

中國醫藥大學中醫學系博士班博士論文

指導教授：侯庭鏞教授

論文題目

左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應與機轉研究

Study on the effect and mechanism of Zuo-Jin-Wan
on the transformation of hepatoma cells

研究生：趙德澂

中華民國一百年五月

目錄

第一章前言.....	1
第二章文獻探討.....	6
第一節肝癌現代醫學之相關文獻探討.....	6
第二節中醫學對肝癌之文獻探討.....	9
一、疾症發生的中醫觀點.....	9
二、中醫醫家對治肝病的思路.....	15
三、治療肝癌的中醫思路.....	17
四、中醫轉譯醫學的建構.....	18
五、左金丸.....	18
第三章材料與方法.....	21
第一節左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應.....	21
3.1.1. 細胞株和化合物.....	21
3.1.2. 備製左金丸、黃連和吳茱萸的水性萃取物.....	21
3.1.3. 定性分析左金丸黃連吳茱萸的活性物質.....	21
3.1.4. 細胞培養和 TPA 處理.....	22
3.1.5. 冷光酵素分析(Luciferase assay).....	22
3.1.6. 毒性測試 (Cytotoxicity Assay).....	23
3.1.7. Anchorage-independent growth assay.....	23
3.1.8. 統計分析.....	23
第二節吳茱萸抑制肝癌細胞轉形之機轉.....	24
3.2.1. 吳茱萸藥材.....	24
3.2.2. 吳茱萸各種溶劑的萃取.....	24

3.2.3. 細胞培養	24
3.2.4. Stable transfection 和 G418 selection	25
3.2.5. 穩定的轉殖 Stable transfection	25
3.2.6. Anchorage-independent transformation assay	25
3.2.7. 冷光酵素活性的測定	26
3.2.8. 毒性測試 (Cytotoxicity Assay)	26
3.2.9. 細胞存活率試驗	27
3.2.10. 西方墨點分析法(Western blotting)	27
3.2.11. 統計分析	27
第四章結果	28
第一節左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應	28
4.1.1. 以高效色層分析法測定左金丸、黃連和吳茱萸的主要生物 鹼成份	28
4.1.2. 在 HepG2 中，TPA 可活化 AP-1 和 NF- κ B 表現	29
4.1.3. TPA 引發 HepG2 的 anchorage- independent growth	30
4.1.4. 左金丸可抑制 TPA 所引起的 HepG2 細胞內 AP-1 和 NF- κ B 活化	30
4.1.5. TPA 所引起的肝細胞轉形可被左金丸所抑制	32
4.1.6. 在 HepG2 細胞株中，黃連與吳茱萸可所抑制 TPA 誘發的 AP-1 活性	33
4.1.7. 在 HepG2 細胞株中 TPA 誘發的 AP-1 活性，分別可為小藥 鹼與吳茱萸鹼所抑制	33
4.1.8. 小藥鹼與吳茱萸鹼抑制 TPA 誘發的肝細胞轉形	36
第二節吳茱萸抑制肝癌細胞轉形之機轉	36
4.2.1. TPA 在人類肝細胞可活化 AP-1 的活性	36
4.2.2. 為了評估吳茱萸能否抑制細胞轉形，以各種溶劑萃取吳茱萸，	

並找出有效活性成份	38
4.2.3. 吳茱萸鹼下調肝細胞內 TPA 所引起的 AP-1 活化	40
4.2.4. 吳茱萸鹼經 ERKs 路徑抑制肝細胞轉形暨 TPA 引起的 AP-1 活化	42
第五章討論	44
第一節左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應	44
第二節吳茱萸抑制肝癌細胞轉形之機轉	45
第六章結論	47
第一節結論	47
第二節未來展望	47
附錄	49
參考文獻	58
謝辭	81



圖目錄

圖 4.1.1. 高效液相層析圖 HPLC chromatographs	28
圖 4.1.2. 在 HepG2 細胞株中 TPA 對 AP-1 和 NF- κ B 活性的影響..	29
圖 4.1.3. TPA 對於 HepG2 anchorage-independent assay 的效果	30
圖 4.1.4. 左金丸在 HepG2 細胞株對 TPA 誘發的 AP-1 及 NF- κ B 活化的抑制效果.....	31
圖 4.1.5. 左金丸在 HepG2 細胞株抑制 TPA 所誘發的 anchorage-independent growth.....	32
圖 4.1.6. 黃連與吳茱萸在 HepG2 細胞株對 TPA 誘發的 AP-1 及 NF- κ B 活化的抑制效果	34
圖 4.1.7. 小蘗鹼與吳茱萸鹼在 HepG2 細胞株對 TPA 誘發的 AP-1 及 NF- κ B 活化的抑制效果	35
圖 4.1.8. 小蘗鹼與吳茱萸鹼抑制 TPA 誘發 HepG2 細胞株細胞轉形的效果.....	37
圖 4.2.1. TPA 對肝細胞內 AP-1 活性的效果.....	38
圖 4.2.2. 吳茱萸的甲醇萃取物作用在 TPA 所誘發的 AP-1 活性和 TPA 引起的肝細胞 anchorage-independent transformation	39
圖 4.2.3. 吳茱萸鹼、吳茱萸次鹼和檸檬苦素對肝細胞中 TPA 所引起的 AP-1 活化的效果	41
圖 4.2.4. 吳茱萸鹼在 TPA 誘發的細胞群落生成與 MAP kinase 活化的效果.....	43
圖 6.1. 左金丸及其成份化抑制肝細胞轉形的作用機轉	48

表目錄

表 1.1.肝癌三階段的相關症狀	2
表 1.2.阻斷癌細胞訊息傳遞路徑的標靶治療藥物	3
表 2.1.比較不同溶劑萃取吳茱萸的 EC_{50} 、 TC_{50} 及 SI.....	8
表 2.2.1.歷代典籍對於陰陽的觀察	9
表 2.2.2.典籍中與肝相關之條文	14
附表 1:依年代順序討論文獻上對左金丸的論述	49
附方 1. 中滿分消湯（利濕之劑）	57
附方 2. 喬三余方-陰陽攻積丸.....	57



縮寫對照表

縮寫	英文全名
AP-1	Activator protein 1
BER	berberine
CC	<i>Coptis chinensis</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ER	<i>Evodia rutaecarpa</i>
EVO	evodiamine
FBS	Fetal bovine serum
HCC	hepatocellular carcinoma
HPLC	high-performance liquid chromatography
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LIM	limonine
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
PBS	Phosphate buffer saline
[poly-(HEMA)]	poly (2-hydroxyethyl methacrylate)
RUT	rutaecarpine
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
ZJW	Zuo-Jin-Wan

左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應與機轉研究

研究生：趙德澂

指導教授：侯庭鏞教授

中國醫藥大學中醫學系博士班

目的：中國醫學治療肝病已有千年以上的歷史，卻未能以現代科學證明，其優點隱而不現，本研究將依典籍論述的中醫辨證法，經適當與合理的轉譯方式，選取適當的方劑：左金丸，進行治療肝癌的研究，期使中醫臨床經驗與科學研究達到相輔相成的境界。

材料與方法：以左金丸及黃連、吳茱萸及其有效成份化合物，分析重組的肝癌母細胞(HepG2/AP-1 和 HepG2/NF- κ B)與非腫瘤肝細胞(Chang /AP-1)，在 12-鄰-四萘酸-佛波醇-13-乙酸誘發肝癌細胞轉形的癌化過程中，觀察 AP-1 和 NF- κ B，表現量與其相關途徑表現。

結果：第一、由 TPA 引起的 AP-1 和/或 NF- κ B 活化上升，伴隨肝癌母細胞轉形。當分別加入左金丸及黃連、吳茱萸及小蘗鹼與吳茱萸鹼活性化合物可抑制 HepG2 肝癌母細胞的 AP-1 和/或 NF- κ B 的表現活化，阻斷癌化過程。第二、甲醇的吳茱萸萃取物，可有效抑制 Chang /AP-1 細胞株的細胞轉形，比較三種主要活性化物吳茱萸鹼、吳茱萸次鹼和檸檬苦素，發現吳茱萸鹼可有效抑制 AP-1 活性，分析其訊息傳遞路徑為 MAPK/ERKs。

結論：不論是左金丸或是吳茱萸、黃連，以及活性成份小蘗鹼和吳茱萸鹼都可抑制 HepG2 肝癌母細胞的癌化過程；其中左金丸與黃連小蘗鹼是透過阻斷 AP-1 和 NF- κ B 路徑。而吳茱萸與吳茱萸鹼可抑制 HepG2 肝細胞的細胞轉形的過程，是降低 AP-1 活性。在 Chang liver 細胞中發現：其機轉是降低 AP-1 活性經 MAPK 的 ERKs 的磷酸化減少。另外比較肝癌母細胞(HepG2)與非腫瘤細胞(Chang liver cell)都可

被吳茱萸與吳茱萸鹼所抑制，可見吳茱萸鹼可針對被誘發的 AP-1 活性的肝細胞，有選擇性的抑制癌化過程中的 tumor promotion。

關鍵字：左金丸；肝癌；活化蛋白質-1；核因子- κ B；吳茱萸鹼；12-鄰-四羧酸-佛波醇-13-乙酸；細胞轉形



第一章前言

肝癌(hepatocellular carcinoma)是全球最常見的六大癌症之一，死亡率更高居第三位，估計全球每年超過五十萬人死於肝癌，存活率在美國及已開發國家約在 3%~5%¹，手術及化療後的不佳，是治療肝癌的主要課題^{2,3}。在台灣肝癌的死亡率亦高居第二位，若合併肝病及肝硬化的比例，肝病影響國人的死亡率近 9%⁴。因此釐清肝癌形成的分子機轉及主要標的，對治療肝癌非常重要。肝細胞惡性腫瘤的主要危險因子是慢性 B 型肝炎和 C 型肝炎^{5,6}，另外食物被真菌污染所產生黃麴毒素屬於環境因子⁷，亞洲國家的主要危險因子是來自母親垂直感染慢性 B 型肝炎⁸，西方國家與日本主要的肝炎病毒是 C 型肝炎⁹。研究發現：慢性 B 型肝炎帶原者罹癌的機會比普通人的大於一百倍。所以在台灣針對 B 型肝炎帶原女性所產下的新生兒，給予接種 B 型肝炎表面抗原疫苗，大大降低兒童 B 型肝炎帶原者機率¹⁰。其中肝硬化與原發性肝癌關係密切，而 80% 以上的肝癌病人皆與慢性 B 型肝炎與 C 型肝炎病毒感染有關^{5,11,12}，另外酗酒¹³，亦是肝癌的致病因子之一。台灣地區成年人中有 15-20% 是 B 型肝炎帶原者，約 300 百多萬人⁵，會進行到肝硬化與肝癌。這種情形對研究如何治療肝癌，有迫切的需要。原發性肝癌一般又稱肝細胞癌，但亦有從它處轉移的肝癌，原發性肝癌一般會有三個階段：分別是慢性肝炎、肝硬化、肝癌⁵，其相關症狀如表 1.1。¹⁴。現代病理的研究及可能的研究範圍如下：

一、肝炎：肝細胞壞死後會影響鄰近的正常肝細胞產生繼發性的炎症。壞死肝組織增加、小膽管纖維化的作用、肝臟 Kuffer 細胞功能下降、肝細胞的新生降低、肝臟血流減緩、腸胃道功能與營養的供應和代償性廢物的排除受限。

二、肝硬化：伴隨肝硬化所產生的組織變化：脾腫大、食道靜脈曲張、肛痔靜脈擴張、肝臟血竇內壓加大、肝解毒功能降低，血氮增高，肝

動靜脈分流增加，白蛋白減少，氨基酸代謝異常等。血液供給肝臟的氧氣與養分不足、Kuffer 細胞活性降低、肝細胞纖維化增加。

三、肝癌：癌細胞增加、癌細胞分裂增加、免疫力下降、癌細胞分化異常、膽汁不通暢，呈現黃疸症狀、肝細胞再生不正常。

表 1. 1.肝癌三階段的相關症狀

	慢性肝炎	肝硬化	肝癌
一般症狀	頭暈目眩、心悸、氣短、失眠、疲乏	頭暈目眩、心悸、氣短、失眠、消瘦、乏力、皮膚枯躁	頭暈目眩、心悸、氣短、失眠、乏力、低熱
消化道	食慾不振，噁心，厭油，腹脹，大便時乾時溏	食慾不振、噁心、嘔吐、噯氣、腹脹、腹痛、腹瀉、嘔血	胃納減退、消化不良、腹脹、噁心、嘔吐、腹瀉等。
肝區	肝區脹痛或刺痛，或反復黃疸	黃疸	肝區疼痛、肝腫大與腫塊黃疸
出血與貧血	齒衄、鼻衄、皮膚紫癍	鼻衄、牙齦出血及皮膚粘膜紫癍等，嚴重者可出現尿血、便血	鼻衄、牙齦出血及皮膚粘膜紫癍等，嚴重者可出現尿血、便血
水腫	—	腹水	胸腔積液、腹水
內分泌	月經紊亂、男性機能減退	月經紊亂、男性機能減退	月經紊亂、男性機能減退

保守的治療方法有：施打疫苗、干擾素、免疫球蛋白等。目前全世界目前治療肝癌的方法及其進展，大概有下列方向：

1. 外科手術切除及肝臟移植²
2. 非外科局部治療包括局部摘除(Local ablation)、經導管動脈化療栓塞法(transcatheter arterial chemoembolization)²
3. 分子標靶治療(molecular targeted therapy)⁶

能消滅癌細胞又不傷害正常組織是治療肝癌的最佳模式。所以標靶治療已成為癌症治療最受矚目的方法之一。其原理是針對癌細胞的生長特性：突變(mutation)、增殖(proliferation)或擴散(metastasis)，阻斷癌細胞生長或修復(repair)；或抑制腫瘤血管新生，抑制癌細胞生長、促進癌細胞死亡、防止癌細胞擴散的目的。目前已上市或正在研究的肝癌標靶藥物，整理如表 1.2.

表 1.2. 阻斷癌細胞訊息傳遞路徑的標靶治療藥物

藥物名稱	作用機轉 (multikinase inhibitors)	阻斷癌細胞訊息傳遞路徑
Sorafenib (Nexavar) ¹⁵⁻¹⁷	Protein tyrosine kinases	抑制血管內皮生長因子、血小板源生長因子受器及 Raf Sorafenib 專一作用在 Raf/Mek/Erk pathway (MAP Kinase pathway)
Sunitinib ⁶ (Sutent)	Protein tyrosine kinases	抑制血小板源生長因子與血管內皮生長因子受器
Erlotinib ^{18, 19} (Tarceva)	Protein tyrosine kinases	抑制表皮生長因子受器 (EGFR) 阻斷 Ras/MAPK 訊息傳遞路徑，導致肝癌細胞的死亡

b. 抑制血管新生的標靶藥物

bevacizumab (Avastin)²⁰。

c. 其他

temsirolimus (Torisel)，主要阻斷肝癌增生 Akt/mTOR 路徑²¹。標靶治療藥物用於肝癌末期的治療，但如何提升療效與與降低副作用與增強病患耐受性等，是使用標靶藥物的重點。以上藥物的研究大多為國外研究，如能考量東方族群的肝癌的特性，應是研究的方向之一。

除上述外科手術切除及肝臟移植、及非外科局部治療包括局部摘除、或者經導管動脈化療栓塞法，及依癌細胞特性所採用的放射性療法，以及阻斷癌細胞訊息傳遞路徑的標靶治療。尚有朝 1. 癌細胞週期的抑制²²。2. 基因治療(gene therapy)²³。3. 醣化作用的抑制^{8,24}。4. 單株抗體^{6,25}。5. Tolemerase Inhibitors²⁶。6. 疫苗^{27,28}。7. 反股治療²⁹。雖然可能的方法有這麼多，但是目前尚在研發階段。

轉譯醫學的發展是 2005 年由美國國家衛生研究院的 Zerhouni 博士所率先提出，認為研究的目的地、藥物開發與臨床治療應結合，與以往各自發展不同，可以更迅速找到有效藥物的作法，應在全世界推廣³⁰。本研究企圖從中醫典籍中經轉譯醫學的詮釋，再以適當的分子生物學方法中尋求治療癌症的線索，針對癌化過程中之 tumor promotion 尋找阻斷或延緩的中藥，並從中醫學的治療角度分析可能的分子生物機轉，希望解開中、西醫學間，因民族文化、語言及哲學系統不同所造成的差異。畢竟中、西醫學所看到的皆是事實，雖然有不同的表達方式與治療模式，但是都應透過體內的基因表現、轉錄、轉譯等相同的基礎過程。所以若能找到相通的語言，必可使中醫的優點在國際舞台上發揚光大。

本篇研究分為兩大部份：

第一部份，探討中醫文獻上的肝病論述，找出可能且簡約有效處方，進一步可與現代研究相符合的方藥，透過由轉譯醫學的精神，回

歸到文獻上討論其應用的合理性。臨床上使用左金丸都是以科學中藥為主，此部份將以左金丸及其成份藥物黃連、吳茱萸的科學中藥之水萃取物及有效的活性成分(小蘗鹼、吳茱萸鹼) 針對肝腫瘤細胞株探討與癌化最相關的因子 AP-1 和 NF- κ B 的關聯性。

第二部份，為更進一步分析，吳茱萸的主要活性成分，以五種溶劑萃取，分別對 Chang liver 的細胞作用，分析不同的溶劑萃取物與 AP-1 及細胞轉形(transformation)的關聯性；再以成份活性化合物吳茱萸鹼、吳茱萸次鹼和檸檬苦素，與 TPA 所誘發的肝細胞轉形與 AP-1 轉活化的影響，找出最具潛力的化合物及其作用機轉。



第二章文獻探討

第一節肝癌現代醫學之相關文獻探討

癌化 (carcinogenesis) 是重複而連續性所造成細胞轉型的結果³¹⁻³³。一般腫瘤的形成可分三個階段，分別為：initiation、promotion 及 progression。Initiation 是屬於可逆性且快速、發生頻率很高的一個階段。通常是正常細胞在受到致癌因子刺激時，引發 DNA 受損，若無法即時修復 DNA，而致癌因子持續刺激，細胞基因會因而突變。promotion 是指細胞突變後，改變正常細胞週期的調控，進行增生而形成腫瘤，其間需時相當長且長期暴露在 promotion agent，通常超過 10 年以上。癌化的 Progression 期是不可逆的過程，這時腫瘤細胞會透過增生(proliferation)、侵襲(invasiveness)和轉移(metastasis)而增加腫瘤細胞的數量。所以預防癌症生成的過程中以抑制速率限制期的 tumor promotion，是已知最有效的策略³⁴。轉錄因子 activator protein 1(AP-1)對 tumor promotion 是非常重要³⁵⁻³⁸。因為腫瘤在 promotion 階段時，必需有 AP-1 的存在，而 AP-1 可啟動相關基因的轉錄，促腫瘤從 neoplastic transformation 轉成 tumor promotion 階段³⁸⁻⁴²。以往研究中指出照射紫外線會引起 tumor initiation 和 tumor promotion，進而形成皮膚癌^{43,44}，由此推論 AP-1 在 tumor promotion 是非常重要的因素^{40,45,46}。另外有些藥物抑制劑，如：flucinolone acetonide、retinoic acid；生物抑制劑，如：突變的 c-jun 和 negative phosphatidylinositol-3 kinase 也可抑制 AP-1 的活性，而阻斷 neoplastic transformation^{40,42,46-48}。所以臨床上也發現肝癌形成時會有 activator protein 1 (AP-1)或 nuclear factor-κB (NF-κB)連續性活化^{49,50}。AP-1 為 dimeric 蛋白質包括 JUN (c-Jun, JunB 和 JunD)，FOS (c-Fos, FosB, Fra-1 和 Fra-2)，和 ATF families of proteins³⁵。AP-1 會黏附在 DNA 上含有 2-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 結合序列的操縱子(promoter)的區域且活化與細胞增殖細胞凋亡細胞轉形的轉錄基因相關^{35,40,51-53}。例

如:以 TPA 或 epidermal growth factor 刺激 JB6 P+ 或 U937 細胞株會引起細胞 anchorage-independent growth 及癌化^{40, 53, 54}。

增加 AP-1 表現量也與多種癌症的 tumor promotion 及 progression 如皮膚、肺和乳癌⁵⁵⁻⁵⁸，此外，有些食品也可抑制 AP-1 活性而阻斷 JB6 細胞轉形諸如 omega-3 fatty acids 和 glycosides⁵⁹。

另外，中藥萃取物降低 AP-1 活性可能有效抑制 tumor promotion^{60, 61}。Mitogen-activated protein (MAP) kinases 是細胞內訊息傳導途徑的必要成員，可調整細胞增殖與細胞凋亡，MAP kinases 可分成三群: extracellular signal-regulated kinase (ERK)，c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) 和 p38 MAP kinase，像 TPA、UV radiation、growth factors 和 oxidative agents^{52, 62, 63}。這些刺激都可透過活化 MAP kinases 達到提高 AP-1 活性。

NF- κ B 是異雙分子 heterodimer 包括有 RelA (p65)、c-Rel、RelB、p50 和 p52。NF- κ B 在免疫與發炎上扮演重要的角色。甚至透過調整細胞生長、凋亡與癌化過程，也影響細胞生長與存活⁶⁴。更進一步說，NF- κ B 在許多慢性肝病都被活化，像 cholestasis 和 HCC⁶⁵。

不論在活體外、或活體內的各種研究指出，AP-1 或 NF- κ B 參與癌症的 initiation、promotion、progression 和 metastasis^{66, 67}。在癌化的過程中，AP-1 和 NF- κ B 扮演重要的角色顯示：AP-1 和 NF- κ B 可以當作篩選化學治療試劑的目標⁶⁸。例如：C 型肝炎可經抑制人類巨大細胞 AP-1 的活化阻斷合成介白素-12⁶⁹。此外，抑制 NF- κ B 活化明顯降低癌化過程，不論是 colitis-associated cancer 或者是發炎引發的 cholestatic carcinoma^{70, 71}。所以我們推論中藥萃取物如可下調 AP-1 和/或 NF- κ B 活性，便可有效抑制 tumor promotion。

左金丸(Zuo-Jin-Wan)，典籍上記載以治療肝火脅痛為主，方出自丹溪心法⁷²，當今的臨床使用上以治療胃腸道疾病，例如噁心嘔吐發炎性的消化道疾病^{73, 74}，另外有部分研究則認為左金丸可減緩或阻斷大腸癌或胃癌的癌變過程⁷⁵⁻⁷⁸。左金丸為中醫的傳統方劑，包含兩種中藥：黃連(*Coptis chinensis*)與芸香科植物的未成熟果實，吳茱萸

(*Evodia rutaecarpa*)，比例為 6:1。其中吳茱萸主要含有吳茱萸鹼 (evodiamine)、吳茱萸次鹼(rutaecarpine) 屬於 quinazolinocarboline 的生物鹼⁷⁹，有降血壓、減緩心跳⁸⁰、抗心律不整、刺激內皮細胞及抑制巨噬細胞釋放一氧化氮之作用^{81, 82}。吳茱萸鹼可增加動脈壓、鎮痛、血管舒張及抗腫瘤活化^{80, 83, 84}及抗腹瀉作用⁸⁵，在動物實驗發現可使癌細胞生長周期停滯，引發細胞凋亡及壞死⁸⁶。而吳茱萸次鹼⁸⁷，在肝中具很強的誘導 CYP1A1 與 CYP1A2 活性^{87, 88}，另外吳茱萸次鹼具有抗血小板凝集作用^{89, 90}。薑製吳茱萸後，吳茱萸鹼及吳茱萸次鹼的含量會較生品含量多，會擴張皮膚血管，自覺溫熱感。吳茱萸鹼可直接擴張離體血管的活性。吳茱萸次鹼也具有擴張離體腸繫膜動脈，促使內皮細胞釋放 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)而使血管舒張，亦直接對血管平滑肌產生舒張作用^{81, 82}。吳茱萸鹼萃取量，以黃連炮製最佳，比生品多 3.05 倍，生藥材最差；吳茱萸次鹼萃取量，亦以黃連炮製較佳，比生品多 1.42 倍，最差的是生藥材。吳茱萸水製後較無辛辣味，顯示其水溶性成分減少最多⁹¹。黃連及其活性成份小蘗鹼(berberine)同時也發現隨不同的炮制增加其活性成份⁹¹，由此推論左金丸的配伍(黃連配吳茱萸)，能增加其主要成份吳茱萸鹼與吳茱萸次鹼萃取量。另外從過去碩士吳泰賢的研究發現⁹²，吳茱萸以多種溶劑萃取時對於肝細胞因 TPA 所誘發 AP-1 活性的各種研究發現，不論是 EC₅₀、TC₅₀ 及 SI 等效果都以吳茱萸的甲醇萃取物效果較佳，如下表 2.1.1. 所顯示：

表 2.1.2. 比較 5 種溶劑吳茱萸萃取物的 EC₅₀、TC₅₀ 及 SI

	Acetic ethanol	Ethanol	methanol	H2O	Boiled water
EC ₅₀	24.8	24.44	24.72	—	—
TC ₅₀	90.42	79.77	122.51	>625	>625
SI	3.65	3.26	4.96	—	—

EC₅₀ (μg/mL)：抑制TPA所誘發AP-1活性達一半時的藥物濃度

TC₅₀ (μg/mL)：減少細胞存活量至一半時所需的藥物濃度

SI (selective index) = TC₅₀/EC₅₀

但左金丸、成分藥物及活性化物在肝細胞的抗腫瘤效、tumor promotion 的調控都不清楚。本研究針對左金丸及其成份組成，在 TPA 誘發的肝細胞轉形與機轉進行探究，找出左金丸及其成份組成可能的抗癌作用。

第二節 中醫學對肝癌之文獻探討

一、疾症發生的中醫觀點

中醫學自古以來一直都強調平衡的概念，以陰陽為總綱觀察人身與一切天地事物相互變化，並在辨證上以病位、病性或涉及臟腑經絡做進一步的剖析：諸如表裏、寒熱、虛實、氣血；或者經絡、臟腑、衛氣營血。由此觀之，癌症的發生與氣機的陰陽與氣機之升降關係。

在《黃帝內經》及歷代典籍對此論點有深刻的描述：

陰陽

其論點都以平衡為基本原則，見表 2.1，1. 人與環境的關係：強調機體本身的正氣若能強化，外邪難以入侵^{93, 94}。2. 人體內部的關係：代表實質的陰與功能的陽需達平衡，進一步則可有生化作用⁹⁵⁻⁹⁷；反之，過無不及都有害於身心的健康⁹⁵。3. 治療方向：觀察人體陰體的孰重孰輕，將之調整則氣和而身和矣！^{96, 99}

表 2.2.1. 歷代典籍對於陰陽的觀察

素問·陰陽應象大論	陰陽者，天地之道也 ⁹³
-----------	-------------------------

素問·生氣通天論	陰平陽秘，精神乃治 ⁹⁴
素問·至真要大論	謹察陰陽所在而調之，以平為期。亢則害，承乃制，制則生化 ⁹⁵
素問·評熱病論	正氣內存，邪不可干。邪之所湊，其氣必虛 ⁹⁷
素問·藏氣法時論	肝病者，兩脅下痛引少腹，令人善怒 ⁹⁸
針灸大成·卷三·諸家得失策	夫人之身，亦陰陽而已矣。陰陽者，造化之樞紐，人類之根抵也，惟陰陽得其理則氣和，氣和則形亦以之和矣 ⁹⁹
醫原·卷上·陰陽互根論	《易》曰：太極生兩儀，兩儀生四象，四象生八卦，八卦相錯，萬物生焉。太極，陰含陽也；儀象，陽分陰也。陽不能自立，必得陰而后立，故陽以陰為基，而陰為陽之母；陰不能自見，必待陽而后見，故陰以陽為統，而陽為陰之父。根陰根陽，天人一理也。以定位言，則陽在上，陰在下，而對待之體立；以氣化言，則陰上升，陽下降，而流行之用宏 ⁹⁶

升降

迭以陰陽描述天地萬物之更替，體現出陰陽之關係非一成不變，一日之間有日出日落、往來潮汐、四季之變換、周而復始的轉動，而在古籍《醫原·卷上·陰陽互根論》中才會提出：「陰陽互根，本是一氣，特因升降而為二耳！」⁹⁶，「邪之所湊，其氣必虛」，若病之演變產生內陷者，多因有入而無出，病下陷者，歸之有降而無升，從陰陽升降變化，實為百病之綱領¹⁰⁰。由此產生升降的概念，所以黃帝內經對此亦多有發揮。《六微旨大論》中記載帝曰：其升降何如？岐伯曰：氣之升降，天地之更用也¹⁰¹。出入廢則神機化滅，升降息則氣

立孤危。升降出入，無器不有¹⁰²。明·張景岳更一步闡示：「天無地之升則不能降；地無天之降則不能升」¹⁰³。所以自古業醫者必須明乎臟腑經絡氣血表裏寒熱等陰陽升降之理，如此治病皆可得其要領¹⁰⁴。更甚者，強調治病的療效取決於處方的劑量，其應用的多寡使憑借於陰陽升降之理，所以《存存齋醫話稿》「自昔名醫，無不以陰陽升降，盈虛消長，而為劑量準」¹⁰⁵。茲舉《鵲塘醫話·正文》書中一例：「因謂氣欲其升，不欲其降，血欲其降，不欲其升。然氣下陷，則為泄為脫；而氣上沖，則為喘為呃；血上涌，則為吐為衄；而血下泄，則為崩為漏，皆病也」¹⁰⁶。所以在使用補氣藥時常會佐以滋陰藥，讓升中有降。若病當補陰，其意取潤下，有當輔以補陽之品，使降中有升。另外在用藥上除須注意陰陽升降外，對治療上亦有五行生剋的理論產生如：「凡用藥，甘以和中，苦以燥濕，酸以收斂，辛以發散，咸以軟堅，淡以滲泄，此正治也。寒因寒用，熱因熱用，通因通用，塞因塞用，此從治也。虛則補其母，又曰子能令母實；實則瀉其子，又曰子能盜母氣，因相生而兼相為用，此常法也。脾病平肝，肝病壯脾，腎病清心，心病滋腎，此隔二治法也，肝病益肺(左金湯之類)，脾胃病暖腎，或助命門火，此隔三治法也。神而明之，思過半矣」¹⁰⁶。近代醫家彭子益先生則從清·黃元御的著作中得到啟發¹⁰⁷，認為體內的同屬性的氣機，亦存在升降之機，舉例而言，人身木氣有二：一屬肝，另一屬膽，兩者間存在表裏關係；更有升降的概念，「木氣有疏泄作用，膽氣經木氣的疏泄作用由上而下，肝經木氣的疏泄作用由下而上，以成一圓運動，足者膽經自頭走足，絡肝主降。肝經自足走胸，絡膽主升」¹⁰⁸。

肝病

肝的實質在《難經·四十二難》中認為：「肝重四斤四兩，左三葉右四葉，凡七葉，主藏魂」¹⁰⁹。《難經·三十七難曰》：「肝氣通於目，目和則知黑白矣」¹¹⁰。《素問·至真要大論》則提及肝的症狀與外邪之關係：「諸風掉眩，皆屬於肝」，由是觀之，肝病之發可從諸風掉眩、目之功能與顏色，魂之表現得之；然更有甚者：心有拂鬱，鬱從內發，

鬱則氣機滯而不通。所以鬱則百病叢生，該升不升，欲降不降，或鬱於氣，或鬱於血，氣血升降失調，病安不作？鬱而不舒，當推肝木之病，故前賢曰知其要者，一言而終¹¹¹。

癌出現在中醫典籍中最早是記載於西元 1170 年北宋年間的《衛濟寶書》中提到：癰疽五發，一曰癌、二曰癰、三曰疽、四曰疔、五曰癰¹¹²，又進一步闡述：「癌疾初發，卻無頭緒，只是肉熱痛。過一七或二七，忽然紫赤微腫，漸不疼痛，迤邐軟熟紫赤色，只是不破」。描述皮肉上的病變，與現代醫學的認識尚有差距。到了南宋楊士瀛描述癌的相關症狀如文：「癌者，上高下深，巖穴之狀，顆顆累垂，裂如瞽眼，其中帶青，由是簇頭，各露一舌，毒根深藏，穿孔通裡，男則多發於腹，女則多發於乳，或項或肩或臂，外證令人昏迷」¹¹³。這是中醫關於乳癌與胃癌的早期論述。

然而中醫文獻中雖無肝癌這一病名，但與之類似肝癌的臨床症狀的記載相當豐富，依症狀可分為屬：黃疸（又分陽黃、陰黃、急黃）肥氣、臃脹、脅痛、癥瘕、積聚、肝著、肝癰¹¹⁴⁻¹¹⁷等。肝癌的病位在肝，其病機與五臟相關，尤以後天之本的脾胃最為重要。

肥氣

《難經·五十六難》曰：肝之積名曰肥氣，在左脅下，如覆杯，有頭足如龜鱉狀，久久不愈，發咳逆，痰瘧，連歲月不已，以季夏戊己日得之。肺病傳肝，肝當傳脾，脾以季夏王不受邪，因留結為積¹¹⁴。

臃脹

一名蠱脹，即單腹脹也。《六元經紀論》云：脾乃陰中之太陰，同濕土之化，脾濕則臃滿食不化。天為陽為熱，主運化也；地為陰為濕，主長養也；無陽則陰不能生化，故云臟寒生滿病。《調經篇》云：因飲食勞倦傷脾胃，始受熱中，未傳寒中，皆由脾胃之氣虛弱，不能運化精微，而致水谷聚而成脹滿。經云：腹滿脹支膈脅，下厥上冒，過在足太陰陽明，乃寒濕郁遏也。《脈經》云：胃中寒，則脹滿。又云：諸脹腹大，皆屬於熱者，何哉？此乃病機總辨。假令外傷風寒，有餘之邪自表轉里，寒變為熱，而作胃熱腹滿，仲景以大承氣湯治之。

亦有膏粱之人，濕熱郁于內，而成脹滿者，此熱脹之謂也。大抵寒脹多而熱脹少，治者宜詳辨之。

積聚癥瘕痞

而《本草綱目》提到積聚癥瘕：左為血，右為食，中為痰氣。積系于臟，聚系于腑，癥系于氣與食，瘕系于血與蟲，痞系于氣郁，癥系于痰飲。肝為肥氣¹¹⁴。

肝癰

而論肝癰人有左脅間疼痛非常，手按之更甚，人以為脅痛，而不知非脅痛也，此乃肝經之癰耳。夫肝經生癰，多得之惱怒，予前條已暢論之矣。然而肝癰不止惱怒能生，而憂郁亦未嘗不生癰也。惟因惱怒而得之者，其痛驟；因憂郁而得之者，其痛緩。當初痛之時，用逍遙散大劑煎飲，痛立止，又何至成癰也。因失于速治，而肝中郁氣苦不能宣，而血因之結矣。血結不通，遂化膿而成癰，其勢似乎稍緩，然肝性最急，癰成而毒發其驟也¹¹⁷。

另外吳儀洛引用東垣論述：按痞病由陰伏陽蓄，氣血不運而成。處心下，位中央，填塞痞滿，皆土病也。與脹滿有輕重之分。痞惟內覺滿悶，脹滿則外有脹急之形也。有中氣虛衰，不能運化精微而成痞者。有飲食痰積，不能施化而成痞者。有濕熱太甚，上乘心下而成痞者。方用黃連、厚朴、吳茱萸、白朮、黃芩、茵陳、乾薑、桂、巴豆霜¹¹⁵。

清·張秉成則提到所謂「彼堅之處，必有伏陽」。用藥因病濕熱而苦寒，考量濕濁粘膩之氣非苦降直泄之藥所能達之，又輔以辛熱藥，呈現出升降苦辛併用達除痞之功¹¹⁸。

表 2.2.2.典籍中與肝相關之條文

難經·三十七難	「肝氣通於目，目和則知黑白矣」 ¹¹⁰
難經·四十二難	「肝重四斤四兩，左三葉右四葉，凡七葉，主藏魂」 109
難經·五十六難	肝之積名曰肥氣，在左脅下，如覆杯，有頭足如龜 驚狀，久久不愈，發咳逆，痰瘧，連歲月不已，以 季夏戊己日得之。肺病傳肝，肝當傳脾，脾以季夏 壬不受邪，因留結為積 ¹¹⁴
素問·至真要大 論	「諸風掉眩，皆屬於肝」 ¹¹⁹
素問·臟氣法時 論	「肝病者，兩脅下痛引少腹，令人善怒」 ⁹⁸
素問·標本病傳 論	肝病頭目眩脅支滿，三日體重身痛，五日而脹，三 日腰脊少腹痛脛痠，三日不已死，冬日入，夏早食 120
靈樞·邪客篇	肝有邪，其氣流于兩腋 ¹²¹
素問·大奇論	肝雍兩肱滿，臥則驚，不得小便 ¹²²
素問·玉機真藏 論	是故風者，百病之長也，今風寒客于人，使人毫毛 畢直，皮膚閉而為熱，當是之時，可汗而發也；或 痺不仁腫痛，當是之時，可湯熨及火灸，刺而去之。 弗治，病入舍于肺，名曰肺痺，發咳上氣。弗治， 肺即傳而行之肝，病名曰肝痺，一名曰厥，脅痛出 食，當是之時，可按若刺耳 ¹²³
素問·五臟生成 篇	青脈之至也，長而左右彈，有積氣在心下支肱，名 曰肝痺。得之寒濕，與疝同法 ¹²⁴
素問·脈要精微 論	肝脈搏堅而長，色不青，當病墜若搏，因血在脅下， 令人喘逆 ¹²⁵

靈樞·五邪篇	邪在肝，則兩脅中痛，寒中，惡血在內，行善掣，節時腳腫，取之行間以引脅下，補三里以溫胃中，取血脈以散惡血，取耳間青脈，以去其掣 ¹²⁶ 。
素問·咳論篇	肝咳之狀，咳則兩脅下痛，甚則不可以轉，轉則兩肱下滿 ¹²⁷ 。
素問·厥論	少陽之厥，暴聾頰腫而熱，脅痛，脘不可以運 ¹²⁸
素問·四時刺逆從論	少陽有餘，病筋痺脅滿 ¹²⁹
靈樞·邪氣臟腑病形	肝脈急甚者為惡言；微急為肥氣，在脅下若覆杯。緩甚為善嘔，微緩為水瘕痺也。大甚為內癰，善嘔衄；微大為肝痺，陰縮，咳引小腹。小甚為多飲；微小為消瘵。滑甚為潰疝；微滑為遺溺。濇甚為溢飲；微濇為痙攣筋痺 ¹³⁰
金匱五臟風寒積聚病脈證並治第十一	積者，臟病也，終不移。聚者，腑病也，發作有時 ¹¹⁶

二、中醫醫家對治肝病的思路

清·王旭高在《西溪書屋夜話錄》中提及治肝三十法：分成肝氣、肝風、肝火三者同出而異名。其中對肝火的論述如下：當肝火旺盛時全身上下都能致病。其症狀如，神智易有癡厥狂躁、不寐，目紅顴赤，飲食易，善飢煩渴，嘔吐，此外淋秘瘡瘍、上下血溢也都是肝火亢盛的常見症狀。王旭高總結前人經驗歸納為清肝、瀉肝、清金制木、瀉子、補母、化肝等法¹³¹。清·林瑞琴在《類證治裁》中提到肝氣肝火肝風論治，文章節錄如下：「凡上升之氣，自肝而出。肝木性升散，不受遏鬱，鬱則經氣逆，為噯，為脹，為嘔吐，為暴怒脅痛，為胸滿不食，為飧泄，為頽疝，皆肝氣橫決也。且相火附木，木鬱則化火，為吞酸脅痛，為狂，為痿，為厥，為痞，為呃噎，為失血，皆肝火沖

激也。風依于木，木鬱則化風，為眩，為暈，為舌麻，為耳鳴，為瘧，為痺，為類中，皆肝風震動也。故諸病多自肝來，以其犯中宮之土，剛性難馴，挾風火之威，頂巔易到，藥不可以剛燥投也。經曰：肝苦急，急食甘以緩之；肝欲散，急食辛以散之^[98]。用辛補之，酸瀉之。古聖治肝，法盡于此。夫肝主藏血，血燥則肝急。凡肝陰不足，必得腎水以滋之，血液以濡之，味取甘涼，或主辛潤，務遂其條暢之性，則鬱者舒矣。凡肝陽有餘，必需介屬以潛之，柔靜以攝之，味取酸收，或佐酸降，務清其營絡之熱，則升者伏矣。」「若氣有餘便是火，治肝火實，吞酸脅痛，左金丸、抑青丸。」「大抵肝為剛臟，職司疏泄，用藥不宜剛而宜柔，不宜伐而宜和，正仿《內經》治肝之旨也。丹溪曰：病人自言冷氣從下而上，非真冷也。此上升之氣，自肝而出，中挾相火，自下而上。其熱為甚，自覺冷者，火極似水，積熱之甚也。陽亢陰微，故見此症。又曰：氣從左邊起，肝火也。宜左金丸」¹³²。

而在治療方面，朱丹溪提及：凡火盛者，不可驟用涼藥，必兼溫散¹³³。肝病專家馬光亞教授在治肝病曾提及：治肝炎熱重之證，必須佐以辛開宣氣之品，方能得到除邪盡淨之功。因熱入肝經，多少挾有濕邪，故常發生阻滯沉著之象，將熱封蟄出。」「治熱重之肝炎，用苦寒三黃解熱，必選配枳實、乙金、橘紅、竹茹、菖蒲、桔梗、厚朴等宣氣，銀花、連翹、板藍根解毒之品，便秘者必下後方可減其病勢。」¹³⁴，又云：臨床治療肝炎，尤其濕熱型肝炎常用東垣方，因其多用羌活獨活，升麻葛根等祛風升陽之藥，風能勝濕，升則氣陽，而濕去，初證用羌活勝濕湯加減，中期用升陽除濕湯加減，後期用補中益氣湯加減，效果都好¹³⁵。

馬光亞教授對肝病治療則認為應從兩方面考慮，按肝病的發生的原因，不外乎外因與內因；外因常見的有風寒型與濕熱兩型，其中又以濕熱影響肝病最劇，輕者引起腸胃失調、黃疸；重者熱盛昏迷。內因以肝受損，其一、引發肝病傳脾的規律，脾陽受遏、進而發展成水濕泛濫的腹水、納差便溏的脾虛證候。其二、肝氣不舒日久，以致氣不行則血不行，造成血瘀實熱、瘀血沖逆、血瘀成癥證、氣滯血凝成

癌證等。其三、熱盛傷陰的陰虛型：如肝腎陰虛、熱入血份、濕熱並重之陰虛、陰虛津少等證。其四、肝功能衰竭險證、糖尿病併發肝硬化腹水證、肝癌胰臟癌蔓延至腸系證¹³⁴。

另外在中國大陸的谷銘三醫師累積 70 餘年治療肝腫瘤的經驗認為：肝癌的辨證可分成 1. 肝氣鬱結。2. 氣滯血瘀。3. 血瘀化熱。4. 脾困濕鬱。5. 肝膽濕熱。6. 熱毒亢盛。7. 氣陰兩虛¹³⁶。

所以宜考慮病人之正氣與外來邪氣強弱：若是正氣足時，會因外邪的影響產生肝本臟異常，諸如：肝氣、肝風、肝火。時間一久，可產生肝與餘臟腑的互相影響，如肝胃不和、肝脾不和，依症狀與病家體質而變動。所以在肝病本身會有急慢性肝炎、肝硬化甚或肝癌等不同階段的變化。

小結上述各家對肝病肝癌的看法，當機體抵抗外邪時，1. 正氣存內邪不可干。2. 外感風寒濕熱，致機體衛外之氣與之抗衡，引起體內臟腑虛實的相對性變化。3. 久病致臟腑受擾，氣機不暢、氣滯血瘀、濕熱橫行、熱毒亢盛，最終氣陰受累，陰陽失衡，病機趨於惡化。

三、治療肝癌的中醫思路

中醫治療肝病亦或是肝癌，都以陰陽為依歸，演化成陰陽動態變化的升降理論，以實質論肝，除與現代醫學相同的《難經》條文，經絡之分布(胸脅)與情志因素。而外邪的干擾會引起肝之陰陽氣血的機能出現異常，以肝氣肝火肝風，嚴重性是一層勝過一層，如同木鬱而氣鬱，氣鬱化火而生風，影響脾胃功能，亦即五行的生剋原理。《張氏醫通》：肝木搖動中土，故中土擾擾不寧，而嘈雜如飢狀，每求食以自救，苟得少食，則嘈雜少止，止則復作¹³⁷。肝木克脾胃之土、木火刑金、乙癸同源、肝腎同治、實則瀉其母、虛則補其子。治療上可採用一、見肝之病，知肝傳脾，當先實脾¹³⁸。二、用藥注重陰陽升降，溫熱寒涼。三、治病注重標本虛實。

四、中醫轉譯醫學的建構

因此以中醫的辨證為基礎，配合現代病理及分子生物學的分析，瞭解身體內所相對應的癌化階段，在選擇用藥上必然可截長補短，縮短治療的時間，避免發生轉移的惡性變化。其選方原則：辨證要准，立法要穩，選方要精，用藥要輕。針對瀉肝火輔以瀉心火(實則瀉其子)，病情嚴重時，應考慮補腎水(虛則補其母)，其中必須符合中醫治則的總綱：陰陽升降理論。

五、左金丸

挑選方劑中能符合具備針對肝病者濕熱貫穿其中等特性，又能吻合中醫治則的總綱且組方原則：肝之氣證、肝之火證、肝之風證¹³⁹，左金丸與上述條件相契合，加上其方義中又兼具中醫的五行補瀉的概念，如：金令左行平木火，實則瀉其子。吳茱萸與黃連的配伍，早自宋代以前即有記載(附表一)，《太平聖惠方》於西元 992 年刊行，其中卷五十九中提及：茱萸丸，治水瀉不止。其中吳茱萸與黃連用量相等。到了西元 1111 年刊行的《聖濟總錄·卷第三十四》上則記載甘露散；黃連與吳茱萸組成比為 1：2，主治暑氣。另外在西元 1196 年刊行的《是齋百一選方·卷之六·第八門》中則提出應用吳茱萸與黃連應用在赤白痢：赤痢，以黃連為丸三十粒配以甘草湯服下；白痢，則以用吳茱萸為丸三十粒，以乾薑湯下；若是赤白痢，則各用十五粒，佐以甘草乾薑湯下。此時已將病機之寒熱觀念運用其中。但若出現滑泄晝夜無度之重症，則須在等份吳茱萸與黃連為丸中加入罌粟殼，並用醋糊做丸，以達治瀉的作用¹⁴⁰。

直到元朝的朱丹溪所提出左金丸乃為治肝火正劑⁷²，丹溪認為脅痛者，如經診斷為氣從左邊起者，屬肝火¹³³，設若肝火盛，木氣實，易有死血，產生痰流注，可以左金丸瀉肝火，但火盛者，切不可驟用涼藥，必兼溫散，因熱甚而以吳茱萸為之反佐：正是熱者從治，以熱治熱，從其性而治之。寓從陽引陰入，免機體內格拒之勢發，與傷寒論的白通湯加人尿豬膽汁之義同；其中黃連與吳茱萸為六比一，飲淡

薑湯下。又提醒：「火，陰虛火動難治。火鬱當發，看何經，輕者可降，重者則從其性而升之」。

而《金匱翼》中談及：「肝火盛而脅痛者，肝氣實也。其人氣收善怒。經云：肝病者，兩脅下痛引少腹，善怒，又云：肝氣實則怒是也，其脈當弦急數實，其口當苦酸，其痛必甚，或煩熱，或渴，或二便熱澀不通」¹⁴¹。左金丸不僅吻合辨證要准，立法要穩，選方要精，用藥要輕的首選之方，與中醫總則陰陽升降之機相配合。

在《醫方集解》¹⁴²中將左金丸列入瀉肝火之劑，又名茱萸丸。其中點出現今中醫應用最多的吞酸吐酸之證。抑青丸方中用黃連一味，並吳茱萸湯浸一宿為丸，應用於大瀉肝火。其中隱含左金丸之義。與單用黃連的瀉心湯治心熱截然不同。

並且若因肝火所引發的咳嗽，也可以左金丸治療，後人解讀為「左金者，謂金令行左而肝平也」，清·吳昆在其《醫方考》提到左金丸，其一用於卷二·火門第八；其二在卷二·咳嗽門第十七^{143, 144}；可見肝火旺時引脅作痛可用，若遷延至肺金使木火刑金時亦可用左金丸。明·施沛則引述薛立齋以左金丸合神曲，併用陳皮白朮湯下，除治肝火脅肋刺痛，另外對或發寒熱或頭目作痛泄瀉淋秘一切肝火之症皆效¹⁴⁵。其中清·林佩琴在《類證治裁·卷之三·呃逆論治附方》提到治肝火之劑以左金湯稱之，由此可見不論是丸劑或是湯劑，劑型的使用可因地因時隨證變化¹⁴⁶。清·王燕昌針對左金丸的配伍提出其看法：古人立方之妙，多是以藥制藥，以藥引藥，非曰君臣佐使各效其能不相理也。解釋為：古人制方，構思巧妙，根據藥性的寒熱溫涼，配伍或相反相成，或相輔相成，以充分發揮和提高藥物療效。如左金丸中以黃連苦寒佐以吳茱萸溫中止嘔。以劑量連萸六比一，以黃連的苦寒以重泄胃熱達到止酸止嘔，配以吳茱萸少量制黃連之苦寒，發揮導熱下行，更助黃連清熱之效。展現用藥以君臣佐使之真義在於互補，互助，截長補短，發揮最大的效能，同時降低因藥物引起的毒副作用，減少對身體的危害。此以藥制藥，以藥引藥的配伍關係，實是用藥之金箴¹⁴⁷。

以藥物區分，黃連屬於瀉肝藥；吳茱萸則為溫肝藥，在神農本草經中提及黃連的氣味苦寒，主熱氣目痛、腸澼、腹痛、下痢¹⁴⁸。黃連，味苦性寒無毒。沉也，陰也。其用有四：瀉心火，消心下痞滿之狀；主腸，除腸中混雜之物；治目疾暴發宜用；療瘡瘍首尾俱同¹⁴⁹。

而吳茱萸的氣味辛、溫，主溫中，下氣，又除濕血痺，逐風邪，咳逆^{150, 151}。吳茱萸，味苦辛，性熱有小毒。可升可降，陽也。其用有四：咽噎寒氣噎塞而不通；胸中冷氣閉塞而不利；脾胃停冷腹痛而不住；心氣刺痛成陣而不止¹⁴⁹。《珍珠囊補遺藥性賦 卷二 主治指掌》：其中，黃連苦寒入心直折心火，實則瀉其子原則，減少吞酸脅痛病纏綿。而吳萸辛熱，能入厥陰。行氣解鬱又能引熱下行，且黃連入肝，一寒一熱一苦一辛，同治厥陰氣火有餘。

另外如中滿分消湯¹⁵²，李中梓選用的喬三余方-陰陽攻積丸¹⁵³中（見附方一、二）亦以黃連、吳茱萸為其組成，針對中滿寒脹、積聚時選用的方劑，其中寒熱藥同見、升降藥並存，屢屢可見，更見論證之周詳。

小結：所以從現代研究肝癌的三大過程，肝炎肝硬化肝癌三部曲經過中醫轉譯醫學，例如：林昭庚教授主編的中西醫病名對照大辭典¹⁵⁴，進而達到中國醫學的現代化與國際化。中西醫病名對照大辭典中指出病毒性肝炎與中醫病名或者症狀之黃疸、瘟黃、脅痛相關。而清·王旭高談到肝病總以本臟變化，肝氣肝風肝火為要點，而馬光亞教授則補充六淫中以風寒濕火與肝病密切關係，但濕熱貫穿其中。陳立夫先生提出對中西醫學的看法是：救人無囿於中西之分；為學應盡明古今之道。如何找到匯通中西的門徑，確是當前中西醫界努力的方向，多年前林昭庚教授先以中西醫病名對照大辭典，對於中西醫的整合貢獻良多，以病名為聚焦討論的主軸，使百年來中西醫對話有共同的平台。使今日進行肝癌的研究，可在此基礎上討論分析。

第三章材料與方法

第一節左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應

3.1.1. 細胞株和化合物

人類的肝母細胞瘤細胞株(HepG2)、購自生物資源保存及研究中心(新竹, 臺灣) 培養在含 10% 胎牛血清(FBS) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies), 溫度濕度控置在 37 °C, 5% 二氧化碳的培養箱中。一般化學藥品都購自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA), 其它特殊藥品會另行說明。TPA 溶在乙醇中, 濃度 0.5 mg/ml; Neomycin G-418 (Promega, Madison, WI, USA) 溶在水中, 吳茱萸鹼(EVO)、吳茱萸次鹼(rutaecarpine) 和檸檬苦素(limonin) 溶在 dimethyl sulfoxide (DMSO), 濃度 100 mM; 小蘗鹼溶在 50% 甲醇, 濃度 100 mM。質體(Plasmids) pAP1-Luc 和 pSV3-neo 分別購自 Stratagene (La Jolla, CA, USA) 和 ATCC。備製質體 DNA 的試劑是 Qiagen plasmid kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)。

3.1.2. 備製左金丸、黃連和吳茱萸的水性萃取物

左金丸、黃連和吳茱萸等科學中藥都是購自仙鹿藥品公司(臺灣)。這些中藥的水萃物的備製是由沸水萃取水溶性且耐熱的化合物。過程是 200 克的藥材浸泡在蒸餾水 2000 毫升放在錐形瓶中加熱, 錐形瓶同時接上迴流裝置, 方便冷卻蒸氣及回收藥品。再以 715 g 離心 20 分鐘後, 收集上清液, 在室溫真空乾燥, 乾燥粉末以蒸餾水泡成 1 mg/ml。

3.1.3. 定性分析左金丸黃連吳茱萸的活性物質

使用 Waters 生產的型號 2695 Alliance 高效液相層析儀(HPLC) (Waters, Milford, MA, USA) 進行分析, 內建有自動取樣及 2996 個光學

二極體探測器。吳茱萸鹼的分離的條件是以流速 1 ml/min 和溶劑乙腈 acetonitrile/5 mM phosphoric acid (50:50, v/v)。分離吳茱萸鹼所使用層析管的型號與廠牌是 Merck Purospher STAR RP-18e (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，在波長 254 nm 偵測出。分離小蘗鹼的移動相使用 acetonitrile/water (16:84, v/v)，溶液流速 0.8 ml/min，再以波長 280 nm 偵測。將上述條件通入 Waters SunFire- C 18 column (150 mm ×4.6 mm, 5 μm)層析管進行分析，所有在吳茱萸鹼及小蘗鹼的比重都在相同的條件下與標準品的校正曲線比較。

3.1.4. 細胞培養和 TPA 處理

HepG2/AP-1 及 HepG2/NF-κB 為兩組重組的肝母細胞瘤細胞株，分別含有 AP-1 或者 NF-κB 結合序列的冷光報導基因(luciferase)，建構的方法參之前的文獻^{61, 155}。HepG2/AP-1 和 HepG2/NF-κB 細胞株培養在含有 10% FBS 的 DMEM。為測試 TPA 處理效果，先將細胞株均勻分配到 96 孔的培養皿中，放置在 37°C。24 小時後以 DMEM 清洗，並單以 DMEM 培養另外 24 小時。此時才以不同濃度的 TPA 刺激上述的肝細胞 16 小時或 24 小時。

3.1.5. 冷光酵素分析(Luciferase assay)

肝細胞株 HepG2/AP-1 或 HepG2/NF-κB 分別在 25 毫升的培養皿於 37°C，培養 24 小時，用 DMEM 清洗，再以含 0.1%的胎牛血清的 DMEM 培養 24 小時。加入各種劑量或濃度的藥物或 TPA 在 37°C 培養 16 小時。再以 4 毫升的冰冷的磷酸鹽緩充液 PBS(137 mM NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 4.3 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.2)沖洗細胞，加上融解緩沖液 400 微升，12000 xg, 4°C 離心 2 分鐘。混合冷光酵素的受質(Promega, Madison, WI, USA) 100 微升，隨即以冷光儀(FB15, Zylux, Huntsville, AL, USA)測定冷光酵素活性。相對的冷光酵素活性計算 Relative luciferase activity (RLU)等於藥物處理細胞吸光值除以溶劑處

理吸光值的商。50%的抑制濃度(IC₅₀)的計算是藥物抑制 50%冷光酵素活性時的濃度¹⁵⁵。

3.1.6. 毒性測試 (Cytotoxicity Assay)

將細胞繼代到 96 孔培養皿中，置於 5% CO₂、37°C 培養箱中，培養 24 小時後，再加入各種濃度的藥物，再培養 24 小時。細胞的毒殺作用是測量 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 比色法判讀。在培養液內加入體積的 1/10 的 5 mg/ml MTT，在 37°C 培養 4 小時，加入等體積濃度 0.04 N HCl 的 isopropanol 溶液，以分光比色儀測定 570 nm 的吸光值。細胞存活率% (Cell viability) 的計算是(藥品處理後細胞的 OD 值 / 溶劑處理過的 OD 值)×100 計算。

3.1.7. Anchorage-independent growth assay

Anchorage-independent growth assays¹⁵⁶，操作過程如下：取 96 孔培養皿，分別在各孔中加入濃度 5 mg/ml 體積 50 μl poly (2-hydroxyethyl methacrylate) [poly-(HEMA)] 溶液，在 37°C 下乾燥至少兩天。亦即在培養皿上塗上 poly-(HEMA)，觀察缺乏細胞外基質的狀況下，細胞生長的情形。將平均每孔 1×10^3 - 2.5×10^3 個細胞分讓至 poly-(HEMA) 培養皿中培養在 37°C、5% CO₂ 24 小時。再加入藥物處理。經 24 小時後，加入 MTT (5 mg/ml)，在 37°C、5% CO₂ 下培養 4 小時。再加入 0.04 N HCl 的 isopropanol 溶液，以 570 NM 測吸光值，相對的細胞群形成(colony formation)可以公式(藥品處理後細胞的 OD 值 / 溶劑處理過的 OD 值)×100 計算。

3.1.8. 統計分析

數據的呈現以平均值±標準差。Student's t test 用來比較各組間的差異。當 *p* 值小於 0.05 為統計學的顯著差異。

第二節 吳茱萸抑制肝癌細胞轉形之機轉

3.2.1. 吳茱萸藥材

乾燥的未成熟吳茱萸果實分讓自順天堂藥廠股份有限公司。

3.2.2. 吳茱萸各種溶劑的萃取⁹²

1. 酸性乙醇萃取物：將吳茱萸 30 公克加入 100 毫升的酸性乙醇中，在室溫中萃取 24 小時，再經 -30°C 冷凍解凍一次，此即酸性乙醇萃取物後，烘乾並測量其溶質乾重。

2. 乙醇萃取物：將吳茱萸 30 公克加入 100 毫升的酸性乙醇中，在室溫中萃取 24 小時，再經 -30°C 冷凍解凍一次，此即酸性乙醇萃取物後，烘乾並測量其溶質乾重。

3. 甲醇萃取物：將吳茱萸 30 公克加入 100 毫升的甲醇中，在室溫中萃取 24 小時，再經 -30°C 冷凍解凍一次，此即甲醇萃取物後，烘乾並測量其溶質乾重。

4. 水萃取物：將吳茱萸 30 公克加入 100 毫升的水中，在室溫中萃取 24 小時，再經 -30°C 冷凍解凍一次，此即水萃取物，烘乾並測量其溶質乾重。

5. 熱水萃取物：將水 100 毫升加熱至 60°C ，10 分鐘後再加入吳茱萸 30 公克，置於室溫中萃取 24 小時， -30°C 冷凍解凍一次，此即得沸水萃取物，烘乾並測量其溶質乾重。

3.2.3. 細胞培養

肝細胞株為 Chang/AP-1 重組細胞株，這株細胞分別為含有 AP-1 結合序列/報導基因(luciferase)的 Chang liver 細胞^{36, 155}，因此可藉由測定 luciferase 的活性，評估 AP-1 的活性。重組細胞主要培養在含有 10%胎牛血清(HyCloneR)的 DMEM (Life Technologies)中。

3.2.4. Stable transfection 和 G418 selection

將上游含有 AP-1 序列及 TATA box，下游帶有 luciferase 為報導基因之質體¹⁵⁷，與帶有 Neomycin (G418) 抗藥性基因之質體—pSV3 neo¹⁵⁸，利用 Superfect (QIAGEN) 送進 Chang liver 和 HepG2 細胞，48 小時後，持續於細胞培養基中加入 400 µg/ml G418 進行篩選。最後藉由 luciferase assay 選出 luciferase 活性最強者為實驗細胞株，並重新命名為 Chang/AP-1 和 HepG2/AP-1 重組細胞。

3.2.5. 穩定的轉殖 Stable transfection

質體 pAP1-Luc 包含冷光基因和 AP-1 結合序列，都以 AlwNI 限制酵素處理後重組^[61]。細胞同時 transfected 2.5 µg linear pAP1-Luc DNA 和 2.5 µg EcoRI linearized pSV3-neo DNA 使用 SuperFectR transfection 試劑(Qiagen)。經 48 小時後，以 G-418 (400 µg/mL) 篩選細胞。單一 clone 可以經有限稀釋及冷光酵素測驗。選出 clone 具表現度高的冷光活性，即為 Chang/AP-1 細胞株。重組細胞株以含 10% 胎牛血清及 400 µg/mL G-418 的 DMEM 培養。

3.2.6. Anchorage-independent transformation assay

Anchorage-independent growth assays 的操作過程如下：取 96 孔培養皿，分別在各孔中加入濃度 5 mg/ml 體積 50 µl poly (2-hydroxyethyl methacrylate) [poly-(HEMA)] 溶液，在 37°C 下乾燥至少兩天。亦即在培養皿上塗上 poly-(HEMA)，觀察缺乏細胞外基質的狀況下，細胞生長的情形。將平均每孔 1×10^3 - 2.5×10^3 個細胞分讓至 poly-(HEMA) 培養皿中培養在 37°C、5% CO₂ 24 小時。再加入藥物處理。經 24 小時後，加入 MTT (5 mg/ml)，在 37°C、5% CO₂ 下培養 4 小時。再加入 0.04 N HCl 的 isopropanol 溶液，以 570 NM 測吸光值，相對的細胞群

形成(colony formation)可以公式(藥品處理後細胞的 OD 值 / 溶劑處理過的 OD 值) $\times 100$ 計算¹⁵⁶。

3.2.7. 冷光酵素活性的測定

Chang/AP-1 細胞 (1×10^4) 培養在 96 孔培養盤，37 °C 24 小時，以 DMEM 清洗後，再以 0.1% FBS 的 DMEM 培養 24 小時。加入各種劑量的化合物在 37 °C for 48 小時。再以 4 毫升的冰冷的磷酸鹽緩充液 PBS(137 mM NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 4.3 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.2)沖洗細胞，加上融解緩沖液 350 微升 (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 和 1 mM dithiothreitol, pH 7.8) 12000 $\times g$ ，4 °C 離心 2 分鐘。取細胞萃取液 20 微升、混合冷光酵素的受質 (Promega, Madison, WI, USA) 100 微升，隨即以冷光儀(FB15, Zylux, Huntsville, AL, USA)，測定冷光酵素活性。相對的 AP-1 活性以 relative light unit (RLU) 表示，等於藥物處理的細胞吸光值除以溶劑吸光值的商。50% 抑制濃度(EC₅₀) 的計算是藥物抑制 50%冷光酵素活性時的濃度。

3.2.8. 毒性測試 (Cytotoxicity Assay)

將細胞繼代到 96 孔培養皿中，置於 5% CO₂、37°C 培養箱中，培養 24 小時後呈單層 confluent cell 時，再加入各種濃度的藥物，再培養 24 小時。細胞的毒殺作用是測量 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 比色法判讀。在培養液內加入體積的 1/10 的 5 mg/ml MTT，在 37°C 培養 4 小時，加入等體積濃度 0.04 N HCl 的 isopropanol 溶液，以分光比色儀測定 570 nm 的吸光值。細胞存活率% (Cell viability)的計算是 (化合物處理後細胞的 OD 值 / 溶劑處理後細胞的 OD) $\times 100$ 。

3.2.9. 細胞存活率試驗

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

3.2.10. 西方墨點分析法(Western blotting)

在 37 °C 下，將 Chang/AP-1 細胞培養在 25 cm² 錐形瓶 24 小時，以 DMEM 清洗，再加入含 0.1% FBS 的 DMEM 後，再培養 24 小時。在不同的時段加入 TPA 處理，再以 PBS 清洗後，以 250 μL sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol 和 0.1% bromophenol blue) 解離細胞。細胞均質液(cell lysate)的蛋白質濃度以 Bradford 法測定。蛋白質 (15–20 μg) 以 10% SDS -polyacrylamide 膠體電泳且電轉至 nitrocellulose 膜(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)。膜先用 blocking buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 140 mM NaCl, 0.1% Tween-20 和 5% skim milk powder) 處理，再以 anti-JNK、anti-phospho-JNK、anti-p38、anti-phospho-p38、anti-ERK 及 anti-phospho-ERK 等抗體探測 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)。這些已結合的抗體用 horseradish 的過氧化酵素結合 anti-mouse antibody 偵測。接著用化學冷光 (ECL System, Amersham, Buckinghamshire, UK) 和 X 光片曝光顯影。

3.2.11. 統計分析

數據的呈現以平均值±標準差。Student's t test 用來比較各組間的差異。當 *p* 值小於 0.05 為統計學的顯著差異。

第四章結果

第一節左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應

4.1.1. 以高效色層分析法測定左金丸、黃連和吳茱萸的主要生物鹼成份

本實驗的設計想法是使用臨床中最常用的科學中藥來進行研究，所以先確認左金丸與組成藥物黃連、吳茱萸、吳茱萸鹼和小檗鹼存在科學中藥粉中，利用樣品與標準樣品比較停流時間與紫外線的吸收，鑑定與分析吳茱萸鹼和小檗鹼。

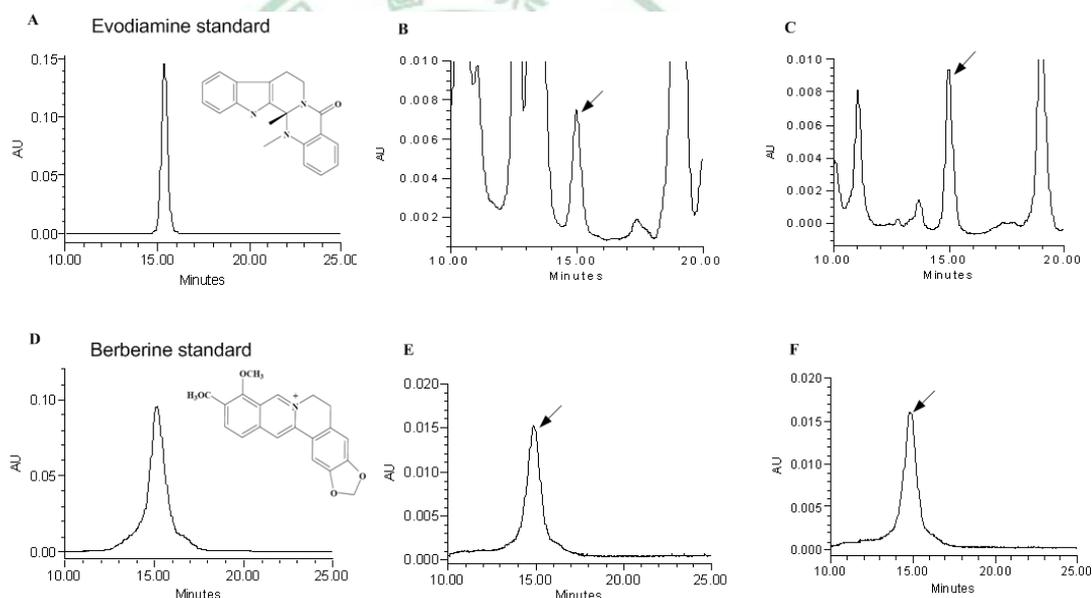


圖 4.1.1. 高效液相層析圖 HPLC chromatographs

圖 A 是吳茱萸鹼的結構與標準品高效液相層析圖。圖 B 和 E 是左金丸的不同分析的層析圖。圖 C 是吳茱萸的層析圖。圖 D 小檗鹼的結構式與標準品的層析圖。圖 F 黃連的層析圖，箭頭指出吳茱萸鹼或小檗鹼的吸收波峰。吳茱萸鹼和小檗鹼在左金丸的內容比例分別是 0.03% 和 2.9%。吳茱萸鹼和小檗鹼在吳茱萸與黃連的內容比例分別是 0.05% 和 3.34%。

4.1.2. 在 HepG2 中，TPA 可活化 AP-1 和 NF- κ B 表現

研究 TPA 能否調控肝細胞株中的 AP-1 和 NF- κ B 活性，將重組細胞株 HepG2/AP-1 或 HepG2/NF- κ B 分別繼代到 96 孔的培養皿，並以多種濃度的 TPA 刺激。HepG2 細胞株以不同濃度的 TPA 處理在 16 小時後測定冷光酵素的活性與細胞活力，柱狀形代表相對的冷光酵素活性，乃與未處理過細胞的 RLU 比較產生。線形表示實驗過程中細胞的活性。由圖 4.1.2. 可看出 TPA 可誘發 AP-1 和 NF- κ B 活性且成劑量反應。過程中沒有細胞毒殺作用發生。1 ng/ml TPA 處理後 NF- κ B 活性增加 3 倍；相對於 AP-1 活性增加 3 倍時 TPA 的劑量已達 100 ng/ml。結果說明：在 HepG2 中，TPA 可活化 AP-1 和 NF- κ B 表現。

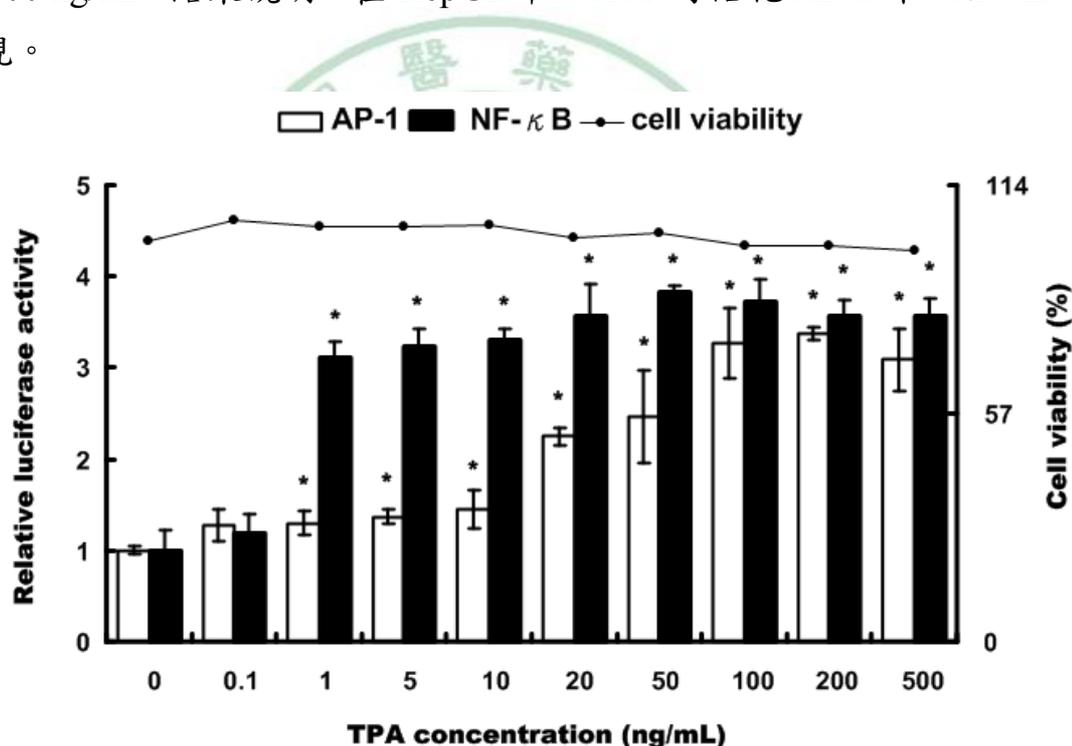


圖 4.1.2 在 HepG2 細胞株中 TPA 對 AP-1 和 NF- κ B 活性的影響

HepG2 細胞株以不同濃度的 TPA 處理在 16 小時後測定冷光酵素的活性與細胞活力，柱狀形代表相對的冷光酵素活性，乃與未處理過細胞的 RLU 比較產生。線形表示實驗過程中細胞的活性。採三重複的平均值 \pm 標準差，與控制組比較 * $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

4.1.3. TPA 引發 HepG2 的 anchorage-independent growth

為進一步確認 TPA 是否促進細胞的 anchorage-independent growth，我們將 HepG2 細胞繼代至塗有 poly(HEMA) 96 孔的培養皿，加入各種劑量的 TPA。經由 MTT 比色分析評估細胞的 anchorage-independent growth。

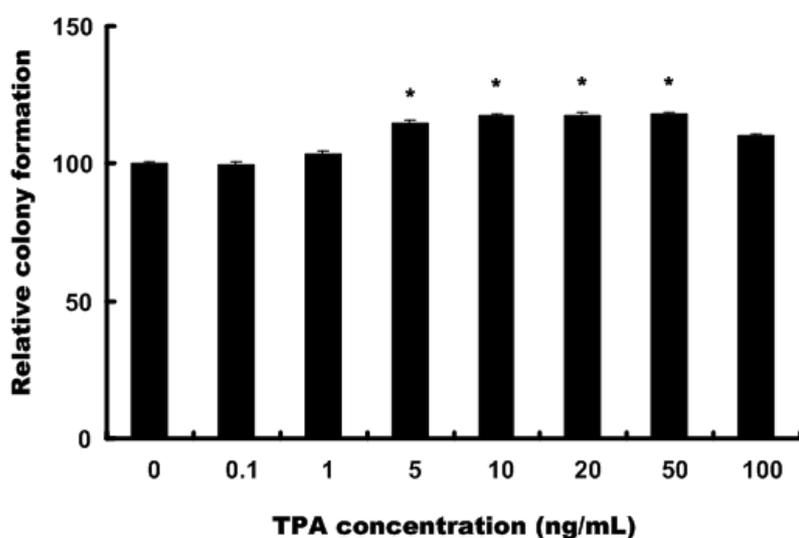


圖 4.1.3 TPA 對於 HepG2 anchorage-independent assay 的效果

TPA 明顯刺激 HepG2 細胞的 anchorage-independent assay。TPA 誘發最大的細胞 anchorage-independent growth 最大的濃度是 20 ng/ml。因此，TPA 在以後的實驗都採用濃度 20 ng/ml。細胞繼代至塗有 poly-(HEMA) 96 孔的培養盤，並以各種劑量的 TPA 處理。採三重複的平均值 ± 標準差，與控制組比較 * $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

4.1.4. 左金丸可抑制 TPA 所引起的 HepG2 細胞內 AP-1 和 NF- κ B 活化

因為 AP-1 與 NF- κ B 活性的增加在癌化的過程中扮演重要的角色^[6]，

^{15]}，我們發現在 HepG2 細胞株，左金丸可調控 TPA 誘發的 AP-1 和 NF- κ B 活性。亦即左金丸可抑制 HepG2 細胞內 TPA 所引起的 AP-1 和 NF- κ B 表現，且呈劑量反應。另外左金丸對於 AP-1 和 NF- κ B 活性的 50% 抑制濃度(IC₅₀) 分別是大於 200 及 22.9 μ g/ml。實驗過程中，左金丸也沒有明顯的細胞毒性。結果顯示：左金丸可以抑制 HepG2 中 TPA 所引發的 AP-1 和 NF- κ B 活性。HepG2 細胞株先以各種濃度的左金丸處理 1 小時，再加入 20 ng/ml TPA。細胞株在 37°C 培養 48 小時後，以冷光酵素分析細胞萃取液內 AP-1 或 NF- κ B 的活性。柱狀圖代表相對性冷光活性。並與 TPA 處理後的結果比較 RLU。線狀表示細胞活性。

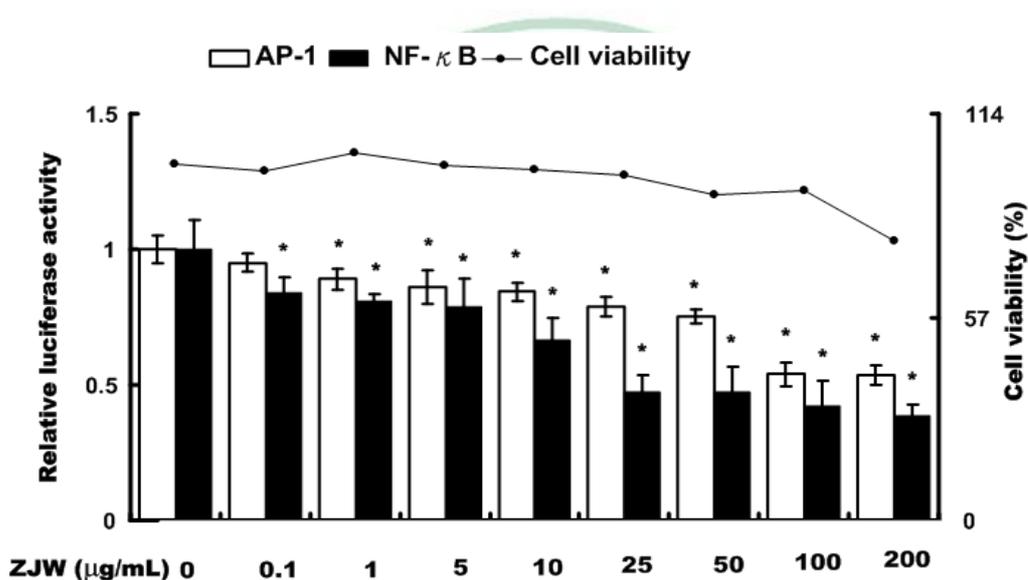


圖 4.1.4 左金丸在 HepG2 細胞株對 TPA 誘發的 AP-1 及 NF- κ B 活化的抑制效果

採三重複的平均值 \pm 標準差。與只以 TPA 處理，但沒有左金丸比較時，* p <0.05 表有統計上的顯著差異。

4.1.5. TPA 所引起的肝細胞轉形可被左金丸所抑制

細胞轉形最重要的特徵是細胞的 anchorage-independent assay 且能夠幫助癌細胞轉移。所以轉形細胞的生長能力與癌化程度相關。圖 4.1.5. 顯示 TPA 引起的細胞 anchorage-independent growth, 可以被左金丸明顯抑制, 且隨左金丸濃度的上升, 抑制效果更明顯。當左金丸濃度達 50 $\mu\text{g/ml}$ 時, 可減少 HepG2 細胞生長 20%。從左金丸可抑制 TPA 誘發的 AP-1 和 NF- κ B 活化作用與抑制肝細胞轉形的結果, 可推論左金丸經由抑制 AP-1 和 NF- κ B 活化, 阻斷 HepG2 細胞轉形的作用得知, 左金丸的組成藥物: 黃連與吳茱萸必然對 HepG2 細胞轉形有不同的調控機轉。

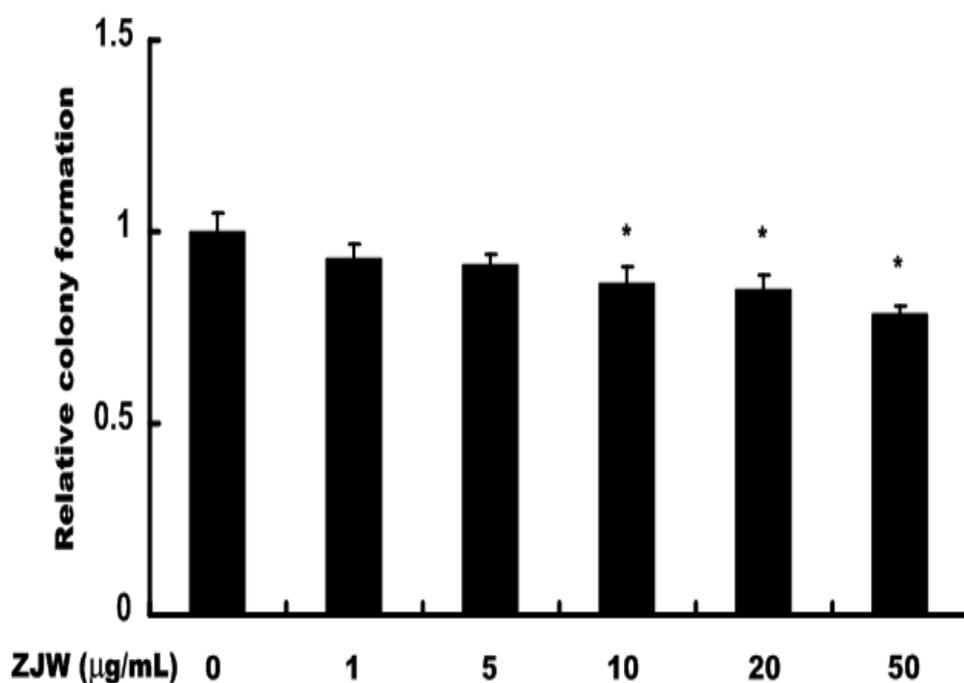


圖 4.1.5. 左金丸在 HepG2 細胞株抑制 TPA 所誘發的 anchorage-independent growth

HepG2 細胞以 20 ng/ml TPA 處理和/或各種劑量的左金丸。採三重重複的平均值 ± 標準差，與只以 TPA 處理，但沒有左金丸比較，* $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

4.1.6. 在 HepG2 細胞株中，黃連與吳茱萸可所抑制 TPA 誘發的 AP-1 活性

我們更進一步分析黃連與吳茱萸在 HepG2 細胞株中對 TPA 誘發的 AP-1 和 NF- κ B 活性的效果。TPA 引起的 AP-1 和 NF- κ B 活性可隨黃連濃度的上升而下降(圖 4.1.6A.) 黃連對 AP-1 和 NF- κ B 活性的 IC₅₀ 分別是 23.2 和大於 >200 μ g/ml。吳茱萸抑制 AP-1 活性成劑量反應，且其 IC₅₀ 值是 200 μ g/ml (圖 4.1.6B.)。然而，吳茱萸不影響 NF- κ B 活性。實驗過程中黃連與吳茱萸沒有細胞毒作用。因此，結果指出，黃連可抑制 TPA 誘發的 AP-1 和 NF- κ B 活化，而吳茱萸專抑制肝癌細胞中 AP-1 活性。HepG2 細胞株先以各種濃度的黃連(A)或吳茱萸(B)處理 1 小時，再加入 20 ng/ml TPA。細胞株在 37°C 培養 48 小時後，以冷光酵素分析細胞萃取液內 AP-1 或 NF- κ B 的活性。

4.1.7. 在 HepG2 細胞株中 TPA 誘發的 AP-1 活性，分別可為小蘗鹼與吳茱萸鹼所抑制

黃連和吳茱萸的主要成份分別是小蘗鹼與吳茱萸鹼^{159, 160}。我們進一步分析是否這些主要成份藥物的效果與原藥材在肝細胞株中對 AP-1 和 NF- κ B 活性有著相似的結果。與黃連相似，小蘗鹼可抑制 AP-1 和 NF- κ B 活性，並與濃度成正比，其 IC₅₀ 值分別是 9.5 和 50 μ M (圖 4.1.7A.)。吳茱萸鹼的表現與吳茱萸相似，僅抑制 AP-1 活性且與濃度有關，但對 NF- κ B 活性無影響(圖 4.1.7B.)。實驗中，所有藥物對細胞株沒有任何的細胞毒性產生。結果顯示：小蘗鹼與吳茱萸鹼分別是黃連和吳茱萸的主要活性成份。另外，在 HepG2 細胞株中 TPA 誘發的 AP-1 活性，分別可為小蘗鹼與吳茱萸鹼所抑制。HepG2 細胞株先以各種濃度的小蘗鹼(A)或吳茱萸鹼(B)處理 1 小時，再加入 20 ng/ml TPA。細胞株在 37°C 培養 48 小時後，以冷光酵素分析細胞萃

取液內 AP-1 或 NF- κ B 的活性。柱狀圖代表相對性冷光活性。並與 TPA 處理後的結果比較 RLU。線狀表示細胞活性。

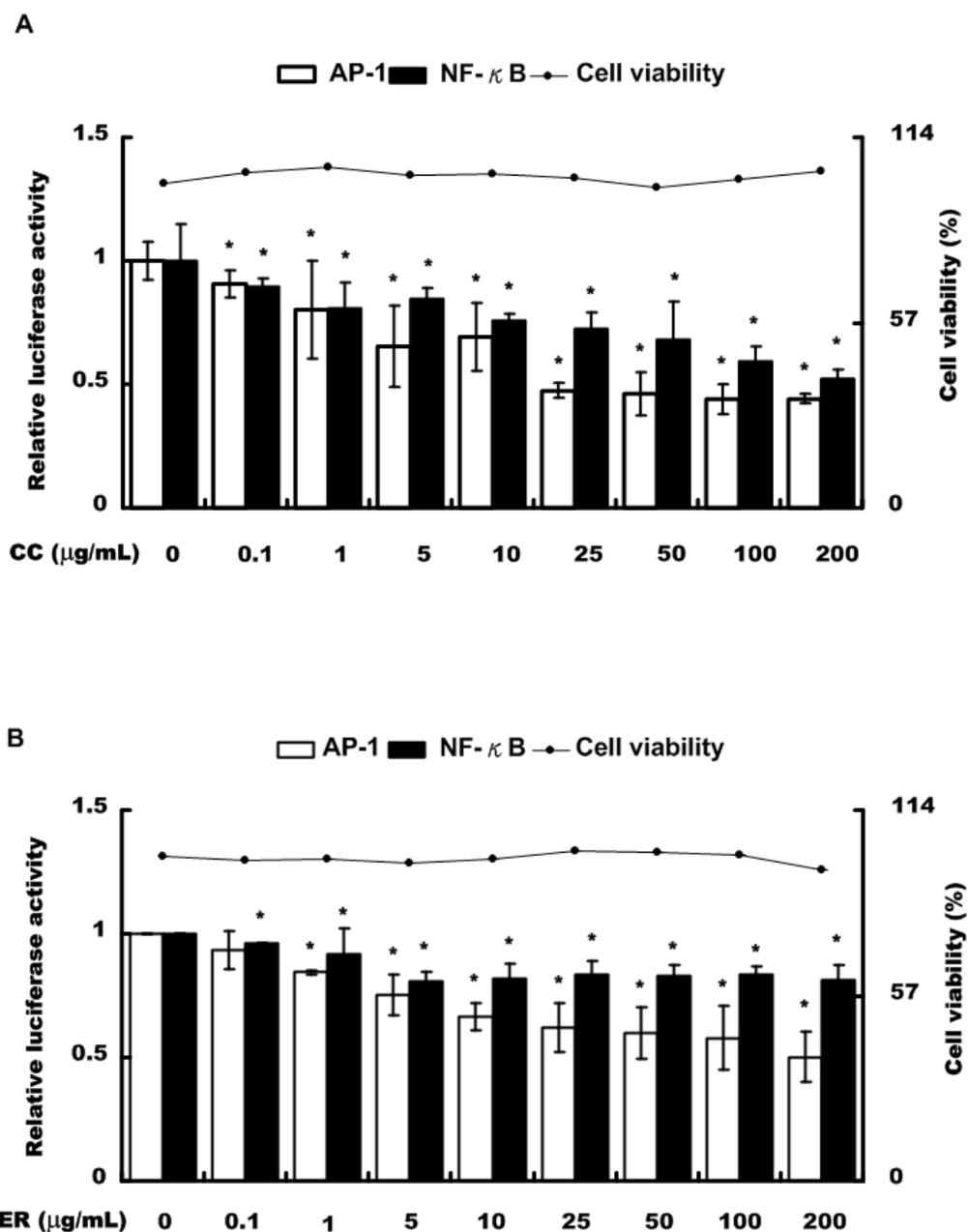


圖 4.1.6. 黃連與吳茱萸在 HepG2 細胞株對 TPA 誘發的 AP-1 及 NF- κ B 活化的抑制效果

柱狀圖代表相對性冷光活性。並與 TPA 處理後的結果比較 RLU。線狀表示細胞活性。採三重複的平均值 \pm 標準差。與只以 TPA 處理，但沒有黃連和吳茱萸比較時，* $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

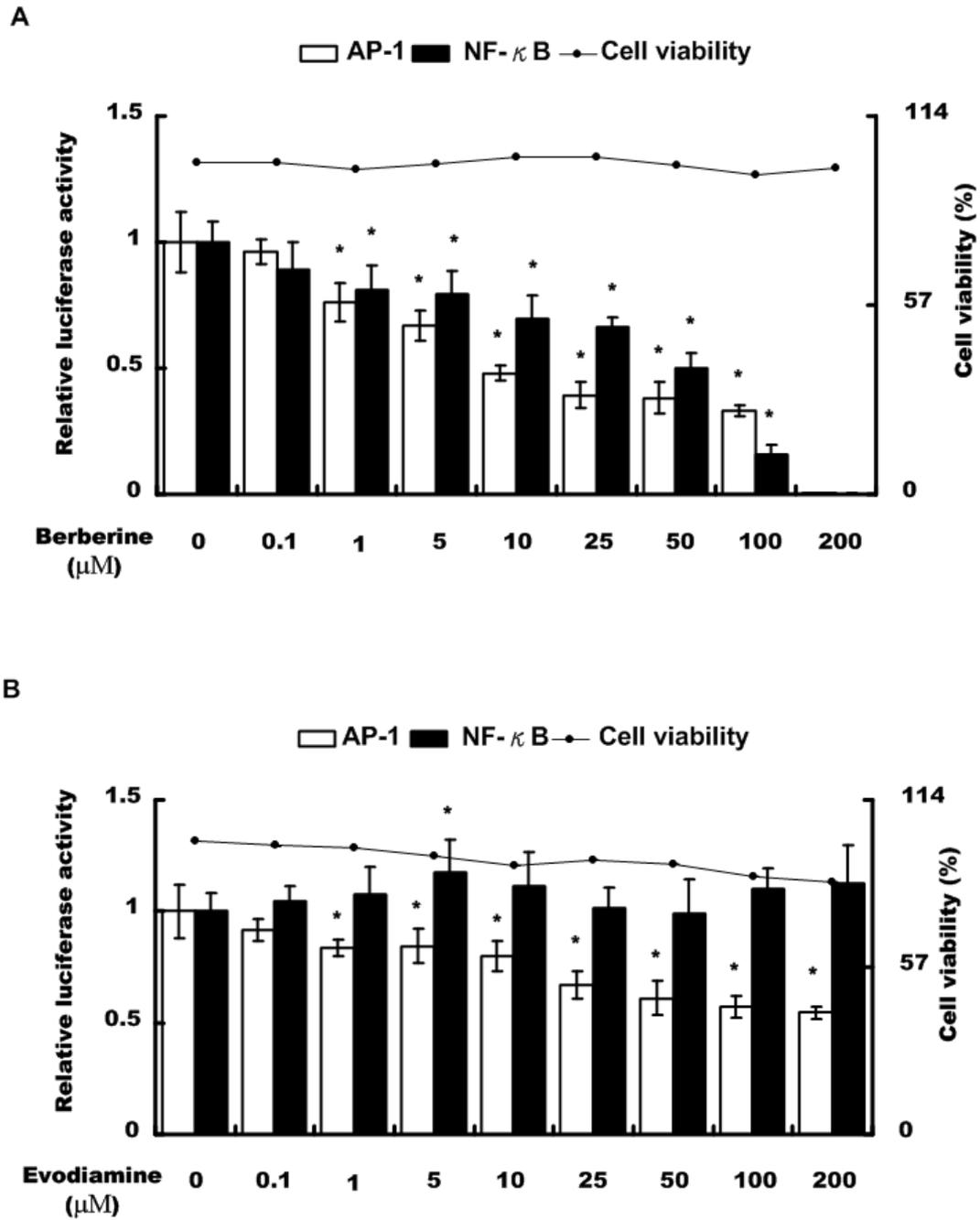


圖 4.1.7. 小蘗鹼與吳茱萸鹼在 HepG2 細胞株對 TPA 誘發的 AP-1 及 NF- κ B 活化的抑制效果

採三重複的平均值 \pm 標準差。與只以 TPA 處理，但沒有小蘗鹼和吳茱萸鹼比較時， * p <0.05 表有統計上的顯著差異。

4.1.8. 小蘗鹼與吳茱萸鹼抑制 TPA 誘發的肝細胞轉形

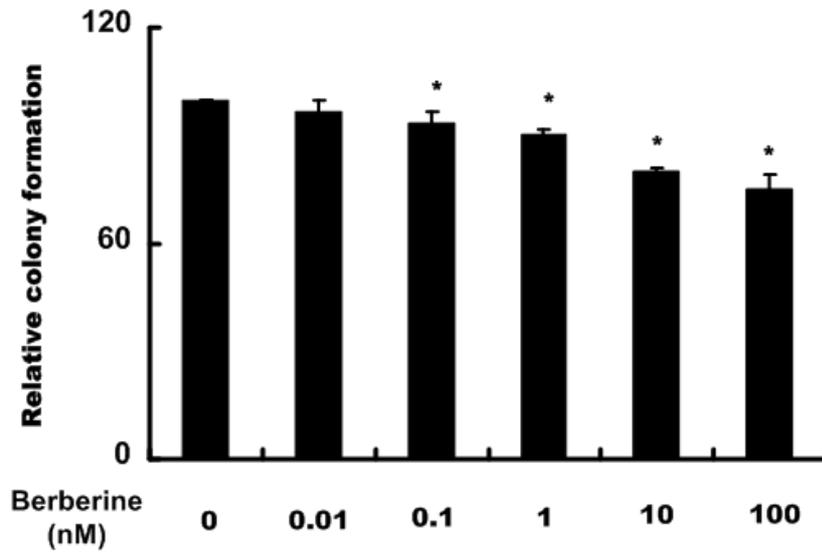
評估小蘗鹼與吳茱萸鹼抑制 TPA 所誘發的肝細胞轉形是使用 anchorage-dependent growth assays. 轉形的細胞株生長時不受細胞外基質的影響；生長的能力與癌化程度有關¹⁶¹。因此抑制轉形的 anchorage-independent 生長，代表有效的化療抗癌策略。圖 4.1.8.，以 100 nM 小蘗鹼和吳茱萸鹼可抑制 TPA 刺激後的 HepG2 細胞株生長，分別為 25% 和 26 %。歸納結論是：小蘗鹼與吳茱萸鹼分別是黃連和吳茱萸的有效活性化合物，在肝細胞株中可抑制 AP-1 和/或 NF- κ B 活性，具有抗腫瘤轉形的有效。

第二節 吳茱萸抑制肝癌細胞轉形之機轉

4.2.1. TPA 在人類肝細胞可活化 AP-1 的活性

欲探究是否 TPA 在人類肝細胞可活化 AP-1 的活性，需建構穩定的含有 AP-1 結合序列/冷光酵素轉殖細胞株。如圖 4.2.1.，TPA 明顯增加 AP-1 的活性且呈劑量反應。在 TPA 刺激的過程中細胞活力維持一致。當 TPA 濃度達 25 ng/mL，AP-1 活性可增加 4.1 倍。結果指出：在人類肝細胞 TPA 可誘發 AP-1 的活性。吳茱萸的甲醇萃取物可抑制 TPA 所誘發人類肝細胞的 AP-1 活性及肝細胞的轉形。

A



B

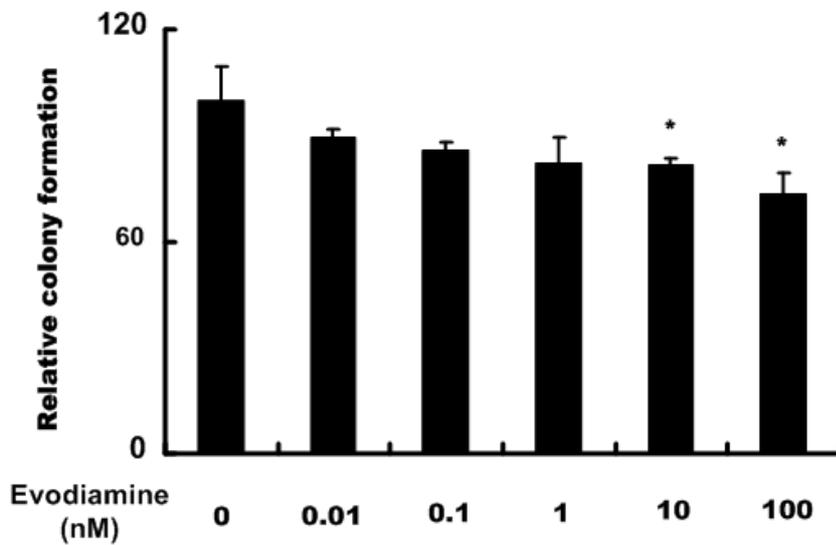


圖 4.1. 8.小蘗鹼與吳茱萸鹼抑制 TPA 誘發 HepG2 細胞株細胞轉形的效果

HepG2 細胞株以 20 ng/ml TPA 及/或小蘗鹼(A) 和吳茱萸鹼依圖示濃度。採三重複的平均值 ± 標準差。與只以 TPA 處理，但沒有小蘗鹼和吳茱萸鹼比較時， * $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

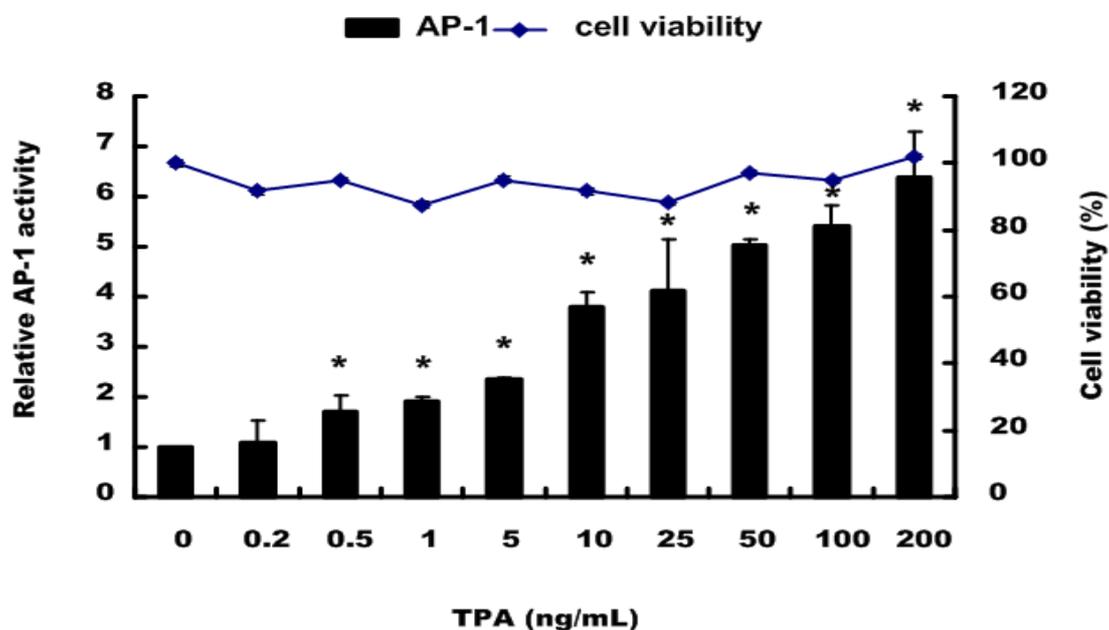


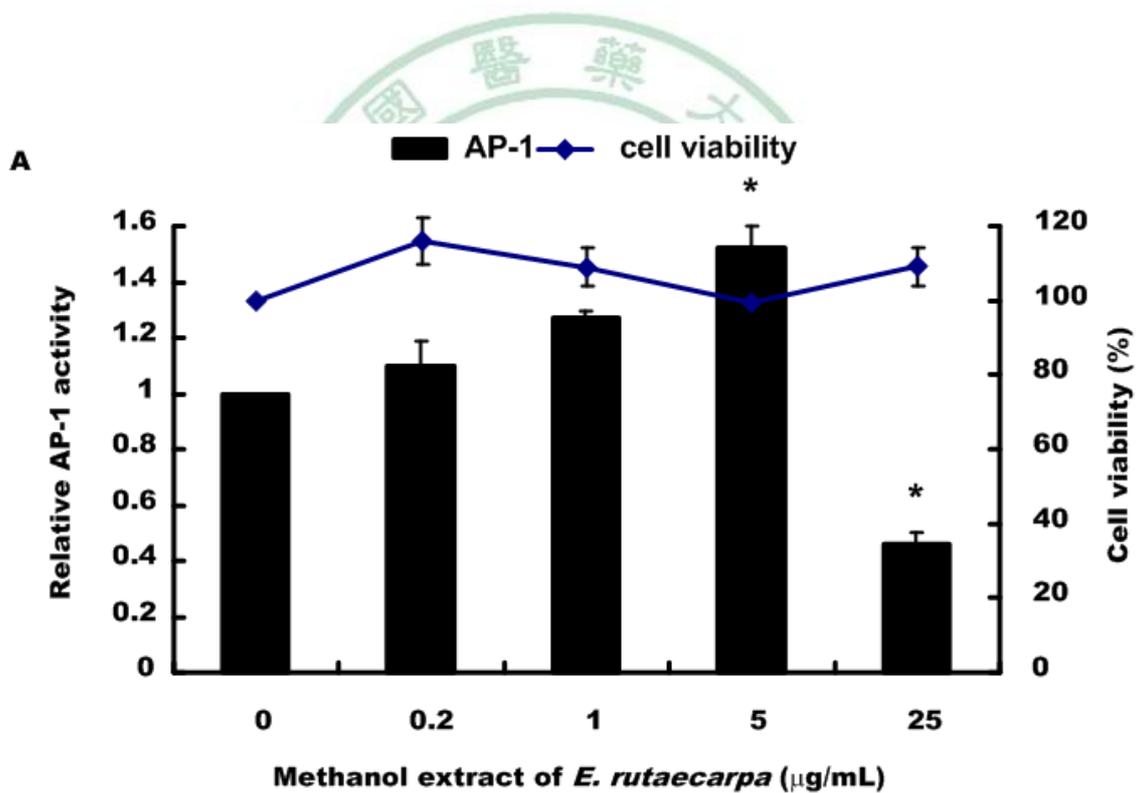
圖 4.2.1. TPA 對肝細胞內 AP-1 活性的效果

TPA 處理後冷光酵素與細胞活性的表現，柱狀圖表示相對性的 AP-1 活性，並與溶劑處理後的結果比較 RLU。線狀表示細胞活性。採三重複的平均值 ± 標準差，與控制組比較 * $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

4.2.2. 為了評估吳茱萸能否抑制細胞轉形，以各種溶劑萃取吳茱萸，並找出有效活性成份。

分析各種溶劑的吳茱萸的萃取物對 TPA 引起的 AP-1 活性，發現甲醇的萃取物內存在最強的成份。吳茱萸的甲醇萃取物的阻斷 TPA 引起的 AP-1 活化 EC_{50} 值為 $24.72 \mu\text{g/mL}$ (表 2.1.3.)⁹²。而圖 4.2.2A.：甲醇萃取物濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ 明顯抑制 TPA 誘發的 AP-1 活性，且沒有細胞毒性。結果建議：吳茱萸的甲醇萃取物可在 Chang liver cells 中

抑制 TPA 引起 AP-1 活性。另外也發現吳茱萸的甲醇萃取物濃度在 0.2–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間，有輕微地活化 AP-1 活性。由於中藥萃取物的成份複雜使然；此活化可能是細胞對環境壓力的反應。因為 AP-1 可調控細胞轉形與癌化過程。進一步分析吳茱萸的甲醇萃取物是否因可抑制 AP-1 活性而阻斷細胞轉形。如圖 4.2.2B，吳茱萸的甲醇萃取物濃度越高抑制 TPA 所誘發的細胞轉形功能越佳，以濃度成正相關。結果顯示：吳茱萸的甲醇萃取物可抑制 AP-1 活性，並且可在 Chang liver 細胞株上抑制細胞轉形。



B

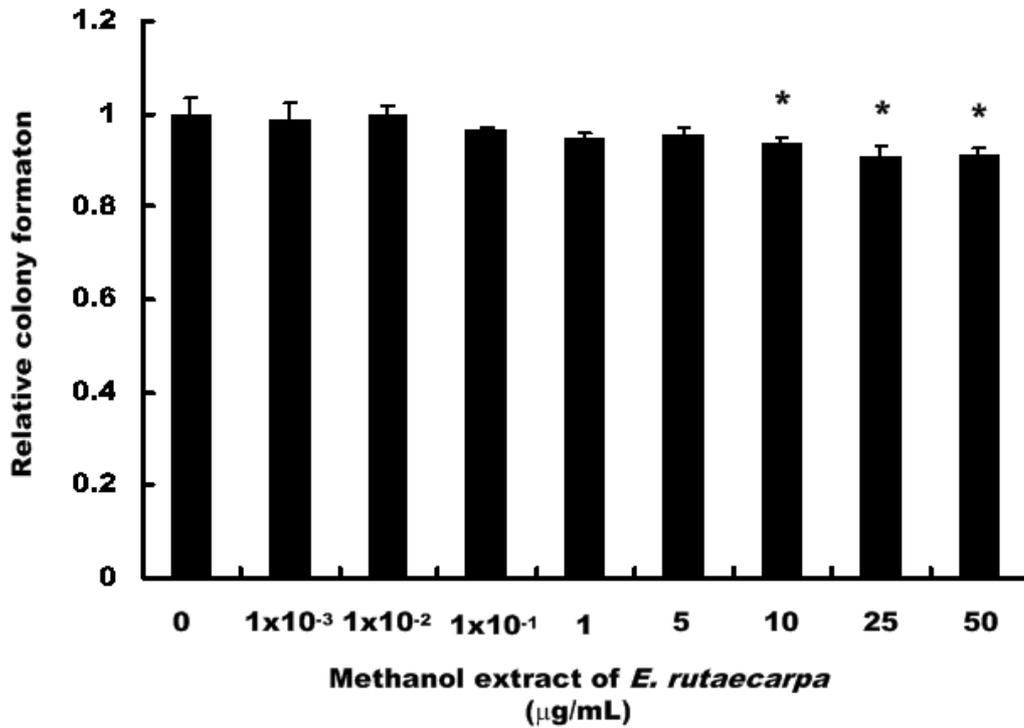


圖 4.2.2. 吳茱萸的甲醇萃取物作用在 TPA 所誘發的 AP-1 活性和 TPA 引起的肝細胞 anchorage-independent transformation

圖 4.2. 2A. AP-1 活性分析⁹²。Chang/AP-1 細胞株先以圖示的吳茱萸甲醇萃取物濃度處理 1 小時，再以 20 ng/mL TPA 處理。

圖 4.2. 2B. Anchorage-independent transformation 分析。Chang/AP-1 細胞株同時以 20 ng/mL TPA 和圖示濃度的吳茱萸甲醇萃取物處理。採三重複的平均值 ± 標準差。與只以 TPA 處理控制組比較時，* $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

4.2.3. 吳茱萸鹼下調肝細胞內 TPA 所引起的 AP-1 活化

吳茱萸鹼、吳茱萸次鹼和檸檬苦素是吳茱萸的甲醇萃取物的主要活性組成(圖 4.2.3A.)。所以，進一步研究要找到吳茱萸抗腫瘤的主要活性。在圖 4.2.3B.，吳茱萸鹼有效阻斷 TPA 引起的 AP-1 活性，且為劑量反應。在吳茱萸鹼濃度 10 µM 時，AP-1 活性減少約 40%。吳茱萸鹼的 EC₅₀ 值為 82 µM。而在吳茱萸次鹼濃度 10 µM 時，AP-1 活

性上升 2.5 倍；要到吳茱萸次鹼濃度達 100 μM ，AP-1 活性才會回到 basal level (圖 4.2.3C)。另外，檸檬苦素處理過程則沒有明顯的變化(圖 4.2.3D)。因此吳茱萸的活性化合物，吳茱萸鹼可阻斷 TPA 誘發的 AP-1 活性，也是吳茱萸的活性化合物。

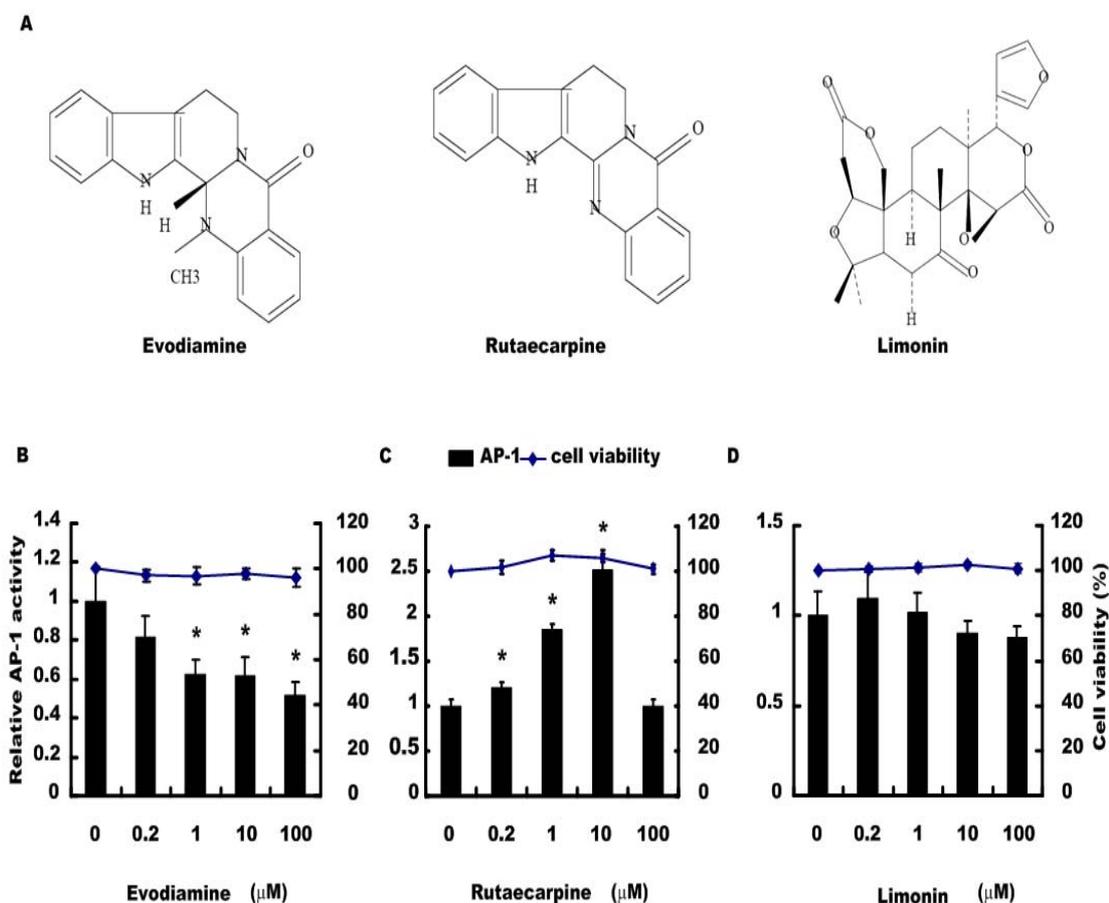


圖 4.2.3. 吳茱萸鹼、吳茱萸次鹼和檸檬苦素對肝細胞中 TPA 所引起的 AP-1 活化的效果

(A) 本研究所使用化合物的結構式。Chang/AP-1 細胞株先以圖示濃度的吳茱萸鹼先處理 1 小時。(B)，吳茱萸次鹼 (C)，或檸檬苦素 (D)，然後再以 20 ng/mL TPA 處理。採三重複的平均值 \pm 標準差。與只以 TPA 處理控制組比較時，* $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。

4.2.4. 吳茱萸鹼經 ERKs 路徑抑制肝細胞轉形暨 TPA 引起的 AP-1 活化

為確認吳茱萸鹼的抗腫瘤效果，使用細胞 anchorage-independent assay 法分析。圖 4.2.4A.，吳茱萸鹼以劑量反應減少群落產生。吳茱萸鹼在 Chang/AP-1 cells 抑制 TPA 引起的細胞群落產生的 EC₅₀ 值是 8.2 μM。所以吳茱萸鹼可抑制 TPA 誘發的人類肝細胞活體外的轉形。此外，反應細胞外訊息而調整 AP-1 表現，與三種 MAP kinase cascades 有關，包括 ERKs、JNK 和 p38 pathways¹⁶²。因此必須了解吳茱萸鹼抑制那一條個路徑。使用西方墨點法分析(western blotting)分析肝細胞的 MAP kinase proteins 和個別的磷酸化形態(活化)(圖 4.2.4B.)。TPA 處理後引起 ERKs、p38 和 JNK 的磷酸化。然而，吳茱萸鹼明顯減少 TPA 誘發的 ERK kinases 磷酸化；輕微抑制 p38 的磷酸化；JNK 的磷酸化則沒有影響。結果指出吳茱萸鹼的標的是 ERKs，透過 ERKs 可阻斷肝細胞內 TPA 誘發的 AP-1 活化。

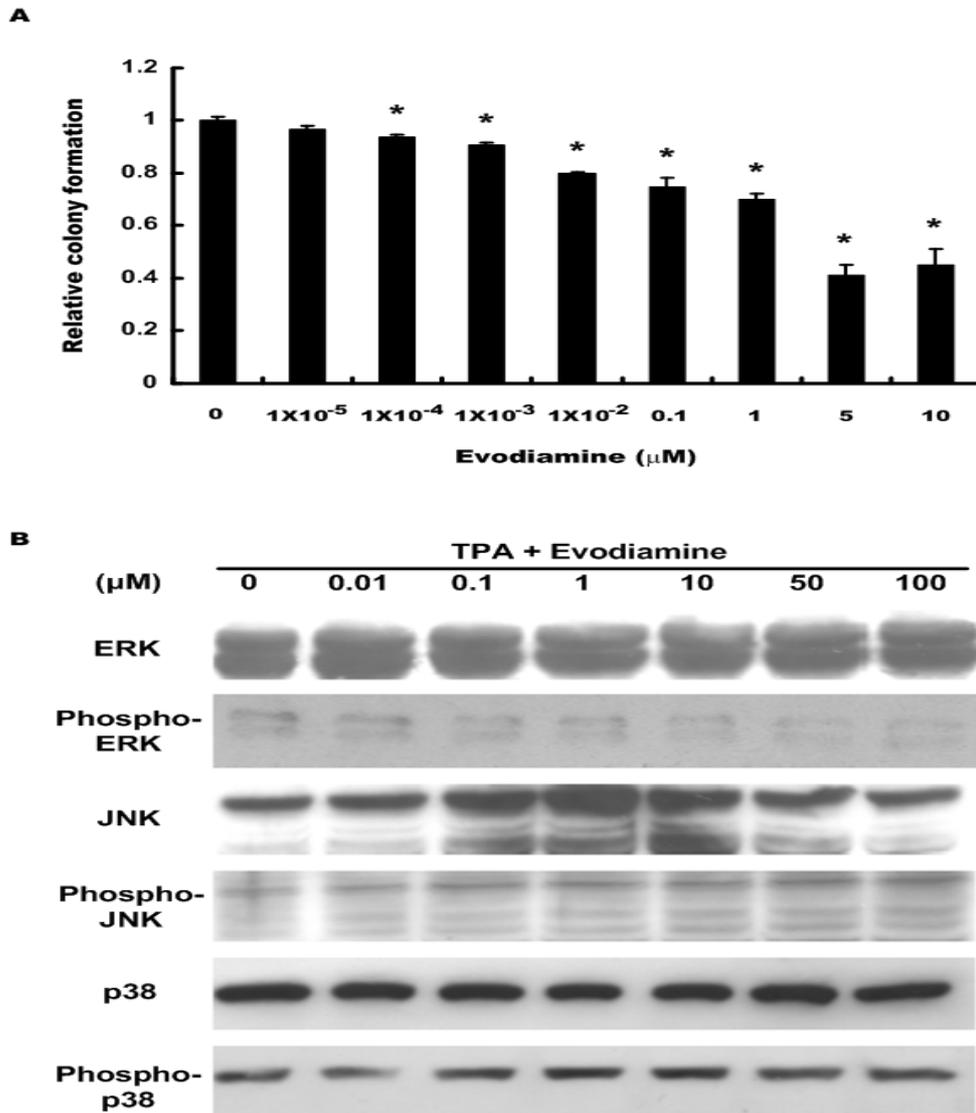


圖 4.2.4. 吳茱萸鹼在 TPA 誘發的細胞群落生成與 MAP kinase 活化的效果

(A) Anchorage-independent transformation, Chang/AP-1 細胞株以 20 ng/mL TPA 和圖所示之吳茱萸濃度處理，採三重複的平均值 ± 標準差。與只以 TPA 處理控制組比較時，* $p < 0.05$ 表有統計上的顯著差異。(B) 西方墨點分析，Chang/AP-1 細胞株以含 0.1% 胎牛血清的 DMEM 培養 24 小時，再以 20 ng/mL TPA 與各濃度的吳茱萸鹼培養 30 分鐘。重複實驗三次且選具代表性的照片。

第五章討論

第一節左金丸抑制肝癌細胞轉形之效應

中醫藥是越來越受人們重視與喜愛，是眾多替代醫學中非常重要的一支，應用在人體健康的維護以超過三千年，累積大量的臨床成果，惜其機轉與現代研究未能有效結合，影響力仍以亞洲地區為主。所以如何將過去的臨床經驗轉化成現代研究，讓更多的研究人員投入中醫藥的研究，是推廣中醫藥的重要方向。例如：過去的研究中，應用小柴胡湯在肝腫瘤兼有腹水的病人，特別是沒有 B 型肝炎表面抗原的病人¹⁶³。輔助療法應用中藥處方 MSSM-002 在治療過敏性氣喘¹⁶⁴。白虎湯原用在治療糖尿病病人，研究顯示可強化 3T3-L1 脂肪細胞經胰島素刺激的葡萄糖攝取乃透過 peroxisome proliferator-activated receptors- γ 訊息傳遞路徑¹⁶⁵。左金丸，屬於傳統的中醫藥處方，過去都用來治療腸胃病及肝病^{72, 74, 133}。本研究左金丸用在抗肝腫瘤的化學治療效果。研究結果顯示：左金丸可在肝母細胞瘤細胞株 HepG2 阻止 TPA 所誘發的 AP-1 和 NF- κ B 活性、細胞的 anchorage-independent cellular growth，且呈劑量反應。結果提示左金丸可以抑制肝癌細胞轉形。從過去研究發現 AP-1 的轉活化 (transactivation) 對 tumor promotion 是必需；阻斷 tumor promoter 上 AP-1 的活性，可抑制腫瘤轉形^{37, 40, 66}。NF- κ B 可以調控參與發炎反應 (inflammatory responses) 的基因表現¹⁶⁶。另外在細胞凋亡 (apoptosis)、血管新生 (angiogenesis)、細胞增殖 (cell proliferation) 及細胞轉形 (cellular transformation) 都可偵測到 NF- κ B 的活化，顯示 NF- κ B 是發炎與癌症重要聯結^{15, 50, 167}。因此有效對抗肝癌癌症形成的策略可透過抑制 AP-1 和/或 NF- κ B 活性。進一步的研究需分析左金丸可治療抗肝細胞腫瘤成份活性化物。我們的發現指出小蘗鹼與吳茱萸鹼分別屬於黃連與吳茱萸的主要生物鹼成份，可阻斷 AP-1 和/或 NF- κ B，又可以抑制肝癌細胞的 anchorage-independent growth 方式。吳茱萸鹼

與小蘗鹼皆屬於多樣性的藥物(pleiotropic agents)；如：促細胞凋亡(apoptotic)、抗分化(anti-differential)、抗增生(anti-proliferative)等特點^{168, 169}。同時也有治療中樞神經系統疾病的作用^{170, 171}。在此我們發現兩種藥物同時有效地減少 AP-1 活化、影響肝癌細胞的轉形，且都呈現劑量反應。

第二節 吳茱萸抑制肝癌細胞轉形之機轉

吳茱萸應用在消化道疾病與肝病已超過千年^{72, 74, 113, 182, 183}。先前的研究指出吳茱萸及其主要成份吳茱萸鹼(EVO)和吳茱萸次鹼可有效抑制 IgE 誘發的過敏性疾病，如：異位性皮膚炎和鼻炎¹⁷²。吳茱萸的乙醇萃取物對脂多醣(lipopolysaccharide)引起小膠質細胞的一氧化氮合成增加與一氧化氮合成酶的活性上升¹⁷³。然而，沒有直接證據顯示吳茱萸及吳茱萸鹼與抗腫瘤或者抗細胞轉形間的關聯性。本部份研究是第一次提出吳茱萸的甲醇萃取物可以經抑制 AP-1 轉錄活化，阻斷 TPA 誘發的人類肝細胞轉形。此外，吳茱萸的活性有效化物：吳茱萸鹼亦能隨著濃度的上升增加抑制 ERKs 路徑而達到阻斷 AP-1 活性的效果。AP-1 是關鍵的轉錄因素，可調控多種生物性功能；諸如：細胞增殖、分化、細胞凋亡及癌細胞轉形¹⁷⁴。之前的研究曾提出 AP-1 的轉活化(transactivation)對 tumor promotion 是必需；阻斷 tumor promotor 上 AP-1 的活性，可抑制腫瘤轉形¹⁶。本部份的研究指出經吳茱萸的甲醇萃取物處理後，TPA 引起 AP-1 活性上升與肝細胞的轉形都會減少。既然 TPA 引起 AP-1 活化與細胞的轉形可被吳茱萸的甲醇萃取物所抑制，那麼吳茱萸的活性組成份；吳茱萸鹼、吳茱萸次鹼及檸檬苦素(limonin)¹⁷⁵最有可能為有效成份。結果發現，吳茱萸鹼可抑制 TPA 引起 AP-1 活化，並呈劑量反應；而吳茱萸次鹼隨濃度上升先活化 AP-1，當濃度到達 100 μ M 降到 basal level。由於吳茱萸鹼與吳茱萸次鹼在 TPA 誘發 AP-1 活化上展現相反的效果，我們推測吳茱萸鹼才是主要吳茱萸的抗腫瘤效果的主要活性藥物，因為兩者的效果雷同。過去的研究指出吳茱萸鹼、吳茱萸次鹼及檸檬苦素具有抗

腫瘤、抗發炎、抗過敏、及抗血管新生的效果¹⁷⁴⁻¹⁷⁶。但是這些化合物都沒有發現與 AP-1 活性的關聯性。本研究揭諸吳茱萸鹼可抑制 AP-1 活性，且呈劑量反應，是吳茱萸主要的生物活性化合物，而非吳茱萸次鹼或檸檬苦素。Ogasawara 等，曾提出吳茱萸鹼比吳茱萸次鹼有更強的 antimigratory 活性¹⁷⁷。另外，吳茱萸鹼可抑制細胞增殖與 invasion^[178]。比較結構與功能的關係發現：在 N-14 上甲基及組態上 C-13 β 的氫可能是吳茱萸鹼具抑制活性的原因。

AP-1 活性的調控主要經 MAP kinase 途徑，包括 ERKs、p38 及 JNK。在人類的肝腫瘤發現，MAP kinase 表現明顯上升，顯示 MAP kinase 對於肝腫瘤的形成與維持可能是重要^{49, 179}。另外觀察人類的乳癌細胞也發現致癌基因所調控的 MAP kinase 活化經由 p27 失控，歸功於抗雌激素阻力；抑制 MAP kinase 活性可以恢復 p27 的抑制作用及雌激素的靈敏度^[180]。我們的結果指出吳茱萸鹼抑制 ERKs 磷酸化，但不是 JNK 或 p38 kinase。細胞群落的形成分析也被吳茱萸鹼所阻斷。因此，抑制 ERKs 磷酸化是可能是吳茱萸鹼調控的機轉，有助於抑制 TPA 引起的 AP-1 活性及細胞轉形。

吳茱萸鹼是傳統中藥吳茱萸中的主要生物鹼之一，除具有抗炎、降低血糖等作用外，還具有抗腫瘤活性。研究發現，吳茱萸鹼一方面能抑制腫瘤細胞生長，引起細胞週期阻滯於 G2/M 期或 G0/G1 期，並改變細胞週期相關蛋白的表達；另一方面能通過多條信號通路，如依賴於 caspase、凋亡誘導因子(AIF)或通過 κ B(NF- κ B)、p38 MAPK/ERK 等通路誘導細胞凋亡、壞死，從而提高腫瘤細胞的死亡率⁶。此外，吳茱萸鹼還能在體外抑制腫瘤細胞合成血管內皮生長因數(VEGF)以及與血管生成相關的多種酶的活化，從而抑制血管生成，並且在體內體外抑制腫瘤細胞的浸潤和轉移¹⁸¹。

第六章結論

第一節結論

本篇研究的結果可以圖 6.1.表示，此研究首次揭諸左金丸與其組成(黃連、吳茱萸)、及有效成份(小蘗鹼、吳茱萸鹼)可有效抑制 AP-1 和/或 NF- κ B 轉譯活化達到抑制肝細胞的轉形作用，也沒引起細胞毒殺作用，以上的發現提示：左金丸及其組成份具有治療肝細胞 tumor promotion 的潛力藥物，特別是吳茱萸鹼不僅對肝癌母細胞株有效，對一般的肝細胞的癌化作用效果亦佳，是屬於強力有效的人類肝癌化療試劑候選藥物之一。

第二節未來展望

左金丸及其成份活性化合物，比較吳茱萸鹼的作用機轉與現已使用或正進行臨床試驗的標靶藥物(表. 1.3.)，都可作用於抑制表皮生長因子受器 (EGFR)、又可阻斷 Ras/MAPK 訊息傳遞路徑，導致肝癌細胞的死亡。加上從左金丸的典籍回顧發現早在宋朝即用在治療濕熱，所以左金丸可以應用在腹水等症狀有其合理性，從近期的動物實驗中，也發現左金丸具有活體內抗肝癌的效果，現今原發性肝癌對國人健康與日俱增，因此左金丸、黃連、吳茱萸及其成份化合物吳茱萸鹼及小蘗鹼都具有應用在治療肝癌的潛力與前景。

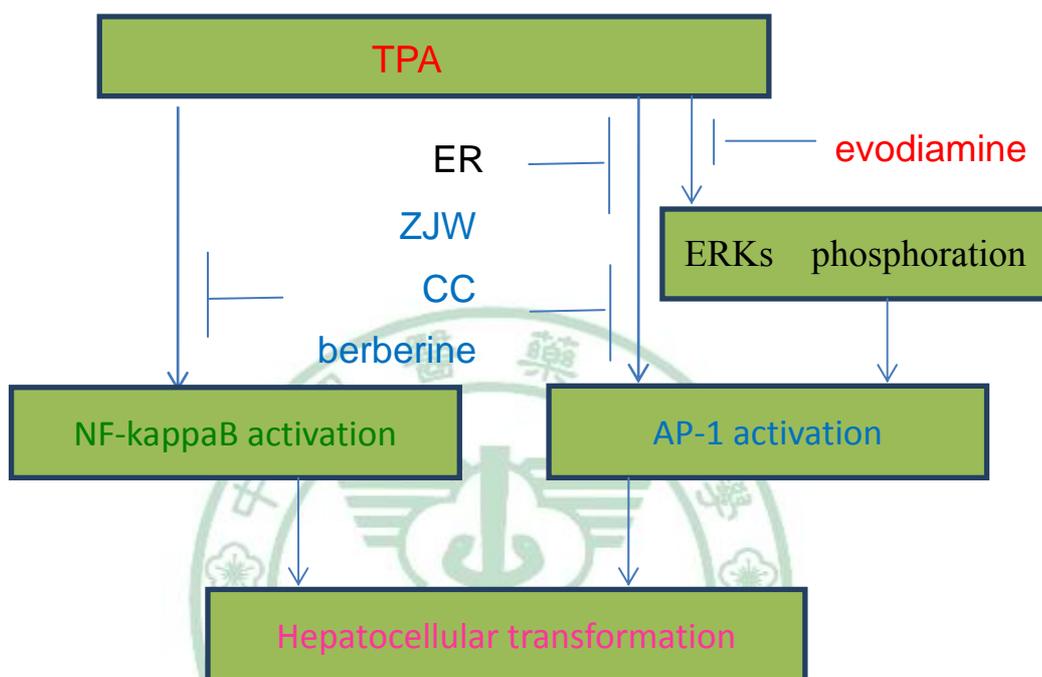


圖 6.1. 左金丸及其成份化物抑制肝細胞轉形的作用機轉

附錄

歷代在文獻上對左金丸或左金法(組成相同，但比例不同)等方劑的論述，摘錄如附表一：

附表 1:依年代順序討論文獻上對左金丸的論述

方名、出處與年代	主治條文	組成及服法
茱萸丸 ¹⁸² 太平聖惠方 西元 992 年	治水瀉不止	吳茱萸(二兩，湯浸七遍，焙乾微炒)、黃連(二兩去鬚微炒)上件藥，搗羅為末。用軟飯和丸。如梧桐子大。每服。不計時候。以粥飲下三十九
甘露散 ¹⁸³ 《聖濟總錄》 西元 1111 年	治暑氣	黃連(去鬚銼一兩)吳茱萸(半兩)上二味。同炒，以茱萸黑色為度，放地上出火毒，不用茱萸，將黃連搗羅為細散，每服半錢匕，食后茶清或新水調下
腸風久血方 ¹¹³ 《仁齋直指》 南宋楊士瀛	腸風久血	吳茱萸(淨半兩，盪七次，炒過)、黃連(去鬚七錢)，為末陳米糊丸桐子大每服五十圓陳米飲下食前服
黃連丸、茱萸丸 ¹⁴⁰ 《是齋百一選方》 西元 1196 年	治赤白痢	吳茱萸(揀淨)、黃連(去鬚并蘆，切骰子大)上等分，一處以好酒浸透，取出，各自揀，焙或晒乾，為細末，糊丸如梧桐子大(註一)

<p>固腸丸¹⁴⁰ 《是齋百一選方》 西元 1196 年</p>	<p>治臟腑滑泄，晝夜無度。</p>	<p>吳茱萸（揀淨）、黃連（去鬚）、罌粟殼（炙，去穰蒂）上三味等分為末，醋糊丸，如梧桐子大，每服三十丸，米飲下，空心食前服</p>
<p>左金丸¹³³ 《丹溪心法》 西元 1450 年</p>	<p>治肝火，凡火盛者，不可驟用寒涼藥，必用溫散</p>	<p>黃連(六兩)、吳茱萸(一兩或半兩)</p>
<p>左金丸⁷² 《丹溪治法心要》 西元 1450 年</p>	<p>治肝火，凡火盛者，不可驟用寒涼藥，必用溫散</p>	<p>黃連(二兩)、吳茱萸(一兩)</p>
<p>左金丸¹⁸⁴ 《丹溪心法》西元 1450 年</p>	<p>有火盛者，當伐肝木，左金丸治肝火，有氣鬱而胸脅痛者，看其脈沉澀，當作鬱治 脅下有食積一條扛起</p>	<p>用吳茱萸、炒黃連</p>
<p>回令丸¹⁸⁵ 《丹溪心法·卷五·秘方一百》 西元 1450 年</p>	<p>瀉肝火，行濕為之反佐，開痞結，治肝邪，可助補脾藥。</p>	<p>黃連（六兩）、茱萸（一兩）上為末，粥丸</p>
<p>左金丸^[185] 《丹溪心法·卷</p>	<p>治肺火</p>	<p>黃連（六兩）、茱萸（一兩或半兩），水丸，白湯下</p>

<p>五·秘方一百》 西元 1450 年</p>		
<p>變通丸¹⁸⁶ 《奇效良方》 西元 1471</p>	<p>治赤白痢，臍腹痛，日夜無度，膿血相雜，裏急後重，及腸風下血(註二)</p>	<p>吳茱萸、黃連等份，一方去鬚，半寸截，同炒熱分為兩處，同炒香，揀出各自為末，粟米飯丸梧桐子大，另收。每服三十丸</p>
<p>左金丸¹⁸⁷ 《明醫雜著·卷之六·附方》 西元 1502 年</p>	<p>治肝火脅肋刺痛，或發寒熱，或頭目作痛，泄瀉，淋秘，一切肝火之症，並皆治之</p>	<p>黃連（六兩）、吳茱萸（一兩，湯煮片時用）</p>
<p>左金丸¹⁸⁸ 《醫學正傳·卷之四·脅痛》 西元 1515 年</p>	<p>瀉肝火行濕，為熱甚之反佐。(註三)</p>	<p>黃連（六錢）、吳茱萸（一錢），上為細末，湯浸蒸餅為丸，如綠豆大，每服三、五十丸，淡薑湯下</p>
<p>左金丸¹⁸⁹ 《女科撮要·卷上·附方並註》 西元 1529 年</p>	<p>肝火胸脅刺痛，或發寒熱，或頭目作痛，小便淋秘，或小腹疼痛，一切肝火之症(註四)</p>	<p>黃連（六兩）、吳茱萸（一兩，湯煮片時用）上為末，粥丸，白朮、陳皮煎湯下</p>
<p>左金丸^{190]} 《古今醫統大全·卷之第五十七·脅痛門·藥方》</p>	<p>左金丸：瀉肝火，行濕，為熱甚之反佐(註五)</p>	<p>黃連（六錢）、吳茱萸（一錢），上為末，湯浸蒸餅丸，綠豆大。每服三十丸，滾薑湯下</p>

西元 1554 年		
左金丸 ¹⁹¹ (古今醫統大全·卷之二十火證門藥方)	治肝火	
左金丸 ¹⁹² 《古今醫統大全·卷之二十六·鬱證門治法》。 西元 1554 年	肝鬱者，兩脅微膨，或時刺痛，噯氣連連有聲者是也	黃連（六錢）、吳茱萸（一錢），上為末，湯浸蒸餅丸，綠豆大。每服三十丸，滾薑湯下
左金丸 ¹⁹³ 《本草綱目·草部第十三卷·草之二》 西元 1578 年	時珍曰：黃連，治目及痢為要藥	古方治痢：變通丸，用黃連、茱萸；治肝火，用黃連、茱萸
左金丸 ¹⁴³ 《醫方考》·左金丸 西元 1584 年	肝臟火實，左脅作痛者，此方主之。左，肝也。左金者，謂金令行左而肝平也。黃連乃瀉心之物，瀉去心火，不得乘其肺金，則清肅之令左行，而肝有所制矣	黃連（六兩，炒）、吳茱萸（一兩，湯泡），二共為末作丸。吳茱萸味辛熱而氣臊，臊則入肝，辛熱則疏利，乃用之以為反佐。經曰：佐以所利，和以所宜。此之謂也

<p>左金丸¹⁴⁴ 《醫方考·卷二·咳嗽門第十七左金丸》 西元 1584 年</p>	<p>肝熱左脅痛，咳嗽，此方主之。 左金者，黃連瀉去心火，則肺金無畏，得以行金令于左以平肝。吳茱萸氣臊味辛性熱，故用之以為反佐。此方君一臣一，制小其服者，肝邪未盛也</p>	<p>黃連（六兩）、吳茱萸（一兩，湯泡）</p>
<p>左金丸¹⁹⁴ 《簡明醫彙·卷五·脅痛》 西元 1629 年</p>	<p>瀉肝火行濕，為熱甚之反佐(註六)</p>	<p>黃連（六錢）、吳茱萸（一錢）上為末，湯浸蒸餅，丸綠豆大。每服三十丸，滾薑湯送下</p>
<p>左金丸¹⁹⁵ 《景岳全書卷之五十七字集古方八陣寒陣》 西元 1636 年</p>	<p>治肝火脅肋刺痛，或發寒熱，或頭目作痛，淋秘、泄瀉，一切肝火等證(註七)</p>	<p>黃連（六兩，炒）、吳茱萸（一兩，湯泡片時，炮乾用），上為末，粥丸，梧子大。白朮、陳皮煎湯下三、四、五十九</p>
<p>丹溪左金丸¹⁴⁵ 《祖劑》 西元 1640 年</p>	<p>薛立齋用白朮陳皮湯下，治肝火脅肋刺痛，或發寒熱，或頭目作痛，泄瀉淋秘一切肝又之症皆效(註八)</p>	<p>用黃連六兩、茱萸一兩同炒為末，神曲和為丸，如梧子大。每服三四十丸白湯下</p>

<p>左金丸¹⁹⁶ 《醫燈續焰·卷五·火病脈證·第四十九附方》 西元 1652 年</p>	<p>治肝火脅肋刺痛，或發寒熱，或頭目作痛(註九)，或大便不實、小便淋秘，或小腹疼痛。一切肝火之證，以此主治</p>	<p>黃連(六兩)、吳茱萸(一兩，湯煮片時用)上為末，粥丸。白朮、陳皮煎湯下</p>
<p>左金丸¹⁹⁷ 《症治匯補·卷之五·胸膈門·嘔吐》 西元 1687 年</p>	<p>治肝火上逆嘔吐</p>	<p>黃連、吳茱萸(各等分)，末之</p>
<p>左金丸¹⁹⁸ 《醫宗己任編·卷一·二十五方主證》 西元 1725 年</p>	<p>治肝膽鬱火。胸脅痛不可忍。酒濕發黃。每食吞酸吐酸。如醋浸心。酸水嚙口中齒不可合者</p>	<p>黃連、茱萸。為末粥丸。白朮陳皮湯下</p>
<p>左金丸¹⁹⁹ 《金匱翼·卷四·脹滿統論·肝脹》 西元 1768 年</p>	<p>其症口苦，脈弦，脅及小腹脹滿或痛，發則身熱氣逆是也</p>	<p>黃連(六兩)、吳茱萸(一兩)，粥為丸，椒目大，每服三十丸，白湯下</p>
<p>左金丸²⁰⁰ 《重訂通俗傷寒論·第九章·傷寒夾證·第八</p>	<p>專治肝火鬱結、脅肋攻痛、吞酸吐沫、疝氣痞結</p>	<p>川連六兩、吳茱萸一兩、研細、水法丸、每服一錢、開水送下</p>

節》 西元 1776 年		
左金丸 ²⁰¹ 《銀海指南·卷三·湯丸備要》 西元 1807 年	治肝膽鬱火，左脅作痛，或胸脅痛不可忍，吞酸吐酸，筋疝痞結，酒濕發黃。亦治噤口痢，湯藥入口即吐	黃連（六兩，薑汁炒）、吳茱萸（一兩，鹽水泡）水丸
左金丸 ²⁰² 《醫學實在易·卷七·哮喘證吞酸》 西元 1808 年	怒動肝火，逆於中焦，其症口苦脈弦，脅及小腹胀滿，或痛發則身熱氣逆是也	黃連（六兩）、吳茱萸（一兩）粥為丸，椒目大，每服三十九，白湯下
左金丸 ²⁰³ 《筆花醫鏡·卷二·臟腑證治肝部》 西元 1824 年	治肝氣痛	川黃連（一錢）、吳茱萸（七分）
變通丸 ²⁰⁴ 《本草述鈞元·卷七》 西元 1842 年	治赤白下痢日夜無度。及腸風下血	用川黃連去毛。吳萸湯泡過。各二兩。同炒香揀出。各為末。以粟米飯和丸。梧子大。水收。每服三十九
左金丸 ²⁰⁵ 《類證治裁》 西元 1851 年	吞酸、平肝、肝火	黃連（六兩薑汁炒）、吳茱萸（鹽水泡一兩）水丸
左金丸 ²⁰⁶	平肝木，木平則	吳茱萸、炒連，即左金丸，黃連清

<p>《醫學舉要·卷三·雜症合論》 西元 1879 年</p>	<p>不生心火，火不刑金而金能制木，不直伐木而佐金以制木，此左金所以得名也</p>	<p>心火，吳茱萸氣燥，肝氣亦燥，同氣相求</p>
<p>左金丸²⁰⁷ 《血證論·卷八》 西元 1884 年</p>	<p>病左脅痛。及嘔酸苦者。肝火也。以金平木。清火生金</p>	<p>吳茱萸（一錢）、川黃連（六錢）</p>
<p>左金丸²⁰⁸ 《血證論·卷二·嘔血》 西元 1884 年</p>	<p>嘔酸是濕熱。嘔苦是相火，膽寄相火，膽汁苦，故相火之味，能變胃津使苦</p>	<p>吳茱萸（一錢）、川黃連（六錢）</p>
<p>左金丸²⁰⁹ 《霍亂燃犀說·卷上·列方》 西元 1888 年</p>	<p>（丹溪）治霍亂轉筋，火邪內熾</p>	<p>黃連、吳茱萸為末，米飲為丸，如梧子大，每服三錢，以陳木瓜五錢煎湯下</p>
<p>反左金丸²¹⁰ 《施今墨藥對》 西元 1996 年</p>	<p>主治胃寒證</p>	<p>黃連 1 兩、吳茱萸 6 兩</p>

註一：赤痢，用黃連丸三十粒，甘草湯下；白痢，用茱萸丸三十粒，乾薑湯下；赤白痢，各用十五粒相合，并以甘草乾薑湯下。此方浙西何山純老以傳，蘇韜光云，數十年救人無數，人多求方，不敢輕授，恐以其藥品之微而忽之。韜光每以救人，甚效。洪氏方亦有修制湯使，

少異。

註二：描述近似《百一選方》。

註三：描述與《丹溪心法·卷五·秘方一百》相似。

註四：描述與《明醫雜著·卷之六·附方》同。

註五：描述與《丹溪心法·卷五·秘方一百》雷同。

註六：描述同於《丹溪心法·卷五·秘方一百》。

註七：文同於《明醫雜著·卷之六·附方》。

註八：描述宗《明醫雜著·卷之六·附方》與丹溪心法同。

註九：描述與《明醫雜著·卷之六·附方》同。

附方 1. 中滿分消湯（利濕之劑）

治中滿寒脹寒疝，二便不通，四肢厥冷，食入反出，腹中寒，心下痞，下虛陰躁，奔豚不收

〔組成〕乾薑、生薑、草薢仁、吳茱萸、畢澄茄、川烏、益智仁、黃連、黃蘗、茯苓、澤瀉、半夏、木香、柴胡、升麻、人參、黃耆、麻黃、當歸、青皮、厚朴

附方 2. 喬三余方-陰陽攻積丸

不拘食積、痰積、水積、瘀積、虫積，

〔組成〕吳茱萸、炮乾薑、官桂、炒川烏、薑汁炒川連、薑半夏、浙茯苓、炒延胡、人參各一兩，上沉香，真琥珀各五錢，巴豆霜一錢，為末，皂角四兩煎汁糊丸，綠豆大，每服八分，加至錢半，淡薑湯下。最有效力。

參考文獻

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisanil Paola. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2): 74-108.
2. Rampone B, Schiavone B, Martino A, Viviano C, Confuorto G. Current management strategy of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(26): 3210-3216.
3. Livraghi T, Makisalo H, Line PD. Treatment options in hepatocellular carcinoma today. *Scand J Surg,* 2011. 100(1): 22-29.
4. 行政院衛生署，98年主要死因統計. 2010.
http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_p01.aspx?class_no=25&level_no=1&doc_no=76013
5. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132(7): 2557-2576.
6. Shen YC, Hsu C, Cheng AL. Molecular targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *J Gastroenterol.* 2010;45(8): 794-807.
7. Wild CP, Montesano R. A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Lett.* 2009; 286(1): 22-28.
8. Lei HY, Chang CP. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J Biomed Sci.* 2009;16:10.
9. Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Paterlini-Brechot P. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol.* 2000; 10(3): 211-231.

10. Ni YH, Huang L M, Chang MH, Yen CJ, Lu CY, You SL, Kao JH, Lin YC, Chen HL, Hsu HY, Chen DS. Two decades of universal hepatitis B vaccination in taiwan: impact and implication for future strategies. *Gastroenterol.* 2007;132(4): 1287-1293.
11. McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP. Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. *Arch Intern Med.* 1990;150(5): 1051-1054.
12. Thomas MB, Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol.* 2005;23(13): 2892-2899.
13. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol.* 2002;155(4): 323-331.
14. 王伯祥主編：中醫肝膽病學，中國中醫藥科技出版社，北京 1993；pp. 170-218, 261-263, 300-323.
15. Keating GM , Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs.* 2009;69(2): 223-240.
16. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(10): 3129-3140.
17. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006;66(24): 11851-11858.

18. Li Z, Xu M, Xing S, Ho WT, Ishii T, Li Q, Fu X, Zhao ZJ. Erlotinib effectively inhibits JAK2V617F activity and polycythemia vera cell growth. *J Biol Chem.* 2007;282(6): 3428-3432.
19. Landriscina M, Piscazzi A, Fabiano A, Maddalena F, Costantino E, Farese A, Bufo P, Cignarelli M. Targeting epidermal growth factor receptor 1 signaling in human thyroid-stimulating hormone-independent thyroid carcinoma FRO cells results in a more chemosensitive and less angiogenic phenotype. *Thyroid.* 2009;19(6): 629-637.
20. Sun W, Sohal D, Haller DG, Mykulowycz K, Rosen M, Soulen MC, Caparro M, Teitelbaum UR, Giantonio B, O'Dwyer PJ, Shaked A, Reddy R, Olthoff K. Phase 2 trial of bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin in treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2011;117(14):3187-3192.
21. Yuan R, Kay A, Berg WJ, Lebwohl D. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2009; 2: 45.
22. Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Miyoshi E, Noda K, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Taniguchi N, Monden M. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology.* 1999; 30(1): 90-99.
23. Kidner T, Dai M, Adusumilli PS, Fong Y. Advances in experimental and translational research in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am.*2008;17(2): 377-379, ix.
24. Comunale MA, Rodemich-Betesh L, Hafner J, Wang M, Norton P,

- Di Bisceglie AM, Block T, Mehta A. Linkage specific fucosylation of alpha-1-antitrypsin in liver cirrhosis and cancer patients: implications for a biomarker of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 5(8): e12419.
25. Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, Chen H, Clark-Garvey S, Weinberg A, Mandeli J, Christos P, Mazumdar M, Popa E, Brown RSJr, Rafii S, Schwartz JD. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008; 26(18): 2992-2998.
26. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J*. 2002; 16(9): 935-942.
27. Lim SG, Mohammed R, Yuen MF, Kao JH. Prevention of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 24(8): 1352-1357.
28. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med*. 1997; 336(26): 1855-1859.
29. Hopfner M, Schuppan D, Scherubl H. Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14(1): 1-14.
30. Zerhouni EA. US biomedical research: basic, translational, and clinical sciences. *JAMA*. 2005; 294(11): 1352-1358.

31. Brown K, Balmain A. Transgenic mice and squamous multistage skin carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1995; 14(2): 113-124.
32. Boutwell RK. Model systems for defining initiation, promotion, and progression of skin neoplasms. *Prog Clin Biol Res.* 1989; 298: 3-15.
33. Bickers DR, Lowy DR. Carcinogenesis: a fifty-year historical perspective. *J Invest Dermatol.* 1989;92(4 Suppl): 121S-131S.
34. Trosko JE. Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? *Mol Carcinog.* 2001;30(3): 131-137.
35. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1072(2-3): 129-157.
36. Hsiang CY, Wu SL, Ho TY. Activation of activator protein 1 and extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular transformation. *Tumour Biol.* 2004;25(5-6): 313-320.
37. Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, Vousden KH, Colburn NH. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene.* 1998; 16(21): 2711-2721.
38. Domann FE, Levy JP, Birrer MJ, Bowden GT, Stable expression of a c-JUN deletion mutant in two malignant mouse epidermal cell lines blocks tumor formation in nude mice. *Cell Growth Differ.* 1994; 5(1): 9-16.
39. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 1987; 49(6): 729-739.

40. Dong Z, Birrer MJ, Watts RG, Matrisian LM, Colburn NH. Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2): 609-613.
41. Alani R, Brown P, Binetruy B, Dosaka H, Rosenberg RK, Angel P, Karin M, Birrer MJ. The transactivating domain of the c-Jun proto-oncoprotein is required for cotransformation of rat embryo cells. *Mol Cell Biol*. 1991;11(12): 6286-6295.
42. Huang C, Ma WY, Dong Z, Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor-induced AP-1 transactivation and transformation in JB6 P+ cells. *Mol Cell Biol*. 1996;16(11): 6427-6435.
43. Strickland PT. Photocarcinogenesis by near-ultraviolet [68] radiation in Sencar mice. *J Invest Dermatol*. 1986; 87(2): 272-275.
44. Staberg B, Wulf HC, Klemp P, Poulsen T, Brodthagen H. The carcinogenic effect of UVA irradiation. *J Invest Dermatol*. 1983; 81(6): 517-519.
45. Dong, Z, Crawford HC, Lavrovsky V, Taub D, Watts R, Matrisian LM, Colburn NH. A dominant negative mutant of jun blocking 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion in mouse keratinocytes. *Mol Carcinog*. 1997;19(3): 204-212.
46. Huang C, Ma WY, Dawson MI, Rincon M, Flavell RA, Dong Z, Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11): 5826-5830.
47. Li JJ, Dong Z, Dawson MI, Colburn NH. Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress

- AP-1 without transactivating retinoic acid response element.
Cancer Res. 1996;56(3): 483-489.
48. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell. 1990;62(6): 1189-1204.
49. Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 1997;236(1): 54-58.
50. Tai DI, Tsai SL, Chang YH, Huang SN, Chen TC, Chang KS, Liaw YF. Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma. Cancer. 2000;89(11): 2274-2281.
51. Aggarwal BB, Totpal K, LaPushin R, Chaturvedi MM, Pereira-Smith OM, Smith JR. Diminished responsiveness of senescent normal human fibroblasts to TNF-dependent proliferation and interleukin production is not due to its effect on the receptors or on the activation of a nuclear factor NF-kappa B. Exp Cell Res. 1995;218(1): 381-388.
52. Sawai H, Okazaki T, Yamamoto H, Okano H, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Ishikura H, Umehara H. Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. J Biol Chem. 1995;270(45): 27326-27331.
53. Huang C, Ma WY, Young MR, Colburn N, Dong Z, Shortage of mitogen-activated protein kinase is responsible for resistance to AP-1 transactivation and transformation in mouse JB6 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(1): 156-161.
54. Franklin CC, Kraft AS, Constitutively active MAP kinase kinase (MEK1) stimulates SAP kinase and c-Jun transcriptional activity in

- U937 human leukemic cells. *Oncogene*. 1995;11(11): 2365-2374.
55. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell*. 1995; 82(5): 721-732.
56. Dumont JA, Bitonti AJ, Wallace CD, Baumann RJ, Cashman EA, Cross-Doersen DE. Progression of MCF-7 breast cancer cells to antiestrogen-resistant phenotype is accompanied by elevated levels of AP-1 DNA-binding activity. *Cell Growth Differ*. 1996;7(3): 351-359.
57. Young MR, Li JJ, Rincon M, Flavell RA, Sathyanarayana BK, Hunziker R, Colburn N. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(17): 9827-9832.
58. Chen N, Nomura M, She QB, Ma WY, Bode AM, Wang L, Flavell RA, Dong Z. Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res*. 2001;61(10): 3908-3912.
59. Liu G, Bode A, Ma WY, Sang S, Ho CT, Dong Z. Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line. *Cancer Res.*, 2001. 61(15): p. 5749-5756.
60. Cheng WY, Hsiang CY, Bau DT, Chen JC, Shen WS, Li CC, Lo HY, Wu SL, Chiang SY, Ho TY. Microarray analysis of vanillin-regulated gene expression profile in human hepatocarcinoma cells. *Pharmacol Res*. 2007; 56(6): 474-482.
61. Hsiang CY, Lai IL, Chao DC, Ho TY. Differential regulation of activator protein 1 activity by glycyrrhizin. *Life Sci*. 2002;70(14): 1643-1656.

62. Lamb RF, Hennigan RF, Turnbull K, Katsanakis KD, MacKenzie ED, Birnie GD, Ozanne BW. AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol.* 1997;17(2): 963-976.
63. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem.* 1996;271(23): 13422-13429.
64. Arsura M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2005;229(2): 157-169.
65. Sato Y, Kato J, Takimoto R, Takada K, Kawano Y, Miyanishi K, Kobune M, Takayama T, Matunaga T, Y Niitsu. Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut.* 2006; 55(12): 1801-1808.
66. Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001; 20(19): 2401-2412.
67. Karin M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog.* 2006;45(6): 355-361.
68. Liu P, Kimmoun E, Legrand A, Sauvanet A, Degott C, Lardeux B, Bernuau D. Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol.* 2002;37(1): 63-71.
69. Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS. Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem.* 2004; 279(42): 43479-43486.
70. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ,

- Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004;118(3): 285-296.
71. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004;431(7007): 461-466.
72. 元·朱震亨：丹溪治法心要，人民衛生出版社，2001；pp. 586.
73. 沈祥春、張貴林、任光友：左金丸總生物鹼對胃腸功能的影響。中藥藥理與臨床 2006；06: 34-36.
74. 國家藥典委員會編：中華人民共和國藥典，化學工業出版社，北京 2005;1: pp. 412-413.
75. 龔艷青、文彬：左金丸對大腸癌 APC 表達及 DNA 甲基轉移酶活性的影響。南昌大學學報(醫學版) 2010;(12): 46-49.
76. 孫麗群、胡運蓮、譚大琦、薑楠：加味左金丸治療大鼠慢性萎縮性胃炎癌前病變的病理研究。湖北中醫雜誌 2005;(03): 11-13.
77. 文彬、熊旻利、戴偉怡、梁齊桁、劉玲、陳蔚文：左金丸及反左金丸對實驗性大腸癌不同時期甲基轉移酶表達的影響。世界華人消化雜誌 2009;(20): 2074-2078.
78. 文彬、黃秋凌、龔艷青、陳蔚文：左金丸及其主要單體成分對大腸癌的干預作用。世界華人消化雜誌 2009;(19): 1936-1941.
79. Chiou WF, Liao JF, Chen CF. Comparative study of the vasodilatory effects of three quinazoline alkaloids isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J Nat Prod*. 1996; 59(4): 374-378.
80. Xu SB, Huang YM, Lau CN, Wat CK, Kong YC. Hypotensive effect of dehydroevodiamine from *Evodiae Fructus*. *Am J Chin Med*. 1982;10: 75-85.
81. Chiou WF, Chou CJ, Liao JF, Sham AY, Chen CF. The mechanism

- of the vasodilator effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Eur J Pharmacol*. 1994; 257(1-2): 59-66.
82. Chen CF, Chen SM, Lin MT, Chow SY. In vivo and in vitro studies on the mechanism of cardiovascular effects of Wu-Chu-Yu (*Evodiae fructus*). *Am J Chin Med*. 1981; 9(1): 39-47.
83. Chiou WF, Chou CJ, Shum AY, Chen CF. The vasorelaxant effect of evodiamine in rat isolated mesenteric arteries: mode of action. *Eur J Pharmacol*. 1992; 215(2-3): 277-283.
84. Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Inhibitory effects of evodiamine on in vitro invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2001; 24(8): 917-920.
85. Wu CL, Hung CR, Chang FY, Lin LC, Pau KY, Wang PS. Effects of evodiamine on gastrointestinal motility in male rats. *Eur J Pharmacol*. 2002; 457(2-3): 169-176.
86. Zhang Y, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(1): 83-89.
87. Ueng YF, Wang JJ, Lin LC, Park SS, CF Chen. Induction of cytochrome P450-dependent monooxygenase in mouse liver and kidney by rutaecarpine, an alkaloid of the herbal drug *Evodia rutaecarpa*. *Life Sci*. 2001; 70(2): 207-217.
88. Ueng YF, Ko HC, Chen CF, Wang JJ, Chen KT. Modulation of drug-metabolizing enzymes by extracts of a herbal medicine *Evodia rutaecarpa* in C57BL/6J mice. *Life Sci*. 2002;71(11): 1267-1277.
89. Sheu JR, Kan YC, Hung WC, Su CH, Lin CH, Lee YM, Yen MH. The antiplatelet activity of rutaecarpine, an alkaloid isolated from

- Evodia rutaecarpa, is mediated through inhibition of phospholipase C. *Thromb Res.* 1998;92(2): 53-64.
90. Sheu JR, Hung WC, Lee YM, Yen MH, Mechanism of inhibition of platelet aggregation by rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Eur J Pharmacol.* 1996;318(2-3): 469-475.
 91. 吳命選、郭明欣、陳立奇、陳介甫、柯漢傑：中藥吳茱萸炮製後之含量分析研究。《臨床生藥學》1999; 99(25): 114-118.
 92. 吳泰賢：以 AP-1 為標的開發肝細胞轉形藥物，中國醫藥大學醫學研究所碩士論文，台中 2002；pp. 23, 29.
 93. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；1：pp.87-89.
 94. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；1：pp.70.
 95. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；2：pp.743-744.
 96. 清·石壽棠撰、王新華點注：醫原，江蘇科技出版社，江蘇 1983；pp. 8-9.
 97. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 381.
 98. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；1：pp. 280, 285-286.
 99. 明·陽繼洲原著、黑龍江祖國醫藥研究所校釋：針灸大成校釋，人民衛生出版社，北京 1995；pp. 360
 100. 清·唐笠山纂輯：吳醫匯講，上海科技出版社，上海 1983；pp. 40.
 101. 清·姚止庵撰：素問經注節解，人民衛生出版社，北京 1963；pp. 335.

102. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975； pp. 757-758.
103. 明·張介賓：類經，中國中醫藥出版社，北京 1997； pp. 381
104. 清·吳達著：醫學求是，江蘇科學技術出版社，江蘇 1984； pp. 13.
105. 清·趙晴初著：廣輯存存齋醫話稿，引自近代中醫珍本集，浙江科學技術出版社，杭州 1994； pp. 179.
106. 清·張景熹：鵠塘醫話，引自中國醫學大成，上海科學技術出版社，上海 1990； 39：15-16
107. 清·黃元御著：四聖心源，引自黃元御醫學全書，中國中醫藥出版社，北京 1999； pp. 789-790
108. 彭子益·李可主校：圓運動的古中醫學，中國中醫藥出版社，北京 2007； pp. 11.
109. 元·滑壽：難經本義，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975； 5: pp. 3125.
110. 元·滑壽：難經本義，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975； 5: pp. 3116.
111. 清·何夢瑤輯：醫碯，上海科學技術出版社，蘇州，1982； pp. 113-115.
112. 宋·東軒居士增注，衛濟寶書，引自文淵閣四庫全書電子版，迪志文化出版公司，香港 2002； pp. 1-41.
113. 南宋·楊士瀛撰、明·朱崇正附遺，仁齋直指外四種，上海古籍出版社，上海 1991； pp. 423-466
114. 明·李時珍：本草綱目，中國醫藥研究所，台北 1988； 3： pp. 145-147
115. 清·吳儀洛：成方切用，上海科學技術出版社，上海 1958； 4： pp. 152

116. 漢·張仲景著：金匱要略，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；5：pp. 3352
117. 清·陳士鐸：辨證錄，人民衛生出版社，北京 1989；13:pp. 100, 267, 442, 769-770.
118. 清·張秉成：成方便讀，啟業出版社，台北 1981；pp.104.
119. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 1004.
120. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 686-687.
121. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 1458.
122. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 510.
123. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 247-248.
124. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 164.
125. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 213.
126. 宋·林億校正：黃帝靈樞經，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp.1283.
127. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 418.
128. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 488.
129. 宋·林億校正：黃帝內經素問，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；pp. 677.

130. 宋·林億校正：黃帝靈樞經，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975； pp.1181.
131. 清·王旭高，褚玄仁校注：王旭高醫學遺書六種，學苑出版社，北京 1996； pp. 107-110.
132. 清·林珮琴：類證治裁，旋風出版社，台北 1978；1：pp. 185-192.
133. 元·朱震亨：丹溪心法，引自丹溪醫集，人民衛生出版社，2001：pp. 159-160.
134. 馬光亞：中醫如何診治肝病，九思出版社，台北 1998：pp. 69.
135. 馬光亞：中醫如何診治肝病，九思出版社，台北，1998：pp. 173.
136. 谷言方、張天文、牛煜、谷雨整理：谷銘三治療腫瘤經驗集，上海科學技術出版社，上海 2002；pp. 113-124.
137. 清·張璐著：張氏醫通，上海科學技術出版社，上海 1963；pp. 483
138. 漢·張仲景著：金匱要略，引自醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；5：pp. 3255.
139. 黃泰康總編、謝文光主編，中醫配方學，中國中醫藥科技出版社，北京 2000；pp. 93-99.
140. 宋·王璆原撰：是齋百一選方，新文豐出版公司，台北 1987；pp. 188-189.
141. 清·尤怡：金匱翼，中國中醫藥出版社，北京 1996；pp. 176-177.
142. 清·汪訥庵：醫方集解，天津科學技術出版社，天津 1997；pp. 237.
143. 明·吳昆：醫方考，引自吳昆醫學全書，中國中醫藥出版社，北京 1999；pp. 39.
144. 明·吳昆：醫方考，引自吳昆醫學全書，中國中醫藥出版社，北京 1999；pp. 60.
145. 明·施沛：祖劑·附雲起堂診籍，人民衛生出版社，北京 1987；

pp.199-200.

146. 清·林珮琴：類證治裁，旋風出版社，台北 1970: p. 200.
147. 清·王燕昌：王氏醫存·古方用藥之妙，江蘇科學技術出版社，江蘇 1983；pp.
148. 陳修園著：神農本草經讀，引自陳修園醫書七十二種，文化圖書公司，台北 1996；pp. 10.
149. 元·李杲；明·李中梓註，珍珠囊補遺藥性賦·引自雷公炮製藥性賦解，復漢出版社，台南 1974；pp. 36-37.
150. 陳修園著：神農本草經讀，引自陳修園醫書七十二種，文化圖書公司，台北 1996；1：pp. 59.
151. 明·李時珍著：本草綱目，國立中國醫藥研究所，台北 1976: pp. 1064-1065.
152. 清·汪訥庵：醫方集解，天津科學技術出版社，天津 1997; pp. 205.
153. 明·李中梓：醫宗必讀，中國中醫藥出版社，北京 1997: pp. 253.
154. 林昭庚主編：中西醫病名對照大辭典，中國醫藥研究所，台北 2004；pp. 1333-1361.
155. Hsiang CY, Wu SL, Cheng SE, and Ho TY. Acetaldehyde-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha production is inhibited by berberine through nuclear factor-kappaB signaling pathway in HepG2 cells. *J Biomed Sci.* 2005; 12(5): 791-801.
156. Fukazawa H, Mizuno S, Uehara Y. A microplate assay for quantitation of anchorage-independent growth of transformed cells. *Anal Biochem.* 1995; 228(1): 83-90.
157. Taylor IC, Kingston RE. Factor substitution in a human HSP70 gene promoter: TATA-dependent and TATA-independent interactions. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(1): 165-175.
158. Southern PJ, Berg P. Transformation of mammalian cells to

- antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet.* 1982; 1(4): 327-341.
159. Shoji N, Umeyama A, Takemoto T, Kajiwara A, Ohizumi Y. Isolation of evodiamine, a powerful cardiogenic principle, from *Evodia rutaecarpa* Benth (Rutaceae). *J Pharm Sci.* 1986; 75(6): 612-613.
160. Chi CW, Chang YF, Chao TW, Chiang SH, P'Eng FK, Lui WY, Liu TY. Flowcytometric analysis of the effect of berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* 1994; 54(26): 2099-2107.
161. Shin SI, Freedman VH, Risser R, Pollack R. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(11): 4435-4439.
162. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001; 20(19): 2390-2400.
163. Oka H, Yamamoto S, Kuroki T, Harihara S, Marumo T, Kim SR, Monna T, Kobayashi K, Tango T. Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to (TJ-9). *Cancer.* 1995; 76(5): 743-749.
164. Li XM, Huang CK, Zhang TF, Teper AA, Srivastava K, Schofield BH, Sampson HA. The chinese herbal medicine formula MSSM-002 suppresses allergic airway hyperreactivity and modulates TH1/TH2 responses in a murine model of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106(4): 660-668.
165. Chen CC, Hsiang CY, Chiang AN, Lo HY, Li CI. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation-mediated

- potentiation of glucose uptake by Bai-Hu-Tang. *J Ethnopharmacol.* 2008; 118(1): 46-50.
166. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986; 47(6): 921-928
167. Giannelli G, Antonaci S. Novel concepts in hepatocellular carcinoma: from molecular research to clinical practice. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40(9): 842-846.
168. Jiang J, Hu C. Evodiamine: a novel anti-cancer alkaloid from *Evodia rutaecarpa*. *Molecules.* 2009; 14(5): 1852-1859.
169. Sun Y, Xun K, Wang Y, Chen X. A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs. *Anticancer Drugs.* 2009; 20(9): 757-769.
170. Kulkarni SK, Dhir A. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res.* 2010; 24(3): 317-324.
171. Yuan SM, Gao K, Wang DM, Quan XZ, Liu JN, Ma CM, Qin C, Zhang LF. Evodiamine improves cognitive abilities in SAMP8 and APP(swe)/PS1(DeltaE9) transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(3):295-302.
172. Shin YW, Bae EA, Cai XF, Lee JJ, Kim DH. In vitro and in vivo anti-allergic effect of the fructus of *Evodia rutaecarpa* and its constituents. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(1): 197-199.
173. Ko HC, Wang YH, Liou KT, Chen CM, Chen CH, Wang WY, Chang S, Hou YC, Chen KT, Chen CF, Shen YC. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *Eur J Pharmacol.* 2007; 555(2-3): 211-217.

174. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9(2): 240-246.
175. Matsuda H, Yoshikawa M, Iinuma M, Kubo M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*. *Planta Med.* 1998; 64(4): 339-342.
176. Shyu KG, Lin S, Lee CC, Chen E, Lin LC, Wang BW, Tsai SC. Evodiamine inhibits in vitro angiogenesis: Implication for antitumorigenicity. *Life Sci.* 2006; 78(19): 2234-2243.
177. Ogasawara M, Matsunaga T, Takahashi S, Saiki I, Suzuki H. Anti-invasive and metastatic activities of evodiamine. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(11): 1491-1493.
178. Ogasawara M, Suzuki H. Inhibition by evodiamine of hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of tumor cells. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27(4): 578-582.
179. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998; 74: 49-139.
180. Donovan JC, Milic A, Slingerland JM. Constitutive MEK/MAPK activation leads to p27(Kip1) deregulation and antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(44): 40888-40895.
181. 梁華平、張醇：吳茱萸鹼抗腫瘤活性研究進展。中國新藥雜誌 2010；19(17)：1558-1562.
182. 宋·王懷隱等編：太平聖惠方，新文豐出版公司，台北 1980；pp.5734.
183. 宋·曹孝忠編纂、元·焦惠重校：聖濟總錄，新文豐出版公司，台北 1978；34：pp. 324.
184. 元·朱震亨：丹溪心法，引自丹溪醫集，人民衛生出版社，北

- 京 2001；pp. 267.
185. 元·朱震亨：丹溪心法，引自丹溪醫集，人民衛生出版社，北京 2001；pp. 322.
186. 明·方賢：奇效良方，商務印書館，香港 1971；pp. 230-231.
187. 明·王綸：明醫雜著，江蘇科學技術出版社，江蘇 1995；pp. 206.
188. 明·虞搏：醫學正傳，新文豐出版公司，台北 1981；4：pp. 432.
189. 明·薛己：女科撮要，引自薛立齋醫學全書，中國中醫藥出版社，北京 1999；pp. 58.
190. 明·徐春甫撰：古今醫統大全，新文豐出版公司，台北 1978；pp. 3660.
191. 明·徐春甫撰：古今醫統大全，新文豐出版公司，台北 1978；pp. 1887
192. 明·徐春甫撰：古今醫統大全，新文豐出版公司，台北 1978；pp. 2188
193. 明·李時珍：本草綱目，國立中國醫藥研究所，台北 1976；pp. 447-452.
194. 明·孫志宏：簡明醫彙，人民衛生出版社，北京 1984；pp. 271.
195. 明·張介賓：景岳全書，台聯國風出版社，台北 1980；pp. 1190.
196. 清·潘楫著：醫燈續焰，中國中醫藥出版社，北京 1997；5：pp. 87
197. 清·李用粹編著、吳唯校注：症治匯補，中國中藥出版社，北京 1976；pp. 297.
198. 清·高鼓峰著：醫宗己任編，四明心法，上海科學技術出版社，上海 1959；pp. 22-23.
199. 清·尤怡：金匱翼，中國中醫藥出版社，北京 1996；pp. 113.
200. 清·俞根初：重訂通俗傷寒論，旋風出版社，台北 1971；pp. 357.
201. 清·顧錫著：銀海指南，新文豐出版公司，台北 1974；3：pp. 34.

202. 清·陳修園：醫學實在易，引自陳修園醫學七十二種，文化圖書公司，台北, 1996；7：pp. 131-132.
203. 清·江涵暉著：筆花醫鏡，兩儀出版社，台北 1969；pp. 30.
204. 清·楊時泰著，黃雄、崔曉豔編著：本草鉤元述釋義，山西科學技術出版社，太原 2009；pp. 162.
205. 清·林珮琴：類證治裁，旋風出版社，台北 1978；3：pp. 62, 187, 194, 196, 199, 200.
206. 清·徐玉台輯述：醫學舉要，五洲出版社，台北 1984；3: pp. 23.
207. 清·唐容川著：血證論，引自珍本醫書集成，浙江科學技術出版社，杭州 2003；5:pp.300.
208. 清·唐容川著：血證論，引自珍本醫書集成，浙江科學技術出版社，杭州 2003；5 :pp.167.
209. 清·許起：霍亂燃犀說，引自珍本醫書集成，浙江科學技術出版社，杭州 2003；pp. 12.
210. 呂景山：施今墨藥對，人民軍醫出版社，北京 1996: p. 131.

Study on the effect and mechanism of Zuo-Jin-Wan on the hepatocellular carcinoma

De-Cheng Chao

Advisor: Tin-Yun Ho

Graduate institute of Chinese medicine, China Medical University

PURPOSE:Zuo-Jin-Wan (ZJW) has been used to treat digestive diseases in Asia. This study was to determine whether ZJW and its components blocked activator protein 1 (AP-1) and/ or nuclear factor- κ B (NF- κ B) activities as well as tumor promotion in Chang liver cells and hepatoblastoma HepG2 cells.

METHODS AND MATERIALS:The Chang/AP-1 and HepG2/ AP-1 and HepG2/ NF- κ B cells were treated with the AP-1 and NF- κ B stimulator 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. And ZJW, *Coptis chinensis*, *Evodia rutaecarpa* and its components, berberine, evodiamine, rutaecarpine and limonin were analyzed in anchorage-independent growth of Chang liver or HepG2 cells.

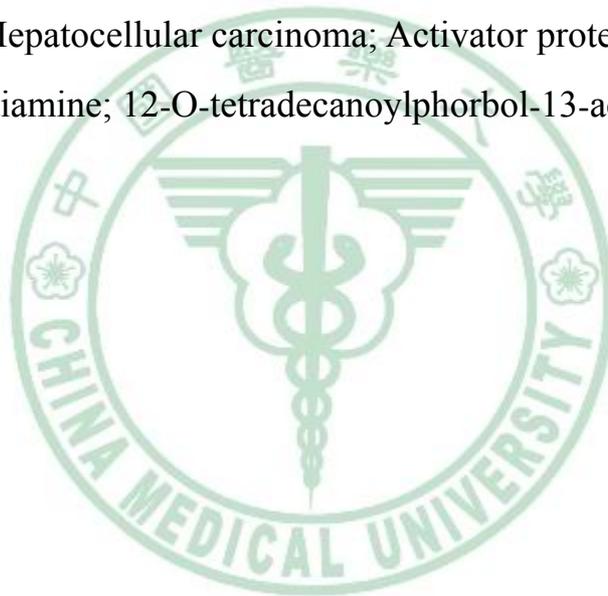
RESULTS:ZJW and its components, *Coptis chinensis* and *Evodia rutaecarpa*, inhibited AP-1 and/ or NF- κ B activities, and suppressed anchorage-independent growth of Chang liver and/ or HepG2 cells. The major alkaloidal ingredients, berberine and evodiamine, inhibited AP-1 activities and/or NF- κ B activation, and further suppressed hepatocellular transformation. Moreover, evodiamine significantly diminished the TPA-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases. These results suggested that evodiamine treatment suppressed the TPA-induced

AP-1 activity via the ERKs pathway.

CONCLUSION: ZJW, *Coptis chinensis*, *Evodia rutaecarpa*, berberine and evodiamine inhibited the AP-1 and/ or NF- κ B activity and cellular transformation in human hepatocytes, suggesting that ZJW and its active components were a potential agent for antitumor therapy.

Keywords:

Zuo-Jin-Wan; Hepatocellular carcinoma; Activator protein 1; Nuclear factor- κ B; evodiamine; 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; transformation



謝辭

三千多個日子，轉眼間如大江東去，一溜煙已不見蹤跡，留下的痕跡卻清晰可辨。對於科學研究的熱情依舊，經過歲月的磨練更見幾許的穩健，而做事的過程中更能拿捏孰輕孰重，分辨出輕重緩急，深刻的體會出知難行易的真諦，而學醫之路卻也因此豁達開闊，從形而下逐步朝形而上調整，從天地間的領悟，內化到省思自身的修練，本無二至，正是態度決定高度，一切的秘密都在易理中，所謂大道至簡，此之謂也乎。最感謝的是：我的恩師侯庭鏞博士寬大包容的方式，讓我在求學的過程中深深理解：面臨研究中可能的挑戰，能研擬最佳對策；在當今的瞬息萬變的研究環境，依然運籌為握、胸有成竹，並在有限經費發揮效果倍增的作用，點點滴滴都讓我受益良多，特別在關鍵時刻激勵我、終能完成學位，這些諄諄教誨都讓我感同身受，面對挫折，依然鬥志高昂；對未來充滿自信。

期間，深受劉俊昌主任對中醫的執著及治學態度所影響，乃得初窺中醫廟堂之美，才知成功絕無偶然，都是引領我繼續前進的標竿。執業初期，陳立德主任鼓勵進修，並期許後學努力使中醫的未來更美好，這些叮嚀與鞭策，讓我在研究時不忘將研究中融入中醫的精神，而深知求道學醫的過程並不孤單。此外，口試委員張永勳教授、項千芸教授、謝慶良教授、陳悅生教授、蔡金川教授、張世良教授，對論文中巨細彌遺的指正，都讓我獲益菲淺；而投稿過程中，林麗娟老師不辭辛勞的提點，功不可沒。另外實驗室的學弟妹：羿如、泰賢、家男、欣怡、書琴、奕瑾、欣宜，適時提供意見與幫忙都讓我的博士研究生涯增添不少甜美的回憶，人與人相處的溫馨與光明面，更是支持研究熱誠的最大助力。

三年前，因緣際會到美國芝加哥講授難治性疼痛的系統治療方法，頓悟醫療無國界，而全球有更多為疼痛所苦的人期待好的醫學出現，拯救受難的靈魂。臺下參與醫師的專注眼神；病患因痛消失的驚訝表

情，至今難忘。直到今日那種無言的心靈交會，還在心中激盪。這些都要感謝我的父母、內人及可愛的兒女們，無論在學習、研究、事業與家庭上，給予最大的支持與鼓勵，讓我無後顧之憂，勇往直前；另外謹以此論文紀念我的外祖母，在我口試後的一周，她老人家走完一百零三歲的精彩人生，其對生命及生活的豁達智慧，豐富我的人生，留給我無限的追思，正是昔人日已遠，典範在夙昔，但外祖母的敦厚樸實的精神會永遠傳承下去。

趙德澂謹誌於中醫所分子生物研究室

中華民國一百年七月一十八日

