

發明專利說明書

※申請案號：

※申請日期：

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

用於治療癌症之當歸萃取物 / ANGELICAE SINENSIS EXTRACTS USEFUL FOR TREATMENT OF CANCERS

二、申請人：共 人

指定為應受送達人

三、發明人：

◎專利代理人：

四、聲明事項

主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

主張專利法第二十六條微生物：

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存

五、中文發明摘要：

本發明提供當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物、或己烷萃取物，以及由其純化所得之活性成分。

六、英文發明摘要：

The invention provides an acetone extract, chloroform extract or hexane extract purified therefrom such as n-butylidenephthalide, which are effective in treating cancer.

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

[發明所屬之技術領域]

本發明主要關於當歸 (*Angelicae sinensis*) 之丙酮萃取物、氯仿萃取物或己烷萃取物，及由其純化所得之活性成分。

[先前技術]

癌症為不正常之細胞增生，起因於細胞中基因變化之累積而賦予增生潛能。癌症治療主要於手術、化療及放射線治療。預防癌症之新方向。

當歸 (*Angelicae sinensis*; Dangqui) 為傳統中國醫藥處方中，最常使用的藥物之一。當歸之萃取物用於治療婦女月經不正常之疼痛，及降低血膽固醇 (Chinese Herbs, Shanghai Science and Technology Institute, 1991)。中國專利CN1053747揭示製備傘科植物當歸 (*Angelicae sinensis* (Oliv) Diels, ASD) 及ASDP與ASDP之衍生物。

免疫佐劑。於CN1109356中報導由當歸(*Angelicae sinensis* (Oliv)Diels、ASD)萃取之有效成分，可作為免疫佐劑。Kumazawa等人提供由當歸之水草萃取物分離之免疫刺激性多醣類，由於其抗體產生力強，可作為具潛力之佐劑(Y. Kumazawa等人，*Immunology*, Vol. 47, p. 75, 1982)。然而，此先前技術之癌症治療之一般性敘述，關於機制並無充足的證據。

[發明內容]

本發明提供當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物、或己烷萃取物，以及由其所純化之成分，例如正一亞丁基苯酞(Telomerase)活性，且進一步誘發其細胞凋亡而可使用於治療惡性腫瘤(malignant neoplasm)藥物，以及由其所純化之成分，例如正一亞丁基苯酞，有潛力於製造癌症治療之醫藥品，且可經口服用。

因此，本發明之一目的係提供於腫瘤組織中，抑制癌細胞增生及移轉之方法。

本發明之另一目的係提供抑制癌細胞端粒酶活性之方法。

本發明之又一目的係提供誘發癌細胞凋亡(apoptosis)之方法。

本發明之再一目的係提供當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物或己烷萃取物，以及由其所純化之成分，經由其於細胞週期調節與端粒酶抑制性之活性，與化療藥物組合作為佐劑。

[實施方式]

本發明提供當歸之有機溶劑萃取物，由其所純化之成分，例如正一亞丁基苯酞(BP)，可抑制癌細胞增生且可用於癌症治療。

當歸萃取物之製備

當歸(*Angelicae sinensis* ; Dangqui)長時間以來係使用於血液疾病與女性疾病。一般而言，當歸係由正一亞丁基苯酞(*Angelicae sinensis* (Oliv)Diels)之乾燥根部。*Angelicae sinensis* (後文簡稱為AS)為此項技術領域中，或純化*Angelicae sinensis*之個別活性成分。*Angelicae sinensis*之有機溶劑萃取物可由此萃取物中純化。當歸係以丙酮、氯仿或己烷類萃取。本發明之一具體例中，當歸係以丙酮萃取，製得萃取物為AS-A。再者，AS-A進一步使用氯仿萃取，製得萃取物為AS-C；且AS-A係以己烷類萃取，製得萃取物為AS-D。

活性成分之純化

*Angelicae sinensis*之活性成分可使用任何習知之技術，由*Angelicae sinensis*之有機溶劑萃取物中純化，特別是根莖部分。可使用於進一步純化之技術包括過濾、選擇性萃取、液相層析(HPLC)等。根據本發明，由*Angelicae sinensis*之有機溶劑萃取物中純化某些活性成分，例如正一亞丁基苯酞(n-butylidenephthalide)，該等活性成分可誘發腫瘤細胞凋亡(apoptosis)。本發明之一具體例中，係以HPLC及NMR加以特徵化。

癌症治療機制

端粒(telomeres)，為真核染色體之末端，係維持基因體之完整性所必需且於細胞成熟(aging)及衰老中扮演重要角色。端粒長度及其減少速率於器官與個體中多所變化。人類與老鼠之端粒長度有大的染色體內變化，且端粒長度之減少可導致異常的染色體分離(chromosomal segregation)(L. L. Sandell, V. A. Zakian, *Cell*, 75, 729-738, 1993)。顯然地，細胞具有對抗端粒之重要的減短及異常延伸兩者之保護系統。已確立端粒酶活性之抑制可誘發細胞凋亡(G. B. Morin, *Cell*, 59, 521-529(1989))。因此，具有選擇性抑制端粒酶活性之任何化合物或物質，可誘發細胞凋亡為癌症治療之另一機制，已成為細胞生物學研究的最新領域。

細胞凋亡進程的活化係由來自細胞內及細胞外刺激之多種信號調控。事實上，近年來的證據開始顯示端粒酶活性之抑制可誘發細胞凋亡。期望與細胞凋亡相關之新藥物更有效對抗具高增生速率之腫瘤。已篩選許多該等候選者。Montaner, Esther Llagostera, Vanessa Soto-Cerrato. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1447-1454(2003)。細胞凋亡由兩個通常使用之終點分析而偵測：細胞之形態改變(核染色質之濃縮、細胞凋亡體之形成)及DNA之片段化(oligonucleosomesized fragment)(多個200bp)，其於瓊脂膠電泳呈現DNA帶之「階梯」模式。該等分析去定量族群中凋亡細胞之百分比。為此，本發明於固定細胞中添加螢光-生物素化核糖核苷酸以偵測細胞凋亡。Piettea, *, Ce' dric Volantia, Annelies Vantieghemb, Jean-Yves Yvette Habrakena, Patrizia Volantia. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1651-1659(2003))。

對於藥物誘發之細胞凋亡之受體及粒線體途徑之相關分部已成為爭論之主題。取決於毒性藥物本質，細胞凋亡可經由Fas/FasL途徑中信號之細胞種類。

相分離：均質化之樣品於15至30°C培養5分鐘，以使核蛋白複合體(nucleoprotein complexes)完

(Riedel-de-Haën)。將樣品瓶嚴密封套。樣品瓶以手劇烈震盪15秒且於15至30°C培養2至3分鐘。混合物分為下層紅色之酚-氯仿相、中間相(interphase)、及無色之上層水相。RNA獨有地保留於水相中。RNA沉澱：將水相移至乾淨瓶中。水相與異丙醇(Fluka)混合沉澱RNA。於起始均質化所添加之Trizol於不超過12,000xg下，於2至8°C離心10分鐘。

RNA清洗：移除上清液。使用75%酒精清洗RNA沉澱一次，於起始均質化所添加之Trizol試劑每1ml於2至8°C離心5分鐘。

再溶解RNA：移除上清液後，乾燥RNA小粒。溶解RNA於無RNase之水中，且於55至60°C培養10分鐘。

細胞株
測試人類腫瘤細胞株(MCF-7、CL1-5、HT-29、Caco-2)、人類臍帶血管內皮細胞(human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)、人類皮膚纖維母細胞(human dermal fibroblasts; HDFs)對 *Angelicae sinensis* 萃取物、蒿本內酯(ligusticin)之敏感度。將DBTRG-05MG, BCM, HL-60及J5細胞，於37°C供給5%CO₂之潮濕大氣下，生長於含有10%胎牛血清之DMEM培養基。將G5T/VGH、RG2、N18、SVEC及Balb/3T3細胞，於37°C供給5%CO₂之潮濕大氣下，生長於含有10%胎牛血清之DMEM培養基。於各試驗前，使用PCR篩檢法排除受黴漿菌(mycoplasma)感染之培養細胞。

實施例1—細胞毒性之分析

以不同濃度之 *Angelicae sinensis* 萃取物或由其純化之活性成分處理對細胞存活之效果，以3000個細胞/孔之密度，於96孔盤中，以100 μl生長培養基之96孔盤。使細胞附著24小時後，使用100 μl之溶解於培養基之植物萃取物處理細胞。於24、48及72小時後，含有藥物之培養基以50 μl新鮮培養基置換，且於各孔之細胞於50 μl之400倍稀釋液中，以MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)測定。以MRX微量滴定盤冷光儀(DYNEX, USA)測定溶液於550 nm之吸光度。或活性成分對於GBM細胞生長速率之影響，5x10³個指數生長細胞以不同濃度處理24、48及72小時。本研究所需之藥物濃度。本研究之所有試驗均為三重複。

表 1. 不同 *Angelicae sinensis* 有機溶劑萃取物、BP 及其衍生物於不同細胞株之細胞毒性 (IC₅₀)

		細胞毒性 (IC ₅₀)				
		正常細胞		癌細胞		
		HUVEC	HDF	Caco-2	MCF-7	RG2
萃取物 (μ g/ml)	AS-A	91.85	>100	>100	92.06	6.83
	AS-C	44.19	85.08	51.17	>100	7.22
	AS-H	>100	66.55	>100	62.42	30.49
	BP	>100 (>532 μ M)	300 (1596 μ M)	>20 (>106 μ M)	>20 (>106 μ M)	4 (7.45 μ M)
	BP-E 型	>100 (>532 μ M)	>100 (>532 μ M)			>20 (>106 μ M)
	BP-Z 型	>100 (>532 μ M)	65.25 (347 μ M)			>20 (>106 μ M)

Caco-2: 人類結腸腺癌細胞 MCF-7: 人類乳癌細胞 RG2: 老鼠惡性神經膠質瘤 (rat malignant glioma)

表 2. *Angelicae sinensis* 之有機溶劑萃取物及 BP 於不同細胞株之細胞毒性 (IC₅₀)

	AS-A (μ g/ml)	AS-C (μ g/ml)	AS-H (μ g/ml)	BP (μ g/ml)
A549	90-100			8-12(42.6-63.8 μ M)
AT12	100			10-15(53.2-79.8 μ M)
J5	70-90			15-20(79.8-106.4 μ M)
HCT15	80-100			25-30(133.0-160.0 μ M)
HT-29	21-94	20	30	15-97(79.8-516.0 μ M)
CL1-5	29	22	28	>100(>532 μ M)
DBTRG-05MG	40-110	44	>400	7-10(37.2-53.2 μ M)
G5T/VGH	50-223	46-60		
N18	111	35		
BCM	300	142	>400	
HL-60	367	173		
RG2	35	30		1.4(7.45 μ M)
SVEC	76	86		
Balb/3T3	38	>400	>400	>300(>1596 μ M)

選殖株)J5：人類肝癌細胞株HCT15：人類結腸腺癌細胞株HT-29：人類結腸腺癌細胞株CL1-5：G5T/VGH：人類多形性神經膠質母細胞瘤細胞株N18：神經母細胞瘤BCM：人類乳癌HL-60：人類淋巴結內皮細胞Balb/3T3：老鼠纖維母細胞

表 3. HUVEC 之 ETS-1、MMP-2、細胞移轉(migration)及管形成(tube formation)之測試結果

		抑制性			
		RT-PCR		移轉	管形成
		ETS-1	MMP-2		
萃取物 (μ g/ml)	AS-A	1	1	30	30
	AS-C	30	30	1	10
	AS-H	100	100	30	10
	BP	53.13 (282.6 μ M)	159.4 (847.9 μ M)		53.13 (282.6 μ M)
	BP-E 形	159.4	-		-
	BP-Z 形	159.4	531.3		159.4

相較於正常細胞(HUVEC及HDF)，正-亞丁基苯醌(BP)及當歸萃取物(AS-A、AS-C、AS-H)對人類腦腫瘤細胞顯示強的細胞毒性效果。BP亦對兩個抗紫杉醇之人類肺腺癌細胞、人類肝癌細胞AS-C及BP對腦腫瘤細胞株之 IC_{50} 分別為35至60 μ g/ml及1.4至10 μ g/ml，而對正常細胞株(HDF)於正常細胞中，血管內皮細胞($IC_{50}=44.2\pm 0.1 \mu$ g/ml)比纖維母細胞($IC_{50}=85.1 \mu$ g/ml)對AS-H亦測試卡姆斯丁(carmustin)(BCNU)及紫杉醇之抑制效果。結果顯示GBM腫瘤對卡姆斯丁並不敏感(分別為 $IC_{50}=61.0\pm 3.3 \mu$ g/ml及 $IC_{50}<0.1 \mu$ g/ml)。然而，紫杉醇於血管內皮細胞引發非常者。以AS-C或BP處理後，可於72小時期間內於不同時間點，觀察到GBM細胞(DBTRG-05MG)脫離。著劑量增加(於BP之情況中，於3小時觀察到)。

於進行AS-C或BP處理後之GBM細胞脫離及漂浮可歸因於腫瘤細胞之型態改變。於上述試驗中，實施例2：於GBM細胞中，AS-C與BP增加細胞週期停止於 G_0/G_1 時期

腦腫瘤細胞株DBTRG-05MG及G5T/VGH與稀釋劑培養於生長培養基。於各測試組及對照組，添加70 μ g/ml之AS-C及400 μ M之BP。將所有樣品培養48小時。細胞週期分布之分析係使用碘化丙啶(2×10^6 個細胞脫離(detachment)。離心脫離的細胞及漂浮死亡的細胞且以10ml之冷1xPBS(Life Tech)之1xPBS後，添加200 μ l之PI溶液(50 μ g/ml PI+0.05mg/ml RNase A; Sigma Chemical公司)，1小時。染色後，使用FACScan(Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, California)分析DNA。 G_0/G_1 時期設開於M1(x2)； G_2/M 時期設開於M2(x2)；總細胞設開於M3；S時期為M3-(M1(x2))。細胞週期分析顯示，於GBM細胞中，70 μ g/ml之AS-C及400 μ M之BP增加細胞週期累積於 G_0/G_1 時期。細胞週期累積於 G_0/G_1 時期同時減少S時期($p < 0.05$, $p < 0.005$)。

實施例3：AS-C及BP誘發GBM細胞凋亡

凋亡細胞之死亡係使用原位細胞死亡偵測套組(*In Situ Cell Death Detection Kit*, POD(Roch))。操作步驟係根據製造商之指示進行。簡言之，將細胞培養於培養皿且分別以AS-C(70 μ g/ml)中，收集懸浮細胞。於對照組中，收集脫離及漂浮細胞。而後，於室溫下，於生理鹽水包復之載

且以3% H_2O_2 降低內生性過氧化酶之活性後培養於冷滲透溶液(permeabilization solution; 0.1%)

於37°C下，與末端去氧核苷移轉酶(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)一介導之dUTP
之後，細胞以1xPBS清洗一次，使用碘化丙啶(PI)復染(counterstain)以進行細胞計數。於凋亡
當相較於未處理之細胞時，幾乎所有於AS-C及BP處理組之GBM細胞都發現有進行中之凋亡。以AS
色及點化丙啶細胞復染，且於明視野下觀察。同樣地，於GBM細胞中，BP誘發之細胞凋亡係使用7
胞暴露至BP(5至800 μ M)48小時。結果示於第2圖。可發現，相較於未處理之細胞(對照組)，於BP
實施例4：AS-C及BP經由多個代謝途徑誘發細胞凋亡

細胞凋亡分子之西方墨點分析

DBTRG-05MG細胞(人類GBM細胞)使用AS-C(70 μ g/ml)處理0、6、12、24及48小時。於另一測試
及48小時。細胞小粒(cell pellets)復懸浮於溶解緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EGTA, 0.5
醯基氟化物)且於冰上培養30分鐘後，於4°C下，13000xrpm離心20分鐘。使用BCA蛋白質分析套組
蛋白質濃度。細胞溶解物(20 μ g/lane)於10至12%之SDS-PAGE(Bio-Rad, Hercules, CA)進行電泳
Lifesciences, Piscataway, NJ)。於室溫下，使用5%脫脂牛奶作為封阻劑(blocking agent)遮蔽
時：Fas(FL-335)、Fas-L(C-178)、caspase 3(H-277)、caspase 8(H-134)、caspase 9(H-
p53(DO-1; 1/100稀釋)(Santa Cruz Biotechnology公司, CA, USA)、phospho-p53(Ser15; 1/20
Technology, MA, USA)。偵測抗體辨識，係將膜分別與結合有(conjugated)辣根過氧化酶(horseradish
抗體(1/1000稀釋；Santa Cruz Biotechnology公司, CA, USA)，於室溫培養1小時，且使用ECL P
每一測試樣品，作為系統對照組之SDS-PAGE膠體皆為二重複製備，而含有同量蛋白質；並使用
於西方墨點分析法。帶(band)之強度係使用GS-800 Calibrated Imaging Densitometer(Quant
示，AS-C顯著增加GBM細胞之Fas表現(1至159倍)，對Fas-L則無影響。此外，偵測死亡受體誘
量，於AS-C處理6小時後，僅些微增加，而活化之caspase-8之量，於AS-C處理6小時後，大幅
測定p53及Rb蛋白質之磷酸化作用且結果顯示AS-C於處理6小時後增加磷酸化之p53蛋白質。再者
蛋白質於6小時減低，且於AS-C處理12小時後成為無法偵測。該等結果顯示，AS-C可啟動蹤細
p21及Bax之量，且發現所有該等三種蛋白質於AS-C處理後皆增加(參照第3b圖)。

最後，亦測定procaspase-9及procaspase-3之活化。於AS-C處理6小時後，procaspase-9及
於BP之情況中，結果顯示BP 400 μ M大幅增加Fas之表現(由1.5小時5.2倍至48小時27.9倍)，而壓
亦發現BP增加caspase-8之活化，於48小時增加至137.9，但procaspase-8減低(參照第3d圖)。
於BP-誘發細胞凋亡之粒線體途徑之角色研究中，顯示BP誘發Bax及AIF之表現，其分別於48小時
procaspase-9減低(參照第3e圖)。亦發現caspase-3增加而procaspase-3減低(參照第3d圖)。
於BP-誘發細胞凋亡之細胞週期途徑之角色研究中，顯示BP增加p53、p21及p16之表現，其於48
時為5.2倍且於48小時為9.2倍，但降低之Rb磷酸化作用於48小時為0.2倍(參照第3f圖)。於此研
總結言之，可推論由BP壓力所誘發之細胞凋亡信號傳導途徑之略圖模式，其由死亡受體、粒線體

實施例5：動物研究

使用RG2細胞(大鼠GBM)及DBTRG-05MG細胞(人類GBM)於動物試驗以偵測AS-C及BP之抗腫瘤活性
至260g)及雄性Foxnl nu/nu老鼠(10至12週齡)。所有步驟皆符合慈濟大學實驗動物中心之標準操
驗室動物膳食加以餵食。分別製備DBTRG-05MG細胞(人類GBM)及RG2細胞(大鼠GBM)，於裸鼠進行
於AS-C處理組

試驗1-AS-C以皮下注射投藥對於帶有皮下GBM腫瘤大鼠之存活率及腫瘤尺寸之影響

將同樣之F344大鼠分為兩組(6/組)，於後背皮下植入 1×10^6 RG2細胞。動物由植入腫瘤細胞點之遠
藥AS-C(500mg/kg/day)(處理組)，或載劑(50mg/ml聚乙二醇及100mg/ml Tween-80於蒸餾水中
以雙角規形夾(caliper)測定且體積計算為 $L \times H \times W \times 0.52$ 。於腫瘤體積超過 25cm^3 時犧牲動物且以犧
結果顯示，相較於未處理組(對照組)，AS-C處理組對於腫瘤生長具有顯著抑制作用($p < 0.05$)(第
理組 $11.5 \pm 0.7 \text{cm}^3$ 。相較於對照組，AS-C處理組之存活率顯著延長(40 ± 2.7 天相對於 30 ± 2.1 天； $p < 0.05$)

AS-C以劑量500mg/kg皮下注射，於大鼠未發現藥物相關毒性，可由體重及存活器官之組織學分析

試驗2-AS-C由皮下注射投藥與腹腔內注射投藥對於帶有皮下人類GBM腫瘤大鼠之腫瘤尺寸之比

將裸鼠分為兩組(6/組)，植入s.c. 5×10^6 DBTRG-05MG細胞，且於腫瘤細胞植入5天後投藥AS-C(i
腫瘤尺寸以雙角規形夾(caliper)測定且體積計算為 $L \times H \times W \times 0.52$ 。於老鼠體內腫瘤體積超過 1000mm^3
結果顯示，相較於未處理組，以AS-C i.p. (500mg/kg)及AS-C s.c. (500mg/kg)處理組顯著壓抑

849.9±150.1mm³，於AS-C i. p. (500mg/kg)處理組為295.5±25.3mm³，於AS-C s. c. (500mg/kg)處理組。試驗3-AS-C由皮下注射投藥對於帶有原位GBM腫瘤(顱內同種異體GBM)大鼠之腫瘤尺寸之影響

AS-C對於原位腫瘤之毒性效果，係以RG2細胞測定。同種大鼠分為二組(6/組)，植入i. c. (紋狀體)RG2細胞，以AS-C(500mg/kg/day)或載劑s. c. 處理。使用於慈濟醫院之具有回波平面造影功能(echo-planar magnetic resonance imaging, General Electric, Wisconsin, USA)的3-T單位MRI(General Electric, Wisconsin, USA)測定及計算腫瘤體積。使用快速旋轉回波平面(fast spin echo)進行功能性MRI掃描，回波平面擷取序列之重複時間為6000msec，且平面內解析度為80μm。每隻大鼠每19.5秒持續6.5分鐘獲得20片，每片為1.5mm厚。

於MRI影像數據中發現，相較於未處理組，處理組之腫瘤體積顯著減少(p<0.05)(第6圖)。平均腫瘤體積

AS-C處理組為46.2±3.6mm³及99.5±9.5mm³。

試驗4-AS-C皮下注射投藥對於帶有異種移植人類GBM腫瘤之老鼠之腫瘤尺寸之細胞毒性。於此試驗中，使腫瘤生長至大尺寸以促進臨床條件之腫瘤之手術移除為不可接受之選擇。

如上所述，於裸鼠後背植入s. c. DBTRG-05MG細胞(5×10⁶)。僅當腫瘤體積≥250mm³時，將帶有腫瘤之裸鼠以AS-C處理10天後，使用H&E組織染色測定於腫瘤之細胞毒性後，犧牲動物。觀察組織切片且於光學顯微鏡下分析之照片顯示，AS-C誘發核降解、空孔細胞質及腫瘤細胞塊之腫瘤細胞死亡。相對地，未於腫瘤塊中發現。

BP處理組

試驗1-BP對於F344雄性大鼠中顱內(i. c.)大鼠同種異體GBM腫瘤之影響

大鼠分為二組(6/組)，植入i. c. (紋狀體)5×10⁴RG2細胞，且於腫瘤細胞植入後第4、5、6、7及8天以BP處理。以MRI測定及計算腫瘤體積。MRI係藉由使用具有回波平面造影功能(echo-planar magnetic resonance imaging, General Electric, Wisconsin, USA)之3-T單位(General Electric, Wisconsin, USA)執行。簡言之，使用BP處理組(fast spin echo)進行功能性MRI掃描，回波平面擷取序列之重複時間為6000msec，回波時間為19.5秒，且平面內解析度為80μm。每隻大鼠每19.5秒持續6.5分鐘獲得20片(每片為1.5mm厚)。

最後，測定及計算各組之腫瘤體積。如上述使用MRI掃描及回波平面造影計算，結果顯示，相較於未處理組，BP處理組之腫瘤體積顯著減少(p<0.05; **：p<0.001)。

平均腫瘤體積於第14及16天之對照組分別為69.9±4.81mm³及101.68±8.3mm³。MRI造影數據顯示，相較於對照組，BP處理組之原位腫瘤體積具有較小區域。

試驗2-BP對於壓抑裸鼠體內s. c. 異種移植人類GBM腫瘤之生長及老鼠存活率之影響

動物(Foxnl裸鼠)分為六組(6/組)，皮下植入(s. c.)1×10⁶DBTRG-05MG細胞，且於腫瘤細胞植入後第4、5、6、7及8天以BP(500、800mg/kg/day)或載劑s. c. 於遠離腫瘤植入點處(>2cm)處理。每2天測定腫瘤尺寸及計算腫瘤體積。存活率達200天。

結果顯示，相較於未處理組，BP一處理組具有顯著之腫瘤生長壓抑(第9圖；300mg/kg/day組之p值為0.001)。

第10圖之存活圖之對數範圍(Log-rank)(Mantel-Cox)比較顯示，以BP處理之帶有異種移植皮下腫瘤之裸鼠，其存活率顯著增加。

實施例7-AS-C對人類惡性腫瘤細胞之端粒酶活性之影響使用TRAP分析端粒酶活性

端粒酶活性係使用揭示於文獻之改良之端粒酶重複擴增方法(telomere repeat amplification protocol, TRAP)測定。簡言之，將含有0.5μg之DNA模板(內標準)、0.1μg之反義寡核苷酸、20mM Tris-HCl, pH8.3, 1.5mM MgCl₂, 63mM KCl, 0.005%(v/v)Tween 20, 1mM EGTA, 50mM NaCl, 10mM DTT, 10mM β-mercaptoethanol, 10mM Tris-HCl, pH8.0, 54mM 硼酸及1.2mM EDTA之緩衝液中。電泳膠於濾紙上乾。使用Bio-Max MR, Kodak Rochester, NY, USA)之X-底片(Bio-Max MR, Kodak Rochester, NY, USA)。

TRAP分析DNA階梯產物之信號強度，係使用Bio-Max MR, Kodak Rochester, NY, USA)定量及比較。

統計

數據以平均值±SD或SE表示。統計顯著性使用Student's t-test分析。將p值<0.05認為顯著。Kaplan-Meier分析計算。

雖然以具體例說明本發明，但於此技術中具有通常知識者應可加以進行多種改變及變化。而應了

於本發明之範疇且落入於後文所定義之申請專利範圍中。

[圖式簡單說明]

第1圖為細胞週期分析之結果圖，顯示以70 $\mu\text{g/ml}$ AS-C(當歸之氯仿萃取物)，處理GBM細胞(DBTRG-05MG)同時減少S時期。於G5T/VGH細胞亦顯示相同結果(未圖示)。

第2圖為5至800 μM 之BP(正-亞丁基苯醌)誘發GBM腫瘤細胞(DBTRG-05MG)凋亡之效果圖，係以TU劑(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.005$ ，*** $p < 0.0005$)。

第3a至3c圖為AS-C誘發之凋亡途徑之分析結果圖，70 $\mu\text{g/ml}$ (其中係使用DBTRG-05MG細胞株)。

第3d至3f圖為BP誘發之凋亡途徑之分析結果圖，400 μM (其中係使用DBTRG-05MG細胞株)。

第4圖為AS-C處理(500mg/kg)帶有皮下GBM腫瘤(RG-2)之老鼠之腫瘤尺寸之抑制效果圖($p < 0.05$)。

第5圖顯示經AS-C處理之老鼠之存活率(劑量-500mg/kg)顯著延長($p < 0.0001$)(相較於對照組)。

第6圖顯示AS-C處理(500mg/kg)老鼠原位GBM腫瘤(RG2)體積之生長之抑制效果(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.005$)。

第7圖顯示AS-C處理(500mg/kg由腹腔或皮下投藥)老鼠移植腫瘤生長之抑制效果($p < 0.005$)，其

第8圖顯示BP處理(300mg/kg)老鼠原位GBM腫瘤(RG2)體積之抑制效果，使用回波平面造影功能，

第9圖顯示不同劑量BP處理(70至800mg/kg)老鼠移植腫瘤生長之抑制效果($p < 0.005$)，其中係使用

第10圖顯示BP處理(70至800mg/kg)帶有移植腫瘤(皮下DBTRG-05MG)之裸鼠之存活期間之延長效果。

十、申請專利範圍：

1. 一種抑制癌細胞增生及移轉之方法，係包含使用有效量之當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物、腫瘤組織中癌細胞之增生及移轉。

2. 一種抑制癌細胞端粒酶活性之方法，係包含使用有效量之當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物、腫瘤組織中癌細胞之端粒酶活性。

3. 一種誘發癌細胞之細胞凋亡之方法，係包含使用有效量之當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物、腫瘤組織中癌細胞之細胞凋亡。

4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之方法，其中，該由當歸萃取物純化之活性成分包含正

5. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之方法，其中，該癌細胞係選自人類惡性神經膠母細胞、肺癌所成組群者。

6. 如申請專利範圍第4項之方法，其中，該癌細胞係選自人類惡性神經膠母細胞、結腸直腸癌所成組群者。

7. 一種抑制癌細胞增生及移轉之方法，係包含使用有效量之當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物與一種或以上之其他藥劑合併使用，以抑制腫瘤組織中癌細胞之增生及移轉。

8. 一種抑制癌細胞端粒酶活性之方法，係包含使用有效量之當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物與一種或以上之其他藥劑合併使用，以抑制腫瘤組織中癌細胞之端粒酶活性。

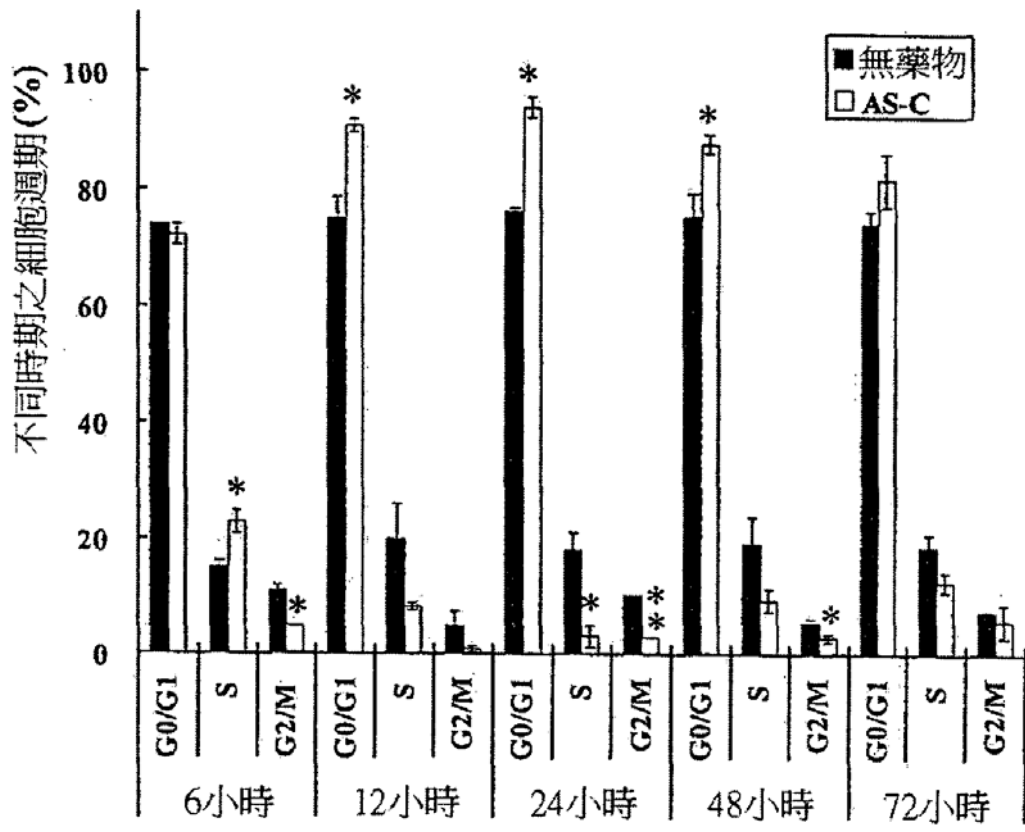
9. 一種誘發癌細胞之細胞凋亡之方法，係包含使用有效量之當歸之丙酮萃取物、氯仿萃取物與一種或以上之其他藥劑合併使用，以誘發腫瘤組織中癌細胞之細胞凋亡。

10. 如申請專利範圍第7至9項中任一項之方法，其中，該由當歸萃取物純化之活性成分包含

11. 如申請專利範圍第7至9項中任一項之方法，其中，該癌細胞係選自人類惡性神經膠母細胞、肺癌及肺腺癌所成組群者。

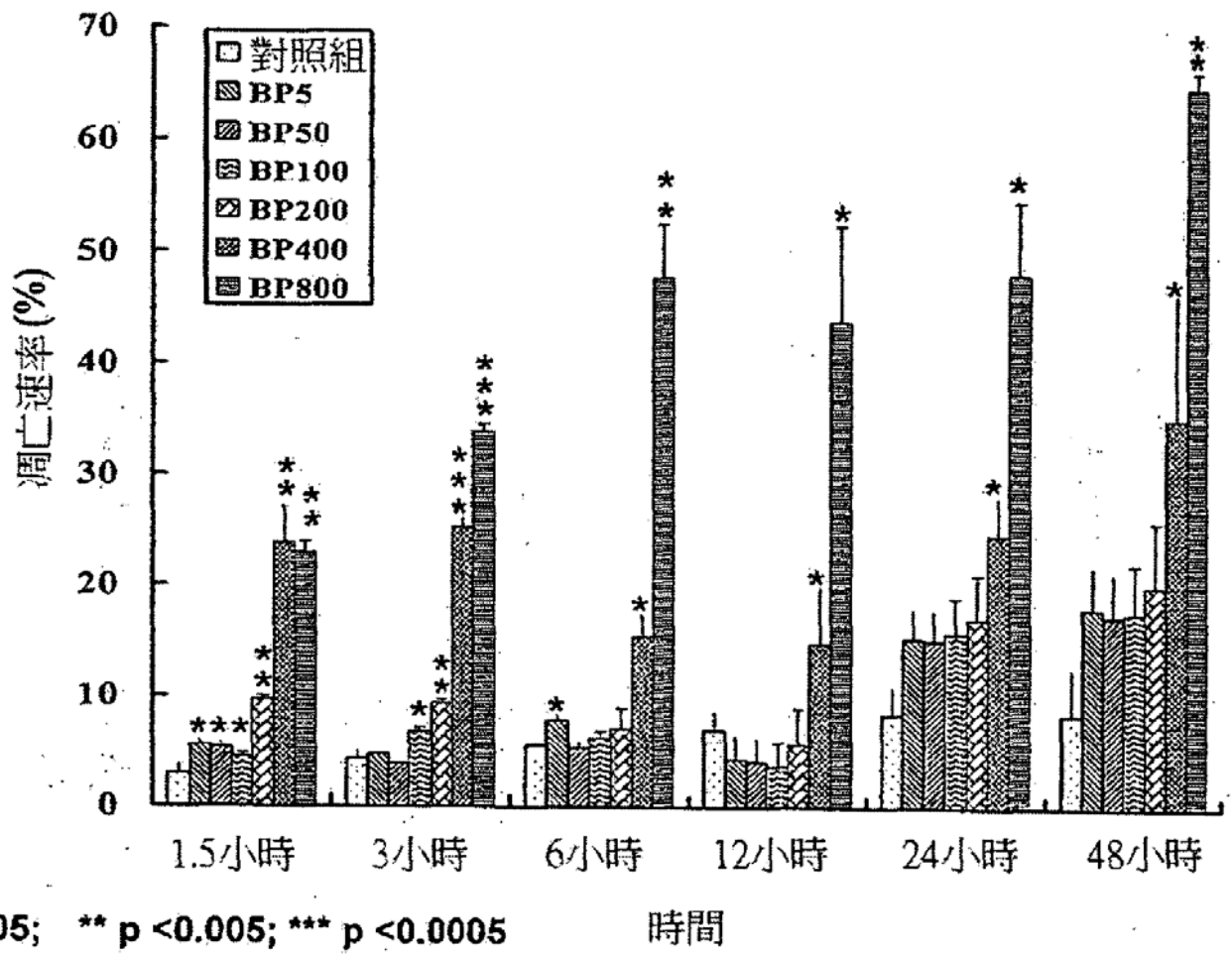
12. 如申請專利範圍第10項之方法，其中，該癌細胞係選自人類惡性神經膠母細胞、結腸直腸癌所成組群者。

十一、圖式：

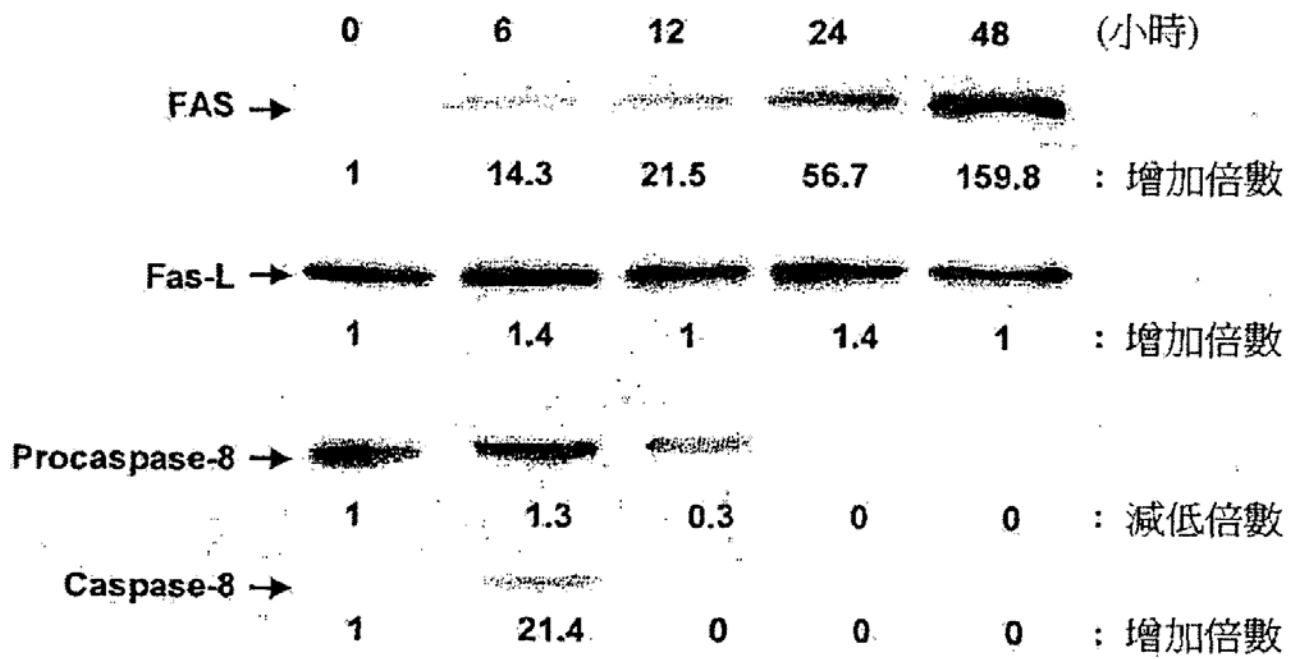


*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$

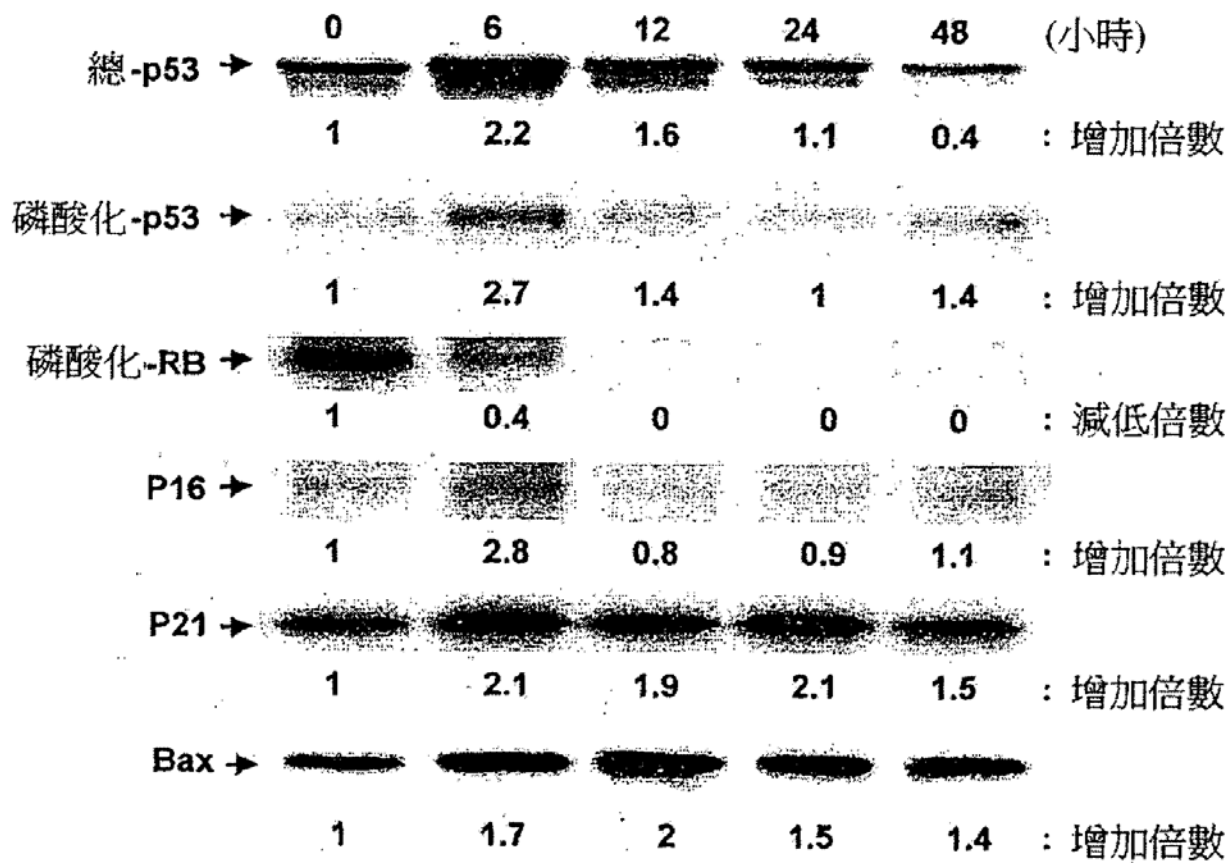
第 1 圖



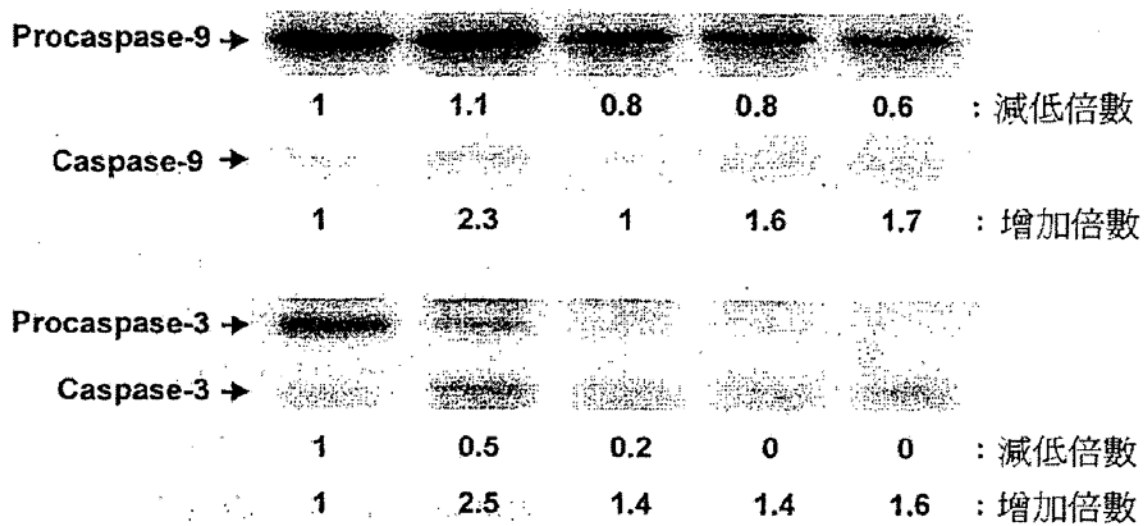
第 2 圖



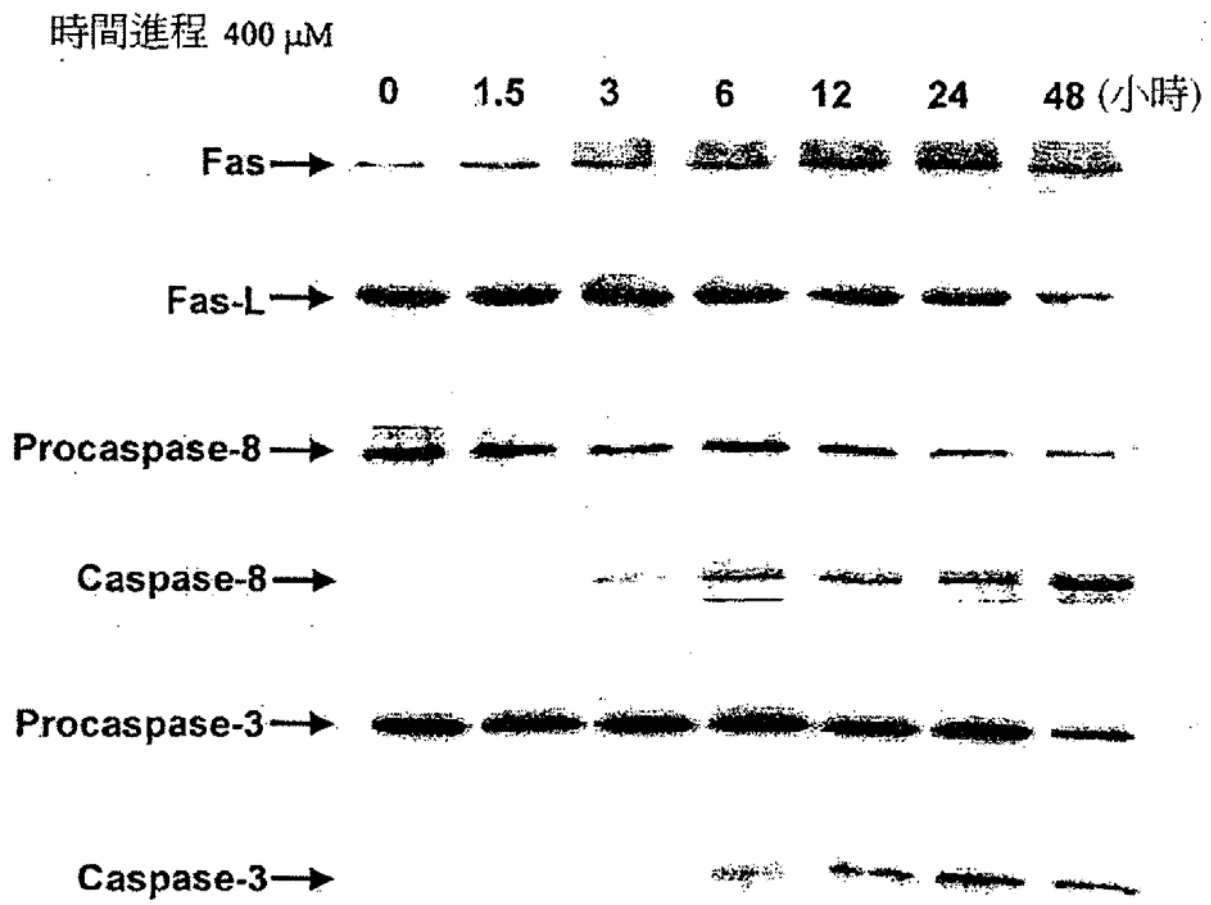
第 3a 圖



第 3b 圖

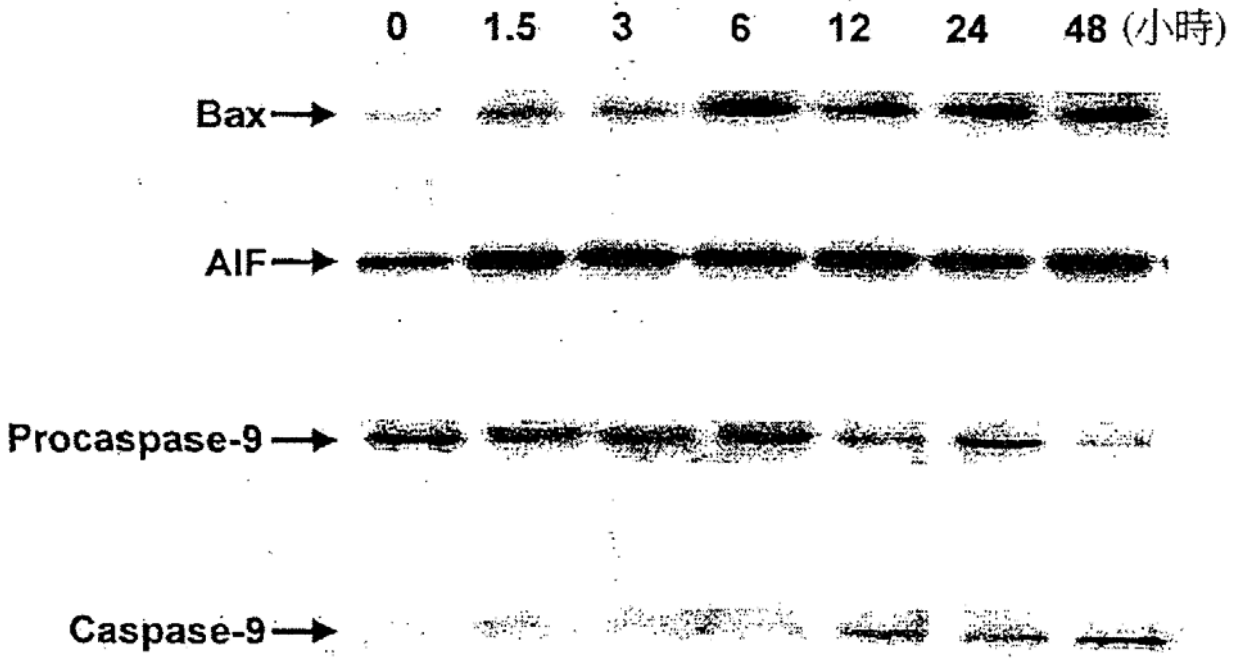


第 3c 圖

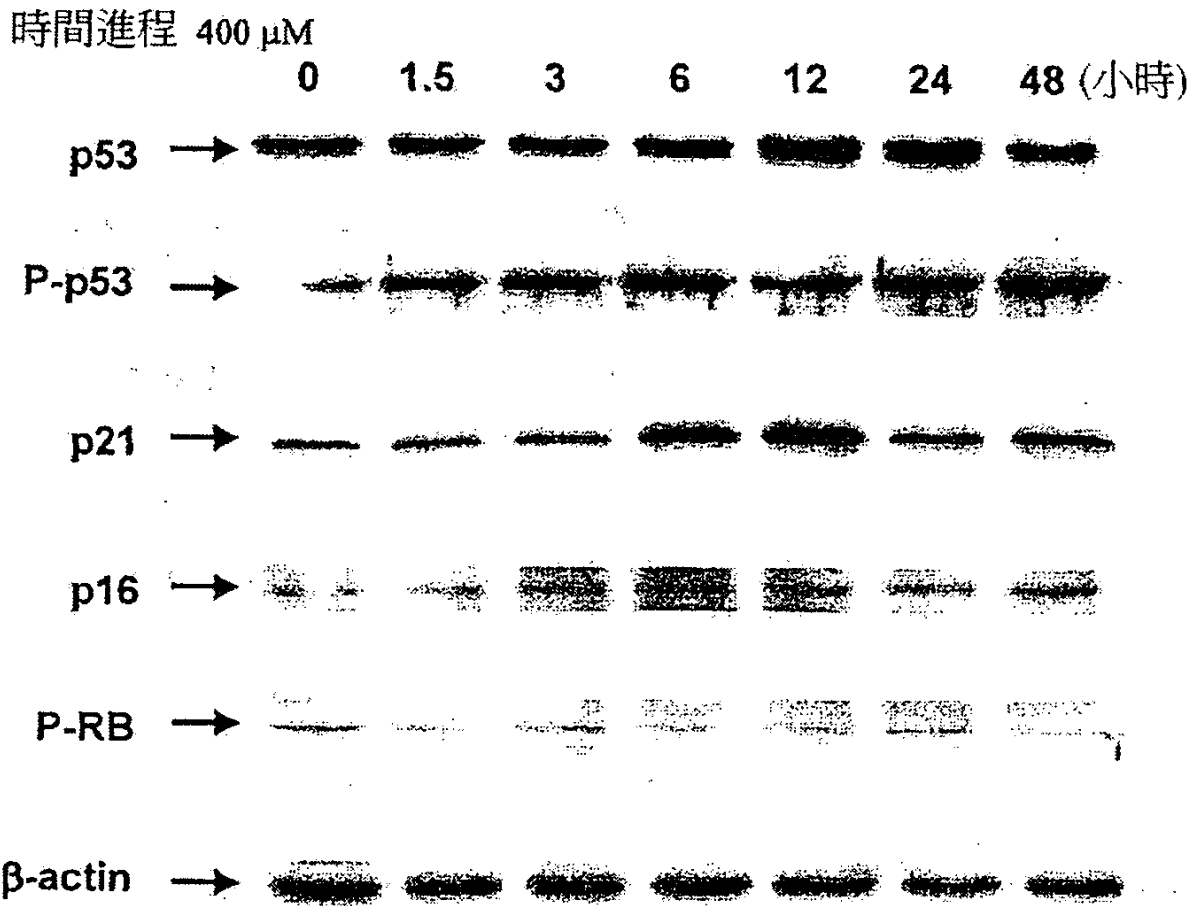


第 3d 圖

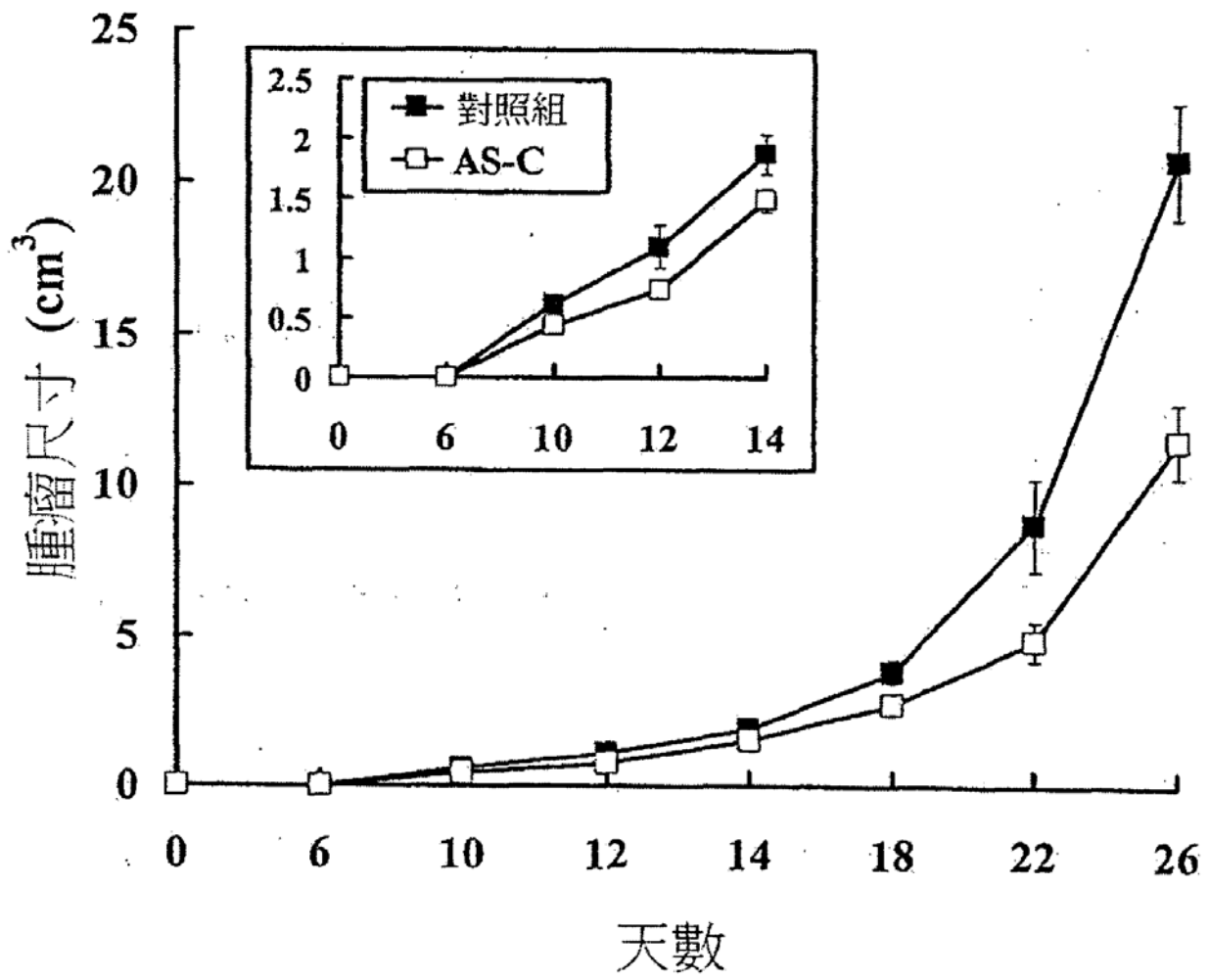
時間進程 400 μ M



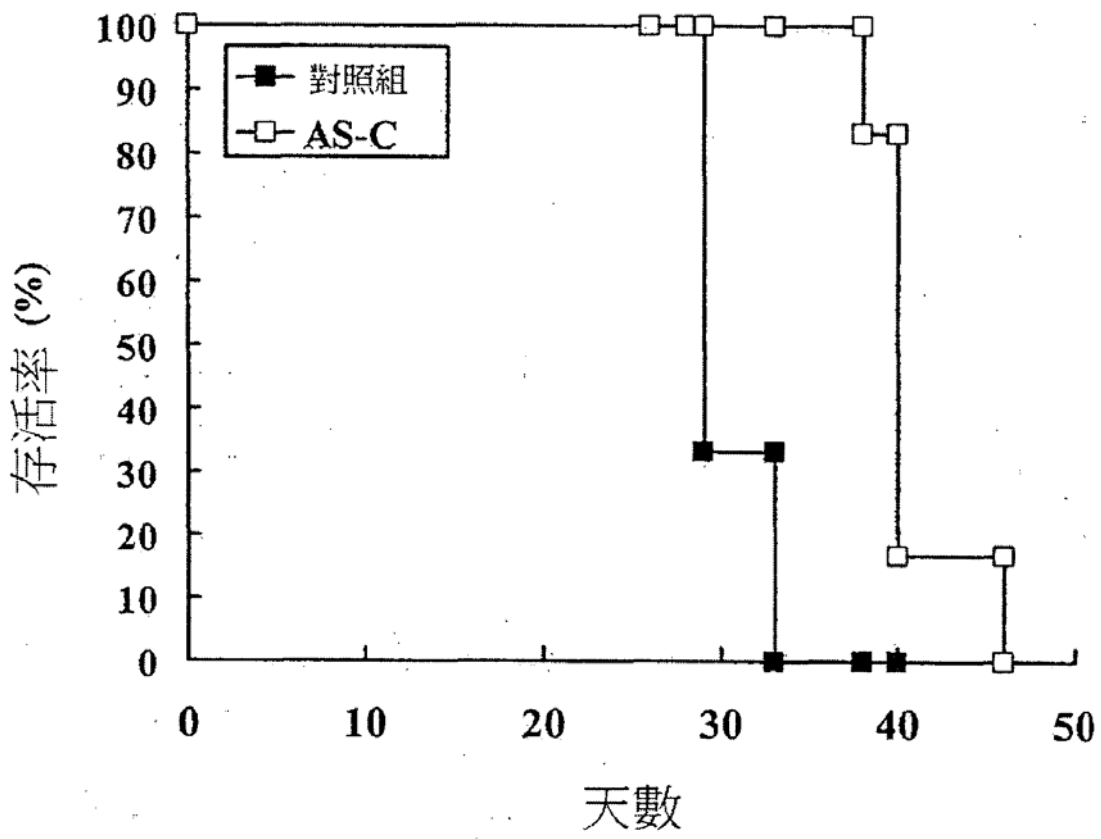
第 3e 圖



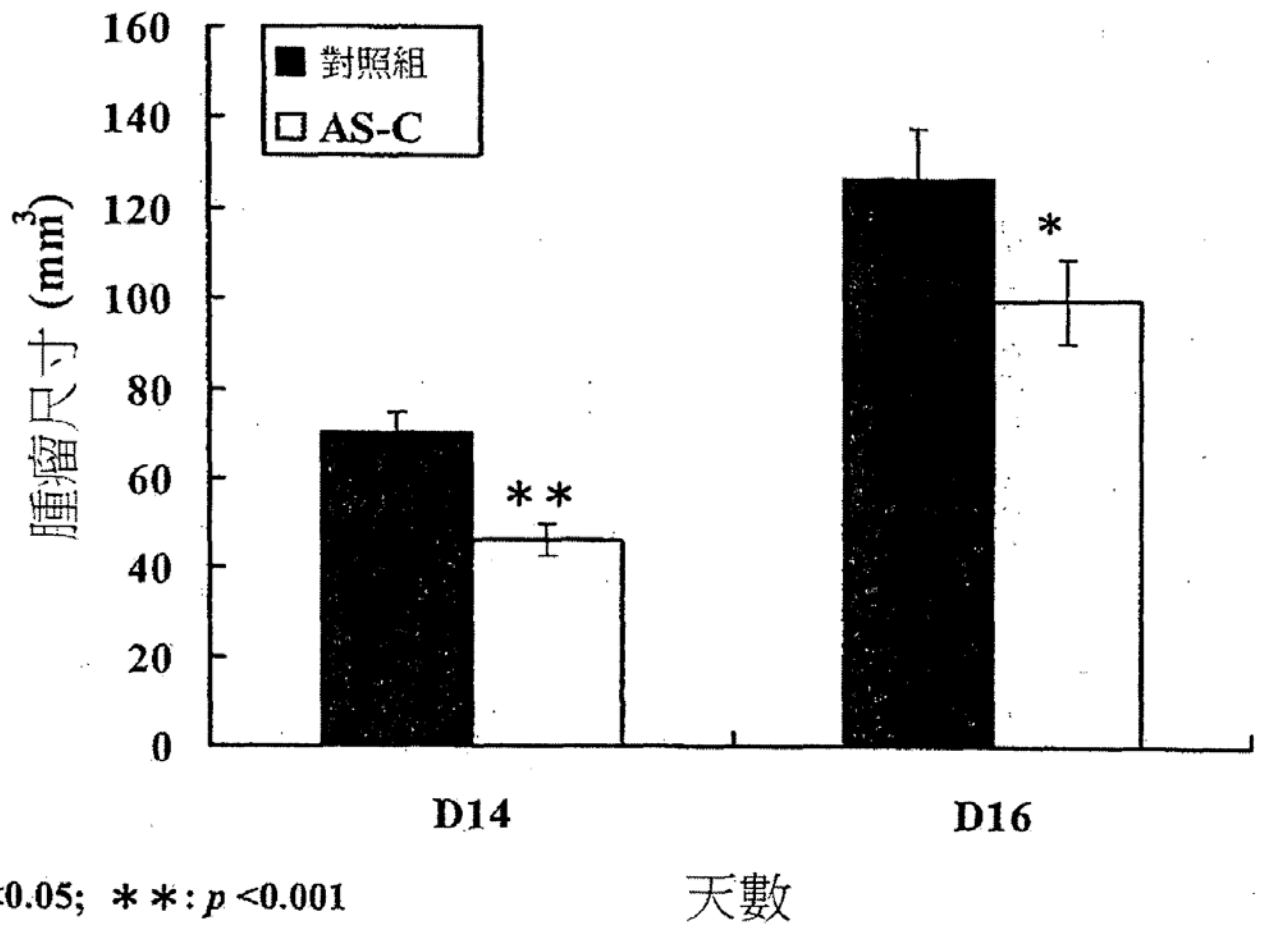
第 3f 圖



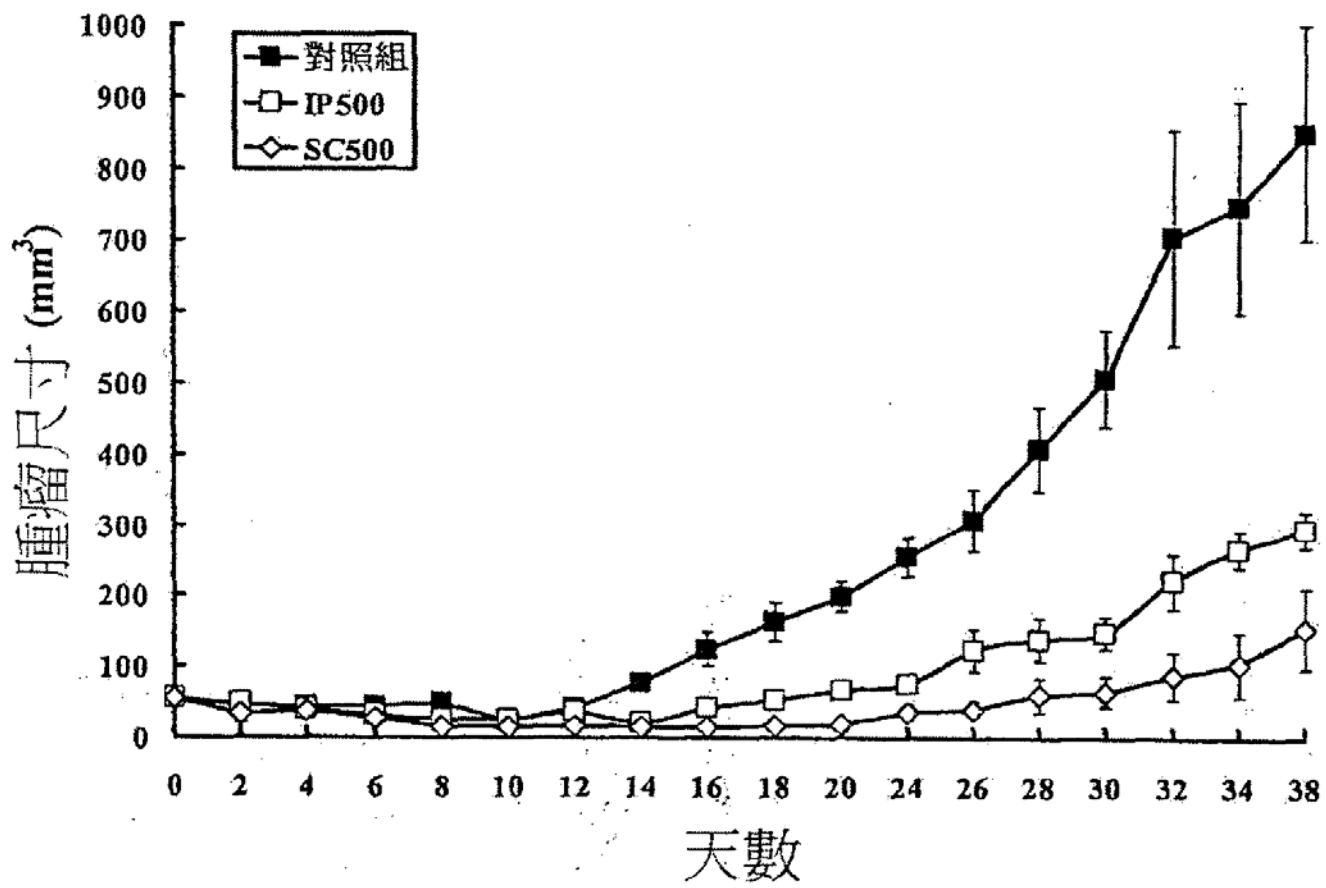
第 4 圖



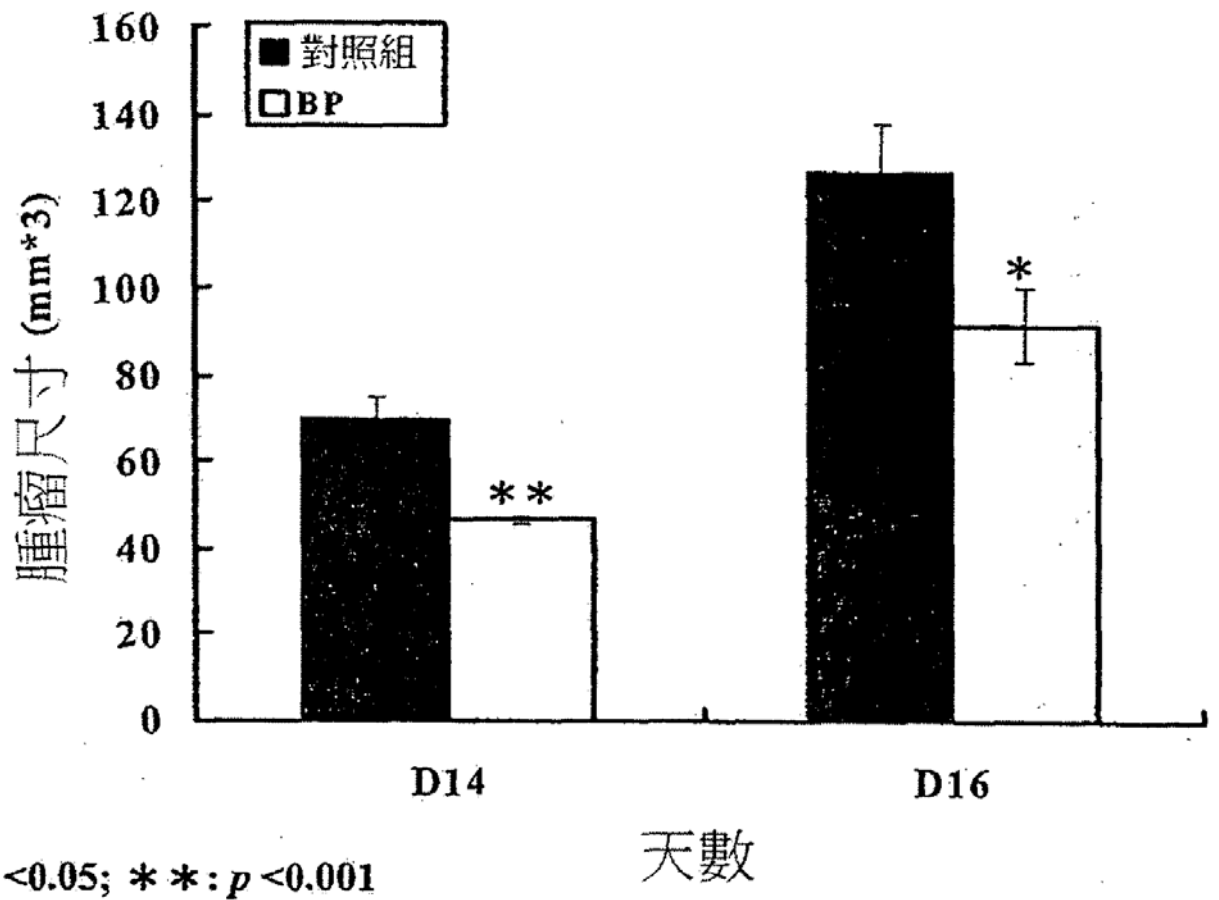
第 5 圖



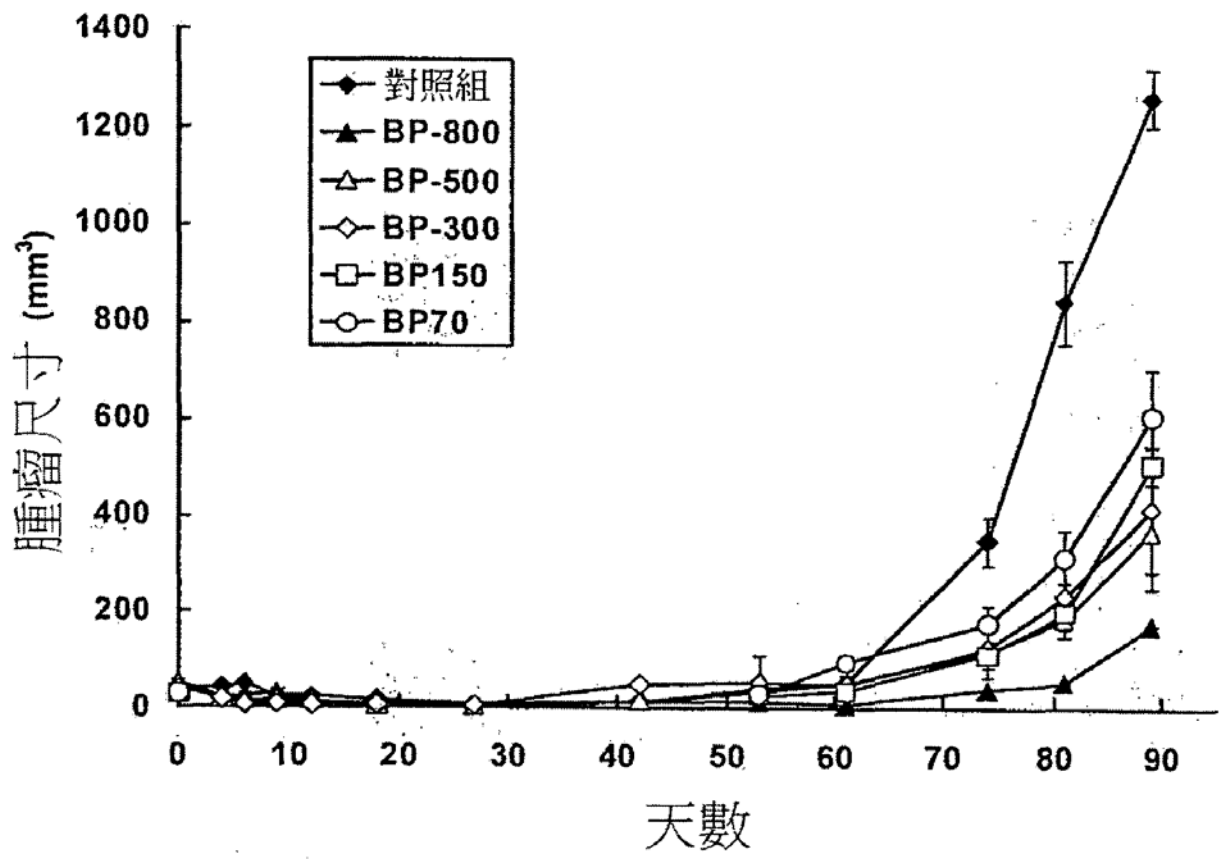
第 6 圖



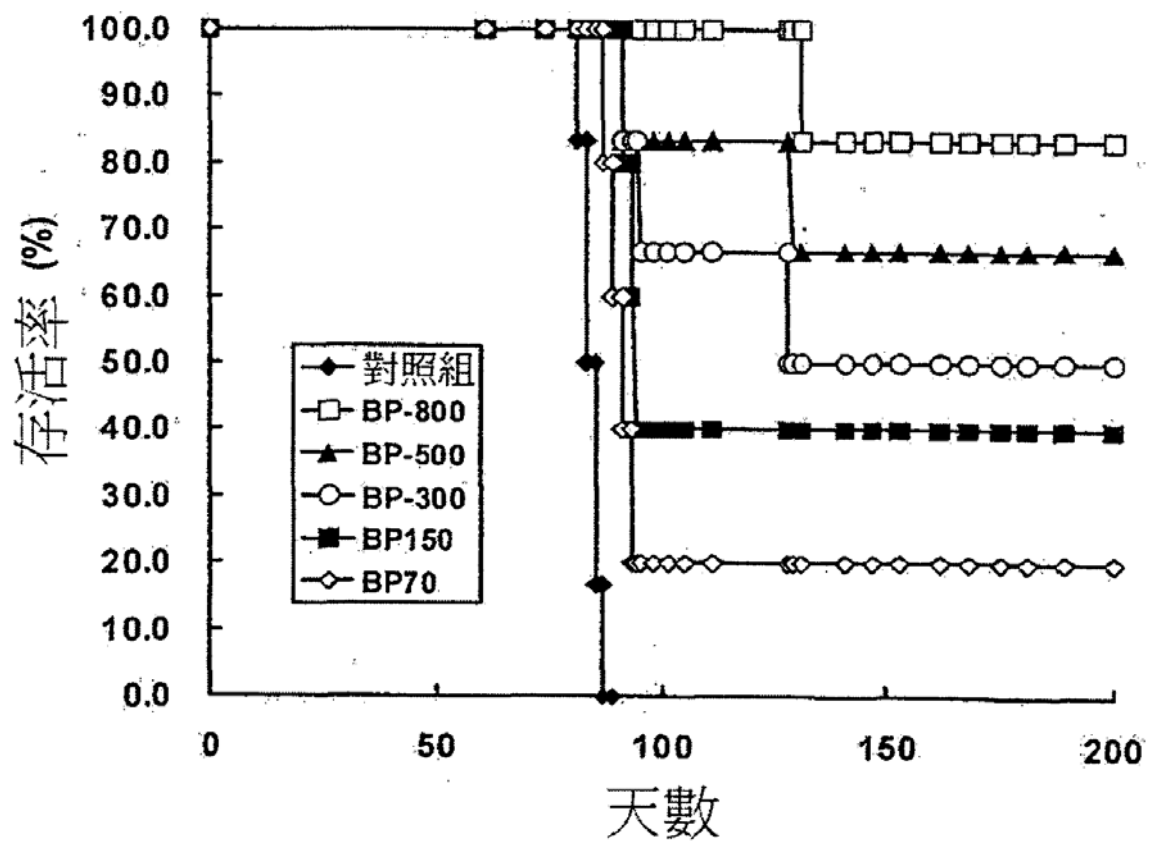
第 7 圖



第 8 圖



第 9 圖



第 10 圖