

中國醫藥大學藥學院
中國藥學暨中藥資源學系博士論文

編號：ICPS-D77

指導教授：張永勳 教授

共同指導教授：戚謹文 教授

血藤莖部粗抽物誘導人類血癌細胞凋亡並透過活性氧化物

途徑與三氧化二砷產生協同效果之抗血癌作用

**Synergistic Apoptosis-Inducing Antileukemic Effects of
Mucuna macrocarpa Stem Extract and Arsenic Trioxide in
Human Leukemic Cells via a Reactive Oxygen
Species-Dependent Mechanism**

研究生：盧冠宏

Lu, Kuan-Hung

中華民國一百年七月

目 錄

目錄.....	I
表目錄.....	V
圖目錄.....	VI
略字表.....	VIII
中文摘要.....	X
英文摘要.....	XII
第一章 緒言.....	1
第二章 總論.....	3
第一節 血藤.....	3
一、血藤之本草學考察.....	3
二、血藤之藥用植物學考察.....	5
三、血藤之藥理學考察.....	8
四、血藤之化學成分考察.....	9
第二節 血癌.....	10
一、血癌的症狀.....	10
二、血癌的分類.....	10
三、血癌的治療與進展.....	12
第三節 細胞凋亡.....	16
一、細胞凋亡的定義.....	16
二、細胞凋亡與細胞壞死.....	16
三、細胞凋亡的調控機轉.....	17
四、活性氧化物與細胞凋亡.....	22

第四節	三氧化二砷	23
一、	砷化物的醫療史	23
二、	三氧化二砷在癌症治療的作用機制	24
第三章	實驗設計	26
第一節	研究目的	26
第二節	實驗架構	26
第四章	實驗材料與方法	27
第一節	實驗材料	27
一、	試劑	27
二、	抗體	28
三、	細胞株	29
四、	實驗動物	29
五、	儀器設備	29
第二節	實驗方法	31
一、	植物材料之採集	31
二、	血藤莖部粗抽物之製備	31
三、	高效液相層析法	32
四、	細胞培養	32
五、	藥物處理	35
六、	細胞生長試驗	35
七、	細胞核染色法	36
八、	細胞週期分析	37
九、	Annexin V / PI 雙染色法	38

十、Active caspase-3 分析	39
十一、細胞內活性氧化物測定	40
十二、細胞蛋白質萃取	40
十三、蛋白質含量測定	41
十四、西方墨點法	41
十五、裸鼠異位移植腫瘤實驗	42
十六、藥物合併作用分析	43
十七、統計方法	43
第五章 實驗結果	45
第一節 血藤莖部粗抽物之 HPLC 指紋圖譜	45
第二節 血藤莖部粗抽物對於人類血癌細胞 HL-60 生長之 影響	46
第三節 血藤莖部粗抽物對於人類血癌細胞 HL-60 細胞週 期中 sub-G ₁ 比率之影響	47
第四節 血藤莖部粗抽物誘導人類血癌細胞 HL-60 細胞凋 亡現象之探討	48
一、以 EtBr 染色法檢測細胞凋亡之型態特徵	48
二、以 annexin V-FITC/PI 雙染色法檢測凋亡細胞之 比率	48
三、以流式細胞儀檢測細胞內之活化態 caspase-3	49
第五節 血藤莖部粗抽物對於裸鼠異位移植腫瘤實驗之影 響	50
第六節 血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用對於人類血癌 細胞 HL-60, Jurkat 及 Molt-3 生長之影響	51

第七節	血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用對於人類血癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞內活性氧化物之影響	52
第八節	血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用對於人類血癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞週期中 sub-G ₁ 期比率之影響	53
第九節	血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用誘導人類血癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞凋亡現象之探討	54
	一、以 DAPI 染色法檢測細胞凋亡之型態特徵	54
	二、以 annexin V-FITC/PI 雙染色法檢測凋亡細胞之比率	54
第十節	利用西方墨點法探討血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用誘導人類血癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞凋亡之相關蛋白質表現	56
第六章	討論	57
第七章	結論與展望	63
	參考文獻	65
	附錄	96
	附錄 1. 經史證類大觀本草之血藤植物圖	96
	附錄 2. 植物名實圖考之血藤植物圖	97
	附錄 3. 血藤 (<i>Mucuna macrocarpa</i>) 植物外觀圖	98
	附錄 4. 血藤 (<i>Mucuna macrocarpa</i>) 植物型態特徵圖	99
	附錄 5. 細胞凋亡主要分子傳遞路徑圖	100
	附錄 6. 西方墨點法所使用之各種溶液配方	101
	附錄 7. 藥物合併作用分析之 CI 意義對照表	105

表目錄

Table 1: Biological activities for extracts of <i>Mucuna macrocarpa</i>	74
Table 2: Presence of compounds in <i>Mucuna macrocarpa</i>	75
Table 3: Chromatographic conditions.....	76
Table 4: CI values for the combination of arsenic trioxide and crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i> in leukemia cell lines after 24 h of treatment.....	77



圖目錄

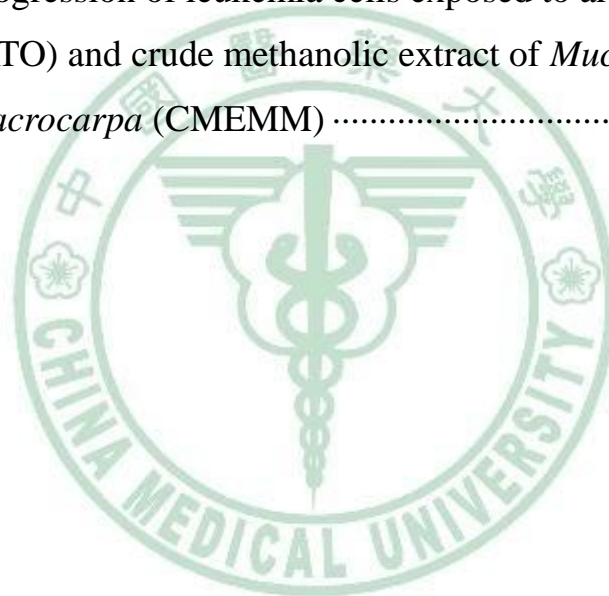
Figure 1: Scheme of the study on antileukemic effects of crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i>	78
Figure 2: Phytochemical analyses of crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i>	79
Figure 3: Antiproliferative effects of crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i> on HL-60 cells.....	80
Figure 4: Cell cycle progression in crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i> -treated cells	81
Figure 5: Nuclear morphological changes induced by crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i>	82
Figure 6: Annexin V-FITC/PI analyses of crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i> -treated cells	83
Figure 7. Activation of caspase-3 in crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i> -treated cells	84
Figure 8. In vivo antiproliferative effect of crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i> on human leukemia HL-60 xenografts	85
Figure 9: Antiproliferative effects of combined application of arsenic trioxide and crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i> on human leukemia cells.....	86
Figure 10: Changes in the level of intracellular reactive oxygen species in leukemia cells exposed to arsenic trioxide and/or crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i>	87
Figure 11: Cell cycle progression in leukemia cells exposed to arsenic trioxide and/or crude methanolic extract of <i>Mucuna macrocarpa</i>	89

Figure 12: Nuclear morphological changes induced by arsenic trioxide
and/or crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* 91

Figure 13: Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) analyses of arsenic
trioxide and/or crude methanolic extract of *Mucuna
macrocarpa*-treated cells. 92

Figure 14: Expressions of apoptosis-related proteins in leukemia cells
treated with arsenic trioxide, crude methanolic extract of
Mucuna macrocarpa and/or *N*-acetyl cysteine..... 94

Figure 15: Effects of a pan-caspase inhibitor (z-VAD-fmk) in cell cycle
progression of leukemia cells exposed to arsenic trioxide
(ATO) and crude methanolic extract of *Mucuna
macrocarpa* (CMEMM) 95



略字表

AML: acute myelocytic leukemia
ALL: acute lymphocytic leukemia
APL: acute promyelocytic leukemia
ANOVA: analysis of variance
Ara-C: 1- β -arabinofuranosylcytosine
ATO: arsenic trioxide
ATRA: all-trans retinoic acid
BCA: bicinehoninic acid
BSA: bovine serum albumin
BHT: butylated hydroxytoluene
CI: combination index
CLL: chronic lymphocytic leukemia
CMEMM: crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa*
CML: chronic myelocytic leukemia
DHE: dihydroethidium
DNA: deoxyribonucleic acid
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO: dimethyl sulfoxide
ECL: enhanced chemiluminescent
EtBr: ethidium bromide
FBS: fetal bovine serum
FITC: fluorescein isothiocyanate
H&E: hematoxylin and eosin
HPLC: high performance liquid chromatography
IC₅₀: the concentration of 50% inhibition
NAC: *N*-acetyl cysteine

PARP: poly-ADP ribose polymerase

PBS: phosphate-buffered saline

PI: propidium iodide

PML-RAR α : promyelocytic leukemia gene product-retinoic acid
receptor α

ROS: reactive oxygen species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SE: standard error

TBS: Tris-buffered saline



摘要

血藤 (*Mucuna macrocarpa* Wallich) 為豆科血藤屬植物，遍佈於台灣及東南亞中低海拔山區，民間以其莖部入藥，治療身體循環不佳或是血液相關疾病，屬活血化癥劑。本研究的目的是在於探討血藤是否具有抗血癌的功效，以其驗證民俗用法並提升應用價值。首先，利用體外細胞培養模式測試血藤莖部粗抽物 (CMEMM) 對於人類血癌細胞如 HL-60, Jurkat 和 Molt-3 的影響。實驗結果顯示，劑量範圍在 25 $\mu\text{g/ml}$ 至 75 $\mu\text{g/ml}$ 之 CMEMM 對於 HL-60 細胞有抑制生長的效果，且有時間及劑量的依存關係，其 72 小時之半數抑制濃度 (IC_{50}) 為 36.4 $\mu\text{g/ml}$ 。而 CMEMM 誘導 HL-60 細胞凋亡的現象可經由細胞核凋亡性形態特徵的出現、細胞處於 sub- G_1 期比率的增加、annexin V-positive 比率的提升，以及細胞內活化態 caspase-3 的提升等結果證實。此外，CMEMM 於活體動物模式中亦有顯著抑制腫瘤生長的效果，且實驗過程中對於老鼠不具毒性。

為拓展臨床上的應用價值，本研究進一步評估 CMEMM 與血癌治療用藥三氧化二砷 (ATO) 並用的治療效果。實驗結果發現，劑量為 50 $\mu\text{g/ml}$ 之 CMEMM 與 2.5 μM 之 ATO 並用時可協同性地抑制 HL-60 和 Jurkat 細胞生長，而 CMEMM 與 ATO 並用所誘導的細胞凋亡，亦由增加細胞處於 sub- G_1 期的比率、提升 annexin

V-positive 的比率，以及出現細胞核凋亡性形態特徵等結果得到驗證，且發現此現象可能與粒線體路徑中 caspase-3 和 caspase-9 等細胞凋亡相關性蛋白質被活化所致。此外，CMEMM 與 ATO 並用會提高細胞內活性氧化物的生成，而當抗氧化劑如 *N*-acetyl cysteine (NAC), butylated hydroxytoluene 或 α -tocopherol 介入時，此細胞凋亡現象將顯著地受到抑制，其機制與抗氧化劑如 NAC 會抑制粒線體路徑中 caspase-3 和 caspase-9 等蛋白質有關。

綜合上述結果，本論文證實台灣藥用植物血藤之抗血癌活性及其機制，並以合併使用血癌治療用藥三氧化二砷的效果，提供未來臨床研究的基礎，亦開啟血癌治療上以中草藥與化療藥物並用來提升治療效果的可能性。

Abstract

Mucuna macrocarpa Wallich (Leguminosae) is believed to hold blood circulation activating effects, and has been used as a folk remedy in Taiwan and Southeast Asia for the treatment of various hematologic and circulatory related ailments. The objective of this study was to investigate whether crude methanolic extract of *M. macrocarpa* (CMEMM) possessed antileukemic effects on human leukemia cell lines such as HL-60, Jurkat and Molt-3. CMEMM was prepared from dried stems of this plant, and its apoptosis-inducing effects were investigated using HL-60 cells in vitro and in vivo first. With treatment of 25 to 75 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM, the in vitro antiproliferative effect on HL-60 cells increased in a concentration- and time-dependent manner during the 72 h treatment period. The concentration of CMEMM that exhibited a 50% growth inhibition (IC_{50}) for 72 h exposure was 36.4 $\mu\text{g/ml}$. Apoptosis triggered by CMEMM in HL-60 cells was confirmed by characteristic apoptotic nuclear fragmentation, concentration-dependent accumulation of sub- G_1 phase in cell cycle analyses, increased percentages of annexin V-positive apoptotic cells, and concentration-dependent elevation of active caspase-3. Furthermore, the in vivo effect of tumor growth suppression by CMEMM (500 mg/kg/day i.p.) was observed in mouse xenografts.

To broaden the therapeutic potential of CMEMM, further study was to examine the potential of enhancing the antileukemic activity of arsenic trioxide (ATO) using combination treatment. Human leukemia

cells HL-60, Jurkat and Molt-3 were treated with various doses of CMEMM, ATO and combinations thereof for 24 and 48 h. Results indicated the combination of 50 µg/ml CMEMM and 2.5 µM ATO synergistically inhibited cell proliferation in HL-60 and Jurkat cells. Apoptosis triggered by CMEMM/ATO treatment was confirmed by accumulation of cells in the sub-G₁ phase in cell cycle analyses, characteristic apoptotic nuclear fragmentation and increased percentage of annexin V-positive apoptotic cells. Such combination treatments also led to elevation of reactive oxygen species (ROS). The anti-oxidants *N*-acetyl cysteine (NAC), butylated hydroxytoluene, and α-tocopherol prevented cells from CMEMM/ATO-induced apoptosis. The CMEMM/ATO-induced activation of caspase-3 and -9 can be blocked by NAC.

In conclusion, these results suggest that CMEMM/ATO-combination treatment exerts synergistic apoptosis-inducing effects in human leukemic cells through a ROS-dependent mechanism and may provide a promising antileukemic approach in the future.

第一章 緒言

血癌 (leukemia) 俗稱白血病，為血液或骨髓的惡性疾病，依據民國 98 年衛生署統計資料，白血病占台灣癌症主要死因第十一位，而小兒白血病又占小兒癌症發生率第一位，近年來發病人數有逐漸增加之趨勢 (行政院衛生署, 2009)。急性前骨髓性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 是急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 的一種亞型，其特徵是病患第 15 號及第 17 號染色體片段會發生交錯異位，產生 PML/RAR α 重組蛋白，進而影響白血球的分化。雖然此類的病患可透過化療藥物 anthracyclines 與分化促進劑全反式維甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 或三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 得到緩解，但 ATRA 對於幼童常伴隨維甲酸症候群等不良反應發生，而藥物耐藥性的發生使得復發率高達 30~40% (Burry and Seki, 2002)。因此，對於白血病仍然急需發展新的藥物或治療方式。

血藤 (*Mucuna macrocarpa* Wallich) 為豆科植物，遍布於台灣及東南亞海拔高度 100~1500 公尺之山區 (Editorial Committee of the Flora of Taiwan, 1993)，民間以其乾燥莖部做為活血化癥劑使用，用於治療貧血、咳血、月經不調、腰膝痠痛、手腳麻木等身體血液循環不佳之症狀 (Editorial Board of Zhong Hua Ben Cao, 1999)，或用於糖尿病治療 (Lin,

1992)。血藤已被報導之化學成分包括胺基酸 (amino acids)、脂肪酸 (lipids) 及三萜類 (triterpenoids)，而本實驗室先前之研究亦發現血藤莖部含有異黃酮類 (isoflavonoids) 之活性成分 (陳亭亭, 2005; 盧冠宏, 2003)，其中 medicarpin、afroformosin、calycosin 及 genistein 等具有抗氧化、抗菌以及抗癌等作用。而血藤已被報導之藥理活性有利尿及解痙攣等，但有關抗癌之活性仍未見報導。而我們初步的研究發現血藤莖部粗抽物對於人類血癌細胞 HL-60 具有顯著的生長抑制，因此本研究的目的是在於探討血藤抗血癌效果的機制，以及與血癌治療用藥三氧化二砷合併使用的效果，藉此提升台灣藥用植物之利用價值，並提供未來臨床血癌治療上，以中草藥與化療藥物並用來提升治療效果的新思維。



第二章 總論

第一節 血藤

一、血藤之本草學考察

(1) 歷代諸家本草所錄之血藤植物原文

1. 經史證類大觀本草 (宋·唐慎微, 1971)

圖經曰：「血藤，生信州。葉如鄱蘭葉，根如大拇指，其色黃，五月採，行血治氣塊，彼土人用之。」(附錄 1)

2. 植物名實圖考 (清·吳其濬, 1983)

植物名實圖考蔓草卷之二十一：「血藤產九江山坡。蔓生勁莖，赭色，一枝一鬚。副枝生葉，如菊花葉柔厚有花叉，而末不尖，面綠，背白。春時枝梢開花如簇金粟，與千年健同名血藤」。(附錄 2)

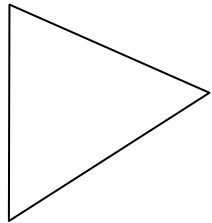
(2) 產地之考訂 (臧勵酥, 1987)

圖經：「血藤，生信州」。信州即今江西上饒。

植物名實圖考：「血藤產九江山坡」。九江即今江西九江。

(3) 血藤本草系統圖 (郭啟文, 2004)

嘉祐補注本草 (唐 659AD)



圖經本草【血藤】 (宋 1602 AD)

經史證類備急本草 (宋 1098AD)



植物名實圖考【血藤】 (清 1848AD)



二、血藤之藥用植物學考察

(1) 血藤之植物學分類 (甘偉松, 1993)

被子植物門 Angiospermae

雙子葉綱 Dicotyledoneae

離瓣花亞綱 Choripetalae

雙花被類 Dialypetalae

薔薇目 Rosales

豆科 Leguminosae

血藤屬 *Mucuna*

(2) 豆科 (Leguminosae) 血藤屬 (*Mucuna*) 植物之特徵 (劉和義 et al., 2000)

一年生或多年生藤本，莖汁紅色。三出葉。總狀花序。花萼寬鐘形，5齒裂，上方二面合生，最下方一片明顯較長。花瓣蝶形。莢果通常具刺毛。台灣有 4 種，其特性分述如種檢所表。

(3) 血藤屬 (*Mucuna*) 植物之種檢索表 (Editorial Committee of the Flora of Taiwan, 1993)

1. 莖被有白色伏毛；每個莖節有 3 朵花；豆莢不平坦，白色毛狀.....
.....*M. pruriens* var. *utilis* 虎爪豆
1. 莖被有銹色柔毛或無毛；每個莖節有 2 朵花；豆莢平坦，銹色毛狀或無毛。
2. 小葉無小托葉；豆莢長於 20 公分，沿縫線處無翼.....
.....*M. macrocarpa* 血藤
2. 小葉有小托葉；豆莢短於 15 公分，沿縫線處有翼。
3. 頂小葉橢圓至長菱形；豆莢平滑且無毛.....
.....*M. membranacea* 蘭嶼血藤
3. 頂小葉卵橢圓或卵圓形；豆莢不平滑且無毛.....
.....*M. gigantea* ssp. *tashiroi* 大血藤

(4) 血藤 (*M. macrocarpa*) 之植物形態 (劉和義 et al., 2000)

大型木質攀緣植物，枝條被銹色柔毛。三出複葉，頂小葉橢圓形，長 12-15 cm，寬 6-7 cm，背面被毛，先端尾狀突尖。總狀花序，花軸上有 15-30 朵花，花軸可達 40 cm 長；小花柄約 2.5 cm 長；花萼約 1 cm 長；花冠深紫色約 5 cm 長。豆莢平坦，大部分 7-15 cm 長，5 cm 寬，密被柔毛，種子 6-12 顆。血藤植物外觀及型態特徵圖分別如附錄 3 及附錄 4。

(5) 血藤之基原、分佈與功用

1. 學名：*Mucuna macrocarpa* Wallich
2. 科名：豆科 Leguminosae
3. 別名：黑血藤、長莢油麻藤 (Editorial Board of Zhong Hua Ben Cao, 1999)，老鴉花藤、大血藤、嘿良龍 (江蘇新醫學院, 1992)
4. 分佈：台灣、廣東、海南、廣西、貴州、雲南等地 (Editorial Board of Zhong Hua Ben Cao, 1999)
5. 藥性：味苦、澀，性涼 (Editorial Board of Zhong Hua Ben Cao, 1999)
6. 效用：莖可強筋壯骨，調經補血。用於小兒麻痺後遺症，月經不調，風濕筋骨痛 (甘偉松, 1993)。
7. 附方 (Editorial Board of Zhong Hua Ben Cao, 1999)
治小兒麻痺後遺症：血藤 60 g，研細。加粗糠炒熱，外包環跳穴或肩髃穴，3 天換藥 1 次。

治月經不調：血藤 15 g 泡酒 500 mL。每次 10 mL，每日服 2 次。

三、血藤之藥理學考察

有關血藤 (*Mucuna macrocarpa*) 藥理之文獻，依據美國伊利諾大學 NAPRALERT 資料庫以及 PubMed 資料庫的搜尋結果，其民俗用法 (ethnomedical usage) 及生物活性 (biological activities) 相關文獻整理如下：

血藤之民俗用法方面，血藤之乾燥全植物，在中國大陸地區有作為藥物使用 (Pei, 1985)；而在台灣則是用乾燥莖部治療糖尿病 (Lin, 1992)。

血藤之生物活性方面，有文獻指出其乾燥莖部之乙醇與水抽出物有利尿及解痙活性。其中對大鼠以胃管給藥，劑量為 510.7 mg/kg，顯示具有利尿活性 (Bhakuni et al., 1988)，而其他活性測試如鎮痛、抗原蟲、抗病毒等，結果皆不具活性，詳如 Table 1 所示。

四、血藤之化學成分考察

血藤植物之化學成分方面，透過美國伊利諾大學 NAPRALERT 資料庫檢索，文獻中已知分離得到的成分有 *l*-dopa (陳勇 et al., 1993), lupenone, friedelin, $\Delta^{5,22}$ -stigmasterin-3 β -ol, β -sitosterol, tetracosanoic acid 2,3-dihydroxypropyl ester, pentacosanoic acid 2-3-dihydroxy-propyl ester, hexacosanoic acid 2-3-dihydroxy-propyl ester (胡旺云 et al., 1994)。而本實驗室先前的研究發現血藤莖部含有 tetracosanoic acid, mixture of β -sitosterol and stigmasterol, medicarpin, afrormosin, genistein, calycosin, sucrose, D-pinitol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside, tetracosanoic acid 2,3-dihydroxypropyl ester，而葉部含有 mixture of β -sitosterol and stigmasterol, betulin, medicarpin (陳亭亭, 2005; 盧冠宏, 2003)，詳見 Table 2。

第二節 血癌

一、血癌的症狀

血癌的成因起源於分化不完全之不成熟血球浸潤在骨髓，使正常的白血球數量減少，而患者由於成熟白血球驟減而易受感染，呈現發燒、畏寒及其他類似流行性感冒的症狀，亦因為紅血球減少而容易出現貧血，臉色蒼白、虛弱、疲倦、沒有食慾且體重減輕。又因其血小板量不足而造成出血、瘀青、牙齦腫脹等現象。此外，尚有脾臟腫大、骨頭或關節疼痛以及個體活動力降低等病症出現 (Groves et al., 1994)。

二、血癌的分類

血癌依細胞的來源及形態特徵，在臨床上可分為骨髓性及淋巴性兩大類，而依病程進展的快慢又可分為急性及慢性，各種類型詳述如下：

(1) 急性骨髓性白血病 (Acute myelocytic leukemia, AML)

好發於成年人，約有80%的病人超過25歲。急性骨髓性白血病在細胞型態學上可依據French-American-British (FAB) co-operative group的分類標準 (FAB classification)，再細分為M1到M7型，其中M1型是「急性未成熟骨髓芽球性白血病」(myeloblasts without maturation)，M2型是「急性成熟骨髓芽球性白血病」(myeloblasts with maturation)，M3型是「急性多顆

粒前骨髓細胞性白血病」(hypergranular promyelocytic leukemia)，M4型是「急性骨髓單核球性白血病」(myelomonocytic leukemia)，M5型是「急性單核球性白血病」(monocytic leukemia)，並且分為不成熟型M5a (poorly differentiated monocytic leukemia) 及成熟型M5b (well differentiated monocytic leukemia) 兩種亞型，M6型是「急性紅血球性白血病」(erythroleukemia)，而M7型是「急性巨核細胞性白血病」(megakaryocytic leukemia)。

(2) 慢性骨髓性白血病 (Chronic myelocytic leukemia, CML)

與費城染色體 (Philadelphia chromosome) 的異常有關，好發於20歲到45歲的成年人 (Wong and Witte, 2001)。

(3) 急性淋巴球性白血病 (Acute lymphocytic leukemia, ALL)

好發於兒童，急性淋巴球性白血病依癌細胞形態特徵，又可再分為L1, L2, L3型，其中L1及L2型分別為小型及大型的lymphoblast，且都以T細胞為主，但L3型則為B細胞 (Pui, 1997)。

(4) 慢性淋巴球性白血病 (Chronic lymphocytic leukemia, CLL)

好發於50歲以上的老年人。淋巴球可分為B細胞及T細胞淋巴球，故可再分為慢性B淋巴球性白血病以及慢性T淋巴球性白血病。

三、血癌的治療與進展

有關癌症的治療，於二十世紀主要是以外科手術、放射線治療及化學治療為主，但常因嚴重的副作用使得治療的效果不彰，使得癌症無法有效的根治，因而陸續有免疫療法、賀爾蒙療法或基因療法等出現。然而，急性白血病在目前臨床上的治療，仍以化學療法為主，待病情轉緩，才可以進行骨髓移植或放射線療法。由於化學療法毒性太大且疾病復發機會大，常常在治療上無法獲得很大的功效，讓病人不易接受。因此，如何提供有效且不具毒性的治療方法仍是醫學界面臨的重要課題，而目前可供選擇的治療方式如下（陳長安 及 謝瑞坤, 2009; 陳博明, 1999）：

(1) 化學治療

以化學藥物來治療癌症簡稱「化療」。化療可使用一種化學藥物或結合多種藥物來進行。目前治療白血病的化療藥物很多，依白血病種類用藥的差異性又可分為：

1. 急性骨髓性白血病

急性前骨髓性白血病屬於急性骨髓性白血病第三型（AML-M3），目前使用口服的ATRA（all-trans retinoic acid）可透過在RAR（retinoic acid receptor）的作用，促進血癌細胞進行分化，雖然治療效果顯著，但也容易產生抗藥性或造成身體嚴重不適（Cornic and Chomienne, 1995）。而其它

6型 (M1, M2, M4, M5, M6及M7) 之急性骨髓性白血病，均可使用1- β -arabinofuranosylcytosine (Ara-C) 加上daunorubicin來治療，約70%可達緩解效果。

2. 慢性骨髓性白血病

以Ara-C加上daunorubicin為主，再配合干擾素的使用，可得緩解。而高劑量的化治合併骨髓移植是唯一可以根治的療法。

3. 急性淋巴性白血病

一般使用的藥物包括Ara-C, daunorubicin, vincristine, cyclosporamide, L-asparaginase, methotrexate及prednisolone。當疾病緩解後，考慮鞏固性的化學治療，以口服化療藥物進行維持性治療。然而，急性淋巴性白血病通常會侵犯至中樞神經系統，所以必須加上頭部的放射線治療及骨髓腔內的化學治療。

4. 慢性淋巴性白血病

早期沒有特殊症狀並不需要急於治療，而當症狀出現後，再考慮給予Ara-C, daunorubicin, vincristine, cyclosporamide及prednisolone等藥物治療。

(2) 放射線治療

又稱「放射療法」，常與化學治療一起使用，對大多數癌症均具有療效，可使惡性腫瘤縮小，或摧毀手術後殘餘的癌細胞。但高能量的放射線在摧毀癌細胞時，也同樣會傷害身體的正常細胞，此為放射治療過程中極為嚴重的副作用。此外，還包括：疲倦、皮膚發癢、皮膚乾燥、掉髮、噁心腹瀉、白血球及血小板數降低等副作用。白血病的放射線治療，主要有兩種給予方式，對於有癌細胞聚集的部位，例如腦部或脾臟，可直接給予放射治療；而其餘的病人則是接受全身放射線治療，且通常在骨髓移植之前給予。

(3) 骨髓移植

骨髓移植是將他人或自己身上健康的骨髓移植到功能受損的骨髓中。白血病、惡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤、卵巢癌、睪丸癌或乳癌等，都可以接受骨髓移植的治療。骨髓移植的類型包括：

1. 自體骨髓移植

由病人本身未受癌細胞侵犯的骨髓抽出，儲存在零下196°C液態氮中，待病人癌症發作時，給予治療。

2. 異體骨髓移植

將他人得來的骨髓輸入癌症病患體內，而提供骨髓者以同卵雙胞胎，或組織抗原相符的家人尤佳。近年來，因為骨髓資料庫的建立，提供沒有

適當骨髓來源者很好的治療機會，若捐贈者與病患的human leukocyte antigen比對一致，則骨髓移植排斥的機會大為降低，移植成功的機率也相對提高。



第三節 細胞凋亡

一、細胞凋亡的定義

細胞凋亡 (apoptosis) 是一種細胞計畫性死亡的過程 (programmed cell death)，和細胞增殖一樣都屬生命基本現象，是維持體內細胞數量動態平衡的基本措施，但也在許多疾病的發展上扮演著重要的角色，特別是癌症 (Thompson, 1995)。Apoptosis 一詞源自於希臘文，原本字意是指樹葉凋落或掉落，有“墮落、死亡”之意，而在拉丁文中“apopto-“是枯萎、凋零之意，因而用來表示細胞進行 apoptosis 時的型態，意指細胞死亡。細胞凋亡的進行源自於細胞內在基因表現的調控，當正常細胞受到傷害或發生基因突變時，會引起細胞凋亡的機轉，讓細胞自行死亡 (Reed, 1999)。在多細胞有機生物裡，細胞凋亡扮演著調節及維持細胞數目的重要角色，而生物體之恆定也仰賴細胞凋亡與細胞增生間的平衡來控制 (Raff et al., 1993)。因此，若細胞凋亡程式受到抑制或其中調控的基因受損，將會使細胞無法走向計畫性死亡，導致細胞循著錯誤的訊息繁衍下去，最終造成細胞不正常增殖甚至癌化的發生。

二、細胞凋亡與細胞壞死

細胞凋亡的發生包含著特定的生物反應變化，其過程主要可以分為凋

亡早期及晚期兩個階段。在凋亡早期，細胞外型會有變化、細胞膜內層的磷脂質 (phosphatidylserine) 會外翻 (Fadok et al., 1992)、染色質濃縮，且細胞開始萎縮。而細胞凋亡晚期時，特徵性的變化主要在於細胞核，如細胞核皺縮、DNA 斷裂，並出現被細胞膜包覆的凋亡小體 (apoptotic body)。而後巨噬細胞會來吞噬這些凋亡小體，但卻不會產生發炎反應。

而細胞壞死 (necrosis) 是當細胞受到物理性、化學性或是嚴重病理性刺激時的生理反應，一開始細胞會因大量水分進入而腫脹，接著引起發炎反應並導致細胞破裂，而細胞內破碎的胞器及染色質片段會隨著細胞液外流，並釋出發炎因子，而這也造成周圍的細胞開始產生發炎反應。因此，若以誘導細胞凋亡的方式來治療癌症，將可減少藥物所引發的副作用甚至併發症，所以一般認為細胞凋亡是一種較佳的抗癌機制 (Matsuda et al., 1996)。

三、細胞凋亡的調控機轉

細胞凋亡的分子傳遞路徑主要可分為內在路徑—粒線體路徑 (mitochondrial pathway) 以及外在路徑—死亡受體路徑 (death receptor pathway) 兩種，兩種路徑的訊息傳遞詳述如下 (附錄 5)：

(1) 內在路徑—粒線體路徑

當細胞受到藥物、放射性輻射、氧氣不足等刺激，或是 DNA 損傷時，首先細胞質的粒線體膜電位會下降，位於粒線體外層的 Bcl-2 會調控細胞的存活，而 cytochrome *c* 會由粒線體膜間隙釋放至細胞質中，與 Apaf-1 及 pro-caspase-9 結合並刺激 apoptosome 的形成，之後 ATP 會活化 caspase-9 並促使下游的 caspase 活化，最後導致細胞凋亡 (Parone et al., 2002; Shi, 2001)。

1. Caspase 家族蛋白

Caspase (cysteine aspartyl-specific protease) 是一種具有專一性且有 cysteine 活化態殘基的蛋白酶，可在標的蛋白 N 端的 aspartate 殘基與 C 端的 small hydrophobic residue 間切割而變成活化態。未活化的 caspase 有三個主要 domain：amino-terminal prodomain、small subunit (10-12 KDa) 以及 large subunit (17-20 KDa)。這些未活化 Caspase 需要其他的 Caspase 進行特定的蛋白分解作用，使這些 domain 形成活化態。未活化的 caspase 可分為兩類，一種是 initiator caspase，例如 caspase-2, -8, -9, -10，可啟動活化 apoptotic executioners，使其能執行 apoptosis，稱為 promoter；另一種 effector caspase，例如 caspase-3, -6, -7，其功能為執行細胞凋亡，裂解下游蛋白 (Shi, 2002)。

當細胞凋亡發生時，在粒線體路徑中會有特定訊息，如 cytochrome *c* 釋出與 Apaf-1 結合，會傳遞給 caspase-9 使其活化，接著再活化下游的

caspase-3, -6, -7，造成膜蛋白分解，並使具修復DNA作用的PARP裂解而失去修復功能。另外，caspase也切除 inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease (ICAD) 釋出CAD導致DNA fragmentation，誘導走向細胞凋亡 (Ashe and Berry, 2003)。

2. Bcl-2家族蛋白

Bcl-2家族蛋白主要可分為促使凋亡蛋白分子 (pro-apoptotic protein) 及抑制凋亡蛋白分子 (anti-apoptotic protein) 兩類 (Reed, 1998)，在細胞凋亡中扮演著細胞存活調控的重要角色。促使凋亡蛋白分子的成員有Bad, Bak, Bax, Bid, Bik, Bim, Blk, Bok及Bcl-Xs等，若大量表現會促進細胞凋亡；而抑制凋亡蛋白的成員有Bcl-xL, Bcl-2, Bcl-w, Boo, Mcl-1, A1/Bfl-1，若表現過量時會阻斷各種不同壓力所誘發的細胞凋亡 (Reed et al., 1998)。

Bcl-2家族這兩大類的蛋白結構相當類似，皆含有四個類似的Bcl homology domain (BH1, 2, 3, 4)，彼此以同質二元體 (homodimer) 或異質二元體 (heterodimer)形式結合來調控細胞凋亡 (Jurgensmeier et al., 1998)。抑制凋亡蛋白如Bcl-2，正常狀態是位在粒線體膜上、核膜上或內質網膜上；而促使凋亡蛋白Bax, Bad和Bid等則是在細胞質中，當接收到凋亡訊息傳遞時，就會轉位 (translocation) 至粒線體膜上，改變粒線體膜電位，造成膜的通透性改變 (Kroemer and Reed, 2000)。其他促使凋亡蛋

白表現時，Bax的結構會改變，使Bax利於結合到粒線體外膜上，進行傳遞凋亡訊號。再者是Bid被Caspase-8活化裂解成tBid，而tBid會結合在粒線體膜上。另外，Bad受到凋亡訊息刺激，則產生去磷酸化，使Bad移至粒線體上。以上作用會促使粒線體膜內的蛋白，像是cytochrome *c*、Smac/DIABLO等釋放至細胞質 (Kroemer et al., 1995)。而apoptosis inducing factor (AIF)、endonuclease G會直接進入細胞核，促進apoptosis的作用。因此Bcl-2家族蛋白扮演著channel protein的角色在粒線體膜上穿梭 (Wood and Newcomb, 2000)。

3. 細胞凋亡誘導因子 (AIF)

AIF屬於caspase-independent cell death effector，其分子量約57 KDa，存在粒線體內膜中，具有抑制Bcl-2的能力 (Kannan and Jain., 2000)。當粒線體的通道發生變化時，會從粒線體膜間隙釋出，經過細胞質之後到核膜，然後誘導染色質濃縮，最後產生50 Kb之DNA片段 (Kannan and Jain, 2000)。

4. 內核酸酶 (endonuclease G)

Endonuclease G具有多種生理活性，包括DNA修補及粒線體DNA複製等，同時也具有核酸酶 (nuclease) 的功能，可參與細胞凋亡。Endonuclease G被活化後會由粒線體膜間隙進行轉位進入細胞核，執行核酸酶的功能，

將DNA分解 (Miller et al., 1999)。

(2) 外在路徑－死亡受體路徑

1. Fas (CD95) /FasL

Fas是細胞表面的醣基化穿膜蛋白，屬於腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) receptor superfamily中的第一型膜蛋白，分子量約45 KDa。而FasL (Fas ligand) 是第二型膜蛋白，分子量約40 KDa，可維持細胞與B細胞的平衡，並清除有害細胞如發炎細胞或其他癌化細胞。當Fas與FasL結合時，會使細胞內引發一系列的訊息傳遞，吸引細胞內的Fas-associated death domain (FADD) 過來與細胞質中的death domain (DD) 結合，之後啟動凋亡訊號傳遞，活化下游因子caspase-8，活化態的caspase-8經由一連串的過程會活化下游的caspase-3與caspase-7，或是使Bcl-2家族中的Bid裂解成為tBid，而促使cytochrome *c*活化caspase-9和caspase-3。

(2) Tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1)

TNF是由感染反應活化的T cell與macrophage所製造出來的，其接受器為TNFR1及TNFR2。當TNF與TNFR1結合時，會吸引TNFR-associated death domain (TRADD) 與receptor domain結合，並活化下游因子caspase-8 而導致細胞凋亡。另外，TNF也可與TNFR2結合，啟動免疫反應使 receptor interacting protein (RIP) 與TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) 的結

合，進而活化NF- κ B促使細胞存活。

四、活性氧化物與細胞凋亡

ROS (例如 superoxide 或是 hydrogen peroxide) 在細胞裡是屬於會產生毒性的代謝產物，雖然適量的 ROS 不具毒性且參與訊息的傳導，但 ROS 過度生成或蓄積將會對細胞內的蛋白質或核酸產生傷害。然而，細胞體內也有代謝 ROS 的機制，例如 GSH (glutathione), SOD (superoxidase dismutase), GPx (glutathione peroxidase) 及 catalase 均對 ROS 的代謝扮演著重要的角色，也藉此維持細胞內 ROS 的平衡 (Chang et al., 2009; D'Autreaux and Toledano, 2007)。而過去的研究指出，若癌細胞中 ROS 過度增加將會導致細胞凋亡的產生，例如：過量的過氧化氫會使粒線體膜電位發生改變、cytochrome *c* 從粒線體被釋出，而後活化下游的 caspase，最終導致細胞凋亡，因此經由 ROS 路徑來誘導癌細胞走向細胞凋亡，已是普遍認同的抗癌機制 (Simon et al., 2000)。

第四節 三氧化二砷

一、砷化物的醫療史

砷 (arsenic) 為自然界中的元素，常以硫化物、氧化物或砷酸鹽類 (arsenate) 的形式存在，而砷化物又可分為有機砷及無機砷，有機砷係三價或五價砷與碳原子結合，而無機砷主要有雄黃 (realgar, As_2S_2 , red)、雌黃 (orpiment, As_2S_3 , yellow) 及三氧化二砷 (arsenic trioxide, As_2O_3 , white) 等三種，其中雄黃和雌黃屬於有毒且化性不穩定的化合物，而三氧化二砷則是炙燒硫化砷的產物，也是中藥砒霜的主要成分 (Evens et al., 2004)。

據文獻記載，砷化物做為醫藥使用已超過兩千四百年，而在當時砷就已經被認為同時具有藥物及毒藥兩種不同的性質。在砷的醫療歷史上，最早開始為希臘人Hippocrates以硫化砷來治療皮膚潰瘍，而後砷被廣泛應用在各種疾病上，包括用於治療瘧疾、鎮靜劑、發汗劑、抗牛皮癬、抗氣喘和抗癌等不同疾病上 (Zhu et al., 2002)。西元1970年，在中國的人體試驗中發現命名為癌靈1號 (Ailing-1) 的三氧化二砷溶液中 ($1 \text{ mg/ml As}_2\text{O}_3$ 與 $0.01 \text{ mg/ml Hg}_2\text{Cl}_2$)，對於急性前骨髓細胞白血病 (APL) 的病人有非常好的療效。臨床研究也證實不管是復發性或者是對其它化學治療效果不好的APL病人，三氧化二砷都可以得到不錯的治療效果。因此在西元2000年美國食品藥物管理局 (FDA) 核准了商品化的三氧化二砷 (Trisenox[®])

(Cohen et al., 2001)，用於治療復發型或者是對於all-trans retinoic acid和anthracycline有抗藥性的APL病人。

二、三氧化二砷在癌症治療的作用機制

三氧化二砷的抗癌機轉尚未完全明瞭，但至今已知三氧化二砷可以藉由下列幾種路徑達到療效：

(1) 使PML-RAR α 融合蛋白分解

部分APL病人的白血球細胞會表現此種融合蛋白，此融合蛋白會阻止骨髓細胞正常分化的基因表現，並抑制細胞的死亡，造成分化不正常的細胞增生。據文獻報導，三氧化二砷可以促進PML-RAR α fusion protein進入nuclear body內分解，促使細胞進行分化而達到治療效果 (Zhu et al., 2002)。

(2) 抑制細胞週期的進行

細胞週期的進行可分為G₁, S, G₂, M四個階段，正常細胞都必須先做完每一階段的工作且沒有錯誤才可以通過管制點 (checkpoint) 進入下一階段，而癌細胞異於正常細胞的地方，就在於不斷的增生複製卻又難以進行分化。有研究顯示三氧化二砷會增加cyclin B的表現，導致細胞週期停在G₂/M階段，進而使細胞增生受到抑制 (Choi et al., 2002)。

(3) 誘導細胞凋亡

三氧化二砷可以藉由增加細胞內的過氧化氫，造成粒線體內膜電位差改變，促使cytochrome *c*釋出，進一步活化下游caspase的活性，最後導致細胞凋亡。除此之外，文獻指出三氧化二砷誘導細胞凋亡的效果和細胞內glutathione (GSH) 的多寡有密切的關係。實驗發現當利用buthionine sulfoximine (BSO) 降低細胞內GSH量的時候，三氧化二砷的誘導細胞凋亡的作用大幅地提高。反之，給予*N*-acetyl cysteine (NAC，為GSH的前驅物) 時，三氧化二砷的作用則明顯受到抑制 (Miller et al., 2002)。此外陸續有學者發現，細胞內GSH量較低的時候，蓄積在細胞內的砷濃度就較高，這是因為GSH可以和三價砷結合而排出細胞外，因此當細胞內GSH量較高的時候，會造成三價砷在細胞內的濃度較低，而使得三氧化二砷的效果降低 (Leslie et al., 2004; Salerno et al., 2002)。

第三章 實驗設計

第一節 研究目的

本研究之目的在於探討血藤抗血癌效果的機制，以及與血癌治療用藥三氧化二砷合併使用的效果，藉此提升台灣藥用植物之利用價值。

第二節 實驗架構

本研究首先進行血藤植物之本草學、藥用植物學、藥理學及化學成分等文獻考察，取得經基原確認之植物後進行切片、陰乾及萃取等程序，製備成血藤莖部粗抽物，接著利用 HL-60 人類血癌細胞株，測試經血藤莖部粗抽物處理後之細胞生長、細胞週期以及細胞凋亡等相關 *in vitro* 試驗，並利用裸鼠進行 *in vivo* 活性評估。

之後再將血藤莖部粗抽物與三氧化二砷合併用於 HL-60, Jurkat 及 Molt-3 等人類血癌細胞株，測試藥物合併使用的抗血癌效果，並分析藥物交互作用的形式為協同、加成或是拮抗作用，最後利用活性氧化物分析及西方墨點法，探討藥物合併使用的可能機制。血藤抗血癌活性評估的實驗架構圖如 Figure 1 所示。

第四章 實驗材料與方法

第一節 實驗材料

一、試劑

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) , Cat. No. D9564, 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

Arsenic trioxide , Cat. No. A1010, 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

Acetic acid, Cat. No. 1.01830, 購自 Merck (Darmstadt, Germany)

Active Caspase-3 FITC Mab Apoptosis Kit, Cat. No. 550480 , 購自 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA).

ANNEX100F Kit (annexin V: FITC assay kit), 購自 AbD Serotec (Kidlington, UK).

BCA kit, Cat. No.23227 , 購自 PIERCE (Rockford, IL, USA)

Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit, Cat. No. 340242, 購自 Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)

Dihydroethidium (DHE), Cat. No. D7008, 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

Dimethyl sulfoxide (DMSO), Cat. No. D2650, 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

Enhanced chemiluminescent (ECL) detection reagent, 購自 PerkinElmer (Waltham, MA, USA)

Ethidium bromide (EtBr), Cat. No. E7637 , 購自 Sigma (St. Louis, MO,

USA)

Fetal bovine serum (FBS), Cat. No. 16170-078, 購自 Gibco (Grand Island, NY, USA)

Gentamycin, Cat. No. 15750-078, 購自 Gibco (Grand Island, NY, USA)

M-PER mammalian protein extraction reagent, Cat. No. 78501, 購自 PIERCE (Rockford, IL, USA)

Methanol, Cat. No. 1.07018, 購自 Merck (Darmstadt, Germany).

N-acetyl cysteine , Cat. No. A9165, 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

Phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), Cat. No. 70011, 購自 Gibco (Grand Island, NY, USA)

Protease inhibitors cocktail, Cat. No. 539134, 購自 Calbiochem (Darmstadt, Germany)

RPMI-1640 medium, Cat. No. 31800-022, 購自 Gibco (Grand Island, NY, USA)

Trypan blue dye solution, Cat. No. 15250-061, 購自 Gibco (Grand Island, NY, USA)

z-VAD-fmk, Cat. No. 219007, 購自 Calbiochem (Darmstadt, Germany)

二、抗體

Mouse monoclonal antibody against caspase-3, 購自 Imgenex (San Diego, CA, USA)

Rabbit polyclonal antibodies against caspase-9, 購自 Imgenex (San Diego, CA, USA)

Rabbit polyclonal antibodies against β -actin, 購自 Sigma (St. Louis, MO,

USA)

Rabbit polyclonal antibodies against poly-ADP ribose polymerase (PARP), 購自 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)

三、細胞株

人類血癌細胞株 HL-60 (acute promyelocytic leukemia), Jurkat (acute T-lymphoblastic leukemia), Molt-3 (acute T-lymphoblastic leukemia) 購自 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)

四、實驗動物

雄性裸鼠 (BALB/c nude mice), 購自國家實驗動物中心 (Taiwan)

五、儀器設備

Cytospin (Shandon Cytospin Cytocentrifuge, Cheshire, UK)

XBridge RP-18 endcapped column (5 mm pore size, 250 × 4.6 mm, inner diameter, Waters, USA)

Syringe Filter 0.45 μm pore size (PVDF, MILLIPORE, USA)

Waters Alliance 2695 separations module (Waters, USA)

Waters 996 photodiode array Detector (Waters, USA)

水浴槽 (Kansin Instruments, Taiwan)

超音波震盪器 (Model 3200, Branson, USA)

培養箱 (Model 370, Thermo Forma, USA)

無菌操作台 (造鑫, Taiwan)

迴轉式大型減壓濃縮機 (Rotavapor R-153DW, Buchi, Switzerland)

迴轉式小型減壓濃縮機 (Rotavapor R200 Series, Buchi, Switzerland)

真空控制器組 (VC-7600/VP-60D, Panchum, Taiwan)

恆溫冷卻循環裝置 (CA-1100, Eyela, Japan)

冷卻循環機 (CC-3000, Panchum, Taiwan)

無油式真空幫浦 (VP-60D, 泛群科技有限公司, Taiwan)

溶劑過濾器組 (HPLC Filtration System, MILLIPORE, USA)

超純水製造機 (TK-5/FM-120D/ZROS6016Y/ZMQS600, Millipore
Milli-Q, USA)

電子分析天平 (Toledo AT201, Mettler, Switzerland)

流式細胞儀 (FACScan, Becton Dickinson, USA)



第二節 實驗方法

一、植物材料之採集

本研究之植物材料血藤 (*Mucuna macrocarpa*) 係經本實驗室張永勳老師 (本校藥學院中國藥學暨中藥資源學系教授) 協助採集及鑑定。血藤植物於民國 95 年 7 月採集於台灣南投縣魚池鄉，並參照台灣維管束植物簡誌及中華本草等相關書籍比對所採集植物之外部型態，而確認其基原，藥材樣本並儲存於本實驗室。

二、血藤莖部粗抽物之製備

淨選採集之血藤植物以留下藤莖的部分，以切片機將莖部切成約 3 mm 厚度之薄片，於通風的環境下室溫陰乾一週後，將藥材移至不鏽鋼桶中以 methanol 浸泡 48 小時，取出萃取液並加入新的 methanol 再次浸泡，相同的浸泡時間後，再重複上述動作，一共進行 3 次。將所有萃取液以濾紙過濾後合併，所得濾液在 40°C 下以減壓濃縮機濃縮至乾，之後移至凍晶乾燥機處理 24 小時，即得血藤莖部甲醇粗抽物 (Crude methanolic extract of the stems of *Mucuna macrocarpa*, CMEMM)，並置於-20°C 冰箱中貯藏。陰乾後之血藤重 1.09 kg，經甲醇萃取濃縮後萃取物重 151 g，故萃取率約 13.9%

三、高效液相層析法

此項實驗係以血藤已知之活性成分 calycosin、afroformosin、genistein 及 medicarpin 等異黃酮類化合物做為指標成分，進行高效液相層析法分析。層析條件的探索係以上述 4 個活性成分為標準品來進行，先將標準品及檢品 (CMEMM) 溶於 methanol 或 DMSO，並分別配製為 0.1 mg/ml 及 10 mg/ml 之濃度，再以 0.45 μm 濾膜過濾，然後注入 20 μl 至高效液相層析儀 (Waters Alliance 2695 separations module 及 Waters 996 photodiode array Detector) 進行分析。層析管柱以使用 XBridge RP-18 endcapped column (5 mm pore size, 250 \times 4.6 mm, inner diameter)，移動相 (mobile phase) 沖提方式為等度沖提 (isocratic)，而為取得最佳之層析分離效果，逐一測試不同之移動相溶媒比例、檢測波長、流速及層析時間等層析條件組合，如 Table 3。

四、細胞培養

(1) 培養液的配製

將 9.5 g 之 RPMI-1640 粉狀培養基溶於約 900 ml 二次水中，加入 2 g sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)，攪拌混合均勻，調整 pH 至 7.2 到 7.4 之間，然後加二次水使容量成為 1 升，再利用 pump 將此溶液以 0.22 μm

無菌濾膜過濾，最後添加 10% fetal bovine serum (FBS) 及 0.01 mg/ml gentamycin，此溶液即為 RPMI-1640 培養液。

(2) 細胞株及培養條件

人類急性骨髓血癌細胞 HL-60 以及人類急性淋巴血癌細胞 Jurkat 和 Molt-3，皆使用 RPMI-1640 培養液培養於恆溫 37°C 並含 5% CO₂ 與過濾空氣之潮濕培養箱中。

(3) 繼代培養

培養過程使細胞密度維持在 $0.2\sim 1 \times 10^6$ cells/ml。當細胞密度超過此範圍時進行繼代培養，步驟為將含有細胞之培養液收集至離心管中，以 1200 rpm (270 ×g) 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，再將細胞打散加入新鮮培養液中繼續培養。

(4) 細胞計數

將含有細胞之培養液移至離心管，以 1200 rpm (270 ×g) 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，再將細胞打散加入新鮮培養液，取出適量體積 (10~20 μl) 與等體積之 trypan blue 混合均勻，然後取 10 μl 之混合液注入血球計數器 (hemocytometer)，蓋上蓋玻片再移至顯微鏡下計數。以手持計數器的方式，目視記錄下圖所示血球計數器四個角落之細胞總數 (N)，由於每個角落為邊長 1 mm 之正方形，而蓋上蓋玻片會形成厚度為 0.1 mm 的空

間，故可代入下列公式計算細胞密度。

1								2
4								3

$$\text{細胞密度 (cells/ml)} = N / 4 \times 2 \times 10^4$$

(5) 冷凍細胞

冷凍細胞前先確認細胞生長狀況良好再開始進行。首先配製冷凍保護液，將 RPMI-1640 培養液及 dimethyl sulfoxide (DMSO) 以 9 : 1 的比例混勻備用。將含有細胞之培養液收集至離心管中，以 1200 rpm (270 ×g) 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，再將細胞打散加入冷凍保護液，使細胞密度為 $1\sim5 \times 10^6$ cells/ml，以 1 ml 為單位分裝至冷凍小管中，然後將冷凍小管放入裝有 isopropanol (IPA) 並已預先回溫至室溫之漸凍盒中，移至 -80°C 冰箱至少 4 小時後，最後將冷凍小管取出保存於液態氮中。

(6) 解凍細胞

將冷凍小管由液態氮桶中取出後，迅速移至 37°C 的水浴槽中急速解凍約 30 秒，將含有細胞之冷凍保護液吸至已含有培養液的離心管中稀釋，以 1200 rpm (270 ×g) 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，再將細胞打

散加入新鮮 RPMI-1640 培養液培養。

五、藥物處理

精確稱取 75 mg 之 CMEMM 於 1.5 ml eppendorf 中，加入 1 ml DMSO 後，移至超音波震盪器震盪 1~2 小時使粉末完全溶解，此為 CMEMM 母液 (stock solution)，儲存於零下 20°C。另精確稱取 1.98 mg 之 arsenic trioxide (ATO) 於 1.5 ml eppendorf 中，加入 1 ml 0.1 N NaOH 後，以 vortex 震搖使粉末完全溶解，此為 ATO 母液，儲存於-20°C。依據不同實驗設計，使用前再以新鮮培養液稀釋至所需濃度進行，各濃度之 CMEMM 藥液 (25, 50 or 75 $\mu\text{g/ml}$) 所含 DMSO 皆不高於 0.1%，而各濃度之 ATO 藥液 (2.5 or 5 μM) 所含 NaOH 則不高於 5×10^{-5} N。將 HL-60, Jurkat 和 Molt-3 細胞置換為各濃度 CMEMM 或 ATO 藥液後，以 1×10^5 cells/ml 細胞密度移回培養箱繼續培養，在不同時間點 (24, 48 or 72 h) 收集細胞進行分析，並以只處理 0.1% DMSO 者為對照組。

六、細胞生長試驗

細胞生長之測定以錐蟲藍排除法 (trypan blue exclusion assay) 進行，試驗原理為 trypan blue 染劑可將細胞膜已受損之細胞染成藍色，故透過細胞計數的方式，經由顯微鏡下觀察所見藍色細胞為死細胞；反之，細

胞膜完整之健康細胞不會被 trypan blue 染劑所穿透，經由顯微鏡下觀察不被染色者為活細胞。

將藥物處理過之細胞，分別於 24、48 或 72 小時後收集至離心管中，以 1200 rpm (270 \times g) 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，拍散細胞並加入 1 ml PBS (1X) 將細胞混勻。取等量之細胞懸浮液與 0.4% trypan blue solution 充分混合，取 10 μ l 加入血球計數器中，移至顯微鏡下觀察，死細胞呈現藍色，而活細胞會呈透明，可分別計算活細胞及死細胞之總數量及細胞存活率。

七、細胞週期分析

細胞週期分析係以 propidium iodide (PI) 對細胞之 DNA 進行螢光染色，再利用流式細胞儀進行分析。試驗原理為細胞週期正常運作時，DNA 含量會發生週期性的變化， G_2 期的 DNA 含量為 G_1 期的 2 倍，S 期的 DNA 含量則居於兩者之間，而若細胞進行凋亡反應時，DNA 斷裂後產生的亞二倍體 (hypodiploid) 則會增加，故 sub- G_1 期可視為細胞凋亡的一種象徵。由於 PI 是一種會與 DNA 雙股螺旋上氫鍵結合的核酸染劑，當 PI 被偵測到的訊號愈強時，即代表 DNA 的含量愈多，因此可藉由分析 sub- G_1 期或細胞週期各時期之 DNA 百分比，來觀察藥物對細胞週期的影響。

本實驗係以 Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit，依照 Becton Dickinson 廠商提供之實驗步驟進行染色。將藥物處理過之細胞，分別於 24、48 或 72 小時後收集至流式細胞儀專用試管 (Falcon cat. 352054) 中，以 300 ×g 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，拍散細胞，再以 1 ml Buffer Solution (主要含 sucrose, trisodium citrate 以及 DMSO, 貯存及 wash 細胞用) wash 兩次，回溶於 1 ml Buffer Solution。然後改以 400 ×g 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，加入 250 μl Solution A (含有 trypsin 的 spermine tetrahydrochloride detergent buffer, 用於 digest 細胞膜及細胞骨架)，以手輕拍混勻，室溫下靜置 10 分鐘。再加入 200 μl Solution B (含有 trypsin inhibitor 及 RNAase 的 citrate buffer, 用中止 trypsin 反應及 digest RNA)，以手輕拍混勻，室溫下靜置 10 分鐘，再加入 200 μl Solution C (含有 PI 及 spermine tetrahydrochloride 的 citrate stabilizing buffer, 用於 DNA 螢光染色)，以手輕拍混勻，將樣品移至冰上，避光靜置 10 分鐘後，以 FACScan 流式細胞儀分析。FACScan 係利用 argon ion laser (15 mV) 波長 488 nm 光束射向細胞，並透過波長 585 nm 之濾片收集 PI 被激發後所產生的紅色螢光訊號，最後以 CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 與 ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, USA) 兩套軟體來分析結果。

八、細胞核染色法

將藥物處理過之細胞，分別於 24、48 或 72 小時後收集至離心管中，以 PBS (1X) wash 兩次後，利用 Cytospin 離心機將細胞固定於玻片上，滴入適量 (約 30~50 μ l) 之 methanol/acetic acid (3/1, V/V) 混合液或 10 % formalin solution 為固定液，待風乾後，滴入適量 (約 30~50 μ l) EtBr 或 DAPI 進行細胞核染色，再用封片膠將蓋玻片與載玻片黏合，利用螢光顯微鏡鏡檢。

九、Annexin V-FITC / PI 雙染色法

在正常細胞中，磷脂絲胺酸 (phosphatidylserine, PS) 只分布在細胞膜脂質雙層的內側，而在細胞凋亡早期，細胞膜中的磷脂絲氨酸會由脂膜內側翻向外側。而 annexin V 是一種 Ca^{2+} 依賴性的磷脂結合蛋白，其與磷脂絲氨酸有高度親和力，可透過細胞外側暴露的磷脂絲氨酸與凋亡早期細胞的胞膜結合，因此 annexin V 可作為檢測細胞早期凋亡的靈敏指標，以具有 FITC 螢光素標記之 annexin V 作為探針，可透過流式細胞儀檢測細胞凋亡的發生。另外，利用 PI 不會通過完整細胞膜的特性，同時進行雙染色則可進一步區分活細胞與死細胞，因此 annexin V-FITC / PI 雙染色法可以將處於不同凋亡時期的細胞區分開來。

本實驗係以 ANNEX100F Kit (annexin V: FITC assay kit)，依照 AbD

Serotec 廠商提供之實驗步驟進行染色。將藥物處理過之細胞，分別於 24、48 或 72 小時後收集至流式細胞儀專用試管中，以 300 xg 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，拍散細胞，再以 1 ml PBS (1X) wash 一次後，回溶於已稀釋至 1X 之 Binding buffer，並調整細胞密度至 $2-5 \times 10^5$ cells/ml。加入 5 μ l Annexin V:FITC 於 195 μ l 之上述細胞液，以手輕拍混勻，於室溫下避光靜置 10 分鐘。然後以 Binding buffer (1X) wash 一次並回溶於 190 μ l，加入 10 μ l PI solution 後，利用 FACScan 流式細胞儀檢測，並以 CellQuest 軟體分析。

十、Active caspase-3 分析

細胞中活化態的 caspase-3 可視為進行細胞凋亡的一種指標，本實驗係以 Active Caspase-3 FITC Mab Apoptosis Kit，依照 BD Pharmingen 廠商提供之實驗步驟進行染色。將藥物處理過之細胞，於 24 小時後收集至流式細胞儀專用試管中，以 300 xg 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，拍散細胞，再以 1 ml PBS (1X) wash 兩次後，回溶於 BD Cytotfix/Cytoperm™ solution，並調整細胞密度至 1×10^6 cells/ 0.5 ml。將檢品移至冰上靜置 20 分鐘後，離心去除上清液，並以已稀釋至 1X 之 BD Perm/Wash buffer™ wash 兩次，然後將細胞回溶於含有 caspase-3 抗體之 Perm/Wash buffer™ (混和比例如下表所示)，於室溫下靜置 30 分鐘。最後以 1 ml BD Perm/Wash

buffer™ (1X) wash 一次，並用 0.5 ml 回溶細胞後，然後以 FACScan 流式細胞儀檢測，以 CellQuest 軟體進行資料分析。

Number of Tests	Number of cells	Perm/Wash™ Volume (ml)	Antibody Volume (μl)
1	1x10 ⁶	0.10	20
5	5x10 ⁶	0.50	100
10	10x10 ⁶	1.00	200
20	20x10 ⁶	2.00	400

十一、細胞內活性氧化物測定

本實驗係以 DHE 做為探針來檢測細胞內之超氧陰離子 (superoxide)。將藥物處理過之細胞，分別於指定之時間收集至流式細胞儀專用試管中，以 300 ×g 室溫下離心 5 分鐘，移除上清液，拍散細胞，再以 1 ml PBS wash 一次，回溶於濃度為 10 μM 之 DHE-containing RPMI-1640 medium (不含 phenol red)，將試管移至 37°C 水浴槽放置 30 分鐘，之後將試管移至冰上，靜置 10 分鐘後上 FACScan 流式細胞儀分析。

十二、細胞蛋白質萃取

將藥物處理過之細胞收集至離心管中，以 270 ×g 於 4°C 離心 5 分鐘，將移除上清液並拍散細胞，用 PBS wash 細胞兩次，再加入適量 (30-50 μl) 的 complete lysis buffer (每 1 ml M-PER mammalian protein extraction reagent 含有 0.5% Proteinase inhibitors cocktail) 並與細胞均勻混合，移置冰

上30分鐘。之後以14000 ×g 於4°C 離心20分鐘，最後收集上清液即為細胞蛋白質溶液，將其保存於-80°C 冰箱備用。

十三、蛋白質含量測定

蛋白質於鹼性環境下可將雙價的銅離子 (Cu^{2+}) 還原成單價的亞銅離子 (Cu^+)，而 bicinchoninic acid (BCA) 會與亞銅離子螯合，產物成藍紫色，因此本實驗使用 BCA kit 來分析蛋白質含量。BCA reagent kit 含 reagent A (BCA) 及 reagent B (CuSO_4)，事先將 reagent A 及 reagent B 以 49 : 1 比例均勻混合，在 96-well plate 中與標準品 bovine serum albumin (BSA) 或蛋白質樣品以 9 : 1 比例混合，於 37°C 暖房靜置反應 30 分鐘，最後利用分光光度計在波長 562 nm 檢測其吸光值，藉由 BSA 繪製之標準曲線，以內插法可求得樣品中蛋白質含量。

十四、西方墨點法

首先，使用 BioRad 迷你電泳裝置，製備 10% 或 12.5% 之 separating gel 與 5% stacking gel 進行 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳。將已定量之蛋白質與 4X sample loading buffer 混合均勻，放入 100°C 沸水中煮 5 分鐘，隨後立即放置冰上冷卻，再依序 loading 至每個 well 中。固定電壓在 60 volts 進行電泳 (約 0.5 至 1 小時)，

當band跑至separating gel時，再將電壓調至120 volts進行電泳（約1至1.5小時）。電泳結束後將gel取出，用BioRad transfer system固定電流400 mA通電1小時，將gel上的蛋白質轉印至nitrocellulose membrane (NC membrane)，完成後將NC membrane放進5% blocking buffer (5% non-fat milk in TTBS)，進行blocking 1小時。接著針對實驗欲觀察的蛋白，用一級抗體和NC membrane上的蛋白質結合，再以二級抗體和一級抗體結合，接著與enhanced chemiluminescence (ECL) 進行呈色反應。用底片壓片後，使用沖片機進行沖片，即可在底片上觀察蛋白質表現的變化。本實驗所使用的各種溶液之配方如附錄6。

十五、裸鼠異位移植腫瘤實驗

本實驗是經過台北榮民總醫院動物實驗委員會核可通過，核可文號為No. 97-148。首先，將購得之 22 隻裸鼠（週齡 5 週，體重 20 g 至 24 g），飼養於無病原環境之場所，室溫維持 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，燈光每日以 12 小時亮與 12 小時暗的方式循環，使用之鼠籠需經過滅菌，而飼料與飲用水皆經過滅菌再給予。飼養一週後，將 HL-60 細胞以皮下注射的方式注入裸鼠兩邊的大腿外側，每邊的細胞數為 1×10^6 cells (in 0.5 ml PBS)。當所有老鼠長出可觸知大小的腫瘤時（腫瘤直徑約 4 mm 至 6 mm，時間約 3 週），將裸鼠隨機分成三組，每組 7 到 8 隻，分別以腹腔注射的方式給予劑量為

100 mg/kg/day 之 CMEMM, 500 mg/kg/day 之 CMEMM 以及滅菌水，每天給予 1 次，同時以數位游標卡尺測腫瘤大小以及體重，腫瘤大小的計算係依據公式： $\text{tumor volume (mm}^3\text{)} = 0.4 \times L \times W^2$ ，L 和 W 分別為腫瘤之最長邊與最短邊。連續給藥 21 天後，將所有裸鼠犧牲並取下腫瘤，記錄最後體重與腫瘤重量以計算 % ratio of final tumor-to-body weight (Ho et al., 2006)，然後將腫瘤與其他器官，如肝臟、腎臟及脾臟，分別取適當大小進行固定及石蠟包埋，最後將蠟塊切片，以 H&E (hematoxylin and eosin) 染色後，請病理科醫師進行病理學分析。

十六、藥物合併作用分析

本分析的目的在于於判斷藥物合併的交互作用是屬於協同性、加成性或者拮抗性，實驗數據取自 CMEMM 與 ATO 並用處理後之細胞生長試驗，利用 CalcuSyn V2 軟體 (購自 Biosoft, Cambridge, United Kingdom) 計算各劑量組合之 Combination Index (CI)。當 CI 小於 1 時屬於協同作用，CI 等於 1 時屬於加成作用，而 CI 大於 1 時則是拮抗作用，更進一步的 CI 意義判讀則參照附錄 7。

十七、統計方法

進行統計分析時，實驗數據取自具有再現性至少三次之獨立實驗 (動

物實驗除外)，每次實驗中各處理均至少二重複，並以平均值加減標準誤 (mean ± SE) 表示。實驗組與對照組間平均值差異的分析，係以變異數分析 (one-way analysis of variance) 進行，並以 Student–Newman–Keuls 做事後檢定，當 $P < 0.05$ 時視為具有統計上的意義，使用之統計軟體為 SPSS for Windows 10.0 version。



第五章 實驗結果

第一節 血藤莖部粗抽物之 HPLC 指紋圖譜

為尋求分離效果最佳之層析條件，本實驗先將 4 種異黃酮類 calycosin、afroformosin、genistein 及 medicarpin 之混合標準品以 Table 3 之層析條件 A 至 E 逐一進行測試，其中層析條件 D 及 E 的對於 4 種標準品成分之分離效果較佳。再以此二條件注入 CEMMM 檢品測試，結果以層析條件 E 可明顯分離出 calycosin、afroformosin、genistein 等三成分，其標準品及 CEMMM 之層析圖譜如 Figure 2。



第二節 血藤莖部粗抽物對於人類血癌細胞 HL-60 生長之影響

如 Figure 3 所示，CMEMM 對於 HL-60 細胞的生長抑制有劑量及時間的依存關係，以 50 $\mu\text{g/ml}$ 或 75 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 處理之細胞可以看到顯著的生長抑制作用 ($P < 0.05$)，而反應時間在 48 及 72 小時組別的趨勢一致。抑制效果最明顯是出現在 72 小時的反應時間，隨著 CMEMM 劑量由 25 $\mu\text{g/ml}$ 增加至 75 $\mu\text{g/ml}$ ，生長抑制的百分率也由 22.7% 提升至 81.0%。72 小時之 CMEMM 半數抑制濃度 (50% growth inhibition, IC_{50}) 為 36.4 $\mu\text{g/ml}$ 。



第三節 血藤莖部粗抽物對於人類血癌細胞 HL-60 細胞週期中 sub-G₁ 期比率之影響

以流式細胞儀分析經 CMEMM 處理之 HL-60 細胞週期，結果如 Figure 4 所示，CMEMM 會提高 HL-60 細胞於 sub-G₁ 期 (hypodiploid 亞二倍體) 比率，且有劑量依存之關係。在 24 至 72 小時的反應過程中，HL-60 細胞以 75 µg/ml CMEMM 處理者，其細胞處於 sub-G₁ 期比率明顯由 25.4% 提升至 54.7%，而相同條件下對照組則幾無變化 (0.4% 至 0.7%)。



第四節 血藤莖部粗抽物誘導人類血癌細胞 HL-60 細胞 凋亡現象之探討

一、以 EtBr 染色法檢測細胞凋亡之型態特徵

本實驗是將經過 CMEMM 處理 72 小時之 HL-60 細胞，藉由 EtBr 螢光染色來觀察細胞核之型態改變。如 Figure 5 所示，經 25 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 處理之細胞，其細胞核型態與對照組相似；而經 50 $\mu\text{g/ml}$ 或 75 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 處理之細胞，其細胞核呈現皺縮 (condensed nuclei)、斷裂 (fragmented chromatin) 或凋亡小體 (apoptotic bodies)，與對照組圓形且完整的細胞核明顯不同。

二、以 annexin V-FITC/PI 雙染色法檢測凋亡細胞之比率

以 annexin V-FITC/PI 雙染色法分析經 CMEMM 處理之 HL-60 細胞，結果如 Figure 6 所示，CMEMM 會提高 annexin V-positive 凋亡細胞的比率，且有劑量及時間的依存關係。經過 72 小時的反應過程，HL-60 細胞以 75 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 處理者，細胞早期凋亡 (annexin V-positive, PI-negative) 的比率由 8.5% 提升至 64.8%，細胞壞死 (annexin V-positive, PI-positive) 的比率由 7.1% 提升至 23.4%，而相同條件下對照組則幾無變化 (細胞早期凋亡比率：1.3% 至 2.5%；細胞壞死比率 0.6% 至 1.8%)。

三、以流式細胞儀檢測細胞內之活化態 caspase-3

由於 caspase-3 為 caspase 家族主要成員之一，此類的 cysteine protease 可裂解 protein substrate 並產生特異性的凋亡型態 (characteristic apoptotic morphology) ，因此 caspase-3 的活化可以做為細胞凋亡的指標。而為了瞭解 caspase-3 的活化是否與 CMEMM 所誘導的 HL-60 細胞凋亡有關，本實驗以具專一性的活化態 caspase-3 抗體 (active caspase-3-specific antibody) 做為探針，利用流式細胞儀檢測分析。結果如 Figure 7 所示，於 24 小時的反應時間下，CMEMM 會誘導 HL-60 細胞內之活化態 caspase-3 提升，且有劑量的依存關係。其中，以 75 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 處理之 HL-60 細胞，其活化態 caspase-3 的比率由 2.8% 提升至 42.5%。

第五節 血藤莖部粗抽物 (CMEMM) 對於裸鼠異位移植腫瘤實驗之影響

為了瞭解在活體動物模式中，CMEMM 是否也可以抑制 HL-60 細胞的生長，本實驗先將 HL-60 細胞注入裸鼠，待腫瘤生成後，每天以腹腔注射的方式，分別將劑量 100 mg/kg 或 500 mg/kg 之 CMEMM 注入裸鼠，並以給予 PBS 者做為對照組，為期 21 天。結果如 Figure 8 所示，以每日所測量之腫瘤體積指數 (relative tumor volume) 來看，處理 100 mg/kg CMEMM 之組別與對照組的趨勢相同，而處理 500 mg/kg CMEMM 之組別相較於對照組由給藥第 5 天起即有顯著差異。實驗結束時，100 mg/kg CMEMM 組與對照組之腫瘤體積指數分別為 16.8 及 16.6，而 500 mg/kg CMEMM 組腫瘤體積指數為 9.4。此外，以最終腫瘤與體重比值 (final tumor-to-body weight) 來看，處理 500 mg/kg CMEMM 之組別相較於對照組有顯著差異，顯示 CMEMM 抑制腫瘤生長的同時並未使裸鼠體重減輕。而實驗期間各組均未發生老鼠死亡的情形，且後續的病理切片觀察 (H&E stain) 中，肝臟、腎臟及脾臟皆未發現有病變的情形。

第六節 血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用對於人類血 癌細胞 HL-60，Jurkat 及 Molt-3 生長之影響

為評估 CMEMM 與 ATO 並用時對於 HL-60，Jurkat 及 Molt-3 細胞生長之影響，將上述細胞分別以 25 $\mu\text{g/ml}$ ，50 $\mu\text{g/ml}$ ，75 $\mu\text{g/ml}$ 之 CMEMM 以及 2.5 μM ，5 μM 之 ATO 單獨或是合併處理。經過 24 及 48 小時反應時間後，各組別之生長情形如 Figure 9 所示，CMEMM 合併使用 ATO 明顯可以增強對於細胞生長抑制的效果。

以 CalcuSyn 軟體分析藥物交互作用的結果如 Table 4 所示，不同濃度之 CMEMM 與 ATO 並用對於 HL-60 細胞的生長抑制作用均屬於協同效果，但對於 Jurkat 及 Molt-3 細胞的生長抑制則依組合的不同而呈現協同、加成或拮抗效果。

第七節 血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用對於對於人類血癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞內活性氧化物之影響

由於 ATO 或某些 DNA damaging agent 可以透過 ROS 的生成來誘導細胞凋亡，因此本實驗以 DHE 做為探針，檢測 ROS 在 CMEMM 與 ATO 誘導之細胞凋亡是否產生變化。結果如 Figure 10 所示，在 CMEMM 與 ATO 合併處理 48 小時的過程中，HL-60 細胞於處理時間 16 小時開始，細胞內 ROS 之生成量隨著時間漸漸上升，而 Jurkat 細胞則是從處理時間 8 小時開始顯著提升。



第八節 血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用對於人類血 癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞週期中 sub-G₁ 期比 率之影響

由於 CMEMM 與 ATO 並用時，可以協同性地增加對於 HL-60 及 Jurkat 細胞生長抑制的作用，所以本實驗進一步以流式細胞儀分析經藥物處理之細胞週期的變化。結果如 Figure 11 所示，當處理時間為 24 小時，細胞只有處理 2.5 μ M 之 ATO 者，其處於 sub-G₁ 期細胞的比率都很低（小於 3%），而同時再加入 50 μ g/ml 之 CMEMM 處理者，sub-G₁ 期的比率將會顯著提升。若處理時間延長至 48 小時，則 Jurkat 細胞處於 sub-G₁ 期增加的比率明顯高於 HL-60 細胞。

此外，倘若 CMEMM 與 ATO 並用時再加入抗氧化劑 NAC，當處理時間為 24 小時，HL-60 細胞處於 sub-G₁ 期細胞的比率將由 8.12% 降低為 4.12%，Jurkat 細胞處於 sub-G₁ 期細胞的比率將由 13.27% 降低為 2.75%；若處理時間延長至 48 小時，則抑制幅度更為明顯，HL-60 細胞處於 sub-G₁ 期細胞的比率將由 10.14% 降低為 4.11%，Jurkat 細胞處於 sub-G₁ 期細胞的比率將由 22.59% 降低為 2.37%。顯示 NAC 可以抑制 CMEMM 與 ATO 並用所造成的 sub-G₁ 期比率增加。

第九節 血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用誘導人類血 癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞凋亡現象之探討

一、以 DAPI 染色法檢測細胞凋亡之型態特徵

本實驗是將單獨處理 50 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM、2.5 μM ATO 或是並用處理之細胞，藉由 DAPI 螢光染色來觀察細胞核之型態改變。如 Figure 12 所示，於處理時間 24 小時，CMEMM 和 ATO 並用處理之 HL-60 及 Jurkat 細胞明顯比單獨處理者具有細胞核皺縮 (condensed nuclei)、斷裂 (fragmented chromatin) 或凋亡小體 (apoptotic bodies) 的現象。當處理時間延長至 48 小時，則並用處理所造成 HL-60 及 Jurkat 細胞的凋亡形態特徵將更為明顯，而 Molt-3 細胞也開始出現凋亡形態特徵。

二、以 annexin V-FITC/PI 雙染色法檢測凋亡細胞之比率

為了進一步確認在 CMEMM 與 ATO 並用造成細胞凋亡的現象中，ROS 是否扮演重要的角色，本實驗在 annexin V-FITC/PI 雙染色法檢測凋亡細胞比率的同時，另外加入一些抗氧化劑如 NAC、BHT 或 α -tocopherol 加以測試。結果如 Figure 13 所示，經過 24 小時的處理時間，單獨處理 50 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 或 2.5 μM ATO 之 HL-60 細胞，其 annexin V-positive 凋亡細胞的比率分別為 3.65% 及 2.18%，但兩者並用處理時此比例會顯著提

升至 25.36%，而若同時再加入抗氧化劑 NAC 或 BHT 處理，則 annexin V-positive 的比率則分別會減少至 2.51% 或 12.79%。而相同的處理時間下，單獨處理 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMEMM 或 2.5 μM ATO 之 Jurkat 細胞，其 annexin V-positive 的比率分別為 3.89% 及 6.86%，兩者並用處理時此比例則顯著提升至 23.81%，若同時再加入抗氧化劑 NAC 或 α -tocopherol 處理，則 annexin V-positive 的比率則分別會減少至 7.70% 或 8.55%。以上結果顯示，CMEMM 與 ATO 並用在所 HL-60 及 Jurkat 細胞所誘導的凋亡現象，顯然與氧化壓力的形成有關。



第十節 利用西方墨點法探討血藤莖部粗抽物與三氧化二砷並用誘導人類血癌細胞 HL-60 及 Jurkat 細胞凋亡之相關蛋白質表現

為了進一步探討 CMEMM 與 ATO 並用所誘導細胞凋亡的可能機轉，本實驗以西方墨點法檢測粒線體路徑相關蛋白質的表現。如 Figure 14 所示，經過 24 小時以 CMEMM 與 ATO 並用處理之 HL-60 及 Jurkat 細胞，其活化態的 caspase-3 和 caspase-9 (cleaved caspase-3, caspase-9) 以及被切斷的 PARP (cleaved PARP) 蛋白質表現量都比單獨處理者為高。此外，若同時加入 NAC 於 CMEMM 和 ATO 並用處理者，這些蛋白質的表現量將明顯受到抑制，且幾乎與未處理藥物者相同。本實驗結果顯示，CMEMM 與 ATO 並用所誘導細胞凋亡與粒線體路徑有關，並且可以被抗氧化劑 NAC 所調控。

第六章 討論

在傳統中醫藥的使用上，活血化癥劑常被用來治療身體循環不佳或是血液相關的疾病。由於這一類草藥也具有改善血癌相關的症狀，近年來中國大陸已有使用活血化癥劑治療白血病或骨隨增殖性疾病 (myeloproliferative disorders) 的報導 (吳順杰 及 顏美心, 2001)。此外，也有文獻指出活血化癥劑可以透過誘導細胞凋亡達到抗血癌的效果 (鄭瑾 et al., 2003; 戴錫珍, 2004)。因此，本研究的動機在於探討同屬活血化癥劑之血藤對於抗血癌的活性與機制，以尋求血藤之民俗用法的佐證。

實驗結果證實，血藤具有抑制急性前骨隨性白血病細胞 HL-60 生長的作用 (Figure 3)。相較之下，對於急性淋巴性白血病細胞 Jurkat 的抑制生長作用較弱一些，但對於 Molt-3 細胞則最不敏感 (Figure 9)，其可能原因在於細胞分化程度上的差異所致。而類似的情形在先前的報導中也有出現，亦即同一種藥物對於 APL 及 AML 這兩個不同種類白血病細胞的生長抑制效果會有差異，且結果同樣是 HL-60 細胞明顯較 Molt-3 細胞對於藥物更為敏感 (Chang et al., 2005)。而本研究進一步去探討 CMEMM 抑制 HL-60 細胞生長是否與細胞凋亡有關，經由：(1) 細胞處於 sub-G₁ 期比率的增加 (Figure 4)、(2) 細胞核凋亡性形態特徵的出現 (Figure 5)、(3) annexin V-positive 比率的提升 (Figure 6)，以及 (4) 細胞內活化態

caspase-3 的提升 (Figure 7) 等結果證實，CMEMM 的確會誘導 HL-60 細胞進行凋亡。

而在裸鼠異位移植腫瘤實驗中，每天以腹腔注射劑量 500 mg/kg/day 之 CMEMM 的組別，其腫瘤生長的趨勢相較於對照組明顯有受到抑制，而最終腫瘤與體重比值也顯著的低於對照組 (Figure 8)。然而，在初步預試驗的結果中，每天以餵食管口服方式給予相同劑量 500 mg/kg/day 的組別，其腫瘤生長的情形卻與對照組沒有統計上的差異。因此，可以推論 CMEMM 經由不同的給藥途徑時，可能會受到吸收、分布或代謝等藥物動力學行為影響療效，若要提升 CMEMM 的生體可用率及其應用價值，或許未來可朝劑型研究或配方設計等方式來發展。此外，未來動物實驗模式的選擇，也可利用老鼠血癌細胞 WEHI-3 直接腹腔注射於 BALB/c 老鼠誘導血癌發生的方式 (Lai et al., 2010)，加以評估 CMEMM 對於全身性具有血癌細胞的老鼠是否同樣具有療效。

近年來由於 ATO 在急性前骨髓性白血病的治療上具有顯著療效，因而不少的臨床前研究發現 ATO 具有對抗其他癌症的治療潛力，但不幸的是，在非急性前骨髓性的白血病治療上，幾個臨床研究的結果卻說明，如果僅單獨使用 ATO 的治療效果會很有限。因此，近來的臨床前研究方向已朝向將前氧化劑 (pro-oxidant) 或天然化合物與 ATO 並用的合併療法，

藉以提升 ATO 的療效。所以本研究進一步去探討 CMEMM 若同時與 ATO 並用對於人類血癌細胞的影響，結果發現當 50 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 與 2.5 μM ATO 並用時會協同性地增加對於 HL-60 及 Jurkat 細胞的生長抑制作用 (Figure 9, Table 4)，其機轉是透過活性氧化物途徑誘導細胞凋亡 (Figure 10, 11, 12, 13)，並與粒線體路徑有關 (Figure 14)。這些發現提供了未來 CMEMM 與 ATO 並用於血癌治療上的研究基礎，也開啟臨床治療上將化療藥物與中草藥並用的可能性。

關於藥物交互作用的分析，主要是依據 CI 的演算結果來做判讀。有趣的是，CMEMM 與 ATO 在不同劑量組合下，對於 HL-60 細胞都是產生協同性的生長抑制效果，但對於 Jurkat 或 Molt-3 細胞則可能因不同的劑量組合而有協同性、加成性，甚至拮抗性的作用結果 (Table 4)。由於 HL-60 和 Jurkat、Molt-3 分別屬於 APL 和 ALL 兩個不同種類的細胞株，藥物交互作用分析結果裡的不一致可能也和細胞株特異性的分子或基因表現有關 (Ralph, 2008)，例如：PML-RAR α 蛋白質的降解或是基因表現甲基化的減少，可能會被藥物的交互作用所影響 (Pelicano et al., 2006; Peng et al., 2010; Yao et al., 2009)。所以未來臨床應用上，最佳化的劑量組合將會是 CMEMM 和 ATO 合併療法重要的一環，值得進一步探討。

此外，藥物交互作用分析係基於 median-effect equation 的 mass-action

law principle，也就是分析結果不管是協同性或是拮抗性，其實都與作用機轉 (mechanism)、劑量單位 (drug unit) 或是動力學模式 (dynamic order) 不具依存關係 (Chou, 2010)。所以當相同的 50 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM 與 2.5 μM ATO 並用處理時，對於 HL-60 及 Jurkat 細胞有協同性的增強生長抑制效果，但對於細胞於 sub- G_1 期的比率 (Figure 11) 或是細胞凋亡相關之蛋白質表現 (Figure 14) 卻沒有協同性的增加，這樣的結果是可以理解的。不過，在 annexin V-FITC/PI 的實驗結果中，相同的劑量組合仍可以顯著的觀察到協同性地增加 annexin V-positive 的細胞比率 (Figure 13)。

ATO 會刺激細胞內生成 ROS 是眾所周知的事實，一些體外試驗的研究報導指出，ATO 所誘導的血癌細胞凋亡可能是透過活性氧化物途徑，例如：NADPH oxidase (Wang et al., 2008), mitochondrial electron transport chain (Pelicano et al., 2003) 或是抑制抗氧化酵素如 thioredoxin reductase (TrxR) (Lu et al., 2007), GPx (Jing et al., 1999) 等。因此，本研究進一步探討了 ROS 在 CMEMM 與 ATO 並用所誘導細胞凋亡的重要性 (Figure 10, 13)，而類似的效果也在 ATO 與一些天然的多酚類並用時出現，例如 ATO 與 quercetin (Ramos and Aller, 2008), genistein (Sanchez et al., 2008) 或是 curcumin (Sanchez et al., 2010) 並用。因此，這些結果證實如果 ATO 在含有前氧化物的環境中 (pro-oxidant environment)，將會增強血癌細胞凋亡的現象。

有關血藤化學成分方面，本實驗室先前已由莖部分離出多個具有活性之異黃酮類成分 (Table 2)，而本研究以 calycosin、aformosin 及 genistein 為指標成分，建立 CMEMM 之 HPLC 指紋圖譜 (Figure 2)，可供後續研究者基原比對使用。這些化合物的活性相關報導指出，calycosin 具有抑制 U937 淋巴癌細胞生長的作用 (Matsuda et al., 2007)，aformosin 對於以 TPA 誘導小鼠皮膚腫瘤生成具有抑制效果 (Konoshima et al., 1992)，而 genistein 對於骨髓性血癌細胞 (HL-60 和 KG1a) 及淋巴性血癌細胞 (Molt-3 和 Raji) 皆有抑制生長作用，並在以小鼠血癌細胞 L1210 誘導的血癌動物模式中，觀察到富含 genistein 的飲食可以提高患有血癌小鼠的存活率 (Raynal et al., 2008)。此外，近來有報導指出 genistein 與 ATO 並用時，會透過提高 ROS 的生成來增強血癌細胞 (如 HL-60, THP-1, Jurkat, RPMI-8866 及 U937) 的凋亡現象，然而其 genistein 的使用劑量為 50 μ M (Sanchez et al., 2008)，由於先前的本實驗室對於 genistein 在血藤乾燥莖部的含量分析結果為 0.001% (陳亭亭, 2005)，因此可以合理的推斷，genistein 並非 CMEMM 去增強 ATO 誘導 HL-60 及 Jurkat 細胞凋亡的主要成分，CMEMM 與 ATO 協同性地抗血癌效果可能是透過多個具有抗癌作用的異黃酮成分 (calycosin、aformosin、genistein 及 medicarpin) 所產生。

而為進一步探討 CMEMM 與 ATO 並用所誘導的細胞凋亡是否透過

caspase-dependent 的路徑，在細胞週期試驗中，也嘗試加入 pan-caspase inhibitor 如 z-VAD-fmk 來觀察細胞死亡現象是否受到影響。而實驗結果發現，在處理時間 24 小時的反應中，25 μ M 的 z-VAD-fmk 可以顯著地減少 Jurkat 細胞因 50 μ g/ml CMEMM 與 2.5 μ M ATO 作用所引起 sub-G₁ 期的蓄積；但是在同樣的條件下，z-VAD-fmk 對於 HL-60 細胞卻顯然無法抑制 sub-G₁ 的比率 (Figure 15)。然而，經由 annexin V-FITC/PI 的實驗結果可以發現，HL-60 細胞受 CMEMM 與 ATO 並用所誘導的 necrotic cell 為 13.17%，明顯比 Jurkat 細胞的 2.22% 為高 (Figure 13)，因此推測 z-VAD-fmk 對於 HL-60 細胞無法抑制其 DNA 斷裂的原因，可能是因為 HL-60 部分的細胞已走向細胞壞死的方式。此外，25 μ M 之 z-VAD-fmk 對於 HL-60 的細胞是否濃度過低而不足以作用，或者 z-VAD-fmk 加入時間點過早，以致於還沒開始作用就被細胞的酵素所分解，這些也都是 z-VAD-fmk 對於 HL-60 細胞反應不明顯的可能原因，至於是否與 caspase-independent 路徑有關則有待進一步評估。

第七章 結論與展望

本論文旨在揭露藥用植物血藤 (*Mucuna macrocarpa*) 之抗血癌活性研究及其可能機轉。首先，利用血藤已知的異黃酮活性成分建立 HPLC 指紋圖譜，以供後續研究者基原比對使用。而細胞培養實驗結果顯示，血藤莖部甲醇粗抽物 (CMEMM) 可以透過誘導細胞凋亡的方式，去抑制人類血癌細胞 HL-60 的增殖作用，並且於活體動物模式中亦有顯著抑制腫瘤生長的效果，而實驗過程中 500 mg/kg/day 之高劑量 CMEMM 對於老鼠不具有毒性。

CMEMM 與抗血癌用藥三氧化二砷 (ATO) 並用時，也會透過誘導細胞凋亡的方式，協同性地抑制急性前骨髓性白血病細胞 (HL-60) 及急性淋巴性白血病細胞 (Jurkat) 生長。兩者並用時所形成的協同作用，讓劑量在人體可達血中濃度之 ATO (2.5 μM)，其抑制血癌細胞增生的效果得以顯著提升。而在 CMEMM 與 ATO 並用所誘導的細胞凋亡過程中，由於活性氧化物的生成扮演著重要的角色，因此抗氧化劑的介入與否將明顯影響兩者並用的療效。此外，此細胞凋亡的機轉也明顯與粒線體路徑的活化有關。

綜合以上結果，血藤不僅具有治療急性前骨髓性白血病的潛力，更可能透過與三氧化二砷的並用來治療急性淋巴性白血病。本論文驗證藥用植

物血藤的民俗用法，提供未來 CMEMM 與 ATO 並用於血癌治療上的研究基礎，提升台灣藥用植物的應用價值，也開啟臨床治療上將化療藥物與中草藥並用的可能性。



參考文獻

- Ashe, P.C. and Berry, M.D., 2003. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 199-214.
- Bhakuni, D.S., Goel, A.K., Jain, S., Mehrotra, B.N., Patnaik, G.K. and Prakash, V., 1988. Screening of Indian plants for biological activity: Part XIII. *Indian J Exp Biol* 26: 883-904.
- Burry, L.D. and Seki, J.T., 2002. CNS relapses of acute promyelocytic leukemia after all-trans retinoic acid. *Ann Pharmacother* 36: 1900-1906.
- Chang, Y.F., Chi, C.W., Chern, Y.T. and Wang, J.J., 2005. Effects of 1,6-Bis[4-(4-amino-3-hydroxyphenoxy)phenyl]diamantane (DPD), a reactive oxygen species and apoptosis inducing agent, on human leukemia cells in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 202: 1-12.
- Chang, Y.F., Hsu, Y.C., Hung, H.F., Lee, H.J., Lui, W.Y., Chi, C.W. and Wang, J.J., 2009. Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2-methoxyestradiol in human hepatoma cells. *Nutr Cancer* 61: 735-745.
- Choi, Y.J., Park, J.W., Suh, S.I., Mun, K.C., Bae, J.H., Song, D.K., Kim, S.P. and Kwon, T.K., 2002. Arsenic trioxide-induced apoptosis in U937 cells involve generation of reactive oxygen species and inhibition of Akt. *Int J Oncol* 21: 603-610.
- Chou, T.C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies.

Pharmacol Rev 58: 621-681.

Chou, T.C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 70: 440-446.

Cohen, M.H., Hirschfeld, S., Flamm Honig, S., Ibrahim, A., Johnson, J.R., O'Leary, J.J., White, R.M., Williams, G.A. and Pazdur, R., 2001. Drug approval summaries: arsenic trioxide, tamoxifen citrate, anastrozole, paclitaxel, bexarotene. *Oncologist* 6: 4-11.

Cornic, M. and Chomienne, C., 1995. Induction of retinoid resistance by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia after remission. *Leuk Lymphoma* 18: 249-257.

D'Autreaux, B. and Toledano, M.B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 813-824.

Editorial Board of Zhong Hua Ben Cao, 1999. Zhong Hua Ben Cao (China Herbal). Shanghai Scientific Technology Press, Shanghai, China; pp. 576-577.

Editorial Committee of the Flora of Taiwan, 1993. Flora of Taiwan. Tah Jinn, Taipei, Taiwan; pp.341-343.

Evens, A.M., Tallman, M.S. and Gartenhaus, R.B., 2004. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. *Leuk Res* 28: 891-900.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of

- apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148: 2207-2216.
- Groves, F.D., Linet, M.S. and Devesa, S.S., 1994. Epidemiology of human leukemia. *Curr Opin Hematol* 1: 321-326.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Ho, C.Y., Kim, C.F., Leung, K.N., Fung, K.P., Tse, T.F., Chan, H. and Lau, C.B., 2006. *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract attenuates growth of human leukemia xenografts and induces apoptosis through the mitochondrial pathway. *Oncol Rep* 16: 609-616.
- Jing, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R.M., Tatton, W.G. and Waxman, S., 1999. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 94: 2102-2111.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J.C., 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4997-5002.
- Kannan, K. and Jain, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7: 153-163.
- Konoshima, T., Kokumai, M., Kozuka, M., Tokuda, H., Nishino, H. and Iwashima, A., 1992. Anti-tumor-promoting activities of afromosin and soyasaponin I isolated from *Wistaria brachybotrys*. *J Nat Prod* 55: 1776-1778.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L. and Mignotte, B., 1995.

- The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9: 1277-1287.
- Kroemer, G. and Reed, J.C., 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6: 513-519.
- Leslie, E.M., Haimeur, A. and Waalkes, M.P., 2004. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem* 279: 32700-32708.
- Lai, T.Y., Lin, J.J., Huang, W.W., Kuo, S.C., Wen, Y.F., Lai, I.C., Lin, C.C., Yang, J.S. and Chung, J.G., 2010. Arsenic trioxide (As₂O₃) inhibits murine WEHI-3 leukemia in BALB/c mice in vivo. *Environ Toxicol* DOI: 10.1002/tox.20650.
- Lin, C.C., 1992. Crude drugs used for the treatment of diabetes mellitus in Taiwan. *Am J Chin Med* 20: 269-279.
- Lu, J., Chew, E.H. and Holmgren, A., 2007. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12288-12293.
- Matsuda, H., Strebler, F.R., Kaneko, T., Stephens, L.C., Danhauser, L.L., Jenkins, G.N., Toyota, N. and Bull, J.M., 1996. Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Res* 16: 1117-1121.
- Matsuda, H., Yoshida, K., Miyagawa, K., Asao, Y., Takayama, S., Nakashima, S., Xu, F. and Yoshikawa, M., 2007. Rotenoids and flavonoids with anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937, and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. *Bioorg*

Med Chem 15: 1539-1546.

Miller, M.D., Cai, J. and Krause, K.L., 1999. The active site of Serratia endonuclease contains a conserved magnesium-water cluster. *J Mol Biol* 288: 975-987.

Miller, W.H., Jr., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J. and Waxman, S., 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 62: 3893-3903.

Parone, P.A., James, D. and Martinou, J.C., 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84: 105-111.

Pei, S.J., 1985. Preliminary study of ethnobotany in Xishuang Banna, People's Republic of China. *J Ethnopharmacol* 13: 121-137.

Pelicano, H., Carew, J.S., McQueen, T.J., Andreeff, M., Plunkett, W., Keating, M.J. and Huang, P., 2006. Targeting Hsp90 by 17-AAG in leukemia cells: mechanisms for synergistic and antagonistic drug combinations with arsenic trioxide and Ara-C. *Leukemia* 20: 610-619.

Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J.S., Hileman, E.O., Plunkett, W., Keating, M.J. and Huang, P., 2003. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 278: 37832-37839.

Peng, C.Y., Jiang, J., Zheng, H.T. and Liu, X.S., 2010. Growth-inhibiting effects of arsenic trioxide plus epigenetic therapeutic agents on leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma* 51: 297-303.

Pui, C.H., 1997. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 44:

831-846.

Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M.D., 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262: 695-700.

Ralph, S.J., 2008. Arsenic-based antineoplastic drugs and their mechanisms of action. *Met Based Drugs* 2008: 260146.

Ramos, A.M. and Aller, P., 2008. Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* 75: 1912-1923.

Raynal, N.J., Momparler, L., Charbonneau, M. and Momparler, R.L., 2008. Antileukemic activity of genistein, a major isoflavone present in soy products. *J Nat Prod* 71: 3-7.

Reed, J.C., 1999. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* 11: 68-75.

Reed, J.C., Jurgensmeier, J.M. and Matsuyama, S., 1998. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1366: 127-137.

Salerno, M., Petroutsa, M. and Garnier-Suillerot, A., 2002. The MRP1-mediated effluxes of arsenic and antimony do not require arsenic-glutathione and antimony-glutathione complex formation. *J Bioenerg Biomembr* 34: 135-145.

Sanchez, Y., Amran, D., Fernandez, C., de Blas, E. and Aller, P., 2008. Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in

- human leukemia cells via reactive oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *Int J Cancer* 123: 1205-1214.
- Sanchez, Y., Simon, G.P., Calvino, E., de Blas, E. and Aller, P., 2010. Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumor drugs arsenic trioxide and lonidamine in human myeloid leukemia cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 114-123.
- Shi, Y., 2001. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol* 8: 394-401.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9: 459-470.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A. and Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Thompson, C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
- Wang, J., Li, L., Cang, H., Shi, G. and Yi, J., 2008. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are responsible for the high susceptibility to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Res* 32: 429-436.
- Wong, S. and Witte, O.N., 2001. Modeling Philadelphia chromosome positive leukemias. *Oncogene* 20: 5644-5659.
- Wood, D.E. and Newcomb, E.W., 2000. Cleavage of Bax enhances its cell

- death function. *Exp Cell Res* 256: 375-382.
- Yao, C.J., Yang, C.M., Chuang, S.E., Yan, J.L., Liu, C.Y., Chen, S.W., Yan, K.H., Lai, T.Y. and Lai, G.M., 2009. Targeting PML-RAR α and oncogenic signaling pathways by Chinese herbal mixture Tien-Hsien liquid in acute promyelocytic leukemia NB4 Cells. *Evidence-Based Complement Alternat Med* DOI: 10.1093/ecam/nep165.
- Zhu, J., Chen, Z., Lallemand-Breitenbach, V. and de The, H., 2002. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat Rev Cancer* 2: 705-713.
- 甘偉松, 1993. 藥用植物學. 國立中國醫藥研究所, 台北, 台灣; p.316.
- 行政院衛生署, 2009. 民國 98 年台灣主要癌症死亡統計.
- 江蘇新醫學院, 1992. 中藥大辭典. 上海科學技術出版社, 上海, 中國.
- 吳順杰 及 顏美心, 2001. 活血化癥法治療慢性粒細胞性白血病臨證淺識. *中醫藥學刊* 19, 343-344.
- 宋·唐慎微, 1971. 經史證類大觀本草. 國立中國醫藥研究所, 台北, 台灣.
- 胡旺云, 羅士德 及 蔡建勳, 1994. 大果油麻藤化學成分研究. *中草藥* 25, 59-60, 63.
- 清·吳其濬, 1983. 植物名實圖考. 臺灣商務印書館, 台北, 台灣.
- 陳亭亭, 2005. 血藤 (*Mucuna macrocarpa* Wallich) 葉部及莖部化學成分之研究. 中國醫藥大學中國藥學研究所碩士論文, 台中, 台灣.
- 陳勇, 甄漢深 及 許學健, 1993. 薄層掃描法測定貓豆和藜豆中左旋多巴的含量. *中草藥* 24, 294-295.
- 郭啟文, 2004. 臺灣產血藤類藥材之生藥學研究暨南五味子之組織培養. 中國醫藥大學, 台中, 台灣.

- 陳長安 及 謝瑞坤, 2009. 癌症治療與用藥手冊. 全國藥品年鑑雜誌社, 台北, 台灣; pp. 216-246.
- 陳博明, 1999. 急性骨髓性白血病化學治療最近的進展. 臨床醫學 43, 310-313.
- 臧勵酥, 1987. 中國古今地名大詞典. 商務印書館, 台北, 台灣.
- 劉和義, 楊遠波, 呂勝由 and 施炳霖, 2000. 台灣維管束植物簡誌. 行政院農業委員會, 台北, 台灣; pp. 48, 90.
- 鄭瑾, 劉強, 王宗仁, 李軍昌, 王文, 馬愛玲, 馬靜, 李晶華 及 肖鐵卉, 2003. 活血化瘀中藥複方誘導 K562 細胞凋亡. 第四軍醫大學學報 24, 427-429.
- 盧冠宏, 2003. 血藤 (*Mucuna macrocarpa* Wallich) 化學成分之研究. 中國醫藥大學中國藥學研究所碩士論文, 台中, 台灣.
- 戴錫珍, 2004. 益氣養陰活血化瘀法治療微小殘留白血病凋亡機制. 天津中醫學院學報 23, 177-178.

Table 1: Biological activities for extracts of *Mucuna macrocarpa* (Bhakuni et al., 1988)

Used part	Area	Biological activities
		Diuretic activity: rat, dose 510.7mg/kg (A)
		Spasmolytic activity: rat, conc. used not stated (A)
		Analgesic activity: mouse, dose not stated (I)
		Anticonvulsant activity: mouse dose not stated (I)
Dried stem	India	Antiprotozoan activity: broth culture, conc. used 125.0 mcg/ml (I)
		Antiviral activity: cell culture, conc. used 0.05mg/ml (I)
		Hypothermic activity: rat, dose not stated (I)

A: active I: inactive



Table 2: Presence of compounds in *Mucuna macrocarpa*

Used part	Area	Presence of compound	Type	Reference
Root	China	<i>l</i> -dopa	Proteid	(陳勇 et al., 1993)
Part not specified	China	lupenone	Triterpene	(胡旺云 et al., 1994)
		friedelin		
		$\Delta^{5,22}$ -stigmasten-3 β -ol	Steroid	
		β -sitosterol		
		tetracosanoic acid 2,3-dihydroxypropyl ester	Lipid	
		pentacosanoic acid 2-3-dihydroxy-propyl ester		
		hexacosanoic acid 2-3-dihydroxy-propyl ester		
Dried stem	Taiwan	tetracosanoic acid	Lipid	(盧冠宏, 2003)
		mixture of β -sitosterol and stigmasterol	Steroid	
		medicarpin	Isoflavonoid	
		aformosin		
		genistein		
		calycosin		
		sucrose	Carbohydrate	(陳亭亭, 2005)
		D-pinitol		
		β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside	Steroid	
		tetracosanoic acid 2,3-dihydroxypropyl ester	Lipid	
Leaf	Taiwan	mixture of β -sitosterol and stigmasterol	Steroid	(陳亭亭, 2005)
		betulin	Triterpene	
		medicarpin	Isoflavonoid	

Table 3: Chromatographic conditions

condition	% of organic mobile phase	% of aqueous mobile phase	flow rate (ml/min)	detector (nm)	detection (min)
A	methanol (45%)	d.d. water (55%)	1	280	60
B	methanol (55%)	d.d. water (45%)	0.8	280	40
C	methanol (60%)	2% acetic acid (40%)	0.8	280	40
D	acetonitrile (40%)	2% acetic acid (60%)	0.7	254	40
E	acetonitrile (37%)	2% acetic acid (63%)	0.8	254	40

d.d. water: double distilled water

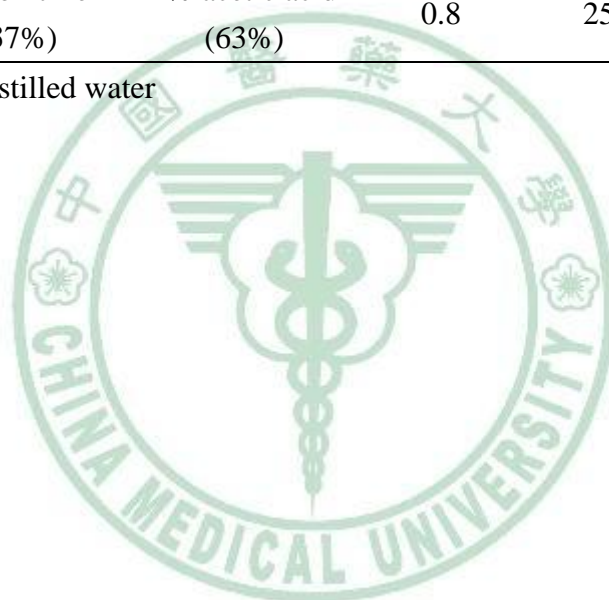


Table 4: CI values for the combination of arsenic trioxide (ATO) and crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM) in leukemia cell lines after 24 h of treatment.

Drug combination		Cell line					
ATO (μM)	CMEMM ($\mu\text{g/ml}$)	HL-60		Jurkat		Molt-3	
		CI	Description	CI	Description	CI	Description
2.5	25	0.644	Synergism	1.043	Nearly additive	0.772	Moderate synergism
2.5	50	0.683	Synergism	0.802	Moderate synergism	0.935	Nearly additive
2.5	75	0.888	Slight synergism	0.820	Moderate synergism	1.155	Slight antagonism
5	25	0.887	Slight synergism	1.446	Moderate antagonism	0.852	Slight synergism
5	50	0.610	Synergism	0.868	Slight synergism	0.850	Moderate synergism
5	75	0.843	Moderate synergism	0.899	Slight synergism	1.021	Nearly additive

CI: combination index

ATO: arsenic trioxide

CMEMM: crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa*



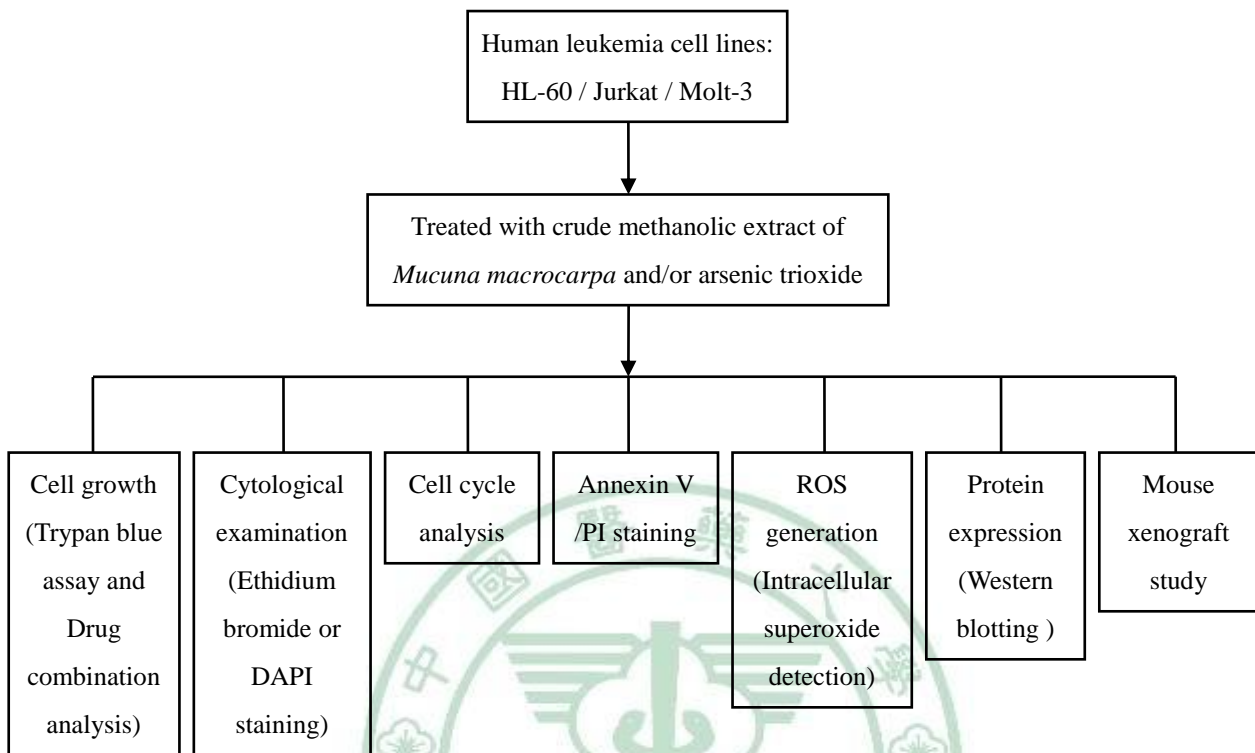


Figure 1: Scheme of the study on antileukemic effects of crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa*.

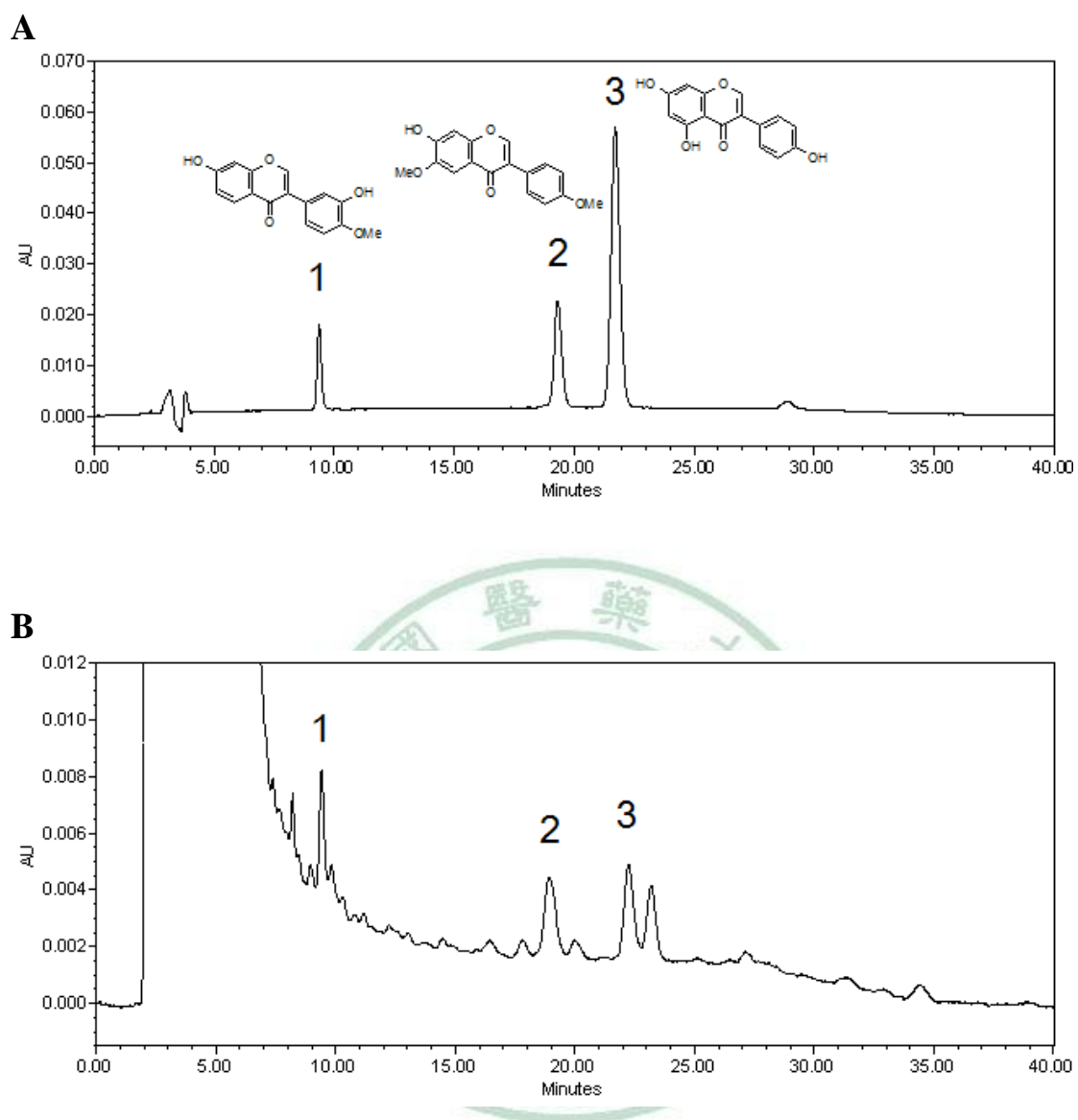


Figure 2: Phytochemical analyses of crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM). High performance liquid chromatography chromatograms show a standard mixture (A) and CMEMM (B): (1) calycosin; (2) afrormosin; (3) genistein.

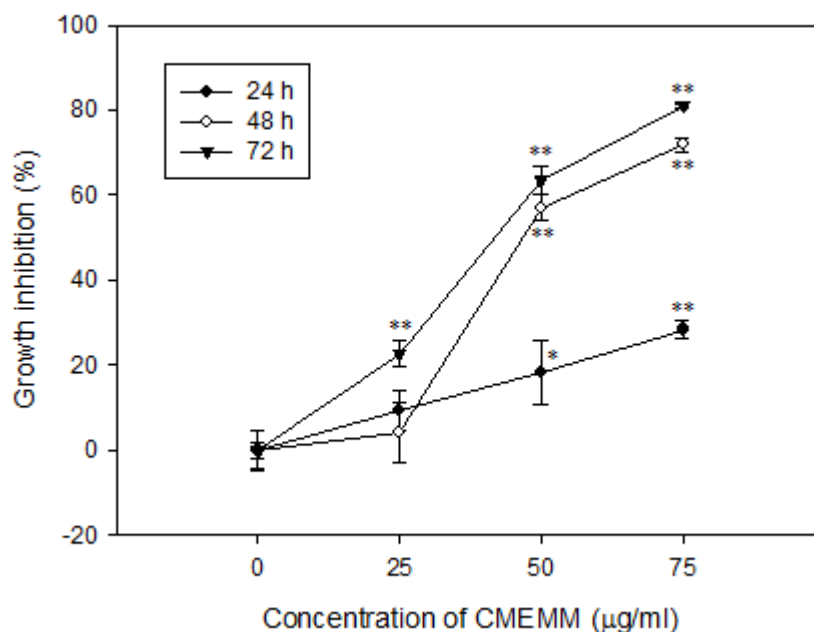


Figure 3: Antiproliferative effects of crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM) on HL-60 cells. Cells (1×10^5 cells/ml) were seeded onto 60 mm dishes and exposed to dosages of CMEMM ranging from 25 to 75 $\mu\text{g/ml}$ for up to 72 h. Control cells were treated with 0.1% DMSO in medium. The percentages of growth inhibition were measured by trypan blue exclusion assay and calculated by comparing the cells numbers with that of the controls. Each value represents the mean \pm SE of six replicate cultures from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicate significant difference from the control value.

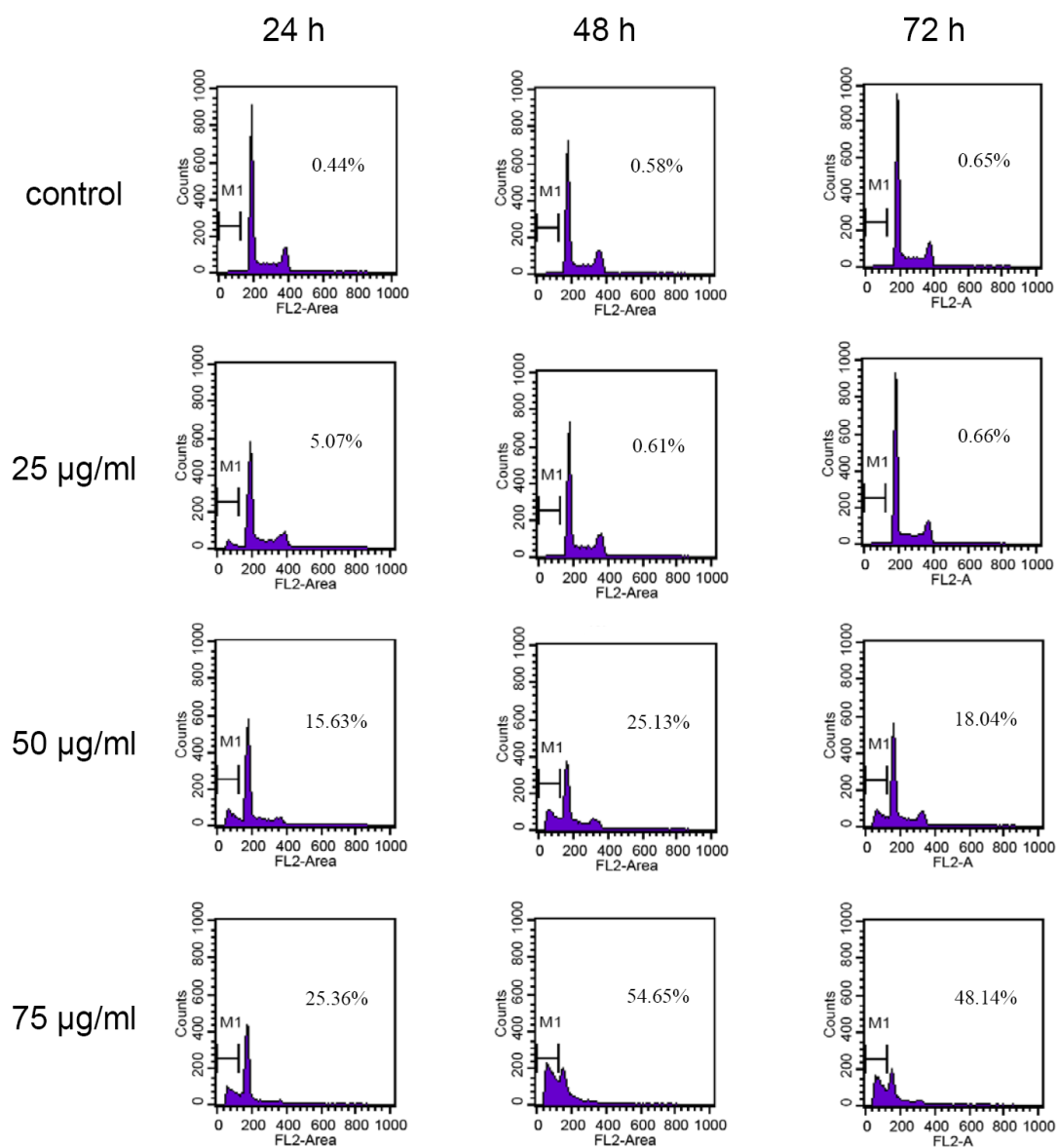


Figure 4: Cell cycle progression in crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM)-treated cells. Cell cycle analyses of HL-60 cells treated with 0.1% DMSO (control), 25 µg/ml CMEMM, 50 µg/ml CMEMM, 75 µg/ml CMEMM for 24 to 72 h. After treatment with CMEMM, cells were collected and stained with propidium iodide, and analyzed for DNA content by flow cytometry. The percentages of sub-G1 or hypodiploid cells were analyzed by CellQuest software. The representative cell cycle progressions in CMEMM-treated or vehicle control cells were from one of three independent experiments.

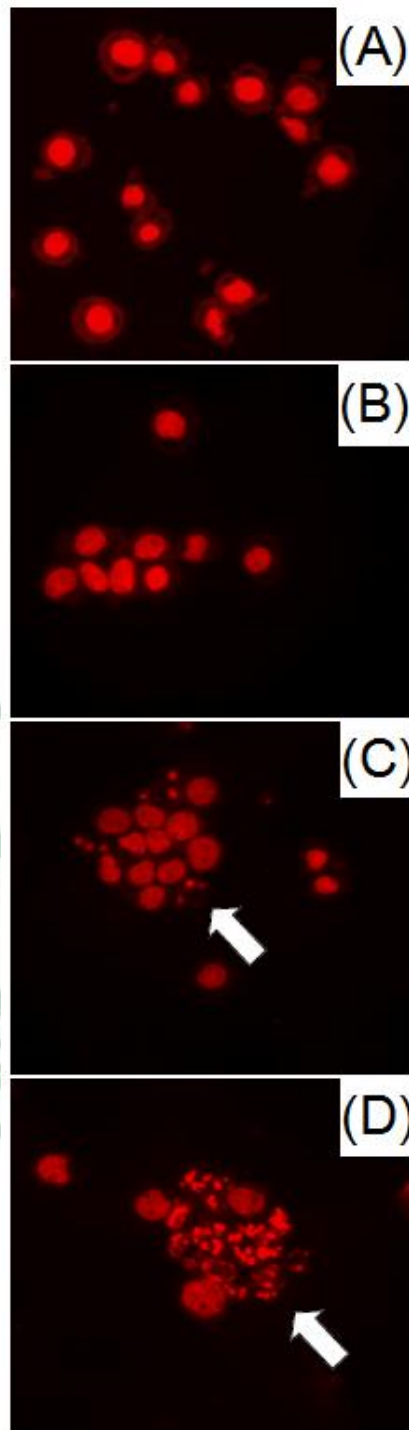


Figure 5: Nuclear morphological changes induced by crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM). Nuclear morphology of HL-60 cells treated with (A) 0.1% DMSO (control), (B) 25 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM, (C) 50 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM, (D) 75 $\mu\text{g/ml}$ CMEMM for 72 h. The nuclei were stained with ethidium bromide. Arrows indicate apoptotic bodies of nuclear fragmentation. Magnification $\times 200$.

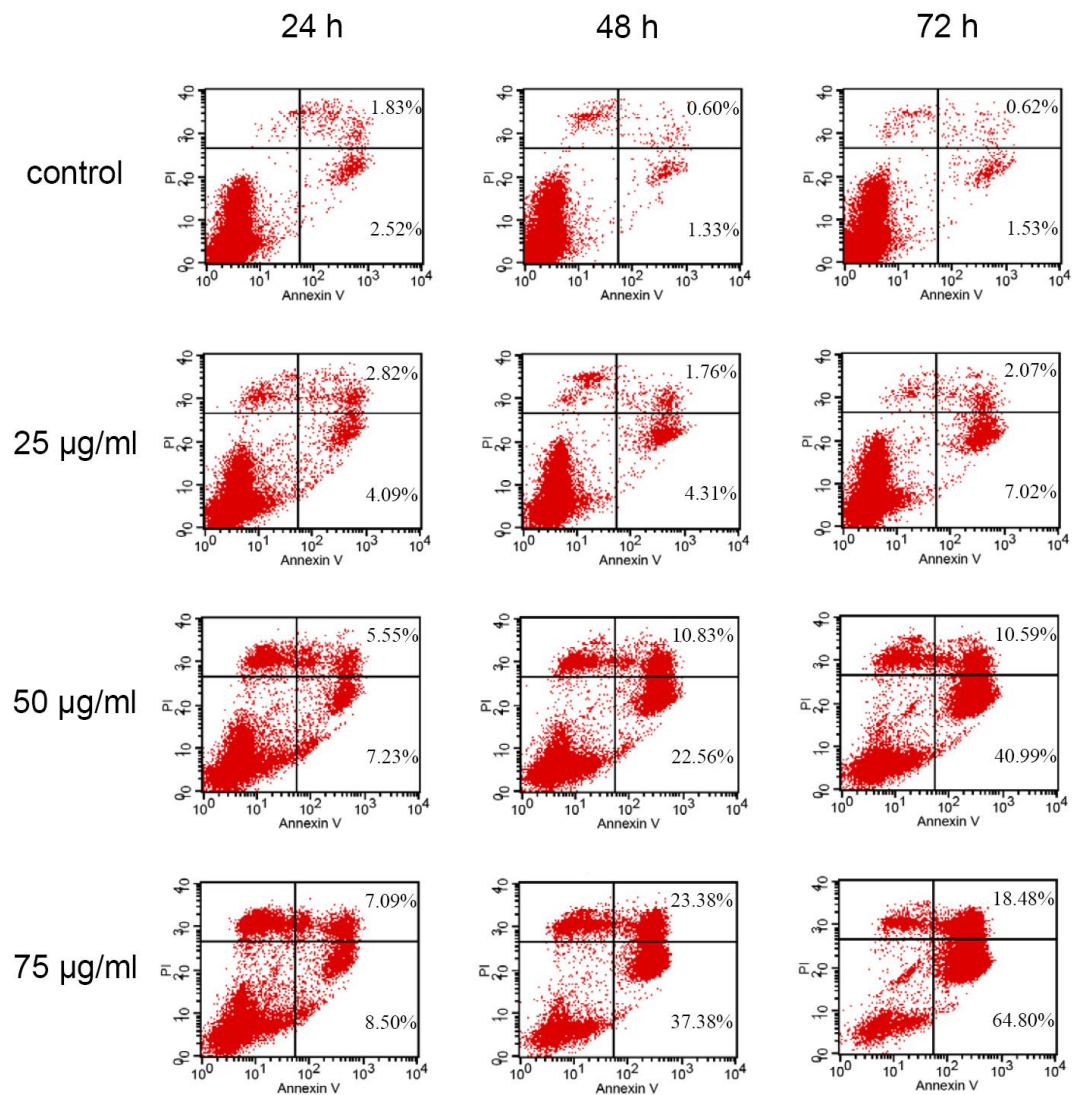


Figure 6: Annexin V-FITC/PI analyses of crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM)-treated cells. HL-60 cells were treated with 0.1% DMSO (control), 25 µg/ml CMEMM, 50 µg/ml CMEMM, 75 µg/ml CMEMM for 24 to 72 h. Quantitative percentages of apoptotic and necrotic cells of CMEMM-treated cells were measured using flow cytometry. Data represent the result from one of three independent experiments.

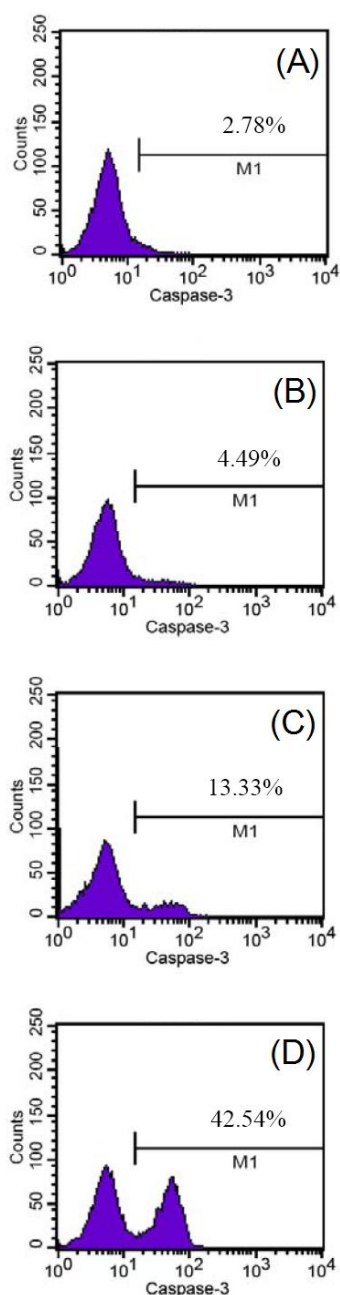
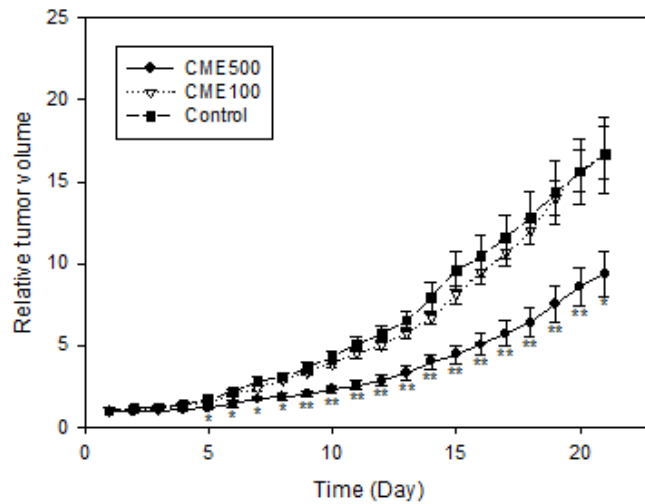


Figure 7: Activation of caspase-3 in crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM)-treated cells. Active caspase-3 analyses were performed on HL-60 cells treated with (A) 0.1% DMSO (control), (B) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMEMM, (C) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMEMM, (D) 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMEMM for 24 h. After treatment with CMEMM, cells were permeabilized, fixed and stained, and analyzed for active caspase-3 by flow cytometry. Data represent the result from one of three independent experiments.

A



B

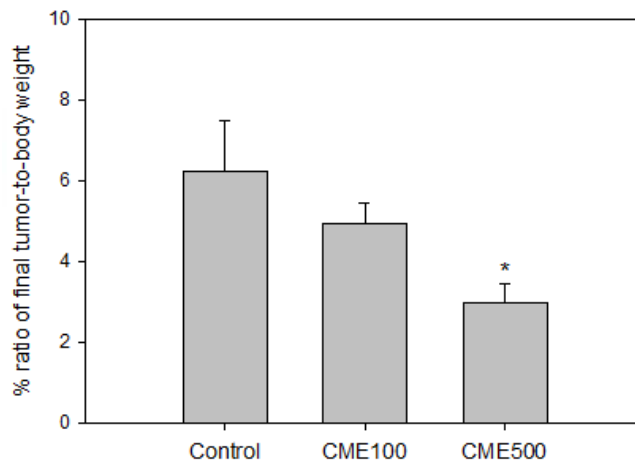


Figure 8: In vivo antiproliferative effect of crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM) on human leukemia HL-60 xenografts. When the tumors were palpable (4-6 mm), BALB/c nude mice were either treated with vehicle control or CMEMM by daily intraperitoneal injection. The animals (7-8 mice per group) were treated with 100 mg/kg/day CMEMM (CME100), 500 mg/kg/day CMEMM (CME500), or with PBS as vehicle control for 21 days. (A) For relative tumor volume, results were expressed as the mean \pm SE calculated from the ratio of tumor volume on each test day to that of Day 1. (B) For % ratio of final tumor-to-body weight, results were expressed as the mean \pm SE * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicate significant difference from the control value.

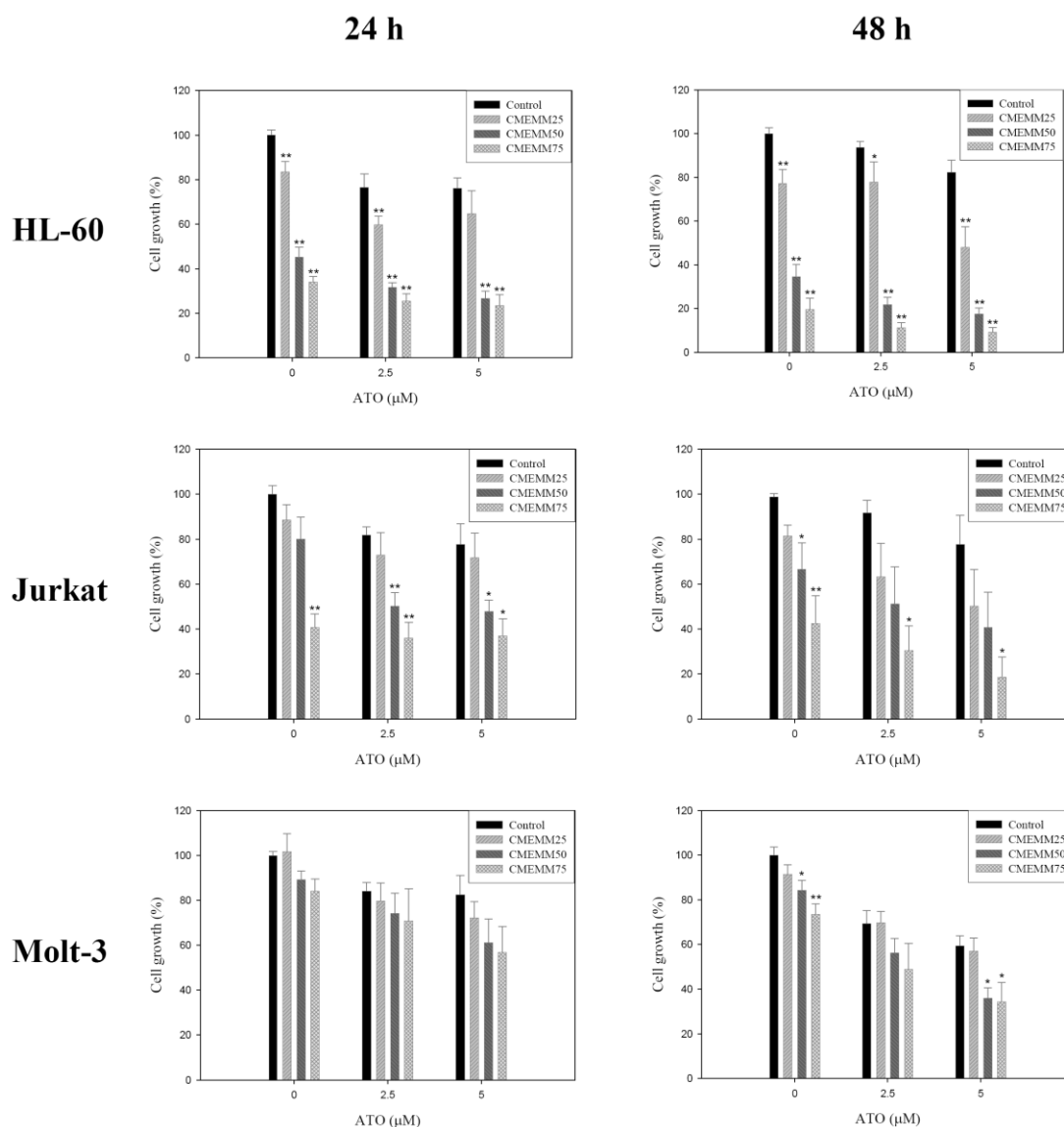


Figure 9: Antiproliferative effects of combined application of arsenic trioxide (ATO) and crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM) on human leukemia cells. HL-60, Jurkat or Molt-3 cells (1×10^5 cells/ml) were seeded into 6-well plates and exposed to 0, 2.5 or 5 μ M ATO alone or together with 0, 25, 50 or 75 μ g/ml CMEMM for 24 and 48 h. Vehicle control cells were treated with 0.1% DMSO in medium. The percentages of cell growth were measured by the trypan blue exclusion assay and calculated by comparing the cells numbers with that of the vehicle controls. Each value represents the mean \pm SE of duplicate cultures from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicate significant difference from the respective control value.

Figure 10(a)

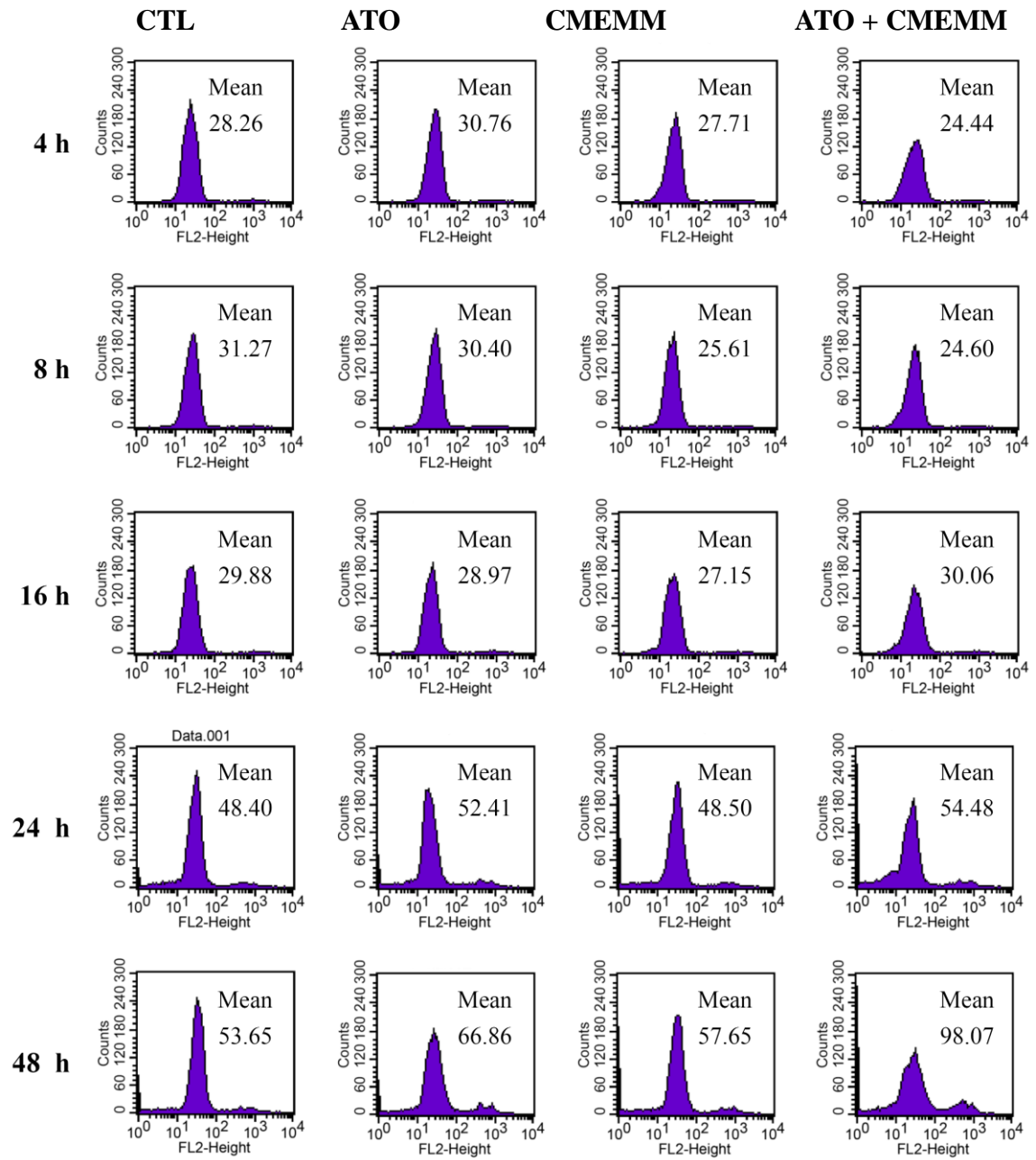


Figure 10(b)

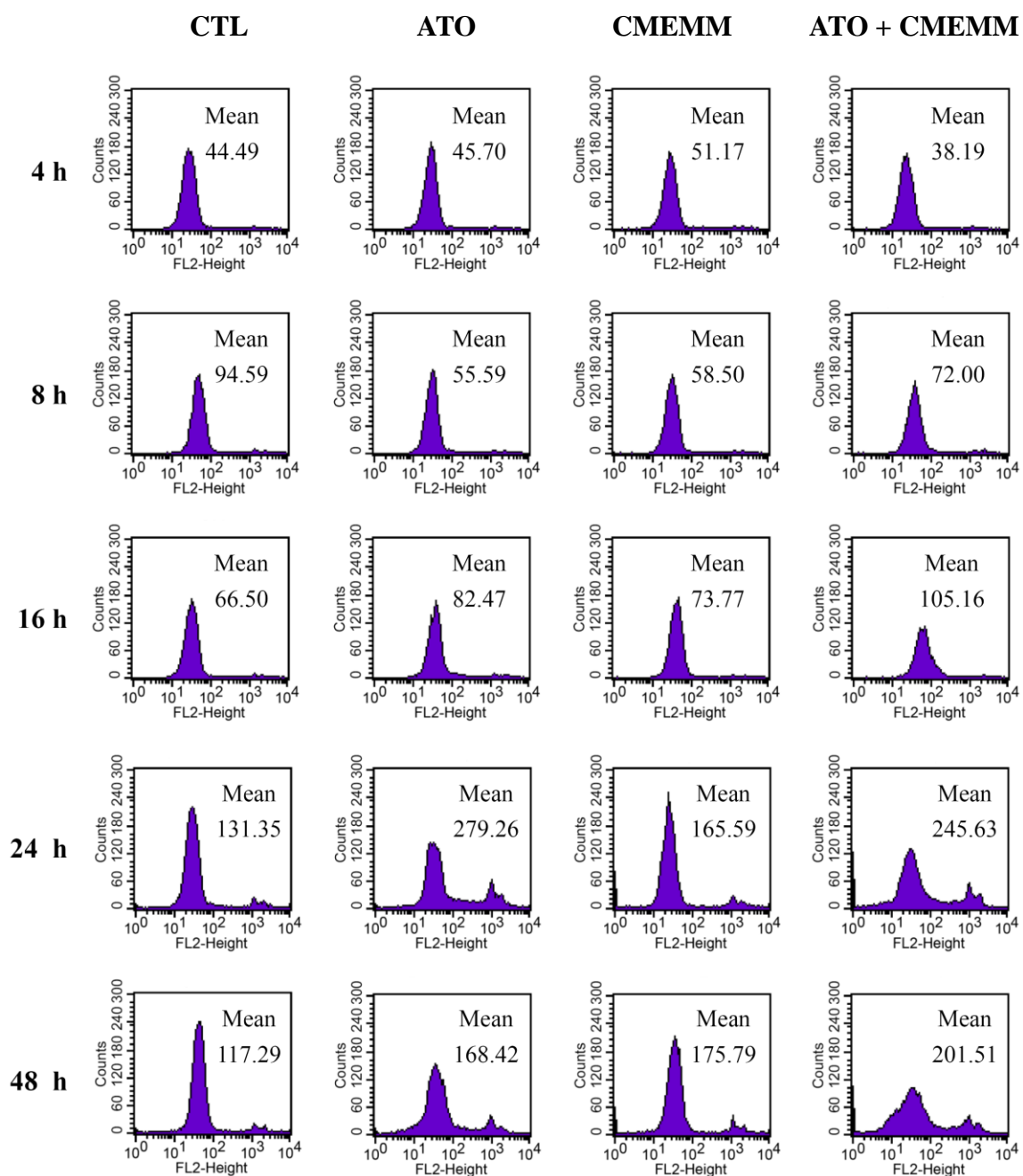


Figure 10: Changes in the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) in leukemia cells exposed to arsenic trioxide (ATO) and/or crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM). HL-60 (a) or Jurkat (b) cells (1×10^5 cells/ml) were treated with 0.1% DMSO (control), 2.5 μ M ATO, 50 μ g/ml CMEMM or 2.5 μ M ATO plus 50 μ g/ml CMEMM for 4 to 48 h. Then, cells were washed with PBS, incubated with dihydroethidium for 30 min and analyzed for red fluorescence by flow cytometry. The mean fluorescence intensity was used as read-out for intracellular ROS levels.

Figure 11(a)

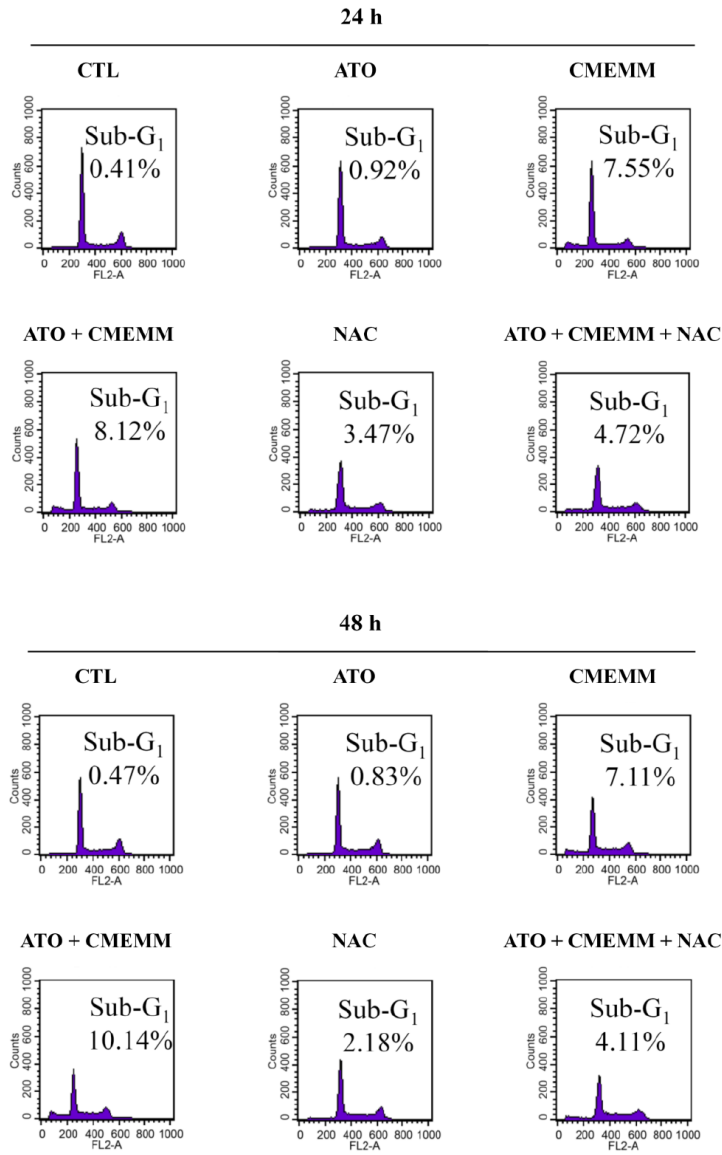


Figure 11(b)

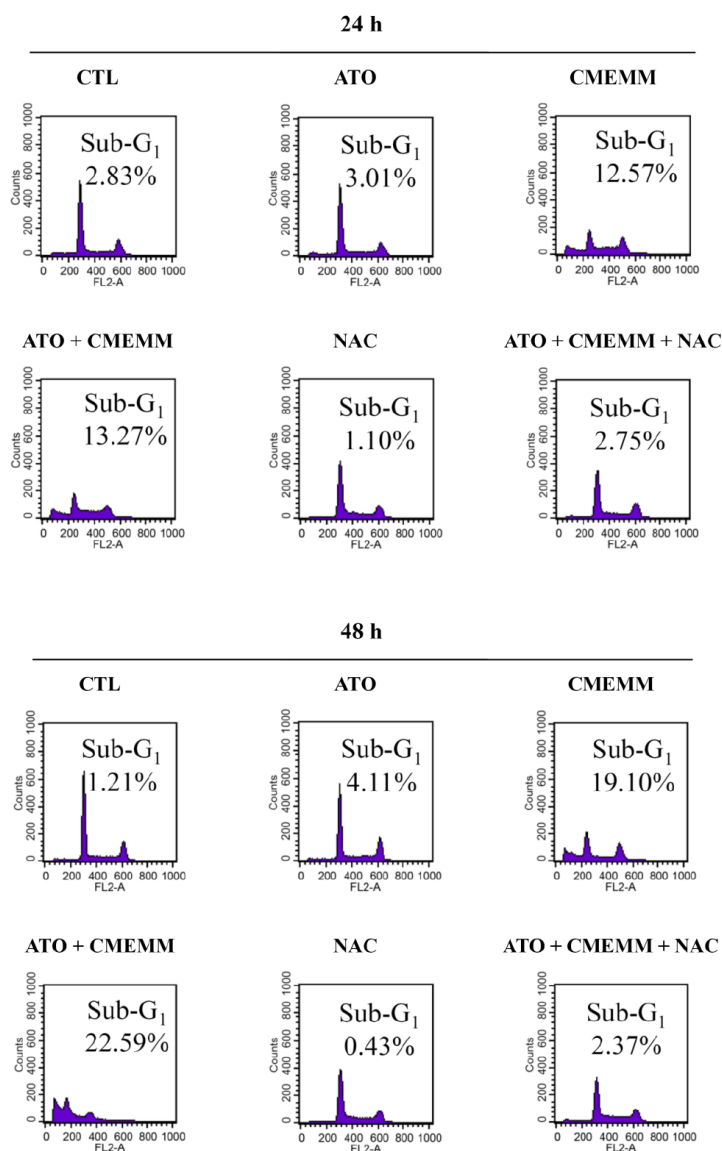


Figure 11: Cell cycle progression in leukemia cells exposed to arsenic trioxide (ATO) and/or crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM). HL-60 (a) or Jurkat (b) cells (1×10^5 cells/ml) were first treated with 5 mM *N*-acetyl cysteine (NAC) or untreated, followed by treatment with 0.1% DMSO (CTL), 2.5 μ M ATO and/or 50 μ g/ml CMEMM as indicated. After 24 or 48 h of treatment, cells were collected and stained with propidium iodide, and determined for DNA content using flow cytometry. The percentages of sub-G₁ or hypodiploid cells were analyzed by ModFit LT software. The representative cell cycle progressions in ATO and/or CMEMM-treated or control cells were from one of three independent experiments.

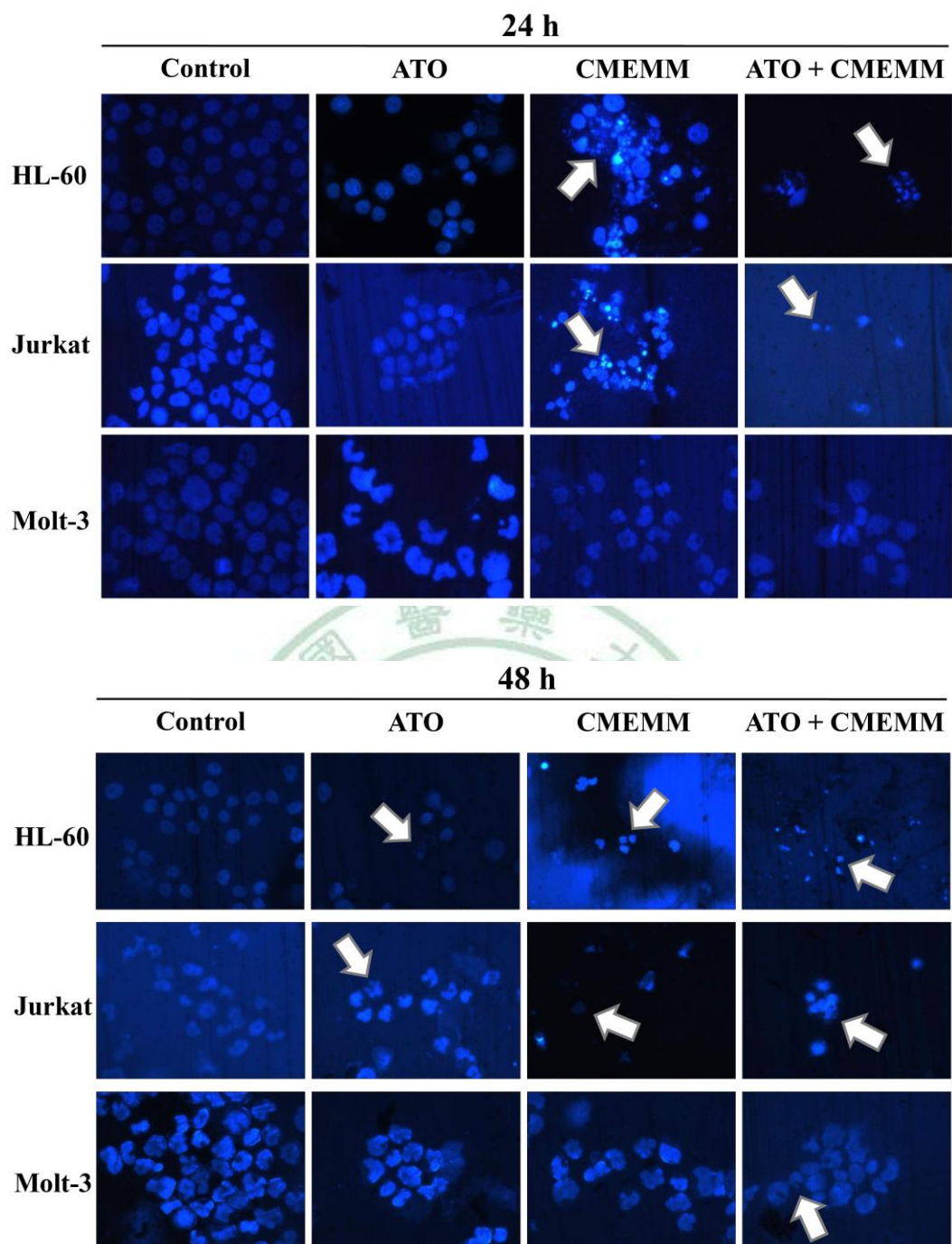


Figure 12: Nuclear morphological changes induced by arsenic trioxide (ATO) and/or crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM). HL-60, Jurkat or Molt-3 cells (1×10^5 cells/ml) were treated with 0.1% DMSO (control), 2.5 μ M ATO, 50 μ g/ml CMEMM or 2.5 μ M ATO plus 50 μ g/ml CMEMM. After 24 or 48 h of incubation, cells were washed with PBS and collected on microscope slides by cytopspin. The nuclei were stained with 2.5 μ g/ml DAPI. Arrows indicate apoptotic bodies of nuclear fragmentation. Magnification $\times 200$.

Figure 13(a)

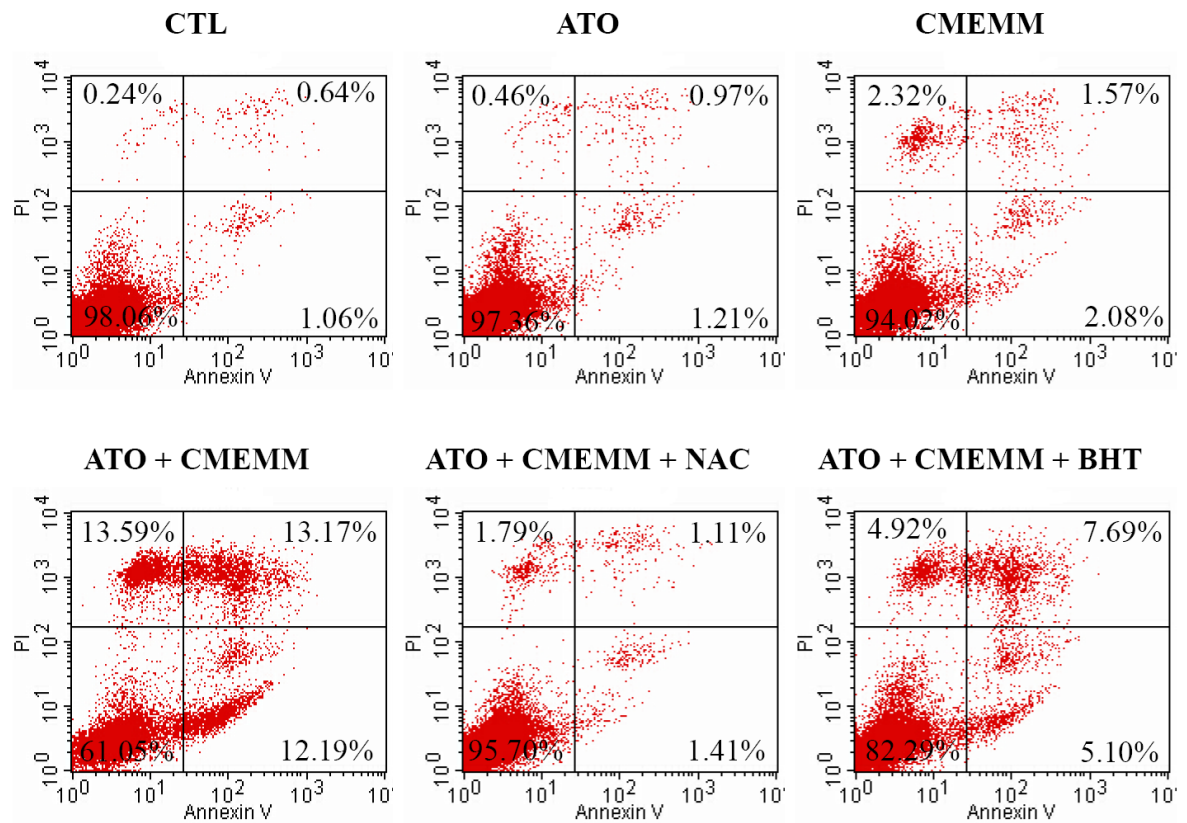


Figure 13(b)

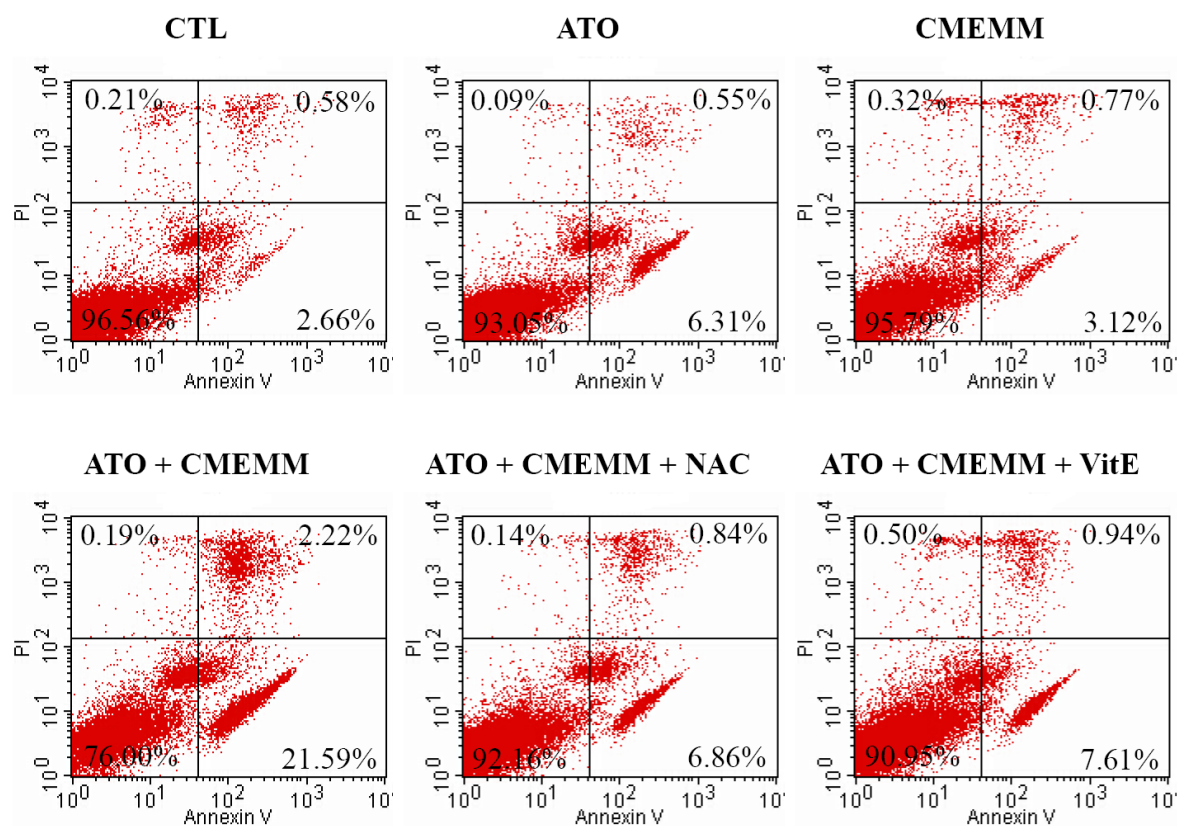


Figure 13: Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) analyses of arsenic trioxide (ATO) and/or crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM)-treated cells. HL-60 (a) and Jurkat (b) cells (1×10^5 cells/ml) were first treated with 5 mM *N*-acetyl cysteine (NAC), 50 μ M butylated hydroxytoluene (BHT), 40 μ M α -tocopherol (VitE) or untreated, followed by treatment with 0.1% DMSO (CTL), 2.5 μ M ATO and/or 50 μ g/ml CMEMM as indicated for 24 h. Quantitative percentages of apoptotic cells of ATO/CMEMM-treated cells were measured by flow cytometry. Data represent the result from one of three independent experiments.

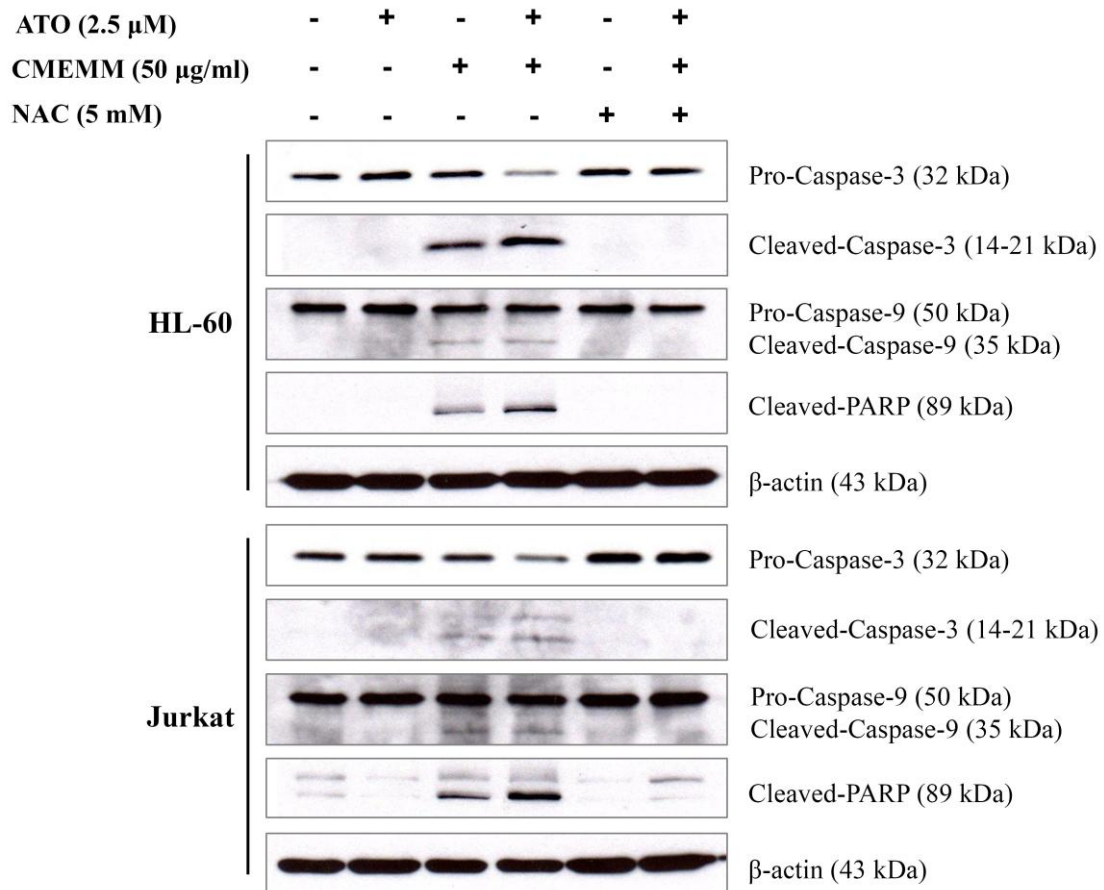


Figure 14: Expressions of apoptosis-related proteins in leukemia cells treated with arsenic trioxide (ATO), crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM) and/or *N*-acetyl cysteine (NAC). Whole cell lysates were prepared from HL-60 or Jurkat cells treated with 2.5 μ M ATO, 50 μ g/ml CMEMM, 5 mM NAC, or indicated combinations for 24 h. Proteins as indicated were analyzed by Western blotting with β -actin as loading control. Representative blots shown were from one of three independent experiments.

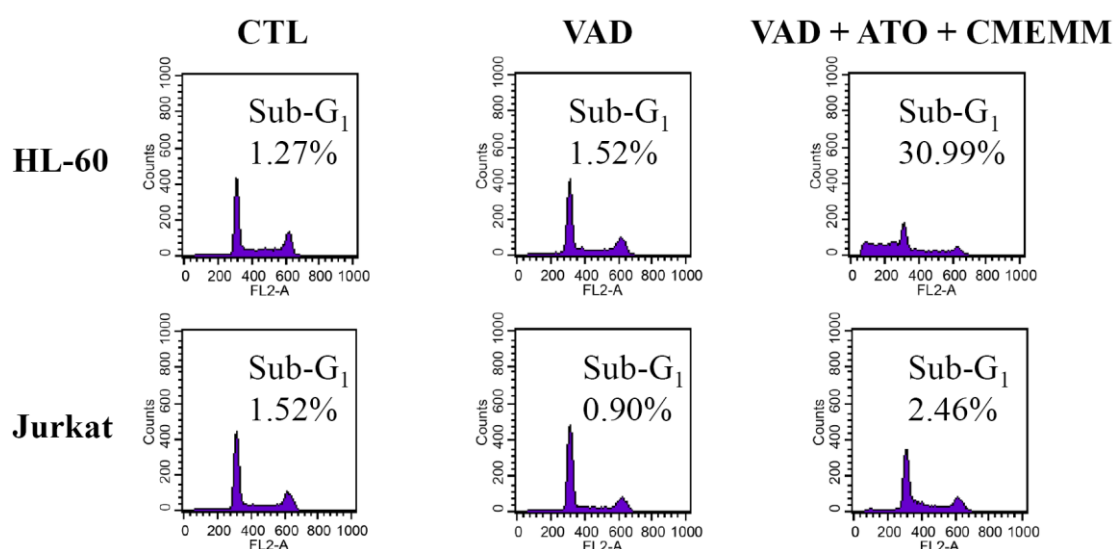


Figure 15: Effects of a pan-caspase inhibitor (z-VAD-fmk) in cell cycle progression of leukemia cells exposed to arsenic trioxide (ATO) and crude methanolic extract of *Mucuna macrocarpa* (CMEMM). HL-60 or Jurkat cells (1×10^5 cells/ml) were first treated with 25 μ M z-VAD-fmk (VAD) or untreated, followed by treatment with 0.1% DMSO (CTL) or 2.5 μ M ATO and 50 μ g/ml CMEMM as indicated. After 24 h of treatment, cells were collected and stained with propidium iodide, and determined for DNA content using flow cytometry. The percentages of sub-G₁ or hypodiploid cells were analyzed by ModFit LT software. The representative cell cycle progressions in treated or control cells were from one of two independent experiments.

附錄

附錄 1. 經史證類大觀本草之血藤植物圖 (宋·唐慎微, 1971)



附錄 2. 植物名實圖考之血藤植物圖 (清·吳其濬, 1983)



血藤 血藤產九江山坡蔓生勁莖赭色一枝一鬚附枝
生葉如菊花葉柔厚有花叉而末不尖面綠背白春時

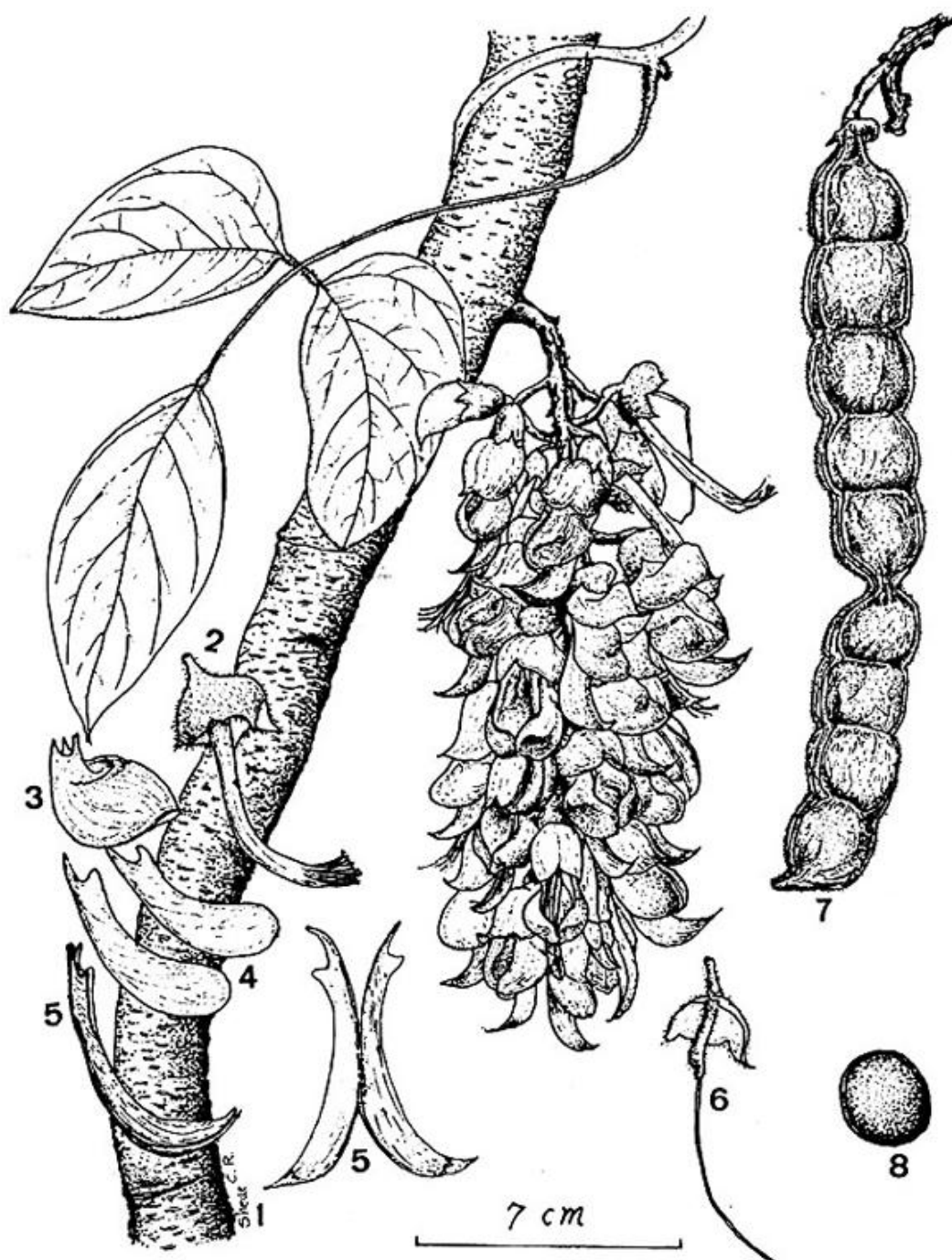
血藤



附錄 3. 血藤 (*Mucuna macrocarpa*) 植物外觀圖 (劉和義 et al., 2000)

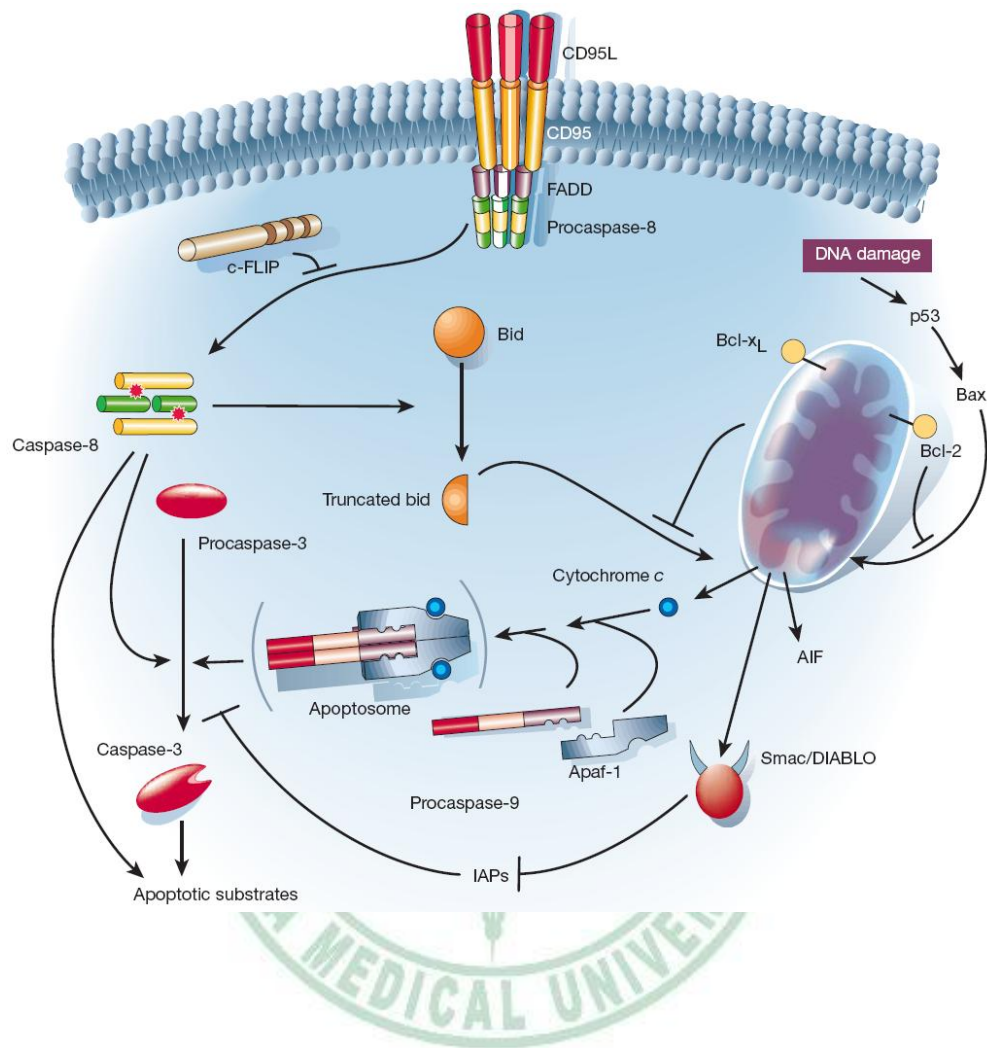


附錄 4. 血藤 (*Mucuna macrocarpa*) 植物型態特徵圖 (Editorial Committee of the Flora of Taiwan, 1993)



1. flowering branch; 2. flower removed corolla; 3. standard; 4. wings;
 5. keels; 6. pistil; 7. pod; 8. seed.

附錄 5. 細胞凋亡主要分子傳遞路徑圖 (Hengartner, 2000)



附錄 6. 西方墨點法所使用之各種溶液配方

4X Sample loading buffer配製 (-20°C 保存)

組成	體積 (ml)
1% Bromophenol blue	0.5 ml
β -Mercaptoethanol	2 ml
200 mM EDTA	0.2 ml
Glycerol	2 ml
10% SDS	4 ml
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 μ l
Total	10.7 ml

Running buffer (1.5 M Tris, pH 8.8) 配製 (4°C 保存)

組成	重量/體積
Tris-base	36.3 g
Deionized distilled water (DDW)	150 ml
HCl	調整到pH 8.8
調整後加DDW至總體積200 ml	

Stacking buffer (0.5 M Tris, pH 6.8) 配製 (4°C 保存)

組成	重量/體積
Tris-base	6 g
DDW	80 ml
HCl	調整到pH 6.8

調整後加DDW至總體積100 ml

SDS-PAGE下層膠 (Running gel) 之組成及配製

組成	10%	12.5%
30% Acrylamide-Bis	6.7 ml	8.3 ml
Running buffer	5 ml	5 ml
10% SDS	0.2 ml	0.2 ml
DDW	8.2 ml	6.6 ml
10% APS	0.2 ml	0.2 ml
TEMED	20 μ l	20 μ l
Total	20 ml	20 ml

SDS-PAGE上層膠 (Stacking gel) 之組成及配製

組成	5%
30% Acrylamide-Bis	1.32 ml
Running buffer	2.48 ml
10% SDS	0.1 ml
DDW	4 ml
10% APS	40 ml
TEMED	8 μ l
Total	8 ml

10X Electrode buffer配製 (室溫保存)

組成	重量
Tris-base	30.3 g
Glycine	144.2 g
SDS	10 g

加DDW至總體積1000 ml

使用前，取100 ml 10X Electrode buffer加900 ml DDW混合均勻。

10X Transfer buffer配製 (4°C 保存)

組成	重量
Tris-base	30.3 g
Glycine	144.2 g
加DDW至總體積1000 ml	

使用前，取100 ml 10X Transfer buffer加200 ml methanol及700 ml DDW混合均勻。

10X Tris buffered saline (TBS) buffer配製 (4°C 保存)

組成	重量/體積
Tris-base	30.28 g
NaCl	87.6 g
DDW	950 ml
HCl	調整到pH 7.4
調整後加DDW至總體積1000 ml	

使用前，取100 ml 10X TBS buffer加900 ml DDW及1 ml Tween 20混合均勻，即為TTBS。

附錄 7. 藥物合併作用分析之 CI 意義對照表 (Chou, 2006)

Description and symbols of synergism or antagonism in drug combination studies analyzed with the combination index method

Range of Combination Index	Description	Graded Symbols	Graphic Symbols
<0.1	Very strong synergism	+++++	██████████
0.1–0.3	Strong synergism	++++	██████████
0.3–0.7	Synergism	+++	██████████
0.7–0.85	Moderate synergism	++	██████████
0.85–0.90	Slight synergism	+	██████████
0.90–1.10	Nearly additive	±
1.10–1.20	Slight antagonism	-	-----
1.20–1.45	Moderate antagonism	--	-----
1.45–3.3	Antagonism	---	-----
3.3–10	Strong antagonism	----	-----
>10	Very strong antagonism	-----	-----

