2-3 厘米，先端圓鈍或短尖，基部楔形，下面脈上有短毛，兩側小葉成對，著生方同一小柄上，較小。夏季開黃綠色花，圓錐花序腋生，疏鬆，長 9-15 厘米；花單性，雌雄異株，花萼細小；花冠裂片披針形，先端尾狀長尖，長約 2 毫米。漿果圓形，綠黑色，徑 6-8 毫米，上半部具一橫紋。種子長橢圓形，長約 4 毫米，有皺紋。

生境分布主要生於山間的陰濕環境，以山間林下陰濕而有亂石的環境最為常見，分布於長江以南各省區。

采集一般是在秋季采集，洗淨，曬乾，研粉備用。

其化學成分自從 1976 年開始，日本學者報告從絞股藍中水解得到人參二醇及 2'-羥人參二醇。以後報告從皂 中分離出多種達瑪烷皂 ，至目前為止，已報告分離得到 80 多種皂 ，分別命名為絞股藍 Gypenoside -L ，其中 經 50%醋酸水解可得到人參皂 -Reg3 ， 、 、 、 、 、 、 、 、 、 ，經 水解可得到人參皂 -F2，絞股藍皂 - 經 水解後均可生成次級 20(S)-原人參二醇-20-O- -D 喃葡萄糖 ，該次級 與人參皂 中產生的次級 "化合物 K"的結構一樣。1981 年又從地上部分經醇提取分離得到的兩種新的達瑪烷型皂 ，分別命名為 TN-1 和 TN-2。上述絞股藍 、 、 、 分別與人參皂 Rb1、Rb3、Rd、F2 結構相同。

其藥理作用，據現代研究發現有：

1. 絞股藍總皂 有明顯的降血脂作用，能使實驗性高血脂動物的血清膽固醇和 油三酯明顯下降。
2. 有抗血小板聚集作用。
3. 其提取物對四氧嘧啶性糖尿病小鼠有明顯的降血糖作用，對老年大鼠的糖耐量低下有明顯的改善作用。
4. 絞股藍總皂 靜脈注射 50mg/kg 對麻醉貓有顯著的降壓作用，對結扎兔或大鼠冠狀動脈造成的心肌梗塞有保護作用，能增加離體家兔心臟冠脈流量。

5. 有抗疲勞和抗寒作用，可提高常壓耐缺氧能力，並能增加應激狀態下血漿 ACTH 含量。
6. 其總皂 對利卡因中毒有救治作用，可明顯延長小鼠存活時間。
7. 有明顯的鎮靜、催眠及鎮痛作用。
8. 對大鼠實驗性肝損傷有保護作用。
9. 對體外培養的肝癌、子宮癌、肺癌、黑色素肉瘤等癌細胞的增殖有顯著的抑制作用，而對正常細胞無不良影響。
10. 有免疫增強作用。
11. 有抗衰老作用，能明顯延長果蠅壽命和體外培養的人皮膚細胞壽命，能抑制血清及肝臟過氧化脂質的形成，提高過氧化物歧化酵素活力。
12. 絞股藍有性激素樣作用，能使小鼠睪丸、精囊、前列腺和子宮的重量增加。
13. 對大鼠實驗性胃潰瘍有保護作用。
14. 長期服用絞股藍可抑制實驗性膽石形成。

性味苦、寒。功能有清熱解毒，止咳祛痰、抗癌防老、降血脂等。常用於治療慢性支氣管炎、傳染性肝炎、腎盂炎、胃腸炎、高血壓症等。

絞股藍最早文獻出處依清代《植物名實圖考》所述，是出自明代《救荒本草》，作為饑荒時候充飢的食材，近世對它有「南方的人參」之稱^(33,34)。由於絞股藍的臨床治療效果、藥理作用和化學成分都具有類似人參的作用，具延緩衰老、抗疲勞、滋補強壯、養心安神、補腎溫陽等特性，就中藥性能來說，一般寒性藥物的特性是具清熱、瀉火、解毒等作用，因此有人認為應將絞股藍歸為微溫性中藥⁽³⁴⁾。

至於其成分除類似人參皂 之外，尚有多醣類，主要由木糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖等組成；黃酮類化合物有蘆丁(Rutin)、商陸素(Ombiun)等；此外含有天冬氨酸、穀氨酸、甘氨酸、纈氨酸、異亮氨酸、精氨酸、賴氨酸等 17 種氨基酸，以及鉀、鈉、鎂、鋅、錳、鈣、磷、硅等無機元素，和葫蘿蔔素等維生素。臨床常應用於治療慢性氣管炎、白細胞減少症、肝炎、高血脂症、銀屑病及癌症等⁽³⁵⁾。

絞股藍在抗癌的研究上，大陸的文獻已有一些相關研究報導。體內實驗方面，觀察到絞股藍皂 對小鼠 S180 實體瘤的生長有抑制作用⁽³⁶⁾；以及大田絞股藍和新鮮絞股藍可使艾氏腹水癌小鼠生命延長率達 46.6% 和 40.7%⁽³⁷⁾。體外實驗方面，顯示絞股藍皂 對 S180 細胞株有直接滅殺作用⁽³⁶⁾；絞股藍總皂 在固定濃度下，對不同細胞株有不同的抑制作用，其中對肺癌細胞株 A549、Calu1、592/9 的抑制作用明顯強於子宮頸癌 HeLa s3 及結腸癌 Colo205⁽³⁸⁾。絞股藍也被用在對癌前病變及抗誘變的研究^(39,40)，並以複方形式應用在臨床，顯示能使癌症患者的復發轉移和死亡率皆降低⁽⁴¹⁾，及提高手術放療後的五年存活率⁽⁴²⁾。

第三章 材料與方法

一、細胞株培養

肝癌細胞株 HepG2 及 HA22T/VAH 自液態氮中取出解凍，培養在含 10% 小牛血清 (購自 JR 公司)、0.02 mg/mL 慶大黴素 (gentamycin)、0.1mM 非必需胺基酸、2 mM L- 穀胺酸 (L-glutamine) 的 DMEM (Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium) 內 (皆購自 GIBCOBRL, USA)。以 75T 培養瓶培養，每隔 2-3 天作一次繼代培養。繼代培養時，先以 Trypsin-EDTA 緩衝液 (購自 GIBCO BRL, USA) 處理細胞，使之自附著面脫離，繼以含血清緩衝液終止 Trypsin-EDTA 的反應，整個過程在無菌操作檯操作。處理後細胞置於 37°C 恆溫，飽和濕度的培養箱，並供以 5% CO₂。

二、藥物配製

絞股藍皂 的萃取：取絞股藍 (*Gynostemma pentaphyllum* [Thunb.] Makino) 莖葉，以 70% 甲醇浸漬抽取，重覆六次，合併抽出液，經減壓濃縮後，所得之粗抽出物用二氯甲醇萃取，去除低極性物質，再以正丁醇萃取，所得正丁醇部分即為絞股藍皂^(43,44)。再經冷凍乾燥法保存之。實驗時將絞股藍皂 溶於 PBS buffer 中，再以 0.2 μ m 濾膜過濾以達無菌狀態。

三、細胞生長抑制試驗

將 HepG2 和 HA22T/VGH 等肝癌細胞株細胞培養在 96 well plate (購自 Corning 公司, USA)，每個 well 含 1×10^6 個細胞，隔夜培養之，待細胞附著後，抽出原有培養基，加入含不同濃度的測試藥品的培養基繼續培養，使之作用不同時間 (6~72 小時)。吸去上清液，加入 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) 2,5-diphenol tetrazolium bromide) proliferation kit (購自 Boehringer Mannheim, Germany) 每個 well 加 10 μ L；4 小時後，

再加入清洗液(solubilization solution) 100 μ L ; 隔夜作用後 , 再以免疫酵素螢光儀 (MRX microplate reader, Dynatech Laboratories, Germany)測量結果⁽⁴⁵⁾。(參考圖 3.1)

四、細胞存活率分析

比較經絞股藍總皂 處理與未用藥物處理 , 所存活細胞的比率,即得絞股藍總皂 對肝癌細胞株 HepG2 和 HA22T/VGH 的影響,其計算公式如下⁽⁴⁶⁾ :

$$\text{細胞存活率} = \frac{\text{藥物處理之測量值} - \text{背景值}}{\text{未經藥物處理之測量值} - \text{背景值}} \times 100\%$$

五、DNA 裂解與電泳分析

將約 1×10^7 個細胞以 0.5 ml 溶解液(lysis buffer) , 於 4°C 下作用約 20 分鐘 , 將細胞取至微離心管 , 離心使細胞沈澱 ; 取上清液 , 加 0.1 mg/mL proteinase K , 於 50 ° C 水浴作用 24 小時後 , 加入 RNase A 50 μ g/mL , 再於 50 ° C 作用 1.5 小時 ; 再以苯酚 : 氯仿為 1:1 比例萃取細胞溶解液 , 混合均勻 , 13000 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘後 , 取上層溶液 , 加入 2-propanol 至最後濃度為 50% ; 加入 20 mg 肝醣(glycogen) 1 μ L , 於 -20°C 下靜置隔夜以沈澱 DNA。電泳分析前 , 取適量 DNA 溶於 TE buffer , 置於 2% 洋菜凝膠中進行電泳分析^(47,48)。(參考圖 3.2)

六、對細胞生長周期的影響

將約 1×10^6 個細胞收集在 1.5 mL 的微離心管(Eppendorf tube) , 加入 0.5 mL PI stain solution A (50 μ g/mL propidium iodide, 3% polyethyleneglycol 6000, 0.1% Triton X-100, 1 mg/mL RNaseA, 4 mM citrate buffer pH7.2) 混勻後置於 37°C 作用 30 分鐘 , 再加入 0.5 mL solution B (50 μ g/mL propidium iodide, 3% polyethyleneglycol 6000, 0.1% Triton X-100, 0.4 M NaCl, pH 7.2)(以上試劑購自 PharMingen,

USA), 儲存於 4°C 至少一小時, 經 0.45 μ m 濾膜過濾後, 以流式細胞儀 FACScan(Becton Dickinson, Germany) 進行分析⁽⁴⁹⁾。(參考圖 3.3)

七、分離周邊淋巴球

抽取受檢者的血液 10 mL, 放入含 heparin 的綠頭試管。將血液分兩管, 沿管壁輕輕放入已含 5 mL Ficoll-paque 淋巴細胞分離液的試管內, 離心 2500 rpm, 20 分鐘。沿管壁用吸管抽中層乳白色細胞層, 加入 PBS 10 mL, 離心 1500 rpm, 15 分鐘。倒掉上清液, 加入 PBS 至 10 mL, 輕拍底部使沈澱散開, 再清洗一次。離心 1000 rpm, 10 分鐘。儘量倒乾上清液。加入 RPMI 1640 細胞培養液, 培養之。

八、Annexin 染色

用 PBS 清洗細胞兩次, 再加 1X binding buffer(0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂)於含周邊淋巴細胞的懸浮液, 取出 100 μ L 的溶液, 依比例加入 Annexin 和 Vital Dye 染劑, 以及要觀察的 CD marker 抗原, 避光室溫靜置 15 分鐘, 每個試管加入 400 μ L 的 1X binding buffer, 在 1 小時內用流式細胞儀分析。再將分離的周邊淋巴分空白對照組、絞股藍皂處理組、HbsAg 處理組、HbsAg 加絞股藍皂處理組, 培養 24 小時後, 再以 Annexin 染色及流式細胞儀分析⁽¹²⁾。(參考圖 3.4)

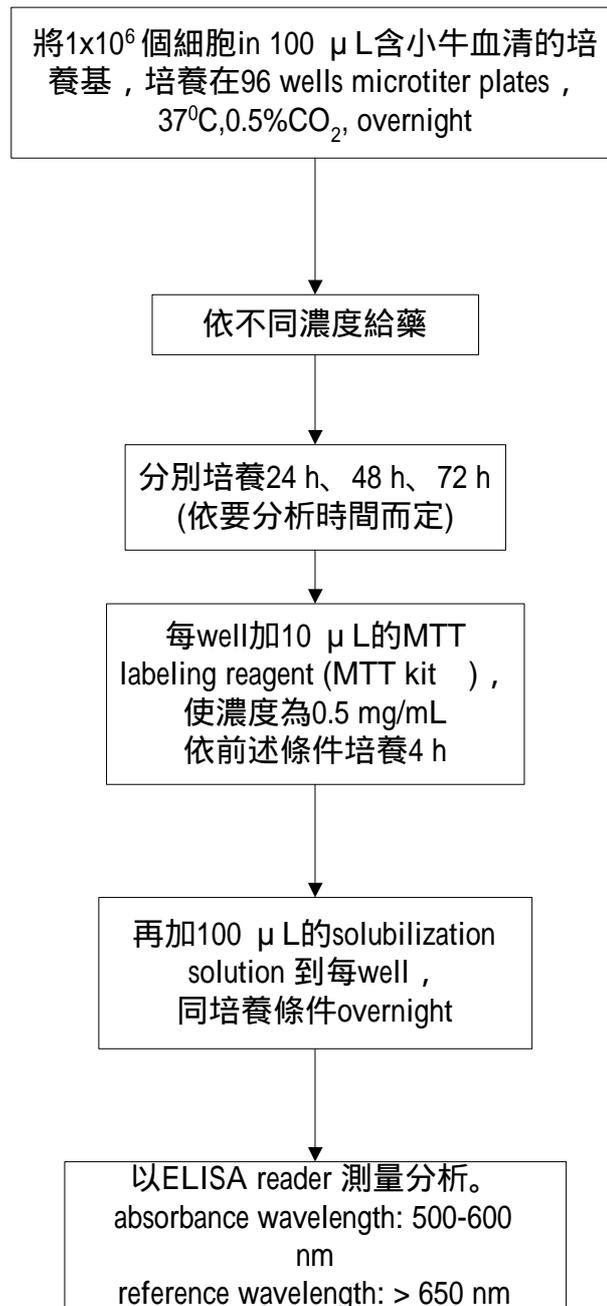


圖 3.1：細胞生長抑制試驗流程圖

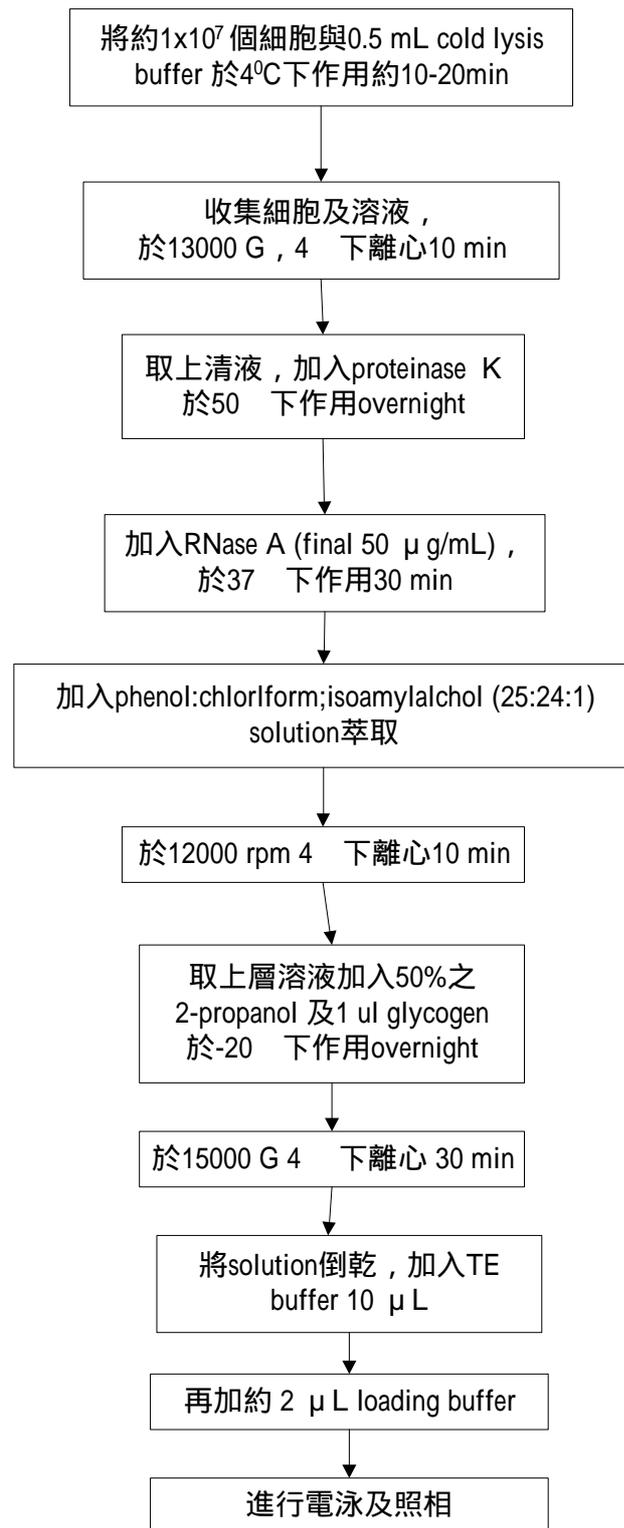


圖 3.2 : DNA 裂解與電泳分析試驗流程圖

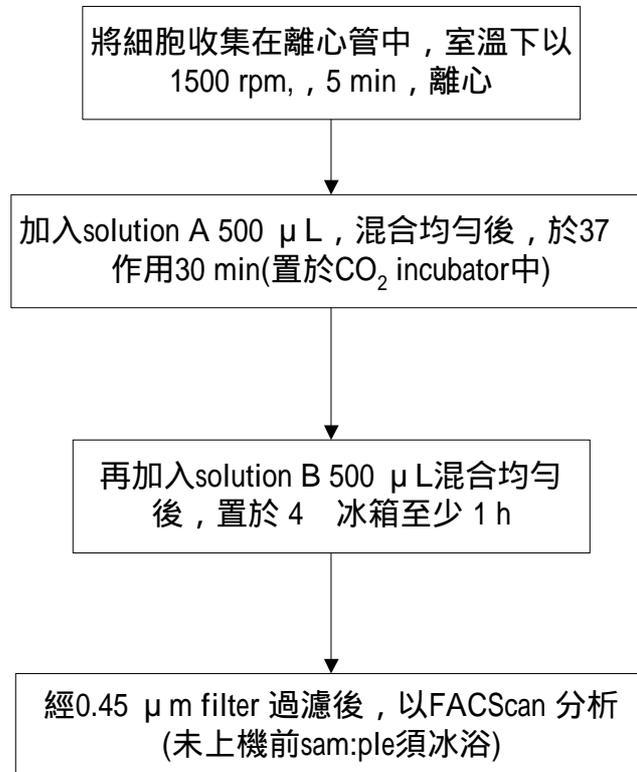


圖 3.3 : 細胞生長周期分析試驗流程圖

PBMC

抽取 10 mL 的血液，放入 Heparin tube (Green head)
 加 5 mL Ficoll 至 10 mL 試管 (共 2 管)
 將約 5 mL 血液沿管壁，小心放入含 5 mL Ficoll tube (共 2 管)
 離心，2500 rpm，20 min
 抽中層 buffy-coat (2 tube) to 10ml tube
 加入 PBS 至 10 mL (wash 1st)
 mix
 離心，1500 rpm，10 min
 倒掉上清液
 加入 PBS 至 10 mL (wash 2nd)輕拍底部使沉澱散開
 mix

取 1 mL 至 Eppendorf tube

剩下 9 mL 放 15 mL 離心管

取 40 μ L 至 Eppendorf
 加 40 μ L dye, mix
 counting cells
 取約 1×10^6 培養 24 hr
 分不加藥組、
 加絞股藍皂甘、
 HbsAg+絞股藍皂甘組

剩餘放至 Eppendorf
 離心
 倒掉上清液，取 ppt
 加 1 mL 1X binding
 buffer

1000 rpm, 10 min
 倒掉上清液
 加入 RPMI 1640
 media culture

避光下操作(單位 μ L)

	1	2	3
CD4-FITC/CD8-PE	10		
IgG-FITC/IgG-PE		5	
Via-probe		10	10
Annexin V			5
CD maker Ab			5
Sample	100	100	100
Mix, 15min at RT in the dark			
1X binding buffer	400	400	400

上 flow cytometry

圖 3.4：分離周邊淋巴球與 Annexin 染色流程圖

第四章 結果

一、細胞生長抑制試驗

就 HepG2 細胞株而言，加入絞股藍總皂 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等不同的濃度，培養 48 及 72 小時後，藉由活細胞的胞膜才能與 MTT 染劑結合的特性來染色，經 ELISA reader 分析，顯示絞股藍總皂 濃度在 100 至 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，對細胞生長呈現部分抑制效應，而當濃度在 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上，則細胞幾乎完全死亡(表 4.1、圖 4.1)。

就 HA22T/VGH 細胞株而言，依次加入絞股藍總皂 濃度 0 100 200 300、400、500、600、700、800、900、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等不同的濃度，培養時間分別為 6、12、24 及 48 小時，發現作用時間在 6 及 12 小時之後，在濃度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上幾乎完全抑制效應；當作用 24 及 48 小時之後，則在濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即完全死亡。

為比較絞股藍皂 對不同細胞株的藥效，選用最高有效劑量之半 (50% effective dose; ED_{50}) 為指標，發現此 ED_{50} 隨藥物作用時間有所不同。比較兩細胞株，絞股藍總皂 對 HepG2 作用 48 小時，其 ED_{50} 值在 367 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；對 HA22T/VGH 作用 48 小時，其 ED_{50} 值在 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此外，進一步實驗顯示在 50-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之較低濃度，培養 6、12、24 及 48 小時後都出現刺激 HA22T/VGH 細胞株生長的現象(表 4.2 表 4.3 圖 4.2)。

表 4.1：絞股藍總皂 作用 48 及 72 小時對 HepG2 細胞生長抑制試驗

藥物處理時間	絞股藍總皂劑量 (i g/mL)	平均吸光度 (mean±SD)	存活率 (%)	ED ₅₀ (i g/mL)
48 小時	0	1.187 ±0.08	100.00	367
	100	1.024 ±0.04	86.27	
	200	1.030 ±0.09	86.77	
	300	0.957 ±0.12	80.62	
	400	0.523 ±0.20	44.06	
	500	0.015 ±0.13	1.26	
	600	0.014 ±0.01	1.18	
	700	0.002 ±0.01	0.17	
	800	0.007 ±0.00	0.59	
	900	0.012 ±0.00	1.01	
	1000	0.009 ±0.01	0.76	
72 小時	0	1.121 ±0.05	100.00	350
	100	1.061 ±0.04	94.65	
	200	1.008 ±0.06	89.91	
	300	0.965 ±0.16	86.08	
	400	0.458 ±0.05	40.86	
	500	0.022 ±0.03	1.96	
	600	0.028 ±0.00	2.50	
	700	0.038 ±0.00	3.39	
	800	0.034 ±0.01	3.03	
	900	0.040 ±0.01	3.57	
	1000	0.011 ±0.01	0.98	

註：以上為三個受測樣本，以 MTT 染色，經 ELISA reader 在 570 nm 的波長下測到其吸光度，並且消除在 650 nm 的背景波之吸光度。

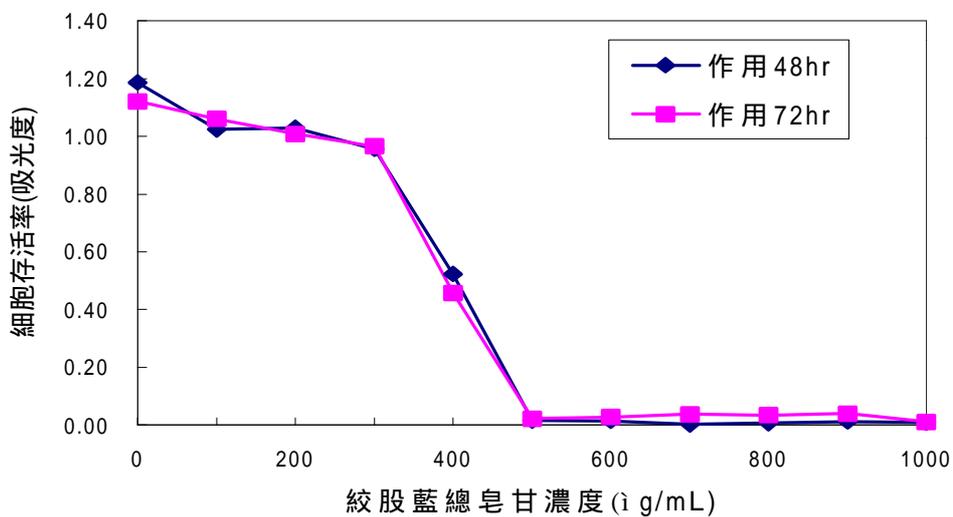


圖 4.1：絞股藍總皂 對 HepG2 細胞生長抑制試驗 藥物處理後的 HepG2 細胞，繼續培養 48 及 72 小時後收集，以 MTT 染色處理，經測光分析後的結果，顯示當絞股藍總皂 濃度超過 500 µg/mL 時細胞完全死亡。作用 48 與 72 小時之 ED₅₀ 值分別為 367 µg/mL 與 350 µg/mL。

表 4.2: 絞股藍總皂 作用 6 及 12 小時對 HA22T/VGA 細胞生長抑制試驗

藥物處理時間	絞股藍總皂劑量 (i g/mL)	平均吸光度 (mean±SD)	存活率 (%)	ED ₅₀ (i g/mL)
6 小時	0	0.52 ±0.04	100.00	479.16
	50	0.67 ±0.01	128.85	
	100	0.78 ±0.03	150.00	
	150	0.88 ±0.03	169.23	
	200	0.81 ±0.07	155.77	
	250	0.80 ±0.07	153.85	
	300	0.78 ±0.04	150.00	
	350	0.66 ±0.04	126.92	
	400	0.22 ±0.03	42.30	
	450	0.33 ±0.03	63.46	
	500	0.21 ±0.01	40.38	
	600	0.19 ±0.01	36.54	
	700	0.21 ±0.01	40.38	
	800	0.23 ±0.01	44.23	
	900	0.25 ±0.01	48.07	
1000	0.25 ±0.00	48.07		
12 小時	0	0.68 ±0.10	100.00	507.35
	50	0.71 ±0.03	104.41	
	100	0.68 ±0.19	100.00	
	150	0.91 ±0.02	133.82	
	200	0.91 ±0.06	133.82	
	250	0.81 ±0.02	119.12	
	300	0.80 ±0.03	117.64	
	350	0.80 ±0.05	117.40	
	400	0.17 ±0.01	25.00	
	450	0.37 ±0.03	54.41	
	500	0.39 ±0.01	57.35	
	600	0.19 ±0.01	27.94	
	700	0.20 ±0.01	29.41	
	800	0.24 ±0.01	35.29	
	900	0.23 ±0.01	33.82	
1000	0.23 ±0.00	33.82		

註：以上為三個受測樣本，以 MTT 染色，經 ELISA reader 在 570 nm 的波長下測到其吸光度，並且消除在 650 nm 的背景波之吸光度。

表 4.3：絞股藍總皂 作用 24 及 48 小時對 HA22T/VGA 生長抑制試驗

藥物處理時間	絞股藍總皂劑量 (i g/mL)	平均吸光度 (mean±SD)	存活率 (%)	ED ₅₀ (i g/mL)
24 小時	0	0.80 ±0.04	100.00	329.41
	50	0.77 ±0.01	96.25	
	100	0.74 ±0.02	92.50	
	150	1.17 ±0.06	146.25	
	200	1.13 ±0.01	141.25	
	250	0.79 ±0.06	98.75	
	300	0.60 ±0.09	75.00	
	350	0.26 ±0.09	32.50	
	400	0.14 ±0.01	17.50	
	450	0.14 ±0.01	17.50	
	500	0.16 ±0.00	20.00	
	600	0.18 ±0.01	22.50	
	700	0.17 ±0.00	21.25	
	800	0.17 ±0.01	21.25	
	900	0.20 ±0.01	32.50	
1000	0.20 ±0.00	32.50		
48 小時	0	0.91 ±0.02	100.00	299.96
	50	0.85 ±0.02	93.41	
	100	0.92 ±0.03	101.10	
	150	1.36 ±0.08	149.45	
	200	1.33 ±0.04	146.16	
	250	1.12 ±0.09	123.08	
	300	0.45 ±0.16	49.45	
	350	0.34 ±0.21	37.36	
	400	0.12 ±0.00	13.19	
	450	0.12 ±0.00	13.19	
	500	0.12 ±0.01	13.19	
	600	0.15 ±0.01	16.48	
	700	0.15 ±0.01	16.48	
	800	0.15 ±0.01	16.48	
	900	0.17 ±0.01	18.68	
1000	0.17 ±0.01	18.68		

註：以上為三個受測樣本，以 MTT 染色，經 ELISA reader 在 570 nm 的波長下測到其吸光度，並且消除在 650 nm 的背景波之吸光度。

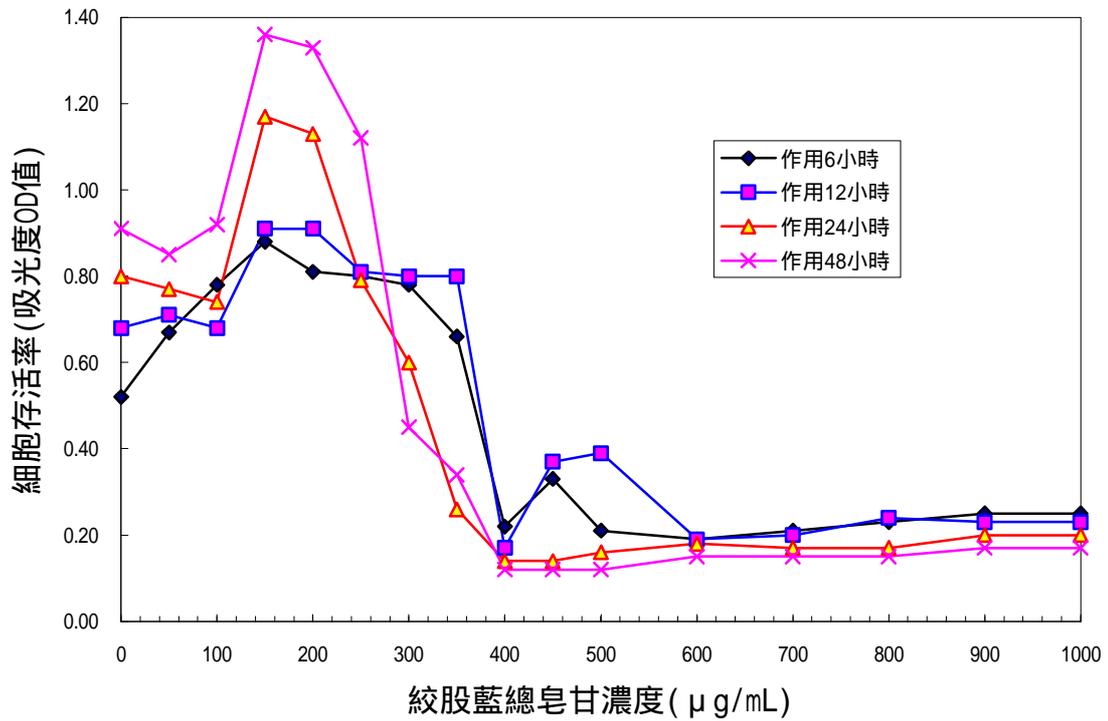


圖 4.2：絞股藍總皂 對 HA22T/VGH 細胞生長抑制試驗 以絞股藍總皂藥物處理 HA22T/VGH 細胞株，培養 6、12、24 及 48 小時後收集，以 MTT 染色處理，經 ELISA reader 分析後的結果。當藥物處理時間為 6 及 12 小時之後，ED₅₀ 值約為 500 µg/mL；藥物作用 24 及 48 小時之後，當絞股藍總皂 濃度超過 400 µg/mL 時，細胞生長完全死亡，而 ED₅₀ 值在 300 至 350 µg/mL。

二、DNA 裂解與電泳分析

由 HA22T/VGA 細胞株生長抑制試驗所得結果，選擇最接近 ED_{50} 值的五個絞股藍皂 濃度 300 350 400 450 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分別培養 HA22T/VGH 細胞經 6、12、24、48 小時後收取細胞進行 DNA 裂解與電泳分析。發現藥物濃度在 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，培養 6 及 12 小時有出現 DNA 裂解片斷；藥物濃度在 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，培養 12 小時後電泳分析亦出現 DNA 裂解片斷；藥物濃度在 400、450、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 則培養 6、12、24 及 48 小時之後，則皆未見到 DNA 裂解片斷（圖 4.3）。

至於 G2 細胞株，則於上述 5 個藥物濃度及 6、12、24 及 48 小時四個作用時間之後，均未見到 DNA 裂解片斷。

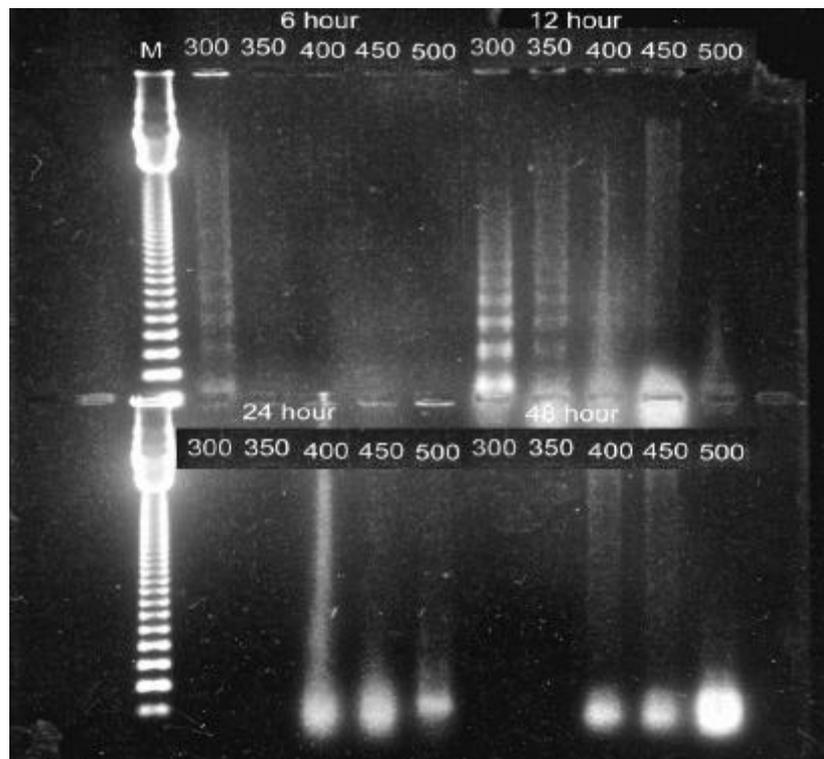


圖 4.3：絞股藍皂 處理 HA22T/VGA 的 DNA 裂解與電泳分析

三、對細胞生長周期的影響

對 HepG2 細胞株而言，分別加入濃度為 200、300、400、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的絞股藍皂，另外以無藥物處理組做對照組，經培養 48 小時之後，以 PI 染色，經流式細胞分析儀來分析，對照組有完整的 G0/G1、M/G2 及 S 等生長期，當絞股藍皂濃度增加到在 300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 HepG2 細胞株有顯著 G1 arrest 的現象，當藥物濃度增加到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，則見 G0/G1 期的細胞亦減少，而凋亡的細胞增多(圖 4.4)。

對 HA22T/VGH 細胞株而言，同樣加入濃度 200、300、400、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的絞股藍皂，並以無藥物處理組做為對照組，經培養 48 小時之後，以 PI 染色，經流式細胞分析儀來分析，在藥物濃度 200 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有明顯的 G1 arrest 現象，當藥物濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用下，可見到凋亡細胞增加，堆積形成 sub G0/G1 peak，而在濃度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 則見細胞大量死亡(圖 4.5)。

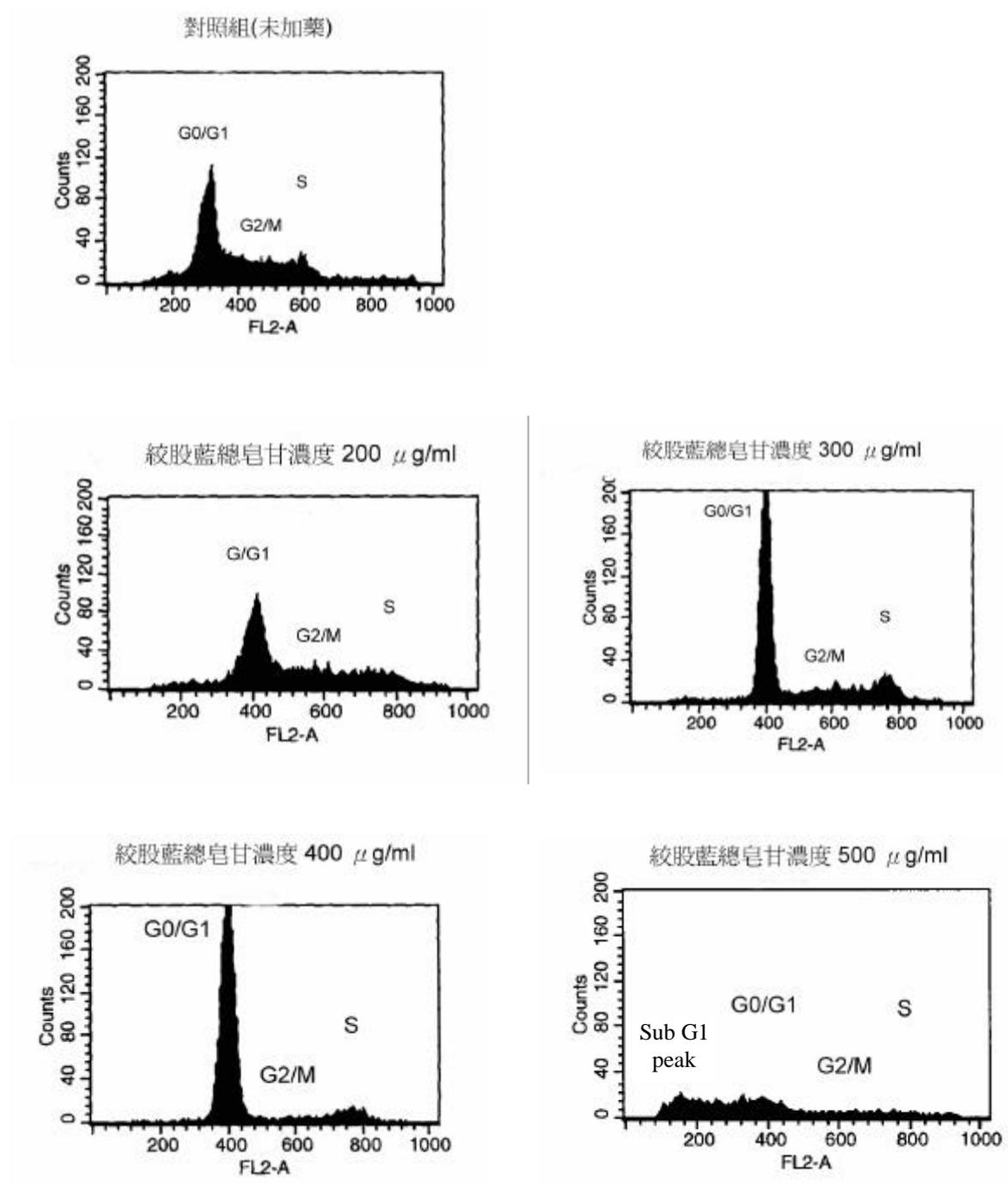


圖 4.4 : 絞股藍皂 培養 48 小時對 HepG2 細胞生長周期的影響

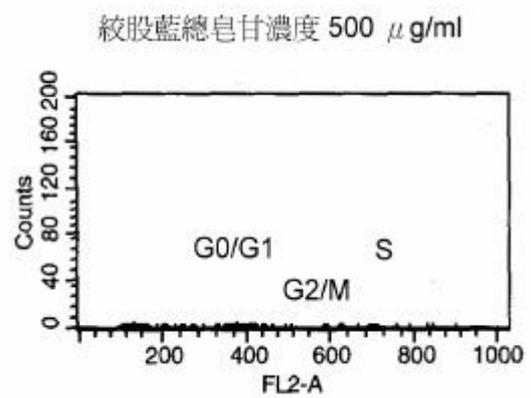
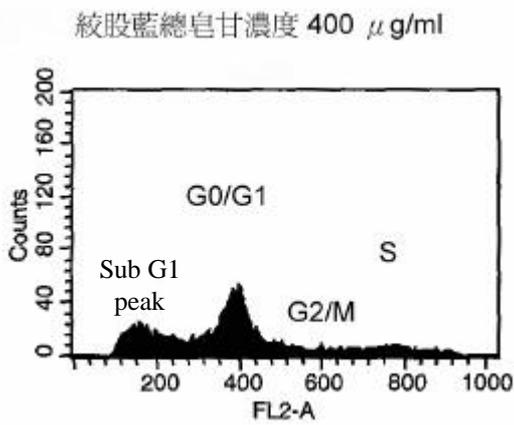
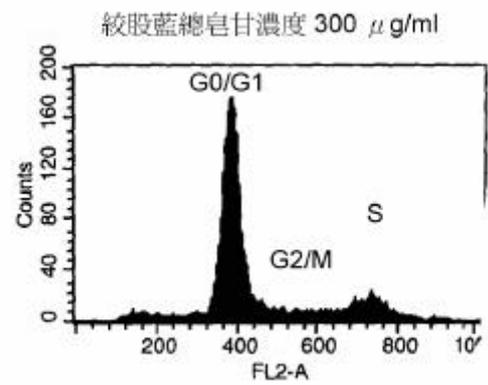
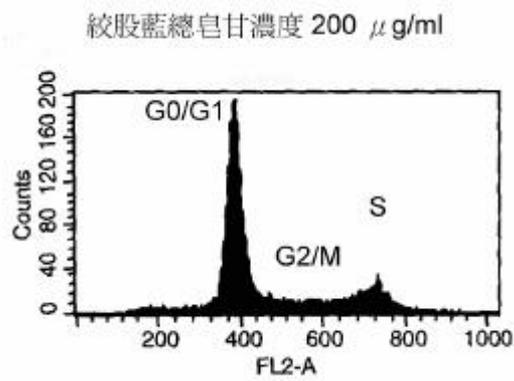
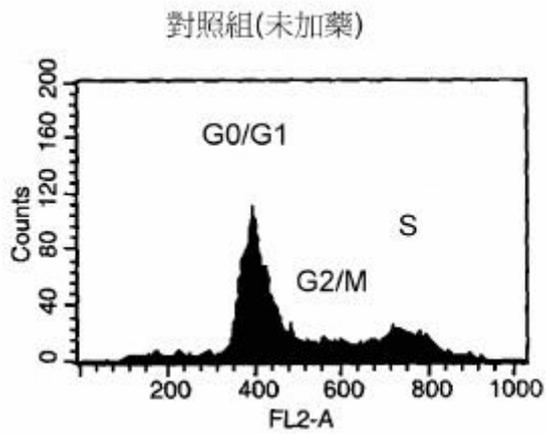


圖 4.5 : 絞股藍皂 培養 48 小時對 HA22T/VGH 細胞生長周期的影響

四、體外培養初代周邊淋巴細胞與細胞凋亡死亡率

取 CD4 淋巴細胞做觀察指標，於分離的周邊淋巴球當中標記 CD4 細胞，進行 Annexin V 染色分析，對無藥物處理組，初分離的 CD4 周邊淋巴細胞其凋亡細胞有 2.61%，死亡細胞有 2.63%，凋亡及死亡率共 5.24%；培養 24 小時之後，凋亡率有 10.26%、死亡率有 0.56%，凋亡及死亡率共 10.82%。(表 4.4、圖 4.6)

絞股藍皂 處理組，加入對 HA22T/VGH 作用 24 小時的 ED_{50} 濃度 330 μ g/mL 處理下，CD4 周邊淋巴細胞死亡殆盡，且細胞形態改變，影響程式判別。直到將絞股藍皂 稀釋到 8.72 μ g/mL 和 33 μ g/mL，前者凋亡率為 7.60%、死亡率為 1.12%，共 8.72%；後者凋亡率為 7.63%、死亡率為 1.02%，共 8.65%。與培養 24 小時的無藥物處理組比較，皆有降低凋亡及死亡率的現象。(表 4.4、圖 4.7)

觀察 B 型肝炎表面抗原(HbsAg)組，當 CD4 周邊淋巴細胞加入 B 型肝炎表面抗原(HbsAg)5 μ g/mL 作用 24 小時，其凋亡率有 11.05% 死亡率有 1.17%，共 12.22%，較培養 24 小時的無藥物處理組的凋亡及死亡率來得高；若同時加入絞股藍皂 8.72 μ g/mL 或 33 μ g/mL 培養 24 小時下，前者凋亡率 11.18%，死亡率 1.72%，共 12.90%；後者凋亡率 10.35%，死亡率 4.96%，共 15.31%。皆未能減少凋亡及死亡率。(表 4.4、圖 4.8)

此結果顯示在絞股藍皂 在 8.72 及 33 μ g/mL 較低的濃度單獨作用下，對體外培養的 CD4 淋巴細胞有降低細胞凋亡及死亡的作用。(圖 4.9)

表 4.4: 藥物處理與 CD4 細胞的凋亡及死亡率

	CD4 凋亡及死亡率		
	Apoptosis cell	Dead cell	total
初分離的 CD4 淋巴細胞	2.61 %	2.63 %	5.24 %
無藥物處理 24 小時後	10.26 %	0.56 %	10.82 %
藥物作用 24 小時			
絞股藍皂 (8.72 μ g/mL)	7.60 %	1.12 %	8.72 %
絞股藍皂 (33 μ g/mL)	7.63 %	1.02 %	8.65 %
藥物作用 24 小時			
HBsAg	11.05 %	1.17 %	12.22 %
HBsAg + 絞股藍皂 (8.72 μ g/mL)	11.18 %	1.72 %	12.90 %
HBsAg + 絞股藍皂 (33 μ g/mL)	10.35 %	4.96 %	15.31 %

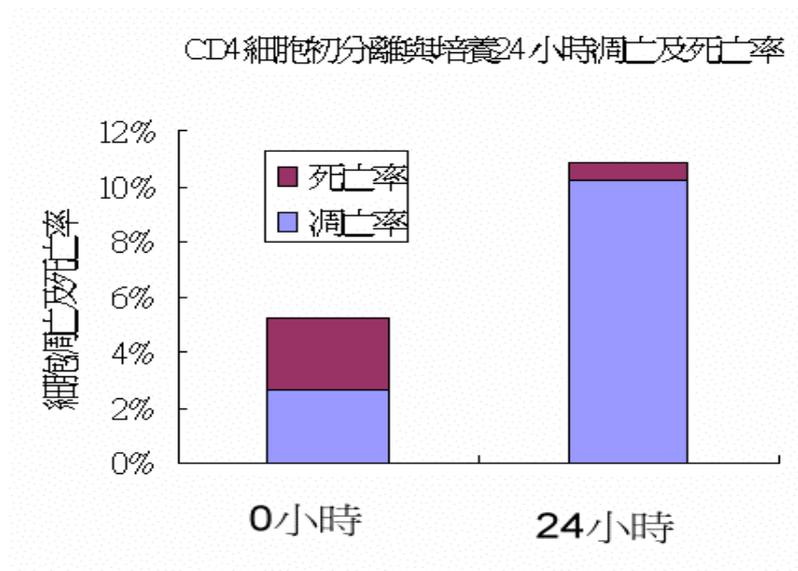


圖 4.6：無藥物處理之 CD4 細胞的凋亡及死亡率

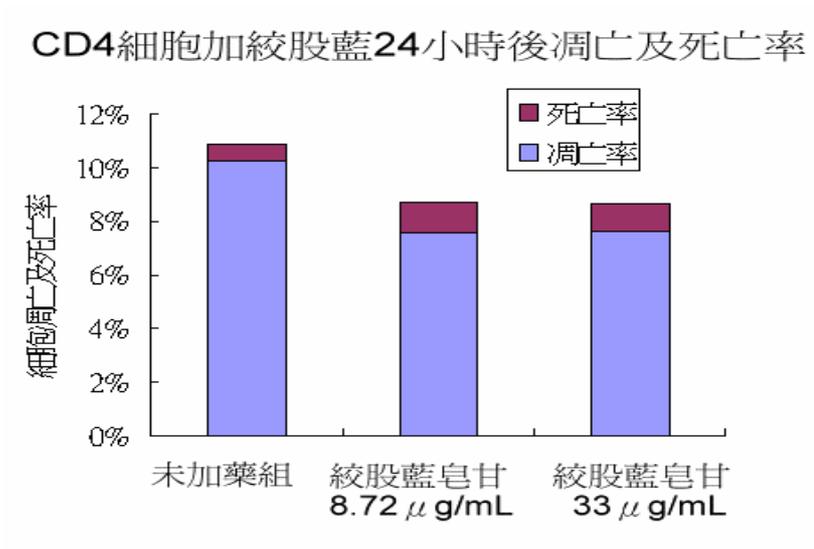


圖 4.7：絞股藍總皂 組細胞凋亡及死亡率

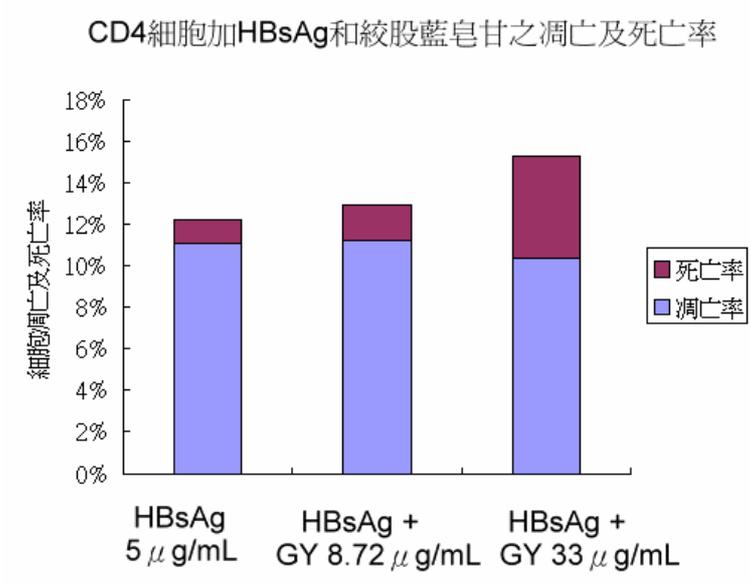


圖 4.8：加絞股藍總皂 於 B 型肝炎疫苗組之凋亡及死亡率

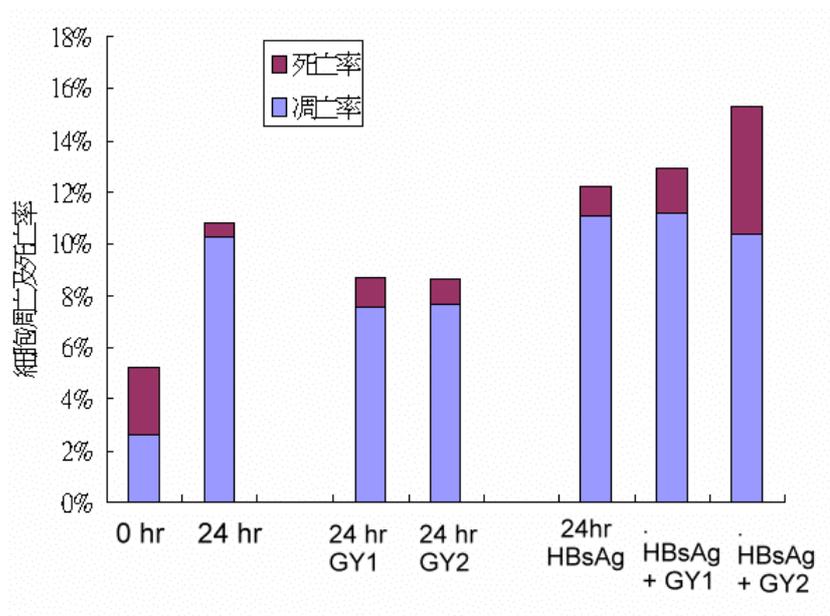


圖 4.9：無加藥組與加藥組共同比較 CD₄細胞的凋亡及死亡率 GY1 表示絞股藍總皂 濃度 8.72 μg/mL, GY2 表示絞股藍總皂 濃度 33 μg/mL。

第五章 討論

有關癌症與細胞凋亡的相關研究，顯示癌症的發生是由於癌細胞無法正常的進行細胞凋亡(apoptosis)，造成漫無止境的大量增生，而妨礙到正常的細胞生理機能，因此細胞凋亡與癌症關係成為相當熱門的研究課題。目前臨床上常用的許多抗癌藥物如：camptothecin、etoposide、bufalin、cisplatin 等都可以誘發各種不同癌細胞株進行細胞凋亡(apoptosis)或分化(differentiation)，然而這些藥物卻容易產生許多嚴重的副作用，如白血球減少(leukopenia)、血小板減少(thrombocytopenia)、噁心、腹瀉、虛弱、囊性出血(hemorrhagic cystitis)等症狀^(48,50)，醫界便期待從傳統中藥當中，尋找出較良好的取代或輔助藥物⁽⁴⁶⁾。

中醫學認為肝癌的病因病機，主要是寒邪、濕邪及虛邪等侵襲人體，加上飲食不潔、脾胃損傷，或情志鬱滯、氣滯血瘀，結而成積；脾虛濕困、濕鬱化熱，蒸鬱而成黃疸⁽²⁷⁾。扶正與祛邪是中醫治療基本原則之一，所謂扶正是扶助機體的正氣不足，祛邪是除去體內的邪氣⁽⁵¹⁾。絞股藍以莖葉入藥，素有「南方的人參」之稱，在中藥藥理分類領域，常被視為兼具清熱及補益的中藥，臨床用於治療癌症的文獻很多^(52,53,54)。選擇 HepG2 與 HA22T/VGH 的目的是代表兩種不同癌化程度的肝細胞株，HA22T/VGH 的癌化度較 HepG2 來得大，從細胞生長抑制試驗，以絞股藍皂 作用 48 小時的結果來看，HepG2 的 ED₅₀ 在 370 μ g/mL，而 HA22T/VGH 的 ED₅₀ 在 300 μ g/mL，此結果與張素等人對它種肝癌細胞 Hep3B 及 Tong 所發表的研究結果相近⁽⁵⁵⁾；經重覆實驗結果均顯示 HA22T/VGH 的 ED₅₀ 值小於 HepG2 的 ED₅₀ 值來看，顯示絞股藍皂 對癌化程度高的肝癌細胞株似有較強的毒殺作用。

在絞股藍皂 對 HA22T/VGH 細胞株的生長抑制試驗，發現濃度 50 至 150 μ g/mL 低的藥物濃度時，培養 6、12、24 及 48 小時後反而出現細胞增生的現象，這種現象也曾出現抗癌藥 cisplatin 對肝癌細胞株 SK-Hep-1 和 PLC/PRF/5 的研究報告中⁽⁵⁶⁾，國內國者研究某些茄科中草

藥對肝癌細胞株 Hep3B 的毒性試驗也曾出現此情形⁽⁵⁷⁾，似乎意味某些藥物對某些細胞株有著雙向調節的作用。

正常的細胞周期在 G1 期和 S 期之間有一個限制點(restriction point)R，決定著細胞未來的方向，是要繼續進入 DNA 合成步驟的 S 期，或繼續停留在 G1 期，以待適合的環境再複製，若此段等待期延長的話，則可能進入休眠狀態的 G0 期。但在癌細胞中，參與調控細胞分裂的蛋白質基因常出現變異，造成癌細胞異常的分裂與增殖。決定走上 DNA 合成與分裂途徑的細胞時，似乎容易受各種干擾因素的傷害，某些抗癌藥物就是只殺傷 S、G2、M 期增殖狀態的細胞，對 G0/G1 靜止期細胞不發生作用⁽⁵⁸⁾。能調節細胞增殖的因素很多，如溫度、營養物質、生長因子、離子濃度、pH 值、藥物等。重覆實驗均顯示低濃度的絞股藍皂對 HA22T/VGH 有刺激生長的作用，但高濃度則抑制 HA22T/VGH 細胞株的生長，但對 HepG2 卻未必如此，推測可能與細胞株特性有關，因 HA22T/VGH 癌化程度較高，細胞增殖能力較強，因此當生長環境稍微欠佳的時候，對其生長影響相對較小；雖然細胞數目增加，但稍後由 PI 染色分析給藥 48 小時的細胞周期試驗卻發現，在絞股藍總皂 200 µg/mL 濃度時，HA22T/VGH 細胞在 G1 期的比率已明顯增加形成 G1 arrest 現象，顯示絞股藍總皂具有調節細胞生長的機制。

以 MTT 染劑來分析生長抑制試驗是一個簡單而快速的方法，但許多人仍喜歡用 trypan blue 染色，再置於細胞計數器(hemocytometer)，用光學顯微鏡計算死細胞及活細胞數。其中一項原因是 MTT 分析法的原理是針對細胞的代謝能力分析，其試劑會被呼吸或醱解作用中的輔助因子 NADH 或 NADPH 給還原作用成有色的結晶不溶物 tetrazolium salt，經 solubilization 溶液清洗後，依酵素結合免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)來做分析。活細胞與增殖中的細胞其代謝大於死細胞或休息期的細胞，然而若是在不理想的環境如培養液中的 pH 值、D-glucose 濃度等，MTT 反應可能因細胞代謝狀況而造成劇烈改變，因此控制細胞接種在 well 的數量，或許是一個減少誤差的方法。

由於 DNA 裂解片斷在過去一度被認為是細胞凋亡現象的主要證據，於本實驗中，雖然只發現絞股藍皂處理的 HA22T/VGH 細胞株，在

藥物濃度 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 6 及 12 小時，和濃度 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 12 小時，在洋菜膠電泳有顯現出 DNA ladder 現象，對 HepG2 細胞株則均未見 DNA ladder 現象，但實驗中發現時間點可能是重要因素，因為在原先實驗選擇培養的時間為 48 和 72 小時，結果均未出現，後來將收細胞的時間提前到 6 及 12 小時才成功出現 DNA ladder 現象，此現象與生長抑制試驗的結果相比較(圖 4.2)，確實見吸光度在絞股藍皂 濃度 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之後急速下降，至於 24 小時以上長時間培養組不見 DNA ladder，可能是 DNA 已完全裂解為小片斷。在相同的藥物濃度與作用時間下，本實驗並未在 HepG2 細胞株發現 DNA ladder，也有 DNA 完全裂解為小片斷的可能性。

從生長周期的影響試驗來看，HepG2 和 HA22T/VGH 兩種細胞株加入絞股藍皂 培養 48 小時後，經 PI 染色及流式細胞儀分析，HepG2 於濃度 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 出現 G1 arrest 現象，而 HA22T/VGH 在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 起就出現 G1 arrest，且在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時的 G0/G1 期的細胞數顯然較少，並出現 sub G0/G1 peak，顯示凋亡的細胞增多，在此亦支持絞股藍皂可能對癌化程度較大的 HA22T/VGH 細胞株，有較強的毒殺作用。

實驗顯示絞股藍總皂 對人類肝癌細胞株有細胞凋亡與毒殺作用，但對正常細胞是否也會產生毒害呢？因為正常人體肝組織取得以及初代肝細胞體外培養困難，曾試圖培養由羊水穿刺分離取出的胚胎皮膚表皮細胞，但都由於細胞生長增殖速度太慢，以致無法進行毒性試驗，於是轉而觀察加入絞股藍總皂 能否減低或增加人體初代周邊淋巴細胞的凋亡及死亡率，以推測對正常細胞組織是否具毒害作用。取標記 CD4 的周邊淋巴細胞做觀察指標進行 Annexin V 染色分析，加入絞股藍皂 培養 24 小時後，與無藥物處理組對照，當絞股藍皂 濃度在 330 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下培養 24 小時，CD4 淋巴細胞數量減少，且由流式細胞儀螢光分析顯示細胞形態亦發生改變，在降低藥物濃度 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下時，加藥組的周邊淋巴細胞有較低的細胞凋亡與死亡率。隨選一組周邊淋巴細胞加入 B 型肝炎疫苗共同培養，此時加藥組並無降低細胞凋亡與死亡率的作用。

由於 HepG2 和 HA22T/VGH 是經馴化可於體外穩定繼代培養的細胞株，而此時 CD4 是初代培養的周邊淋巴細胞，對外界環境異動時的敏感

度較大，因此比較兩者的 ED₅₀ 值並無意義，若是要探討絞股藍總皂 的毒性試驗，可能需觀察長期的動物試驗。

先前發表的報告已證實絞股藍總皂 對肝癌細胞株 HA22T/VGH 和 Hep3B 有促進細胞凋亡的作用⁽⁵⁹⁾，此實驗則探討另一肝癌細胞株 HepG2，以 HA22T/VGH 做正對照，觀察時間增加為給藥後 6、12、24、48 小時，其結果大致相似。

在尋找細胞凋亡相關研究時，發現一些的現象，與傳統中醫學的陰陽學說有異曲同工之妙，細胞凋亡在疾病的角色，以及許多結構相近的調控基因，卻具有相對不同的作用，並且在不同的調節因子存在下產生轉化作用。例如：

(1)細胞凋亡在疾病的角色：癌症、自體免疫疾病(紅斑性狼瘡、免疫性腎小球腎炎)、病毒感染等係因凋亡受抑制；AIDS、神經退行性疾病 (Alzheimer's disease、Parkinson's disease、Retinitis pigmentosa、Cerebellar degeneration)、脊髓退化症候群、缺血性疾病(心肌梗塞、中風)、中毒性肝病等係因凋亡受過度誘發所致⁽²⁾。

(2)p53 的修復作用：原本 p53 被視為能修復細胞 DNA 的保護性基因，當細胞 DNA 受傷害不大時，可激活 WAP1/Cip1/Sdi1 基因產生 p21，使細胞周期停止在 G1，令 GADD45 來修補 DNA。但當 DNA 傷害已超過修復的能力，則下令細胞走向凋亡毀滅⁽³⁾。

(3)C-myc 的作用：被視為原致癌基因，對細胞具有促進增殖及誘導凋亡的雙重作用，其機制與下游目標基因的調控路徑不同，致使細胞走向不同的命運，當生長因子充分時、與 bcl-2 同時存在時則造成細胞增殖；若生長因子被拿掉、沒有其它致癌因子並存時則走向細胞凋亡^(3,11)。

(4)bcl-2 家族的作用：從哺乳動物或其它病毒的細胞中，至少已經發現有 15 個 bcl-2 家族成員，他們的結構上含有一至四個同源區域稱 Bcl-2 homology domains (BH1 to BH4)，但在細胞凋亡的角色上卻分為兩群，促進凋亡的有屬於 bax subfamily 的 bax、bak、bok，以及屬於 BH3 subfamily 的 bik、blk、bid、bad、hrk、bim 等，而抑制凋亡的有 bcl-2、bcl-xL、bcl-w 以及於線蟲 *C. elegans* 發現的 CED-9 和病毒蛋白 BHRF1、LMW5-HLd6ORF16 等⁽⁶⁰⁾。

(5)細胞周期的調控因子：當細胞周期由 G2 進行到 M 期時，需 CDK2 與 cyclin B 結合，但此 cyclin B-CDK2 complex 於 CDK2 的 Thr-161 位置磷酸化時，才真正能活化細胞周期進行，若另一個 Thr-14(或 15)也被磷酸化時，則活性受抑制，細胞周期進行中止⁽⁶¹⁾。又如細胞周期由 G1 進行到 S 期，需 CDK2 與 cyclin E 結合成 cyclin E-CKD2 complex，但若另一個調節蛋白 p21 又與此複合物結合的的話，細胞周期的進行又受到阻滯⁽¹⁴⁾。

其實由中醫的陰陽學說，包括了陰陽的對立制約、陰陽互根互用、陰陽的消長平衡、陰陽的相互轉化，如果生屬陽，死屬陰，細胞凋亡到底要屬陽或屬陰呢？細胞凋亡的角色由陽轉化到陰的過渡階段，生命體須要陰陽平衡，細胞凋亡現象在生命體也必須平衡。

體外實驗中絞股藍總皂 對肝癌細胞株有促進凋亡現象，期待於日後的實驗中，能進一步證實於絞股藍的藥理作用，能幫助人體維持陰陽的動態平衡。

第六章 結論

經由調控細胞本身的基因，使癌細胞自身進行細胞凋亡，是現今研究藥物抗癌作用的重要方向。由電泳出現 DNA 裂解片斷，以及 PI 染色經流式細胞儀分析出現 G1 arrest 和 sub G1 peak，實驗提供證據顯示絞股藍總皂 確實能誘發肝癌細胞株 HA22T/VGH 出現細胞凋亡現象。對 HepG2 則顯示有生長抑制及毒殺作用，且 PI 染色經流式細胞儀分析出現 G1 arrest 和 sub G1 peak。其次對癌化程度較大的 HA22T/VGH 抑制作用較對 HepG2 來得強，依加藥作用時間不同，前者 ED₅₀ 值在 300-350 μ g/mL 之間，後者 ED 值在 350-400 μ g/mL 之間。以人體初代周邊淋巴細胞 CD4 做絞股藍總皂 是否對正常細胞毒害的觀察指標，實驗亦初步證實絞股藍皂 對 CD4 淋巴細胞體外培養有降低細胞凋亡與死亡率的作用，但是否對正常組織細胞有毒害作用，仍宜進一步研究。

參考文獻

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
2. 何康潔：有計劃的細胞凋亡(apoptosis)：其存在、機轉、及與疾病的關係。 *當代醫學*，1996;23(10):785-789。
3. 吳明賢、林肇堂：細胞凋亡與消化系統疾病， *當代醫學*，1996;23(12):49-57，。
4. Dive C, Hickman JA, Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death. *Br J Cancer*. 1991;64:192-196.
5. Goldman AS, Baker MK, Piddington R, Herold R. Inhibition of programmed cell death in mouse embryonic palate in vitro by control and phenytoin receptor involvement and requirement of protein synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1983;174:239-243.
6. 林榮耀:抗癌中藥單離成分對實驗腫瘤細胞生長抑制之分析。 *中醫藥年報*，1997;15(1):1-27.
7. Darzynkiewicz Z, Bruno S, DelBino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Targanos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992; 13:795-808.
8. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death(necrosis). *Cytometry*. 1997;27:1-20.
9. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding C K, Gallant M, Gareau Y, Griffin P R, Labelle M, Lazebnik Y A. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995;376:37-43.

10. Telford WG, King LE, Fraker PJ. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*, 1992;13:137-143.
11. 梁金銅、張金堅：細胞凋亡的特徵、致癌角色、及研究方法。當代醫學，1996；23(11):19-25.
12. Vermes I, Hannen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V, *Journal of Immunological Methods*. 1995; 184:39-51.
13. Imoto M, Tanabe K, Simizu S, Tashiro E, Takada M, Umezawa K. Inhibition of cyclin D1 expression and induction of apoptosis by inostamycin in small cell lung carcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1998; 89(3):315-22.
14. Jaumot M, Estanyol JM, Serratos J, Agell N, Bachs O. Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. *Hepatology*. 1999; 29(2):385-95.
15. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. *Cell*. 1995; 82:349-352.
16. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993;75:641-652.
17. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1991;139:271-279.
18. Tewari M, Quan LT, Orourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a

- mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995; 81:801-809.
19. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 1997; 89:175-84.
 20. Kumar S, Levin MF. The ICE family of cysteine proteases as effector of cell death. *Cell Death Differ*. 1996;3:255-267.
 21. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997; 91(4):443-446.
 22. Vaux DL, Cory S, Adams JM. bcl-2 gene promotes hemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988; 335:440-442.
 23. Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*. 1994;76:665-676.
 24. Cleveland JL, Ihle JN. Contenders in Fas/TNF Death Signaling. *Cell*. 1995; 81:479-482.
 25. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267(5203):1449-56.
 26. 羅錦河：肝癌的對策，健康世界雜誌，一版一刷，台北.1999; p10.
 27. 李岩、王艷紅：肝癌防治錦囊，大作文化，初版，台北. 1999.
 28. 羅錦河：肝癌的對策， p84-85，健康世界雜誌，一版一刷，台北. 1999;pp67-68.
 29. 李岩、王艷紅：肝癌防治錦囊，大作文化，初版，台北，1999.
 30. 李岩、王艷紅：肝癌防治錦囊，p184-188，大作文化，初版，台北，1999; pp73-75.
 31. 陳貴廷、楊思樹主編：實用中西醫結合診斷治療學，中國醫藥科技出版社，一版一刷，北京，1991; pp1390-1396.
 32. 全國中草藥匯編下冊，人民衛生出版社，二版七刷，北京，1996;

- p461-462.
33. 張常勝：絞股藍的藥理及臨床作用研究進展。中醫藥學報，1993；4:52-55.
 34. 葉志文、蔣瑞進：絞股藍性寒質疑。中藥材，1994；17(10)50-51.
 35. 劉聖、陳禮明主編：清熱中藥現代藥理與臨床，安徽科學技術出版社，一版一刷，合肥，1999：p378-383.
 36. 王玉琴：絞股藍總皂 的抗腫瘤作用。中西醫結合雜誌，1988；8(5):286.
 37. 王志浩等：絞股藍對艾氏腹水癌的抑制作用及機理。腫瘤，1990；10(6):246.
 38. 王玉琴：絞股藍能抑制肝癌細胞生長。山東中醫雜誌，1994；13(1):41.
 39. 周曾同等：絞股藍對金鼠頰囊癌變影響的光鏡觀察。中華口腔醫學雜誌，1996；31(5):267.
 40. 周曾同等：複方絞股藍對金地鼠頰囊癌前病變的療效觀察。上海口腔醫學，1996；5(2):74.
 41. 王俊茹等：複方絞股藍湯預防癌症復發轉移的臨床研究。浙江中醫雜誌，1993；28(12):529.
 42. 王劑民等：複方絞股藍湯為主預防癌症手術放療後復發轉移。河北中醫，1997；19(1):22.
 43. 萬振先、汪國寶、劉勇、席仲洪：薄層掃描法測定絞股藍中人蔘二醇的含量。中成藥，1990；12(9):33-34.
 44. 丁樹利、朱兆儀：絞股藍及同屬植物的總皂 測定。中草藥，1992；23(12):627-628.
 45. 林勝豐等：以體外 MTT 化學敏感試驗作為數種抗白血病中藥製劑在人類白血病療效之研究。中醫藥年報，1995；p417-424.
 46. 趙灌中、張吉清、吳香達：靈芝水溶液對婦癌細胞生長之抑制效果。中華民國婦癌醫學雜誌，1998；1:1-4.
43. Gottlieb JA, Guarino AM, Call JB, Preliminary pharmacologic

- and clinical evaluation of camptothecin sodium. *Cancer Chemother Rep.* 1970;54:461-470.
44. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *Journal of Immunology.* , 1994;152(10):5014-5021.
 45. Chiu HL, Kao LH, Wu LH, Chang HM, Lui WY, Prediction of relapse or survival resection in human hepatoma by DNA flow cytometry. *J Clin Invest.* 1992;89:539-545.
 46. Schaeppi U, Fleischman RW, Cooney DA. Toxicity of camptothecin. *Cancer Chemother Rep.* 1974;5:25-36.
 47. 印會河、張伯訥：中醫基礎理論，知音出版社，台北，1993；pp314-318，。
 48. 余素清等：複方絞股藍黃耆湯對提高消化系統癌患者外周血自然殺傷細胞活性實驗研究。河北中醫，1996；18(1):21-22.
 49. 武新華等：藍天湯治療癌性發熱 50 性。山東中醫雜誌，1997；16(10):443-444.
 50. 潘敏求等：絞股藍總皂 減低化療毒副反應 93 例臨床觀察。湖南中醫雜誌，1993；9(2):2-4.
 51. 張素 王明霞：絞股藍皂 的研究與應用。北京中醫學院學報，1991；14(4):46-49.
 52. Jiang, Shunai et al. Apoptosis in Human Hepatoma Cell Lines by Chemotherapeutic Drugs via Fas-dependent and Fas-independent Pathways. *Hepatology.* 1999;29(1):101-110.
 53. 郭國華：以台灣產茄科中藥調控肝細胞腫瘤中 p53 及 Rb 抑癌基因表現與調節修補 DNA 變異之酵素活性及其在抗腫瘤機轉上的研究。中醫藥年報，1997；15(2):259-288.
 54. 簡靜香編譯：分子腫瘤學，藝軒圖書出版社，台北，1996；p184.
 55. Chen JC, Chung JG, Chen LD. Gynenoside induces apoptosis in human Hep3B and HA22T tumour cell. *Cytobios.* , 1999;100:37-48.
 56. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell

Survival. Science. 1998;281:1332-1326.

57. Hasegawa G, Hunter AJ, Charouis AS. Matrix nonenzymatic glycosylation leads to altered cellular phenotype and intracellular tyrosine. J of Biological Chemistry. 1995; 270(7):3278-83.

Induction of apoptosis in cells of hepatocellular carcinoma cell lines by *Gynostemma pentaphyllum*

Pei-Hsiu Hung

Major Professor: JUNG-CHOU CHEN

China Medical College

Eukaryotic cells normally expire through a natural process called apoptosis. This process is crucial for individuals to maintain their development and homeostasis by eliminating damaged, aged or unwanted cells. *Gynostemma pentaphyllum* is a Chinese medical herb possessing anti-tumor effects as it helps to restore the body's overall balance, to enhance physiological performance, and has detoxification and antioxidant qualities. The active compounds present in the extract of *Gynostemma pentaphyllum* was found to be gypenosides which has wide range of actions and may help to promote liver functions and inhibit tumor growth. Gypenosides are therefore often included in medications for treating liver cancers. In this study, gypenosides were tested to induce apoptosis in cells of several hepatocellular carcinoma cell lines, and on other hand to protect the primary culture of human peripheral lymphocytes from apoptosis and cell death.

Two hepatocellular carcinoma cell lines, HepG2 which is well differentiated, and HA22T/VGH, which was poorly differentiated, were cultured. After the addition of different concentrations of gypenosides, the cultures were incubated further for various periods of time. Induction of apoptosis was manifested by cytotoxicity in MTT tests, DNA fragmentation after electrophoresis and cell cycle arrest in flow cytometry analysis. For the evaluation of apoptosis and death rate of peripheral CD4 lymphocytes, primary culture was derived from blood specimen of a hepatitis B carrier. Subsequent to the administration of gypenosides, Annexin V analysis was performed 24 hours later.

Our results indicated that gypenosides inhibited cell growth of both HepG2 and HA22T/VGH, and G1 arrest was demonstrated in these cells. Electrophoresis of isolated genomic DNA showed extensive fragmentation as compared to controls. In vitro lymphocyte culture revealed that the cell death of CD4 cells was lower in gypenosides group, while no protection effect of gypenosides was observed in the group which hepatitis B surface antigen was also present. In summary, evidences provided by this study support the hypothesis that *Gynostemma pentaphyllum* may induce apoptosis in cells of hepatocellular carcinoma cell lines, HepG2 and HA22T/VGH, and does not seem to be harmful to peripheral CD4 lymphocytes when cells are cultured in vitro.