中醫補氣方劑對胃腺癌細胞株之影響評估

研究生　郭哲彰
指導教授　陳建仲 博士
中國醫藥學院 中國醫學研究所

現階段對於胃癌治療還沒有有效的抗癌藥物，因此本計畫試圖以胃癌細胞株實驗來尋找有效的治療中藥方劑。

我們測試臨床常用於癌症化學治療調理的中醫補氣方劑：保元湯、舉元煎、四君子湯、六君子湯、補中益氣湯，試圖篩選出對胃腺癌細胞株 MKN-74 具毒殺能力而且能加強絲鏈黴素(Mitomycin C; MMC)對 MKN-74 細胞株之毒殺能力的補氣方劑。我們更試著討論補氣方劑與 MMC 組合的作用機轉，是否協同加強 MMC 對 MKN-74 細胞株之細胞凋亡的反應，抑或是藉由其他機轉來毒殺細胞。於是我們利用 MTT assay 技術測試細胞的存活率，應用定量螢光顯微鏡分析法來計算細胞的凋亡率。

實驗結果發現補氣方劑當中，補中益氣湯促進 MMC 對胃腺癌細胞 MKN-74 之毒殺能力最強，針對補中益氣湯與 MMC 的合併使用並不會加強 MMC 誘導 MKN-74 細胞株細胞凋亡。因此補中益氣湯與 MMC 可能誘導 MKN-74 細胞株朝向細胞壞死路徑。由於補中益氣湯促進 MMC 對胃腺癌細胞 MKN-74 之毒殺能力最強，因此可以進一步設計臨床試驗，使用這兩種藥物於胃癌的治療以加強胃癌治療的效果。

關鍵字：補中益氣湯　胃癌　細胞凋亡 細胞壞死 絲鏈黴素

第一章 前言

近幾十年來，由於生物科技的進步，導致人類壽命的延長。但是工業快速發展卻造成環境污染，人類生活的周遭充滿著有害致癌物，使得癌症的死亡率在許多國家都是高居十大死因之首。我國癌症死亡率早在民國 71 年就已經位居第一位而且蟬連至今。而癌症之治療方式，也隨著生物科技之進步，日新月異。外科手術、化學治療、放射治療、免疫療法、基因療法、分化療法等都是癌症現在常用的治療模式。傳統中醫治療模式有著二千多年的臨床經驗累積，目前陸陸續續在中藥尋找出治療某些疾病的特殊成份。如青蒿中萃取青蒿素治療瘧疾，砒霜中的砷治療急性白血病。因此，中醫藥一直被認為在癌症治療上應該佔有一席之地。

胃癌在我國佔男性癌症死亡原因居第四位 [1]，在全世界仍是最常見的癌症之一 [2]，而胃腺癌是胃癌中最常見的一種，約佔所有胃癌的 90%-95%[3]。胃腺癌是一種化學治療活性很低的癌症，現階段沒有抗癌藥對胃腺癌細胞特別敏感，最常用的選擇是 Fluorouracil , Cisplatin, doxorubicin, etoposide, methotrexate, mitomycin-C 等。目前外科手術仍是較具積極治療的方法，但由於其存活率與診斷出胃腺癌侵犯的期別有關，五年存活率往往在 5% -15%[4]。由於其存活率低，因此術後常須輔助化學治療，或者先在術前進行輔助化學治療，或是針對轉移性胃腺癌予以姑息性化學治療。現階段沒有抗癌藥物對胃腺癌細胞特別敏感，往往有許多副作用。因此，研發新的方法以及尋找新的藥物組合，是治療胃腺癌非常重要的研究方向。資料顯示，有許多中藥或其萃取物對胃腺癌細胞具有毒殺作用。如綠茶酚(green tea catechin, epigallocatechin gallate)[4],辣椒素(capsaicin)[5],知母萃取物 [6] , isoliquiriti- genin[7]。

由於臨床上用於癌症化學治療後調理之中醫方劑以補氣方劑居多 [8,9]。因此本計劃選取五種補氣方劑：保元湯、舉元煎、四君子湯、六君子湯、補中益氣湯，首先觀察各個補氣方劑對胃腺癌細胞的細胞存活率，其次再篩選出一個對胃腺癌細胞株 MKN-74 毒殺能力最強的補氣方劑，而且能加強 MMC 對 MKN- 74 細胞株之毒殺能力的補氣方劑。另外，

已知 MMC **對** MKN-74 **細胞株會產生細胞凋亡**[10,11]**，因此，我們有興趣探討補氣方劑與** MMC **組合的作用機轉，是否能協同加強** MKN-74 **細胞株之細胞凋亡的反應，抑或是藉由其他路徑來促進細胞的毒殺作用。**

第二章 文獻探討

壹、中醫文獻探討

一、胃癌

癌症在中醫屬於「積聚」範疇[12]。而胃癌包含在中醫的「胃痛」、「胃癰」、「胃翻」等範疇內。

積聚的名詞，首載於《內經》[13]。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。」此書對於治療本病，有著最原始開端與指導。

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[14]。」不僅指出了積與聚臨床的特點，並且根據病情的輕重，判斷其預後。和現代胃癌根據分期，來決定預後，極為相似。

隋代，巢元方於《諸病源候論》中也記載：「積者，臟病也，陰氣之所生也；聚者，腑病也，陽氣之所成。虛勞之人，陰陽傷損，氣血凝澀，不能宣通經絡，故積聚於內也。」明白地創立虛勞致積的理論學說[15]。

明代醫家張景岳在其所著的《景岳全書?積聚論治》中，對於其病因病機有更全面的認識：「積聚之病，凡飲食、氣血、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[16]。」這說明積聚發病原因與飲食偏差、氣血失調、風寒受襲所導致，在病理分

類上，將堅硬不移而有固定形體者，稱之為積，另將較柔軟且無固定形體者稱為聚。其治療，前者從血分治，而後者從氣分治療。

關於積聚之治療，隨著時代演進有著不同的思惟，但大體如清代《醫宗必讀?積聚》篇提到：「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[17]。」隨著正邪盛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。

關於類似胃癌病變及症狀的描述，如《素問?腹中論》說：「病有少腹盛，上下左右皆有根……病名曰伏梁。……裹大濃血，居腸胃之外，不可治，治之每切按之致死。」《難經》說：「心之積，名曰伏梁，起臍上，大如臂，上至心下，久不愈，令人病煩心。」張仲景在《金匱要略》提到：「朝食暮吐，暮食朝吐，宿穀不化，名曰胃反」，以及「脈緊而澀，其病難治」的描述；嚴用和《濟生方》提到：「伏梁之狀，起於臍下，其大如臂，上至心下，猶梁之橫架於胸膈者，是為心積……其病腹熱而面赤，咽乾心煩，甚則吐血，令人食少肌瘦。」以上描述與胃癌晚期幽門梗阻所發生的情況相似。

關於流行病學方面，明代張景岳指出：「少年少見此症，惟中衰耗傷者多有之。」與現代醫學統計胃癌好發於 40 歲以上相符[18]。

二、補氣方劑

以補養藥配製成方，用以治陰陽氣血不足或臟腑虛損之證者，統稱為補益劑。在治則八法中屬於「補法」範圍，十劑中為「補劑」。《素問?三部九候論》提到：「虛則補之」；《素問?至真要大論》提到：「損者益之」；另外，《素問?陰陽應相大論》更提到：「形不足者，溫之以氣；精不足者，補之以味」。這些都是補益劑的立論依據與應用原則[19]。

補氣方劑，專指針對氣虛證，而氣虛之證以脾、肺氣虛為主。其見證倦怠乏力，少氣懶言，語聲低微，動則易喘，食少便溏，舌淡苔白，脈細弱。臨床上癌證末期，或化療後遺症常見氣虛之證候[8,9]。常用補氣藥人參、黨參、黃耆、白朮、炙甘草等為主組合成方劑。若兼氣滯者，配木香、陳皮、砂仁等，調暢氣機，與補氣藥配合，增強脾胃運化之功

能，防其壅氣不化之弊；兼溼阻者，伍以利水滲溼藥，如茯苓、薏苡仁等，使水溼下滲而脾運得健；若氣虛下陷，內臟下垂者，佐以升提藥如升麻、柴胡、桔梗等，以提高補氣升提之功；兼陰虛脈弱者，酌加養陰生津藥如麥冬、五味子，以補養氣陰。

補氣藥之代表方如：保元湯、舉元煎、四君子湯、六君子湯、補中益氣湯。分述如下：

（一）保元湯

出典：十藥神書。

組成：人參三錢　甘草一錢　黃耆三錢　肉桂五分

主治：虛損勞怯、元氣不足、又治痘瘡塌陷。

（二）舉元煎

出典：景岳全書。

組成：黃耆三錢　人參三錢　白朮三錢　炙甘草二錢　升麻三錢

（三）四君子湯

出典：和劑局方。

組成：黨參二錢　白朮二錢　茯苓二錢　炙甘草一錢　生薑三錢　紅棗二錢

主治：榮衛氣虛，臟腑怯弱，心腹脹滿，全不思食，腸鳴泄瀉，嘔噦吐逆。

（四）六君子湯

出典：醫學正傳。

組成：黨參二錢　白朮二錢　茯苓二錢　炙甘草一錢　半夏一錢　陳皮一錢　生薑三錢　紅棗二錢

主治：脾胃氣虛兼痰溼，不思飲食，噁心嘔吐，胸脘痞悶，大便不實。

（五）補中益氣湯

出典：脾胃論。

組成：黃耆五錢　黨參五錢　白朮三錢　炙甘草五錢　陳皮二錢　當歸二錢　升麻二錢　柴胡二錢　生薑三錢　紅棗二錢

主治：氣高而喘，身熱而煩，其脈洪大而頭痛，或渴不止，其皮膚不任風寒而生寒熱。

貳、現代文獻探討

一、細胞凋亡

細胞死亡分為兩種，一種稱為壞死（necrosis），另一種稱為細胞凋亡(apoptosis)，又稱為計畫性死亡（programmed cell death）。當細胞受到缺氧或外來毒素傷害時，最常死亡的形式為壞死，此時細胞腫脹，膜完整性消失，細胞崩解且內容物釋出，易造成個體之發炎反應。但在 1965 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發現到一種細胞縮小、包膜完整、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，且當時欠缺生物標記，因此沈寂一陣子，直到 1990 年代以後得力於線蟲類（nematode）及果蠅的遺傳知識，細胞凋亡的研究才蓬勃發展。細胞凋亡是真核細胞自然死亡的方式，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及細胞恆定。例如，在胚胎發育過程，約有一半的神經細胞與周邊組織細胞連結後，因得不到足夠周邊組織分泌的特異性神經生長因子而死亡。在病理意義上，一些重要疾病如癌症、病毒性疾病、後天免疫缺乏症候群和神經退化等疾病，與細胞凋亡的亢奮與不及相關。因此細胞凋亡成為當前國內外研究的熱門課題 [20-27]。

細胞凋亡的研究方法目前有幾種指標可以參考。最常用的就是細胞形態，由於細胞凋亡活化了許多內生性蛋白質脢（endogenous protease），導致細胞骨架被破壞（cytoskeletal distruption）、細胞萎縮（cell shrinkage）、細胞膜上會有泡沫狀（membrane blebbing）的產生，並產生染色質濃縮（chromatin condensation）的現象 [20,28]。本實驗利用 bisbenzimide trihydrochloride 染劑染濃縮的染色質,再利用螢光顯微鏡予以觀察測量。

二、絲鏈黴素（Mitomycin C）

絲鏈黴素是從一種絲鏈黴菌（*streptomyces caespitosus*）分離而得，是一種烷化基劑，其作用會造成 DNA 雙股之間的交叉連結，進而抑制 DNA 的複製，目前被廣泛使用在癌症的化學治療上，特別在胃癌以及

胰臟癌 目前已知 MMC **會造成胃腺癌細胞株細胞凋亡, 非經由** Fas/CD95 **路徑但能活化** caspases-8,3,9[29]**, 其作用可以因** protein kinase C (PKC)**的抑制劑** SAF, the L-*theo* enantiomer of dihydrosphingosine; safingo **來提高細胞凋亡之能力** [30,31]**，並且得知此** PKC **抑制反應是藉由選擇性抑制** Cyclooxygenase-2 (COX-2) **所導致** [11]**。**

第三章 材料和方法

壹、實驗藥物和儀器

一、實驗儀器

（一）桌上型離心機 Spectrafuge Microcentrifuge

廠牌：Labnet

細胞凋亡實驗中，利用離心原理將細胞離心下來。

（二）震盪器 LAB.ROTATOR Model: DSR 2800V

廠牌：Digisystem Laboratory Instruments, INC

MTT 實驗中，震盪細胞並將細胞溶解。

（三）VORTEX-GENIE 2

廠牌：Scientific Industries, INC

將中藥混合均勻以及在細胞凋亡實驗中將細胞重懸浮。

（四）一般天平 Explorer Balances

廠牌：OHAUS

MTT 實驗中配制 MTT 時，秤重用。

（五）微量天平 Adeventurer Balances

廠牌：OHAUS

藥物濃縮後秤藥物重量

（六）攪拌器

廠牌：JII TSANN CO., LTD

細胞凋亡實驗配 3％Paraformaldehyde 所需。

（七）減壓離心濃縮機 Centrivap Console

廠牌：LABCONCO

中藥流浸膏冷凍乾燥取得粉末，並計算抽取濃度。

（八）ELISA Reader Stat Fax 2100

廠牌：Awreness Technology INC

MTT 實驗測吸光值

（九）Freezer -20℃

廠牌：Frigidaire

儲存中藥流浸膏，其他試劑。

（十）玻片 Micro Slide

廠牌：Muto Pure Chemicals CO., LTD

細胞凋亡實驗使用。

（十一）蓋玻片 Microscopical cover-glasses

廠牌：Assistant

細胞凋亡實驗使用。

（十二）倒立相位差螢光顯微鏡 ECLIPSE TE300

廠牌：Nikon

細胞凋亡實驗使用觀察細胞。

（十三）照相系統 BX60

廠牌：Olympus

細胞凋亡實驗將細胞照相。

（十四）直立型離心機 Kubota 2010

廠牌：Kubota

細胞培養。

（十五）二氧化碳培養箱 BNA-211

廠牌：ESPEC

細胞培養。

（十六）直立式無菌無塵操作台

廠牌：Concrpt

細胞培養。

（十七）真空幫浦

廠牌：GAST

細胞培養及中藥過濾。

（十八）Pipet-Aid

Drummond

抽吸藥品溶液。

二、實驗材料

（一）培養基 購自 Gibco

MEM medium

100 Unit/ml penicillin
100 μg/ml streptomycin
20% heat-inactivated normal calf serum

（二）MMC **購自** Sigma Chemical Co.

（三）MTT（3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue）**購自** Sigma Chemical Co.

（四）SAF (safigo)**購自** Aventi polar, Lipids, Inc

（五）PBS **購自** Amresco

（六）bisbenzamide (Sigma B 2883) **購自** Sigma Chemical Co.

（七）**人類胃腺癌細胞株**（MKN-74）Early passage human gastric cancer **取自** Dr Gary Lab

三、實驗中藥方劑：

保元湯、舉元煎、四君子湯、六君子湯、補中益氣湯共五種，經科達製藥公司 3 **名中藥師共同鑑定其組成藥材基源，本實驗所使用相同之中藥為同一批藥材。中藥基源說明如下：**

（一）保元湯

組　成	科　別	用　部	學　名
人參	五加科	去鬚根之乾燥根	Panax ginseng C.A. Mey.
甘草	豆科	根、根莖	Glycyrrhiza uralensis Fisch.
黃耆	豆科	乾燥根	Astragalus membranaceus Bunge var. mongholicus (Bunge) P.K. Hsiao
肉桂	樟科	乾燥樹皮	Cinnamomum cassia Presl

（二）舉元煎

組　成	科　別	用　　部	學　　　名
黃耆	豆科	乾燥根	Astragalus membranaceus Bunge var. mongholicus (Bunge) P.K. Hsiao
人參	五加科	去鬚根之乾燥根	Panax ginseng C.A. Mey.
白朮	菊科	乾燥根莖	Atractylodes macrocephala koidz.
炙甘草	豆科	根、根莖	Glycyrrhiza uralensis Fisch.
升麻	毛艮科	根莖	Cimicifuga foetida L.

（三）四君子湯:

組　成	科　別	用　　部	學　　　名
人參	五加科	去鬚根之乾燥根	Panax ginseng C.A. Mey.
白朮	菊科	乾燥根莖	Atractylodes macrocephala koidz.
茯苓	多孔菌科	乾燥菌核	Poria cocos (Schw.) Wolf.
炙甘草	豆科	根、根莖	Glycyrrhiza uralensis Fisch.
生薑	薑科	根莖	Zingiber officinale Rosc.
紅棗	鼠李科	乾燥成熟果實	Ziziphus jujuba Mill.

（四）六君子湯:

組　成	科　別	用　部	學　名
人參	五加科	去鬚根之乾燥根	Panax ginseng C.A. Mey.
白朮	菊科	乾燥根莖	Atractylodes macrocephala koidz.
茯苓	多孔菌科	乾燥菌核	Poria cocos (Schw.) Wolf.
炙甘草	豆科	根、根莖	Glycyrrhiza uralensis Fisch.
姜半夏	天南星科	塊莖	Pinellia ternata (Thunb.) Breit.
陳皮	芸香科	乾燥熟果皮	Citrus reticulata Blanco
生薑	薑科	根莖	Zingiber officinale Rosc.
紅棗	鼠李科	乾燥成熟果實	Ziziphus jujuba Mill.

（五）補中益氣湯:

組　成	科　別	用　部	學　名
黃耆	豆科	乾燥根	Astragalus membranaceus Bunge var. mongholicus (Bunge) P.K. Hsiao
人參	五加科	去鬚根之乾燥根	Panax ginseng C.A. Mey.
白朮	菊科	乾燥根莖	Atractylodes macrocephala koidz.
炙甘草	豆科	根、根莖	Glycyrrhiza uralensis Fisch.
陳皮	芸香科	乾燥熟果皮	Citrus reticulata Blanco
當歸	傘形科	乾燥根	Angelica sinensis (Oliv.) Diels
升麻	毛艮科	根莖	Cimicifuga foetida L.
柴胡	傘形科	乾燥根	Bupleurum chinense DC.
生薑	薑科	根莖	Zingiber officinale Rosc.

貳、實驗方法

一、補氣中藥方劑的置備

取藥材 100 g 加入 7 倍水(700 ml)煎煮一小時後，過濾(100 目)，然後將濾後藥渣加入 5 倍水(500 ml)煎煮一小時，再次過濾(100 目)，合兩次濾液濃縮至 80 g。

二、補氣中藥方劑之產率

（一）保元湯

處方比例

原　　料	比　　例	煎煮量(g)
人　　參	3.0	40.00
甘　　草	1.0	13.33
黃　　耆	3.0	40.00
肉　　桂	0.5	6.67
合　　計	**7.5**	**100.00**

溼浸膏重: 83.32 g

乾浸膏率: 43.2%

乾浸膏重: 35.99 g

產率: 35.99%

（二）舉元煎

處方比例

原　　料	比　　例	煎煮量(g)
黃　　耆	3.0	21.43
人　　參	3.0	21.43
白　　朮	3.0	21.43
炙 甘 草	2.0	14.28
升　　麻	3.0	21.43
合　　計	**14.0**	**100.00**

溼浸膏重: 82.26 g

乾浸膏率: 48.28%

乾浸膏重: 39.72 g

產率: 39.72%

（三）四君子湯

處方比例

原　　料	比　　例	煎煮量(g)
人　　參	2.0	16.67
白　　朮	2.0	16.67
茯　　苓	2.0	16.67
炙 甘 草	1.0	8.32
生　　薑	3.0	25.00
紅　　棗	2.0	16.67
合　　計	**12.0**	**100.00**

濕浸膏重: 85.43 g

乾浸膏率: 34.76%

乾浸膏重: 29.70 g

產率: 29.70%

（四）六君子湯

處方比例

原　　料	比　　例	煎煮量(g)
人　　參	2.0	14.29
白　　朮	2.0	14.29
茯　　苓	2.0	14.29
炙 甘 草	1.0	7.14
姜 半 夏	1.0	7.14
陳　　皮	1.0	7.14
生　　薑	3.0	21.42
紅　　棗	2.0	14.29
合　　計	**14.0**	**100.00**

濕浸膏量: 83.04 g

乾浸膏率: 36.68%

乾浸膏重: 30.46 g

產率: 30.46%

（五）補中益氣湯

處方比例

原　　料	比　　例	煎煮量(g)
黃　　耆	5.0	16.13
人　　參	5.0	16.13
白　　朮	3.0	9.68
炙 甘 草	5.0	16.13
陳　　皮	2.0	6.45
當　　歸	2.0	6.45
升　　麻	2.0	6.45
柴　　胡	2.0	6.45
生　　薑	3.0	9.68
紅　　棗	2.0	6.45
合　　計	**31.0**	**100.00**

濕浸膏重: 99.84 g

乾浸膏率: 41.31%

乾浸膏重: 41.24 g

產率: 41.24%

三、補氣方劑濃度製備

將上述五種方劑流浸膏用蒸餾水稀釋成 0.2 g/ml**，分別取** 20 ml **中藥加入** 20 ml PBS **充分混合，分入** 2ml **離心管，以** 7500 rpm **離心** 30 **分鐘後取上清液過孔徑為** 0.45 μm **的濾膜，以濾除細菌，緊接著用** PBS **稀釋成** 100 mg/ml**，在無菌操作台上過** 0.22 μm **孔徑的濾膜，以濾除病毒，並將將藥物分裝並儲存於** -20℃**冰箱。**

四、細胞株培養

將 MKN-74 **細胞株自液態氮中解凍，培養在** 75T **培養瓶中以含有**

10% fetal bovine serum，100 Unit/ml penicillin，100 µg/ml streptomycin 的 MEM 培養基培養，每隔 2-3 天做依次繼代培養。繼代培養時，先以 Trypsin 緩衝液處理細胞，使之自附著面脫離，繼以含血清緩衝液終止 Trypsin 反應，整個培養過程在無菌操作台操作。處理後之細胞置於並放置 37℃恆溫，含 5% CO_2 飽和溼度的培養箱。

五、細胞生長抑制試驗- - MTT assay

（一）原理

MTT是一種水溶性tetrazolium salt 呈黃色。在存活的細胞中具有活性的active mitochondrial dehydrogenase 會將MTT轉化成不溶性之紫色formazan。再經由 acidic isopropanol 來溶解formazan，經分光比色儀偵測染劑顏色的濃度，換算出細胞存活率。

（二）實驗步驟

將胃癌細胞株細胞培養成每孔2500 個細胞，接種於96孔培養盤中，每孔接種200 µl細胞株，並加入不同濃度之實驗藥物各40 µl，依不同分析時間培養細胞。當檢測細胞存活率時，先將培養盤不棄上清液，每孔加入24 µl (總體積的十分之一)新鮮配制的含5 mg/ml MTT (Sigma M 5655)的phenol-red培養基。再置於37℃之5%CO2 培養箱中繼續培養3小時。接著去上清液加入200µl acidic isopropanol (0.096N HCl) 溶解formazan，震盪混合後30秒鐘後，以分光比色儀偵測570 nm波長的吸光值並用630 nm 波長當背景值。

六、細胞存活率分析

以未加藥物的實驗組吸光值測量值當作100% ，並以此計算藥物實驗組的癌細胞存活率。其計算公式如下：

細胞存活率 = [藥物處理之吸光值值背景值] / [未經藥物處理之吸光值-背景值] x 100%

七、細胞凋亡分析

本計畫使用定量螢光顯微鏡分析（Quantitative Fluorescent

Microscopy, QFM)

（一）原理

利用bisbenzimide trihydrochloride **染劑能染上細胞凋亡所產生的濃縮的細胞質（**condensed chromatin**），再利用定量螢光顯微鏡（**QFM**）予以觀察測量。**

（二）操作步驟

經藥物處理過的培養皿，在室溫下用PBS 3 ml **沖洗**3**次後加入**trypsin 1 ml **在** 37℃**下培養**5**分鐘，再以回收之**PBS **沖洗後收取細胞懸浮液上清液，以**1200 rpm**離心**10**分鐘，移去上清液並加入**1ml PBS **重新懸浮細胞沈澱，再將細胞移到**2 ml **離心管離心形成細胞沈澱，用**100 µL 3%paraformaldehyde (4℃ fresh)**固定並重懸浮細胞後，先將細胞置於室溫**10**分鐘，然後冷藏於**4℃**冰箱一段時間。接著用離心機離下細胞並移除固定液，再以用一倍的** PBS 1 ml **沖洗並震盪，吸出**PBS **並用**50 µl Diluted stain**染被固定的細胞。其中**Diluted stain**的配置如下：**

Stock=8 mg/ml bisbenzamide (Sigma B 2883) in PBS

Dilute stain=20 µl Stock +10 ml PBS (1:500 **稀釋**)

接著將被染色的細胞株培養在室溫下 10-15**分鐘後，每次取**15µl**細胞液滴在玻片上，利用螢光顯微鏡，每張玻片觀察約**600**個細胞，計算細胞凋亡細胞出現的百分率。**

（三）實驗分組

本實驗共分兩大組，將補中益氣湯分別與 MMC 0.25 µg/ml **及** MMC 1.0 µg/ml **作用比較，在細胞培養三天後，以利用** bisbenzimide trihydrochloride **染劑及定量螢光顯微鏡分析（**Quantitative Fluorescent Microscopy, QFM**），其分組如表所示。**(**表** 3.1) (**表** 3.2)

表 3.1 **補中益氣湯與** MMC 0.25 μg/ml **對** MKN-74 **細胞株的細胞凋亡反應實驗分組表**

	第一天	第二天	第三天
第一組（負對照）	PBS	PBS	PBS
第二組	補中益氣湯	補中益氣湯	補中益氣湯
第三組	PBS	PBS	MMC 0.25 μg/ml
第四組	補中益氣湯	補中益氣湯	MMC 0.25 μg/ml
第五組	MMC 0.25 μg/ml	Wash MMC add 補中益氣湯	補中益氣湯
第六組	MMC 0.25 μg/ml	Wash out MMC Add PBS	PBS
第七組（正對照）	PBS	PBS	MMC 0.25 μg/ml +Safingo 50 μM

表 3.2 **補中益氣湯與** MMC 1.0 μg/ml **對** MKN-74 **細胞株的細胞凋亡反應實驗分組表**

	第一天	第二天	第三天
第一組（負對照）	PBS	PBS	PBS
第二組	補中益氣湯	補中益氣湯	MMC 1.0 μg/ml
第三組	MMC 1.0 μg/ml	Wash out MMC add 補中益氣湯	補中益氣湯
第四組	MMC 1.0 μg/ml	Wash out MMC addPBS	PBS
第五組（正對照）	PBS	PBS	MMC 1.0 μg/ml+ Safingo 50 μM

八、統計方法

實驗數據以 mean ±SD **表示。統計上使用** two side student's *t* test **來比較差異。分析結果以** *P* **值小於** 0.05 **視為統計上有差異。分析回歸曲線來定藥物抑制作用的** IC_{50} **及** IC_{10} **值。**

第四章 結果

一、MKN- 74 細胞株細胞數目的測定

為了確定本實驗的細胞仍屬於快速生長期，我們將不同細胞數的細胞株 1000-6000 cells/well 種在 96 孔培養盤中，培養三天後，用 MTT assay 計算各組細胞存活率(圖 4.1)。實驗發現，細胞數目在 2000 cell/well 到 3000 cell/well 仍屬快速生長期，因此最後決定取 2500 cells/well，來進行以後 MKN-74 細胞株培養的實驗。

二、計算五種補氣方劑的 IC_{10} 及 IC_{50}

為了得到五種補氣方劑的 IC_{10} 及 IC_{50}，我們將補氣方劑依不同濃度加入細胞株培養三天，用 MTT assay 分別畫出其細胞存活曲線（圖 4.2 至圖 4.6)。再依存活曲線取其線性回歸，分別得到五種方劑的 IC_{10}　IC_{50} 濃度。由於保元湯線性回歸後 IC_{10} 為負值，因此，改以 IC_{25}。五種補氣方劑的 IC_{10} 及 IC_{50} 詳附於 (表 4.1)，接下來的實驗中，我們將取 IC_{10} 及 IC_{50} 的藥物濃度與 MMC 作用，觀察是否促進 MMC 對胃癌細胞毒殺能力，並篩選最有效之方劑。

三、MMC 不同濃度的細胞存活曲線

為了下一步補氣方劑合併 MMC 的細胞毒殺試驗，我們必須先確定 MMC 在不同濃度下的細胞存活率。首先取 MMC 濃度分別 0.25 μg/ml 1.0 μg/ml 、 4 μg/ml 、 8 μg/ml 、 16 μg/ml 加入 MKN-74 細胞株一起培養一天，然後用 MTT assay 計算其細胞存活率。（圖 4.7）其結果顯示 MMC 0.25 μg/ml 的細胞存活率：94.9 ±3.9%，MMC 1.0 μg/ml 的細胞存活率：75 ±7.7%。因此，我們在接下來的實驗，補氣方劑促進 MMC 對胃癌細胞毒殺能力及篩選最有效之方劑實驗中，MMC 的濃度採用 1.0 μg/ml 及 0.25 μg/ml。由於 MMC 0.25 μg/ml 對胃癌細胞幾乎不產生抑制作用，且較逼近於臨床實際的血中濃度，因此在最後篩選的出來的補中益氣湯與 MMC 的作用機轉實驗中，MMC 則採用 0.25 μg/ml。

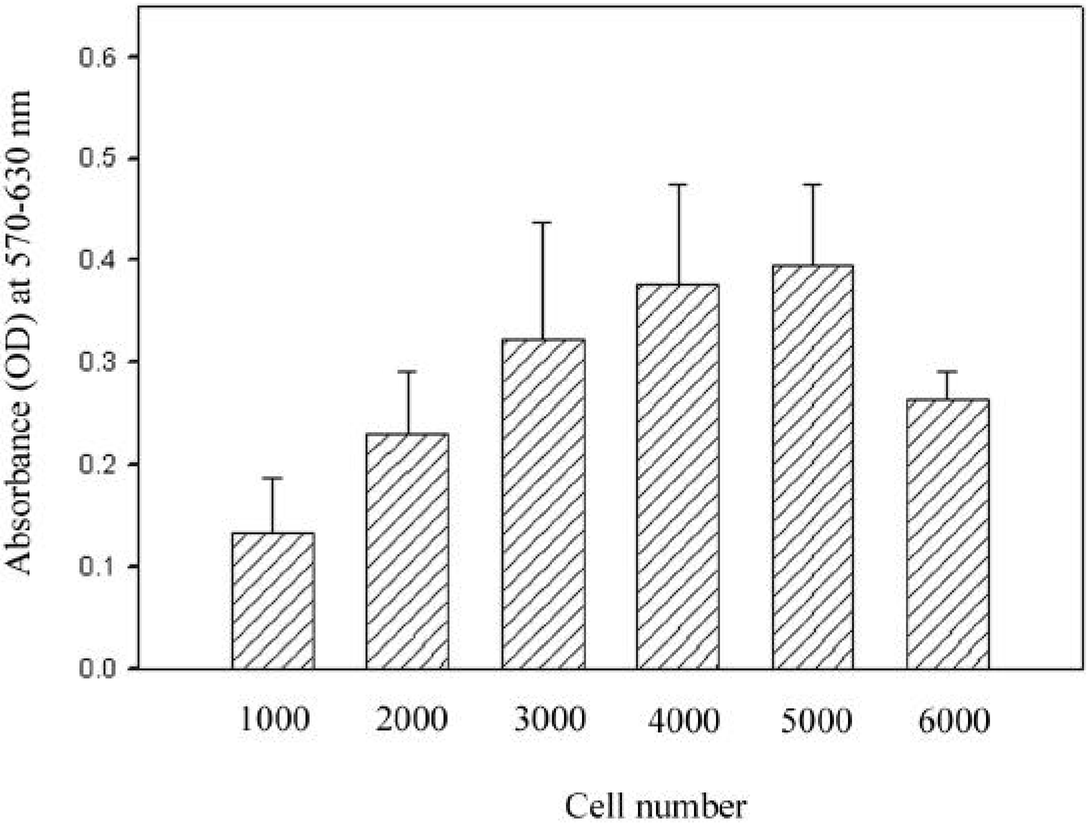

圖 4.1　MKN- 74 細胞株細胞數目的測定

將不同細胞數的細胞株 1000-6000 cells/well **種在** 96 **孔培養盤中，培養三天後，用** MTT assay **計算各組細胞存活率。結果發現，細胞數目在** 2000 cell/well **到** 3000 cell/well **仍屬快速生長期，因此決定取** 2500 cells/well**，來進行** MKN-74 **細胞株培養的實驗。**

實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** n = 3**。**

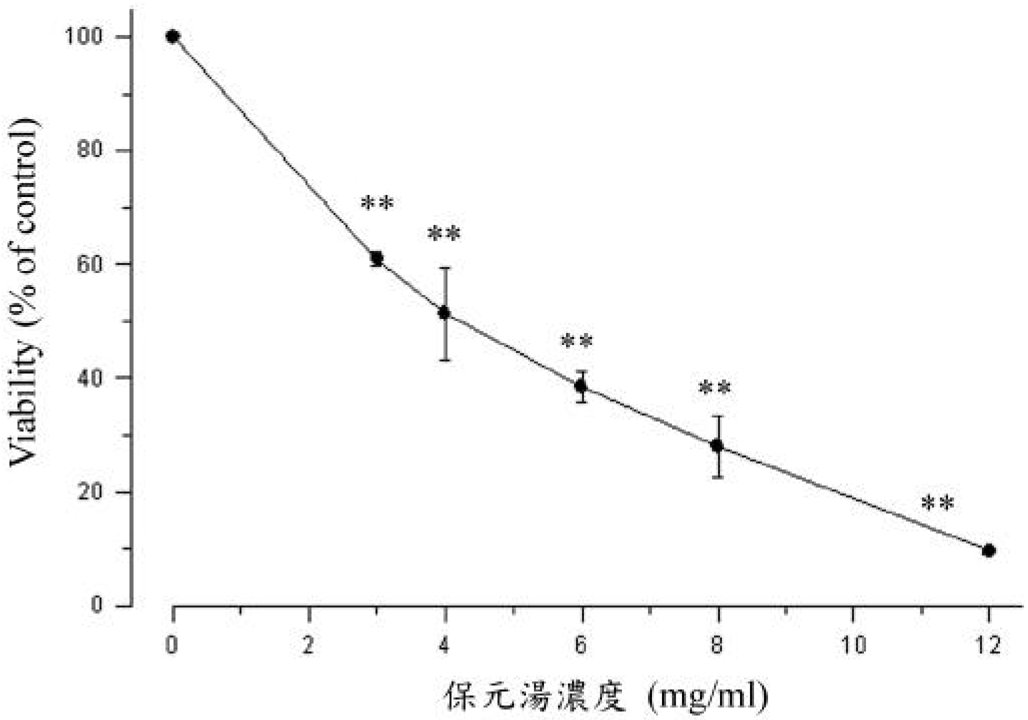

圖 4.2　保元湯對 MKN74 細胞株的存活曲線
實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** ** $P < 0.01$ **與不加藥對照組比較（**n = 3**）。**

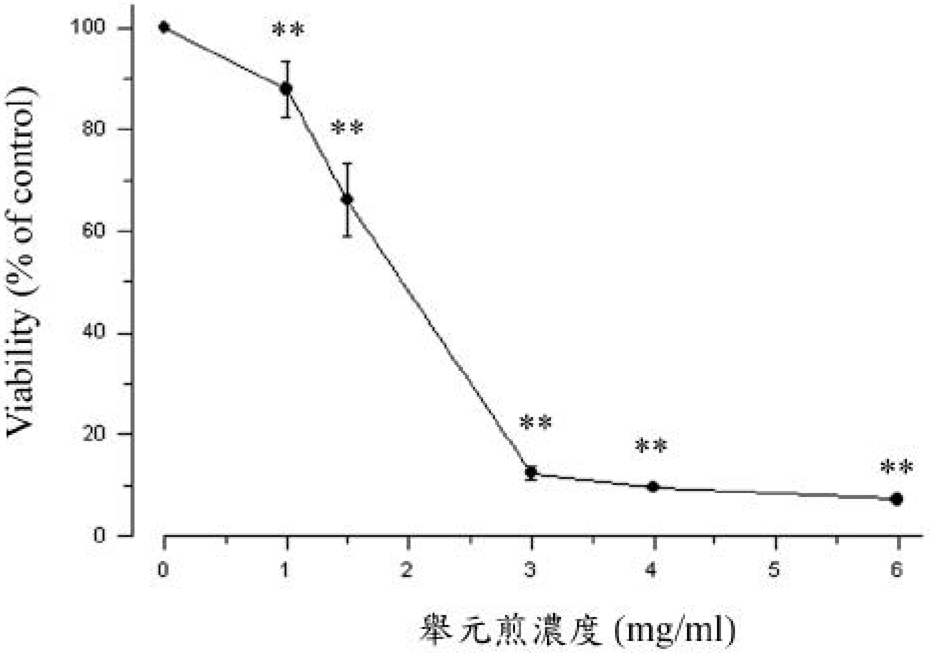

圖 4.3　舉元煎對 MKN74 細胞株的存活曲線

實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** ** $P < 0.01$ **與不加藥對照組比較（**n = 3**）。**

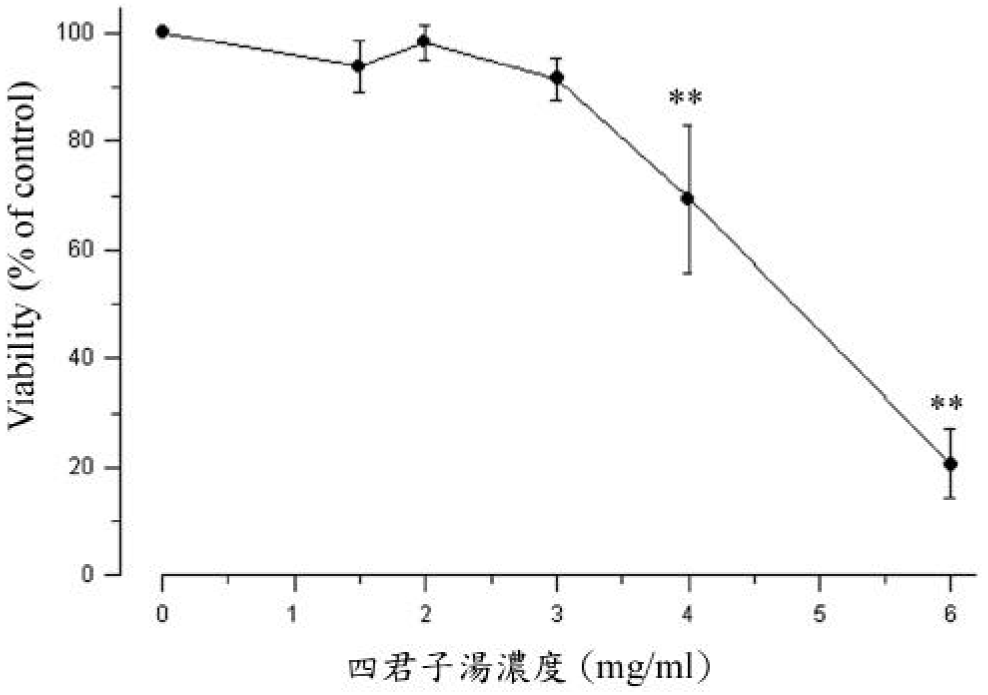

圖 4.4 四君子湯對 MKN74 細胞株的存活曲線

實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** ** $P < 0.01$ **與不加藥對照組比較（**n = 3**）。**

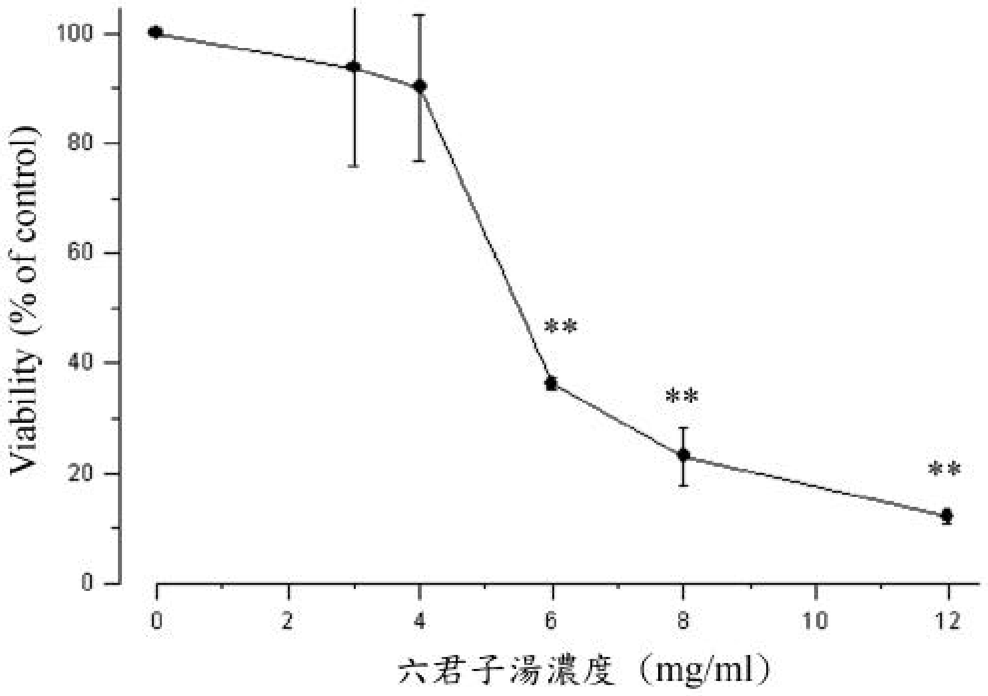

圖 4.5 六君子湯對 MKN74 細胞株的存活曲線

實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** ** *P* < 0.01 **與不加藥對照組比較（**n = 3**）**

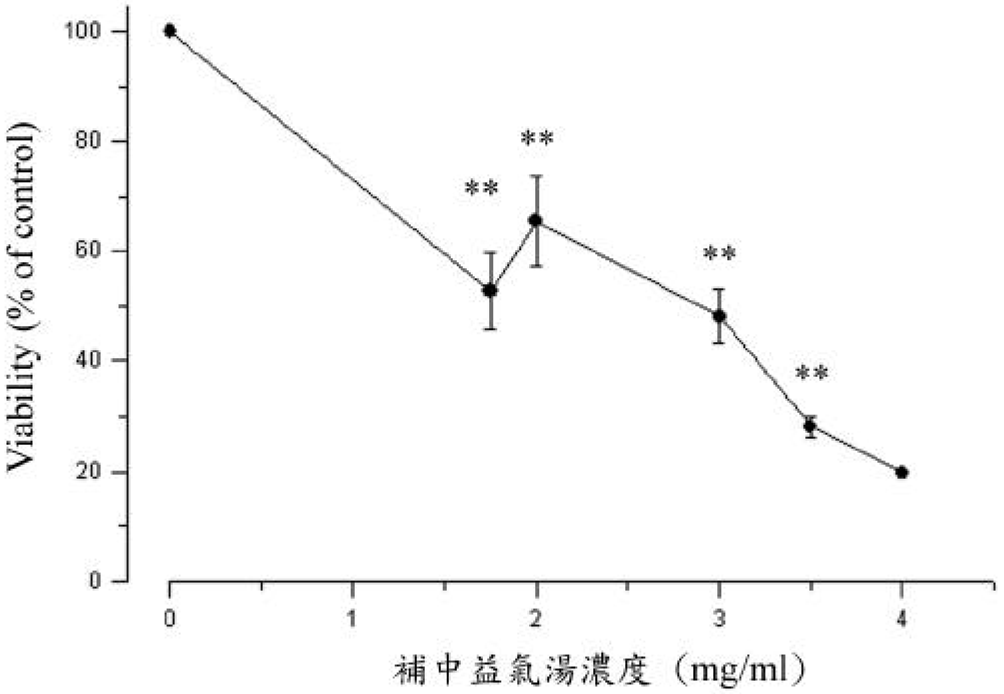

圖 4.6 補中益氣湯對 MKN74 細胞株的存活曲線

實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。**** *P* < 0.01 **與不加藥對照組比較（**n = 3**）。**

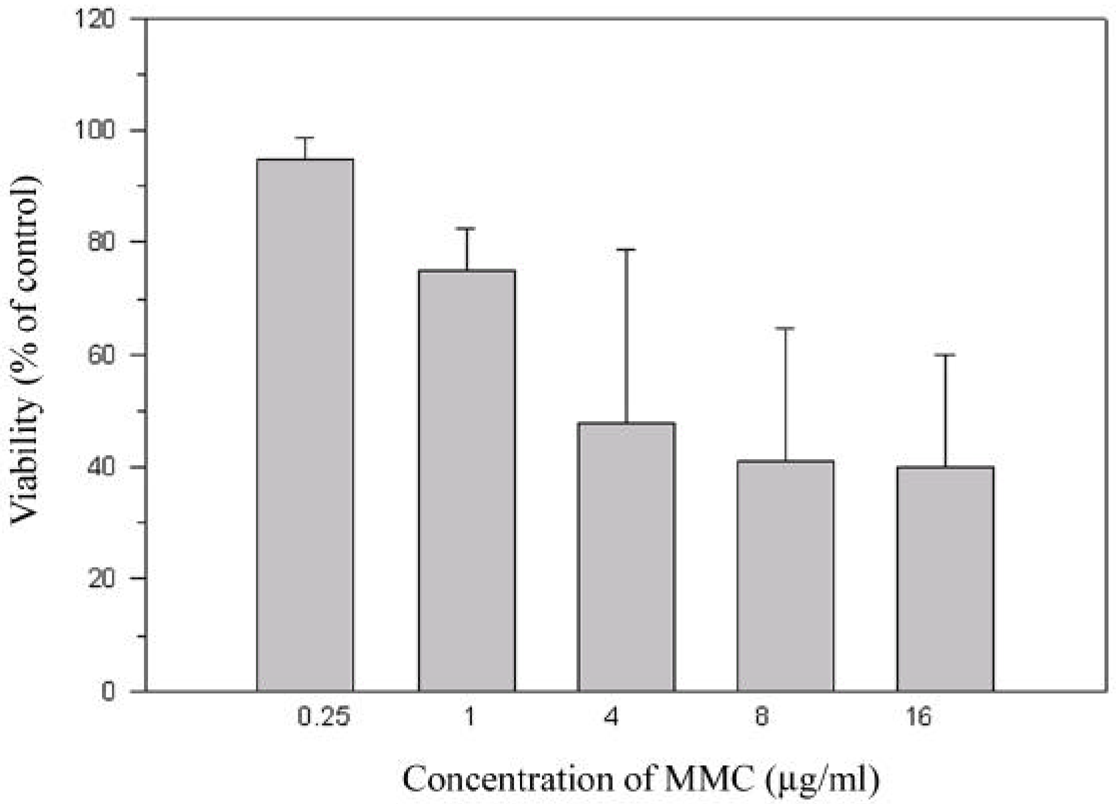

圖 4.7 不同濃度的 MMC 對 MKN74 細胞株的存活影響

其結果顯示 MMC 0.25 μg/ml **的細胞存活率：** 94.9 ±3.9**%，** MMC 1.0 μg/ml **的細胞存活率：** 75 ±7.7**%。**

實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** n = 3

表 4.1　各種補氣方劑的 IC_{10}與 IC_{50}值

	IC_{10}	IC_{50}
保元湯	0.43 mg/ml[a]	3.85 mg/ml
舉元煎	0.68 mg/ml	1.82 mg/ml
四君子湯	3.14 mg/ml	4.78 mg/ml
六君子湯	3.85 mg/ml	5.95 mg/ml
補中益氣湯	0.82 mg/ml	2.41 mg/ml

a: IC_{25} 值

四、五種補氣方劑與 MMC 1.0 μg/ml 對 MKN-74 細胞株的毒殺試驗

本實驗將篩選出與 MMC 合併作用下，具有促進 MMC 細胞毒殺作用之中醫補氣方劑。首先取五種補氣方劑之 IC_{10} 及 IC_{50}，分別加入 MKN-74 細胞株內一起培養 2 天，利用 MMT assay 計算出細胞存活率（圖 4.8 至圖 4.12）。結果顯示 MMC 加入保元湯、舉元煎、補中益氣湯具有促進細胞毒殺反應。

五、保元湯、舉元煎、補中益氣湯促進 MMC 0.25 μg/ml 對 MKN-74 細胞株的毒殺試驗

為進一步篩選出保元湯、舉元煎、補中益氣湯三種補氣方劑中，何者合併 MMC 的細胞毒殺作用最強。因此將保元湯、舉元煎、補中益氣湯以其 IC_{10} 濃度加入 MKN-74 細胞株內一起培養 2 天，第三天加入 MMC 0.25 μg/ml，以 MTT assay 計算細胞存活率（圖 4.13）。其結果補中益氣湯與保元湯有明顯能促進 MMC 的細胞毒殺作用，其中以補中益氣湯最顯著。

六、補中益氣湯與 MMC 對 MKN-74 細胞株的細胞凋亡反應

本實驗主要在探討補中益氣湯與 MMC 合併使用後促進細胞毒殺作用的作用機轉。因 MMC 劑量之不同我們將實驗共分成兩大組（表 3.1）（表 3.2），細胞培養三天後，利用 bisbenzimide trihydrochloride 染劑及定量螢光顯微鏡分析法（Quantitative Fluorescent Microscopy, QFM）計算細胞凋亡之百分率。

實驗結果發現，MMC 在 0.25 μg/ml 時，不論有無加入補中益氣湯，或是之前、之後加入，對於細胞凋亡的發生百分率均無明顯意義（圖 4.14）。而在 MMC 1.0 μg/ml 使用一天後加入補中益氣湯兩天與沒有加入補中益氣湯有顯著差異，$P<0.01$。而 MMC 在第一天加入與第三天加入其細胞凋亡率有明顯的差異，$P < 0.05$（圖 4.15），細胞凋亡之螢光圖見(圖 4.16)。因此得到在 MMC 1.0 μg/ml 使用後再加入補中益氣湯比起沒有加的反而抑制胃癌細胞產生細胞凋亡。而 MMC 1.0 μg/ml 對胃癌細胞株的細胞凋亡反應有明顯的延遲現象。

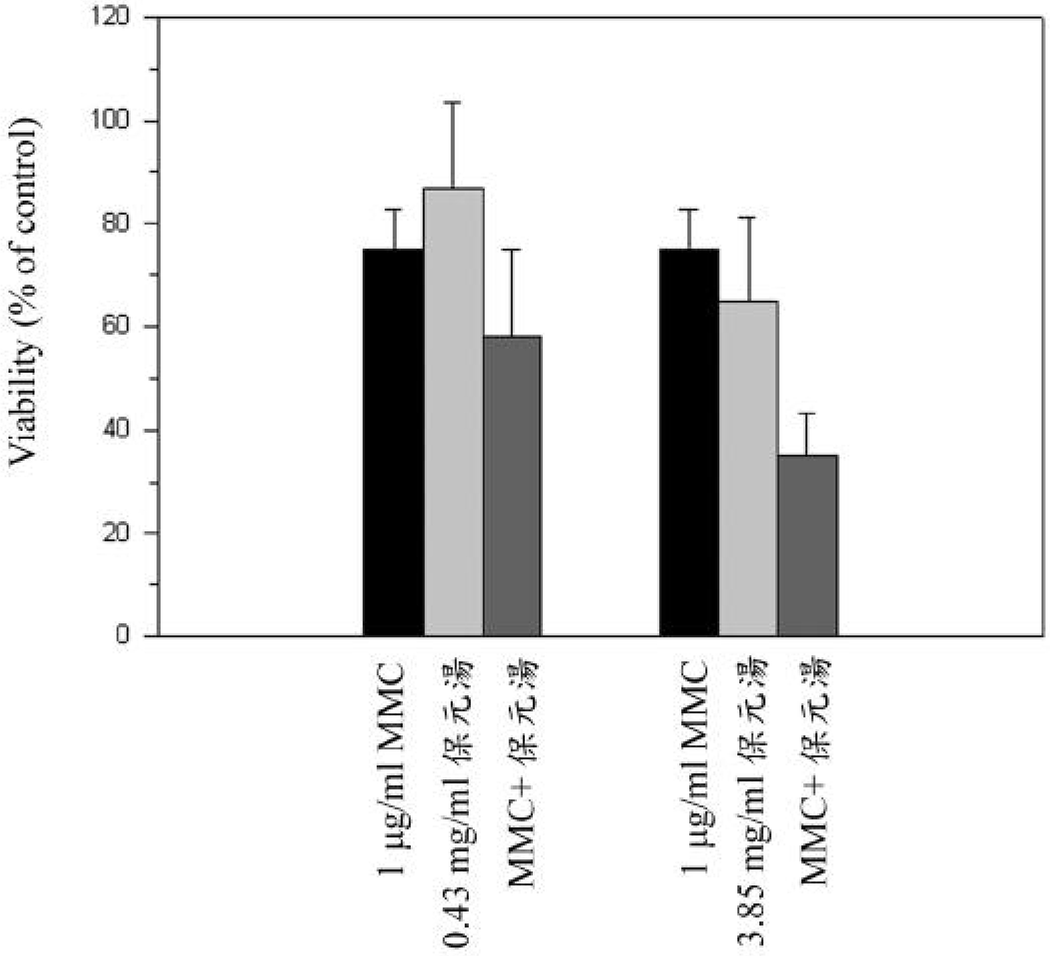

圖 4.8 保元湯與 MMC 1.0 μg/ml 對 MKN-74 細胞株的毒殺試驗實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** n = 3

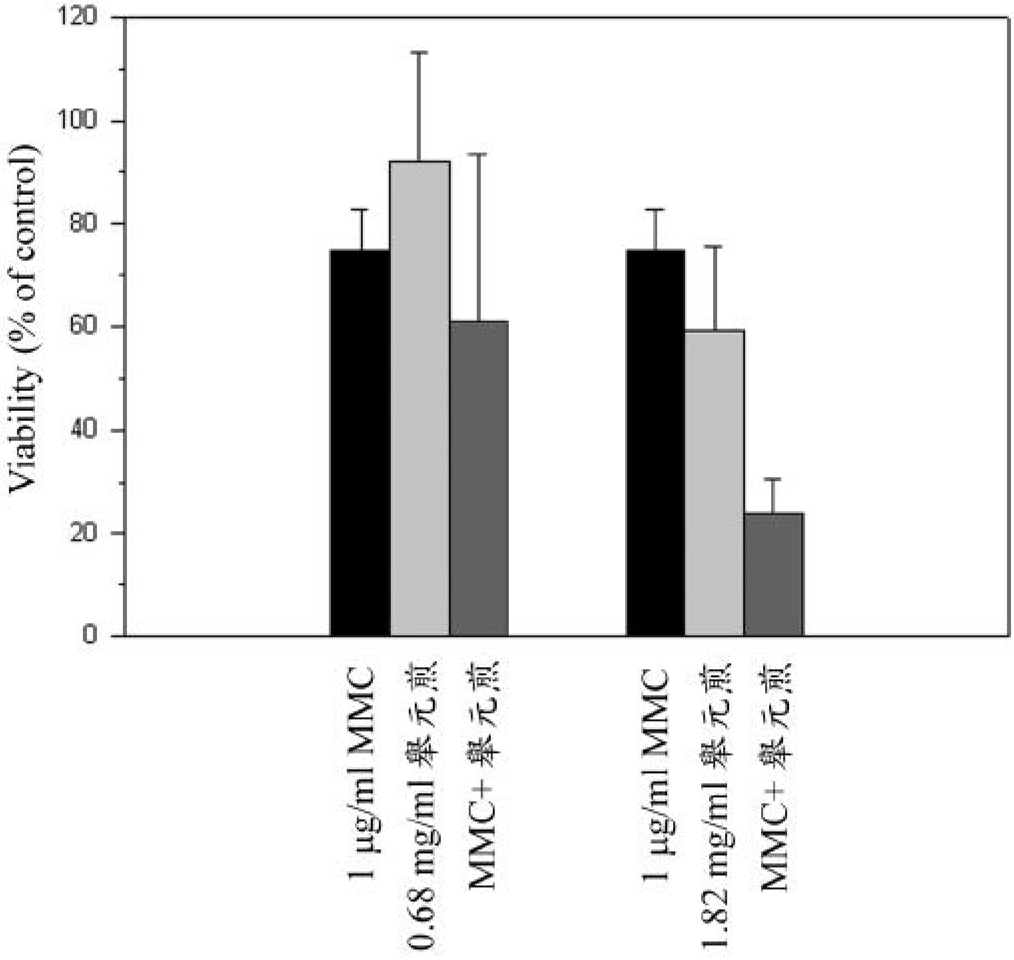

圖 4.9 舉元煎與 MMC 1.0 μg/ml 對 MKN-74 細胞株的毒殺試驗實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** n = 3

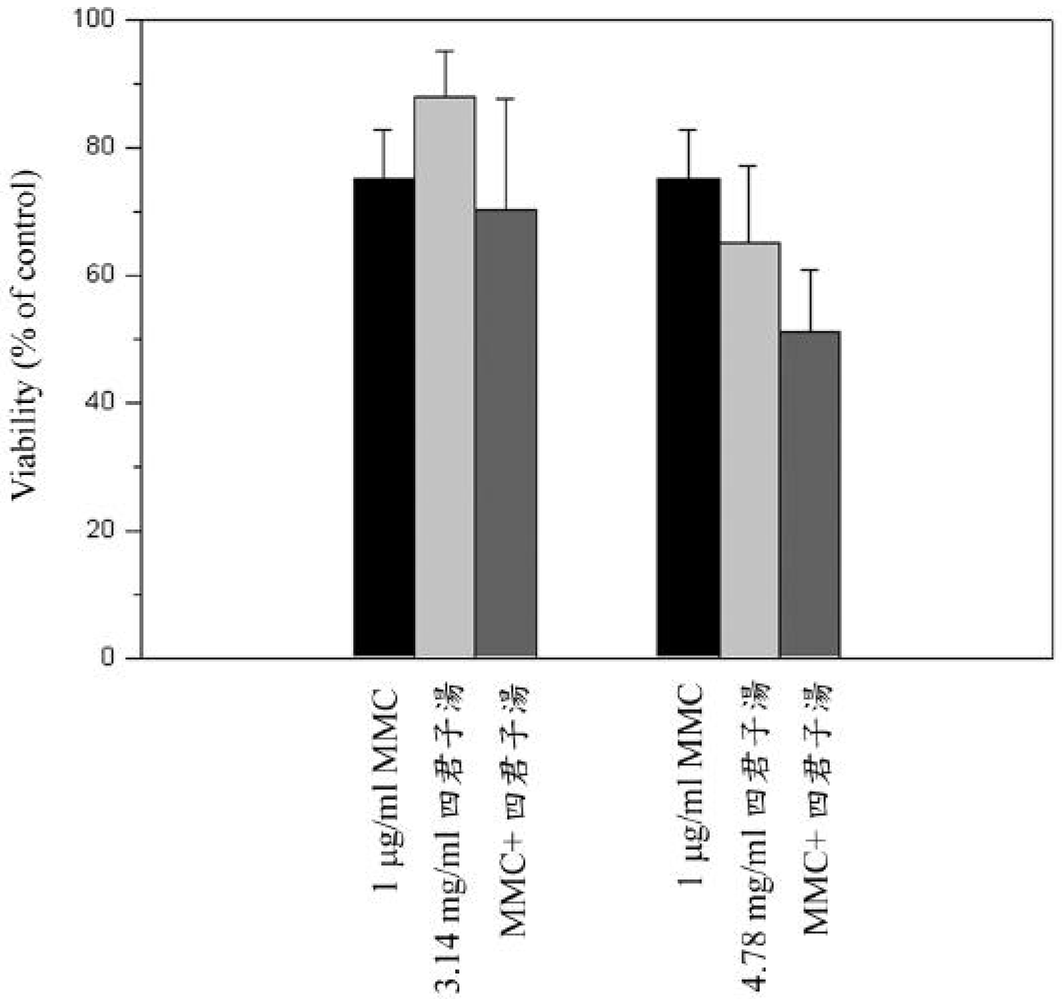

圖 4.10 四君子湯與 MMC 1.0 μg/ml 對 MKN-74 細胞株的毒殺試驗實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** n = 3**。**

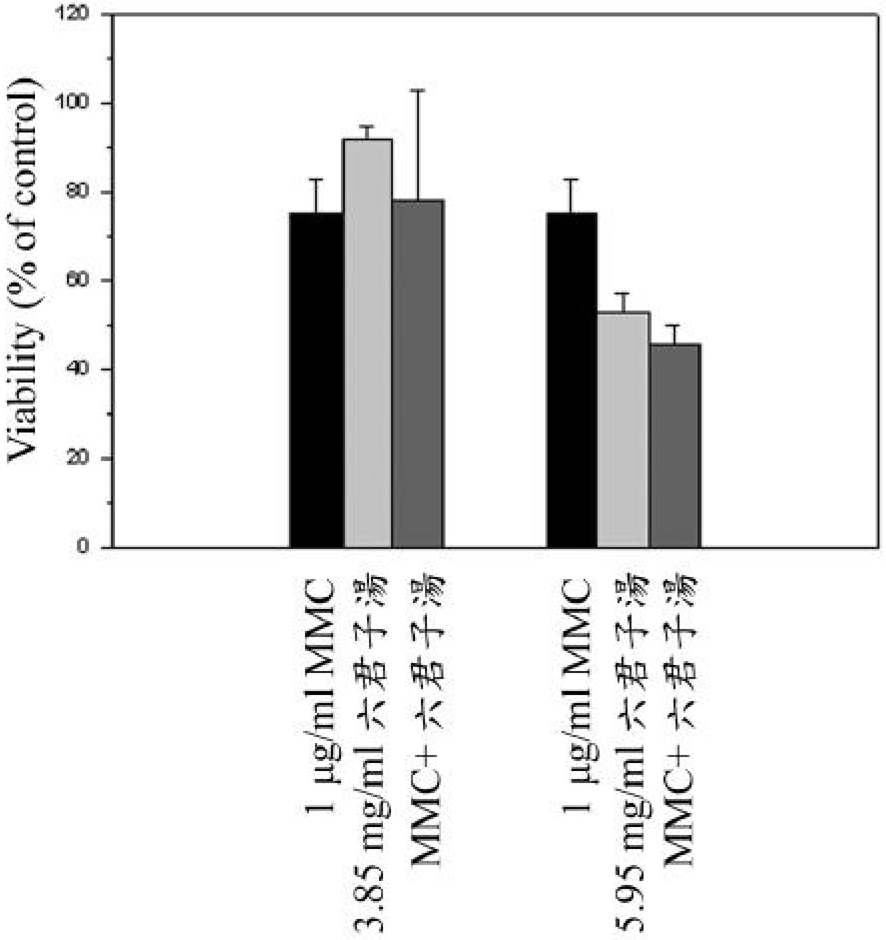

圖 4.11 六君子湯與 MMC 1.0 μg/ml 對 MKN-74 細胞株的毒殺試驗實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** n = 3**。**

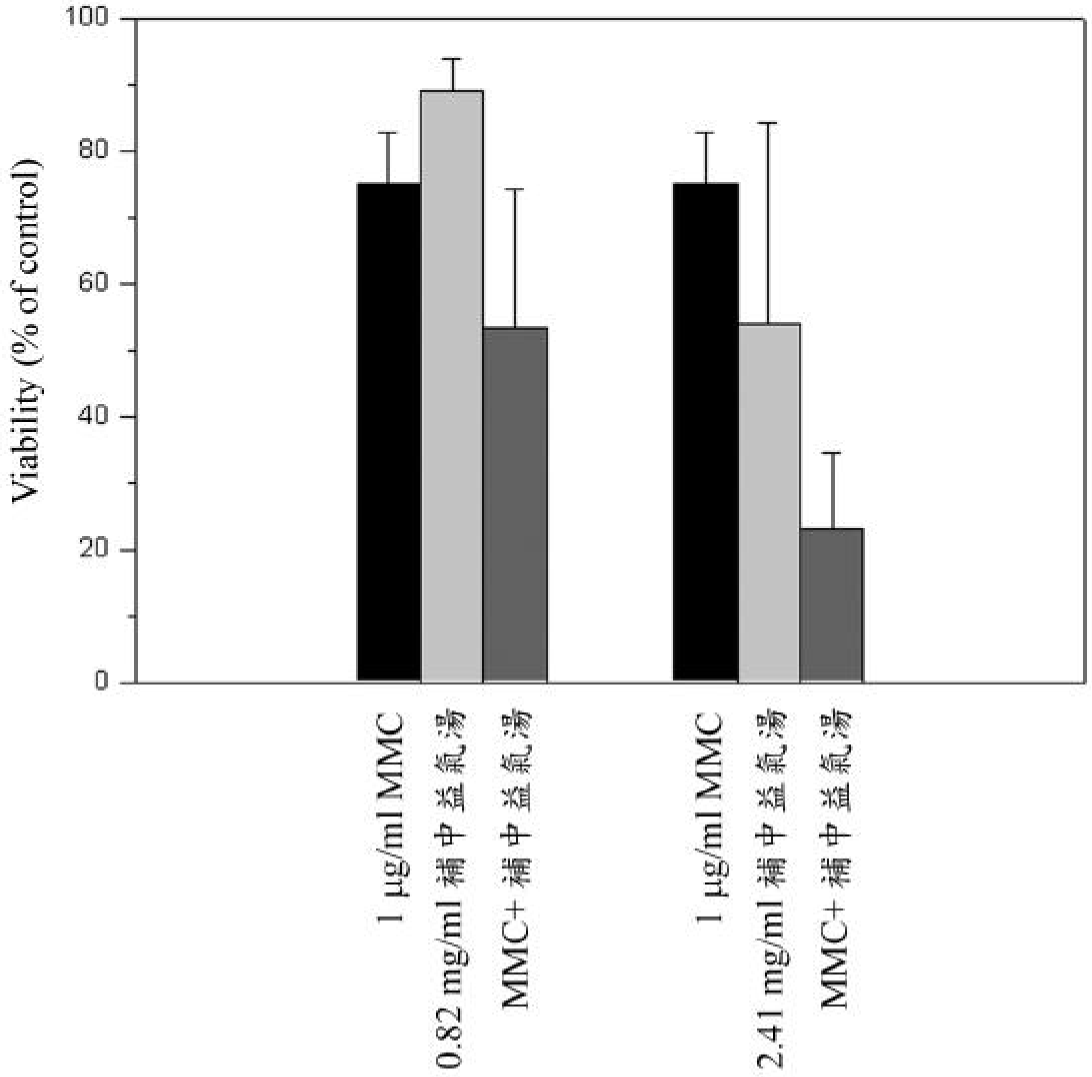

圖 4.12 補中益氣湯與 MMC 1.0 μg/ml 對 MKN-74 細胞株的毒殺試驗實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** n = 3。

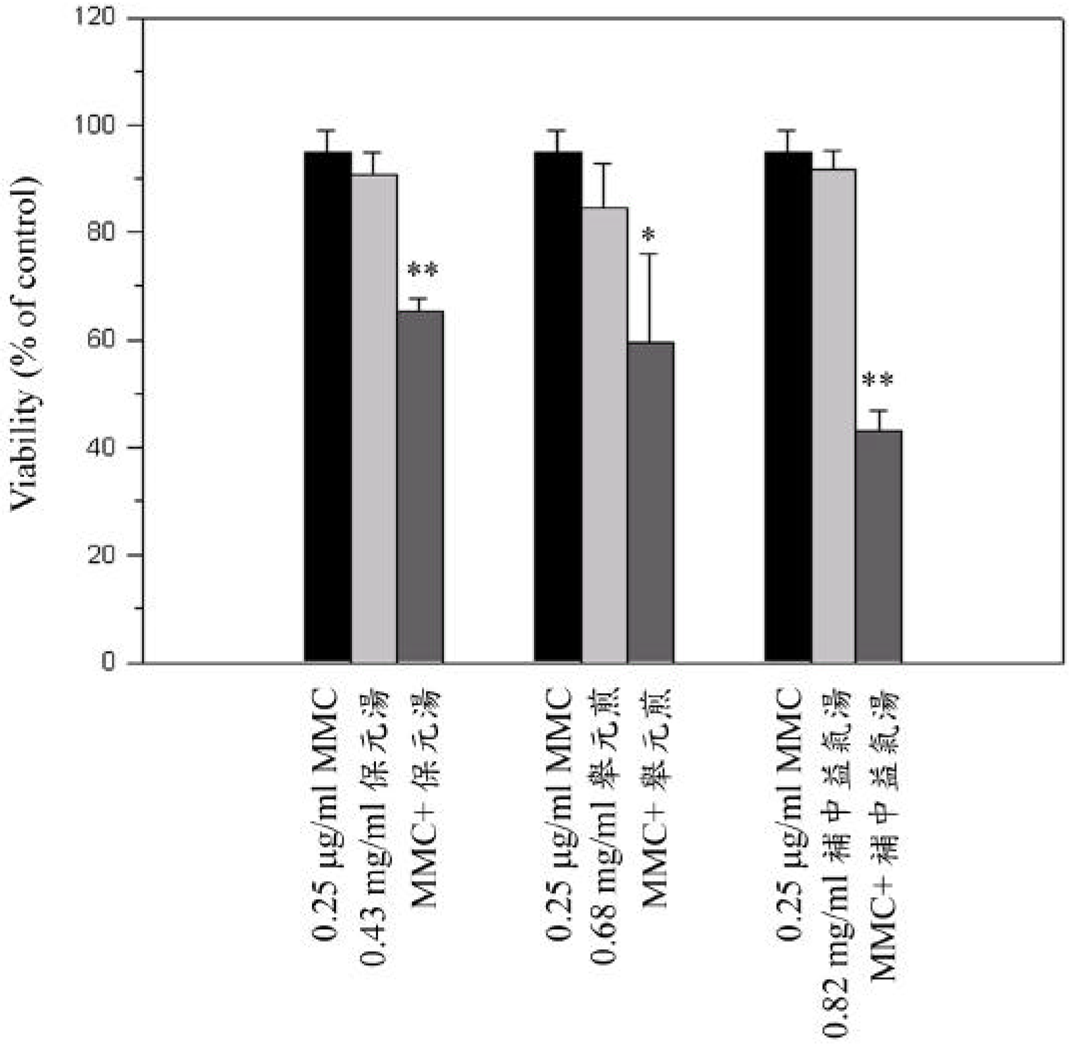

圖 4.13 三種補氣方劑促進 MMC 0.25 g/ml 對 MKN-74 細胞株毒殺作用之比較

結果顯示補中益氣湯與保元湯有明顯能促進 MMC **的細胞毒殺作用。其中以補中益氣湯最顯著。**

實驗結果以 mean ± S.D.**來表示。** * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ **與** 0.25 g/ml mitomycin C **處理實驗組比較**（n = 3）。

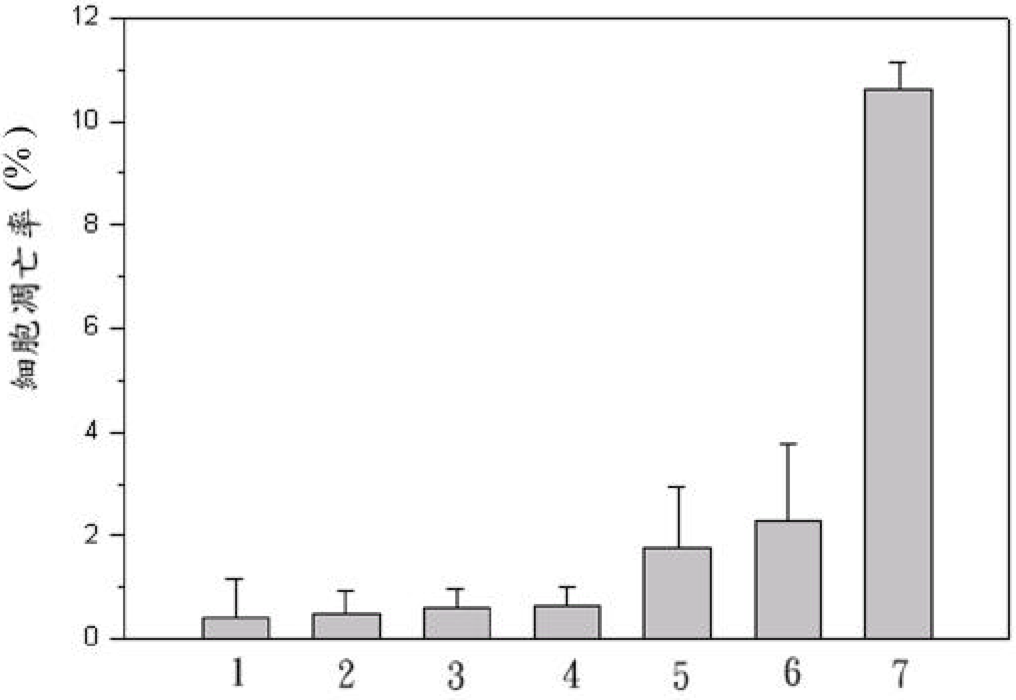

圖 4.14 補中益氣湯與 MMC 0.25 μg/ml **的細胞凋亡的反應**

第一組：對照組

第二組：補中益氣湯 3 days

第三組：MMC　0.25 μg/ml 1day

第四組：補中益氣湯 2 days **後加** MMC 0.25 μg/ml 1 day

第五組：MMC 0.25 μg/ml 1 day wash **後加補中益氣湯** 2 days

第六組：MMC 0.25 μg/ml 1 day wash **後培養** 2 days

第七組：第三天加入 MMC 0.25 μg/ml **及** safingo 50 μM

實驗結果發現，MMC **在** 0.25 μg/ml **時，不論有無加入補中益氣湯，或是之前、之後加入，對於細胞凋亡的發生百分率均無明顯意義。**

其結果以 mean ± S.D.**來表示。**n = 3。

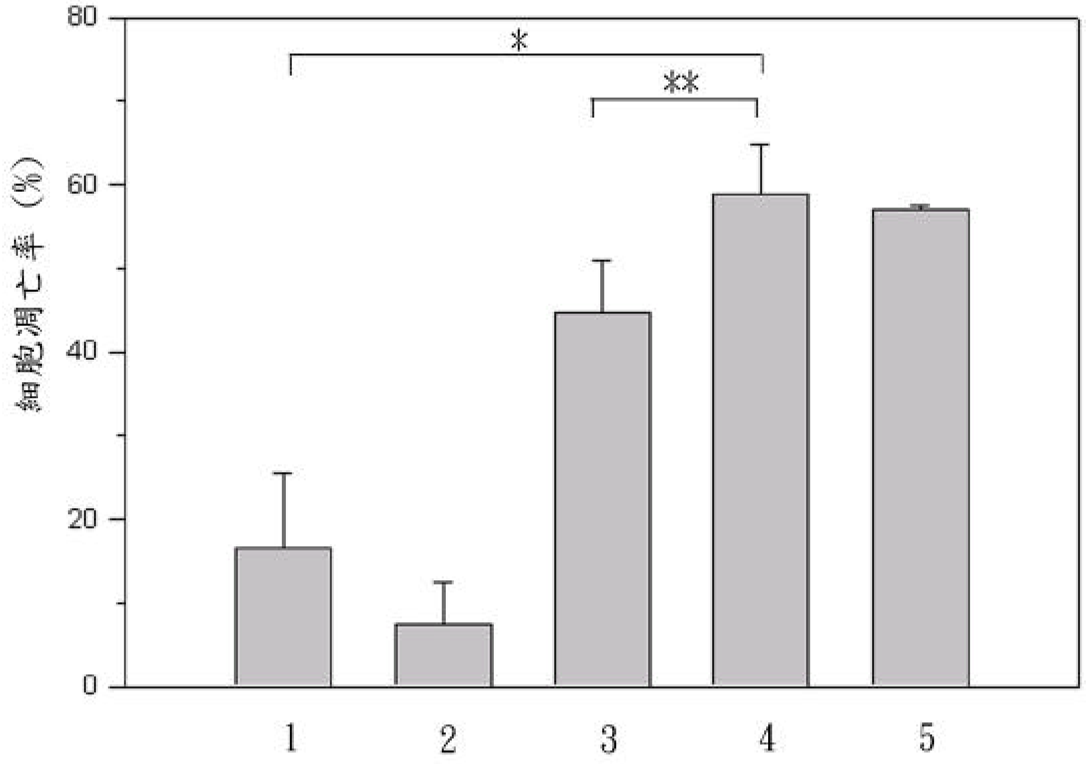

圖 4.15 補中益氣湯與 MMC 1.0 μg/ml **的細胞凋亡的反應**

第一組：MMC 1.0 μg/ml 1 day

第二組：補中益氣湯 2 days **後加** MMC 1.0 μg/ml 1day

第三組：MMC 1.0 μg/ml 1 day wash **後加補中益氣湯** 2 days

第四組：MMC 1.0 μg/ml 1 day wash **後培養** 2 days

第五組：第三天加入 MMC 1.0 μg/ml **及** safingo 50 μM

實驗結果 MMC 1.0 μg/ml**使用一天後加入補中益氣湯兩天與沒有加入補中益氣湯有明顯差異，**$P<0.01$。**而** MMC **在第一天加入與第三天加入其細胞凋亡率有明顯的差異，**$P < 0.05$。

其結果以 mean ± S.D.**來表示。** * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n = 6)。

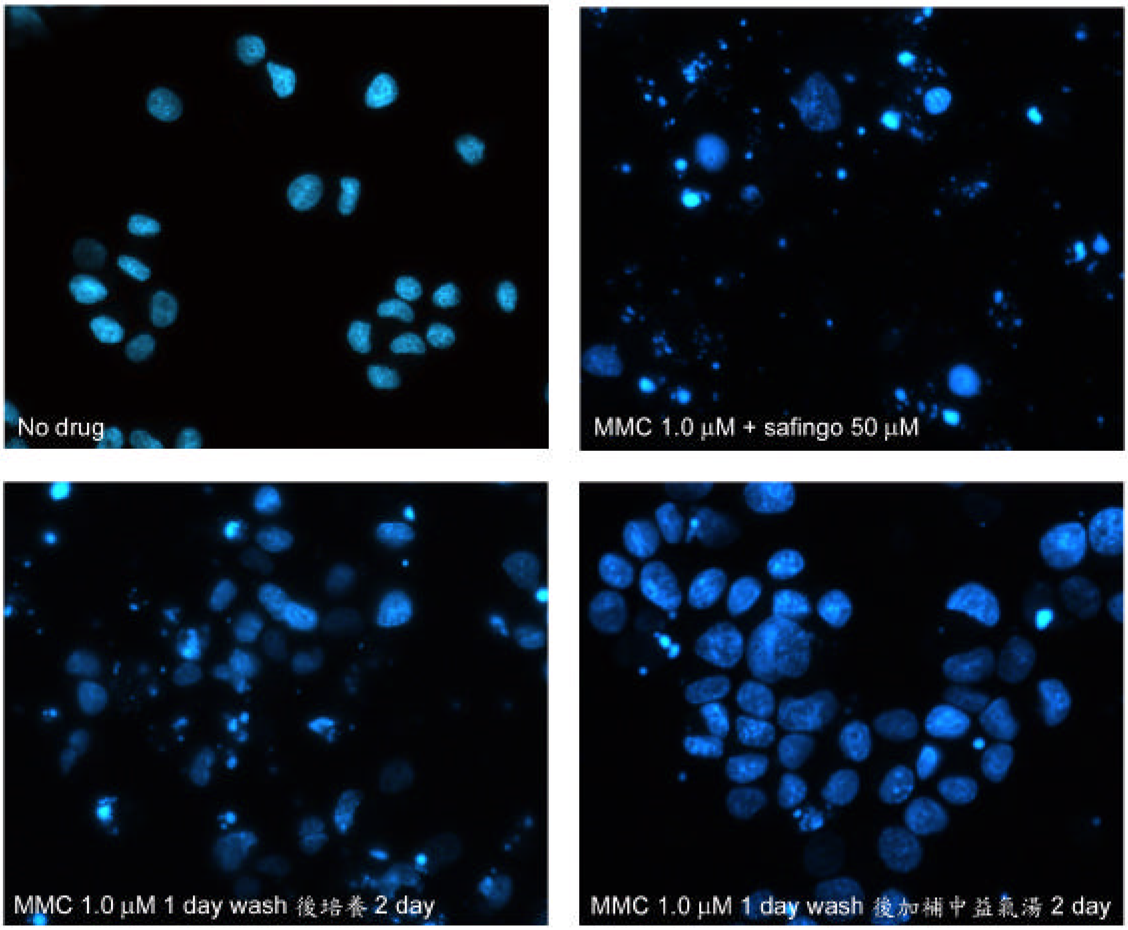

圖 4.16 補中益氣湯與 MMC 1.0 µg/ml 對胃癌細胞株的細胞細胞凋亡反應

螢光點表示 MKN-74 **細胞被** bisbenzimide trihydrochloride **染上細胞核中的濃縮染色質，表示細胞進行凋亡反應。發現正對照組（**MMC 1.0 µg/ml + safingo 50 µM**）產生細胞凋亡的比率最多。其次是** MMC 1.0 µg/ml 1 day wash **後培養兩天，第三是** MMC 1.0 µg/ml 1 day wash **後加補中益氣湯** 2 days**。顯示出補中益氣湯抑制** MMC **的細胞凋亡反應。**

第五章 討論

臨床上發現，胃癌的發生是一個複雜的過程，涉及機體多個系統變化。如局部病理型態、組織學特徵、全身免疫狀況、微量元素、血液流變學等。這些改變均與中醫辨證分型存在一定關係 [32-35]。研究顯示，胃癌組織中，細胞增值活性 PCNA、P53 蛋白、c-erbB-2 蛋白表達明顯增高，其中以中醫證型虛證組表現顯著 [36]。其中脾虛與胃癌前病變關係密切。胃癌前病變，主要伴存於慢性萎縮性胃癌（CAG）。其中 96 篇有關 CAG 論文中報導的 7496 例 CAG 辨證證型進行歸納，共有證型 23 個，脾虛證佔首位 [37]。脾虛症狀的輕重與胃癌前病變及胃癌發生、發展各階段病變之關係呈現正相關 [38]。此外，更進一步發現，脾虛氣滯的胃病其細胞分裂增殖加速，細胞分化產生障礙。由此可知，脾虛氣滯證的胃病有相當的癌變傾向 [39]。此外，幽門螺旋桿菌（H.P）是已知的胃癌危險因子。近來研究發現脾虛證與 H.P 感染關係密切 [40]。胃黏膜上 c-myc, p21, p53 陽性表達與 H.P 感染、胃黏膜病變呈平行關係，顯示 H.P 感染、致癌基因及抑癌基因表達與脾虛證關係密切 [41]。

中醫理論「脾為後天之本、氣血生化之源」及「邪之所湊，其氣必虛」，健脾補氣為治療胃癌之主軸。研究發現健脾法可延長胃癌患者生存期，並發現脾虛的嚴重度可預估患者的存活時間及預後 [42]。由於補氣方劑中多以健脾為主軸，因此，本實驗針對脾虛證型選定補氣相關方劑進行研究，以吻合胃癌發生的病理表現。

MMC 應用於化學治療上其副作用主要是骨髓抑制，最常見白血球、血小板的減少。在中醫辨證上以虛證為主 [9]，針對白血球減少，臨床主要以氣虛表現為主，見頭暈、乏力、易汗出，治宜補氣。因此補氣中藥對於化學治療副作用的緩解有一定的幫助，更加深本實驗選定補氣方劑的動機。

從研究結果發現，補氣方劑中篩選出補中益氣湯優於其他補氣方劑，針對給予中醫方劑二天後，第三天再投與 MMC 的實驗中，補中益氣湯確實能促進 MMC 對胃癌細胞株 MKN-74 的毒殺作用、降低胃癌細胞之存活率。補中益氣湯是補氣方劑之一種，其適應證型為脾氣虛合併中氣下陷，臨床上常用於癌症中晚期或是緩解化學治療之毒副作用以及

腫瘤術後調養[9,43]。最近，體內或體外實驗[44-50]發現補中益氣湯具有化學保護作用（chemopreventive effects）以及生物反應調節作用（biological response modifier），動物實驗中發現本方劑具有預防性抗腫瘤反應[51,52]。一些報導顯示，補中益氣湯抗腫瘤之成分可能與四種成份有關，像astragaloside[53], ginsenoside[54], saikosaponin[55-57], glycyrrhizin[58,59]。目前，補中益氣湯抗腫瘤實驗多以活體為主，對於補中益氣湯在細胞作用的詳細機轉論述較少，更遑論補中益氣湯與化療藥物毒殺細胞的作用機轉，尤其是針對胃癌。

本實驗結果證實補中益氣湯可促進 MMC 的胃癌細胞毒殺反應。進一步，我們想探討補中益氣湯促進 MMC 毒殺細胞之作用機轉。由於已知 MMC 對胃癌細胞株能產生細胞凋亡反應[11,29]。而印象中，一般天然藥物較不具強烈之副作用或是發炎反應。因此，本實驗針對補中益氣湯是否能促進 MMC 產生細胞凋亡反應進行設計，並嘗試補中益氣湯在 MMC 使用之前或之後加入，比較觀察其細胞凋亡之反應。由定量螢光顯微鏡分析法得知，補中益氣湯並不能協同促進 MMC 產生細胞凋亡反應，不管是 0.25 μg/ml 或 1.0 μg/ml。實驗中，有一組正對照組（positive conrol）選取 Safingo 加上 MMC。Safingo 本身是 PKC 的抑制劑，先前研究顯示 Safingo 可以藉由抑制 PKC 的反應, 促進 MMC 產生細胞凋亡[10,11]，因此，本實驗取其當作正對照組。而實驗組中，當 MMC 在 0.25 μg/ml 時，不論有無加入補中益氣湯，或是之前、之後加入其比較均無明顯意義。因此，我們嘗試提高 MMC 劑量至 1.0 μg/ml，看是否會拉大差距，經統計得知，MMC 在第一天加入與第三天加入其細胞凋亡率有明顯的差異（$P < 0.05$），因此發現 MMC 本身對胃癌細胞株的細胞凋亡反應具有延遲現象，亦即 MMC 只給藥一天，在第三天的細胞凋亡率明顯高於第一天。這一有趣現象是雖不是本次實驗探討的重點，但可提供在研究 MMC 抗癌藥理上，另一個重要的啟發。補中益氣湯在 MMC 1.0 μg/ml 之前與之後加入有明顯的差異（$P<0.05$）。而 MMC 1.0 μg/ml 使用一天後加入補中益氣湯兩天與沒有加入補中益氣湯比較有顯著差異（$P<0.01$）。因此得到在 MMC 1.0 μg/ml 使用後再加入補中益氣湯比起沒有加的反而抑制癌細胞產生細胞凋亡。推論補中益氣湯會抑制 MMC 1.0 μg/ml 產生細胞凋亡，尤其以 MMC 1.0 μg/ml 使用之後加入補中益氣

湯其抑制更顯著。針對補中益氣湯能促進 MMC 的細胞毒殺作用，但補中益氣湯抑制 MMC 的細胞凋亡反應，可確知補中益氣湯對於胃癌細胞產生細胞壞死反應。

目前研究顯示壞死也是計畫性死亡的一種[60]。以往所知，細胞壞死的產生是身體受病毒、細菌、原生物的感染，然後被細菌毒素，免疫反應如補體（complement），自然殺手細胞（activated natural killer），腹膜吞噬細胞（peritoneal macrophage）所誘發。近來發現，身體的其他病理狀態感染性疾病、Alzheimer disease、癲癇、缺血、發炎疾病均證實與壞死有關，證實與 cytokines， NO， reactive oxygen species(ROS)的分泌息息相關。越來越多的的證據顯示，細胞壞死是被調控的，是一種計畫性死亡。一般所熟知由細胞凋亡所控制的女性濾泡成熟至卵子的過程，primary T lymphocytes 受活化導致死亡，大腸細胞的更新，目前都證實細胞壞死亦參與其中[61-63]。相信本實驗可以繼續往訊息傳遞路徑探討，找尋補中益氣湯對於胃癌細胞株壞死的作用機轉。

其次，高尚德等人發表補中益氣湯對肝癌細胞有細胞凋亡作用[64]，與本實驗比較，其發表的補中益氣湯 IC_{50} 依不同肝癌細胞株約為 432μg/ml-2284 μg/ml 與本實驗的 IC_{50} 2.41 mg/ml 相差不多，因其實驗所用細胞株與本實驗不同，因此補中益氣湯對不同細胞誘發不同反應是極有可能性的。在補中益氣湯合併 MMC 的共同作用方面，Toshitaka 等人發表[65]有關補中益氣湯對 MMC 所誘發免疫功能低下的老鼠對於 HSV-1 病毒的感染有保護作用。其作用方向與本實驗的癌症治療方向不同。另外，游智勝等人[66]發表豬苓萃取物合併 MMC 對肝癌模型老鼠，發現合併治療比起分別治療可明顯增加其存活率。此研究方向與本實驗類似，但沒有進入細胞層次探討其機轉。因此我們從體外實驗出發，先明白補中益氣湯對胃癌細胞之作用機轉，進而向上提升為動物實驗、人體實驗，一方面運補中益氣湯促進化療藥物毒殺細胞的作用，另一方面利用健脾補氣來減少化療藥物之副作用，降低胃組織癌變機會。

本實驗仍有許多要探討之處，例如本實驗在細胞存活試驗中應增加一組正常細胞組，藉以觀察補中益氣湯的實驗濃度是否影響正常胃細胞。其次，在中藥製備過程中，由於本實驗仿造臨床中藥煎煮過程，利用純水抽提，並經過多道滅菌過濾，是否有效成份會因抽提過程，或加

水稀釋過程將不溶於水的有效成份遺失，這些仍需要進一步探討。

另外，本實驗推測補中益氣湯對胃癌細胞株的毒殺作用來自細胞壞死，下一步本研究將尋找細胞壞死有效的偵測 Marker**，進一步證實補中益氣湯的對胃癌細胞的毒殺作用確實來自細胞壞死。**

第六章 結論

一、保元湯、舉元煎、四君子湯、六君子湯、補中益氣湯中，保元湯及補中益氣湯均明顯促進 MMC 的細胞毒殺作用，其中以補中益氣湯作用最強。

二、當 MMC 0.25 μg/ml 時，補中益氣湯無明顯促進或抑制 MMC 0.25 μg/ml 產生細胞凋亡反應。

三、當 MMC 1.0 μg/ml 時，補中益氣湯會抑制 MMC 1.0 μg/ml 產生細胞凋亡，尤其以 MMC 1.0 μg/ml 使用之後加入補中益氣湯其抑制更顯著。由此可知，補中益氣湯對胃癌細胞的毒殺作用應來自細胞壞死反應。

第七章 參考文獻

1. **中華民國公共衛生年報**. **行政院衛生署**. 1999;60-61.
2. Palli D. Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. J Gastroentrol. 2000;35 Suppl 12:84-89.
3. Tadataka Y, Davide HA, Loren L. Textbook of Gastroenterology, 3rd ed. 1996:1500-1524.
4. Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. Oncol Rep 1998;5:527-529.
5. Kim JD, Kim JM, Pyo JO, Kim SY, Kim BS,Yu R. Capsaicin can alter the expression of tumor forming-retated genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. Cancer Lett 1997;120:235-241.
6. Yoshio T, Hitoshi T, Taku T, Haruhide S. Growth inhibition and apoptosis of gastric cancer cell lines by Anemaeehena asphodeloides Bunge. J gastroenterol 2001;36:79-90.
7. Ma J, Fu NY, Pang DB, Wu WY, Xu AL. Apoptosis unduced by isoliquiritigenin in gastric cancer MGC-803 cells. Planta Medica 2001;67:754-757.
8. **曹庭興、朱悟淳：中藥在腫瘤化療過程中對毒副反應的緩解作用。中國醫院藥學雜誌，**1999；19(8)：484-485.
9. **徐素紅：癌症化療毒副反應的中醫防治。中國腫瘤臨床與康復，**1999；6(3)：72-73.
10. Gary KS, Adriana HF, Scott KD, Desiree E. Reports. J of the National Cancer Institute 1995;87(18):1394-1398.
11. Hsueh CT, Chiu CF, David PK, Gary KS. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances mitomycin-C-induced apoptosis. Cancer Chemother Pharmacol 2000;45:389-396.
12. **何紹奇：現代中醫內科學。中國醫藥科技出版社，**1990：536-539.

13. 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.
14. 東漢?張仲景：金匱教學資料。啟業書局，1984：189-203.
15. 張伯臾：中醫內科學。知音出版社，1992；402.
16. 明代?張景岳：景岳全書。上海古籍出版社，1990：475-482.
17. 張伯臾：中醫內科學。知音出版社，1992：403.
18. 石學敏：中醫綱目。人民日報出版社，1992：2713-2714.
19. 許濟群、王綿之：方劑學。人民衛生出版社，1995：226-227.
20. 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.
21. Kerr JFR. A history study of hypertrophy and ischemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. J pathol Bacteriopl 1965;90:419-435.
22. 何康潔：有計畫的細胞凋亡（apoptosis）：其存在、機轉、及與疾病之關係。當代醫學，1996;23(10):785-789.
23. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-1462.
24. Wyllie AH. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). Br J Cancer 1993;67:205-208.
25. Gerard E, Trevor L. A matter of life and cell death. Science 1998;281: 1317-1321.
26. Tenniswood MP, Guenette RS, Lakins J, Mooibroek M. Active cell death in hormone-dependent tissue. Cancer Metastasis Rev 1992;11: 197-220.
27. Ellis RE, Yuan J, Horvits HR, Mechanism and functions of cell death. Annu Rev Cell Biol 1991;7:663-689.
28. 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.
29. Park IC, Park MJ, Hwang CS, Rhee CH. MMC induces apoptosis in a caspases- dependent and Fas/CD95-independent manner in human

gastric adenocarcinoma cell. Cancer Lette. 2000;158(2):125-132.
30. Schwartz GK, Jiang J, Kelsen D, Albino AP. Protein Kinase C: a novel target for inhibiting gastric cancer cell invasion. J Natl Cancer Inst. 1993;85:402.
31. Schwartz GK, Haimovitz-Friedman A, Dhuphleiter D, Maslak P. Potentiation of apoptosis by treatment with the protein kinase C-specific inhibitor safingo in mitomycin C-treated gastric cancer cells. J Natl Cancer Inst. 1993;87:1394.
32. 瞿淑芬：102 例胃癌中醫辨證分型與臨床病理分型的關係探討。中西醫結合雜誌，1989;9:14.
33. 陳建志：中醫診斷腫瘤方法研究近況。中西醫結合雜誌，1985;2:75.
34. 尹光耀：脾虛證與胃癌患者胃黏膜微量元素及氧化物測定的臨床意義。中西醫結合雜誌，1989;9:724.
35. 齊元富：41 例胃癌兼夾血瘀證的臨床研究。遼寧中醫雜誌，1995;22:64.
36. 章銳：胃癌中醫證型與細胞增殖活性及癌基因關係的研究。臨床老年保健，2001;4(3):159.
37. 范剛啟、王茵萍：健脾化瘀對胃癌前病變的細胞增殖凋亡作用。中國中西醫結合雜誌，2000;20(8):637-639.
38. 趙愛光、楊金坤、鄭堅：脾虛與胃癌發生的相關性研究。上海中醫藥雜誌，1998;(5):10-12.
39. 尹光耀、張武寧：脾虛證胃病胃黏膜亞細胞結構及其微量元素、DNA 研究的臨床意義。中國中西醫結合脾胃雜誌，1996;4(1):10-15.
40. 袁紅霞：胃癌前期病變與 HP 感染關係及臨床觀察。中國中西醫結合脾胃雜誌，1996;4(1):16-18.
41. 張萬岱：胃癌及癌前病變的中醫分型與幽門螺旋桿菌感染、癌基因表達的關係。中國中西醫結合脾胃雜誌，1998;6(1):5-6.
42. 沈克平、韓穎盈、趙海磊：健脾法延長胃癌患者生存期之探討。遼寧中醫雜誌，2001;28(12):725-726.
43. 吳建新：補中益氣湯治療直腸癌術後綜合證。浙江中西醫結合雜誌，1999;9(1):71-72.

44. **凌卓瑩：補中益氣湯對** LAK **細胞抗腫瘤活性的加強作用。癌症，** 1996;15(3):225.
45. Kao ST, Yang SL, Hsieh CC, Yang MD, Wang TF, Lin JG. Immunomodulation of Bu-Zong-Yi-Qi-Tang on *in vitro* granulocytecolony-stimulating-factor and tumor necrosis factor-a production by peripheral blood mononuclear cells. Immunopharmacol and Immunotoxicol 2000;22(4):711-720.
46. Tang B, Wu MY. Effect of TRH and buzhong yiqi tang on natural killer cell activity and endocrine in stress mice. Chung-Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih 1994;14(2):104-105.
47. Kaneko M, Kishihara K, Kawakita T, Nakamura T, Takimoto H, Nomoto K. Suppression of IgE production in mice treated with a traditional Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang. Immunopharmacology 1997;36(1):79-85.
48. Du FB, Wang RJ, Shao TY. Clinical and experimental observations of buzhong yigi decoction in the treatment of chronic hepatitis B. Chung-Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih 1993;13(6):333-335.
49. Ji YB, Jiang WX, Zhang XJ. Effects of buzhong yiqi decoction on anticancer activity and toxicity induced by cyclophosphamide. Chung-Kuo Chung Yao Tsa Chih- China Journal of Chinese Materia Medica 1989;14(3):48-51.
50. Satomi N, Sakurai A, Limura F, Haranaka K. Japanese modified traditional Chinese medicines as preventive drugs of the side effects induced by tumor necrosis factor and lipopolysaccharide. Mol Biotherapy 1989;1(3):155-163.
51. Cho JM, Sato N, Kikuchi K. Prophylactic antitumor effect of Hochu-ekki-to (TJ41) by enhancing natural killer cell activity. In vivo 1991;5(4):389-391.
52. Harada M, Seta K, Ito O, Tamada K, Li T, Terao H, Takenoyama M, Kimura G, Nomoto K. Concomitant immunity against tumor development is enhanced by the oral administration of a kampo

medicine, Hochu-ekki-to(TJ-41: Bu-Zhong-Yi_Qi-Tang). Immunopharmacol and Immunotoxicol 1995;17(4):687-703.

53. Abdadallah RM, Chazy NM, El-sebahy NA, Pirillo A, Verotta L. Astragaloside from Egyptian Astragalus spinosus Vahl. Pharmazie. 1993;48(6):452-454.
54. Shinkai K, Akedo H, Mukai M, Imamura F, Isoai A, Kobayashi M, Kitagawa I. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. Jpn J of Cancer Res 1996;87(4):357-362.
55. Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. Cancer Lette 1994;86(1):91-95.
56. Okita K, Li Q, Murakami T, Takahashi M. Anti-growth effects with components of Sho-saiko-to (TJ-9) on cultured human hepatoma cells. Eur J Cancer Prev 1993;2(2):169-175.
57. Qian L, Murakami T, Kimura Y, Takahashi M, Okita K. Saikosaponin. A-induced cell death of a human hepatoma cell line (HuH-7): the significance of the ‘sub-G1 peak’ in DNA histogram. Pathol Int 1995;45(3):207-214.
58. Suzuki F, Schmitt DA, Utsunomiya T, Pollard RB. Stimulation of host resistance against tumors by glycyrrhizin, an active component of licorice roots. In Vivo 1992;6(6):589-596.
59. Agarwal R, Wang ZY, Mukhtar H. Inhibition of mouse skin tumor-initiating activity of DMBA by chronic oral feeding of glycyrrhizin in drinking water. Nutrition & Cancer 1991;15(3-4): 187-193.
60. Sergey YP, Anatoli GK, Vladimir LG: Necrosis: a specific form of programmed cell death. Exp Cell Res, 2003;283:1-16.
61. Murdoch WJ, Wiken C, Young DA. Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles, J. Reprod. Fertil 1999;117:325-329.
62. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M. Fas trigger an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as

effector molecule. Nat. Immunol 2000;1:489-495.

63. Barkla DH, Gibson PR. The fate of epithelial cells in the human large intestine. Pathology 1999;31:230-238.
64. Kao ST, Yeh CC, Hsieh CC, Yang MD, Lee MR, Liu HS, Lin JG. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via Go/G1 arrest. Life Science 2001;69:1485-1496.
65. Toshitaka K, Kazuya M, Haruyuki D, Hiroshi T, Atushi I, Hiroshi S. The Protective Effect of Hochu-ekki-to(TJ-41), a Japanese Herbal Medicine, against HSV-1 infection in Mitomycin C-Treated Mice. Anticancer Res. 2000;20:4109-4114.
66. You JS, Hau DM, Chen KT, Huang HF. Combined Effects of Chuling(*Polyporus umbellatus*) Extract and Mitomycin C on Experimental Liver Cancer. Am J of Chin Med 1994;112(1):19-28.

Effests of Bu Qi formula of Chinese Medicine on the Human Gastric Adenocarcinoma Cells

Che-chang Kuo
Major professor: Jian-jung Chen
Institute of Chinese Medicine Science, China Medical College

Gastric cancer is a common cancer worldwide and is reported to be the one of the most common cause of death in Taiwan. However, many patients are found to have advanced cancer at the time of diagnosis, and have poor prognosis despite of cytotoxic anticancer therapy.

In this study, we aim to identify an effective regimen combining Tranditional Chinese medicine (TCM) and Mitomycin-C (MMC) on MKN-74 human gastric adenocarcinoma cell line. We are interested in identifying the most effective combination and its mechanism,by way of MTT assay and the Quanitative Flurescent Microscopy assay.

Among all the TCM tested, Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang (BZYQT, Japanese named Hochu-Ekki-To, TJ-41) enhanced MMC induced cytotoxicity most, BZYQT in combination with MMC showed enhanced cytotoxicity but no increased apoptosis when compared to MMC alone. These cytotoxic MKN-74 cells by BZYQT are from cell necrosis, but not from cell apoptosis. These results provide rationale for further animal study, and clinical trial on gastric cancer therapy.

Key word: Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang; Hochu-Ekki-To; gastric cancer; Apoptosis; necrosis; Mitomycin-C