

中國醫藥學院醫學研究所碩士論文

以 AP-1 為標的開發抗肝細胞轉形藥物

Development of the Anti-hepatocellular Transformation
Compound by Using Activator Protein 1 as the Target



指導教授：項千芸 博士
侯庭鏞 博士

研究生：吳泰賢

中華民國九十一年七月

中國醫藥學院醫學研究所
碩士候選人學位考試

論文題目

以 AP-1 為標的開發抗肝細胞轉形藥物

Development of the Anti-hepatocellular Transformation
Compound by Using Activator Protein 1 as the Target

本論文係 吳泰賢 於中國醫藥學院醫學研究所完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

考試委員

所長：

中華民國 九十一年 月 日

誌謝

感謝指導教授項千芸老師及共同指導教授侯庭鏞老師在實驗上及生活上對我的教誨，讓我不只在實驗上受益良多，瞭解到在面對實驗時所應秉持的態度和精神。並感謝口試委員吳世祿老師、林永昌老師及黃蘭如老師對本論文辛勞審查，惠與寶貴意見及指正，使此論文得以更為完善。

研究期間並蒙鐘景光老師、吳禮字老師、劉昭君老師、方世華老師、陳方周老師、李意旻老師、林靜瑩老師及所裡諸位老師之關懷指導，受益匪淺，在此由衷的感謝。

研究期間並受到賴羿如學姊、莊曜禎學長、翁賜信學長、吳志忠學長、趙德澂學長、彭彥鈞醫師、何永鑽醫師、李昌誠醫師、劉旭然學長、福良學弟、嘉穗學妹、欣怡學妹、家男學弟、獻岳學弟、欣裕學弟、佳橙學弟在實驗工作上的協助與生活上的關心。以及同窗好友美溶、彥文、宗晃、怡叡、靜雯、裕聰、涵惠、鄭元凱醫師、楊美都醫師、陳呈旭醫師在這兩年的相互扶持與砥礪，讓我成長許多，心中仍有不捨之情。

最後要感謝我的家人，由於他們的鼓勵與支持使得學業得以順利進行，願將一切結果獻與他們。

泰賢 謹誌

中文摘要

Activator protein 1 (AP-1)為一種轉錄因子，可調控細胞的分裂、分化及轉形，而阻斷 AP-1 的活性也可抑制細胞的轉形，因此本研究主要就以 AP-1 為標的開發抗肝細胞轉形藥物。實驗是先利用經 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 處理的 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 重組細胞為材料，偵測 98 種中藥對細胞 AP-1 活性的影響。再從中篩選出抑制 AP-1 效果最好的 10 種中藥，分別是麻黃、吳茱萸、厚朴、大黃、檳榔、防己、知母、皂莢、苦參、甘草。進一步測試這 10 種中藥在抑制 AP-1 活性、細胞毒殺效應及肝細胞轉形的能力，其中對吳茱萸的甲醇萃取物、酸性乙醇及乙醇萃取物效果最佳，而且這些效應呈現劑量反應。因此由本研究的結果顯示，藉由中藥對 AP-1 活性的影響，可快速篩選出具有抗肝細胞轉形潛能的中藥，而本研究所篩選出的吳茱萸，在體外試驗中皆呈現明顯的抗肝細胞轉形效應，因此值得進一步利用動物試驗驗證其治療肝癌的效果。

目 錄

	頁數
中文摘要.....	1
目錄.....	2
表目錄.....	3
圖目錄.....	4
第一章、 文獻探討.....	5
第二章、 材料與方法.....	12
第三章、 結果(含圖表).....	15
第四章、 討論.....	31
參考文獻.....	34
附表.....	38
英文摘要.....	39
作者簡歷.....	40
著作權聲明.....	41

表目錄

	頁數
表一、Jun 和 Fos 的缺損或增加與體組織之間的相互關係.....	8
表二、本研究所使用中藥之基本資料，分別列出中藥名、藥物 英文學名及分類(科).....	21
表三、10 味中藥的 EC_{50} 、 TC_{50} 及 SI.....	23
表四、吳茱萸 5 種溶劑萃取物的 EC_{50} 、 TC_{50} 及 SI.....	24

圖目錄

	頁數
圖一、組成 AP-1 的蛋白質.....	9
圖二、AP-1 與細胞週期之間的關係.....	10
圖三、AP-1 與腫瘤發生之間的複合性調控關係.....	11
圖四、98 種中藥影響由 TPA 所誘發 Chang/AP-1 細胞之 AP-1 活性。.....	25
圖五、藥物影響由 TPA 誘發之 AP-1 活性及細胞的劑量反應...	26
圖六、中藥影響由 TPA 所誘發之 Chang/AP-1 細胞轉形	27
圖七、不同來源或批號之吳茱萸的特性分析.....	28
圖八、吳茱萸 5 種溶劑萃取之萃取物影響由 TPA 所誘發 AP-1 的活性.....	29
圖九、吳茱萸影響由 TPA 所誘發之 Chang/AP-1 細胞轉形.....	30

第一章、文獻探討(Introduction)

肝癌是人類的重要疾病之一，同時也是一個嚴重的全球公共衛生問題。1990 年的報告指出，全世界的惡性腫瘤排名中，肝癌位居第五名，每年約增加 43 萬個新病例(Bosch *et al.*, 1999)。在國內，2001 年國人因肝癌死亡的人口數為 6415 人，其每十萬人口死亡率為 28.71，位居癌症死因第二位(行政院衛生署)。而 2001 年惡性腫瘤續居十大死因之首(行政院衛生署)，總死亡人數 32993 人，由此可知肝癌實為我國的國病之一。肝癌的治療上最有效的方法便是在肝癌早期細胞還未擴散出去之前，進行肝臟移植手術(Mazzaferro *et al.*, 1996)，但是手術後病人 5 年的存活率只有 2% (Kew *et al.*, 1998),除此之外並沒有更好的治療方式或藥物可供選擇。

Activator protein 1(AP-1)為一種轉錄因子，在 1987 年前即被定義出來(Angel *et al.*, 1987)。受 AP-1 所調控的基因，其啟動區具有 AP-1 的結合序列 5'-TGAG/CTCA-3'，因為這個序列也可以被腫瘤促進劑 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)所活化，因此也稱為 TPA responsive element (TRE) (Angel *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987; Paul and Hecker, 1969)。AP-1 是由 Jun 蛋白質家族(c-Jun, JunB, and JunD)及 Fos 蛋白質家族(c-Fos, FosB, Fra1, Fra2)所組成，其相互間組合成 bZIP 的同形二聚體(homodimer)或異形二聚體(heterodimer)(圖一)(Angel *et al.*, 1987, 1988a; Curran and Franza, 1988; Halazonetis *et al.*, 1988; Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Hirai and Yaniv, 1989)。這些組成 AP-1 的蛋白質皆為含有“leucine zipper”結構的 DNA 結合蛋白(Landschulz *et al.*, 1988)。

許多報告指出 AP-1 會對細胞週期產生調控作用，藉由 Jun 蛋白質或 Fos 蛋白質的增加來促進或抑制細胞週期的進行(圖二)(Angel

and Karin, 1991; Kovary and Bravo, 1991; Lallemand *et al.*, 1997)。在細胞及動物實驗中也顯示被 TPA 生長因子及致癌病毒等所活化的 AP-1 會傳遞細胞轉形的訊息,造成 tumor promotion 和 tumor progression(圖三)(Angel and Karin, 1991; Bernstein and Colburn, 1989; Dong *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; Domann *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1997)。若將 Jun 蛋白質家族或 Fos 蛋白質家族造成缺損或者是增加其量,會造成骨組織、肝臟、心臟及免疫系統的破壞或是腫瘤的發生(表一)(Wang *et al.*, 1992; Grigoriadis *et al.*, 1993; Hilberg *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1999)。

過去對 AP-1 造成細胞轉形的研究,大多將注意力集中在探討 AP-1 對皮膚癌細胞及神經細胞的影響 (Bernstein and Colburn, 1989; Johnson *et al.*, 1992; Carboni *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1996)。至於 AP-1 在肝細胞轉形所扮演的功能,先前實驗室的結果顯示,TPA 透過活化 extracellular signal-regulated kinases (ERKs)的訊息傳導路徑,使得 AP-1 與 DNA 之結合力上升,因而活化 AP-1 活性,而 AP-1 活性持續上升的結果,即造成肝細胞轉形,但如果加入 AP-1 抑制劑,細胞轉形就會被抑制(賴, 2001)。因此這個結果也暗示 AP-1 似乎可以作為搜尋抗肝細胞轉形藥物的標的。

許多植物的萃取物或結構化學的衍生物被認為可以干擾致癌物質的致癌過程(Bode *et al.*, 2001; Hsiang *et al.*, 2002),包括對培養中的腫瘤細胞產生毒殺作用 (Baek *et al.*, 1996; Kubo *et al.*, 1992; Matsunaga *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1998),或者透過引起細胞凋亡而抑制腫瘤細胞的生長及不正常增生 (Wakabayashi *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1997)。這些常用植物包括薑(Bode *et al.*, 2001)、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)(Hsiang *et al.*, 2002)、人參(*Panax ginseng*)(Yun *et al.*, 2001)等。但是中草藥的萃取物對抗細胞轉形的研究至今並不十分

詳細，特別是在中草藥對抗肝細胞轉形方面。因此本論文即在探討利用大規模搜尋 98 種中藥對 AP-1 活性的影響，選出具有抗肝細胞轉形潛力的中藥，進一步了解這些中藥作用的分子機制。

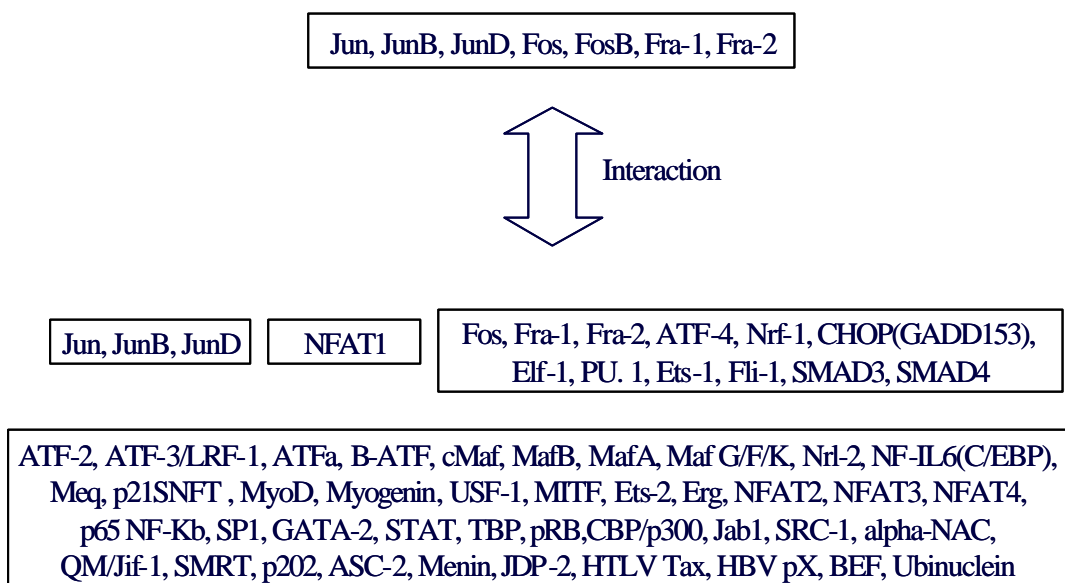
表一、 Jun 和 Fos 的缺損或增加與體組織之間的相互關係 (摘錄自 Jochum *et al.*, 2001)

(A) 缺乏 Jun/Fos 蛋白質家族對組織所造成的影響。

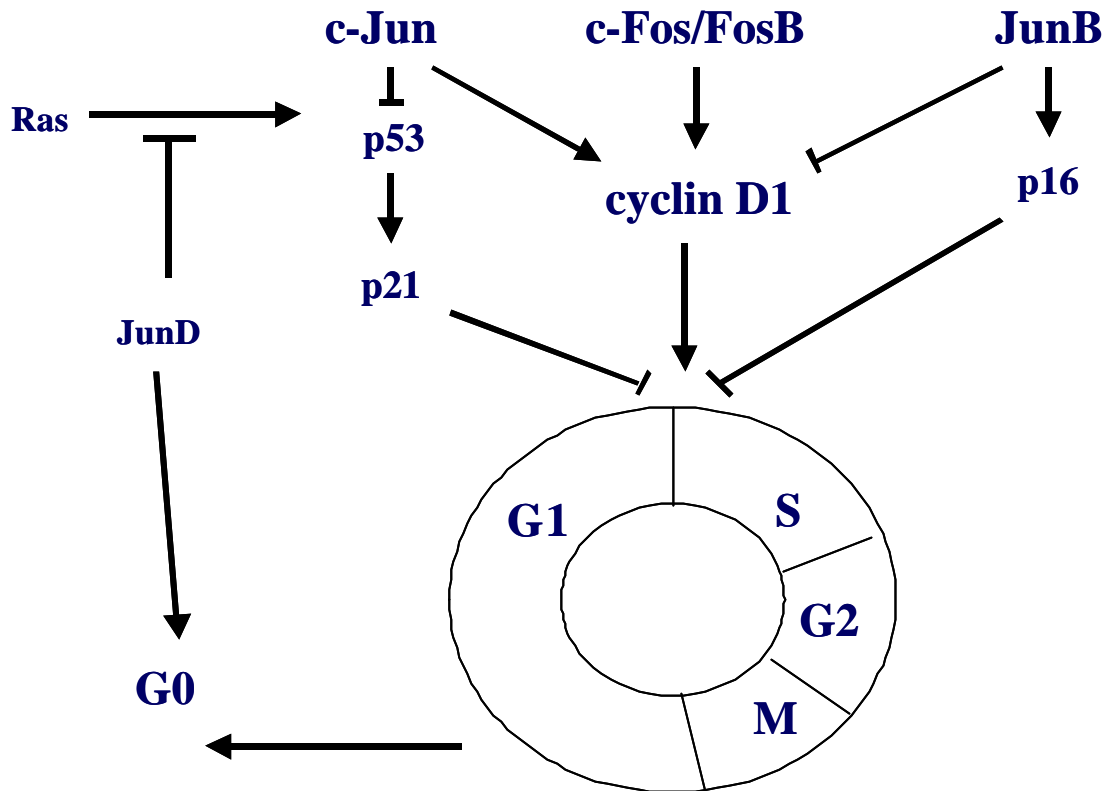
	Phenotype(s)	Affected organ(s)/cell type(s)
c-Fos	Osteopetrosis	Bone /osteoclasts
FosB	Nurturing defect	Brain/hypothalamus
Fra-1	Embryonic lethality	Extra-embryonic tissue/yolk, sac
Fra-2	Not reported	Placenta/labyrinth layer
c-Jun	Embryonic lethality	Liver/hepatoblasts Heart/outflow tract
JunB	Embryonic lethality	Extra-embryonic tissue/giant trophoblast, yolk sac Placenta/labyrinth layer
JunD	Male sterility	Testis/sepermatogenesis

(B) 過量表現 Jun/Fos 蛋白質家族對組織所造成的影響。

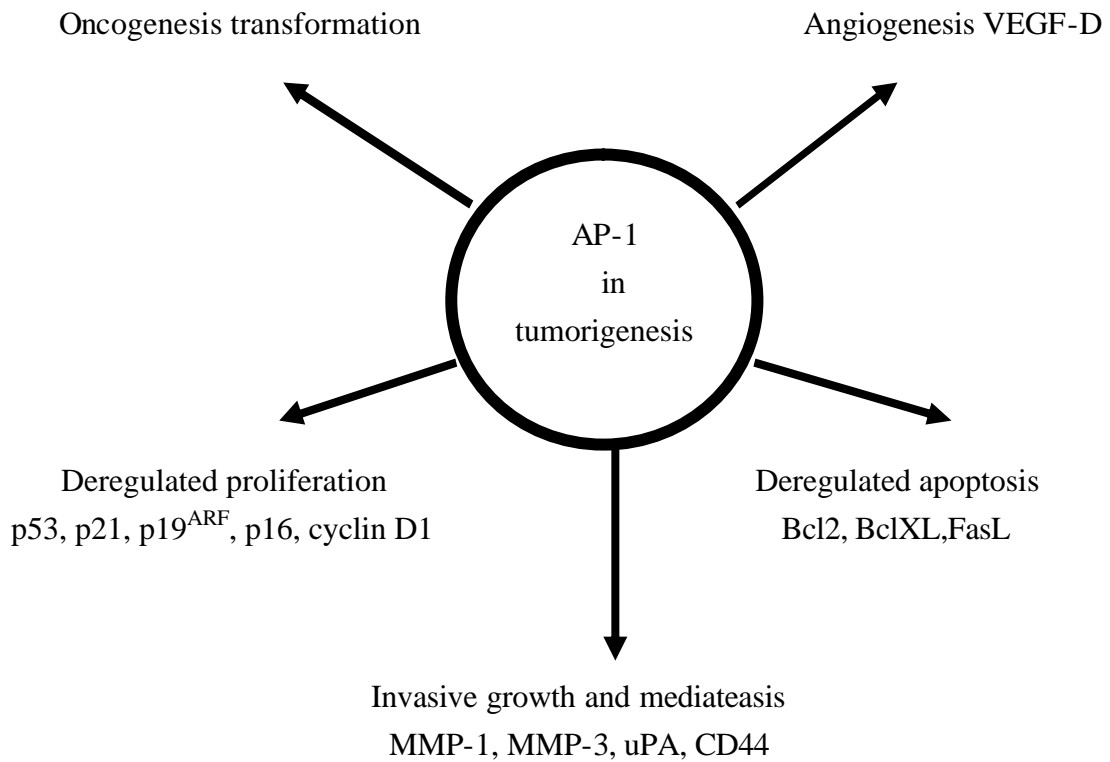
	Promoter(s)	Phenotype(s)	Affected organ(s)/cell types
c-Fos	H2k^b	Osteosarcoma	Bone /osteoclasts
FosB	H2k^b	None	
FosB	TCRb	Impaired T cell differentiation	Thymus/immature thymocytes
	NSE	Osteosclerosis	Bone /osteoclasts
Fra-1	H2k^b	Osteosclerosis	Bone /osteoclasts
Fra-2	CMV	Ocular malformations	Eye/anterior eye structures
c-Jun	H2k^b	None	
JunB	Ubiquitin C	None	
	CD4	Enhanced Th2 maturation	Thymus/CD4/ thymocytes
JunD	Not reported		



圖一、組合成 AP-1 的蛋白質(修改自 Yurii and Tom, 2001)



圖二、AP-1 與細胞週期之間的關係 (摘錄自 Jochum *et al.*, 2001)。AP-1 蛋白質透過調控細胞週期的關鍵性標的促進細胞週期的推進。這些關鍵性標的有 c-Fos、FosB 及 c-Jun 透過誘發 cyclin D1 表現及 c-Jun 壓抑 p53 基因以減少 p21 基因量促進細胞週期推進。反之 JunB 藉由誘發 p16 基因及抑制 cyclin D1 的表現壓抑細胞週期的推進。JunD 則是藉調控 Ras/p53 路徑來促使細胞進入休眠狀態。



圖三、AP-1 與腫瘤發生之間的複合性調控關係 (摘錄自 Jochum *et al.*, 2001)。
AP-1 透過調控某些關鍵性基因的表現，包括致癌基因的轉形、細胞增生、細胞凋亡、侵入性生長及血管新生的方式來促進腫瘤生成。

第二章、材料與方法(Materials & Methods)

中藥萃取

本論文所用的 98 種中藥材分讓自順天堂公司(表二)，中藥的甲醇萃取過程如下：將中藥 3 公克加入 10 毫升的甲醇中，在室溫中萃取 24 小時，再經-30 冷凍解凍一次，取得中藥甲醇萃取物後，烘乾並測量其溶質乾重。吳茱萸 4 種溶劑萃取過程如下：(1)沸水萃取物，將水 10 毫升加熱至 60 ，10 分鐘後再加入中藥 3 公克，置於室溫中萃取 24 小時，-30 冷凍解凍一次，取得中藥水萃取物(2)酸性乙醇萃取物、(3)水萃取物、(4)乙醇萃取物等，如同甲醇萃取物方式萃取。

細胞培養

本論文所用的肝細胞為 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 重組細胞株，這兩株細胞分別為含有 AP-1 結合序列/報導基因(luciferase)的 Chang liver 及 HepG2 細胞(賴，2001)，因此可藉由測定 luciferase 的活性，評估 AP-1 的活性。重組細胞主要培養在含有 10%胎牛血清(HyClone[®])的 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(Life Technologies)中。

AP-1 活性分析

將 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 重組細胞培養在 96 孔培養盤，於 37 °C、5% CO₂ 培養箱培養 24 小時，然後將培養基中 10% 胎牛血清改以 0.1% 培養 24 小時，以中藥萃取物及腫瘤促進劑 TPA(20 ng/ml)(Sigma[®])刺激 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 重組細胞，再檢測細胞中 luciferase 的活性，以獲得細胞中 AP-1 的活性。Luciferase 活性的測定參照 Luciferase Assay System(Promega[®])之步驟，取得細胞萃取物後，以 FB15 luminometer 測量，其結果以 relative light unit(RLU) 來表示。

細胞存活率試驗

將細胞培養在 96 孔培養盤中置於 37 °C、5% CO₂ 培養箱中 24 小時，加入中藥刺激，再分別加入 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)染料及 0.1% SDS-HCl，最後利用 570 nm 波長偵測吸光值量的變化，若是吸光度愈高，表示細胞活性愈佳，反之則表示細胞活性愈低。

Anchorage-independent transformation assay(soft agar)

將 Chang/AP-1 或 HepG2/AP-1 重組細胞(1×10^4) 懸浮在 1 ml (35 mm petri dish)含有 TPA(20 ng/ml)及中藥甲醇萃取物的 0.4% Bacto

agar(Difco[®])的細胞生長培養基中，其中含 10%胎牛血清，最後將這細胞層覆蓋在含 0.6 % agar 的 2 ml 細胞生長培養基上，將細胞培養在 37 °C、5% CO₂ 培養箱中 21 天後，利用 50 ng/ml 的 2,3,5-triphenyl-5-iodonitroetrazolium violet (INT)(Sigma[®]) 染色 24 小時，最後拍照並以電腦影像分析計數細胞群(colony)。

第三章、結果(Results)

中藥對由 TPA 所誘發 AP-1 活性之影響

為了探討中藥是否會對 TPA 所誘發的 AP-1 產生調控的作用,我們從順天堂公司取得了 98 種中藥,並用甲醇進行萃取。之後將 98 種中藥與 20 ng/ml 的 TPA 混合,同時加入 Chang/AP-1 細胞培養液中處理 16 小時後,測其 luciferase 活性。由圖四(A) 結果顯示,部分中藥的確可以在 Chang/AP-1 細胞中調控經 TPA 所誘發的 AP-1 活性。在活化 AP-1 活性方面以射干的活化程度最明顯,其對 AP-1 的活化倍率高於 200%。相反的,在抑制 AP-1 活性方面,以皂莢的作用最明顯,其可將 AP-1 的活性降低至與背景值相同。另外可以抑制由 TPA 所誘發的 AP-1 活性達 50% 以上的藥物有,麻黃、防己、吳茱萸、知母、厚朴、紫草、大黃、苦參、檳榔與甘草。因此這部分實驗確實發現部分中藥可以調控在 Chang/AP-1 細胞中由 TPA 所誘發的 AP-1 活性。

為了了解這些中藥是否在其他肝細胞株中,也具有調節 AP-1 的活性,因此我們利用 HepG2/AP-1 細胞進行測試,在經過與 Chang/AP-1 細胞相同處理之後,測其 luciferase 活性。由圖四(B) 結果顯示,部分中藥的確可以在 HepG2/AP-1 細胞中調控經 TPA 所誘發的 AP-1 活性,以桑白皮、射干、黃芩三者的活化程度最明顯,其對 AP-1 的活

化倍率高於 300%，相反的在抑制 AP-1 活性方面，以皂莢、苦參、檳榔最為顯著，可將 AP-1 的活性降低至與背景值相同。進一步我們選擇在 HepG2/AP-1 細胞中具有抑制 AP-1 活性的十味中藥，分別為吳茱萸、天花粉、赤芍藥、烏梅、皂莢、大黃、青蒿、苦參、黃蓮、黃柏做探討比較。

中藥影響由 TPA 所誘發的 AP-1 活性及細胞活性之劑量反應

我們將在 Chang/AP-1 及 HepG2/AP1 細胞中抑制 AP-1 活性排名前十名的中藥，分別為麻黃(*Ephedra sinica*)、吳茱萸(*Evodia rutaecarpa*)、厚朴(*Magnolia officinallis*)、大黃(*Rheum officinale*)、檳榔(*Arcea catechu*)、防己(*Stephanica tetrandra*)、知母(*Anemarrhena asphodeloids*)、皂莢(*Gleditsia sinensis*)、苦參(*Sophora flavescens*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)作進一步的分析。將 10 種中藥的六種藥物濃度 10、20、30、40、50、100 μ g/ml，加入以 20 ng/ml TPA 處理的 Chang/AP-1 細胞中，培養 16 小時後，測量其 luciferase 活性(圖五)。另外，為了了解這些藥物影響 AP-1 的活性是否是細胞毒殺效應，我們將藥物濃度為 1Q 2Q 3Q 4Q 5Q 10Q 300 μ g/ml，加入 Chang/AP-1 細胞，培養 16 小時，再以 MTT 分析法，測量藥物對細胞的毒殺效應(圖五)。結果顯示 10 種中藥在對 AP-1 活性之影響除了知母(圖五-G)

較緩和之外，其餘隨著藥物濃度增加皆有很明顯的 AP-1 抑制作用。在細胞毒性試驗中，隨著 10 種中藥濃度的增加，細胞的存活率卻也隨之上升，表示藥物在適當濃度下對細胞不但沒有毒殺性，反而還有促進增生的作用。另外從圖五也可以觀察出，在較低藥物濃度時，對 AP-1 活性有較好之抑制效果的藥物為厚朴(圖五-C)和防己(圖五-F)。

從上一個實驗所得到十種中藥對 AP-1 活性及對細胞存活率的影響結果，可以分別計算出每種藥物在 Chang/AP-1 細胞中抑制由 TPA 所誘發 AP-1 活性達一半時，所需的藥物濃度，即是 50% Effective inhibitory concentration (EC_{50})。十種中藥 EC_{50} 由大到小依序排名為大黃、吳茱萸、麻黃、檳榔、苦參、防己、甘草、厚朴、皂莢，其中知母無法計算出來(表三)。在藥物存在下，細胞致死量達一半時所需的藥物濃度，即是 50% Toxicity concentration (TC_{50})，從表中可以看到十味中藥裡有六味中藥的 TC_{50} 大於 300 μ g/ml，分別為麻黃、吳茱萸、知母、厚朴、大黃、檳榔。其餘的中藥， TC_{50} 由大到小依序排列為苦參、甘草、防己、皂莢。將 TC_{50} 除以 EC_{50} 所得到的結果以 Selective index (SI) 表示，SI 數值越大，表示藥物在可以抑制癌細胞的濃度下，其他細胞並不會被藥物殺死，換句話說就是藥物的副作用越低。從表三中可以看到在十味中藥裡面，SI 由大到小依序為厚朴、甘草、檳榔、麻黃、苦參、防己、吳茱萸、大黃、皂莢，另外知母則無法計算出來。

中藥對 TPA 所誘發肝細胞轉形之影響

為了了解上述具抑制 AP-1 活性的中藥是否具有抑制肝細胞轉形的能力，我們利用 anchorage-independent transformation assay 進行測試。將 Chang/AP-1 細胞培養在 2 毫升含有 20 ng/ml TPA 0.4% agar 中，再加入九種藥物的 EC₅₀ 濃度作為治療濃度(麻黃 54.2 μg/ml、防己 9.7 μg/ml、吳茱萸 28.6 μg/ml、厚朴 27.3 μg/ml、皂莢 57.2 μg/ml、大黃 47.9 μg/ml、苦參 30.1 μg/ml、檳榔 45.4 μg/ml、甘草 39.8 μg/ml)，持續培養 21 天後，以 INT 染色 24 小時後拍照，結果如圖六顯示。具有抑制 Chang/AP-1 細胞轉形的藥物有防己(圖六-D)及吳茱萸(圖六-E)，其他藥物雖然也有抑制的傾向，但相對於對照組並不明顯。

吳茱萸(*Evodia rutaecarpa*)不同批號對 TPA 所誘發 AP-1 活性的影響

經過不同細胞株(Chang/AP-1 與 HepG2/AP-1)的 AP-1 活性試驗及 Chang/AP-1 的細胞轉形試驗後，我們進一步選擇吳茱萸來分析。首先分析不同來源的吳茱萸是否對 AP-1 具有相同的抑制作用，圖七(A)顯示三種不同市售來源的吳茱萸在外觀上的差異，順天堂提供的吳茱萸只有吳茱萸果實，而欣隆所提供的除了吳茱萸果實以外，還包括了一部份的莖。圖七(B)則顯示三種不同市售來源的吳茱萸在

Chang/AP-1 細胞抑制 TPA 誘發 AP-1 活性的比率差異，結果顯示，順天堂編號 287 和欣隆編號 507 的吳茱萸從低濃度到高濃度皆有相同的 AP-1 抑制效果，欣隆編號 507 的中藥則對 AP-1 的抑制效果並不顯著

吳茱萸(*Evodia rutaecarpa*)五種溶劑萃取物對 TPA 所誘發 AP-1 活性的影響

為了探究哪一類成分負責吳茱萸抑制 AP-1 活性的能力，我們將吳茱萸利用 5 種不同溶媒(酸性乙醇、乙醇、甲醇、水、沸水)進而萃取之後，分別將 6 種濃度 0.2、1、5、25、125、625 $\mu\text{g/ml}$ 的吳茱萸 5 種溶劑萃取物加入含 20 ng/ml TPA 的 Chang/AP-1 細胞中，培養 16 小時後，測量其 luciferase 活性。另外分別將上述五種濃度之藥物加入 Chang/AP-1 細胞，培養 16 小時再以 MTT 分析法，測量藥物對細胞的毒殺效應。圖八顯示吳茱萸的水及熱水萃取物，對 AP-1 的活性並沒有明顯的抑制作用，而吳茱萸的甲醇萃取物、酸性乙醇萃取物和乙醇萃取物皆對 AP-1 有明顯的抑制作用。在藥物對細胞的毒殺效應的結果可以發現吳茱萸的水及熱水萃取物對細胞沒有明顯的毒殺效應，而在甲醇、酸性乙醇及乙醇萃取物則更精準的測量出在 125 $\mu\text{g/ml}$ 藥物濃度則對細胞有明顯的毒殺效應。

吳茱萸甲醇萃取物對 TPA 所誘發肝細胞轉形之劑量反應

同樣利用 anchorage-independent transformation assay 的方式，將 Chang/AP-1 細胞培養在 2 毫升含有 20 ng/ml TPA 的 0.4% Soft agar 中，並加入 6 種不同濃度 0.2、1、5、25、125、625 μ g/ml 的吳茱萸甲醇萃取物，持續培養 21 天後，利用 INT 染色 24 小時後拍照。圖九 顯示隨著吳茱萸濃度的增加，細胞團塊 (colony) 的大小和數量也隨之減少。

表二、本研究所使用中藥之基本資料，分別列出中藥名、藥物英文學名及分類(科)

編號	中藥名	學名	分類
1	麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Sttappf	麻黃科(<i>Ephedraceae</i>)
2	柴胡	<i>Bupleurum chinense</i> DC.	繖形科(<i>Umbelliferae</i>)
3	木通	<i>Clematis montana</i> Buch.-Ham. ; <i>C. argenticulida</i> W.T. Wang	馬兜鈴科(<i>Aristolochiaceae</i>)
4	豬苓	<i>Polyporus umbellatus</i> (Pers) Fries	多孔菌科(<i>Polyporaceae</i>)
5	秦艽	<i>Gentiana macrophylla</i> Pall.	龍膽科(<i>Gentianaceae</i>)
6	白芷	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. <i>formosana</i> (Boiss.) Shan et Yuan	繖形科(<i>Umbelliferae</i>)
7	防己	<i>Stephanica tetrandra</i> S. Moore	防己科(<i>Menispermaceae</i>)
8	乾薑	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	薑科(<i>Zingiberaceae</i>)
9	吳茱萸	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. <i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. Var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	芸香科(<i>Rutaceae</i>)
10	石膏	<i>Gypsum Fibrosum</i>	礦物(Mineral)
11	知母	<i>Anemarrhena asphodeloids</i> Bge.	百合科(<i>Liliaceae</i>)
12	山梔子	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	茜草科(<i>Rubiaceae</i>)
13	桑白皮	<i>Morus alba</i> L.	桑科(<i>Moraceae</i>)
14	玄參	<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl.	玄參科(<i>Scrophulariaceae</i>)
15	百合	<i>Lilium lancifolium</i> Thunb. ; <i>L. brownii</i> F. E Brown var. <i>viridulum</i> Baker ; <i>L. pumilum</i> DC.	百合科(<i>Liliaceae</i>)
16	杏仁	<i>Prunus armeniaca</i> L. ; <i>Prunus armeniaca</i> L. var. <i>ansu</i> Maxim.	薔薇科(<i>Rosaceae</i>)
17	貝母	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miq.	百合科(<i>Liliaceae</i>)
18	天花粉	<i>Trichosanthes. Kirilowii</i> Maxim. ; <i>T. rosthornii</i> Herms	栝樓科(<i>Trichosanthes</i>)
19	紫苑	<i>Aster tataricus</i> L. f.	菊科(<i>Compositae</i>)
20	厚樸	<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wils. ; <i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wils. var. <i>biloba</i> Rehd. et Wils.	木蘭科(<i>Magnoliaceae</i>)
21	枳實	<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.	芸香科(<i>Rutaceae</i>)
22	赤芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	牡丹科(<i>Paeoniaceae</i>)
23	桃仁	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	薔薇科(<i>Rosaceae</i>)
24	澤蘭	<i>Lycopus lucidus</i> Turcz. var. <i>hirtus</i> Regel	唇形科(<i>Labiatae</i>)
25	當歸	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels	繖形科(<i>Umbelliferae</i>)
26	川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	繖形科(<i>Umbelliferae</i>)
27	白殭蠶	被 <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vaillant 感染致死之家蠶的乾燥蟲體	動物(animal)
28	山茱萸	<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.	山茱萸科(<i>Cornaceae</i>)
29	萹薺	<i>Dioscorea hypoglauca</i> Palibin	薯蕷科(<i>Dioscoreaceae</i>)
30	蒿本	<i>Ligusticum sinense</i> Oliv.	繖形科(<i>Umbelliferae</i>)
31	蒼耳子	<i>Xanthium sibiricum</i> Patr.	菊科(<i>Compositae</i>)
32	白茅根	<i>Imperata cylindrica</i> Beauv. Var. <i>major</i> (Nees) C. E. Hubb.	禾本科(<i>Gramineae</i>)
33	紫草	<i>Arnebia euchroma</i> (Royle) Johnst.	紫草科(<i>Boraginaceae</i>)
34	款冬花	<i>Tussilago farfara</i> L.	菊科(<i>Compositae</i>)
35	薤白	<i>Allium macrostemon</i> Bunge.	百合科(<i>Liliaceae</i>)
36	白芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	牡丹科(<i>Paeoniaceae</i>)
37	淫羊藿	<i>Epimedium brevicornum</i> Maxim. ; <i>E. sagittatum</i> (Sieb. et Zucc.) Maxim.	小蘗科(<i>Berberidaceae</i>)
38	狗脊	<i>Cibotium barometz</i> (L.) J.Sm.	蚌殼蕨科(<i>Dicksoniaceae</i>)
39	烏梅	<i>Prunus mume</i> (Sieb.) Sieb. et Zucc.	薔薇科(<i>Rosaceae</i>)
40	白鮮皮	<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz.	芸香科(<i>Rutaceae</i>)
41	龍眼肉	<i>Euphoria longana</i> Lam.	無患子科(<i>Sapindaceae</i>)
42	合歡皮	<i>Albizia julibrissin</i> Durazz.	豆科(<i>Leguminosae</i>)
43	海蛤	<i>Meretrix meretrix</i> L.	豆科(<i>Leguminosae</i>)
44	蟬蛻	<i>Cryptotympana pustulata</i> Fabricius	動物(animal)
45	射干	<i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC.	鳶尾科(<i>Iridaceae</i>)
46	桔梗	<i>Platycodon grandiflora</i> (Jacq.) A. DC.	桔梗科(<i>Campanulaceae</i>)

(續)

47	半夏	<i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breit.	天南星科(Araceae)
48	天南星	<i>Arisaema erubescens</i> (Wall.) Schott. ; <i>A. heterophyllum</i> Bl. ; <i>A. amurense</i> Maxim.	天南星科(Araceae)
49	旋覆花	<i>Inula japonica</i> Thunb.	菊科(Compositae)
50	篇蓄	<i>Polygonum aviculare</i> L.	蓼科(Polygonaceae)
51	釧附子	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx.	毛茛科(Ranunculaceae)
52	白芨	<i>Beletilla striata</i> (Thunb.) Reichb. f.	蓼科(Polygonaceae)
53	皂莢	<i>Gleditsia sinensis</i> Lam.	豆科(Leguminosae)
54	薄荷	<i>Mentha haplocalyx</i> Briq.	脣形科(Labiatae)
55	土茯苓	<i>Smilax glabra</i> Roxb.	百合科(Liliaceae)
56	板藍根	<i>Isatis indigotica</i> Fort.	十字花科(Cruciferae)
57	蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	茜草科(Rubiaceae)
58	半枝蓮	<i>Scutellaria barbata</i> D. Don	脣形科(Labiatae)
59	蒲公英	<i>Taraxacum mongolicum</i> Hand.-Mazz.	菊科(Compositae)
60	海藻	<i>Sargassum pallidum</i> (Turn) C. Ag.	馬尾藻科
61	大青葉	<i>Baphicacanthus cusia</i> (Nees) Bremek.	十字花科(Cruciferae)
62	龍膽草	<i>Gentiana rigescens</i> Franch.	龍膽科(Gentianaceae)
63	大黃	<i>Rheum officinale</i> Baill.	蓼科(Polyporaceae)
64	白頭翁	<i>Pulsatilla chinensis</i> (Bge.) Regel	木犀科(Oleaceae)
65	連翹	<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb) Vahl	木犀科(Oleaceae)
66	青蒿	<i>Artemisia annua</i> L.	菊科(Compositae)
67	苦參	<i>Sophora flavescens</i> Ait.	豆科(Leguminosae)
68	敗醬草	<i>Thlaspi arvensis</i> L.	敗醬草科(Valerianaceae)
69	魚腥草	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	三白草科(Saururaceae)
70	金銀花	<i>Lonicera japonica</i> Thunb	忍冬科(Caprifoliaceae)
71	荊芥	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	脣形科(Labiatae)
72	升麻	<i>Cimicifuga dahurica</i> (Turcz.) Maxim.	毛茛科(Ranunculaceae)
73	葛根	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	豆科(Leguminosae)
74	檳榔	<i>Arcea catechu</i> L.	棕櫚科(Palmae)
75	牡丹皮	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.	牡丹科(Paeoniaceae)
78	黃蓮	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	毛茛科(Ranunculaceae)
79	黃柏	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	芸香科(Rutaceae)
80	黃芩	<i>Scutellaria baicalensts</i> Georgi	脣形科(Labiatae)
81	莪朮	<i>Curcuma wenyujin</i> Y.H. Chen et C. Ling	薑科(Zingiberaceae)
82	三陵	<i>Sparganium stoloniferum</i> Buch.-Ham.	黑三稜科(Sparganiaceae)
83	蛇床子	<i>Cnidium monnieri</i> (L.) Cuss.	繖形科(Umbelliferae)
85	秦皮	<i>Fraxinus chinensis</i> Roxb.	木犀科(Oleaceae)
86	苦楝子	<i>Melin toosendan</i> Sieb.et Zucc.	楝科(Meliaceae)
87	五味子	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	松藤科(Schisandraceae)
88	夏枯草	<i>Prunella vulgaris</i> L.	脣形科(Labiatae)
89	槐花	<i>Sophora japonica</i> L.	豆科(Leguminosae)
90	甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	豆科(Leguminosae)
91	陳皮	<i>Citrus reticulata</i> blanco 及其變種	芸香科(Rutaceae)
92	茵陳蒿	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	菊科(Compositae)
93	茯苓	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	多孔菌科 (Polyporaceae(Fungi))
94	延胡索	<i>Corydalis yanhusuo</i> W. T. Wang	罌粟科(Papaveraceae)
95	黃耆	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bge	豆科(Leguminosae)
96	人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	五加科(Araliaceae)
97	枸杞	<i>Lycium barbarum</i> L.	茄科(Solanaceae)
98	澤瀉	<i>Alisma orientalis</i> (Sam.) Juzep.	澤瀉科(Alismataceae)
99	麥門冬	<i>Ophiopogon japonicus</i> (Thunb.) Ker-Gawl.	百合科(Lilaceae)
100	燈心草	<i>Juncus effusus</i> L.	燈心草科(Juncaceae)
101	丹參	<i>Salvia miltiorhiza</i> Bge.	脣形科(Labiatae)

表三、10味中藥的 EC₅₀、TC₅₀ 及 SI

Herb	麻黃	防己	吳茱萸	知母	厚朴	皂莢	大黃	苦參	檳榔	甘草
EC ₅₀ ^a (µg/ml)	22.1	17.7	29.4		0.97	24.3	51.5	19.5	19.6	11.36
TC ₅₀ ^b (µg/ml)	>300	188.5	122.51	>300	>300	64.62	>300	252.8	>300	214.3
SI ^c	>13.57	10.65	4.18		>309	2.681	>5.28	12.97	>15.31	18.87

^a 50% Effective inhibitory concentration (EC₅₀) : 由 TPA 所誘發 AP-1 活性被藥物抑制達一半時，所需的藥物濃度。

^b 50% Toxicity concentration (TC₅₀) : 在藥物處理下，細胞致死量達一半時所需的藥物濃度。

^c Selective index (SI): TC₅₀ 除以 EC₅₀ 的數值。

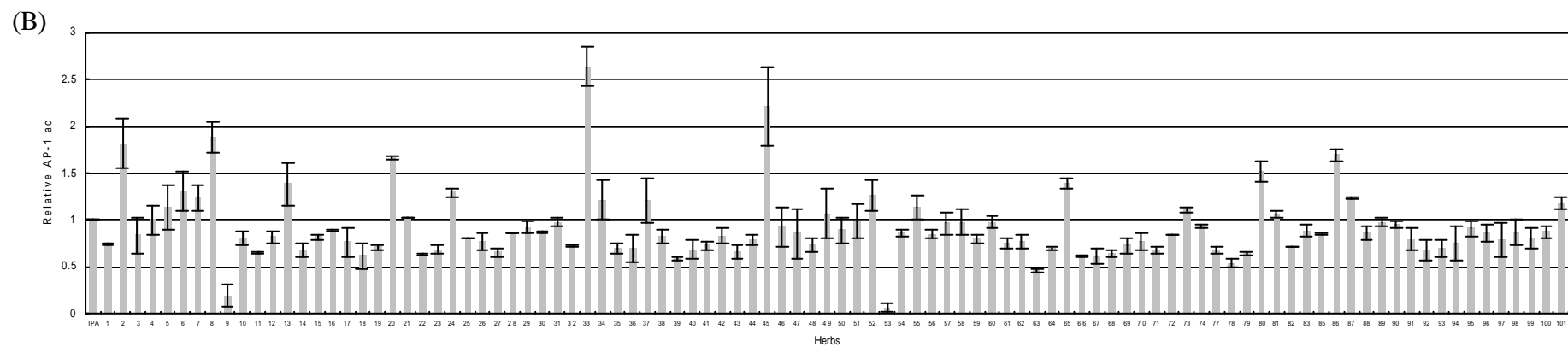
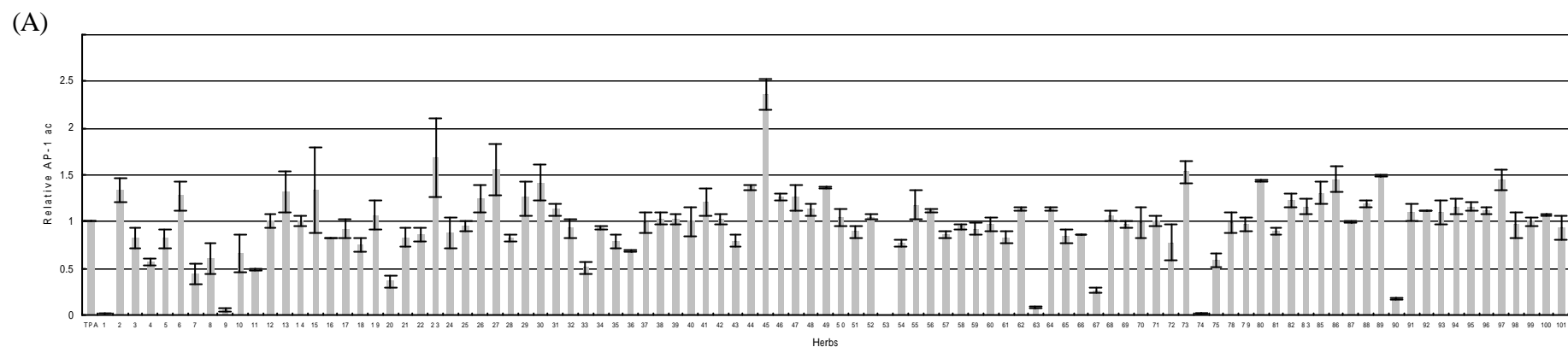
表四、吳茱萸 5 種溶劑萃取物的 EC₅₀、TC₅₀ 及 SI

	酸性乙醇	乙醇	甲醇	水	沸水
EC ₅₀ ^a					
μ g/ml	24.8	24.44	24.72		
TC ₅₀ ^b					
μ g/ml	90.42	79.77	122.51	>625	>625
SI ^c	3.65	3.26	4.96		

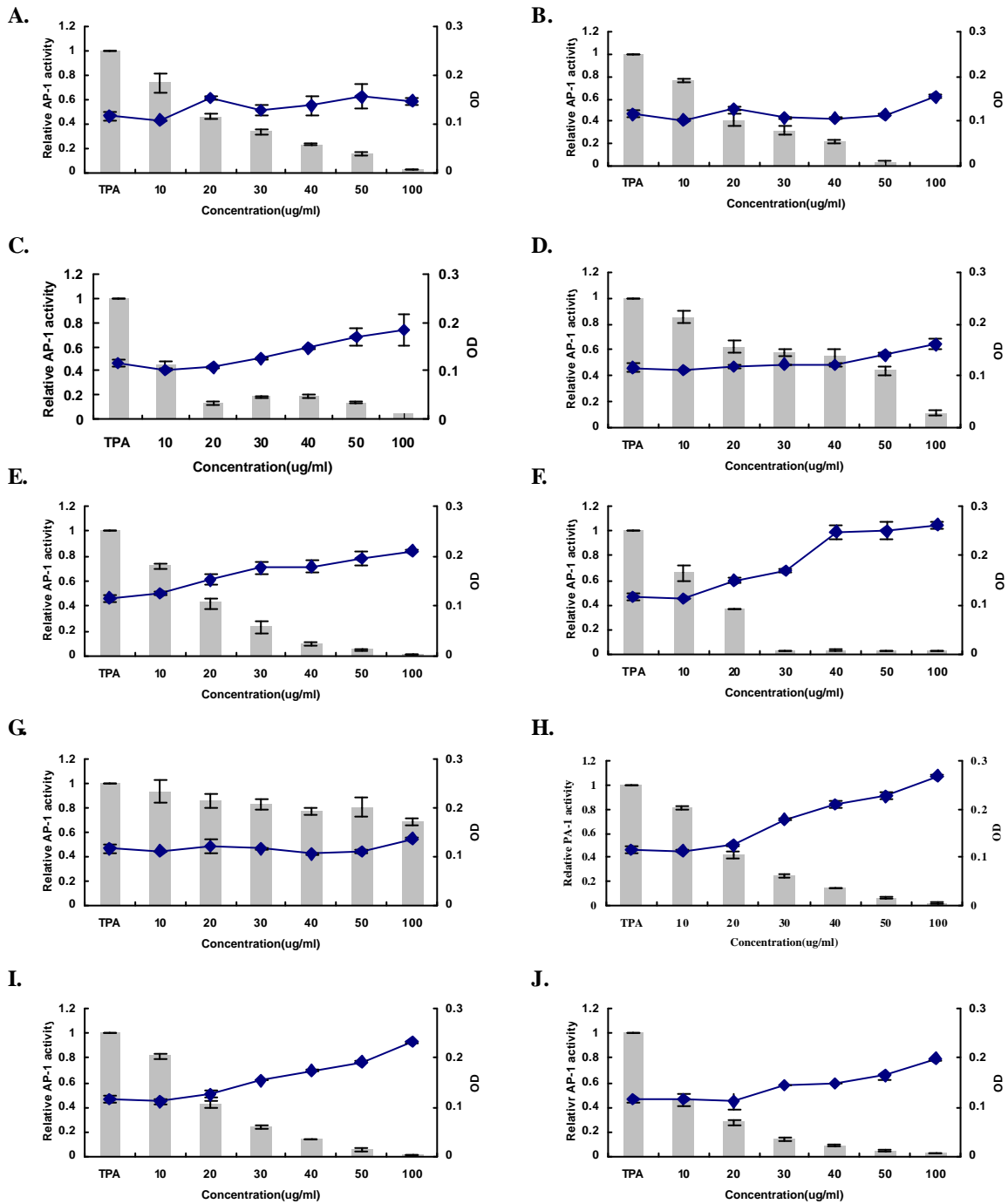
^a. 50% Effective inhibitory concentration (EC₅₀)：由 TPA 所誘發 AP-1 活性被藥物抑制達一半時，所需的藥物濃度。

^b. 50% Toxicity concentration (TC₅₀)：在藥物處理下，細胞致死量達一半時所需的藥物濃度。

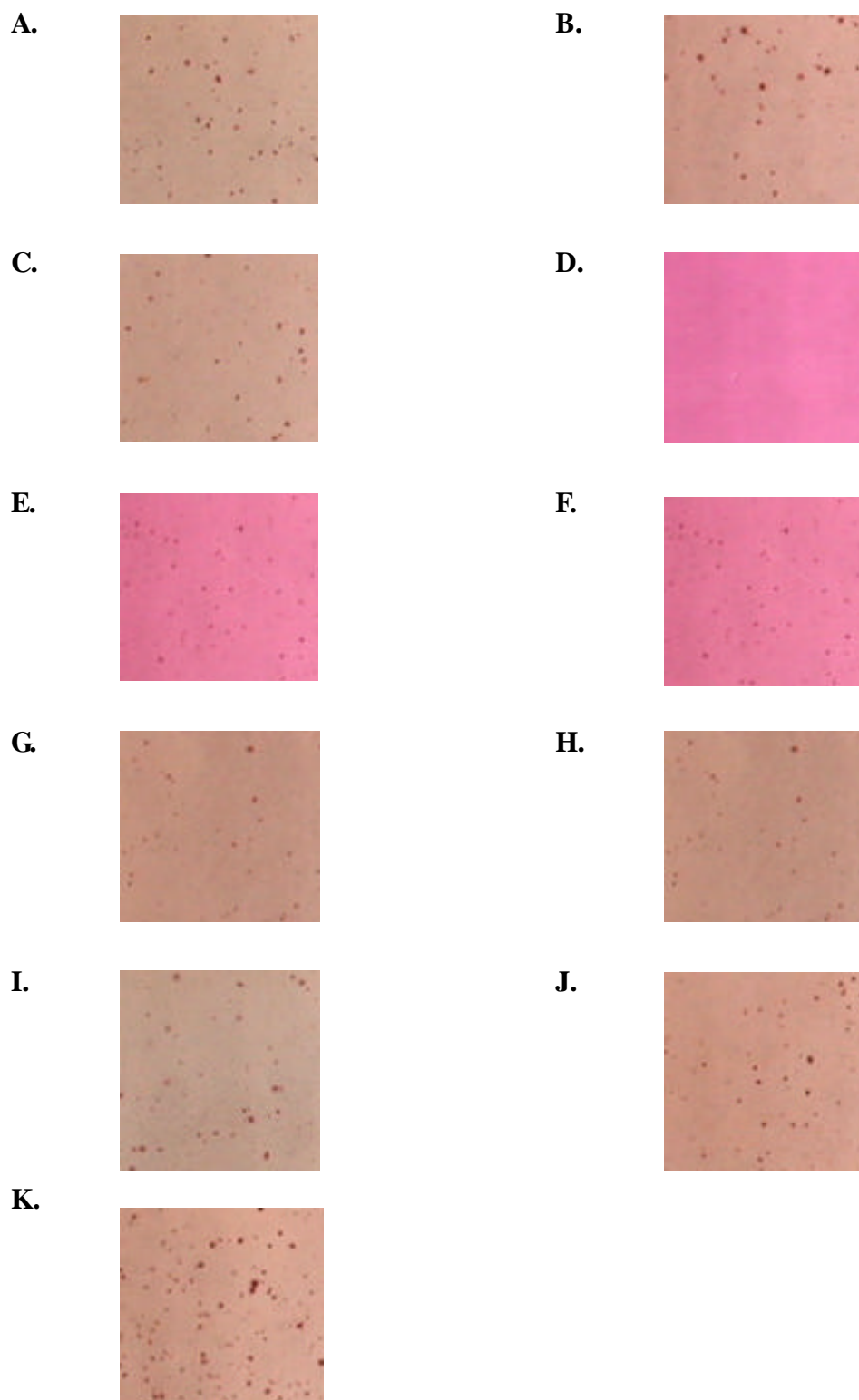
^c. Selective index (SI): TC₅₀除以 EC₅₀的數值。



圖四、 98 種中藥影響由 TPA 所誘發 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 細胞之 AP-1 活性。將 98 種中藥分別加入含 20 ng/ml TPA 的 Chang/AP-1 細胞(A)或 HepG2/AP-1 細胞(B)，培養 16 個小時後，用冷光儀測量 AP-1 活性。實驗結果以中藥調控 AP-1 活性相對於對照組誘發 AP-1 活性的比率表示。藥物濃度為 1/1000(附表)，每種藥物皆重複兩次測定，其值為 2 次實驗的平均值 ±標準差。

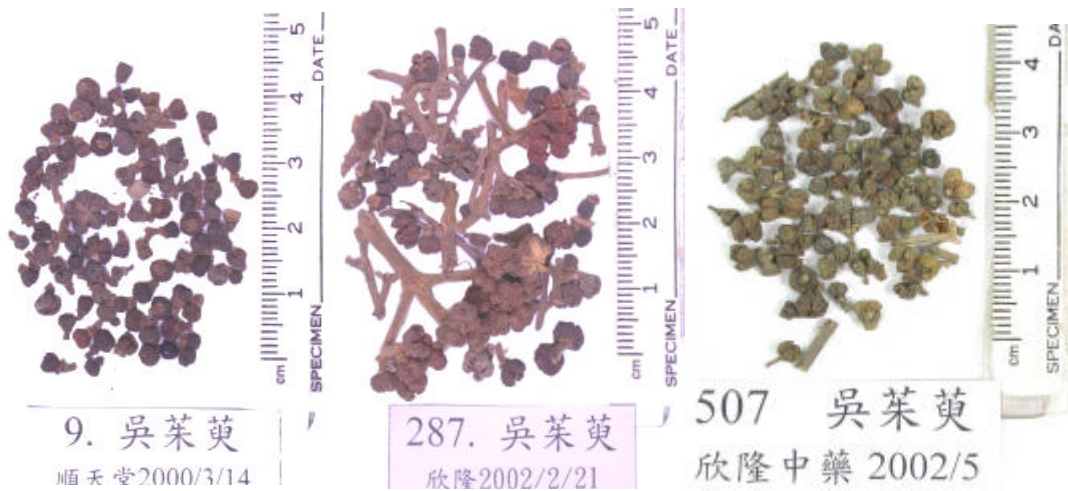


圖五、藥物影響由 TPA 所誘發之 AP-1 及細胞活性之劑量反應。將五種濃度 10、20、30、40、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 的藥物，分別加入含 20 $\mu\text{g/ml}$ TPA 的 Chang/AP-1 細胞中，培養 16 小時後，測量其 AP-1 活性及細胞毒殺效應。AP-1 活性以柱狀圖表示，細胞毒殺性效應以折線圖表示。其值為 3 次實驗的平均值 \pm 標準差。藥物的種類分別為(A) 麻黃、(B) 吳茱萸、(C) 厚朴、(D) 大黃、(E) 檳榔、(F) 防己、(G) 知母、(H) 皂莢、(I) 苦參、(J) 甘草。

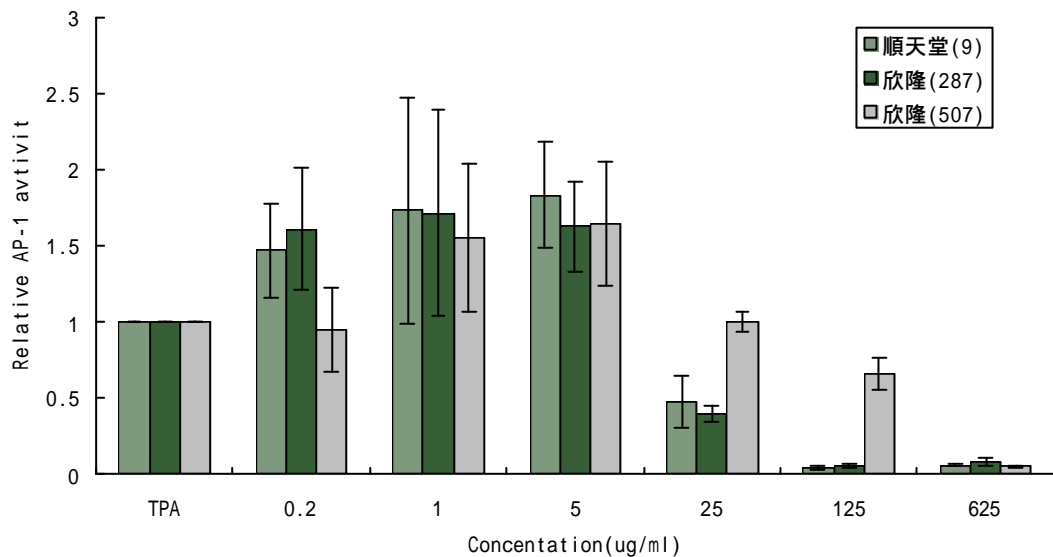


圖六、中藥影響由 TPA 所誘發之 Chang/AP-1 細胞轉形。利用 anchorage-independent transformation assay 的方式，將 Chang/AP-1 細胞培養在 2 ml 0.4% agar 中，並加入 20 ng/ml TPA 及藥物濃度為 EC_{50} 的中藥甲醇萃取物，持續培養 21 天後，利用 INT 染色 24 小時，最後以相機拍照。(A)為 Mock、(B)到 (K)分別表示 TPA、麻黃、防己、吳茱萸、厚朴、皂莢、大黃、苦參、檳榔、甘草。

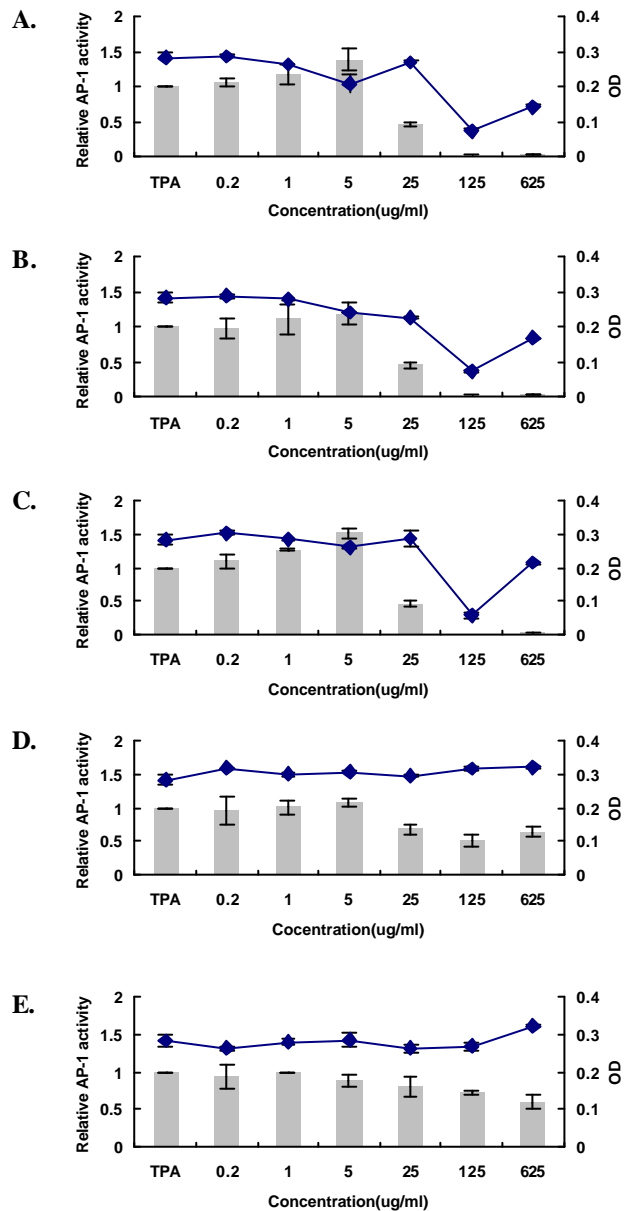
(A)



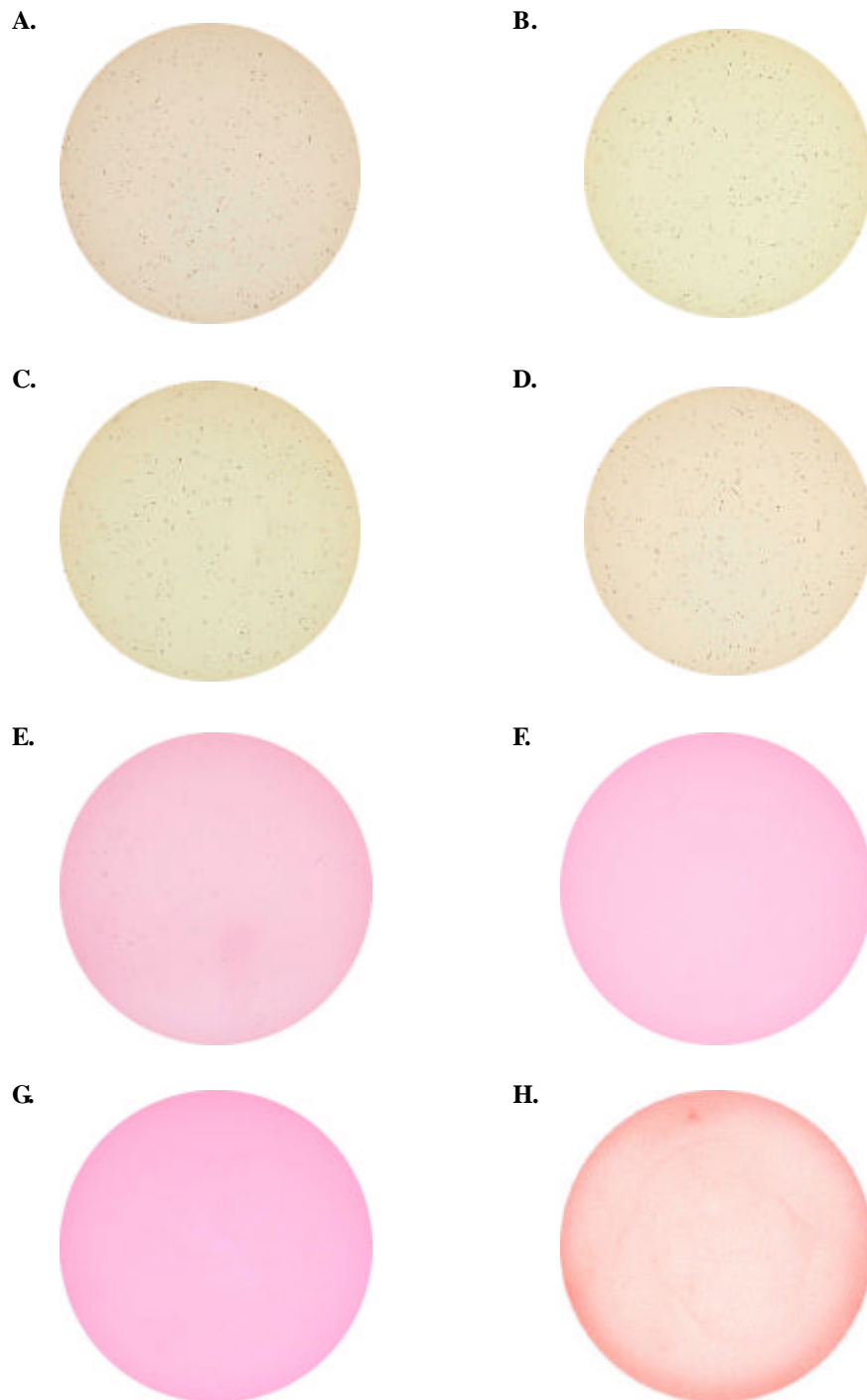
(B)



圖七、不同來源或批號之吳茱萸的特性分析。(A)形態上的比較。將來自於順天堂(2000/3/14 提供)及欣隆(2002/2/21 及 2002/5 提供)的吳茱萸以相機紀錄其形態；(B)影響由 TPA 誘發 AP-1 活性的比較。將五種濃度及三種來源的吳茱萸，分別加入含 20 ng/ml TPA 的 Chang/AP-1 細胞中，培養 16 小時後，測量其 AP-1 活性。其值為 3 次實驗的平均值 ± 標準差。



圖八、吳茱萸 5 種溶劑萃取物影響由 TPA 所誘發 AP-1 的活性。將五種濃度以酸性乙醇(A)、乙醇(B)、甲醇(C)、水(D)及沸水(E)萃取的吳茱萸萃取物分別加入含 20 ng/ml TPA 的 Chang/AP-1 細胞中，培養 16 小時後，測量其 AP-1 活性及細胞毒殺效應。AP-1 活性以柱狀圖表示，細胞毒殺性效應以折線圖表示。其值為 3 次實驗的平均值 ± 標準差。



圖九、吳茱萸影響由 TPA 所誘發之 Chang/AP-1 細胞轉形。利用 anchorage-independent transformation assay 的方式，將 Chang/AP-1 細胞培養在 1 ml 0.4% agar 中，並加入 20 ng/ml TPA 及 0(B) 0.2(C) 1(D) 5(E) 25(F) 125(G) 625(H) μ g/ml 的吳茱萸甲醇萃取物，持續培養 21 天後，利用 INT 染色 24 小時，最後以 Nikon995 相機拍照。(A)為對照組。

第四章、討論(Discussion)

AP-1 是一個很特別的蛋白質，它會受到一些外來訊息的刺激，例如 TPA、生長因子及紫外線等，促使基因轉錄，進而造成腫瘤的發生(Angel and Karin, 1991)。報告指出能抑制 AP-1 活性的物質即能抑制細胞轉形或腫瘤的產生(Barthelman *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1997; Domann *et al.*, 1994)，因此我們以 98 種中藥作為材料，探討中藥是否可以透過 AP-1 的方式來抑制肝細胞轉形的產生，其抑制 AP-1 的機制又是如何。

我們選擇麻黃、防己、吳茱萸、知母、厚朴、檳榔、大黃、苦參、皂莢、甘草等十種中藥作為下一步所要接下來的實驗。

麻黃、防己、吳茱萸、知母、厚朴、檳榔、大黃、苦參、皂莢、甘草在 Chang/AP-1 中是抑制由 TPA 所誘發 AP-1 活性的前十名中藥，另外在 HepG2/AP-1 細胞中抑制由 TPA 所誘發 AP-1 活性的前十名中藥則分別為吳茱萸、天花粉、赤芍藥、烏梅、皂莢、大黃、青蒿、苦參、黃蓮、黃柏，若將在兩細胞株中抑制 AP-1 活性的前十名藥物做相互比較，可以發現吳茱萸、皂莢、大黃、苦參等四種中藥，在 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 兩細胞中都同時可以抑制 AP-1 的活性，這個結果代表著在不同的肝癌細胞株中，吳茱萸和皂莢都可以穩定且

有效的抑制 AP-1 活性。但是從 soft agar 的結果發現抑制 Chang/AP-1 細胞最明顯的中藥是吳茱萸和防己。而其他的報告指出吳茱萸萃取物可以抑制老鼠大腸癌細胞的轉移且吳茱萸在五大類 (Alkaloids, Phenylpropanoids, Terpenoids, Flavonoids, Steroids) 共 23 種藥物中對抑制腫瘤轉移的效果最顯著 (Ogasawara *et al.*, 2001), 所以我們選擇吳茱萸來進一步探討其抑制腫瘤的分子機轉。

在分析吳茱萸之前, 我們想了解是否市售的吳茱萸都有相同抑制 AP-1 活性的能力, 因此我們比較了兩個來源不同批號的吳茱萸, 經過相同萃取及實驗結果發現不同來源的吳茱萸確實在抑制 AP-1 的活性上有不同的結果, 特別是在吳茱萸甲醇萃取物的 25 μ g/ml 及 125 μ g/ml 兩個濃度上, 而這剛好也是吳茱萸 EC_{50} 的濃度區間。會造成這種差異可能的原因是市售吳茱萸在乾燥時的過程不同而導致有效成分在加工處理的過程中流失。

吳茱萸的甲醇萃取物可以抑制 AP-1 活性及抑制 Chang/AP-1 細胞轉形, 並且隨著劑量的增加效果越顯著。透過五種萃取吳茱萸的方式 (酸性乙醇、乙醇、甲醇、水、沸水) 可以發現水及熱水的吳茱萸萃取物對於抑制 AP-1 活性沒有顯著的效果, 而透過統計的計算, 酸性乙醇、乙醇及甲醇三種溶劑的吳茱萸萃取物則對 AP-1 有明顯的抑制效果, 再加上 soft agar 實驗可以發現吳茱萸抑制 AP-1 的活性及抗肝

細胞轉形的物質是屬於非極性，並且有效濃度在 5 μ g/ml 及 25 μ g/ml 之間。乙醇可以萃取出非極性的成分，若在乙醇中加入 0.5%~1% 的酸，則可以利用生物鹼溶於酸性溶液的特性，而過濾除去不溶於酸性溶液的非極性成分(肖, 1987)。報告指出吳茱萸的生物鹼成分之一: Evocarpine, 可以促進 HL-60 血癌細胞的細胞凋亡(Apoptosis)(Kim NY et al., 2001)；另一種生物鹼：Evodiamine 則可以抑制 26-L5 大腸癌細胞的轉移(Ogasawara et al., 2001)，這與我們的實驗有相似的結果，因此我們的結果也可以推測出吳茱萸具抑制 AP-1 的活性及抗肝細胞轉形的物質為生物鹼，因此值得進一步利用動物試驗驗證其治療肝癌的效果。

參考文獻(References)

- 賴翠如。肝細胞轉形之分子機制及分子療程之探討。中國醫藥學院醫學研究所碩士論文。2001。
- 肖崇厚。中藥化學。上海科學技術出版社。1987:70-71。
- Angel P, Allegretto EA, Okino ST, Hattori K, Boyle WJ, Hunter T, Karin M. ncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature*. 1988 Mar 10;332(6160):166-71.
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*. 1987 Jun 19;49(6):729-39.
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Dec 10;1072(2-3):129-57.
- Baek NI, Kim DS, Lee YH, Park JD, Lee CB, Kim SI. Ginsenoside Rh4, a genuine dammarane glycoside from Korean red ginseng. *Planta Med*. 1996 Feb;62(1):86-7.
- Barthelman M, Chen W, Gensler HL, Huang C, Dong Z, Bowden GT. Inhibitory effects of perillyl alcohol on UVB-induced murine skin cancer and AP-1 transactivation. *Cancer Res*. 1998 Feb 15;58(4):711-6.
- Bernstein LR, Colburn NH. AP1/jun function is differentially induced in promotion-sensitive and resistant JB6 cells. *Science*. 1989 May 5;244(4904):566-9.
- Bode AM, Ma WY, Surh YJ, Dong Z. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):850-3.
- Bosch X, Ribes J, Borrás J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 271-85.
- Carboni L, Carletti R, Tacconi S, Corti C, Ferraguti F. Differential expression of SAPK isoforms in the rat brain. An in situ hybridisation study in the adult rat brain and during post-natal development. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Sep 18;60(1):57-68.
- Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*. 1988 Nov 4;55(3):395-7.
- Domann FE, Levy JP, Birrer MJ, Bowden GT. Stable expression of a c-JUN deletion mutant in two malignant mouse epidermal cell lines blocks tumor formation in nude mice. *Cell Growth Differ*. 1994 Jan;5(1):9-16.
- Dong Z, Birrer MJ, Watts RG, Matrisian LM, Colburn NH. Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan 18;91(2):609-13.

- Dong Z, Crawford HC, Lavrovsky V, Taub D, Watts R, Matrisian LM, Colburn NH. A dominant negative mutant of jun blocking 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion in mouse keratinocytes. *Mol Carcinog.* 1997 Jul;19(3):204-12.
- Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(3):685-701.
- Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell.* 1988 Dec 2;55(5):917-24.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature.* 1993 Sep 9;365(6442):179-81.
- Hirai S, Yaniv M. Jun DNA-binding is modulated by mutations between the leucines or by direct interaction of fos with the TGACTCA sequence. *New Biol.* 1989 Nov;1(2):181-91.
- Hsiang CY, Lai IL, Chao DC, Ho TY. Differential regulation of activator protein 1 activity by glycyrrhizin. *Life Sci.* 2002 Feb 22;70(14):1643-56.
- Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2401-12.
- Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell.* 1992 Nov 13;71(4):577-86.
- Kew MC. Hepatic tumors and cysts. In: Feldman M, Sleisenter MH, Scharschmidt BF, editors. *Sleisenger & Fordtran's gastroenterology and liver disease: pathology/diagnosis/management.* 6th edn. Philadelphia: Saunders; 1998. p1364-87.
- Kim NY, Pae HO, Kang TH, Kim YC, Lee HS, Chung HT. Cyclic adenosine monophosphate inhibits quinolone alkaloid evocarpine-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol.* 2000 Jul;87(1):1-5.
- Kovary K, Bravo R. Expression of different Jun and Fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol Cell Biol.* 1991 May;11(5):2451-9.
- Kubo M, Tong CN, Matsuda H. Influence of the 70% methanolic extract from red ginseng on the lysosome of tumor cells and on the cytotoxic effect of mitomycin C. *Planta Med.* 1992 Oct;58(5):424-8.
- Lallemant D, Spyrou G, Yaniv M, Pfarr CM. Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts. *Oncogene.* 1997 Feb 20;14(7):819-30.
- Lamb RF, Hennigan RF, Turnbull K, Katsanakis KD, MacKenzie ED, Birnie GD,

- Ozanne BW. AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol.* 1997 Feb;17(2):963-76.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* 1988 Jun 24;240(4860):1759-64.
- Lee W, Mitchell P, Tjian R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell.* 1987 Jun 19;49(6):741-52.
- Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J.* 1999 Jan 15;18(2):420-32.
- Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, Vousden KH, Colburn NH. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene.* 1998 May 28;16(21):2711-21.
- Martin JH, Mohit AA, Miller CA. Developmental expression in the mouse nervous system of the p493F12 SAP kinase. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996 Jan;35(1-2):47-57.
- Matsunaga H, Katano M, Saita T, Yamamoto H, Mori M. Potentiation of cytotoxicity of mitomycin C by a polyacetylenic alcohol, panaxytriol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;33(4):291-7.
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996 Mar 14; 334(11):693-9.
- Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Inhibitory effects of evodiamine on in vitro invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2001 Aug;24(8):917-20
- Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. *Biol Pharm Bull.* 2001 Jun;24(6):720-3.
- Park JA, Lee KY, Oh YJ, Kim KW, Lee SK. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 1997 Dec 16;121(1):73-81.
- Paul D, Hecker E. On the biochemical mechanism of tumorigenesis in mouse skin. II. Early effects on the biosynthesis of nucleic acids induced by initiating doses of DMBA and by promoting doses of phorbol-12,13-diester TPA. *Z Krebsforsch.* 1969;73(2):149-63.
- Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M, Verma IM. fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell.* 1988 Aug 12;54(4):553-60.

- Wakabayashi C, Murakami K, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 May 29;246(3):725-30.
- Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature*. 1992 Dec 24-31;360(6406):741-5.
- Weekly epidemiological record releve epidemiologique hebdomadaire. *World Health Organization*. 1997 Nov 46;72:341-348
- Yun TK, Lee YS, Lee YH, Kim SI, Yun HY. Anticarcinogenic effect of Panax ginseng C.A. Meyer and identification of active compounds. *J Korean Med Sci*. 2001 Dec;16 Suppl:S6-18.
- Yurii C, Tom KK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*. 2001 Apr 20; 19(3) :2438-52

附表、本研究所使用中藥之 1/1000 所代表之濃度

編號	中藥名	μg/ml(1/1000)	編號	中藥名	μg/ml(1/1000)	編號	中藥名	μg/ml(1/1000)
1	麻黃	54.2	34	款冬花	32.9	67	苦參	30.1
2	柴胡	28.9	35	薤白	7.2	68	敗醬草	4.2
3	木通	4.3	36	白芍藥	11.1	69	魚腥草	4.7
4	豬苓	1.9	37	淫羊藿	12.4	70	金銀花	48
5	秦艽	58.1	38	狗脊	14.4	71	荊芥	5.2
6	白芷	12.3	39	烏梅	40.6	72	升麻	20.4
7	防己	9.7	40	白鮮皮	9.6	73	葛根	17.8
8	乾薑	18.7	41	龍眼肉	106.4	74	檳榔	45.4
9	吳茱萸	28.6	42	合歡皮	7.6	75	牡丹皮	26.9
10	石膏	0.1	43	海蛤	0.2	78	黃蓮	22.9
11	知母	65.3	44	蟬蛻	1.3	79	黃柏	18.7
12	山梔子	39.3	45	射干	55.1	80	黃芩	29.9
13	桑白皮	5.6	46	桔梗	34	81	莪朮	8.6
14	玄參	21.2	47	半夏	1.2	82	三陵	11.5
15	百合	3.3	48	天南星	2.2	83	蛇床子	31
16	杏仁	49.2	49	旋覆花	12.1	85	秦皮	39.9
17	貝母	4.5	50	篇蓄	9.5	86	苦楝子	29.2
18	天花粉	4.7	51	刨附子	1.7	87	五味子	59
19	紫苑	74.1	52	白芨	19.1	88	夏枯草	4
20	厚朴	27.3	53	皂莢	57.2	89	槐花	46.4
21	枳實	43	54	薄荷	21.3	90	甘草	39.8
22	赤芍藥	49.3	55	土茯苓	14	91	陳皮	20.8
23	桃仁	52.1	56	板藍根	17.2	92	茵陳蒿	7.2
24	澤蘭	17.6	57	蛇舌草	11.6	93	茯苓	2.3
25	當歸	26.2	58	半枝蓮	6.4	94	延胡索	2.6
26	川芎	11.5	59	蒲公英	19.6	95	黃耆	12.3
27	白殭蠶	16.1	60	海藻	9.5	96	人參	18.6
28	山茱萸	75.8	61	大青葉	5.2	97	枸杞	67.3
29	葶藶	20.7	62	龍膽草	65.2	98	澤瀉	13.2
30	蒿本	28	63	大黃	47.9	99	麥門冬	26.2
31	蒼耳子	36.6	64	白頭翁	38.7	100	燈心草	0.6
32	白茅根	34.3	65	連翹	34.1	101	丹參	21.5
33	紫草	19.6	66	青蒿	6.9			

Abstract

Activator protein 1(AP-1), a nuclear transcription factor, plays important roles in cell proliferation, differentiation, and transformation. Previous study indicated that blocking of AP-1 activity is able to inhibit the cellular transformation. We therefore develop the anti-human hepatocellular compounds using AP-1 on the target in this study. Effects of 98 herbs on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced AP-1 activity in Chang/AP-1 and HepG2/AP-1 recombinant cells were investigated. Among the herbs, 10 herbs, which showed inhibition abilities on AP-1 activity, were selected. These herbs include *Ephedra sinica*, *Evodia rutaecarpa*, *Magnolia officinallis*, *Rheum officinale*, *Arcea catechu*, *Stephanica tetrandra*, *Anemarrhena asphodeloids*, *Gleditsia sinensis*, *Sophora flavescens*, and *Glycyrrhiza uralensis*. These herbs were further analyzed for their anti-AP-1 activities and anti-hepatocellular transformation activities by luciferase assay and anchorage-independent transformation assay. Results showed that *Evodia rutaecarpa* exhibited the significant inhibition ability on AP-1 activity and hepatocellular transformation in a dose-dependent manner. Moreover, the methanol, acid alcoholic, and alcoholic extracts of *E. rutaecarpa* were responsible for their anti-hepatocellular transformation abilities.

作者簡歷

姓名：吳泰賢

民國65年6月24日生

出生地：台北市

學歷：

台北縣立板橋國小

台北縣立重慶國中

國立板橋高級中學

私立中國醫藥學院公共衛生學系

私立中國醫藥學院醫學研究所碩士

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 私立中國醫藥學院醫學研究所
基礎醫學組九十學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文名稱：以 AP-1 為標的開發抗肝細胞轉形藥物

同意 不同意 (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，註明文號者請將全文資料延後半年再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：

研究生簽名：

學號：8966009

日期：民國 91 年 7 月 30 日