



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

魚腥草對肺癌細胞之活性及作用機轉研究

Bioactivities and action mechanisms of *Hottuynia cordata* on lung cancer cells

指導教授：陳玉芳 副教授

研究生：張文鑫

中華民國九十八年七月

致謝

首先感謝成功大學 吳天賞教授，提供魚腥草生物鹼幫助我在實驗上完成作用機轉之初探，以及擔任口試委員，提供論文修正之寶貴意見。感謝蔡輝彥教授以及我的指導教授 陳玉芳老師，在實驗過程中的指導，給予批評與指教，讓這份碩士論文可以如期完成。

在研究所二年，有同窗好友鈺亭及俏媽咪郁玟學姐，跟我一起努力學習；學術指導兼朋友的宏柏學長，讓我討教實驗上的技術；學姐兼玩伴的易鮮、玟玲、姿秀、佳慈及助理靜怡，可以一起吃飯聊天；可愛聽話的延杰學弟及奕鈞學妹，減輕了我實驗上的負擔；還有亦師亦友的湯智昕老師與藥理科總管柯毅文大哥，謝謝你們陪我度過這些日子，使枯燥的生活增添許多色彩與笑聲。

從職場再回到學校進修，特別要感謝開明先進的永昌爸爸、春櫻媽媽，天真開朗的阿球爺爺，努力勤奮的文姿大姐，活潑美麗的惠娟大妹、淑娟小妹和彭熙帥弟弟，讓我順利完成學業而無後顧之憂。

目錄

圖目錄	IV
表目錄	IX
縮寫表	X
中文摘要	XII
英文摘要	XIV
第一章 緒論	
第一節 魚腥草之簡介	1
第二節 肺癌之簡介	5
第三節 細胞週期	14
第四節 研究動機	17
第二章 總論	
第一節 實驗材料及設備	19
第二節 實驗方法	24
一、小鼠足浮腫-抗發炎實驗	25
二、動物急性毒性測試 (LD50)	25
三、細胞存活測試 (MTT 與 PI 試劑分析)	25

四、細胞型態的觀察-----	27
五、細胞週期分析-----	27
六、Annexin V-FITC/PI 試劑雙染-----	29
七、西方墨點 (western blot) 分析-----	30
第三節 資料統計與分析-----	32

第三章 結果

第一節 魚腥草粗抽物之生理活性

一、魚腥草粗抽物抗發炎作用-----	33
二、魚腥草粗抽物對小鼠之急性毒性作用-----	33
三、魚腥草粗抽物對 A549 細胞或 LLC 細胞存活率的影響---	34
四、魚腥草粗抽物對 A549 細胞於形態學上的改變-----	34
五、魚腥草粗抽物對 A549 細胞之週期的影響-----	35
六、Annexin V-FITC/PI 試劑雙染呈現 A549 細胞死亡情況----	35
七、魚腥草粗抽物對 A549 細胞之週期相關及凋亡相關蛋白質 的影響-----	36

第二節 魚腥草所含生物鹼之生理活性

一、魚腥草所含生物鹼對 A549 細胞存活率的影響-----	58
--------------------------------	----

二、	魚腥草所含生物鹼對 A549 細胞之週期的影響-----	58
三、	魚腥草所含生物鹼對 A549 細胞之週期相關及凋亡相關蛋白質的影響-----	58
第四章	討論-----	70
第五章	結論-----	80
第六章	參考文獻-----	82



圖目錄

Fig.1. <i>Hottuynia cordata</i> T _{HUNB} (<i>Saururaceae</i> ; HC)	1
Fig.2. 歷年惡性腫瘤死亡人數占率趨勢圖	6
Fig.3. 96 年及 97 年台灣主要前十大死因及人數	6
Fig.4. 97 年台灣主要癌症死亡率	7
Fig.5. Cell cycle	15
Fig.6. The effect of <i>Hottuynia cordata</i> (HC) crude extract on carrageenan-induced paw edema in mice.	37
Fig.7. The acute toxicity of <i>Hottuynia cordata</i> (HC) crude extract in mice.	38
Fig.8. Effect of HC-crude extract on the cell viability of human lung carcinoma cells (A549) by MTT assay.	39
Fig.9. Effect of HC-crude extract on the cell viability of murine lung cancer cells (LLC). Cell viability was detected by MTT assay.	40
Fig.10. Effect of HC-crude extract on the cell viability of human lung carcinoma cells (A549) by Flow Cytometry.	41
Fig.11. Effect of HC-crude extract on the cell morphology of human lung carcinoma cells (A549).	42

Fig.12. Alternation of HC-crude extract on cell cycle distribution of A549 cells for 24h.-----43

Fig.13. Alternation of HC-crude extract on cell cycle distribution of A549 cells for 48h.-----44

Fig.14. Alternation of HC-crude extract on cell cycle distribution of A549 cells for 72h.-----45

Fig.15. Effects of HC-crude extract on the cell viability of A549 cells. A549 cells were treated with HC-crude extract and were stained with Annexin V conjugated FITC and PI. Cell viability was measured by using Flow Cytometer.-----46

Fig.16. Effect of HC-crude extract on the cell viability of A549 cells. A549 cells were treated with HC-crude extract for different time (A) 24h (B) 48h (C) 72h and were stained with Annexin V conjugated with FITC and PI.-----47

Fig.17. Suppression of CDKs and cyclins and up-regulation of p27, caspase 8, caspase 3 by HC-crude extract treatment. A549 cells were treated with various concentration of HC-crude extract for 48h.-----48

Fig.18. Suppression of cyclin D1 by HC-crude extract treatment on A549

cells for 48h by immunoblotting.-----	49
Fig.19. Suppression of cyclin E by HC-crude extract treatment on A549	
cells for 48h by immunoblotting.-----	50
Fig.20. Suppression of cyclin A by HC-crude extract treatment on A549	
cells for 48h by immunoblotting.-----	51
Fig.21. Suppression of CDK 4 by HC-crude extract treatment on A549	
cells for 48h by immunoblotting.-----	52
Fig.22. Suppression of CDK 6 by HC-crude extract treatment on A549	
cells for 48h by immunoblotting.-----	53
Fig.23. Suppression of CDK 2 by HC-crude extract treatment on A549	
cells for 48h by immunoblotting.-----	54
Fig.24. Up-regulation of caspase 8 by HC-crude extract treatment on	
A549 cells for 48h by immunoblotting.-----	55
Fig.25. Up-regulation of caspase 3 by HC-crude extract treatment on	
A549 cells for 48h by immunoblotting.-----	56
Fig.26. Up-regulation of p27 by HC-crude extract treatment on A549	
cells for 48h by immunoblotting.The blot of β -actin was used as	
loading control.-----	57
Fig. 27 Effect of aristolactam BII, aristolactam AII, piperolactam A,	

norcepharadione B and noraristolodione on the cell viability of human lung cancer cells (A549) for 24 h. Cell viability was detected by MTT assay.-----60

Fig.28. Effects of aristolactam BII on A549 cell cycle distribution. aristolactam BII treatment for 24h altered A549 cell cycle distribution and arrested at S/G2/M phase..-----61

Fig.29. Effects of aristolactam AII on A549 cell cycle distribution. aristolactam AII treatment for 24h altered A549 cell cycle distribution and arrested at S/G2/M phase.-----62

Fig.30. Effects of noraristolodione on A549 cell cycle distribution. Noraristolodione treatment for 24h altered A549 cell cycle distribution and arrested at S/G2/M phase.-----63

Fig.31. Suppression of CDKs, cyclins, Bcl-2 protein expression and up-regulation of apoptotic protein expression (caspase 3, caspase 8 and p21, p27, p53 and Bax) by aristolactam BII treatment. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam BII for 24h-----64

Fig.32. Suppression of CDKs, cyclins, Bcl-2 protein expression and up-regulation of apoptotic protein expression (caspase 3,

caspase 8 and p21, p27, p53 and Bax) by aristolactam AII treatment. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam AII for 24h. -----66

Fig.33. Suppression of CDKs, cyclins, Bcl-2 protein expression and up-regulation of apoptotic protein expression (caspase 3, caspase 8 and p21, p27, p53 and Bax) by noraristolodione treatment. A549 cells were treated with various concentration of noraristolodione for 24h. -----68

Fig.34. Cell cycle regulation and differentiation.-----74

Fig.35. The possible action and mechanism of *Hottuynia cordata*.-----78

Fig.36. Possible action site of *Hottuynia cordata* on cell apoptosis pathway. -----79

表目錄

Table 1. 台灣主要癌症死亡原因的統計-----	7
Table 2. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam BII for 24h and the expression of cell cycle-related and apoptosis proteins -----	65
Table 3. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam AII for 24h and the expression of cell cycle-related and apoptosis proteins-----	67
Table 4. A549 cells were treated with various concentration of noraristolodione for 24h and the expression of cell cycle-related and apoptosis proteins-----	69

縮寫表

A549	-----Human lung adenocarcinoma cell
AP	-----Ammonium persulfate
CDK	-----Cyclin dependent kinase
CDKI	-----Cyclin dependent kinase inhibitory protein
DMSO	-----Dimethyl sulphoxide
ECL	-----Enhanced chemiluminescence
EDTA	-----Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	-----Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	-----Fetal bovine serum
FACS	-----Fluorescence Activated Cell Sorting
HC	----- <i>Hottuynia cordata</i>
KIP	-----Kinase inhibitory protein
LLC	-----Lewis lung carcinoma cell (Murine)
LD50	-----50% Lethal Dose
MTT	-----3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
NE	-----Nitrocellulose membrane
PBS	-----Phosphate buffered saline

P/S-----Penicillin/Streptomycin

PI-----Propidium iodine

PVDF-----Polyvinylidene difluoride

SDS-PAGE--Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TEMED-----N-N-N'-N'-Tetramethylenediamine



摘要

肺癌於台灣居十大死亡癌症首位，除了現今的化學療法，中草藥之使用或許對肺癌有其參考價值。在台灣，魚腥草是一種很常用的中草藥，它被廣泛的應用在各類的疾病。回顧相關文獻記載：魚腥草具有許多作用，包括：抗發炎、抗氧化、抗病毒、免疫調節作用、抗急性呼吸窘迫症候群、抗菌和抗腫瘤活性。然而未見有文章陳述魚腥草對抗肺癌的作用，因此本研究目的在評估魚腥草抗肺癌之可能的作用與機轉。使用 ICR 品系的小鼠進行腳蹠浮腫實驗以評估魚腥草之抗發炎作用，並選用 2 株肺癌細胞 A549 和 LLC 細胞，進行有關魚腥草對肺癌細胞的存活率，對肺癌細胞形態的改變，對細胞週期之影響，以及造成肺癌細胞凋亡的作用探討；並分析魚腥草對細胞週期及細胞凋亡相關蛋白質之影響，以評估魚腥草對肺癌細胞之作用及其可能之機轉。

利用人類肺癌細胞株 A549 和小鼠肺癌細胞株 LLC 進行抗癌活性評估，結果發現魚腥草粗抽物具有抑制肺癌細胞活性之作用。由人類的肺癌細胞株 (A549) 之實驗結果得知：魚腥草的粗抽物會引起人類肺癌細胞 (A549) 細胞週期的停止，其作用可能是透過向下調節細胞週期中的 G1 期相關的蛋白質所致。又魚腥草含有數種生物鹼，以其

中對 A549 細胞較具抑制效果的 3 種 Aristolactam BII, Aristolactam AII 和 Noraristolodione 進行作用之分析，研究發現這些生物鹼 (Aristolactam BII, Aristolactam AII 和 Noraristolodione) 會使 A549 肺癌細胞之細胞週期在 S 或 G2/M 期產生蓄積作用，使相關的蛋白質向下調節。由本實驗結果可知，魚腥草粗萃取物及其所含生物鹼成分 Aristolactam BII, Aristolactam AII 和 Noraristolodione 對於人類非小細胞肺癌細胞株 A549 細胞的影響，主要是透過造成肺癌細胞週期生長停滯及誘導凋亡。



Abstract

Lung cancer is the leading cause among the top ten-cause of death in Taiwan. Besides the currently used chemotherapy, herbal medicine may play a role in the treatment of lung cancer. *Hottuynia cordata* THUNB (*Saururaceae*; HC), one of the frequently used herbal medicine in Taiwan, has been widely used in various diseases. Review from literatures, HC had many effects, including anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-viral, immunomodulatory, anti-SARS, anti-bacterial and anti-tumor activities. However, there is no literatures describe its effect on lung cancer. The aim of my present study is to evaluate the possible effect and action mechanism of HC on lung cancer. A549 and LLC lung cancer cell lines were used to evaluate the effects of HC on the cell viability and possible anti-tumor effects, and SD rats were used in anti-inflammation study.

The methods of experiment, including paw edema, cell viability, cell morphology, cell cycle, cell apoptosis and protein expression.

We used A549 and LLC cells in the evolution of anticancer activity, and found that HC-crude extract showed inhibitory effect on cell viability of A549 and LLC cells. In order to look into the possible potential and action mechanism of HC on human lung cancer, human lung cancer A549 cells were used. Results from our study, HC treatment causes cell cycle arrest of A549 cells. The inhibition of cell cycle might be via the down-regulating of G1 phase related protein levels such as cyclinD1, cyclinE, cyclinA, CDK4, CDK6, and CDK2. Additionally, HC causes A549 cell apoptosis via caspase-8 and P27 expression. The anti-tumor effect of HC-crude extract and active compounds (aristolactam BII, aristolactam AII and noraristolodione) on human lung carcinoma A549 cell line is via cell cycle arrest and late apoptosis.

第一章 緒論

第一節 魚腥草之簡介

一、魚腥草型態與分佈[1]



Fig.1 *Houttuynia cordata* T_{HUNB} (*Saururaceae*)

魚腥草為三白草科 (*Saururaceae*) 植物蕺菜屬 *Houttuynia cordata* T_{HUNB} (以下簡稱 HC) 的帶根全草，多年生腥臭草本。高 15~50cm，通常分佈於田埂、路旁及河邊潮濕地方，適應性廣、遍及全台灣，為台灣常用之民間藥用植物之一。別名有很多，如岑草《吳越春秋》，蕺《別錄》，菹菜《新修本草》…等，台灣稱臭臊草，大部份為栽培品，部份山區為野生狀。目前市售的魚腥草大多是以人工栽培方式供應，全草可供藥用，具有清熱、解毒、消腫、利尿、治水腫、

淋病、梅毒、尿道炎、子宮炎等效用；外敷治惡瘡、癬疥、痔瘡及溼疹等。

二、魚腥草的文獻考察

回顧魚腥草研究相關文獻，發現其具有下列作用：

1.抗發炎作用

魚腥草的水層粗抽物具有抗發炎活性，對於 RAW264.7 細胞株所產生發炎的前驅物質一氧化氮 (nitric oxide; NO) 和腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor alpha; TNF- α) 具有抑制作用 [2]；魚腥草注射液(HC injection) 可以抑制 carrageenan 所致大鼠肋膜炎及 xylene 造成小鼠耳朵水腫 [3]。

2.抗氧化作用

魚腥草中的多酚成分具抗氧化作用，如類黃酮成分可使患有糖尿病的病人因氧化壓力所產生的自由基分解 [2, 4]；魚腥草中的水層粗抽物對於藥物 bleomycin 氧化作用所引起的肺部纖維化具有保護作用 [5]。

3.抗病毒活性

對抗腸病毒 71 型，魚腥草可以減少病毒斑塊形成 (plaque

formation) 和減少病毒 RNA 合成,增加病毒凋亡作用 [6]; 還可以降低泡疹病毒 (HSV-2 型) 的複製作用,達到具抗病毒感染活性 [7]。

4.抗白血病作用

魚腥草熱水萃取物能有效的抑制人類的白血病細胞的生長[8]。

5.免疫調節與抗嚴重急性呼吸窘迫症候群 (SARS) 作用

魚腥草水層萃取物可刺激小鼠脾臟淋巴細胞而增生,藉增加臟淋巴細胞 IL-2 和 IL-10 的分泌作用,同時增加免疫系統的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 細胞; 在抗病毒方面是抑制 SARS-CoV 3C-like protease (3CLpro) 和 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [9]。

6.抗過敏反應

魚腥草水層粗抽物可以抑制 compound 48/80 所誘導小鼠全身性過敏反應,藉由肥大細胞的去顆粒化作用 (mast cell degranulation) 以及抑制大鼠週邊肥大細胞的組織胺釋放 (histamine release) 和鈣的再吸收 (calcium uptake) [10]。

7.抗菌作用

魚腥草的水層萃取物可以對抗在巨噬細胞 (RAW 264.7 cell) 內的沙門氏菌感染 [11]; 及抗葡萄球菌 [12]。

8.抗腫瘤活性

由甲醇萃取魚腥草所得的 6 種活性生物鹼:aristolactam B, piperolactam A, aristolactam A, norcepharadione B, cepharadione B and splendidine, 可以有效抑制 5 株人類癌細胞株: 非小細胞肺癌 (A549), 卵巢癌 (SK-OV-3), 黑色素瘤 (SK-MEL-2), 中樞神經系統癌細胞 (XF-498) 和結腸癌 (HCT-15) 的生長 [13], 但並未有作用機轉之探討。



第二節 肺癌之簡介

一、前言[14]

在台灣惡性腫瘤已經連續 27 年蟬聯十大死因之首，而且死亡人數逐年增加 (Fig.2)，至今續居國人十大死因之首 (Fig.3)，如何預防及有效地治療，以降低其發生率和死亡率，是目前醫學研究上重要的一門課題。

二、肺癌[14]

由行政院衛生署從 1997~2007 年的主要癌症死亡原因統計資料 (Table 1) 顯示，肺癌名列前茅,每年死亡的人數居高不下。大多數早期的肺癌患者沒有明顯症狀，故只有約 5~15%的人被早期發現，病人大多數是男性，男與女之比約為 4~8:1，患者年齡大多在 50 歲以上。致癌假說錯綜複雜，很難以單一因子來加以解釋，由研究得知吸菸是造成肺癌的最重要因子，抽菸的人比不抽菸的人發生肺癌的危險高達 20 倍，目前肺癌 5 年的存活率約 15%左右。最新各癌症粗死亡率排序，97 年十大主要癌症順位分別為 (Fig.4): (1) 肺癌 (2) 肝癌 (3) 結腸直腸癌 (4)

女性乳癌 (5) 胃癌(6) 口腔癌 (7) 攝護腺癌 (8) 子宮頸癌 (9) 食道癌
 (10) 胰臟癌，順位與去年(96年)相同。

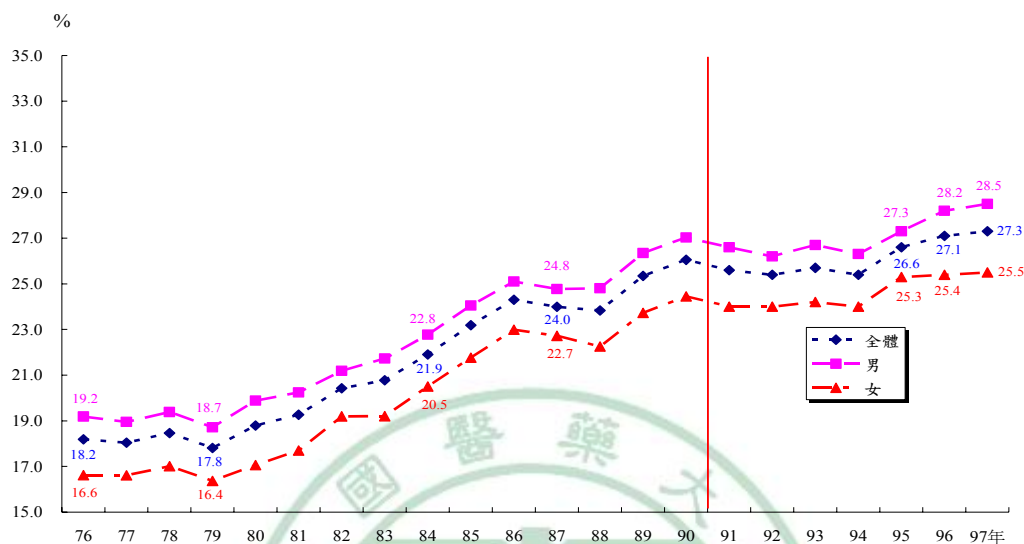


Fig.2. 歷年惡性腫瘤死亡人數占率趨勢圖

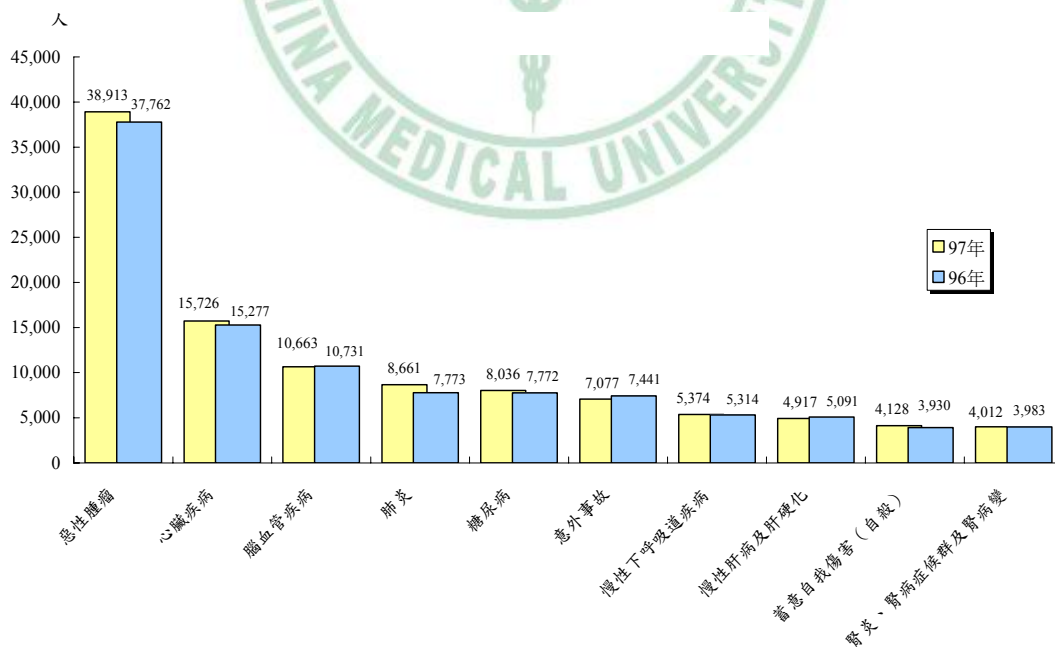


Fig.3. 96年及97年台灣主要前十大死因及人數

Table 1. 從 1997 至 2007 年台灣主要癌症死亡原因的統計

西元	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
當年死亡人數	119385	119116	121991	121181	126653	126936	12878	133679	138957	1350171	139376
癌症	29011 (24.3)	29260 (24.0)	29784 (23.8)	31554 (25.4)	32993 (26.1)	34342 (27.1)	35201 (27.1)	36357 (27.2)	37222 (26.8)	37998 (28.1)	40306 (28.9)
肺癌	5857 (20.2)	5749 (19.7)	5959 (20.0)	6261 (19.1)	6555 (19.9)	6846 (19.9)	6911 (19.6)	7153 (19.4)	7302 (19.6)	7479 (19.7)	7993 (19.8)
肝癌	5842 (20.0)	5865 (20.0)	5762 (19.4)	6001 (19.0)	6415 (19.4)	6943 (20.2)	7010 (19.9)	7059 (19.4)	7108 (19.1)	7415 (19.5)	7809 (19.4)
大腸癌	2855 (9.8)	2987 (10.2)	3128 (10.5)	3376 (10.7)	3457 (10.5)	3649 (10.6)	3711 (10.5)	3898 (10.7)	4111 (11.0)	4284 (11.3)	4470 (11.1)

[註 1] () : 死亡百分比 (%) [註 2] 暗色空格: 當年度表示在國內為十大癌症死亡原因第一名。



附註: 標準化死亡率係以W.H.O.2000年世界標準人口數為基準。

Fig.4.97 年台灣主要癌症死亡率

三、肺癌病因[15]

1. 抽菸[16]

- a. 每天吸煙 2 包達 20 年的男性，其罹患肺癌危險增加了 60-70 倍。
- b. 吸煙時間愈長，量愈大，開始吸煙的年齡愈小，發病率與死亡率愈高，其中吸煙時間長短比吸煙量多、少更為重要。
- c. 在肺癌發生以前停止吸菸，肺組織可以慢慢恢復正常。
- d. 吸菸者比起不吸菸者，有 30%的較大危險性會罹患肺癌。

2. 二手煙[17]

- a. 女性因吸入二手煙而罹患肺癌的風險高於男性(可高至 1.5 倍)。
- b. 不吸菸的人吸入吸菸者吐出的煙，會增加罹患肺癌的危險性。

3. 氫、石棉、二氯甲基醚、多環芳香煙、鉻、鎳及有機砷化合物等的致癌物。[18]

- a. 和石棉接觸的工人，有較高的危險性罹患肺癌。如果他們也吸煙，罹患肺癌的危險性更大為增加。

4. 空氣污染

5. 廚房油煙

6. 遺傳因素

7. 肺部感染後引起發炎的後遺症

- a. 肺結核與病毒 (HPV, ...) 感染

四、臨床徵狀[19]

1. 新生或持續不停的咳嗽 (cough) (三個禮拜以上)。
2. 持續性的胸部疼痛、肩膀痛或是背痛，通常深呼吸時情況更壞。
3. 痰的顏色改變或是痰中帶血或呈鏽色。
4. 哮鳴聲 (wheezing) / 呼吸會喘 / 呼吸困難 (shortness of bronchus) / 聲音嘶啞，特別是新發生的哮喘。
5. 不斷復發的肺炎 (recurrent pneumonia) 或是支氣管炎等重覆感染。
6. 不明原因的發燒 (罹輕度肺癌者也可能發生)。
7. 疲勞感 (fatigue)、食慾變差 (decreased appetite)、體重減輕 (weight loss)。
8. 當肺癌擴散到遠處器官時，可能引起：頭痛、骨頭痛、關節痛、手臂或腿的軟弱或麻木，暈眩，甚至腹痛。

五、肺癌的分類[20]

根據組織學類型肺癌的分類有兩大類型：

1. 小細胞肺癌 (Small Cell Lung Cancer, SCLC)

小細胞肺癌生長快速，易轉移擴散，對化療及放療敏感，但經治療緩解後，多數病例在兩年內復發，復發後有抗藥性。

2. 非小細胞肺癌 (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)

肺癌常見，占全部肺癌患者的 75%，相對於小細胞肺癌，非小細胞肺癌生長較緩，轉移也較慢，因此對化療及放療不敏感，多採用手術治療。根據腫瘤細胞的形態又分成要主要三種：

a. 肺腺癌 (Adenocarcinoma) :

約占非小細胞肺癌的 50%，占第一位。台灣最常見的肺癌，也是不抽菸 (女性和 45 歲以下的年輕人) 患者中最常見的類型。常常是在有遠處轉移之後才出現臨床症狀，多由血路轉移。包括支氣管肺泡細胞癌 (Bronchioalveolar carcinoma (BAC)) 。

b. 肺鱗癌 (Squamous cell cancer) :

約占非小細胞肺癌的 30%，占第二位。又稱表皮樣癌，常見於男性吸菸者，早期多為局部向外延伸的轉移，後期則經血路擴散。

c. 肺大細胞癌 (Large cell cancer) :

具有外表不正常且大的細胞。在台灣少見，生長速度較緩慢，會經由血路及淋巴擴散。

六、肺癌的分期：[20]

1. 小細胞肺癌：分為侷限期和擴散期。

- a. 侷限期：是指癌細胞僅在一邊胸部或兩側頸部的淋巴結。
- b. 擴散期：則是指癌細胞已跑到另一邊肺部或身體其他的器官。

2. 非小細胞肺癌：

- a. 第 1 期：癌細胞在肺部內,未有轉移。
- b. 第 2 期：癌細胞已轉移至肺部淋巴,但沒有轉移至身體其他器官。
- c. 第 3 期：癌細胞已轉移至另一側肺部的淋巴,但還沒有遠端器官或組織的轉移。
- d. 第 4 期：已有遠端器官組織的轉移如腦部、骨頭的轉移。

七、肺癌治療的方法[21, 22]

1. 手術治療：如果被診斷為第 1、2 期的病患，通常建議趕快開刀切除癌症部位，同時於手術後加上化療，以提高癌症治療的機會；如果是第 3 期的病患，可能會再手術前先做化學治療或放射性治療，用意為讓腫瘤縮小後再進行手術，可提高手術切除成功率。

2. 化學治療：主要是殺死癌細胞；因小細胞肺癌對化學治療藥物反應敏感，所以多採用此種治療方法。而非小細胞肺癌則用於無法手術切除的病患（第 3b、4 期患者），或有些病患在手術後，發現縱膈腔淋巴有腫瘤細胞存在時

使用，通常會使用一種以上的化學藥物來治療病人。

3. 放射線療法：俗稱放療或電療，它是用高能量放射線去殺死癌細胞；

用於手術前縮小癌細胞的範圍，或手術後預防癌細胞切除不完全，以降低腫瘤復發或轉移的機會；有時會與化學治療合併使用。

4. 免疫生物療法：目前的免疫學療法，仍在試驗性，主要作用為刺

激病患本身產生對癌細胞的抵抗力，進而減慢癌細胞生長或轉移的速度，目前使用的治療方法如：干擾素...等。

5. 症狀治療：於治療中或當癌症的侵犯造成身體疼痛時，會使用止痛劑來緩和疼痛情況。若有呼吸困難或咳嗽厲害，則

可用支氣管擴張劑或止咳劑來改善不舒服的症狀。

6. 雷射治療：當癌細胞會阻塞到呼吸道時，用雷射將癌細胞殺死，

以改善呼吸困難症狀，亦可用於止血（癌細胞所造成的出血），此種治療屬於緩解不舒服症狀的方法，只能治標不能治本。

通常治療方式非單一進行，有時會合併 2-3 種方法同時進行，為的是能使病患獲得最完整的治療。現今的治療以化療為主再加上標靶治療為輔助，可以更加提高治療的效果。

八、肺癌的預後[22]

一般說來，肺癌的預後通常是不好的，然而，科技不斷的進步，第三代化學藥物的發展，在臨床上已證實可延長病患預期的生命週期，甚至可達到完全消滅癌細胞，治癒癌症，雖然目前僅有少數的案例，仍為肺癌患者帶來無限的希望，儘管肺癌在早期診斷上確實有很大的困難度存在，仍期望在未來有更多藥物或治療方式的發展，能為肺癌患者帶來更好的預後。



第三節 細胞週期

一、前言[23]

細胞分裂週期又稱細胞週期 (cell cycle)，是一連串嚴謹有規律的步驟，細胞分裂的功能為生殖、生長與修補，完整的細胞分裂應包括一個很長的生長期 (間期，interphase)，所費時間為一個細胞週期中的 90%，在此期間，細胞會生長並複製染色體，作為有絲分裂前 (Mitosis, 含細胞質分裂) 的準備；真核細胞週期可分成五個時期，包括:G0、G1、S、G2、M期 (如 Fig.5 所示)。

G0 (Gap 0) phase:靜止期，細胞離開細胞週期且停止分裂。

G1 (Gap 1) phase:第一間期，細胞生長時期，此時細胞代謝活化，複製所需胞器以及一些細胞質的組成，以供下一阶段複製染色體使用。

S (Synthesis) phase:合成期，DNA 進行複製的時期。

G2 (Gap 2) phase:第二間期，此時細胞已具有兩倍的遺傳物質，並為有絲分裂期做準備。

M (Mitosis) phase:分裂期，進行核裂 (染色體分離) 和質裂 (細胞質分裂) 的階段。

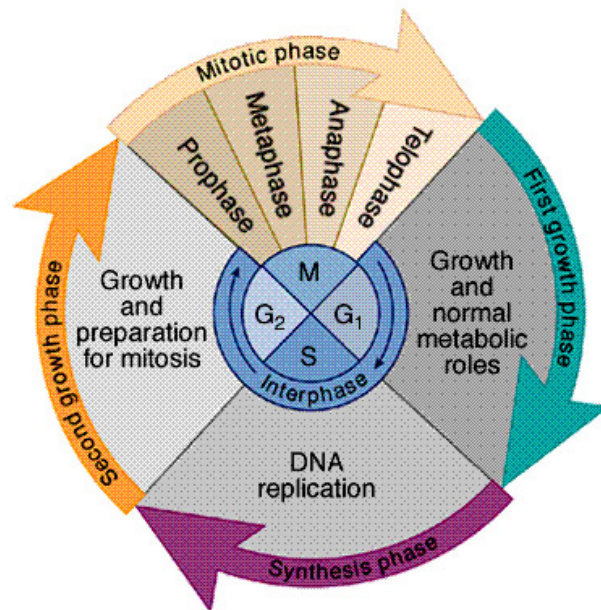


Fig.5. Cell cycle 出自: <https://eapbiofield.wikispaces.com/FRF+PR7>

二、細胞週期的調控[23]

細胞週期的進行可由不同的週期素 (Cyclin) 和週期素依賴性激酶 (Cyclin-dependent kinase; CDK) 結合形成複合物 (Cyclin /CDK complex) 來調控，種類有許多，但只有 Cyclin A、B、D、E 和 CDK 1、2、3、4、6 能夠參與細胞週期。

這些 Cyclins /CDKs 複合物的表現量會隨著細胞週期的進行有所變化，進而確認複合物於細胞週期調控的角色。如同 G₁ 期→S 期→G₂ 期→M 期的進行，在 G₁ 期會大量表現的 cyclin D/CDK4 & 6

漸漸地轉換成 Cyclin E/CDK 2，進入 S 期初步是由 Cyclin E/CDK 2 調控，大部分的 S 期由 Cyclin A/CDK 2 所控制的，另外進入 G2/M 期是由 Cyclin B/CDK 1 所調控。Cyclins /CDKs 複合物決定細胞何時進入下一個週期。

另外還有一種蛋白質，稱為週期素依賴性激酶抑制劑 (Cyclin-dependent kinase inhibitor; CDKI) 是細胞週期裡調控的蛋白質，而此蛋白質則會和上述兩者所形成的複合物結合，因而使週期素及週期素依賴性激酶分離造成細胞週期的停止。

癌細胞與一般正常細胞的最大差別是在於癌細胞能夠一直無限的增生，而這就是癌細胞的細胞週期 (cell cycle) 已經不受正常的調控最明顯的證據。如果能夠利用藥物去控制癌細胞的細胞週期，使癌細胞停止增生，甚至使癌細胞進程式性凋亡 (apoptosis)，那麼就能夠達到我們所預期的抗癌效果。

第四節 研究動機

傳統藥用植物於民間被廣泛地應用疾病上的治療，通常這些藥草都具多功能，例如分佈在台灣魚腥草就有清熱、解毒、消腫、利尿、治水腫、淋病、梅毒、尿道炎、子宮炎等效用；外敷治惡瘡、癬疥、痔瘡及溼疹等。然而治療上的作用機轉並不是很清楚，搜索一些研究文獻，報導魚腥草有抗氧化、抗發炎、抗病毒、抗白血病、免疫調節與抗嚴重急性呼吸窘迫症候群（SARS）作用、抗菌和抗腫瘤等作用。

根據政院衛生署公佈國人的健康狀況，一些與生活息息相關的疾病，像是抽煙喝酒、熬夜壓力、環境飲食所引起的肺癌、肝癌及大腸癌...等，其中肺癌在台灣死亡率居高不下，對生命一直威脅巨大，而魚腥草在抗腫瘤的研究報告對肺癌部份研究著墨不多，所以我們研究目標是找出魚腥草用在肺癌上的作用機轉，期許未來它能成為化學治療以外的另一種支持性療法。大多數的抗癌藥物是針對影響細胞週期所研發的，近年來，藥物化學家對於能夠推動和控制細胞週期的蛋白質感到非常有興趣，而這些蛋白質都具有酶的功能。在癌細胞中就是這些的調控機制出問題，導致癌細胞不斷的增生，而細胞也會喪失正常的功能轉變成為癌細胞[24]。於是就以癌細胞的細胞週期做探討機

制目標，找出造成細胞週期停止的蛋白質，以及引起癌細胞死亡的調控蛋白。本研究擬探討魚腥草對肺癌細胞之作用以及其作用是否與細胞週期調整相關。



第二章 總論

第一節 實驗材料及設備

一、實驗材料之製備

魚腥草 (*Houttuynia cordata*, 簡稱 HC) 之乾燥全株植物 200 公克，以 1 公升的水及 1 公升的酒精抽提，獲得之魚腥草粗抽液 (25mg/ml) 儲存於冰箱-20°C 備用。

二、細胞株

A549 (a human lung adenocarcinoma cell line) 和 LLC (a murine lung cancer cell ; lewis lung carcinoma cell line) 購自新竹食品工業研究所。

三、儀器

1. 細胞培養箱 (Forma Direct Heat CO₂ Incubator Model310 Series)
2. 垂直式無菌操作台 (Laminar flow)
3. 倒立式光學顯微鏡及影像分析軟體 (Digital Microscopy

Camera/Viewfinder3.0)

4. 冷凍離心機 (Cetrifuge-5415R)、高速離心機
(SORVALL[®]-pico 和 KUBOTA-2420)
5. 恆溫水浴槽 (Water bath BH230)
6. 液態氮儲存桶
7. 電子秤重天平 (METTLER TOLEDO AB204-S/FACT)
8. 二次去離子水製造機 (Millipore[®])
9. 酸鹼值測定儀 (pH meter METTLER TOLEDO Seven Easy)
10. ELISA reader (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay reader)
11. 電泳槽 (Bio-Rad SDS-PAGE[®])
12. 半乾式蛋白質轉漬槽 (iBlot Transfer system, Invitrogen[®])
13. 震盪器 (ORBITAL SHAKER 0S701)
14. 細胞計數器 (Haemocytometer plate)
15. 流式細胞分析儀 (Becton Dickinson[®] FACSCanto)
16. 4°C 冷藏冰箱和-20°C 及-80°C 冷凍冰箱
17. 冷光螢光影像分析系統 (Luminescent Image Analyzer, LAS-4000)
18. 高壓蒸氣滅菌鍋

四、試劑

1. 購自 GIBCO company (Langley, Oklahoma, USA)

RPMI medium , Fetal Bovine Serum (FBS) ,
Penicillin-Streptomycin (P/S) , Trypan Blue

2. 購自 Merck company (Whitehouse Station , New Jersey, USA)

Na₂HPO₄ (Disodium hydrogen phosphate) ,
NaCl (Sodium chloride) , KH₂PO₄ (Potassium
dihydrogen phosphate) , KCl (Potassium chloride)

3. 購自 Sigma-Aldrich Chemical company (Missouri, St. Louis, USA)

DMSO (Dimethyl sulfoxide) , PI (Propidium iodide) , RNase
A (Ribonuclease A) , BSA (Bovine Serum Albumin) ,
APS (Ammonium persulfate) , Methanol ,Ethanol, Glycerol ,MTT
(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)
reagent , CellyticTM M cell lysis reagent , Triton X-100

4. 購自 Amersco company (Cleveland, Ohio, USA)

TEMED (N-N-N'-N'-Tetramethylenediamine), Tween-20
(Polyoxyethylenesorbitan monolaurate), Trypsin-EDTA, 40%
acrylamide /bis-acrylamide (29:1 ratio), 10X SDS (Sodium
dodecylsulfate) buffer, Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane),
10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer)

5. 購自 Becton Dickinson company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)

Apoptosis detection Kit (PI/Annexin V-FITC)

6. 購自 Kodak company (New York, USA)

Development reagent (顯影劑) ,Fixed reagent (定影劑) , BioMax
Flim 底片

7. 購自 NEN Life Science (MA, USA)

Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (ECL) Kit

五、耗材

- ◎ 10 公分培養盤 , 75 公分培養瓶 , 12 孔及 96 孔培養盤
- ◎ 15ml、50ml 的離心管和 1.5ml 的冷凍管以及 1.5ml eppendorff
- ◎ 5ml、10ml、25ml 吸管和 200 μ l、1000 μ l 微量吸管尖以及
0.22 μ m 過濾膜
- ◎ PVDF 轉漬膜(Millipore[®], MA, USA)以及 disposable glasses

六、抗體

1. 購自 Fermentas company

Protein marker(# SM6071)

2. 購自 Abcam company

Anti-Cyclin A (ab7956), Anti-CyclinB1 (ab2949),
Anti-CyclinD1 (ab7958), Anti-CyclinE (ab7959),
Anti-Cdk1/Cdc2 (ab6537), Anti-Cdk2 (ab7954),
Anti-Cdk4 (ab7955), Anti-Cdk6 (ab41870),
Anti-p27KIP1 (ab47590), Anti-p21 (ab47452),
Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated
antibody, Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase
conjugated antibody

3. 購自 Santa Cruz Biotechnology company

β -Actin (C4):sc-477778 , Caspase-3(H-277):sc-7418
, Caspase-8 p20 (H-134):sc-7890 , Caspase-9 p35 (H-170):sc-8355

七、實驗動物

購自樂斯科生技公司 (BioLASCO Taiwan Co.,Ltd) 的 ICR 雄性小鼠(ICR mice)，體重約 20~25 公克，由本學校實驗動物中心代養，其飼養室為 12 小時照光以及 12 小時黑暗，給予自由飲食。

第二節 實驗方法

回顧魚腥草相關文獻，魚腥草具抗發炎作用，因此我們先進行魚腥草粗抽物對小鼠足浮腫實驗來驗證其抗發炎活性，及其毒性的評估，以了解魚腥草粗抽物的安全性；接著探討其對非小細胞肺癌細胞株之影響及其可能的作用機轉，所進行的實驗包括：MTT reagent 檢測和流式細胞儀分析癌細胞的存活率；以倒立式光學顯微鏡及影像分析軟體（Digital Microscopy Camera/Viewfinder 3.0）觀察魚腥草對癌細胞型態上的影響；並利用流式細胞儀做細胞週期分析；以 PI / Annexin V-FITC KIT 染色以分析癌細胞之死亡情況；最後利用西方墨點法（western blot analysis）分析與癌細胞週期相關之 cyclinD1、cyclinE、cyclinA 和 CDK4/6、CDK2、p27 以及凋亡相關之 caspase 3、caspase 8 蛋白質的表現。

另進一步探討由魚腥草中分離所得之 5 種生物鹼成分，以其中 3 種對非小細胞肺癌細胞株具有活性的生物鹼：aristolactam BII, aristolactam AII 及 noraristolodione，進行其對非小細胞肺癌細胞株之上述機轉探討。

一、小鼠足浮腫-抗發炎實驗

ICR 小鼠分成 4 組每組 8 隻，以每 10 公克體重給 0.1ml 的劑量利用腹腔注射 (i.p.) 方式將魚腥草粗抽物 (0, 25, 50, 100 mg/kg) 打入體內，另一組打入抗發炎藥 Indomethacin (4mg/kg) 當作正對照組，30 分鐘後，用致炎劑 1% λ -Carrageenan 0.05ml 注入小鼠後腳掌引起浮腫，分別於 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 和 5 小時以 Plethysmometer 腳浮腫測量儀測量排水量。

二、動物急性毒性測試 (LD50)

ICR 小鼠分成 6 組每組 8 隻，以每 10 公克體重給 0.1ml 的劑量利用腹腔注射 (i.p.) 方式將魚腥草粗抽物打入體內，觀察一星期之存活率，並利用 Excel 算出其半數致死劑量 (LD50)，最後換算成每公斤的劑量。

三、細胞存活測試 (MTT 與 PI 試劑分析)

1. MTT 試劑分析

MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 試劑分析法，主要是根據細胞粒線體內 dehydrogenase 會將 tetrazolium salt 還原成 formazan 結晶，其藍紫色結晶生成量與活細胞數目成正

比，再利用 DMSO (Dimethyl sulphoxide) 當作溶媒將藍紫色結晶溶解，然後用酵素免疫自動分析儀 (ELISA reader) 在 570 nm 波長讀取吸光值，實驗組與對照組吸光值的百分比表示細胞存活率。

將非小細胞肺癌細胞株 (A549 or LLC) 用 RPMI 培養液在 10cm^2 培養盤中培養，再植入 96 孔培養盤 ($2 \times 10^4 / 200\mu\text{l}/\text{well}$) 經過 24 小時，先抽掉舊的培養液，加入不同濃度的魚腥草粗抽液 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) 分別作用 24、48、72 小時，或是加入不同濃度的魚腥草所含生物鹼 (0, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作用 24 小時，接著抽掉 20 μl 培養液，再加入 20 μl MTT reagent ，1 小時後，抽掉 200 μl 培養液，並加入 200 μl DMSO，15 分鐘後，將結晶溶解，再用酵素免疫自動分析儀 (ELISA reader) 在 570 nm 波長讀取吸光值。

2.PI 試劑染色

PI [Propidium iodine] 是帶正電的核酸染劑，當細胞死亡時細胞膜通透性增加，便藉由靜電親和力和核酸結合，可發出紅色螢光，再以流式細胞儀中不同雷射波長照射，對細胞的顆粒大小及複雜性所產生的激發光訊號，代表細胞群分佈位置的意義。

將 A549 cells 植入 12 孔培養盤 ($1 \times 10^5 / 1\text{ml}/\text{well}$) 用 RPMI 培養液經過 18~24 小時及 37°C 培養，先抽掉舊的培養液，加入新的培養液及不

同濃度的魚腥草粗抽液 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) 分別作用 24、48、72 小時。

加入 trypsin-EDTA 使細胞剝離培養盤，收取細胞移轉到離心管，用 1XPBS 將細胞沖洗下來 (2 次)，進行離心 1500 轉 5 分鐘，去掉上清液，加入 PI 染劑 (含 2mg/100ml PI 和 1xPBS ,其比例為 1:4) 300 μ l ，上機之前先將有 PI 染劑之細胞移轉到 FAScan 專用管，蓋上錫箔紙避光 30 分鐘，最後以流式細胞儀進行分析。

四、細胞型態的觀察

人類非小細胞肺癌細胞株 (A549) 用 RPMI 培養液在 10 公分培養盤培養經過 24 小時，先抽掉舊的培養液，加入不同濃度的魚腥草粗抽液 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) 分別作用 24、48、72 小時，以倒立式光學顯微鏡觀察細胞型態上之變化情形。

五、細胞週期分析

用 70~75% 冰冷酒精將細胞做固定及細胞膜打洞，PI 染劑染上 DNA 做量化，利用流式細胞儀分析不同週期中 DNA 的含量，便可得知藥物使細胞週期的停滯作用。

將 A549 or LLC cells 植入 12 孔培養盤 (1×10^5 /1ml/ well) 用

RPMI 培養液 (含 10% 胎牛血清) 經過 18~24 小時培養，先抽掉舊的培養液，再加入新的培養液及不同濃度的魚腥草粗抽液 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) 分別作用 24、48、72 小時，或是加入不同濃度的魚腥草生物鹼 (0, 12.5, 25, 50 μ g/ml) 作用 24 小時。

加入 trypsin-EDTA 使細胞剝離培養盤，收取細胞移轉到離心管，用 1XPBS 將細胞沖洗下來 (2 次)，進行離心 1500 轉 5 分鐘，去掉上清液後輕刮管壁來回 3 次，再次加入 1XPBS 清洗與離心，倒掉上清液後輕刮管壁，接著一邊震盪 (vortex) 一邊沿著管壁加入 1ml 冰冷 (4 $^{\circ}$ C) 75%酒精，放在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱存放。

上機之前先從 -20 $^{\circ}$ C 冰箱拿出前述離心管後直接離心 1500 轉 5 分鐘，去掉上清液，輕輕刮管壁來回 3 次以 1ml 的 1xPBS 清洗殘餘酒精，再一次進行離心，去掉上清液，再輕輕刮管壁來回 3 次，每管加入 PI 染劑 300 μ l (包含 20mg/dl PI、2mg/ml RNase A、5% Triton X-100 及 1xPBS)，移轉至流式細胞儀專用管，蓋上錫箔紙避光 30 分鐘，最後以流式細胞儀進行樣品分析。

所得到的細胞週期中 DNA 之含量，用 Becton Dickinson 科技公司 ModFit cell cycle analysis software 3.0 定量軟體進行細胞週期的變化分析。

六、Annexin V-FITC/PI 試劑雙染

在細胞進行凋亡早期時，磷脂絲氨酸（ phosphatidylserine，簡稱 PS ）會外露於細胞膜外，Annexin V 對磷脂絲氨酸有親和性，利用標定螢光物質（FITC）後，可使用螢光顯微鏡或流式細胞儀偵測細胞凋亡的發生。而碘化丙啶（ Propidium Iodide，PI ）是一種核酸染料，它不能穿透完整的細胞膜，但對凋亡中、晚期的細胞和死細胞，PI 能夠透過細胞膜而使細胞核染紅。因此將 Annexin V 與 PI 合併使用，就可以將處於不同凋亡時期的細胞區分開來。

將 A549 cells 植入 12 孔培養盤（ 1×10^5 / 1ml / well）用 RPMI 培養液經過 18~24 小時及 37 °C 培養，先抽掉舊的培養液，加入新的培養液和不同濃度的魚腥草粗抽液（0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml）分別作用 24、48、72 小時。

先收取 12 孔培養盤中含培養液的細胞，用約 0.5ml 1xPBS 清洗後收取細胞到離心管，再用大約 300 μ l 的 trypsin-EDTA 收取到離心管，離心 1500 轉 5 分鐘，去掉上清液後加入 1x PBS 再次清洗與離心，去掉上清液接著按照 Apoptosis detection Kit 上的步驟去做，先加入 300 μ l 的 1 倍 binding buffer 將 cells 混合，從中抽取 100 μ l（ 1×10^5 cells / ml）到 FAScan 管中，以 PI 與 Annexin V-FITC 為 1:1（5 μ l:5 μ l）做雙染，蓋上錫箔紙避光在室溫下作用 15 分鐘，上機之前再加入 400 μ l

的 1 倍 binding buffer，最後以流式細胞儀進行分析。

七、西方墨點 (western blot) 分析

Western Blot 採用的是聚丙烯醯胺凝膠電泳，被檢測物是蛋白質，「探針」是抗體，「顯色」用標記的二抗。經過 PAGE 分離的蛋白質樣品，轉移到固相載體（例如硝酸纖維素薄膜）上，固相載體以非共價鍵形式吸附蛋白質，且能保持電泳分離的多肽類型及其生物學活性不變。以固相載體上的蛋白質或多肽作為抗原，與對應的抗體起免疫反應，再與酶或同位素標記的第二抗體起反應，經過底物顯色或放射自顯影以檢測電泳分離的特異性目的基因表達的蛋白成分。

1. 蛋白質萃取

人類非小細胞肺癌細胞株 (A549) 用 RPMI 培養液先在 10 公分培養盤經過 24 小時培養，抽掉舊的培養液，加入新的培養液和不同濃度的魚腥草粗抽液 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) 分別作用 24、48、72 小時，或是加入不同濃度的魚腥草所含生物鹼 (0, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) 作用 24 小時。

先將細胞中的培養液抽掉，用 1xPBS 清洗後抽掉，放在冰上面使細胞停止活化，加入 100~200 μl CellyticTM M cell lysis reagent，作用 10 分鐘，以塑膠棒輕輕刮過整個細胞後作用 20~30 分鐘（冰

上)，收集 10 公分培養盤上的細胞吸取到 eppendorff，進行離心 1500 轉 15~20 分鐘，取上清液到新的 eppendorff，接著可以作蛋白質定量分析，或是暫時儲存在 -20°C 冰箱。

2. 蛋白質定量

首先定量標準品，用 2mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin)，稀釋成濃度 2000、1000、500、250、125、0 $\mu\text{g/ml}$ ，利用 ELISA reader 在吸光值 570nm 測量，做出一條標準檢量線 (standard curve)，並算出趨勢方程式和 r^2 值 (r 至少大於 0.995 以上)。

樣品的定量則是由低到高濃度 ($0 \rightarrow 0.125 \rightarrow 0.25 \rightarrow 0.5 \text{ mg/ml}$) 分別放入 10 μl 的蛋白質體積量，每個濃度都做 3 個樣品，然後加入體積 200 μl 的 A+B 染劑 (A : B = 50 : 1)，利用 ELISA reader 在吸光值 570nm 測量。將數值套進標準檢量線 (standard curve)，可得到蛋白質的體積量。

3. 電泳跑膠和轉漬

配製 10~12% 的 SDS-PAGE (下膠: D.D water, 1.5M Tris, 30% acrylamide, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED; 上膠: D.D water, 0.5M Tris, 30% acrylamide, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED)，取 40~70 μg 的蛋白質量加入 1/4 倍染劑，以 95°C 加熱 5 分鐘，變性後的蛋白放入含有 1x running buffer 電泳槽的上

膠凹槽內，以 120~125 伏特及 400 安培電流跑膠約 60~70 分鐘。將膠上的蛋白質轉漬到 PVDF 或是 NE 膜上，使用半乾式轉漬機器 (Invitrogen[®]) 轉漬約 6 分鐘 (分子量大時間越久，分子量小時間越短)。

4. 蛋白質免疫染色

將 PVDF 或 NE 膜浸在 5% 脫脂牛奶液中 1 小時，覆蓋掉一些非特異性蛋白結合位置，用 1xPBST 清洗牛奶液，每次 10~15 分鐘，共 4~6 次，室溫下加入一級抗體搖晃至少 1 小時或是冰箱冷藏 (4°C) 浸潤過夜，清洗一級抗體，每次 10~15 分鐘，共 4~6 次，加入二級抗體搖晃 1 小時，清洗二級抗體，每次 10~15 分鐘，共 4~6 次，最後加入等比例 (1 : 1) 冷光劑試劑 (ECL Kit) 呈色反應，於暗房內以 Kodak X 光底片及顯影劑、定影劑呈現蛋白質的表現量。

第三節 資料統計與分析

採用 SigmaPlot 繪圖並以 SPSS 統計軟體分析，實驗結果數據以平均值 (mean) ± 標準誤差 (standard error, S.E.) 表示，實驗與對照組別之間以 One-way ANOVA (Analysis of variance) 中的 Dunnett 分析，若 p 值小於 0.05 即具有統計學上的意義。

第三章 結果

第一節 魚腥草粗抽物之生理活性

一、魚腥草粗抽物抗發炎作用

在給予魚腥草粗抽物的各組別，分別和完全不給藥物組（控制組）及給予 Indomethacin 藥物組（正對照組）做比較。結果發現給藥組都能有效抑制發炎，在給予魚腥草粗抽物劑量 50mg/kg 時，與 Indomethacin (4mg/kg) 組有相似抑制發炎作用，魚腥草粗抽物劑量 100 mg/kg 的抗發炎作用甚至比 Indomethacin (4mg/kg) 藥物作用強，其結果如 Fig. 6 所示。

二、魚腥草粗抽物對小鼠之急毒性作用

將魚腥草的粗抽物以每 10 公克體重給 0.1ml 之劑量，以腹腔注射到小鼠體內，藥物濃度為 0.5, 0.625, 0.75, 1.00, 1.25, 1.5 mg/0.1ml，觀察 7 天內小鼠存活的情況，結果發現投與 0.5mg/0.1ml 與 0.625mg/0.1ml 的小鼠 (n=8) 皆存活，存活率為 100%，而 0.75mg/0.1ml 有 87.5% 的存活率，但是 1.00mg/0.1ml 其小鼠存活率僅有 12.5%，而 1.25mg/0.1ml 和 1.5mg/0.1ml 濃度之下小鼠全都死亡，

存活率為零。由以上實驗結果得知，魚腥草的粗抽物其安全範圍狹小，其 LD50 為 9 mg/kg 。

三、魚腥草粗抽物對 A549 細胞或 LLC 細胞存活率的影響

(一) MTT 試劑的分析 (MTT assay)

以對照組 (control) 的吸光值當 100%，給藥組別的吸光值相對應之百分比代表細胞的存活率，其結果如 Fig. 8 和 Fig. 9 所示。顯示隨著劑量及時間的增加，魚腥草粗抽物抑制非小細胞肺癌細胞株 (A549 or LLC) 的生長，且具有劑量及時間上的依存性。

(二) 流式細胞儀分析 (Flow cytometry analysis)

由 Fig.10 結果顯示隨著劑量及時間的增加，魚腥草粗抽物有意義的抑制 A549 細胞株的生長，與 Fig. 8 的 MTT 試劑分析 A549 細胞活性之結果相似，皆在給予魚腥草粗抽物劑量 0.25 mg/ml 經過 48 小時，有效抑制 50% 的 A549 細胞存活。

四、魚腥草粗抽物對 A549 細胞於形態學上的改變

由 Fig.11 顯示魚腥草粗抽物在高劑量及長時間作用下，A549

細胞形態變得比較不完整及細胞較小，可看到細胞內呈現小顆粒狀，如同圖中以箭頭指出之處。

五、魚腥草粗抽物對 A549 細胞之週期的影響

不同濃度的魚腥草粗抽物 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml)，經過 24、48、72 小時作用，對 A549 細胞之週期影響，結果顯示細胞週期之 DNA 含量在 G1 期最多，S 期其次，G2/M 期最少，以不給藥組當標準比較，發現較投予高濃度魚腥草粗抽物時 (0.25mg/ml 和 0.5mg/ml) 經過 24、48 小時產生蓄積作用在 G1 期最多，而 72 小時產生蓄積作用在 G1 及 S 期最多，如 Fig.12-14 所示。

六、Annexin V-FITC/PI 試劑雙染呈現 A549 細胞死亡情形

不同濃度的魚腥草粗抽液 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) 對 A549 細胞分別作用 24、48、72 小時，結果如 Fig.15 和 Fig.16 所示，經過 24 小時後，A549 細胞隨著魚腥草粗抽液劑量 0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 之細胞死亡百分比分別為 $12.38 \pm 2.39\%$ ， $12.5 \pm 2.07\%$ ， $15.92 \pm 1.41\%$ ， $21.43 \pm 3.59\%$ ；經過 48 小時後，A549 細胞隨著魚腥草粗抽液劑量 0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 之細胞死亡百分比分別為 $10.50 \pm 3.8\%$ ， $10.33 \pm 2.56\%$ ， $23.68 \pm 6.41\%$ ， $28.48 \pm 9.80\%$ ；經過 72 小時後，A549 細

胞隨著魚腥草粗抽液劑量 0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 之細胞死亡百分比分別為 $10.35\pm 1.27\%$, $7.05\pm 0.58\%$, $18.18\pm 2.18\%$, $35.68\pm 3.67\%$ 。由上述結果顯示，魚腥草粗抽液隨著劑量與時間的增加，造成 A549 細胞死亡百分比也增加。

七、魚腥草粗抽物對人類 A549 細胞之週期相關及凋亡相關蛋白質的影響

不同濃度的魚腥草粗抽液 (0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) 處理 48 小時，觀察其對 A549 細胞之週期中的蛋白質及凋亡相關蛋白質的影響。結果如 Fig.17-26 所示，細胞週期 G1 期相關的 cyclinD1、cyclinE、cyclinA 和 CDK4 / CDK6、CDK 2 蛋白質隨著魚腥草粗抽液劑量增加而遞減，而 p27 蛋白表現量增加；與細胞凋亡相關的 caspase 8、caspase 3 蛋白質表現量增加。

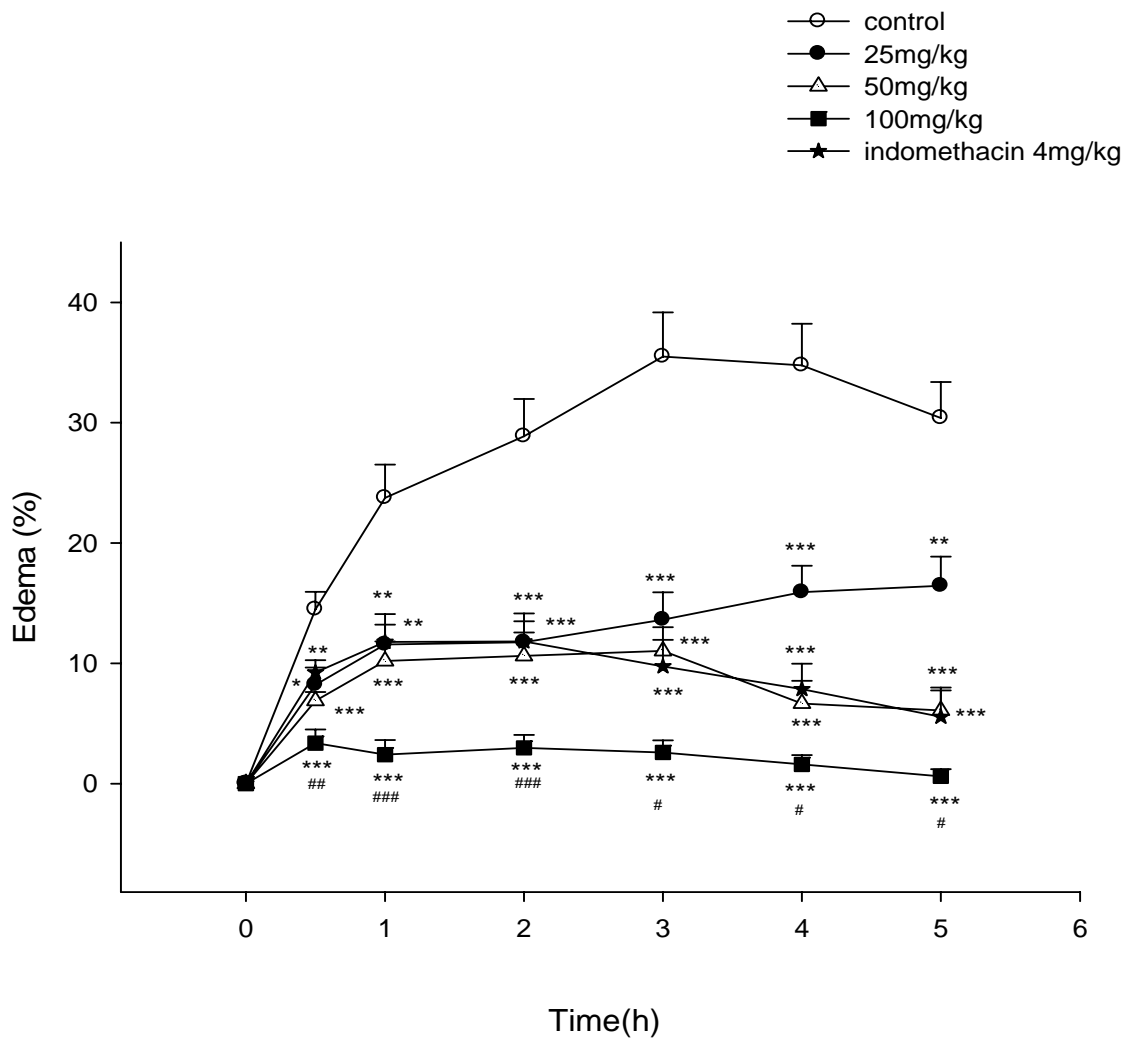


Fig.6 The effect of *Hottuynia cordata* (HC) crude extract on carrageenan-induced paw edema in mice.

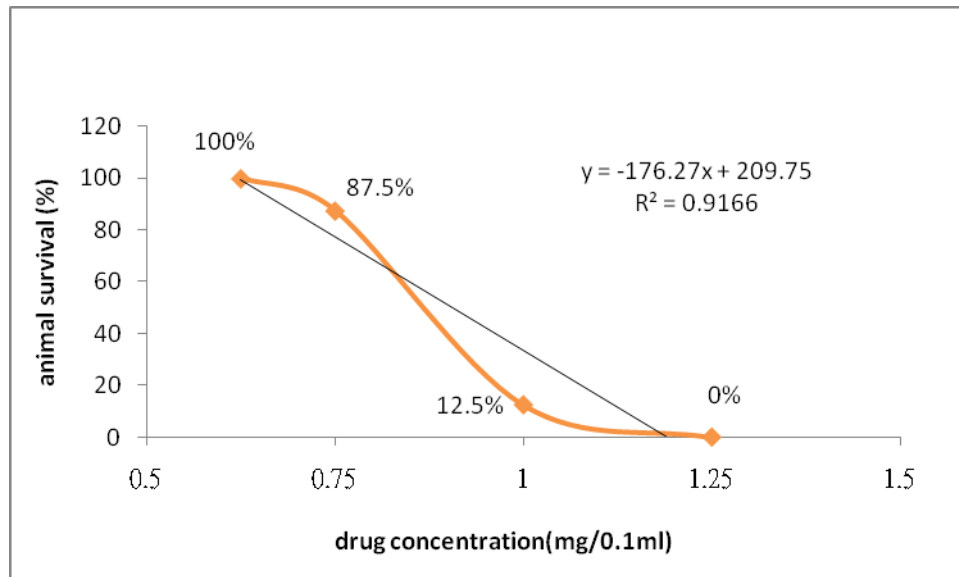


Fig.7 The acute toxicity of *Hottuynia cordata* (HC) crude extract in mice.

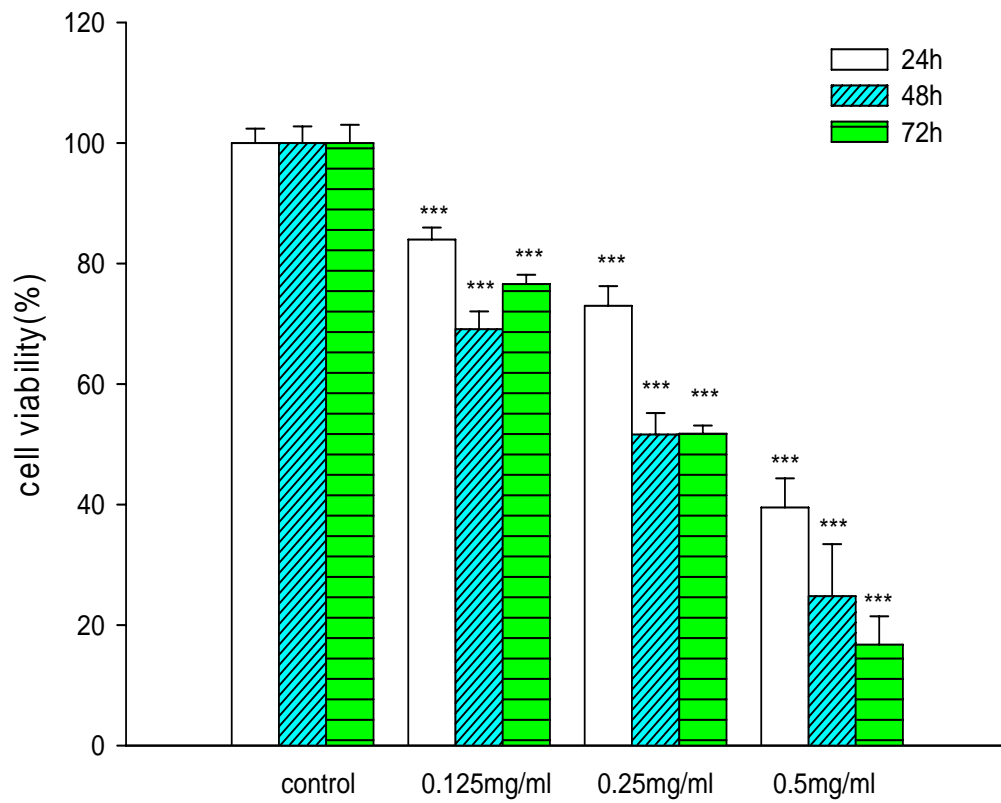


Fig.8 Effect of HC-crude extract on the cell viability of human lung carcinoma cells (A549) . Cell viability was detected by MTT assay.

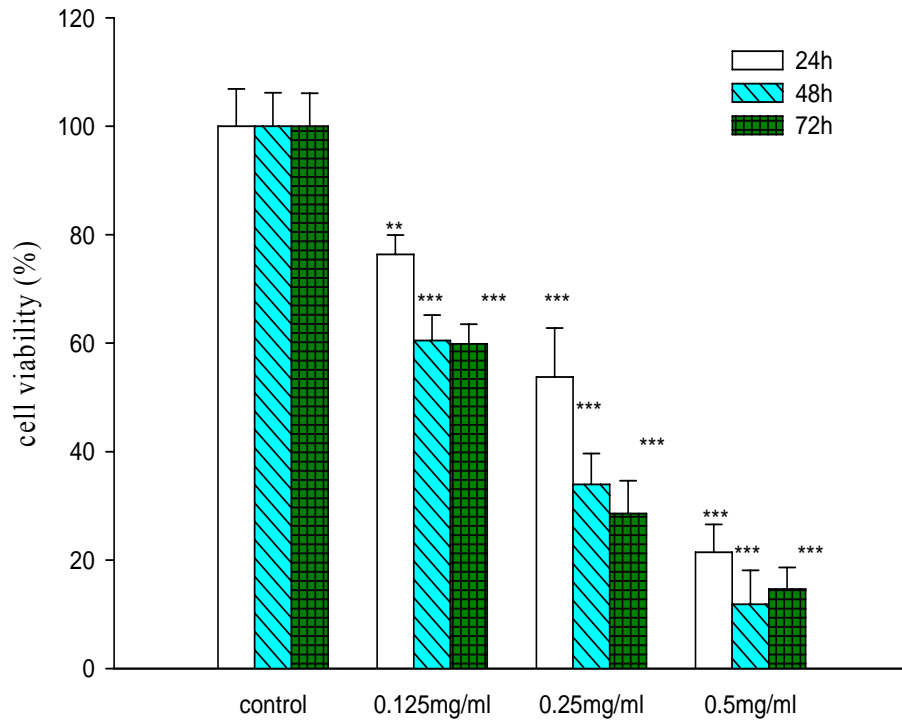


Fig.9 Effect of HC-crude extract on the cell viability of murine lung cancer cells (LLC). Cell viability was detected by MTT assay.

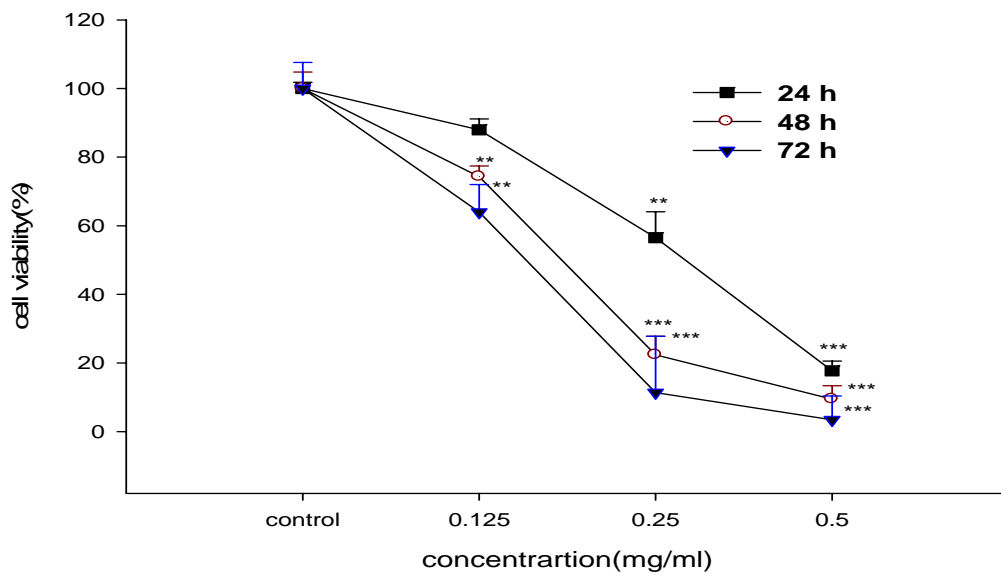
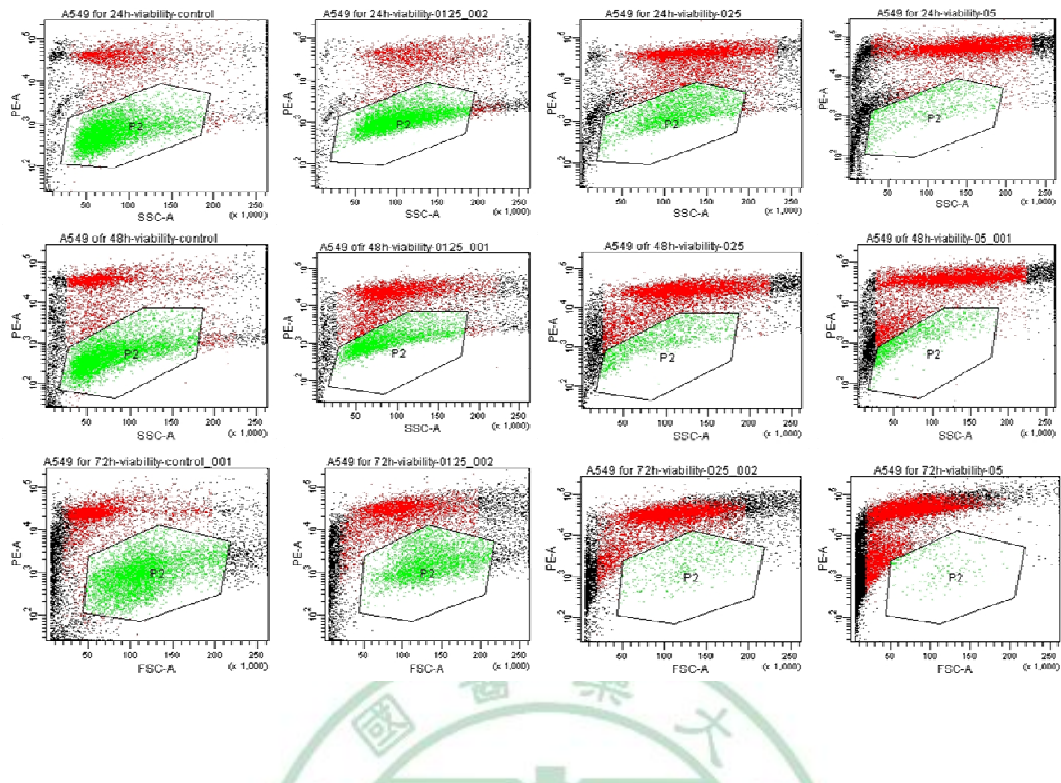


Fig.10 Effect of HC-crude extract on the cell viability of human lung cancer cells (A549) by Flow Cytometry.

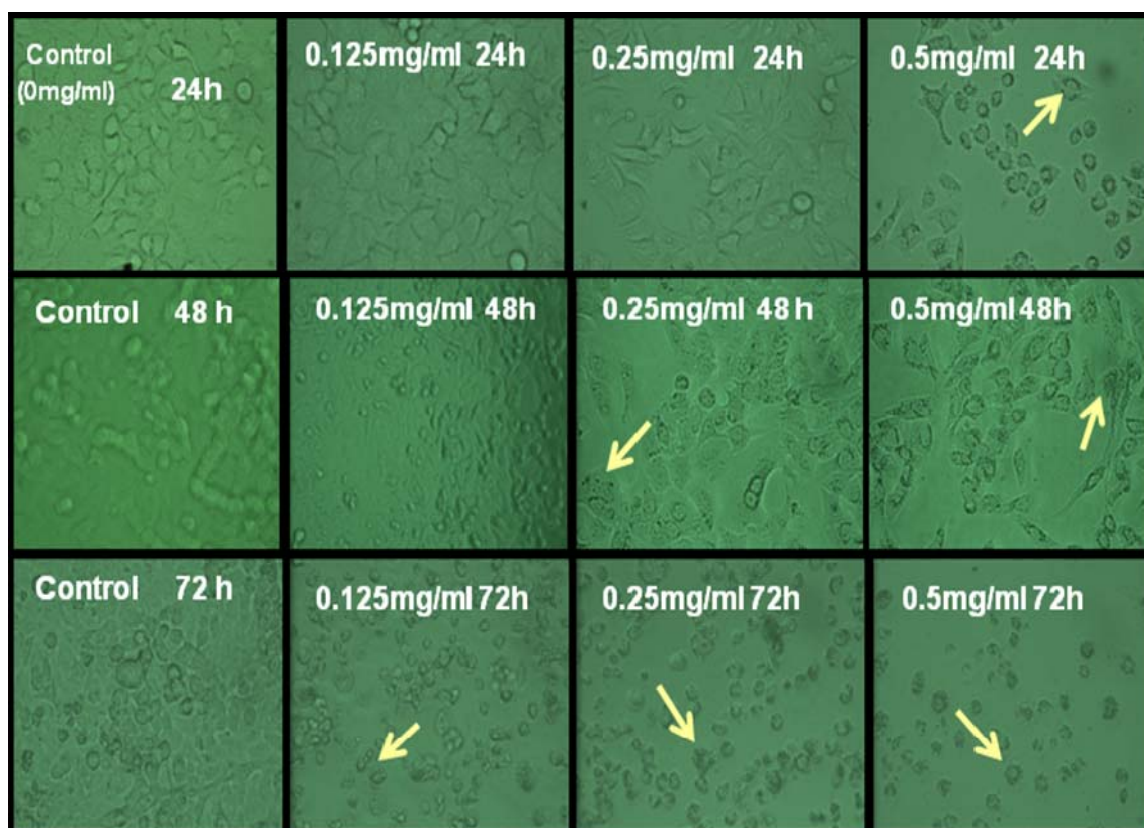


Fig.11 Effect of HC-crude extract on the cell morphology of human lung cancer cells (A549).

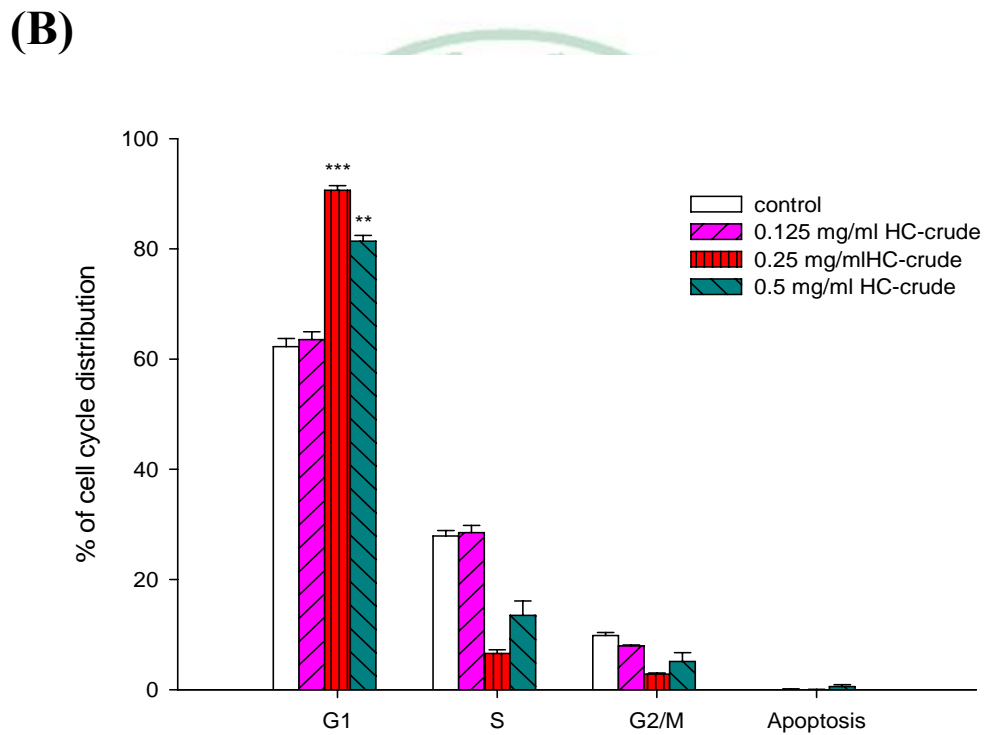
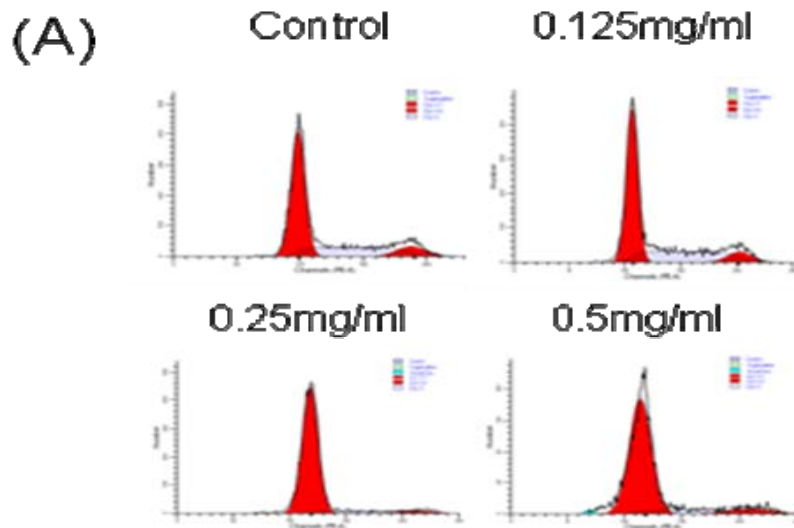


Fig.12 Alternation of HC-crude extract on cell cycle distribution of A549 cells for 24h.

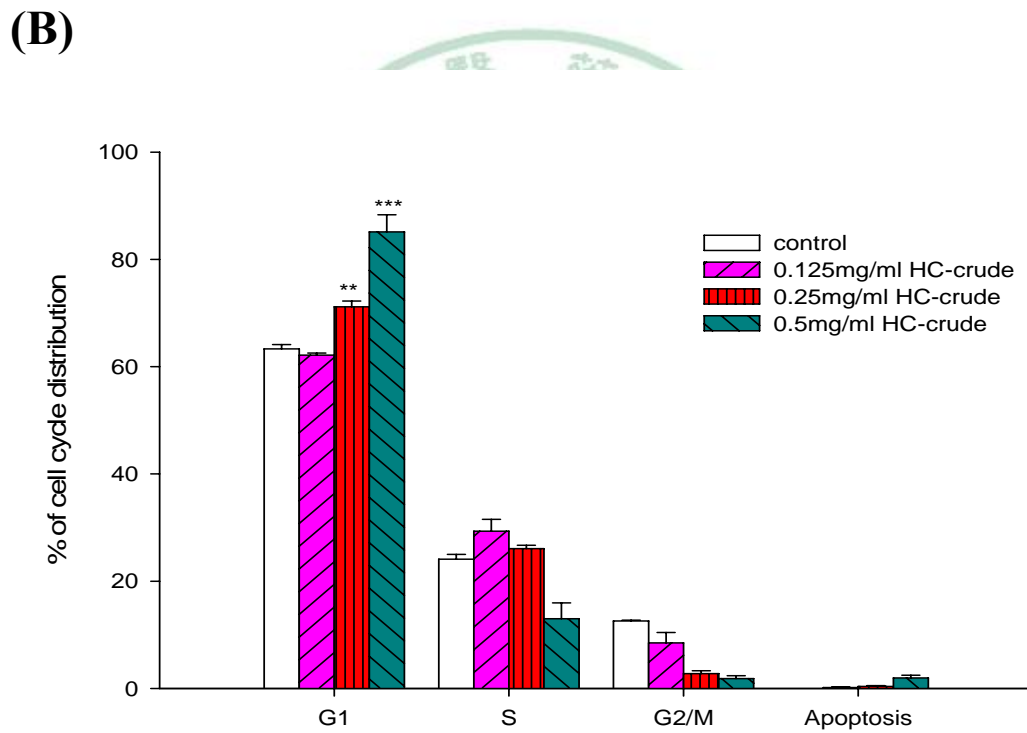
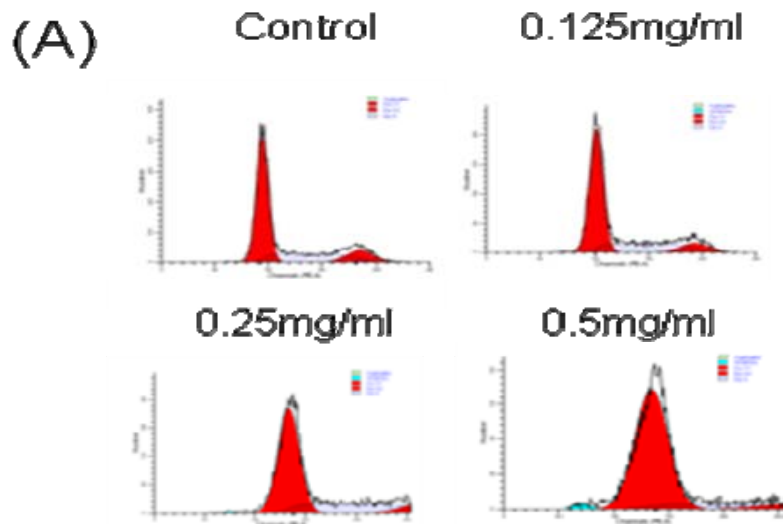


Fig.13 Alternation of HC-crude extract on cell cycle distribution of A549 cells for 48h.

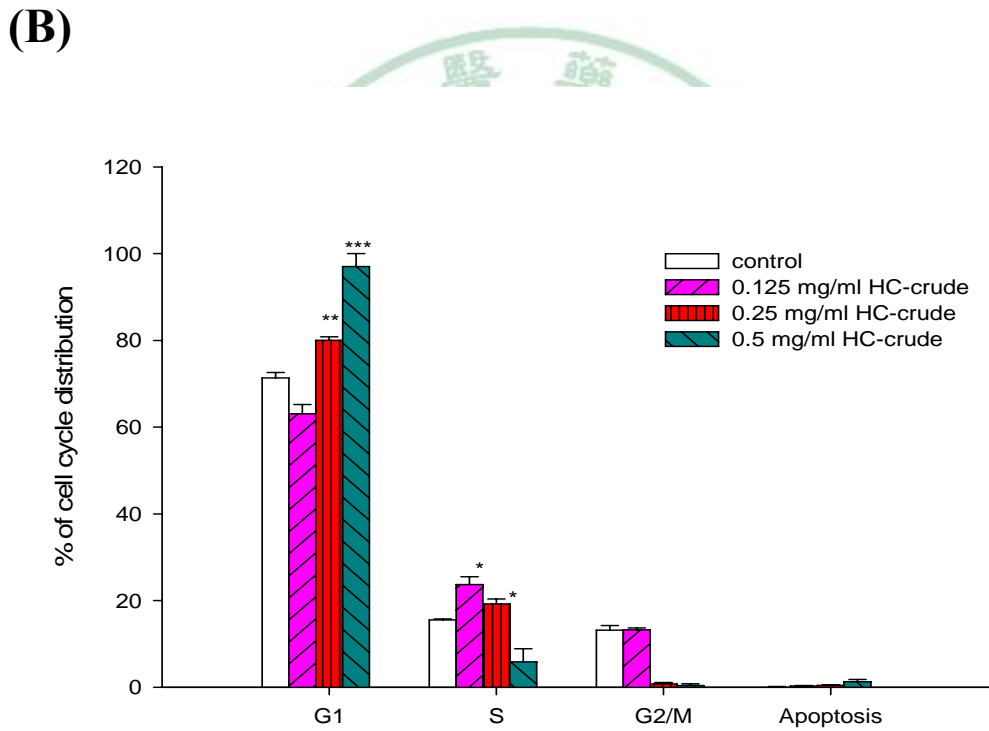
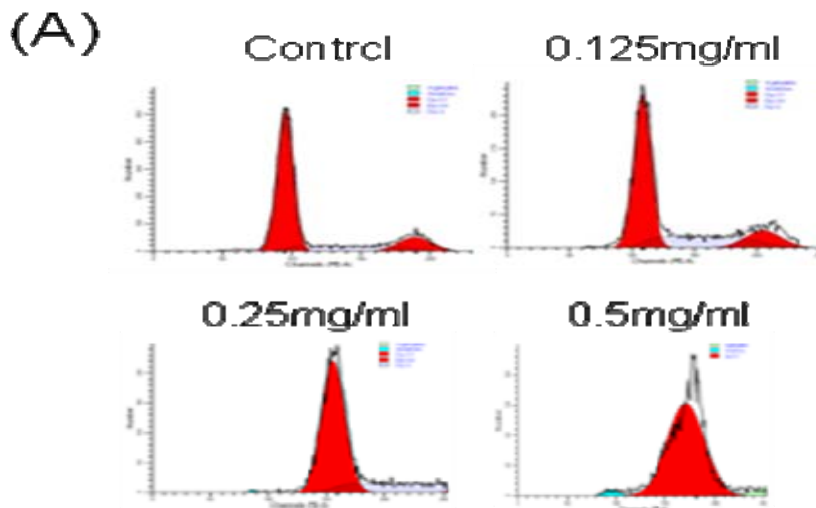


Fig.14 Alternation of HC-crude extract on cell cycle distribution of A549 cells for 72h.

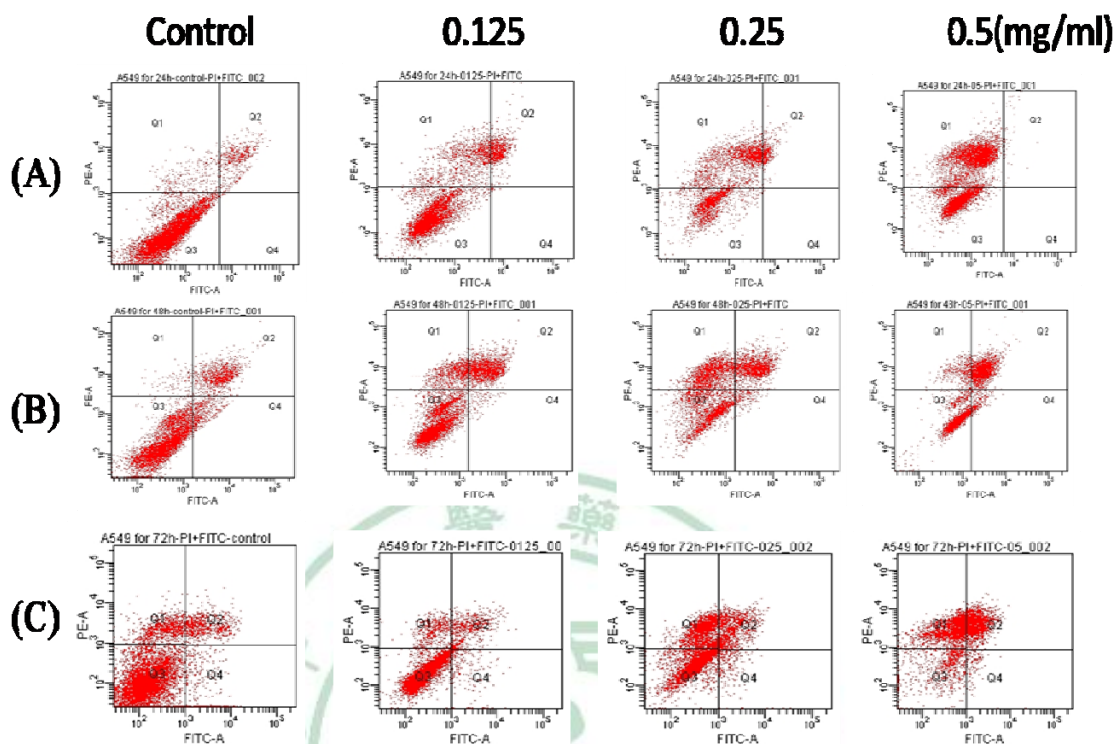


Fig.15 Effects of HC-crude extract on the cell viability of A549 cells. A549 cells were treated with HC-crude extract and were stained with Annexin V conjugated FITC and PI. Cell viability was measured by using Flow Cytometer.

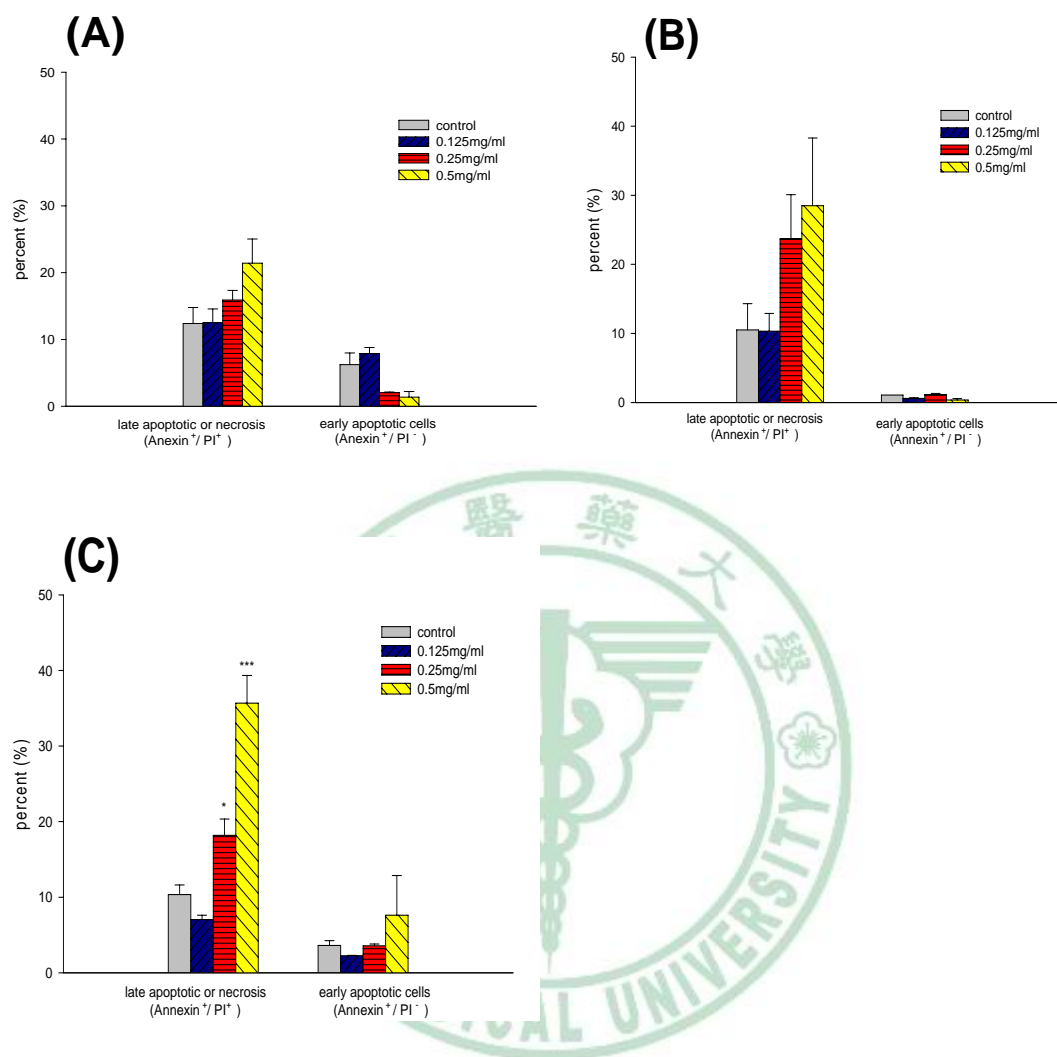


Fig.16 Effect of HC-crude extract on the cell viability of A549 cells. A549 cells were treated with HC-crude extract for different time (A) 24h (B) 48h (C) 72h and were stained with Annexin V conjugated with FITC and PI.

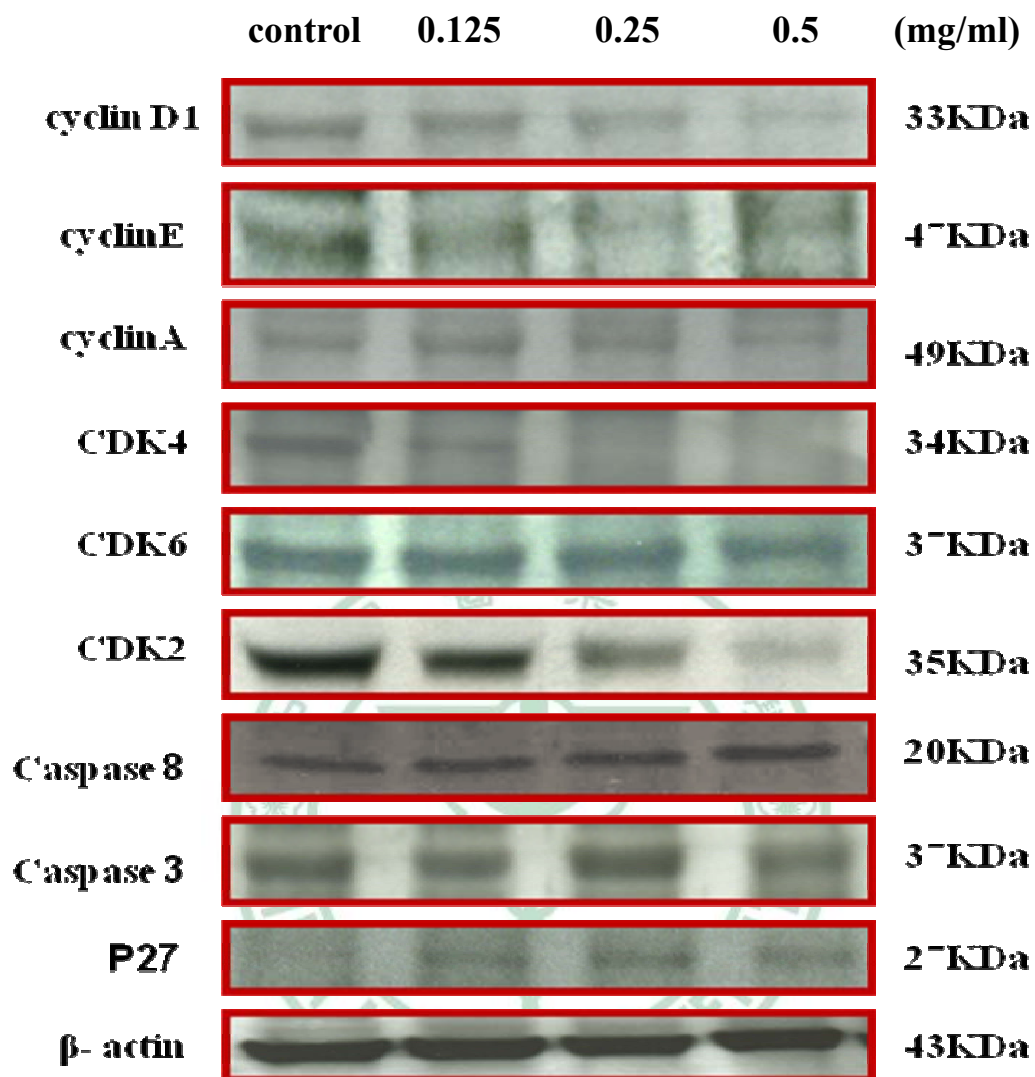


Fig.17 Suppression of CDKs and cyclins and up-regulation of p27, caspase 8, caspase 3 by HC-crude extract treatment. A549 cells were treated with various concentration of HC-crude extract for 48h.

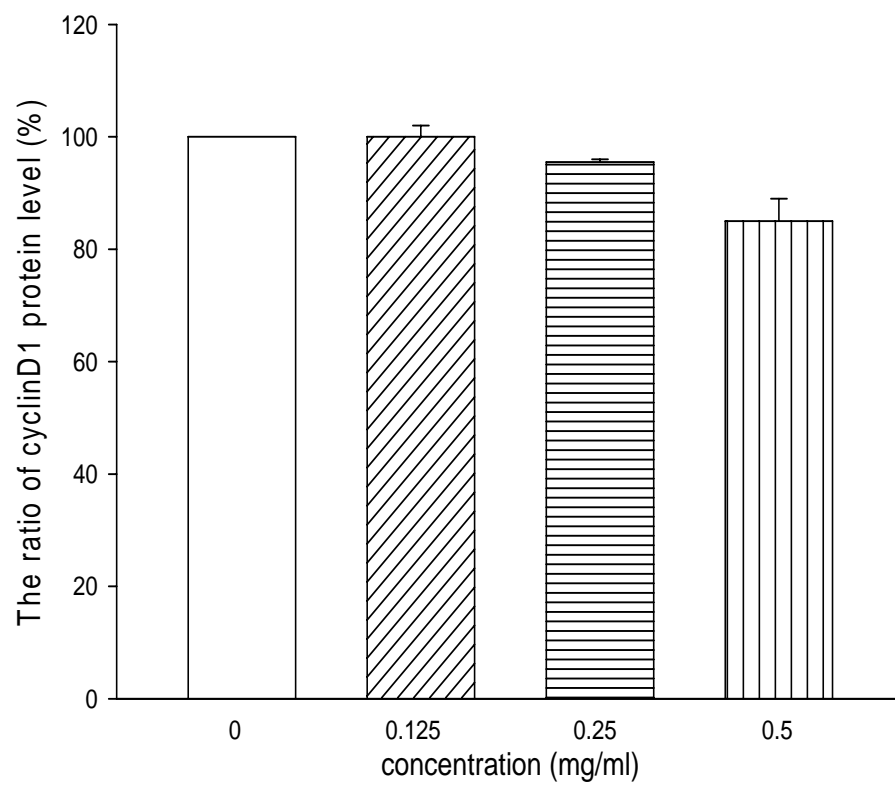
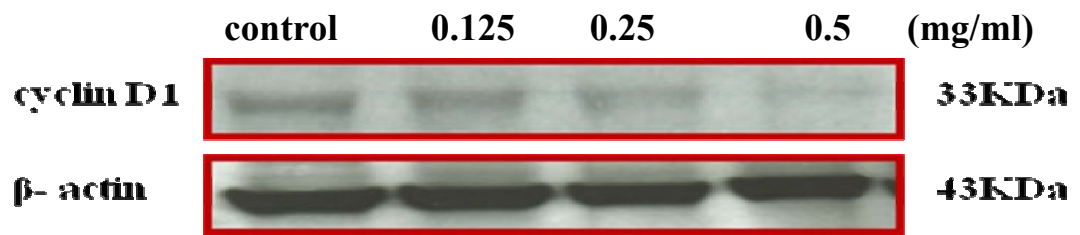


Fig.18 Suppression of cyclinD1 protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

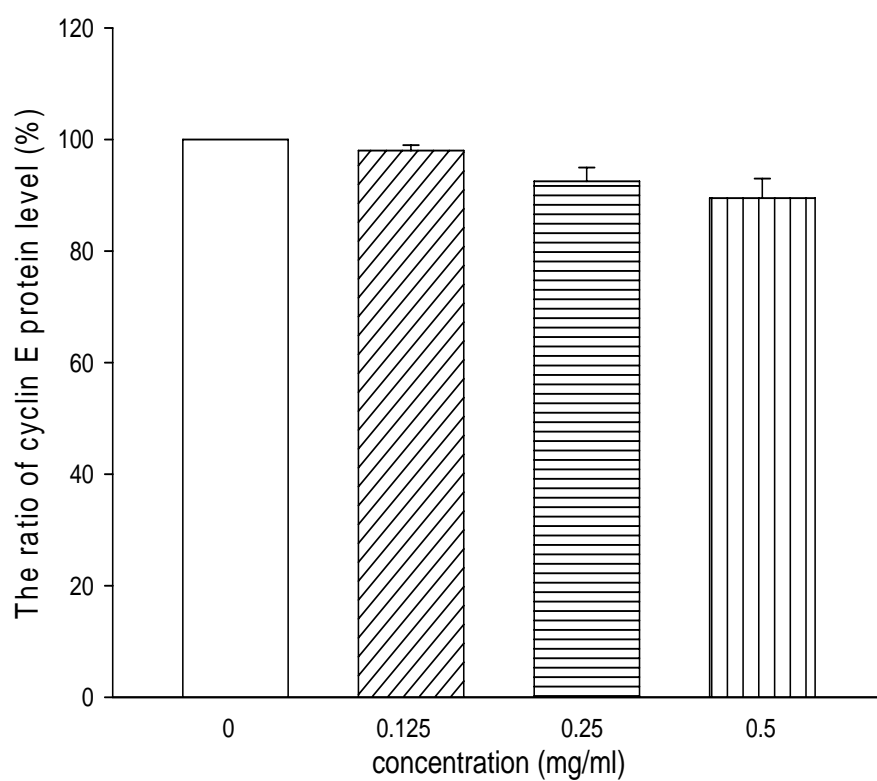
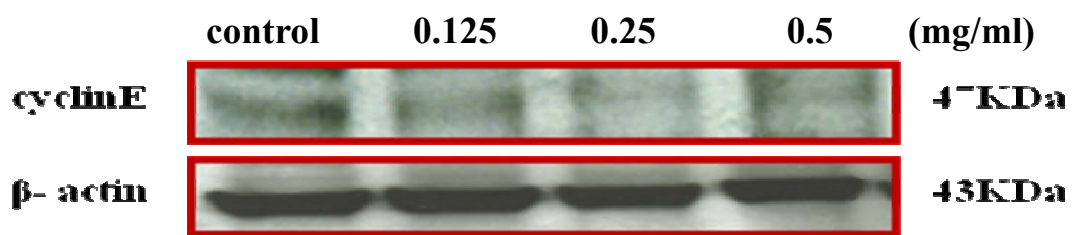


Fig.19 Suppression of cyclinE protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

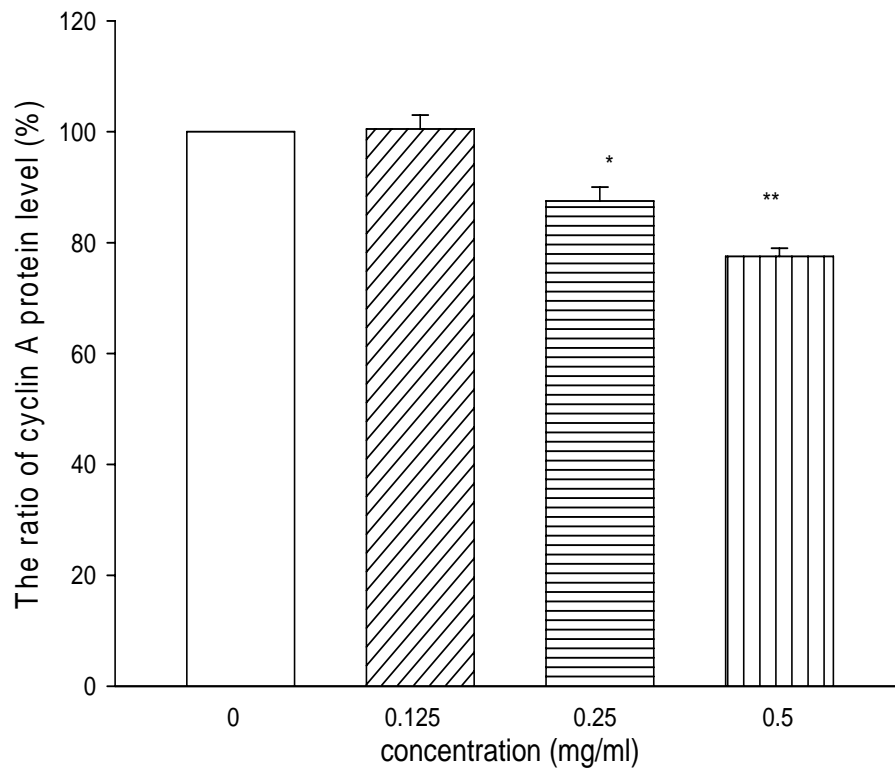
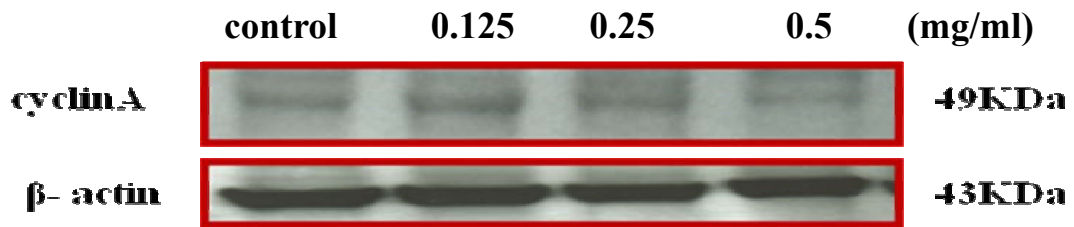


Fig.20 Suppression of cyclinA protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

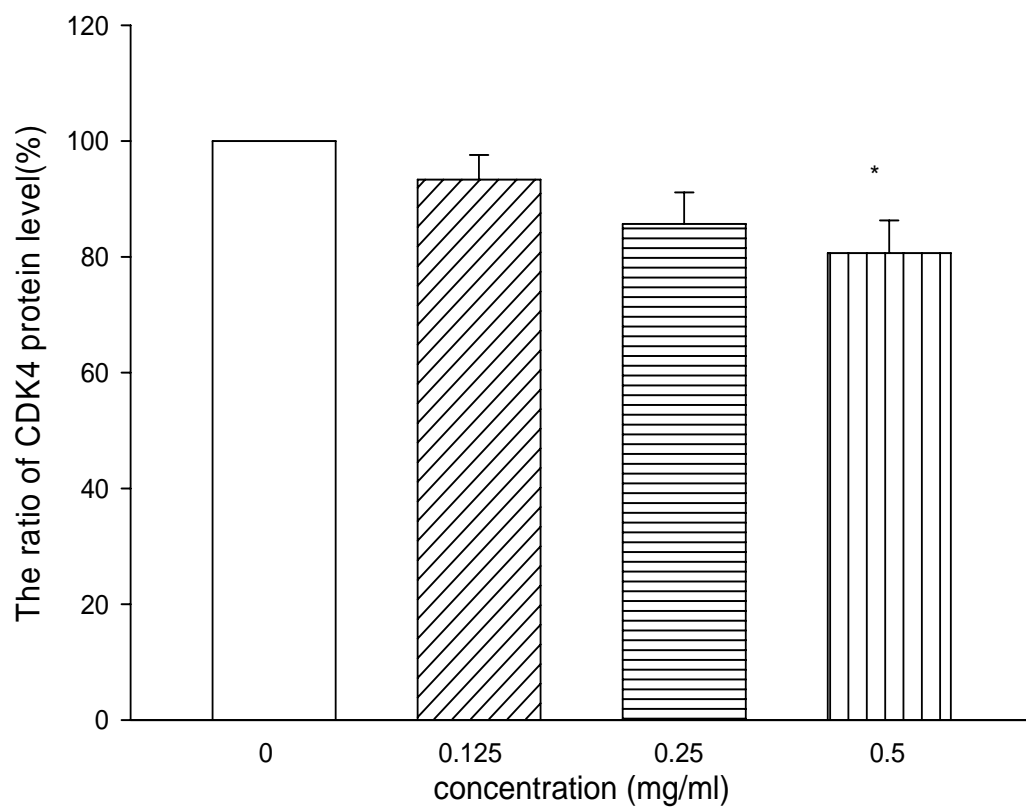
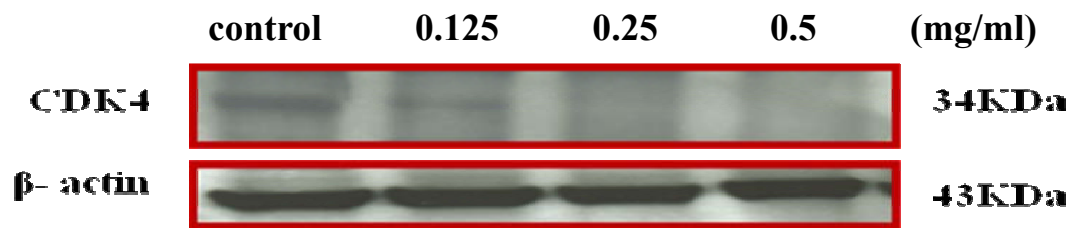


Fig.21 Suppression of CDK4 protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

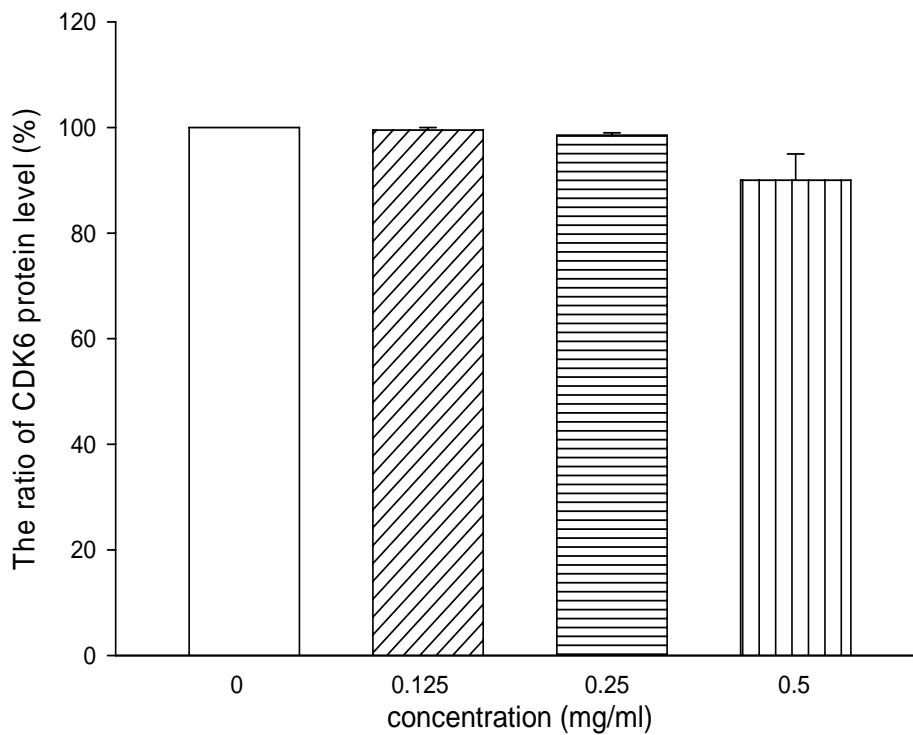
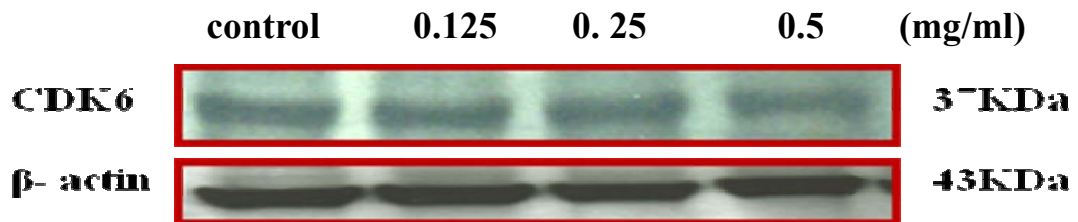


Fig.22 Suppression of CDK6 protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

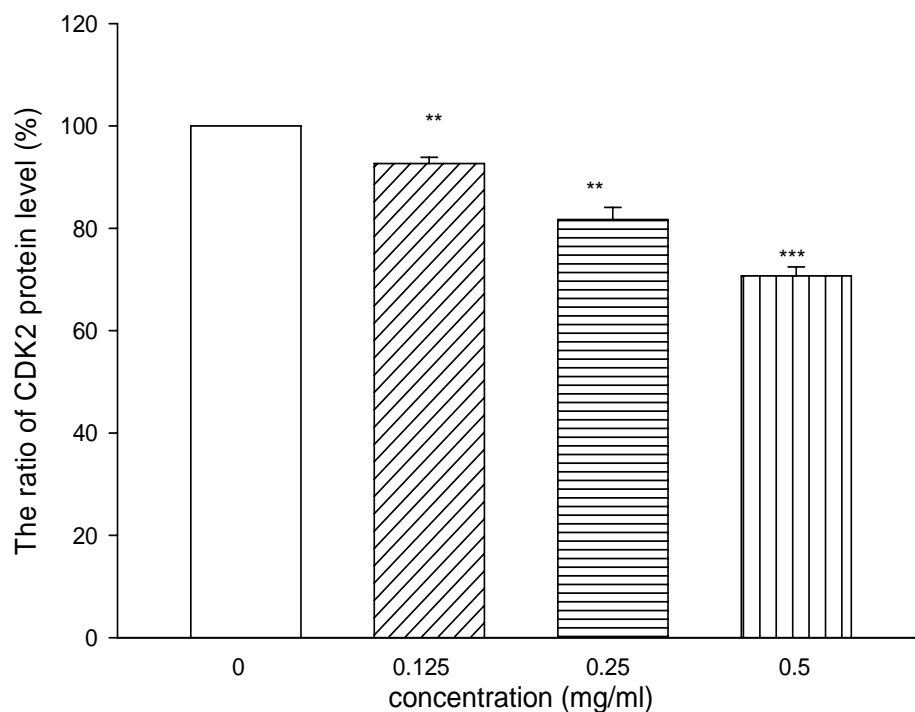
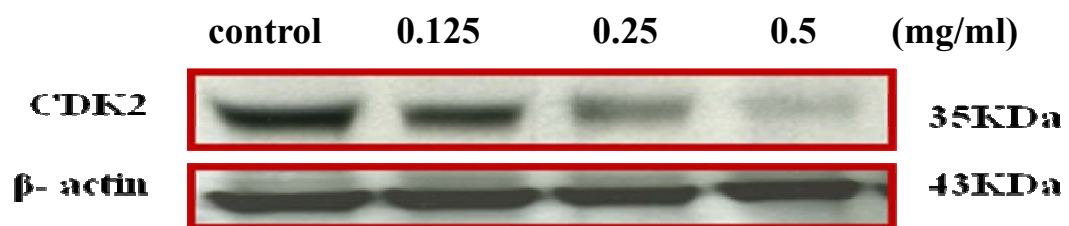


Fig.23 Suppression of CDK2 protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

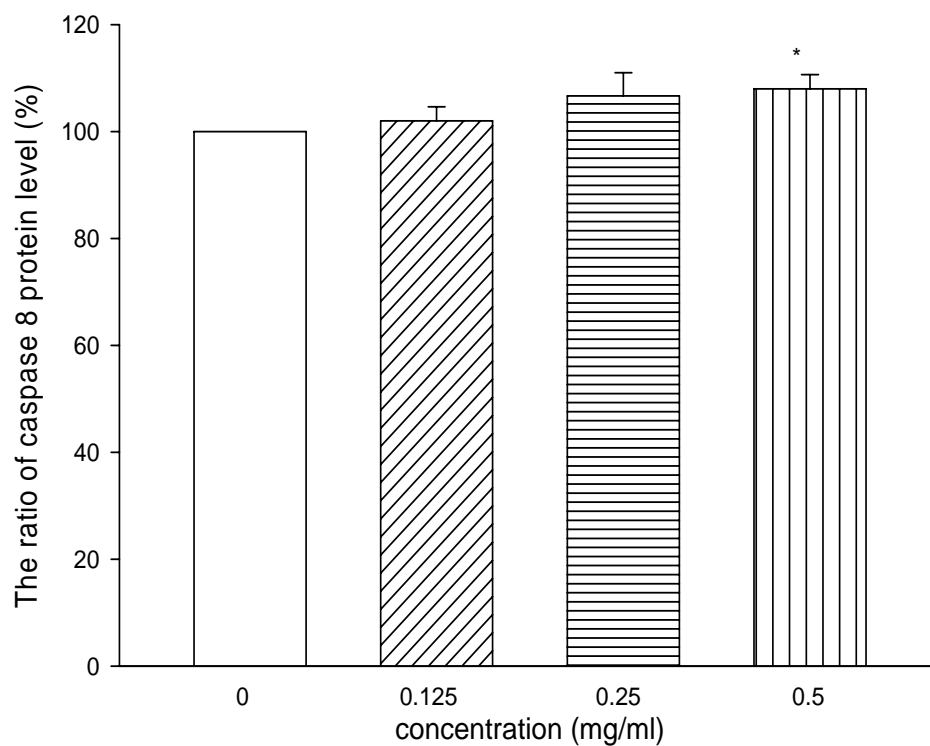
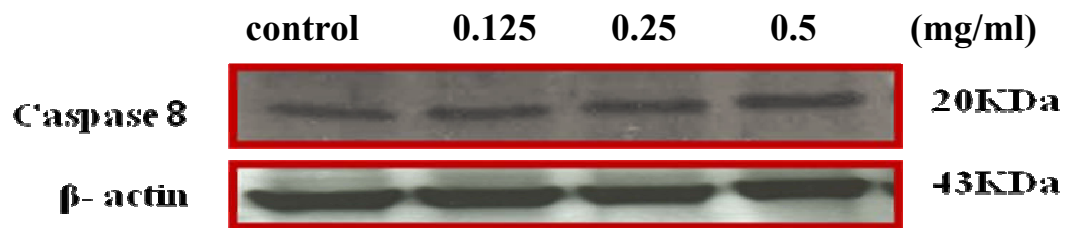


Fig.24 Up-regulation of caspase 8 protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

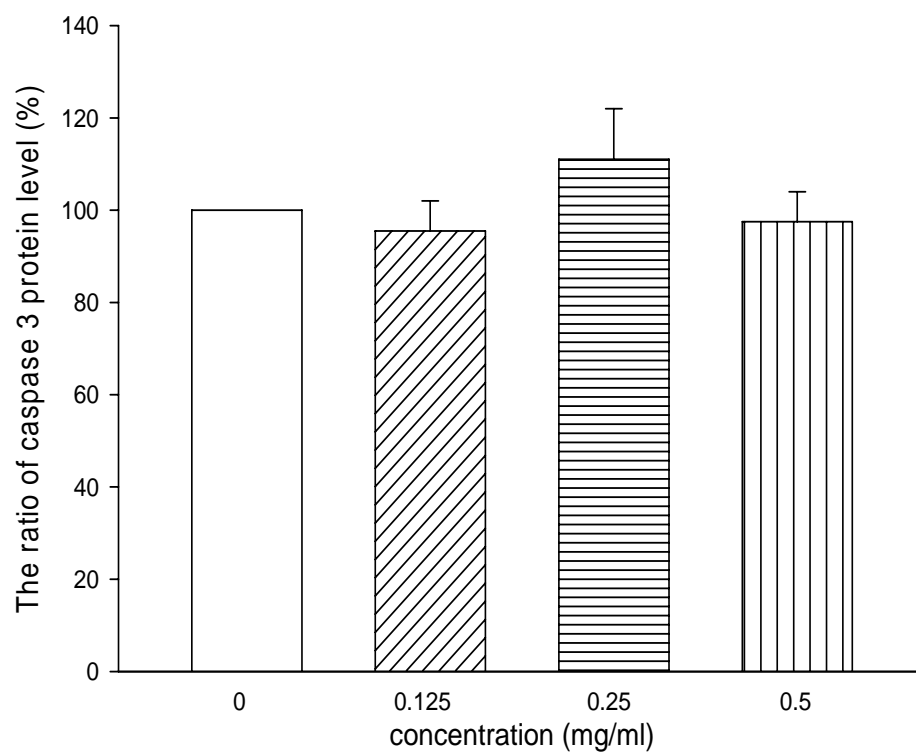
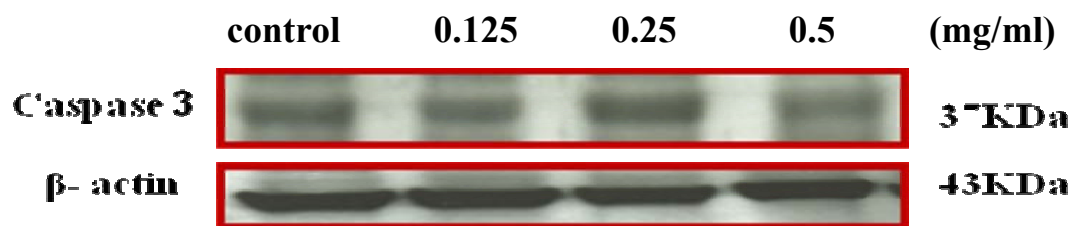


Fig.25 Up-regulation of caspase 3 protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

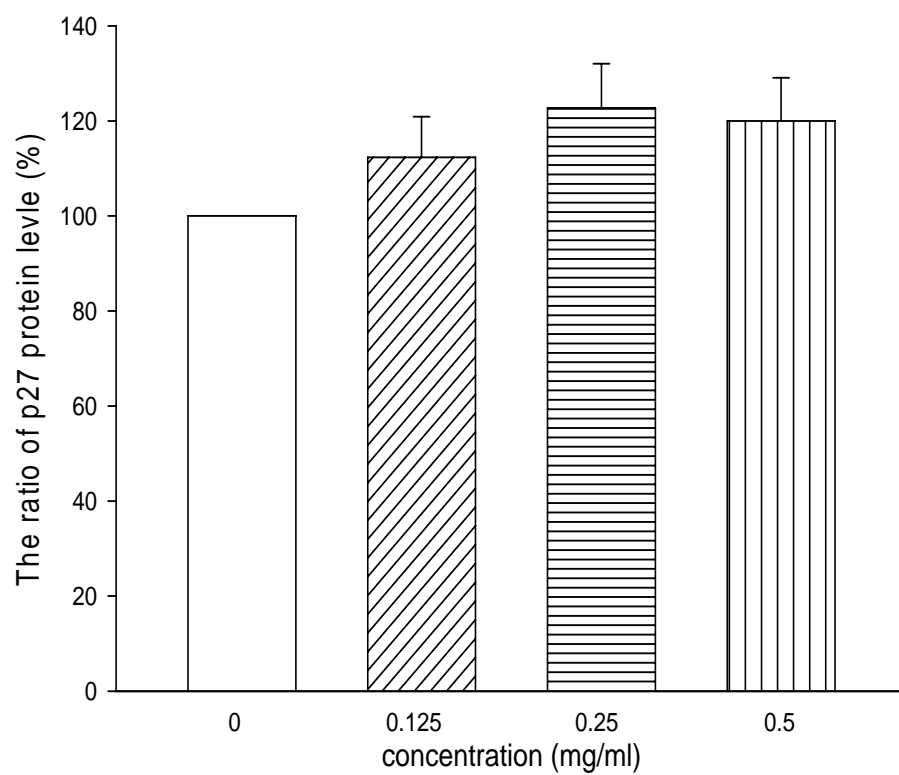
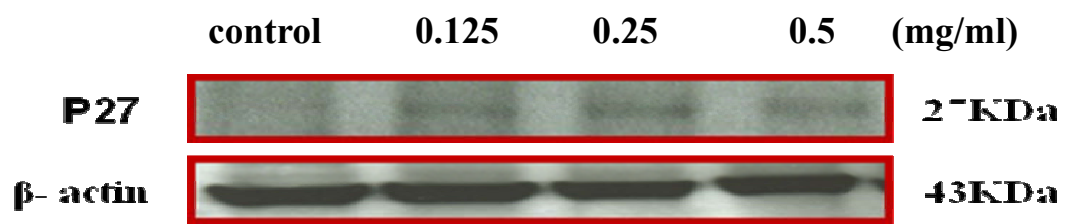


Fig.26 Up-regulation of p27 protein expression by HC-crude extract treatment on A549 cells for 48h by immunoblotting.

第二節 魚腥草所含生物鹼之生理活性

一、魚腥草所含生物鹼對 A549 細胞存活率的影響

結果如 Fig. 27 所示，隨著劑量的增加，魚腥草所含之 5 種生物鹼(包括 aristolactam BII , aristolactam AII, piperolactam A, norcepharadione B, 和 noraristolodione) 對 A549 細胞存活率具抑制作用，以其中的 3 種生物鹼 (aristolactam BII , aristolactam AII 和 noraristolodione) 對 A549 細胞存活率之抑制作用較明顯。

二、魚腥草所含生物鹼對 A549 細胞之週期的影響

結果如 Fig. 28-30 所示，細胞週期之 DNA 含量在 G1 期最多，S 期其次，G2/M 期最少，以不給藥組當標準比較，發現生物鹼成份 aristolactam BII 和 aristolactam AII 會使 S 期與 G2/M 期產生蓄積作用，而 noraristolodione 僅使 S 期產生蓄積作用。

三、魚腥草所含生物鹼對 A549 細胞之週期相關及凋亡相關蛋白質的影響

結果如 Fig.31-33 所示，細胞週期 S 期和 G2/M 期相關的 cyclin A、

cyclin E、CDK 2、Cdc2 (CDK1) 蛋白質隨著魚腥草生物鹼劑量增加而減少;與凋亡有關的 Bcl-2 蛋白質遞減，p21、p27、P53、caspase 3 和 caspase 8 以及 Bax 蛋白質則隨著劑量增加而增加。



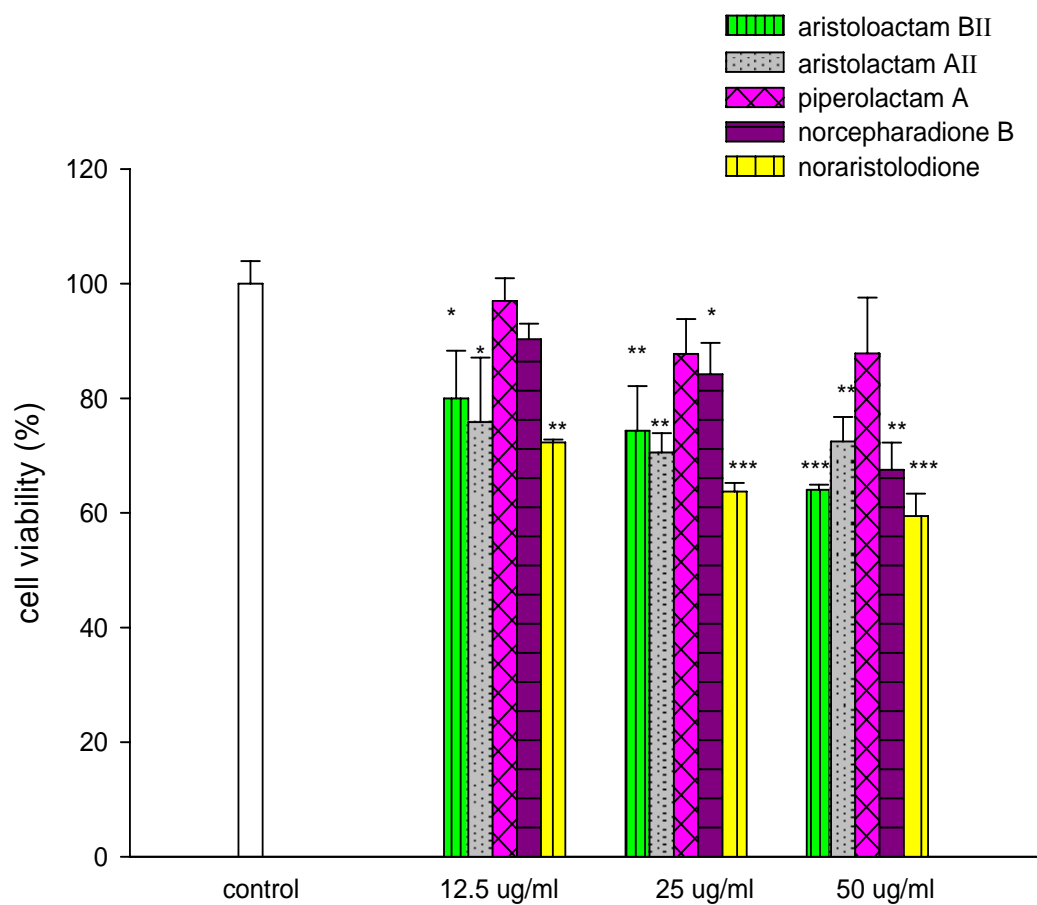


Fig. 27 Effect of aristolactam BII, aristolactam AII, piperolactam A, norcepharadione B and noraristolodione on the cell viability of human lung cancer cells (A549) for 24 h. Cell viability was detected by MTT assay.

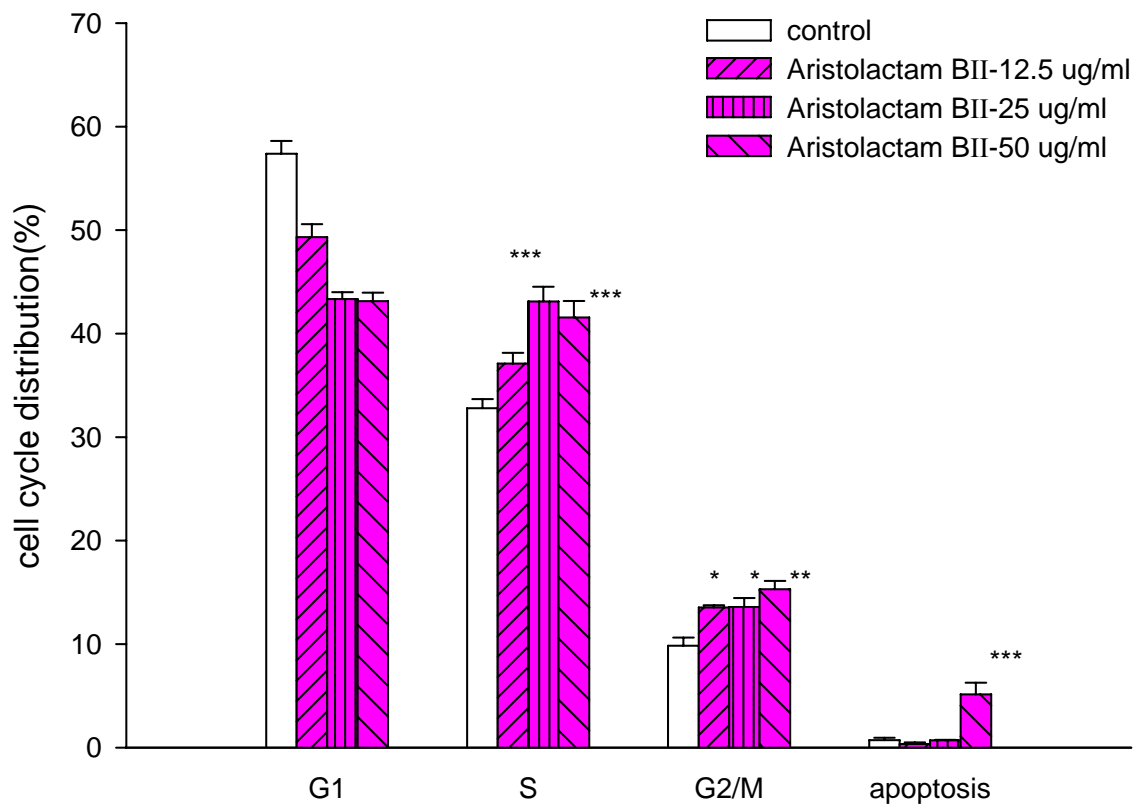


Fig.28 Effects of aristolactam BII on A549 cell cycle distribution. aristolactam BII treatment for 24h altered A549 cell cycle distribution and arrested at S/G2/M phase.

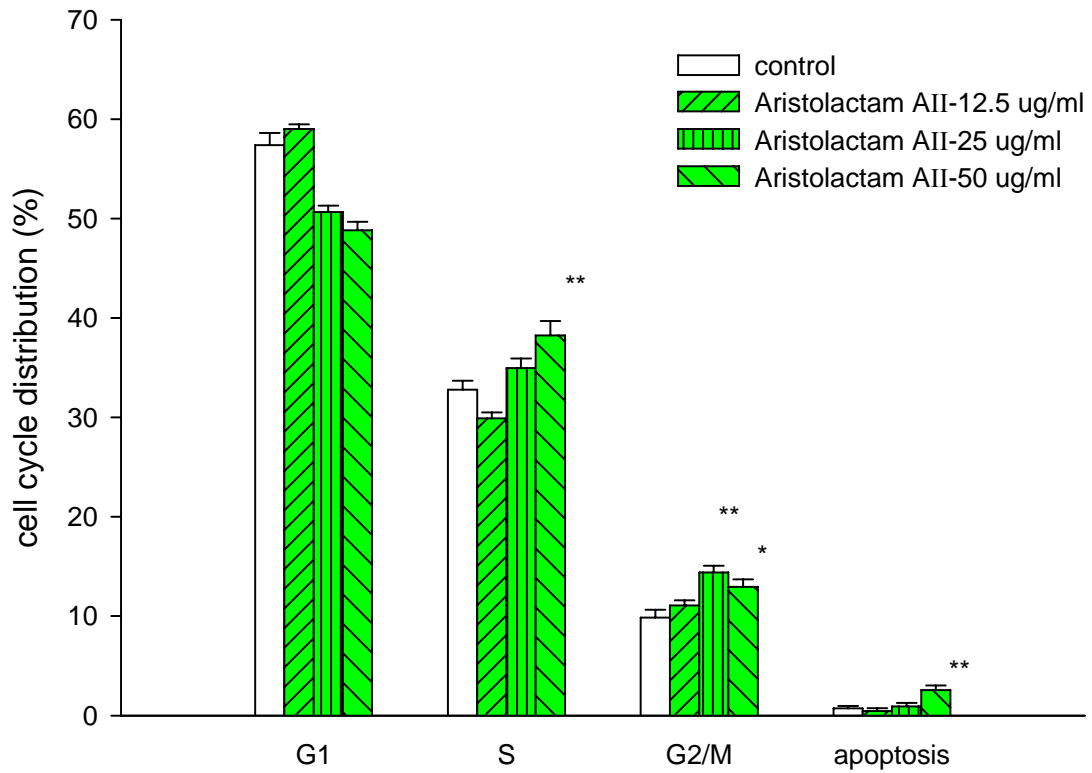


Fig.29 Effects of aristolactam AII on A549 cell cycle distribution. aristolactam AII treatment for 24h altered A549 cell cycle distribution and arrested at S/G2/M phase.

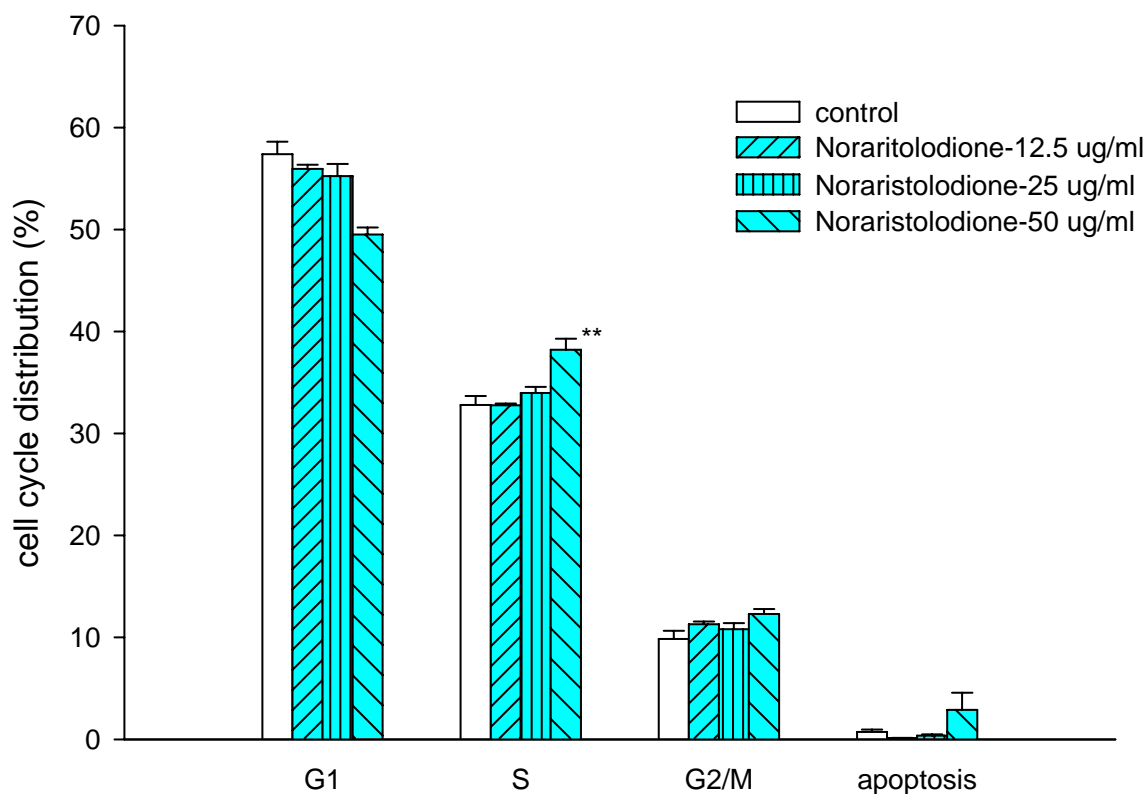


Fig. 30 Effects of noraristolodione on A549 cell cycle distribution. Noraristolodione treatment for 24h altered A549 cell cycle distribution and arrested at S/G2/M phase.

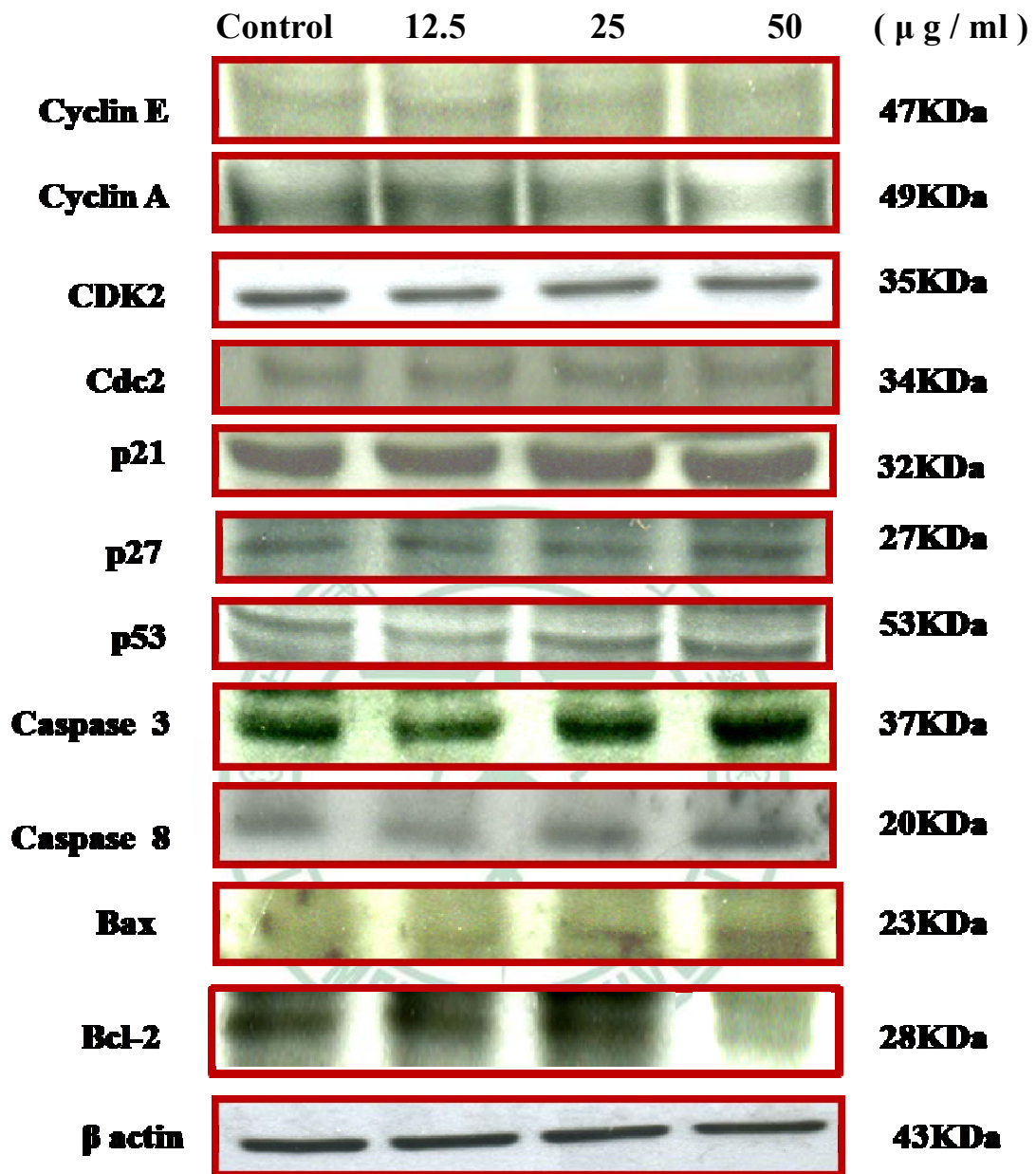


Fig.31 Suppression of CDKs, cyclins, Bcl-2 protein expression and up-regulation of apoptotic protein expression (caspase 3, caspase 8 and p21, p27, p53 and Bax) by aristolactam BII treatment. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam BII for 24h.

Table 2. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam BII for 24h and each data represented the expression of cell cycle-related and apoptosis proteins

Proteins Level(%)	Proteins / β actin	control	aristolactam BII		
			12.5 μ g/ml	25 μ g/ml	50 μ g/ml
	Cyclin E	100	96.45 \pm 0.69**	92.77 \pm 0.93**	88.47 \pm 2.42**
	Cyclin A	100	99.03 \pm 1.62	93.09 \pm 1.63*	83.86 \pm 2.08**
	Cdc 2(CDK 1)	100	97.04 \pm 2.11	93.86 \pm 1.29**	92.13 \pm 2.89
	CDK 2	100	99.34 \pm 4.66	92.72 \pm 3.32	90.75 \pm 4.25
	p21	100	97.47 \pm 0.58	103.10 \pm 2.72	106.66 \pm 4.44
	p27	100	108.44 \pm 0.68***	110.67 \pm 2.65*	117.49 \pm 2.95**
	p53	100	101.18 \pm 0.40	117.21 \pm 4.71*	127.31 \pm 2.49***
	Caspase 3	100	104.60 \pm 1.60*	106.83 \pm 0.29***	118.93 \pm 0.945***
	Caspase 8	100	118.39 \pm 5.45*	120.74 \pm 4.90*	131.12 \pm 3.24***
	Bax	100	107.43 \pm 1.83*	109.84 \pm 1.03***	124.47 \pm 1.65***
	Bcl-2	100	83.50 \pm 0.53***	80.11 \pm 0.75***	74.31 \pm 0.73***

* P < 0.05 , ** p < 0.01 , *** p < 0.001 compared with control group.

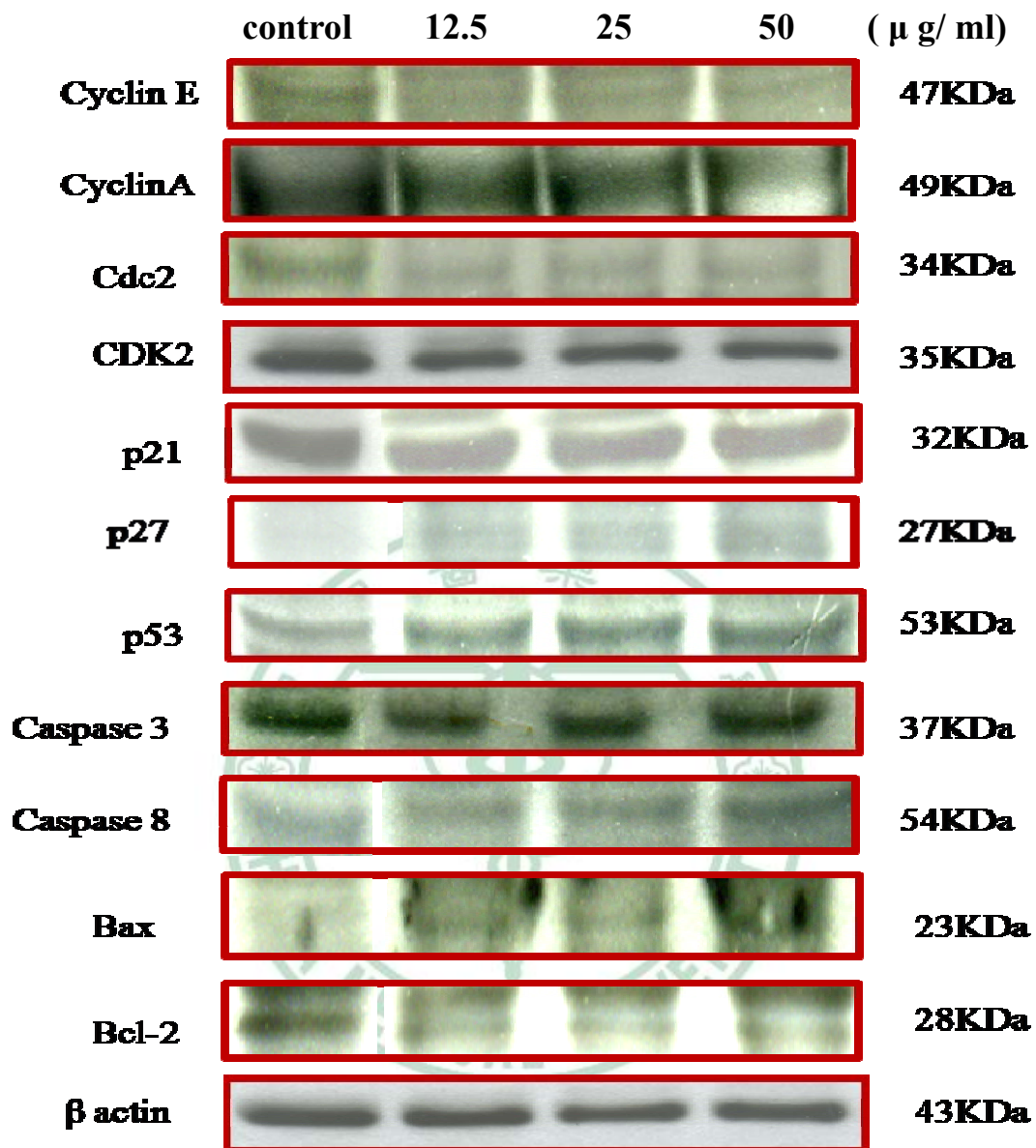


Fig. 32 Suppression of CDKs, cyclins, Bcl-2 protein expression and up-regulation of apoptotic protein expression (caspase 3, caspase 8 and p21, p27, p53 and Bax) by aristolactam AII treatment. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam AII for 24h.

Table 3. A549 cells were treated with various concentration of aristolactam AII for 24h and each data represented the expression of cell cycle-related and apoptosis proteins

Proteins / β actin	control	aristolactam AII		
		12.5 μ g/ml	25 μ g/ml	50 μ g/ml
Cyclin E	100	93.20 \pm 2.18**	87.88 \pm 3.05*	81.36 \pm 3.65**
Cyclin A	100	88.66 \pm 2.42**	90.79 \pm 1.00***	83.13 \pm 2.71**
Cdc 2(CDK 1)	100	91.32 \pm 3.38	90.87 \pm 2.38*	83.19 \pm 2.95**
CDK 2	100	92.86 \pm 4.27	89.61 \pm 4.28	88.89 \pm 5.37
p21	100	105.80 \pm 4.41	110.63 \pm 4.23	116.76 \pm 7.11
p27	100	109.41 \pm 2.42*	120.33 \pm 3.25**	130.00 \pm 3.29***
p53	100	120.22 \pm 6.27*	129.65 \pm 4.11**	145.08 \pm 6.29**
Caspase 3	100	107.13 \pm 4.24	114.97 \pm 3.53*	121.32 \pm 2.78**
Caspase 8	100	110.20 \pm 6.99	113.91 \pm 6.93	120.97 \pm 7.31*
Bax	100	107.32 \pm 2.33*	119.76 \pm 2.01***	130.73 \pm 2.36***
Bcl-2	100	90.86 \pm 4.08	85.29 \pm 3.45*	78.43 \pm 6.03*

* P < 0.05 , ** p < 0.01 , *** p < 0.001 compared with control group.

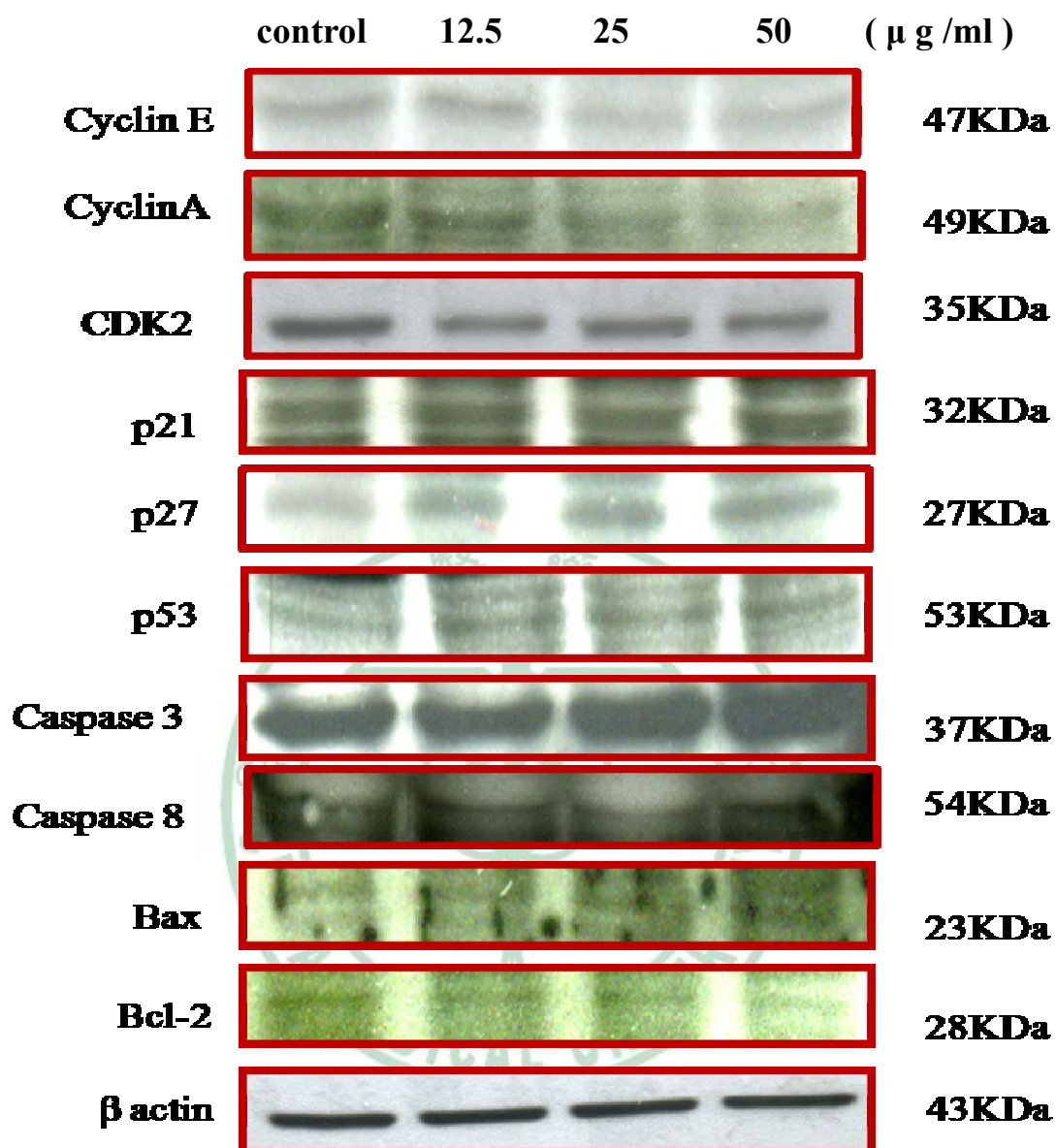


Fig. 33 Suppression of CDKs, cyclins, Bcl-2 protein expression and up-regulation of apoptotic protein expression (caspase 3, caspase 8 and p21, p27, p53 and Bax) by noraristolodione treatment. A549 cells were treated with various concentration of noraristolodione for 24h.

Table 4. A549 cells were treated with various concentration of noraristolodione for 24h and each data represented the expression of cell cycle-related and apoptosis proteins

	Proteins / β actin	control	noraristolodione		
			12.5 μ g/ml	25 μ g/ml	50 μ g/ml
Proteins Level(%)	Cyclin E	100	93.27 \pm 9.06**	90.65 \pm 1.09**	82.48 \pm 1.34***
	Cyclin A	100	95.50 \pm 1.91	87.09 \pm 3.98*	70.13 \pm 1.46***
	CDK 2	100	95.98 \pm 1.58	91.08 \pm 5.73	91.95 \pm 3.93
	p21	100	109.90 \pm 1.76**	113.60 \pm 2.20**	117.21 \pm 2.76**
	p27	100	111.56 \pm 4.88**	121.69 \pm 3.26**	128.93 \pm 5.22**
	p53	100	103.47 \pm 1.52	105.92 \pm 1.34*	116.97 \pm 1.26***
	Caspase 3	100	110.31 \pm 2.90*	115.03 \pm 3.28*	123.19 \pm 4.03**
	Caspase 8	100	106.71 \pm 2.46	110.13 \pm 1.26**	121.88 \pm 4.50**
	Bax	100	107.03 \pm 1.48**	115.37 \pm 3.36*	120.15 \pm 3.24**
	Bcl-2	100	92.84 \pm 3.22	77.96 \pm 1.16***	75.10 \pm 0.87***

* P < 0.05 , ** p < 0.01 , *** p < 0.001 compared with control group.

第四章 討論

民間常見的魚腥草用藥，過去有學者對其抗發炎研究是採用誘發動物胸肋膜炎及耳朵水腫，本實驗以致炎劑 carrageenan 造成小鼠足蹠浮腫，由測其排水量得知發炎程度，分成給魚腥草粗抽物組及對照組，及以 Indomethacin 當正對照組，實驗結果證實魚腥草粗抽物具有抗發炎作用，在劑量 100mg/kg 時的抗發炎活性大於 Indomethacin (4mg/kg) (如 Fig.6 所示)。根據研究文獻指出，前驅發炎 (pro-inflammatory) 物質與抗發炎 (anti-inflammatory) 物質之間平衡失調時，過量的前驅發炎化學物質(chemokines)導致發炎的產生 [25]，長期慢性發炎可能促進血管新生 [26]，進而演變為快速腫瘤的生長，由此可知發炎與癌症之間具有密不可分的關聯 [27-30]。

由於魚腥草具抗發炎作用，是否也具抗癌作用呢？由過去的研究文獻記載，魚腥草確實對一些人類的癌細胞株，如非小細胞肺癌(A549 細胞)、卵巢癌 (SK-OV-3 細胞)、黑色素瘤 (SK-MEL-2 細胞)、中樞神經系統癌細胞(XF-498 細胞) 和結腸癌 (HCT-15 細胞) 產生抑制生長效果 [13]，可惜的是沒有把抗癌作用機轉做詳盡研究，這激起了我們對魚腥草是如何達到抑制癌細胞作用產生興趣。在台灣肺癌從 1997 到 2007 年幾乎是國人十大癌症死因之首 [15]，目前臨床

上對於肺癌之治療多使用化學治療 (chemotherapy) 及放射性療法 [31, 32]，皆有其副作用，因此，本研究擬探討魚腥草對於肺癌細胞之作用及其可能機轉，以期能提供魚腥草在臨床應用之參考。

首先選用了 2 株非小細胞肺癌 A549 (來自人類) 和 LLC (來自老鼠) 做存活率測試，由 MTT 試劑分析結果得知，魚腥草粗抽物對 A549 及 LLC 都具有明顯抑制生長效果 (由 Fig. 8 和 Fig. 9 之結果可知)，進一步研究針對 A549 細胞探討其作用機轉。由流式細胞儀進行 A549 細胞存活率實驗，得到的結果與 MTT 試劑分析相似 (Fig. 10 和 Fig. 8 所示)，兩者不同的分析方式在經過 48 小時的魚腥草粗抽物劑量 0.25 mg/ml 時，皆能抑制 50% 的細胞存活；經過魚腥草粗抽物處理的 A549 細胞與對照組相比較，在倒立式光學顯微鏡下觀察，發現其細胞形態隨著時間和劑量的增加，A549 細胞部分變得不完整、碎小且不貼壁 (Fig.11)，當細胞受到損傷時，可能進行凋亡或壞死[33-35]，觀察外在細胞形態的變化，只能看到細胞較小且皺縮破裂[36, 37]。

為了進一步了解魚腥草造成 A549 細胞死亡之作用及其可能機轉，本研究以魚腥草粗抽物處理過之 A549 細胞進行其細胞週期的變化，以進一步探討魚腥草之抗癌機制。細胞週期生長的控制有賴於週期素 (Cyclins) 和週期素依賴性激酶 (CDKs) 所形成的複合物

[38]，而細胞週期可區分為休眠期 (G0 phase)、第一間期 (G1 pahse)、合成期 (S phase)、第二間期 (G2 pahse) 和分裂期 (M phase)，這些複合物(Cyclins / CDKs) 在各期分別是: G1 期會大量表現的 cyclinD / cdk4 或 cyclinD / cdk6;在晚期 G1 進入初期 S 期則是由 cyclinE / cdk2 負責; S 期中大量表現 cyclinA / cdk2;在 G2 和 M 期是 cyclinA / cdc2(cdk1) 或 cyclinB / cdc2 (cdk1)。另一種調控蛋白質稱週期素依賴性激酶抑制劑 (CDKI)，包括 2 大家族: INK4 (Inhibitor of Cdk4) 家族，成員有 p16^{INK4A}、p15^{INK4B}、p18^{INK4C} 和 p19^{INK4D}，全都是特異性鍵結在 Cdk4 和 Cdk6； CIP/KIP (Cdk Interacting Protein/ Kinase Inhibitory Protein) 家族，成員有 p21^{CIP1}、p27^{KIP1} 和 p57^{KIP2}，較廣泛鍵結在 CDK4、CDK6、CDK2 和 Cdc2。當 CDKI 與 Cyclins / CDKs 複合物結合時，會導致細胞週期的停止[39, 40]，依據研究發現 p21^{CIP1} 過量表現會引起細胞週期停滯在 S 期 [41]，而 p27^{KIP1} 過量表現引起細胞週期停滯在 G1/S 期 [42]，且兩者皆會誘導細胞進行凋亡作用[42]。

臨床上抗癌藥可分細胞週期專一性與非專一性藥物，專一性藥物例如:抗代謝藥物 (Antimetabolites) [43-45] 對 S 期最具作用，抗生素類(Antibiotics) [46]的 Bleomycin 可導致細胞停滯在 G2 期[47]，長春花鹼 (Vinca alkaloids) 抑制 G2 分裂期中的微小管、半合成之

普達非倫生物鹼類 (podohyl alkaloids) 的 Etoposide 可阻斷較後期 S-G2 期; 非專一性藥物例如: 烷化製劑 (Alkylating agents) 的 Mechlorethamine 及其他化學治療劑 Cisplatin 對正在進行增殖的細胞較敏感, 尤其是 G1 與 S 期[48]。經過魚腥草粗抽物處理的 A549 細胞, 以流式細胞儀分析, 發現隨著魚腥草粗抽物劑量與時間的增加, 在 G1 或 S 期產生蓄積現象, 顯示魚腥草粗抽物可使 A549 細胞週期停滯在 G1/S 生長期 (如 Fig.12、Fig.13 和 Fig.14 所示) 。

Grimison 等 2000 年曾指出肺癌細胞之抑制與 cip/kip 蛋白重新分布而抑制了 CDK2 之表現, 而使細胞停滯於 G1 期 [49]。如 Fig.34 [50] 所示, 與細胞週期 G1/S 期相關之 cyclin D / CDK4 / CDK6、cyclin E / CDK2 和 cyclin A / CDK2 複合蛋白質受到 p53, Myc 蛋白質和 cip / kip 家族 (包括 p21, p27, p57) 與 Ink4 家族 (包括 p15, p16, p18, p19) 所調控, 其中 p53 蛋白質影響 cip / kip 家族, 可以抑制 cyclins / CDKs 複合蛋白質, 而 Ink4 家族主要是抑制 D-型的 cyclin / CDK 複合蛋白質, 負向調節細胞週期, 抑制細胞的增生; Myc 蛋白質則是正向調節細胞週期, 促進細胞的增生[49]。利用西方墨點免疫轉漬技術 (western blot), 將細胞週期相關的蛋白質表現出來, 實驗結果顯示 A549 細胞其 G1/S 期相關之 cyclin D1、cyclin E、cyclin A 和 CDK4 / CDK6 及 CDK2 蛋白質, 表現量皆隨魚腥草粗抽物劑量增加而遞減

(如 Fig.17 所示)，p27^{KIP1} 蛋白質表現量則隨魚腥草粗抽物劑量增加而增加 (如 Fig.26 所示)，由此可知，魚腥草對 G1/S 期之作用乃與影響前述 G1/S 期相關之蛋白質表現有關。

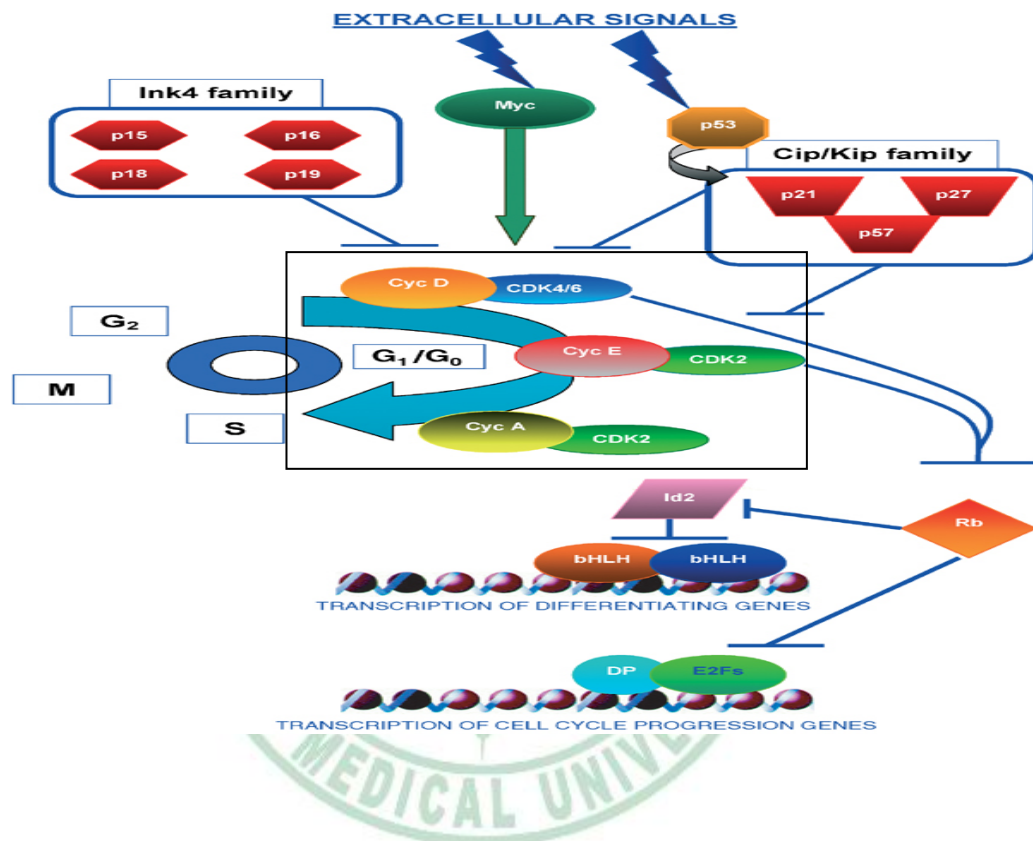


Fig.34. Cell cycle regulation and differentiation.[50]

由本研究發現魚腥草粗抽物可使 A549 細胞之細胞週期停止及死亡，因此進一步探討魚腥草造成 A549 細胞死亡的作用機轉。利用 Annexin V-FITC/PI 試劑進行雙染，當細胞進行凋亡早期時，磷脂絲氨酸 (phosphatidylserine，簡稱 PS) 會外露於細胞膜外，Annexin V 對磷脂絲氨酸有親和性，利用與標定螢光物質 (FITC) 結合後，可

使用螢光顯微鏡或流式細胞儀偵測細胞凋亡的發生；碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一種核酸染料，它不能透過完整的細胞膜，但對凋亡中晚期的細胞和死細胞，PI 能夠透過細胞膜而使細胞核染紅[51, 52]。因此將 Annexin V 與 PI 合併使用，即可將處於不同凋亡時期的細胞區分開來。由實驗結果顯示，加入魚腥草粗抽物引起 24、48、72 小時 A549 細胞的凋亡並不明顯，而是出現在較晚期的凋亡 (如 Fig.15 和 Fig.16 所示)。細胞進行凋亡作用可透過內在路徑 (intrinsic pathway) 或外在路徑 (extrinsic pathway)。細胞質內的一種轉錄因子稱 p53，它是一種腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene)，當細胞接受死亡訊息時，會活化增加 p53 蛋白質的表現，促進凋亡性蛋白質 Bax/Bak 增加，同時抑制抗凋亡性蛋白質 Bcl-2/Bcl-XL 的表現，再使細胞內的粒線體外膜通透性增加，釋放出 cytochrom c 或 AIF (apoptosis inducing factor)，接著誘導凋亡性蛋白質 caspase 活化，造成細胞核的改變，進而使細胞進行凋亡作用，此稱之為粒線體之凋亡路徑，即為細胞凋亡的內在路徑 (intrinsic pathway) [53, 54]；若是細胞死亡訊息藉由死亡受體接收，則會透過 Fas/Fas ligands 作用，造成下游的凋亡性蛋白質 caspase 活化，使細胞進行凋亡作用，稱之為細胞凋亡的外在路徑 (extrinsic pathway) [55, 56]。由 Fig.17 western blot 結果顯示，凋亡性蛋白質 caspase 3 與

caspase 8 的表現量隨魚腥草粗抽物劑量增加而增加，而 Bax, Bcl-2, caspase 9 蛋白質則未偵測到有表現，因此推測魚腥草粗抽物造成 A549 細胞凋亡可能來自於外在路徑（如 Fig.36 所示）。

從魚腥草全株分離出大約有 44 種化合物 [57]，由其粗抽物對 A549 細胞的毒性作用，推論可能是來自魚腥草所含生物鹼成份，再經測試 5 種魚腥草所含生物鹼，結果發現其中 3 種生物鹼對 A549 細胞抑制效果較顯著，於是就以這 3 種魚腥草所含生物鹼: aristolactam BII, aristolactam AII 以及 noraristolodione，來探討其對 A549 細胞之作用，結果顯示 A549 細胞經過不同濃度的 3 種魚腥草所含生物鹼處理 24 小時後，皆使 A549 細胞存活率下降（由 Fig.27 可知）。以流式細胞儀分析出細胞週期的變化，A549 細胞在 aristolactam BII 和 aristolactam AII 的處理之下，發現 S 期或 G2/M 期產生蓄積，也就是細胞週期的生長停止在 S 期或 G2/M 期（由 Fig.28-29 可知）；而在 noraristolodione 的處理之下，結果使得 A549 細胞之週期停滯在 S 期（如 Fig.30 所示），同時這 3 種魚腥草所含生物鹼在劑量 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，會促進 A549 細胞產生凋亡現象。

藉由電泳跑膠及免疫轉漬方式來呈現蛋白質的表現量，結果顯示 aristolactam BII 和 aristolactam AII 在 S 期或 G2/M 期的 cyclinE, cyclinA, CDK2, Cdc 2 蛋白質隨劑量增加而漸減，而控制細胞週期的

p21, p27, p53 隨劑量增加而漸增，與細胞凋亡有關的蛋白質 caspase 3, caspase 8, Bax 隨劑量增加而漸增，Bcl-2 則隨劑量增加而漸減 (如 Fig.31-32 所示)；noraristolodione 在 S 期的 cyclinE, cyclinA, CDK2 隨劑量增加而漸減，而控制細胞週期的 p21, p27, p53 隨劑量增加而漸增，與細胞凋亡有關的蛋白質 caspase 3, caspase 8, Bax 隨劑量增加而漸增，Bcl-2 則隨劑量增加而漸減 (如 Fig.33 所示)。p53 是一種轉錄因子，是負責調控細胞正常生長與進行凋亡之間的平衡，在癌細胞中存在大量的變異性 p53[58, 59]。由實驗結果可知，魚腥草所含之生物鹼會經由影響細胞週期相關蛋白質及細胞凋亡有關之蛋白質而抑制 A549 細胞之活性，可能是一方面透過活化 p53 而促使 p21 / p27 增加，讓 A549 細胞週期停滯，另一方面藉由增加 Bax, caspase 8, caspase 3 的表現及降低 Bcl-2 活性 [60]。

由以上實驗結果顯示，魚腥草粗抽物與其所含生物鹼 (aristolactam BII, aristolactam AII 以及 noraristolodione) 對 A549 細胞可能的生長抑制機制：藉由腫瘤抑制性蛋白質 p53 的增加，促使控制細胞週期的 p21, p27 蛋白質增加，一方面降低 A549 細胞之週期中的 cyclinE, cyclinA, CDK2 蛋白質，另一方面增加凋亡性蛋白質 caspase 3, caspase 8 和 Bax，降低抗凋亡蛋白質 Bcl-2，綜合本研究之實驗結果，得知魚腥草的可能作用機轉如 Fig.35-36 所示。

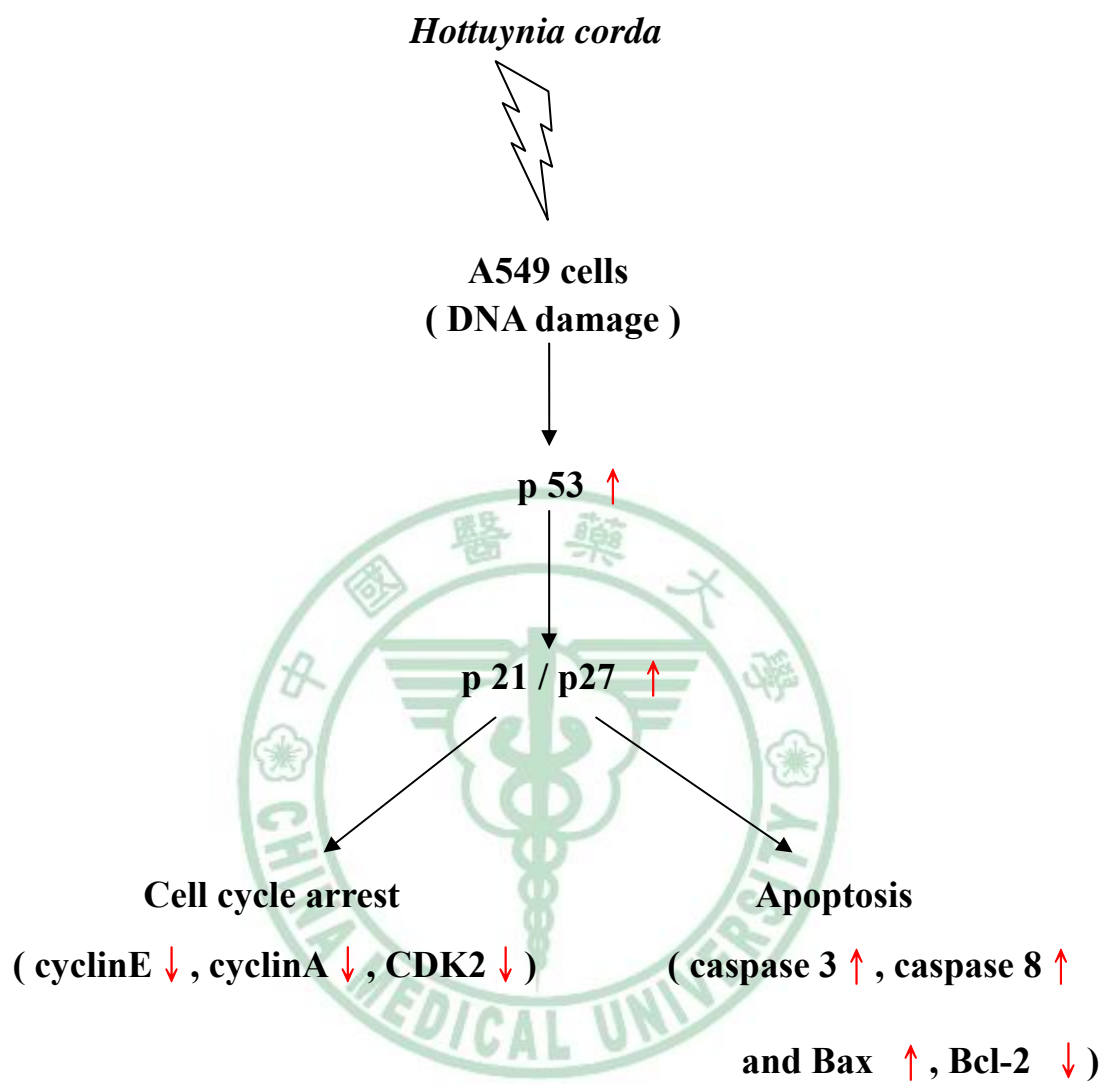


Fig.35 The possible action mechanism of *Hottuynia cordata*.

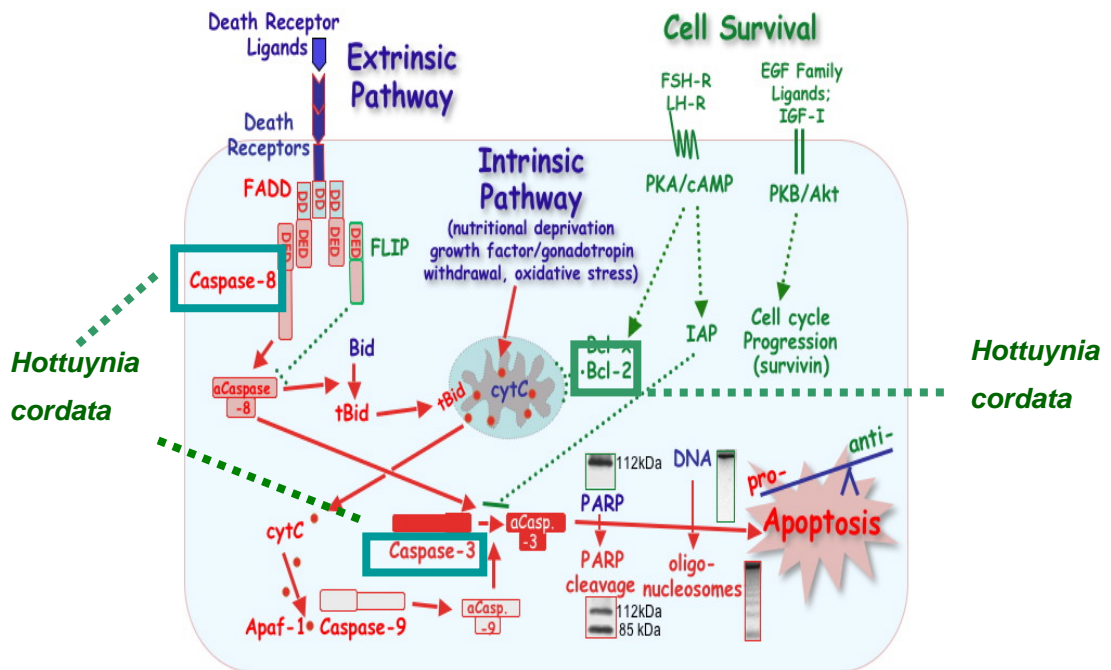


Fig.36 Possible action site of *Hottuyenia cordata* on cell apoptosis pathway.

第五章 結論

本研究使用民間常用的魚腥草做抗肺癌研究，除了驗證具有抗發炎作用，還進行魚腥草粗抽物在小鼠之急性毒性試驗，其半數致死劑量(LD50)統計曲線圖顯得陡峭，證明有它具備一定毒性存在，此結果可供臨床使用魚腥草之參考。

由細胞實驗結果，顯示魚腥草粗抽物抑制 A549 細胞活性的機轉，是透過減少細胞週期之 cyclin D1、cyclin E、cyclin A 和 CDK4/CDK6 及 CDK2 蛋白質的表現，及增加 p27^{KIP1} 的表現，使 A549 細胞停滯於 G1/S 期，此外活化 caspase 3 和 caspase 8 之外在路徑促進細胞凋亡。魚腥草所含生物鹼對 A549 細胞的作用，則是降低細胞週期之 cyclin E、cyclin A 和 CDK2 及 Cdc2 (CDK1) 蛋白質的表現，及增加 p21^{cip}、p27^{KIP1} 以及 p53 蛋白質的表現，使 A549 細胞停滯於 S 或 G2/M 期，同時增加 caspase 3, caspase 8, Bax 及減少 Bcl-2 蛋白質的表現，導致 A549 細胞經由內在與外在路徑進行細胞凋亡作用(如 Fig.36 所示)。

比較魚腥草之粗抽物以及生物鹼之作用，雖然造成 A549 細胞週期在不同時期的抑制作用(粗抽物:抑制 G1/S 期,生物鹼:抑制 S 或 G2/M 期)，不過皆能降低 S 期所含之 cyclin E, cyclin A, CDK2

蛋白質作用，以及引起凋亡的外在路徑 caspase 蛋白質增加，這些相似之處說明了魚腥草粗抽物與生物鹼皆會使 A549 細胞之週期停滯於 S 期，以及活化 caspase 蛋白質而促進 A549 細胞進行凋亡作用。

魚腥草粗抽物中的成分目前已知的就有至少 44 種 [57]，本實驗魚腥草之粗抽物及生物鹼所達到的抗肺癌效果不完全吻合，有許多可能的原因，粗抽物混合著各種有效成分，彼此交互作用所形成的抑制效果或增或減，而單一成分魚腥草之生物鹼所發揮的抑制 A549 細胞作用，可能類似魚腥草之粗抽物，此類傳統藥用植物作用本來就不少，由本研究只進行魚腥草對 A549 肺癌細胞的實驗結果，推論魚腥草具有抗人類 A549 肺癌細胞的作用，其作用機轉乃是經由 p53 的活化而使得 p21 / p27 增加，造成 A549 肺癌細胞之週期停滯於 S 期，同時誘導外在路徑之死亡受體活化而引起 caspase 蛋白活化，以及內在凋亡路徑引起 Bax 蛋白質增加和 Bcl-2 蛋白質減少，造成 A549 細胞的凋亡 [59]。

第六章 參考文獻

1. 中華大辭典 上海科學技術出版社出版發行 1979年7月第1版
2. Toda S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of *Houttuynia cordata* on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide in vitro. *Journal of Medicinal Food*. 2005; 8(2):266-8.
3. Lu HM, Liang YZ, Yi LZ, Wu XJ. Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;104(1-2):245-9.
4. Chen YY, Liu JF, Chen CM, Chao PY, Chang TJ. A study of the antioxidative and antimutagenic effects of *Houttuynia cordata* THUNB. Using an oxidized frying oil-fed model. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2003;49(5):327-33.
5. Ng LT, Yen FL, Liao CW, Lin CC. Protective effect of *Houttuynia cordata* extract on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *American Journal of Chinese Medicine*. 2007;35(3):465-75.
6. Lin TY, Liu YC, Jheng JR, et al. Anti-enterovirus 71 activity screening of chinese herbs with anti-infection and inflammation activities. *American Journal of Chinese Medicine*. 2009;37(1):143-58.
7. Chiang LC, Chang JS, Chen CC, Ng LT, Lin CC. Anti-Herpes simplex virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata*. *American Journal of Chinese Medicine*. 2003;31(3):355-62.
8. Chang JS, Chiang LC, Chen CC, Liu LT, Wang KC, Lin CC. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* THUNB. *American Journal of Chinese Medicine*. 2001;29(2):303-12.
9. Lau KM, Lee KM, Koon CM, et al. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;118(1):79-85.
10. Li GZ, Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(10):1864-8.
11. Kim GS, Kim DH, Lim JJ, et al. Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract

- against the intracellular bacterial pathogen salmonella within the RAW 264.7 macrophage. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2008;31(11):2012-7.
12. Lu H, Wu X, Liang Y, Zhang J. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia* THUNB. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo). 2006;54(7):936-40.
 13. Kim SK, Ryu SY, No J, Choi SU, Kim YS. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Archives of Pharmacal Research*. 2001;24(6):518-21.
 14. 行政院衛生署統計室: 97 年死因統計。
 15. Bruske-Hohlfeld, I., Environmental and occupational risk factors for lung cancer. *Methods in molecular biology*, 2009. 472: p. 3-23.
 16. Bach, P.B., Smoking as a factor in causing lung cancer. *The journal of the American Medical Association*, 2009; 301(5): p.539-41.
 17. Lam WK. Lung cancer in Asian women-the environment and genes. *Official journal of the Asian Pacific Society of Respirology*. 2005;10(4):408-17.
 18. Melloni B, Vergnenegre A, Lagrange P, Bonnaud F. [Radon and domestic exposure]. *Revue des maladies respiratoires*. 2000; 17(6):1061-71.
 19. Ito, K. Oizumi, S. Fukumoto, S. Harada, M. Ishida, T. Fujita, Y. Harada, T. Kojima, T. Yokouchi, H. Nishimura, M, Clinical characteristics of pleomorphic carcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 2009,1-7.
 20. Oscar Auerbach, M., P. Julio M. Frasca, t VERTA R. Parks, BS,, and M. and Harry W. Carter,. A Comparison of World Health Organization (WHO) Classification of Lung Tumors by Light and Electron Microscopy. *American Cancer Society*. 1982;10:2079-88.
 21. Van Schil, P.E., Surgery: therapeutic indications. *Cancer radiotherapie*, 2007. 11(1-2): p.47-52.
 22. Zheng, W., Z.H. Gao, and L.N. Wu, [Clinical observation on treatment of radiative pneumonia in patients with lung cancer by integrative Chinese and Western medicine]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2007. 27(12): p. 1121-3.
 23. Meeran SM, Katiyar SK. Cell cycle control as a basis for cancer

chemoprevention through dietary agents. *Frontiers in bioscience*. 2008;13:2191-202.

24. 羅宇翔, 林志峰, 楊世群, 吳明忠. 細胞週期的新標靶在抗癌藥物的發展 化學 中華民國九十七年第六十六卷第四期 293-308 頁
25. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917):860-7.
26. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 2002 Feb;16(2):217-26.
27. Tauler J, Mulshine JL. Lung cancer and inflammation: interaction of chemokines and hnRNPs. *Current opinion in pharmacology* 2009 Jun 29, 9:1-5
28. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Current drug targets. Inflammation and allergy* 2002;1(4):327-41.
29. Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surgical oncology* 2002;10(4):153-69.
30. Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends in molecular medicine* 2002;8(1):10-6.
31. Rixe O, Spano JP, Seigneur J. [Chemotherapy of non-small cell lung cancer: non-cisplatin based combinations]. *Anticancer Drugs*. 2000;11 Suppl 1:S29-33.
32. Liu X, Wang B, Fu X. [Clinical study on treatment of advanced non-small cell lung cancer with Chinese herbal medicine combined with synchronous radio- and chemotherapy]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2000;20(6):427-9.
33. Shang XJ, Yao G, Ge JP, Sun Y, Teng WH, Huang YF. Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner. *Journal of andrology* 2009;30(2):122-6.
34. Zucchini-Pascal N, de Sousa G, Rahmani R. Lindane and cell death: at the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. *Toxicology*. 2009;256(1-2):32-41.
35. Lohmann C, Muschaweckh A, Kirschnek S, Jennen L, Wagner H, Hacker G. Induction of tumor cell apoptosis or necrosis by

- conditional expression of cell death proteins: analysis of cell death pathways and in vitro immune stimulatory potential. *Journal of immunology* 2009;182(8):4538-46.
36. Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PloS one*. 2009;4(2):e4632.
 37. Thaver V, Lottering ML, van Papendorp D, Joubert A. In vitro effects of 2-methoxyestradiol on cell numbers, morphology, cell cycle progression, and apoptosis induction in oesophageal carcinoma cells. *Cell biochemistry and function*. 2009; 27(4): 205-10.
 38. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009, (5):1-15.
 39. Lecanda J, Ganapathy V, D'Aquino-Ardalan C, et al. TGFbeta prevents proteasomal degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for cell cycle arrest. *Cell Cycle*. 2009;8(5): 742-56.
 40. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*. 1999;13(12):1501-12.
 41. Yao J, Duan L, Fan M, Yuan J, Wu X. Overexpression of BLCAP induces S phase arrest and apoptosis independent of p53 and NF-kappaB in human tongue carcinoma : BLCAP overexpression induces S phase arrest and apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*. 2007;297(1-2):81-92.
 42. Supriatno, Harada K, Hoque MO, Bando T, Yoshida H, Sato M. Overexpression of p27(Kip1) induces growth arrest and apoptosis in an oral cancer cell line. *Oral oncology*. 2002;38(7):730-6.
 43. Clarke SJ, Jackman AL, Harrap KR. Antimetabolites in cancer chemotherapy. *Advances in experimental medicine and biology*. 1991;309A:7-13.
 44. Parker WB, Secrist JA, 3rd, Waud WR. Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs*. 2004;5(6):592-6.
 45. Budde LS, Hanna NH. Antimetabolites in the management of non-small cell lung cancer. *Current treatment options in oncology*.

- 2005;6(1):83-93.
46. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PloS One*. 2009; 4(5): e5592.
 47. Arai M, Sato H, Kobayashi H, et al. Selective inhibition of bleomycin-induced G2 cell cycle checkpoint by simaomicin alpha. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 317(3):817-22.
 48. 陳智堯, 薛又仁, 顏宗賢, 邱俊杰, 林泉洋 最新圖解藥理學 二版. 合記圖書出版社. 2002.
 49. Grimison B, Langan TA, Sclafani RA. P16Ink4a tumor suppressor function in lung cancer cells involves cyclin-dependent kinase 2 inhibition by Cip/Kip protein redistribution. *Cell growth & differentiation*. 2000;11(10):507-15.
 50. Galderisi U, Jori FP, Giordano A. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene*. 2003;22:5208-19.
 51. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*. 2006;1(3):1458-61.
 52. Span LF, Pennings AH, Vierwinden G, Boezeman JB, Raymakers RA, de Witte T. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry*. 2002;47(1):24-31.
 53. Jiang M, Wang CY, Huang S, Yang T, Dong Z. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2009;296(5):F983-93.
 54. Kurosu T, Ohki M, Wu N, Kagechika H, Miura O. Sorafenib induces apoptosis specifically in cells expressing BCR/ABL by inhibiting its kinase activity to activate the intrinsic mitochondrial pathway. *Cancer Research*. 2009;69(9):3927-36.
 55. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2008;19(3-4):325-31.
 56. Tun C, Guo W, Nguyen H, et al. Activation of the extrinsic caspase pathway in cultured cortical neurons requires p53-mediated down-regulation of the X-linked inhibitor of apoptosis protein to induce apoptosis. *Journal of neurochemistry*.

2007;102(4):1206-19.

57. 周書正 魚腥草之成分研究 國立成功大學化學研究所 碩士論文
2005.
58. Wierod L, Rosseland CM, Lindeman B, et al. Activation of the p53-p21(Cip1) pathway is required for CDK2 activation and S-phase entry in primary rat hepatocytes. *Oncogene*. 2008; 27(19):2763-71.
59. Katiyar SK, Meeran SM, Katiyar N, Akhtar S. p53 Cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo. *Molecular carcinogenesis*. 2009;48(1):24-37.
60. Zuckerman V, Wolynec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *The Journal of pathology*. 2009,2584-97

