

編號：CCMP94-RD-045

傳統中藥方劑對人類乳癌細胞增生 抑制作用和細胞程式死亡機制之探討

林俊清

高雄醫學大學

摘 要

在全世界，每年幾乎增加一百萬個乳癌的新病例，在發生於女性的癌症病例中，乳癌佔了 18%。以英國為例，每年約有 14 萬人死於乳癌。台灣地區由於經濟快速成長，飲食日漸西化，導致女性乳癌發生率急遽上升，目前乳癌已是僅次於子宮頸癌，排名女性第二好發的癌症。

本研究目標乃從生命科學發展迅速的分子生物學理論與傳統中藥方劑之作用相互配合，深入地探索其抗乳癌之活性機轉，如此不僅可增加西方醫學對中醫藥作用的接受度，並賦與中醫藥複方藥效的現代化意義。

藥物對細胞增生的抑制活性以 XTT 方式測得；細胞週期的分佈則是以核酸染料將 DNA 染色後以 flow cytometry 的方式分析；Apoptosis 的偵測以 Annexin V assay kit 和 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick endlabeling (TUNEL) 方法分析；p53、p21、Fas/APO-1、Fas ligand 的表現以 ELISA 方式測得；Caspase 的活性以 caspase activity assay kit 分析。其他蛋白質的表現以 Western blot 的方式偵測；in vivo 的活性評估以 nude mice 的實驗方式評估。

研究發現傳統方劑散腫潰堅湯和紫草根牡蠣湯對人類乳癌細胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞具有良好的細胞增生抑制效果。在濃度 300 μ g/ml 的濃度可達最好的增生抑制效果。散腫潰堅湯和紫草根牡蠣湯對抗 MCF-7 細胞增生的 IC₅₀ 值分別為 103.2 和 125.1 μ g/ml；對抗 MDA-MB-231 細胞增生的 IC₅₀ 值分別為 116.2 和 133.6 μ g/ml。

在散腫潰堅湯的作用機轉方面，細胞以散腫潰堅湯處理 24 小時後可促使 MCF-7 和 MDA-MB-231 的細胞週期停滯於 G0/G1 期，此一效果隨著劑量增加而增加。再者，以 AnnexinV-FITC/PI 和 TUNEL 染色的方法也發現散腫潰堅湯會誘發細胞進行細胞凋亡，此一效果隨著劑量和處理時間增加而增加。在分子機制方面，散腫潰堅湯可以透過 p53-independent 的方式增加 p21 的表現。散腫潰堅湯也會抑制 cyclin D1 和 cyclinD2 的表現，進而抑制細胞週期的演進。再者，散腫潰堅湯也會改變 proapoptotic 和 antiapoptotic Bcl-2 蛋白的比值進而啟動粒線體相關的 apoptosis 路徑，包括 cytochrome c 的釋放、caspase-9 的活化而造成細胞死亡。相對於粒線體途徑，散腫潰堅湯則對 death receptor 無有意義的影響。最後，利用 in vivo 的實驗模式也證實散腫潰堅湯在動物體也具有腫瘤抑制的效果。

關鍵詞：細胞凋亡、乳癌、細胞週期、傳統方劑

Number: CCMP94-RD-045

The proliferative inhibition and apoptotic mechanism of Traditional Chinese Medicinal Prescription (TCMP) in human breast cancer Cells

Chun-Ching Lin

Kaohsiung Medical University

ABSTRACT

About a million women in the world are found to have invasive breast cancer every year. Breast cancer, counted up 18 percent, is one of the leading cancers in women. In England, one hundred and forty thousands of women die from breast cancer. The breast cancer case increases rapidly in Taiwan. At present, breast cancer and cervical cancer, respectively, are the first and second leading cancers in the women of Taiwan.

Our laboratory focuses on the integration of traditional Chinese traditional medicines (CTM) with molecular biology to further study the active mechanism their anti-breast cancer activity. This allows a better appreciation of CTM in the modern era and also a better understanding of its underlying potential for therapy, thus increasing its acceptance in Western medicine.

Cell proliferation inhibition was assay by XTT. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Quantitative assessment of apoptosis was analyzed by an Annexin V assay kit and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick endlabeling (TUNEL) method. The levels of p53, p21, Fas and Fas ligand was assay by ELISA kits. The activity of caspases was

measured by caspase activity assay kits. The tumor growth of SZKJT was assessed by *In vivo* tumor xenograft study.

From preliminary research and screening, Zi Cao Gen Mu Li Tang (ZCGMLT, 紫根牡蠣湯) and San Zhong Kui Jian Tang (SZKJT, 散腫潰堅湯) had inhibitory effect on breast cancer cells proliferation. They were therefore selected to test on two human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. Our results showed that SZKJT inhibited the proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells by inducing apoptosis and blocking cell cycle progression in the G0/G1 phase. ELISA and immunoblot assay showed that SZKJT significantly increased the expression of p53 and p21/WAF1 protein, and decreased the levels of cyclinD1 and D2 contributing to cell cycle arrest. In addition, SZKJT also induced apoptosis in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells, as determined by Annexin V staining assay. SZKJT increased the expression of Bax and Bak, but decreased the level of Bcl-2 and subsequently triggered the mitochondrial apoptotic pathway (activation of caspase-9 and caspase-3). Furthermore, SZKJT's inhibition of cell growth effect was also evident in a nude mice model. Taken together, these results suggest a potential anticancer effect of SZKJT against human breast cancer cells.

Keywords: apoptosis, breast cancer, cell cycle, Chinese medicinal prescription

壹、前言

在全世界，每年幾乎增加一百萬個乳癌的新病例，在發生於女性的癌症病例中，乳癌佔了 18%。以英國為例，每年約有 14 萬人死於乳癌。台灣地區由於經濟快速成長，飲食日漸西化，導致女性乳癌發生率急遽上升，目前乳癌已是僅次於子宮頸癌，排名女性第二好發的癌症。乳癌發生的位置最常見於乳房外上方但包括乳頭在內之其他部分亦可發生。乳癌除了侵犯乳房外，更可能轉移到遠處器官如骨骼、肺、肝、腦等，造成身體健康之損害，甚至危及生命。在台灣，乳癌好發年齡在 40~50 歲之間，較歐美國家的好發年齡約提早十歲，但任何成年婦女皆有機會罹患此症⁽²⁾。乳癌治療仍以手術治療為主，也以放射治療、化學治療及荷爾蒙治療為輔。外科手術治療並無法完全移除所有的物性組織，所以通常需要再術後進行化學或放射性治療。現行的研究發現，一些乳癌會藉由改變 Estrogen receptor 或是過度活化 oncogene 的表現而對荷爾蒙治療或化療劑如 Taxol 產生抗藥性^(3,4)。所以，尋求一個能預防乳癌的發生、有效且安全的治療藥、或是能預防手術後再發的有效藥物乃當務之急。

在天然藥物的研究上，過去幾年也發現一些可抗乳癌的方劑、生藥及其純化成分等，如等 *Rheum palmatum*、soyabean isoflavones、*Ganoderma lucidum*、*Hemsleya amabilis*、和 *Punica granatum L.*⁽⁵⁻⁹⁾，但是部分成果處在一些初步的研究，尤其是在機轉的建立上仍有許多的未知，因此從現代分子醫學理論與傳統中藥方劑之作用相互配合，深入地探索其抗乳癌之活性機轉，如此不僅可增加西方醫學對中醫藥作用的接受度，並賦與中醫藥複方藥效的現代化意義更是孕育乳癌新藥產生的最大搖籃。

細胞凋亡 (apoptosis or programmed cell death) 在正常的發展 (development) 上為一種必要的生理過程，其能維持組織生理的平衡及參與免疫防禦系統⁽¹⁰⁻¹¹⁾。除此，它也與一些病理的反應有相當大的關聯性，如急性的神經傷害 (acute neurological injuries)、退化性神經性疾病 (neurodegenerative disease)、心血管疾病 (cardiovascular disease)、免疫疾病 (immunological disease)、AIDS 和癌症⁽¹²⁾。被定義為 Apoptotic death 的特徵包括 cell collapse、membrane blebbing, cell shrinkage、chromatin condensation、DNA fragmentation，最後細胞會裂解為 apoptotic body 而受到鄰近細胞或吞噬細胞的吞噬。相較於壞死 (necrosis)，

apoptosis 不會引起細胞膜在早期就失去完整性而將細胞內容物釋放至細胞間質中而引發發炎反應，故一般認為誘發細胞進行 apoptosis 是一種較好的抗癌機制，藉此減少藥物可能引起的副作用⁽¹³⁾。在 apoptosis 的過程中，caspase 位居於中心的角色，目前已知在哺乳類動物中至少有十四種 caspase 參與 apoptosis。其中可分為 effector (下游的) caspases，和 initiator (上游的) caspases^(11, 14)。Effector caspases 包括有 caspase 3、6、7，這幾個 caspase 為細胞受到瓦解的主要執行者；相對的，initiator caspases 則為下游 caspase 的活化者，這類的 caspase 包括 caspase 8、9 和 10。目前已知的 caspase 受質已有上百種⁽¹⁴⁾，當這些受質受到 caspase 的切裂時，細胞就會呈現 apoptosis 的死亡特徵，如 caspase 3 可將 nuclease 的抑制劑—ICAD (inhibitor of CAD) 切除而放出 CAD (caspases-activated Dnase)，此時 CAD 的活化會將 DNA fragmentation^(15,16)。另外，一些細胞骨骼、細胞生存因數、DNA 修復系統等也都是 caspase 的受質^(14, 17-19)。

Fas/FasL (ligand) 系統為啟動細胞進行 apoptosis 重要的機制之一⁽²⁰⁻²¹⁾。Fas receptor 為 TNF (tumor necrosis factor) receptor 家族中的 type I 膜蛋白，當其被活化時，receptor 會進行 trimerization，並吸納 adaptor molecule FADD (Fas-associated death domain protein) 結合至 receptor 位於細胞質中的 domain；另一方面，FADD 會進一步吸納多分子的 procaspase 8 形成所謂的 DISC (death-inducing signaling complex)，此時 procaspase 8 會因構形的改變和濃度的提高而活化成 caspase 8，具有完整活性的 caspase 8 可活化 caspase 3 和 caspase 7，而 caspase 3 會再活化 caspase 6，這些 effector caspase (包括 caspase 3、6、7) 會進一步去影響一連串的 caspase substrate，最後使細胞 apoptotic death⁽²²⁾。Fas receptor 已被證實分佈於許多的器官中，包括胸腺、心臟、肺臟和肝臟中⁽²³⁻²⁴⁾。它的活化必須要有 ligand (FasL) 與其結合才得以進行，FasL 為 TNF family 的 type II membrane protein，其可分為兩種形式⁽²⁵⁾：一為 soluble Fas Ligand (sFasL)，另一為 membrane-bound FasL (mFasL)。sFasL 乃是經由 metalloprotease-like enzyme 切斷 mFasL 所產生的⁽²⁶⁾。sFasL 的生理功能近來備受爭議，有些文獻認為不論是 sFasL 或 mFasL 都會活化 Fas receptor 進而啟動 apoptosis，但是相較於 mFasL，sFasL 是一種較弱的 apoptosis 誘導⁽²⁷⁾，低濃度的 ethanol 也被證明會誘導 sFasL 的增加而促使肝癌細胞進行 apoptosis⁽²⁸⁾；但另一方面，也有研究認為肝癌細胞會經由增加 sFasL 的表現而使 Fas receptor 去敏感化，以致於癌細胞能逃避免疫系統的偵測，因此 sFasL 量可用來做為評估 cancer 的指標^(29,30)。

除此，Fas receptor 的表現被向下修正也是另一個癌細胞得以逃過免疫防禦機制的主因之一⁽²⁹⁾。所以 Fas receptor 和 FasL 包括 sFasL 和 mFasL 對於藥物的作用佔有一席之地。事實上，愈來愈多的證據證實許多抗癌藥的作用機轉是透過活化 Fas/FasL 系統，且細胞 Fas receptor 的表現也會影響癌細胞對於抗癌藥物的敏感性⁽³¹⁻³²⁾。因此，本研究也針對受測藥物在 Fas receptor 及 Fas ligand 包含 sFasL 和 mFasL 的探討。

另一個會啟動細胞 apoptosis 反應的 pathway 是經由粒腺體 (mitochondrion)^(10, 11, 33) 途徑，當細胞受到一些細胞內或細胞外的 stress 如缺氧、放射線傷害、DNA 傷害時，cytochrome *c*、Apaf-1、AIF (apoptosis inducing factor)、Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP-binding protein with low PI) 等會由粒線體中釋放出來，其中 cytochrome *c* 和 Apaf-1 會與 procaspase 9 在 dATP 的存在下形成 apoptosome，此時 procaspase 9 得以活化成 caspase 9，並且再進一步的活化一連串 caspase cascade，最後使細胞凋亡。而此一 apoptosis 訊息的活化，尤其是 cytochrome *c* 的釋放，最主要受到 Bcl-2 family 的調節控制⁽³⁴⁾，Bcl-2 family 的成員依照其結構相似度和功能可次分為三類：第一類為具有抗 apoptosis (antiapoptotic member) 的能力，此類的 protein 大多侷限於粒腺體的表面，如 Bcl-2、Bcl-X_L；第二類和第三類的 protein 則為促進 apoptosis 的分子 (proapoptotic member)，包括 Bax、Bak、Bid 等，不像第一類的成員，這兩類的 protein 會穿梭於細胞質和胞器間，當其接受到 apoptosis 的訊息才會集中至粒線體^(10, 35)。Bcl-2 家族同類的成員可進行 homodimerize。另外，antiapoptotic 和 proapoptotic 的 protein 也會形成 heterodimers，透過此一機制，proapoptotic member 和 antiapoptotic member 可以互相制衡彼此的功能。所以，細胞是否會進行 apoptotic death，決定於 antiapoptotic 和 proapoptotic member 的量，當 antiapoptotic member 多於 proapoptotic member 時，細胞存活；反之，細胞則進行 apoptosis^(10, 36)。近來已有文獻證明 Bcl-2 family 間成員的表現比例會影響細胞的增生，造成細胞的癌化⁽³⁷⁻³⁸⁾，更甚之，其亦會影響癌細胞對抗癌藥物的敏感性⁽³⁹⁻⁴⁰⁾。所以，當藥物能降低 Bcl-2 或 Bcl-X_L 的表現時，則必能幫助提高藥物毒殺癌細胞的有效性；相對的，若藥物能提升 proapoptotic member 的表現，也有助於癌細胞進行 apoptotic death。

另一個在抗癌藥的抗癌機制中佔有極大份量的因數為腫瘤抑制因數 p53。而現今有愈來愈多的證據顯示，在人類的癌症中有 80% 的癌症與 p53 的突變有關⁽⁴¹⁾，其中也包含肝癌。p53 參與許多生理反應的調節，

包括細胞週期控制、DNA 修復、genome 的穩定、apoptosis、分化、老化和血管新生⁽⁴²⁻⁴⁴⁾。在正常細胞中，p53 的含量極低，但是當細胞受到一些 stress，如放射線傷害、缺氧、營養物缺乏、DNA 受損時則會引起 p53 的活化⁽⁴²⁾。一旦活化 p53 後，透過 p53 的 transactivation function 影響一些下游分子，可能會使細胞出現兩種結果。一為細胞週期 (cell cycle) 停止，細胞可藉此啟動 cell checkpoint 和 DNA 修復機制，使細胞在複製前可將受損的 DNA 修復。p53 所引導的細胞週期停止可能於前期 (G1 phase) 或後期 (G2/M phase)⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾，其中 cell cycle 停止於 G1 phase 被研究的較為透徹。在此 pathway 中，p53 影響幾個分子的表現，如 Gadd45、cyclin G 和 p21⁽⁴²⁾。其中 p21 乃為一種 CDK (cyclin-cdk complex) 的抑制劑，其在 p53 所引導的 cell cycle arrest 扮演了關鍵性的角色。在一般正常的狀況下，細胞要從 G1 phase 進入 S phase 時，必須要有活化的 CDK complex 將 Rb 磷酸化，被磷酸化的 Rb 失去與 E2F 的結合能立即放出遊離的 E2F，此時細胞可由 G1 phase 進入 S phase。所以，當 CDK complex 受到 p21 的抑制時，未磷酸化的 Rb 會增多，使 E2F 無法被釋出，因此細胞便停止於 G1 phase^(42, 45)，即無法進入 S phase。相較於 G1 checkpoint，cell cycle 停止於 G2/M phase 的真正機轉則仍存在較多的未知，近來研究認為，被 p53 影響的下游分子可能包括 p21、14-3-3 protein、Gadd 45、cdc 2 和 cyclin B 等⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾。類似地，p21 也會抑制 cdc2 和 cyclin B 所組成的 CDK complex 使其無法運作而致細胞停滯在 G2 phase。

另一個完全不同於細胞週期停止的反應結果是 apoptosis⁽⁴²⁾。此一結果的成因是來自於 p53 可調節許多分子的表現，p53 可增加幾個 proapoptotic factor 的表現，包括前述的 Fas receptor、Bax、PIG3 和 IGF-BP3。IGF-BP3 可拮抗細胞生存因數 insulin-like growth factor-1 的作用⁽⁴⁹⁾，而 PIG3 (p53-inducing gene) 則會造成細胞處在氧化 stress 的環境下，使細胞死亡⁽⁵⁰⁾。除了向上調整的功能，p53 也會向下修正 antiapoptotic factor 的表現，如 Bcl-2^(42, 51)。如此一來，整個細胞的環境乃處於 apoptotic 訊息大於細胞生存訊息的條件，細胞因此便會啟動細胞程式死亡即 apoptosis。至於在 p53 活化後所表現出的結果是細胞週期停止或是進行 apoptosis 則須視更多條件而定，如刺激因數的種類、細胞的種類、DNA 的傷害程度、細胞環境中生存因數的量和活化的 p53 之多寡等⁽⁴²⁾。但無論是細胞週期停止或是引發 apoptosis，抗癌藥都可藉此抑制癌細胞的增生。所以也有愈來愈多的文獻證明，當細胞的 p53 突變後對於抗癌藥的敏感性將低於 p53 未突變的細胞株⁽⁵²⁻⁵³⁾。

不論是 cell cycle arrest 或是 apoptosis，其中的相關因數如 p21、Bax、Bcl-2 和 Fas 等的表現以及其與 p53 的種種關係性⁽⁴²⁾。因此，在本研究中亦設計著比較受測藥物在兩種不同的細胞株，p53 正常、ER 表現的 MCF-7 和 p53 突變的 Hep、ER 不表現的 MDA-MB-231 cell line，其各個分子在細胞中含量的變化以釐清受測藥物的抗癌機制是透過 p53-dependent 或 p53-independent 的途徑，同時可清楚的建立出其抗癌機轉。

整體研究分成三大步驟，第一是初步抗癌活性的建立，確認抑制癌細胞增生所需之有效抑制濃度，分別確認藥物濃度和作用時間與其效應的關係性，並初步地探討抑制癌細胞增生的狀況，包括細胞凋亡及細胞週期停止等等。第二則針對藥物對腫瘤細胞抑制其增生和誘發細胞凋亡之機轉確立，評估該純化成分對 p53、p21、cyclins、Fas/Fas ligand 和 Bcl-2 family 的影響，建立其完整的抗乳癌途徑。最後則以 nude mice (in vivo) 的方式確立藥物在 in vivo 活性的評估。

貳、材料與方法

一、傳統中藥方劑之組成及來源

(一) 散腫潰堅湯《蘭室秘藏》

昆布 2.5g、黃柏 4g、知母 2.5g、栝樓根 2.5g、桔梗 2.5g、三稜 1.5g、莪朮 1.5g、連翹 1.5g、黃連 1g、黃芩 4g、葛根 1.5g、升麻 1.5g、柴胡 2.5g、當歸尾 1g、甘草 1.5g、龍膽草 2.5g、白芍 1g

(二) 紫草根牡蠣湯《徽癘新書》

當歸 5g、牡蠣 4g、川芎 3g、白芍 3g、紫草根 3g、升麻 2g、黃耆 2g、大黃 1.5g、忍冬花 1.5g、甘草 1g

二、傳統中藥方劑之製備

將各個方劑(200g)，分別用一公升的沸水煮沸達二小時然後過濾，如此重覆三次且合併三次濾液，經減壓濃縮後再以真空冷凍乾燥，計算產率。分別放入瓶內且置於微電腦除濕保管箱，以備每次實驗所需。

三、傳統中藥方劑抗乳癌之分子機轉研究

(一) 細胞培養

人類乳癌細胞 MCF-7 和人類肺纖維母細胞 IMR-90 培養於 DMEM 培養液中，MDA-MB-231 則培養於 RPMI 1640 培養液中。其含 10% 牛血清 (Fetal calf serum) 及含 100units/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin 和 0.25 μ g/ml amphotericin B，培養在 37 $^{\circ}$ C 與 5% CO₂ 的培養箱內。每三天更換一次培養基溶液，當長至培養瓶單層長滿 (confluent)，便做繼代培養 (subculture)。實驗期視實驗目的，以血球計數器計算細胞數，再取細胞數目作分析。

(二) 細胞增生抑制作用分析

XTT { sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl) -3,4-tetrazolium] -bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate } 方法測定原理是利用細胞內粒線體上的脫氫酵素 (dehydrogenase)，可將四錯鹽 (tetrazolium salt) 還原反應產生一水溶性、無毒性、橘紅

色螢光的 Formazan 之現象。先處理細胞將之種於 96Well 內使得每一 Well 最終為 10×10^3 個細胞，於培養箱培養 24 小時後重新注入新的培養液 90 μ l 並加入不同濃度的藥物 10 μ l。所使用之藥物濃度為 300, 150, 50 及 25 μ g/ml。所設定的時間經處理後，則加入 50 μ l 的 XTT labeling mixture 在每個 well 內。放置於 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內過 4 至 6 小時，以波長 492nm 及 690nm 測其光學活性 (optical density, O.D.) 而求得藥物所能抑制 50% (IC₅₀) 癌細胞生長之濃度。

(三) 細胞週期分析

將以藥物處理過的細胞取出，取 4×10^6 個細胞均勻打散，以 PBS 清洗一次，加入 300 μ l 的 PBS，再將細胞均勻打散，緩和加入 700 μ l 的絕對酒精來固定細胞，然後置於 4°C 下 30 分鐘。待細胞固定完成後，離心去除上清液，並加入含 0.5% Triton、0.05% RNase 之 PBS 於 37°C 下作用 1 小時，再加入含 50 μ g/ml PI (Propidium iodide) 之 PBS 於 4°C 下放置 15 至 30 分鐘。離心去除上清液，加入 500 μ l PBS，使細胞懸浮於其中，以流式細胞儀 (flow cytometry) 分析。

(四) 細胞凋亡 (apoptosis) 分析

細胞以藥物處理過後，以 trypsin 的方法取下細胞，並以 Annexin V/PI 進行雙重染色，再以 flow cytometry 分析之。

細胞以藥物處理過後，以 trypsin 的方法取下細胞，並以 TUNEL kit 進行雙重染色，再以 flow cytometry 分析之。

(五) 藥物對於 p53、p21、Fas、Fas ligand protein 之影響測定

將細胞種於 10mm dish 中，待細胞長至 7-8 分單層滿時，以不同濃度之受測藥物培養至所需時間。定量取出 1×10^6 的細胞，將之懸浮於 resuspension buffer (20mM Tris、0.5mM EDTA、1% NP40、0.5% sodium deoxycholate、0.05% SDS、1mM PMSF、1 g/ml Aprotinin、2 μ g/ml Leupetin)，於培養冰上 30 分鐘，離心後取上清液，即為細胞萃取液。在事先 coated 有抗人類 p53、p21、Fas、Fas ligand 蛋白的單株抗體的 96well 盤的每一個 well 中加入 100 μ l peroxidase-labeled detection antibodies 以及 lysis buffer 適當稀釋的細胞萃取液 100 μ l，置於室溫下 2 小時後，以 washing buffer 清洗 3 次，再加入 100 μ l substrate solution 至每個 well 中，於室溫下暗

室中反應 10-30 分鐘。最後加入 100 μ l stop solution 終止反應，並以 ELISA reader (450nm) 定量分析。

(六) 藥物對於 soluble Fas Ligand 的影響

將細胞種於 10mm dish 中，待細胞長至 7-8 分單層滿時，以不同濃度之受測藥物培養至所需時間。加入細胞與藥物培養的上清液 100 μ l 至事先 coated 有抗人類 Fas ligand 蛋白的單株抗體的 96well 盤的小孔中，置於室溫下培養 3 小時，以 washing buffer 清洗 3 次後，每一 well 加入 100 μ l detector antibody 於室溫下反應一小時，以 washing buffer 清洗 3 次，再加入 100 μ l streptavidin-linked horseradish peroxidase (SA-HRP) conjugated antibodies 至每個 well 中，於室溫下反應 30 分鐘。最後以 washing buffer 和去離子水各清洗三次後，加入 100 μ l substrate solution 於暗室反應 30 分鐘後以 100 μ l stop solution 終止反應，並以 ELISA reader (450nm) 作定量分析。

(七) 藥物對於 Bcl-2 protein、MAKPs、p27、cyclins、cdks 的影響

1. 細胞蛋白質含量測定

配置 0.1mg/ml 的 BSA (Bovine serum albumin)，在每個 Well 內分別加入 0、6、12、18、24、30、36、42 μ l 的 BSA 後，再加入 240、234、228、222、216、210、204、198 μ l 的去離子水，最後在各 Well 中加入 Dye reagent blue，於室溫靜置 5 分鐘後以波長 595nm 由 ELISA reader 分析。即得 0、2、4、6、8、10、12、14 μ g/ml 的標準曲線。得到標準曲線後，則加入 2 μ l 細胞萃取液，再加入 238 μ l 去離子水及 60 μ l Dye reagent solution，於室溫作用 5 分鐘，以 ELISA reader (592nm) 定量分析。

2. SDS-PAGE 電泳之偵測

將細胞取下，以冰 PBS 洗二次後，立即加入 Lysis buffer (0.32M sucrose、20mM Tris-HCl、pH7.5、2mM EDTA、5mM EGTA、50 μ g/ml Leupeptin、0.2mM PMSF、0.1% α -Mercaptoethanol)，用超音波震碎機 (sonicator) 將細胞均質化，再以 800g，4 $^{\circ}$ C 離心 15 分鐘，則得上清液為細胞質層，沉澱物為細胞膜層。另將細胞膜層加入含 1% NP-40 之 Lysis buffer

後，經超音波震碎機均質化，使沉澱物溶解即可。得到的蛋白質取 50-100 μ g 加入定量 Sample buffer (0.5M Tris-HCl、pH6.8、Glycerol、10% SDS、2- α -Mercaptoethanol、0.05% Bromophenol blue)及 10% α -Mercaptoethanol 後加熱 100 $^{\circ}$ C，5 分鐘，再依序加到各 Well 中。將電壓設定在 66 伏特進行電泳，待 SDS-PAGE 中的染劑跑出 SDS-PAGE 後則關掉電源。

3. SDS-PAGE 上之蛋白質轉移到 PVDF membrane

PVDF membrane 需浸潤在 Transfer buffer (20mM Tris-base、Glycin、0.1% SDS、10% Methanol)內備用。將 SDS-PAGE 層覆蓋於 PVDF 上，並在其上下各加二張 3 mm Filter paper，使成似「三明治」(sandwich)夾層狀。將「三明治」(sandwich)夾層置於 Transfer buffer 中，電流設定在 53 微安培 3 小時完成，然後取出。

4. 西方點漬法 (Western blotting)

PVDF membrane 加入適量 Blocking buffer [5%脫脂奶於 TBS-T (20mM Tris-base、137 mM Sodium chloride、Hydrochloric acid、0.1% Tween-20)內]於 4 $^{\circ}$ C 下進行 Blocking 一夜，之後以 Washing buffer (TBS-T)連續洗 30 分鐘 (5 分鐘 6 次)，然後加入稀釋好的 Primary antibody 均勻覆蓋在 PVDF membrane 上作用 2 小時，而後再以 Washing buffer 持續洗 30 分鐘。再將 Secondary antibody 稀釋到合適濃度，均勻倒在 PVDF membrane 上反應 1 小時。最後再以 Washing buffer 洗 30 分鐘，再加入 Detection buffer 1 分鐘，待略乾後壓片、洗片即可完成。Primary antibody 為抗 Bcl-2 protein 之抗體。

(八) nude mice (in vivo) 抗癌活性評估

將 breast cancer cells 移入 nude mice 背部並使之長至一定大小，後以口服給藥 60 天。實驗組和控制組各 15 隻，實驗組給予 1000mg/kg 散腫潰堅湯，控制組投與等量體積的生理食鹽水，每天測量腫瘤大小及老鼠體重。實驗終了取出老鼠內臟加以秤重。

參、結果

一、紫根牡蠣湯和散腫潰堅湯對於乳癌細胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 之增生抑制效果

研究結果發現傳統方劑散腫潰堅湯和紫草根牡蠣湯對人類乳癌細胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞具有良好的細胞增生抑制效果。在濃度 300 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度可達最好的增生抑制效果：散腫潰堅湯：88.6% (MCF-7) 和 82.7% (MDA-MB-231)；紫草根牡蠣湯：78.3% (MCF-7) 和 72.1% (MDA-MB-231) 生長抑制作用。散腫潰堅湯和紫草根牡蠣湯對抗 MCF-7 細胞增生的 IC_{50} 值分別為 103.2 和 125.1 $\mu\text{g/ml}$ ；對抗 MDA-MB-231 細胞增生的 IC_{50} 值分別為 116.2 和 133.6 $\mu\text{g/ml}$ 。（圖 1A 和 B）。在初步篩選時針對散腫潰堅湯及紫根牡蠣湯的細胞增生活性進行 72 小時的評估，結果發現 48 小時和 72 小時的培養並不會有極大的活性差異，因此本研究選用 48 小時作為實驗終點。

為了評估散腫潰堅湯及紫根牡蠣湯對於腫瘤細胞是否具有選擇性，特以人類正常肺纖維母細胞 IMR-90 做為正常細胞對照。結果顯示無論是散腫潰堅湯及紫根牡蠣湯在劑量高達 500 $\mu\text{g/ml}$ 仍不具有意義性的細胞增生抑制作用，因此推論散腫潰堅湯及紫根牡蠣湯對於腫瘤有高度的選擇性（圖 1C）。

二、散腫潰堅湯促使 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞週期停滯於 G0/G1 期

在散腫潰堅湯的作用機轉方面，以 flow cytometry 分析發現細胞以散腫潰堅湯處理 24 小時後可促使 MCF-7 和 MDA-MB-231 的細胞週期停滯於 G0/G1 期，此一效果隨著劑量增加而增加（圖 2A 和 B）。當劑量為 100 $\mu\text{g/ml}$ 時，散腫潰堅湯使 MCF-7 細胞的 G0/G1 的細胞比例由 59.4% 提高至 68.2%；MDA-MB-231 細胞的 G0/G1 的細胞比例則由 52.4% 提高至 63.2%。而當散腫潰堅湯的劑量增加至 200 $\mu\text{g/ml}$ 時，效果則更加顯著，其中 MCF-7 細胞的 G0/G1 的細胞比例提高至 75.4%；MDA-MB-231 則增加至 71.4%。

三、散腫潰堅湯促使 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞進行細胞凋亡

在細胞凋亡的誘導方面，MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞以散腫潰堅湯培養 24 小時後，可偵測到典型的早期細胞凋亡特徵—PS 外翻的

情形 (圖三 A 和 B)。200 μ g/ml 散腫潰堅湯經 24 小時培養，誘導 MCF-7 細胞的進行凋亡細胞比例為 24.4%；MDA-MB-231 為 21.9%。此一效果隨時間增加而增加。

另外以分析 DNA 的斷裂量作為定量晚期細胞凋亡分析的實驗方面發現散腫潰堅湯可以有效的誘導 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞進行細胞凋亡，且隨著時間的增加，其效果漸增 (圖三 C 和 D)。在 MCF-7 細胞方面，100 μ g/ml 的散腫潰堅湯在 36 小時就能有效的誘發 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞 DNA 的斷裂。

四、散腫潰堅湯對細胞週期相關調控因數的影響

由於散腫潰堅湯對於 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞的細胞週期演進具有抑制作用，因此進一步探討散腫潰堅湯對於 G0/G1 細胞週期相關的調控因數包括 p53、p21/WAF1、cyclins (cyclin D1、cyclin D2 和 cyclin B) 的影響。首先，在 p53 方面，由於 MDA-MB-231 已經被證實不具有功能性的 p53，因此實驗設計上只偵測散腫潰堅湯對於 MCF-7 的 p53 表現的影響。結果發現，無論是 100 或 200 μ g/ml 的散腫潰堅湯在作用 3 至 24 小時後皆不會增加 MCF-7 細胞 p53 的表現，因此推斷 p53 對於散腫潰堅湯所造成的細胞週期抑制或誘發細胞凋亡可能無直接的關連性 (圖四 A)。相對的在 p21/WAF1 方面，無論是對 MCF-7 或是 MDA-MB-231 細胞，散腫潰堅湯皆可以有意義的增加 p21/WAF1 的表現。其中 200 μ g/ml 的效果優於 100 μ g/ml，且在培養 3 小時後就有效的增加 p21/WAF1 的表現，在 12 小時到達最高峰，之後則漸漸降低 (圖四 B 和 C)。由於散腫潰堅湯在 24 時有效的使乳癌細胞的細胞週期停滯於 G0/G1 期，因此推論 p21 參與散腫潰堅湯所造成的細胞週期停滯。

在 cyclins 的表現方面，由圖四 D 的結果顯示，無論是對 MCF-7 或是 MDA-MB-231 細胞，200 μ g/ml 的散腫潰堅湯會降低 cyclin D1 和 cyclin D1 的表現，此一抑制作用由 3 小時開始一直持續到 12 小時。但是散腫潰堅湯對於 cyclin B 的表現則無明顯的影響。再者，由於散腫潰堅湯在 3 小時就會增加 p21 的表現，而 p21 又可抑制 cyclin D1 和 cyclin D2 的作用。因此透過這些機制，散腫潰堅湯促使細胞週期停滯於 G0/G1 期。

五、散腫潰堅湯對 death receptor pathway 的影響

由於散腫潰堅湯會誘發細胞進行細胞凋亡，因此接下來探討散腫潰堅湯誘發細胞凋亡之相關分子機轉。首先探討 Fas/Fas ligand (Fas L) death receptor apoptotic pathway。結果發現，不論是在 MCF-7 或是 MDA-MB-231 細胞，以 100 或 200 μ g/ml 的散腫潰堅湯培養 6 至 48 小時後，都無法影響 Fas/APO-1 的表現 (圖五 A 和 B)。類似的，散腫潰堅湯無論是在 MCF-7 或是 MDA-MB-231 細胞，其對 membrane-bound Fas ligand 和 soluble Fas ligand 的表現亦無影響 (圖五 C-F)。同時，散腫潰堅湯對於 Fas/APO-1 pathway 所活化的 caspase-8 也無有意義的活化作用 (圖五 G 和 H)，因此推斷 Fas/Fas ligand (Fas L) death receptor apoptotic pathway 極有可能不參與散腫潰堅湯所誘發的細胞凋亡。

六、散腫潰堅湯對 mitochondria pathway 的影響

接下來分析第二個細胞凋亡的分子路徑：粒線體細胞凋亡路徑 (mitochondrial apoptotic pathway)。首先分析散腫潰堅湯對 Bcl-2 family proteins 包括 proapoptotic factors Bax、Bak 和 antiapoptotic factors Bcl-2 表現的影響。結果發現無論是在 MCF-7 或是 MDA-MB-231 細胞，200 μ g/ml 的散腫潰堅湯會增加 Bax 和 Bak 的表現，此一效果起始於 6 小時並延續至 24 小時 (圖六 A)。而在 antiapoptotic factor 方面，散腫潰堅湯會降低 Bcl-2 的表現，此一作用在兩個細胞株都可以被明顯的觀察到，其發生始於 6 小時並延續至 24 小時。因此，散腫潰堅湯對於 Bcl-2 而言，其不只會抑制它的表現，更可以藉由增加 proapoptotic Bcl-2-Bax 和 Bak 的表現而使細胞朝向 proapoptosis 的方向進行。

啟動粒線體細胞凋亡途徑最大的特色是使粒線體中的 cytochrome *c* 由粒線體釋放至細胞質。因此，藉由分離細胞質和粒線體後再利用免疫墨點方式偵測原本只存在粒線體的 cytochrome *c* 是否出現在細胞質，可以藉此觀察 cytochrome *c* 釋放的情形。結果發現，無論是在 MCF-7 或是 MDA-MB-231 細胞，經 200 μ g/ml 散腫潰堅湯經 12 小時的作用後，可以發現粒線體中 cytochrome *c* 的含量降低，相對的，細胞質中則可偵測 cytochrome *c*。因此推斷粒線體的 cytochrome *c* 在 12 小時的處理後會由粒線體釋放至細胞質中。到 24 小時時，粒線體的部分幾乎無法偵測到 cytochrome *c* 的存在；相對的，在細胞質中則可以偵測到大量的 cytochrome *c* (圖六 B) 顯示此時 cytochrome *c* 大部分都已釋放至細胞質了。由於散腫潰堅湯在 6 小

時開始就會改變 Bax/Bcl-2 的比例，而 proapoptotic Bcl-2 family 在粒線體所組成的 channel 已被證實會促進 cytochrome *c* 的釋放（12 小時的作用），因此推論散腫潰堅湯乃透過調控 Bcl-2 family protein 的表現啟動粒線體細胞凋亡路徑。

當 cytochrome *c* 由粒線體釋放至細胞質後會與 Apaf-1 和 procaspase-9 在 dATP 的存在下形成複合物（complex）稱為 apoptosome。此時，procaspase-9 藉由自我分解作用形成活化型的 caspase-9。由圖六 C 和 D 的結果顯示，無論是在 MCF-7 或是 MDA-MB-231 的細胞，100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 散腫潰堅湯皆可以有效的促使 caspase-9 的活化。活化作用由 12 小時開始，於 24 小時達到最高峰，隨後開始下降（圖六 C 和 D）。由於散腫潰堅湯於 12 小時候才促使 cytochrome *c* 由粒線體釋放至細胞質，因此在 caspase-9 在 6 小時時未見活化，須延遲至 12 小時開始，因此確認 caspase-9 的活化 Bcl-2 的調控、cytochrome *c* 的釋放有極大的關連性。

七、散腫潰堅湯之 *in vivo* 抗癌活性

最後進行 *in vivo* 活性評估。結果發現，每日投與 1000mg/kg 的散腫潰堅湯，連續投與 40 天，可以有效的抑制乳癌細胞 MDA-MB-231 在 nude mice 的生長高達 50%（圖七 A 和 B）。

再者，在連續投藥的過程中，相較於控制組，散腫潰堅湯對於老鼠的體重並無明顯的影響（圖七 C）。實驗終點時，比較控制組和實驗組的各個臟器重量（心、肝、肺、腎、脾）也發現散腫潰堅湯對於這些臟器的重量並無明顯的改變。因此確認散腫潰堅湯對於實驗老鼠並無明顯之毒性（圖七 D）。

肆、討論

乳癌是已發展和發展中國家最常見的惡性腫瘤之一⁽²⁻⁴⁾。本研究首度發現紫根牡蠣湯和散腫潰堅湯可以有效的抑制乳癌細胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞的生長。散腫潰堅湯抑制癌細胞生長的作用主要是透過抑制細胞週期的演進和誘發細胞進行程式性死亡。除此，紫根牡蠣湯和散腫潰堅湯對於正常人類纖維母細胞的存活不具有意義性的抑制作用，因此推測兩種方劑對腫瘤細胞具有高度選擇性。在兩個方劑組成中甘草、白芍和當歸為其共通組成。甘草的抽出物及數種活性成分(如 isoliquirteine) 已被證實具有抑制腫瘤增生和誘發細胞進行細胞凋亡的活性^(54, 55)。白芍和當歸的抽出物也被證實對數種癌症具有良好抑制效果。因此未來可針對甘草、白芍和當歸的活性成分進一步的深入研究⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾。

由於腫瘤細胞的細胞週期檢查站 (cell cycle checkpoint) 功能上的不完整使其相較於細胞週期檢查站功能完整的正常細胞對化療藥物會有較高的敏感性⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾。因此，調控細胞週期相關分子的活性及表現可以成為抗癌的策略之一。在經散腫潰堅湯培養過的 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞中發現，散腫潰堅湯可以藉由調整幾個細胞週期相關調控因數促使 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞的細胞週期停滯於 G0/G1 phase。散腫潰堅湯無論是對 p53-wild type MCF-7 或是 p53-mutation MDA-MB-231 皆會增加 p21/WAF1 的表現，且由於散腫潰堅湯並不影響 MCF-7 的 p53 表現量，因此推斷散腫潰堅湯對於 p21/WAF1 的表現乃是透過 p53-independent 的機制。除此之外，散腫潰堅湯亦可透過抑制 cyclinD1 和 cyclin D2 的表現抑制細胞週期的演進使期停滯於 G0/G1 期。因此，綜合對 CDK inhibitor 的向上調控和 cyclins 的表現的抑制作用，散腫潰堅湯有效的抑制乳癌細胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞週期的演進。

兩個最主要參與細胞凋亡的分子路徑，包括細胞死亡接受器和粒線體相關的細胞凋亡路徑⁽¹⁰⁻¹²⁾。在 MCF-7 和 MDA-MB-231 的細胞中，散腫潰堅湯並不增加 Fas/APO-1 receptor 以及相對應的 mFas ligand 和 sFas ligand 的表現；再者，散腫潰堅湯亦不增加 Fas/Fas ligand 系統的 initiator caspase—caspase-8 的活化，因此推斷 Fas/Fas ligand/caspase-8 的細胞死亡接受器的細胞凋亡路徑並不參與散腫潰堅湯所造成的細胞凋亡。但相對的，在粒線體相關的細胞凋亡路徑方面，散腫潰堅湯改變 Bax、Bak

和 Bcl-2 的平衡使之偏向 proapoptotic Bcl-2 family protein。因此綜合上述對 Bcl-2 family protein 的調節作用，散腫潰堅湯得以啟動粒線體的細胞凋亡機制—cytochrome *c* 由粒線體釋放至細胞質，並進一步的活化 caspase-9。因此，綜合對 Bcl-2 family proteins 的調整作用和 caspase-9 的活化作用，散腫潰堅湯有效的啟動乳癌細胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 進行細胞凋亡。

在 *in vivo* 的試驗模式中亦顯示每日投與 1000mg/kg 的散腫潰堅湯，連續投與 40 天，可以有效的抑制乳癌細胞 MDA-MB-231 在 nude mice 的生長高達 50%，因此確認散腫潰堅湯在動物體亦具有對抗腫瘤生長的活性。

伍、結論與建議

本研究結果確切證明傳統方劑紫根牡蠣湯和散腫潰堅湯皆可有效的抑制乳癌細胞之細胞增生。其中散腫潰堅湯主要是透過幾種機制：一、藉由增加 p21 和降低 cyclinD1 及 D2 的表現進而抑制細胞週期的演進；二、藉由調控 Bcl-2 family 的表現；三、啟動粒線體相關的細胞凋亡途徑而造成乳癌細胞的死亡。除此，由於 nude mice 的結果也證明散腫潰堅湯可以有效的抑制腫瘤在裸鼠身上的生長，因此證明散腫潰堅湯在 in vivo 的條件下亦具有抑制腫瘤生長的活性。因此，更進一步的人體實驗以及相關的實驗可更深入評估散腫潰堅湯在臨床的使用價值和安全性。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-045 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Morrow M, Gradishar W. Breast cancer. *BMJ* 2002;324(7334):410-4.
2. 中華民國行政院衛生署網站：<http://www.doh.gov.tw/>
3. Doyle LA, Ross DD.: Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; 22(47): 7340-58.
4. Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, Skaar TC, Gomez B, O'Brien K, Wang Y, Hilakivi-Clarke LA.: Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 2003; 22(47): 7316-39.
5. Campbell MJ, Hamilton B, Shoemaker M, Tagliaferri M, Cohen I, Tripathy D.: Antiproliferative activity of Chinese medicinal herbs on breast cancer cells in vitro. *Anticancer Res* 2002; 22(6C): 3843-52.
6. Ford D.: Mechanistic explanations for the chemopreventive action of soyabean isoflavones: reducing the possibilities. *Br J Nutr* 2002; 88(5): 439-41.
7. Hu H, Ahn NS, Yang X, Lee YS, Kang KS.: Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer* 2002; 102(3): 250-3.
8. Wu J, Wu Y, Yang BB. Anticancer activity of Hemsleya amabilis extract. *Life Sci* 2002; 71(18): 2161-70.
9. Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, Poirier D, Nicholls P, Kirby A, Jiang W, Mansel R, Ramachandran C, Rabi T, Kaplan B, Lansky E.: Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71(3): 203-17.
10. Hengartner MO.: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805): 770-6.
11. Kaufmann SH, Earnshaw WC.: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 42-9.
12. Nicholson DW.: From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407(6805): 810-6.
13. Mukhtar H, Ahmad N. Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 158(3):207-10.
14. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.: Mammalian caspases: structure,

- activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
15. Nagata S.: Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 12-8.
16. Zamzami N, Kroemer G.: Condensed matter in cell death. *Nature* 1999; 401(6749): 127-8.
17. Rao L, Perez D, White E.: Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996; 135(6 Pt 1): 1441-55.
18. Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM.: The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 1997; 90(2): 315-23.
19. Talanian RV, Brady KD, Cryns VL.: Caspases as targets for anti-inflammatory and anti-apoptotic drug discovery. *J Med Chem* 2000; 43(18): 3351-71.
20. Nagata S, Golstein P.: The Fas death factor. *Science* 1995; 267(5203): 1449-56.
21. Krammer PH.: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407(6805): 789-95.
22. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM.: Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 27-33.
23. Tanaka M, Suda T, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S.: Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* 1997; 158(5): 2303-9.
24. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L.: Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182(5): 1223-30.
25. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75(6): 1169-78.
26. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H.: Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995; 182(6): 1777-83.
27. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J.:

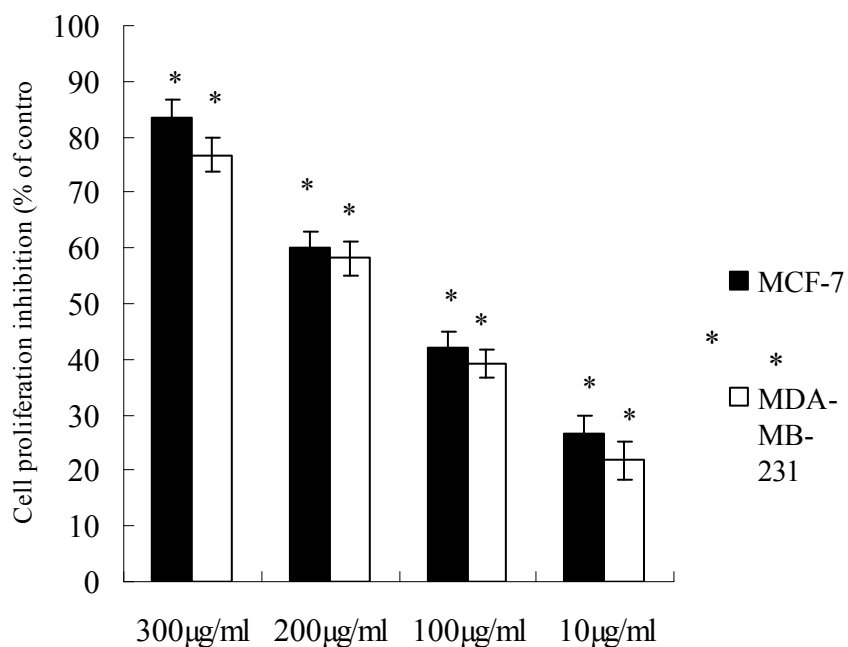
- Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998; 187(8): 1205-13.
28. Castaneda F, Kinne RK.: Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas-receptor pathway. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127(7): 418-24.
29. Lee SH, Shin MS, Lee HS, Bae JH, Lee HK, Kim HS, Kim SY, Jang JJ, Joo M, Kang YK, Park WS, Park JY, Oh RR, Han SY, Lee JH, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ.: Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32(3): 250-6.
30. Kushlinskii NE, Britvin TA, Abbasova SG, Perevoshchikov AG, Prorokov VV, Kostanyan IA, Knysh VI, Lipkin VM.: Soluble Fas antigen in the serum of patients with colon cancer. *Bull Exp Biol Med* 2001; 131(4): 361-3.
31. Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR.: Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; 99(3): 403-13.
32. Jiang S, Song MJ, Shin EC, Lee MO, Kim SJ, Park JH.: Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Hepatology* 1999; 29(1): 101-10.
33. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X.: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91(4):479-89.
34. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 50-7.
35. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ.: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139(5): 1281-92.
36. Adams JM, Cory S.: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381): 1322-6.

37. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM.: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228(4706): 1440-3.
38. Hockenbery DM.: bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci Suppl* 1994; 18: 51-5.
39. Gao G, Dou QP.: G(1) phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2000; 58(5): 1001-10.
40. Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H.: Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001; 34(1): 55-61.
41. Evan GI, Vousden KH.: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411(6835): 342-8.
42. May P, May E.: Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999; 18(53): 7621-36.
43. Wynford-Thomas D.: Cellular senescence and cancer. *J Pathol* 1999; 187(1): 100-11.
44. Bouck N.: P53 and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287(1): 63-6.
45. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407(6805): 777-83.
46. Taylor WR, Stark GR.: Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20(15): 1803-15.
47. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B.: 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; 1(1): 3-11.
48. Zhan Q, Bae I, Kastan MB, Fornace AJ Jr.: The p53-dependent gamma-ray response of GADD45. *Cancer Res* 1994; 54(10): 2755-60.
49. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N.: Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995; 377(6550): 646-9.
50. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B.: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389(6648): 300-5.
51. White E.: Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10(1): 1-15.

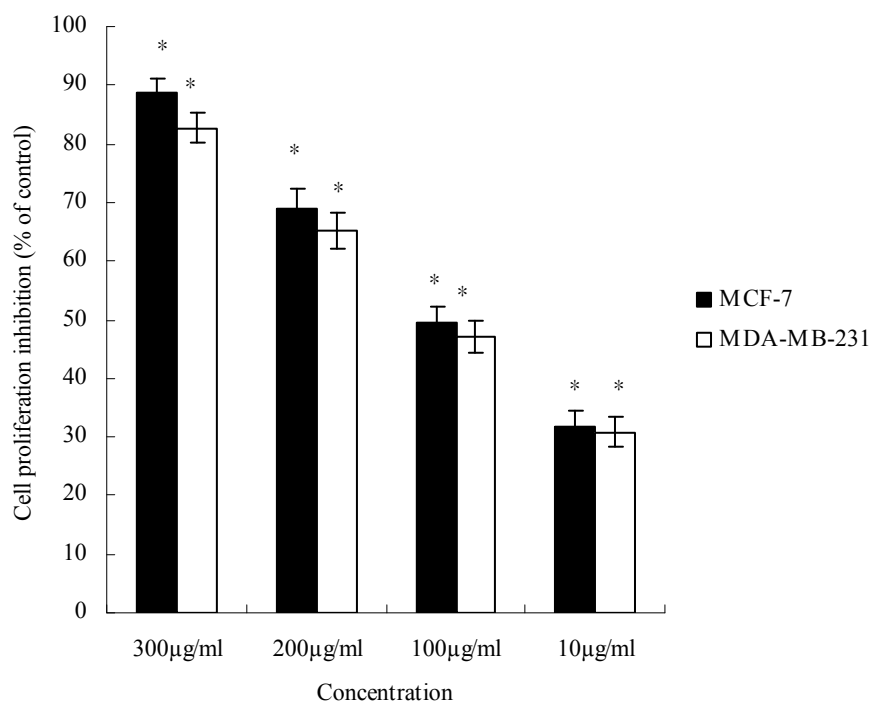
52. Falette N, Paperin MP, Treilleux I, Gratadour AC, Peloux N, Mignotte H, Tooke N, Lofman E, Inganas M, Bremond A, Ozturk M, Puisieux A.: Prognostic value of P53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 1998; 58(7): 1451-5.
53. Brown JM, Wouters BG.: Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59(7): 1391-9.
54. Jo EH, Hong HD, Ahn NC, Jung JW, Yang SR, Park JS, Kim SH, Lee YS, Kang KS.: Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of licorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell. *J Agric Food Chem* 2004; 52(6): 1715-9.
55. Hsu YL, Kuo PL, Lin CC.: Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci* 2005; 77(3): 279-92.
56. Tsai NM, Lin SZ, Lee CC, Chen SP, Su HC, Chang WL, Harn HJ.: The antitumor effects of *Angelica sinensis* on malignant brain tumors in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9): 3475-84.
57. Lee SM, Li ML, Tse YC, Leung SC, Lee MM, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM.: *Paeoniae Radix*, a Chinese herbal extract, inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway. *Life Sci* 2002; 71(19): 2267-77.
58. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW.: Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005; 24(17): 2909-15.
59. Peters G.: The D-type cyclins and their role in tumorigenesis. *J Cell Sci Suppl* 1994; 18: 89-96.

柒、圖

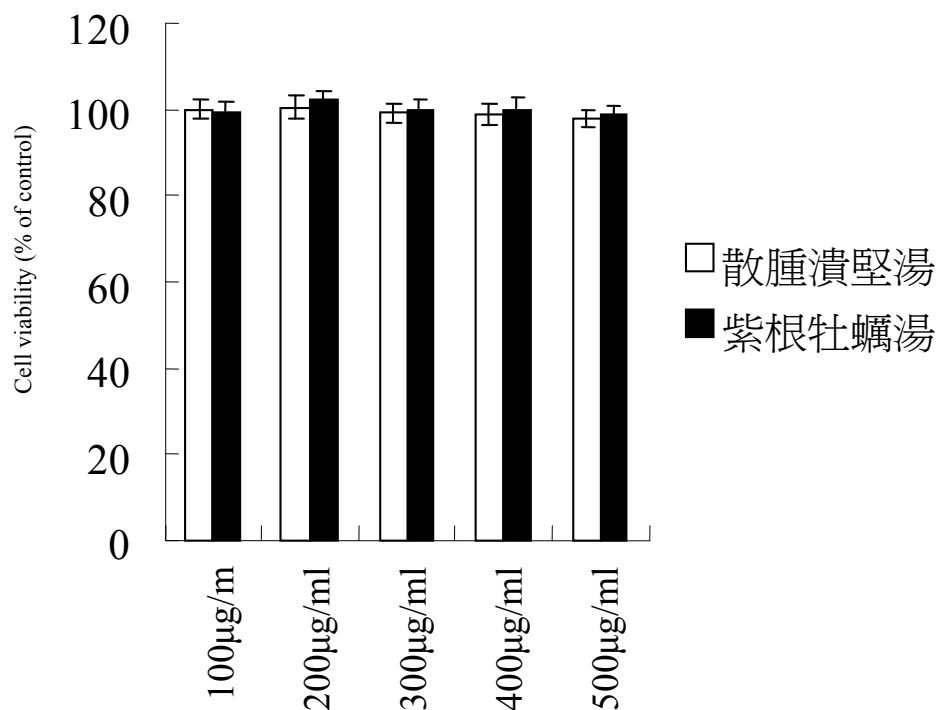
A.



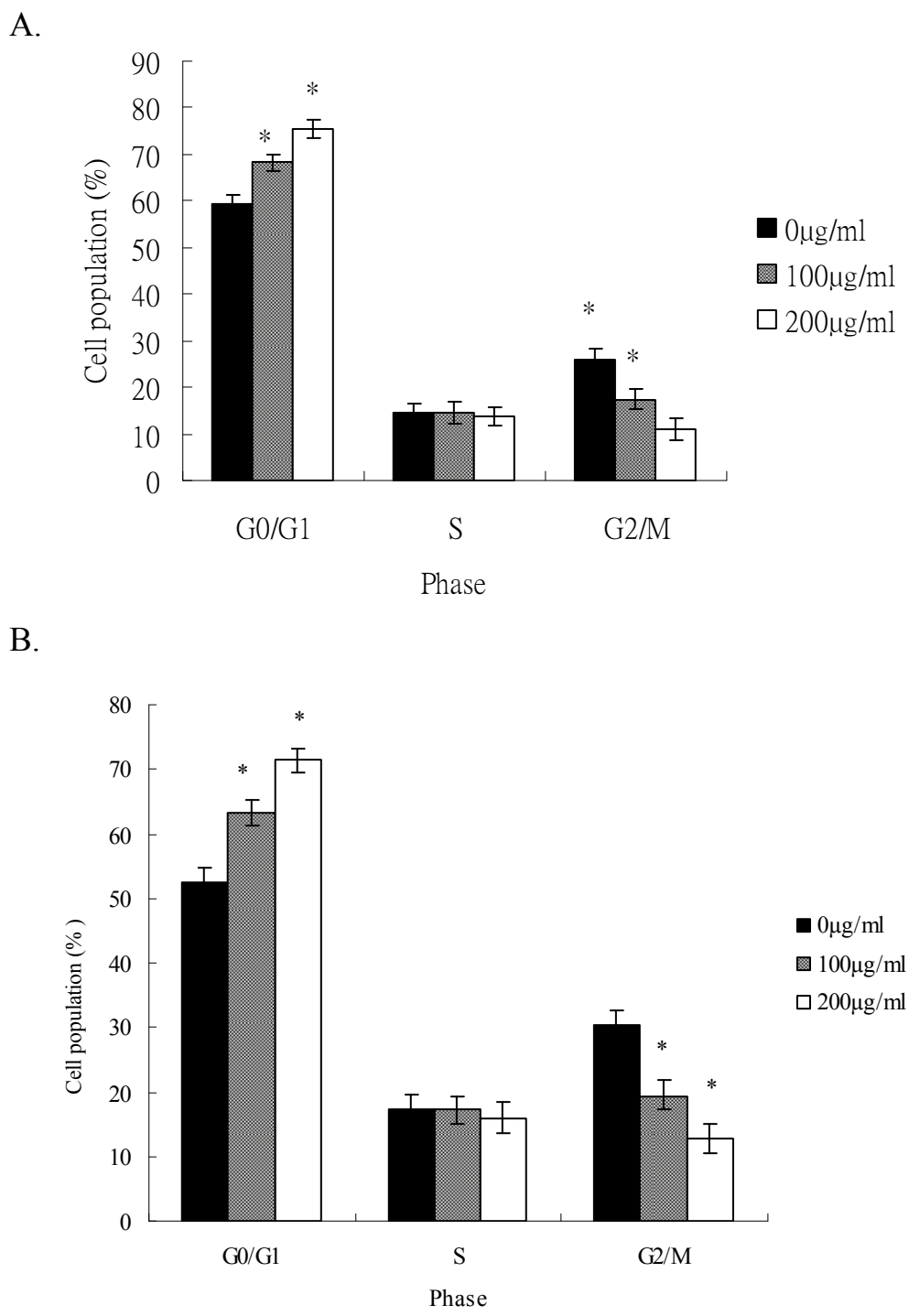
B.



C.

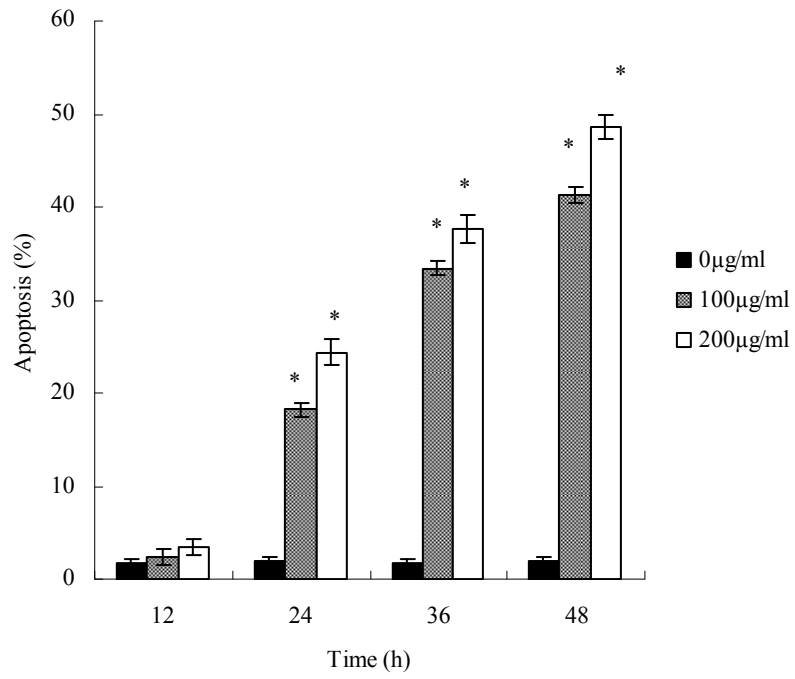


圖一 紫根牡蠣湯及散腫潰堅湯之抗乳癌細胞增生抑制作用。(A)紫根牡蠣湯之增生抑制作用；(B)散腫潰堅湯之增生抑制作用；(C)紫根牡蠣湯及散腫潰堅湯不影響正常肺纖維母細胞 IMR-90 的細胞存活。

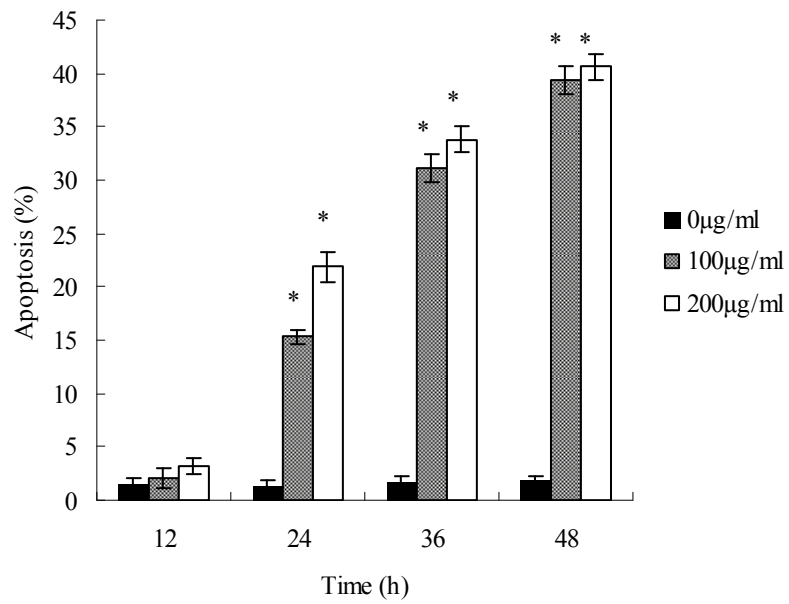


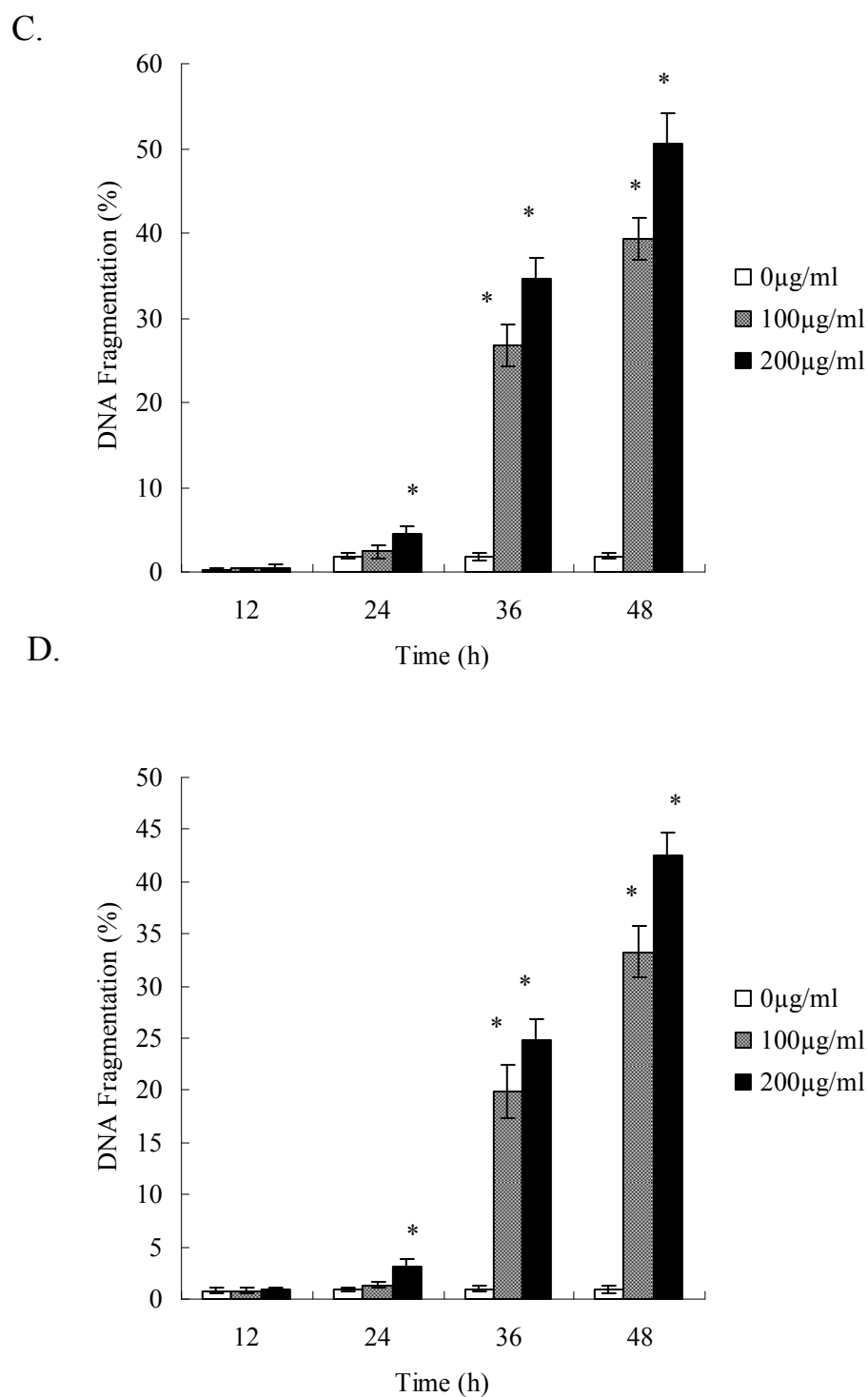
圖二 散腫潰堅湯對乳癌細胞株細胞週期分佈之影響。(A)散腫潰堅湯對 MCF-7 細胞週期的影響；(B)散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 細胞週期的影響。

A.



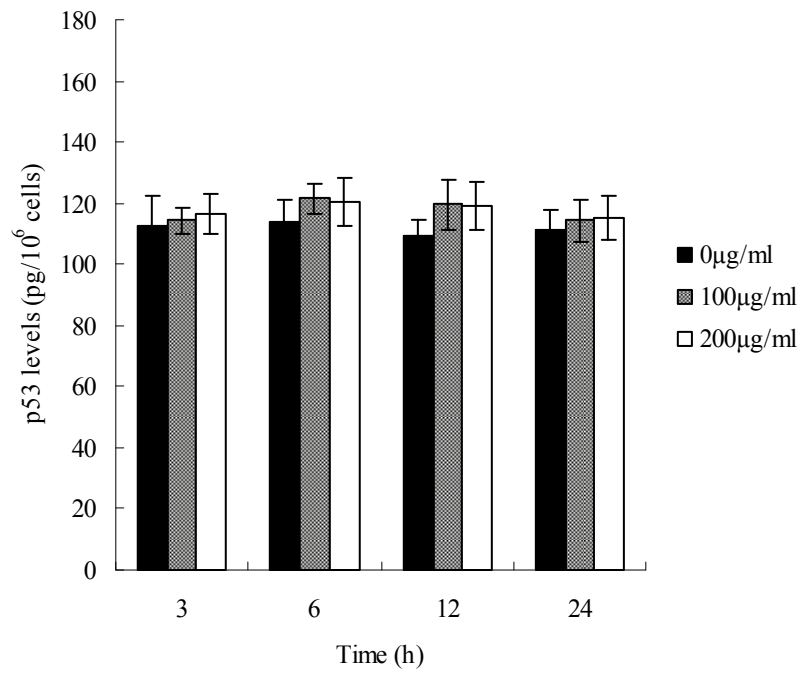
B.



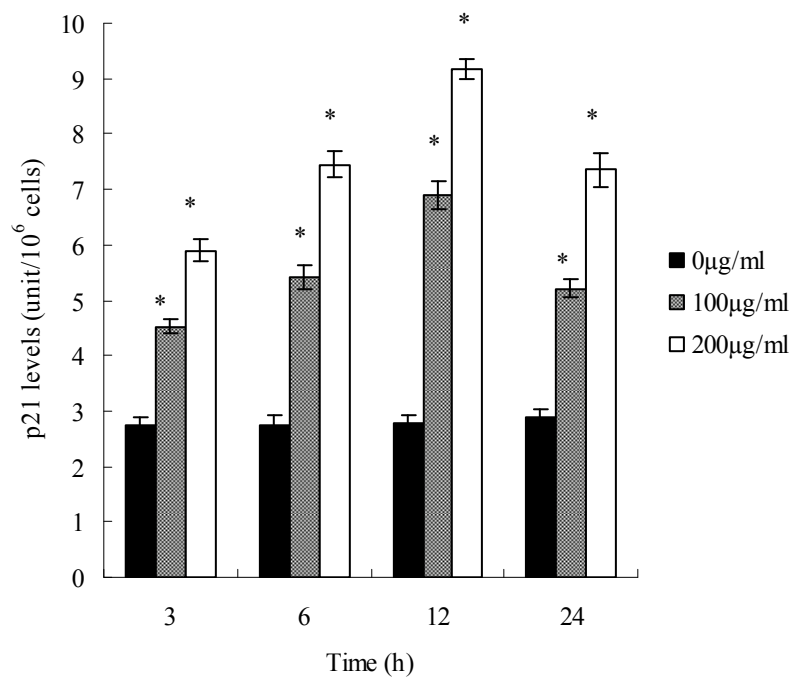


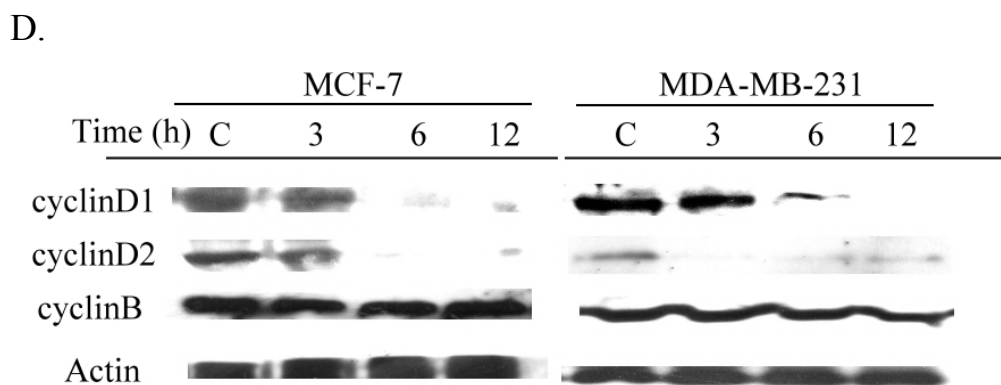
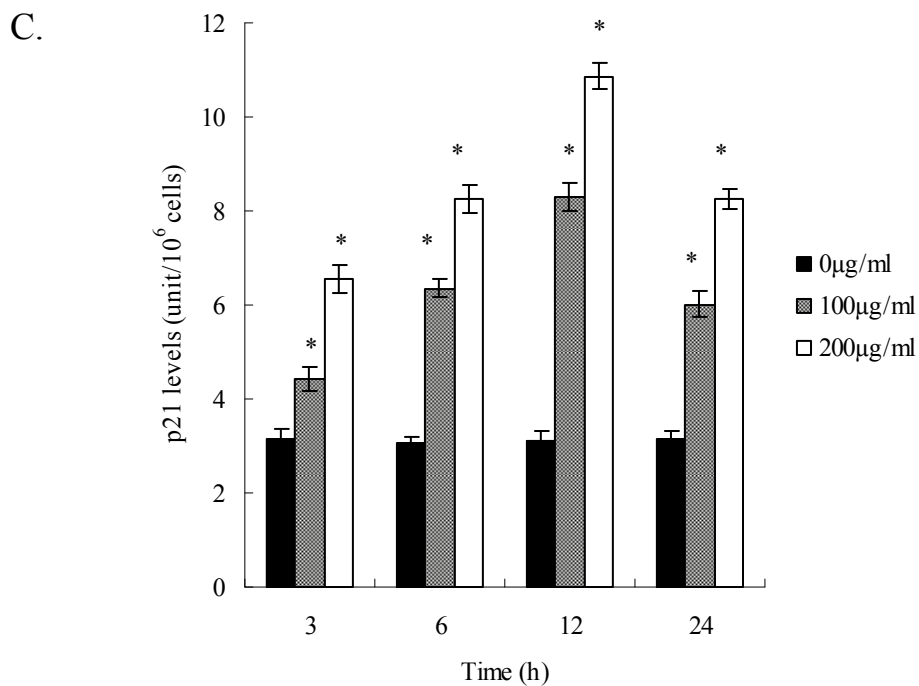
圖三 散腫潰堅湯誘發乳癌細胞進行細胞凋亡。(A)以 Annexin V 染色分析散腫潰堅湯對 MCF-7 的細胞凋亡誘導作用；(B)以 Annexin V 染色分析散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 的細胞凋亡誘導作用；(C)以 Tunnell 染色分析散腫潰堅湯對 MCF-7 的細胞凋亡誘導作用；(D)以 Tunnell 染色分析散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 的細胞凋亡誘導作用

A.



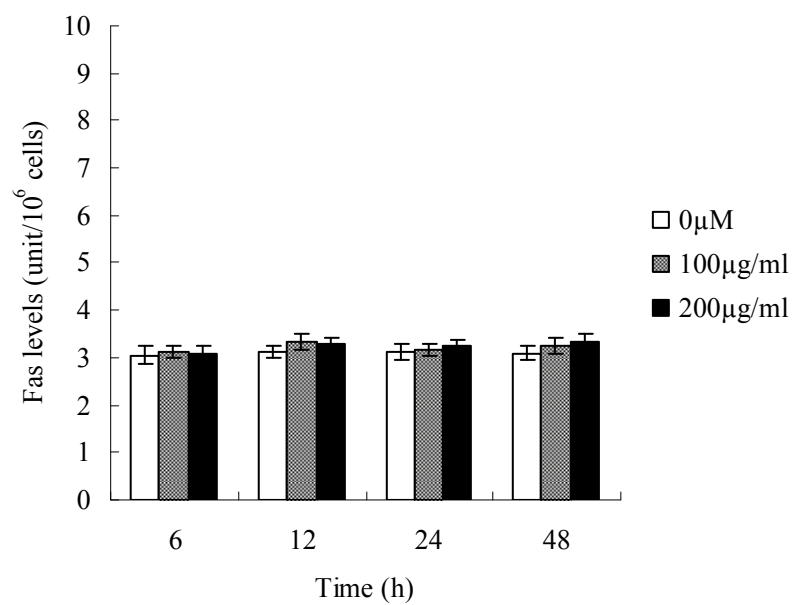
B.



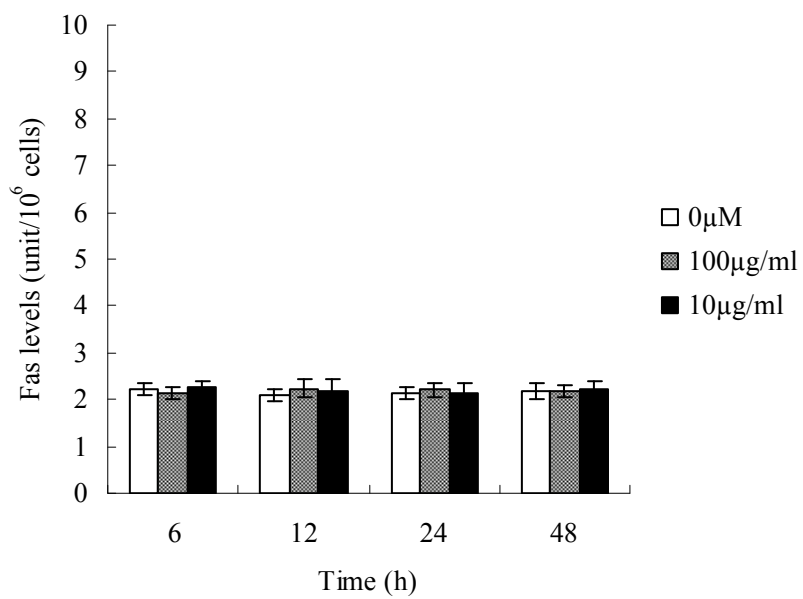


圖四 散腫潰堅湯對乳癌細胞之細胞週期調控因子的影響。(A)散腫潰堅湯對 MCF-7 的 p53 蛋白表現影響；(B)散腫潰堅湯對 MCF-7 的 p21 蛋白表現影響；(C)散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 的 p21 蛋白表現影響；散腫潰堅湯對乳癌細胞的 cyclins 蛋白表現影響

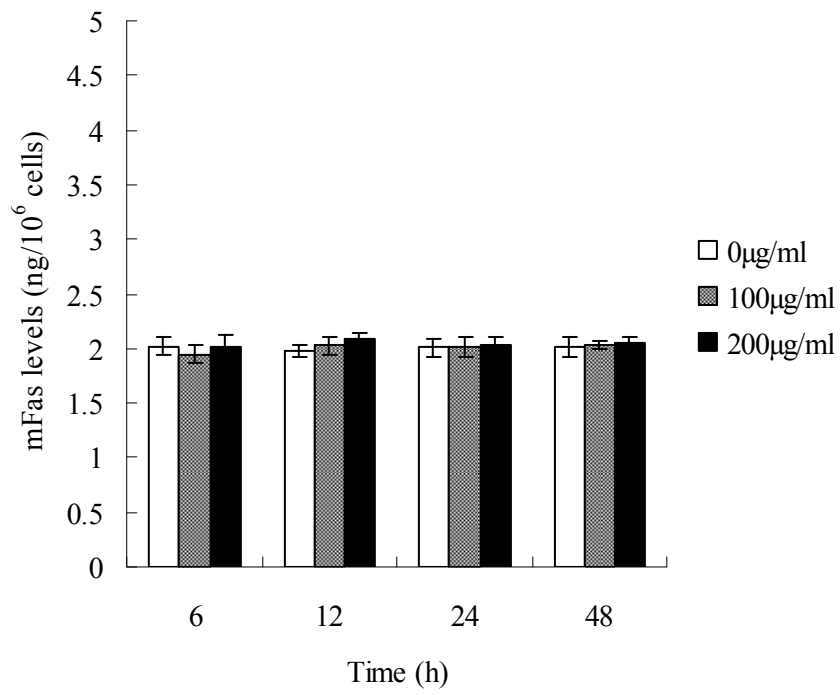
A.



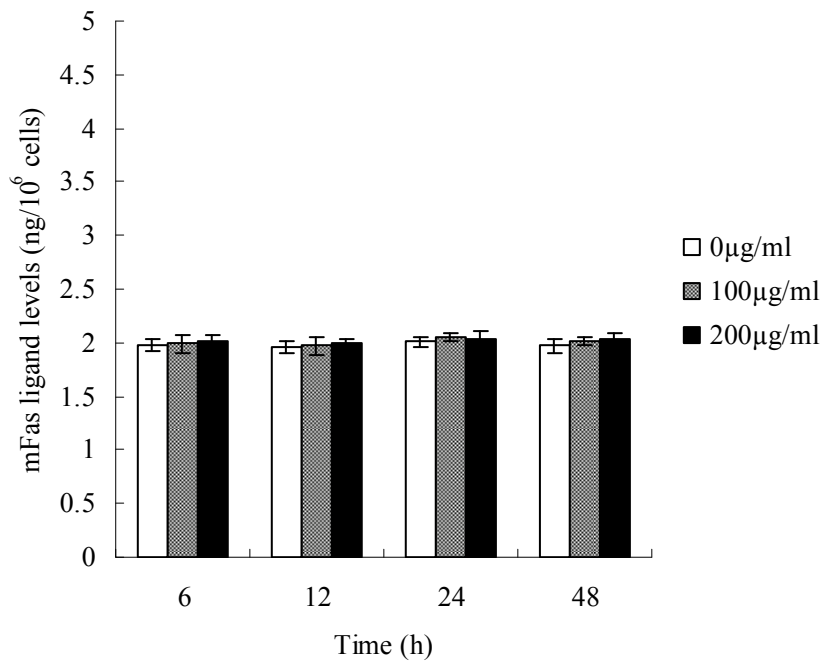
B.



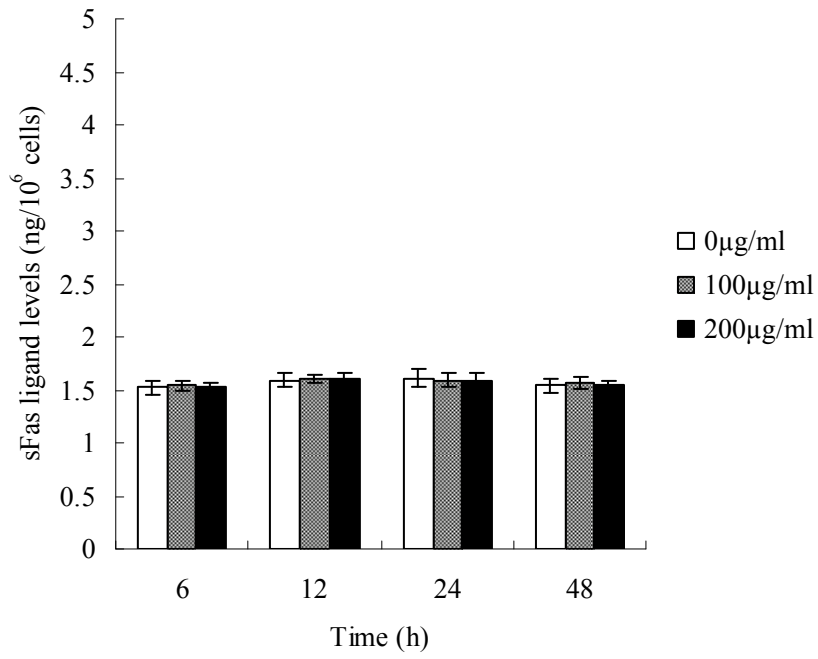
C.



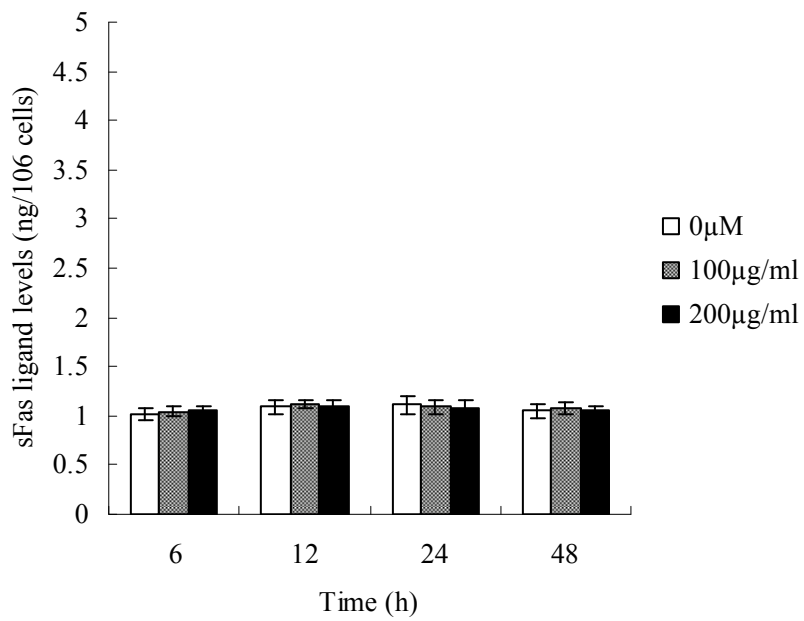
D.

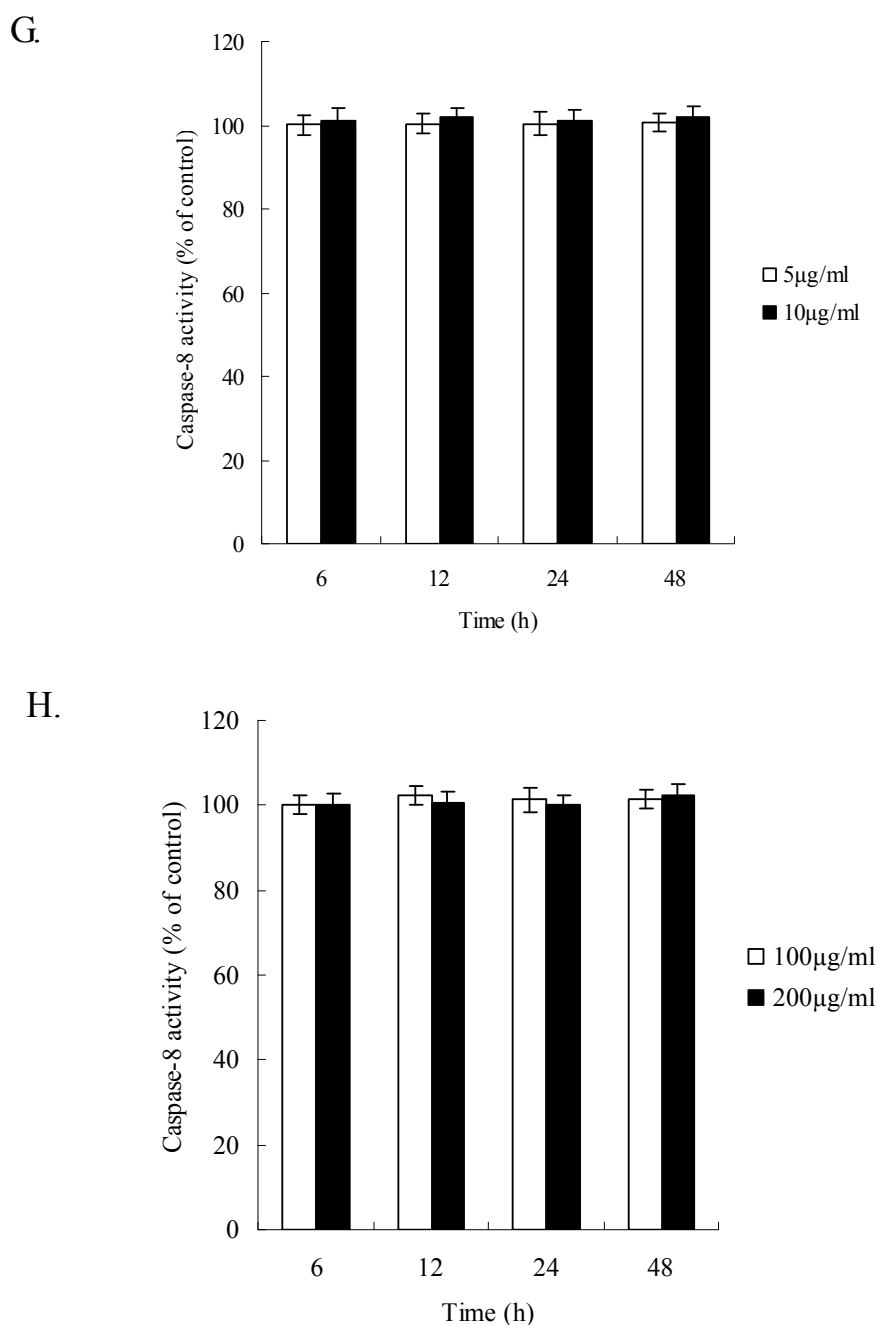


E.



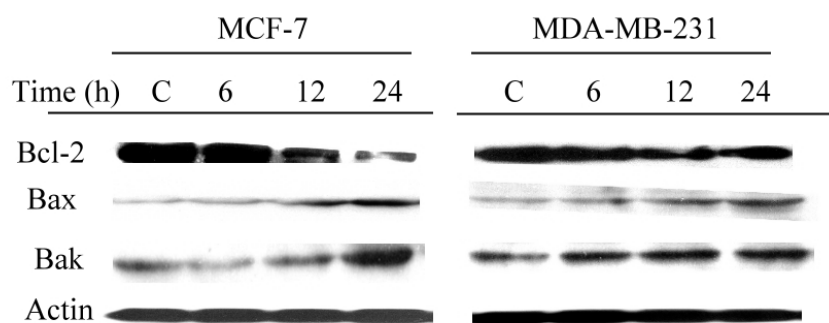
F.



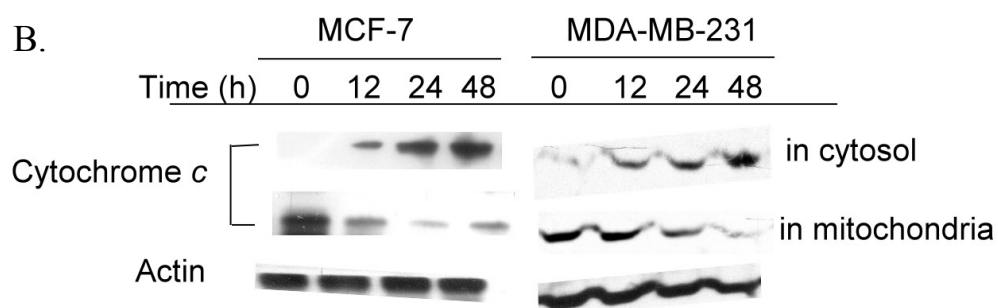


圖五 散腫潰堅湯對 death receptor pathway 的影響。(A)散腫潰堅湯對 MCF-7 的 Fas/APO-1 蛋白表現影響；(B)散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 的 Fas/APO-1 蛋白表現影響；(C)散腫潰堅湯對 MCF-7 的 mFas ligand 蛋白表現影響；(D)散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 的 mFas ligand 蛋白表現影響；(E)散腫潰堅湯對 MCF-7 的 sFas ligand 蛋白表現影響；(E)散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 的 sFas ligand 蛋白表現影響；(G)散腫潰堅湯對 MCF-7 的 Caspase-8 活化影響；(H)散腫潰堅湯對 MDA-MB-231 的 Caspase-8 活化影響；

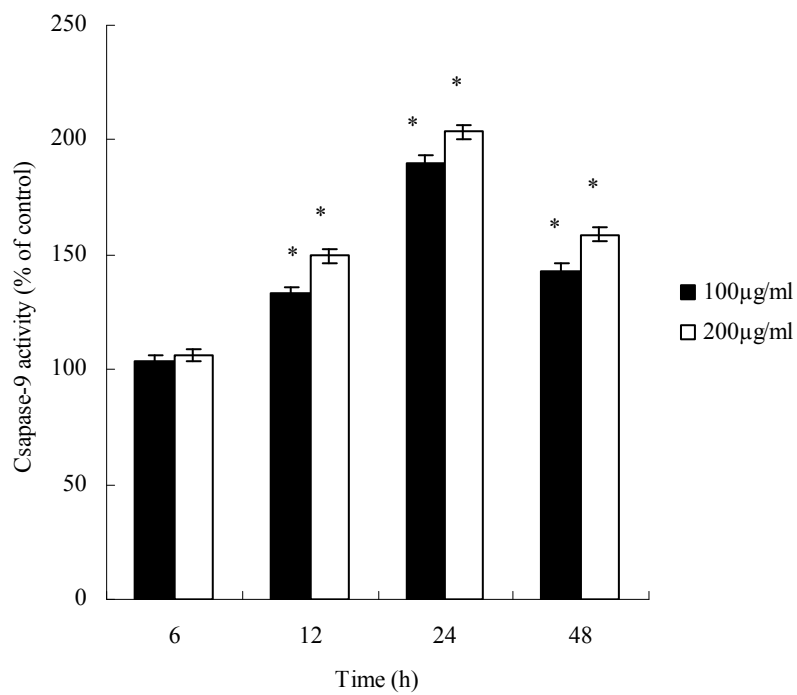
A.

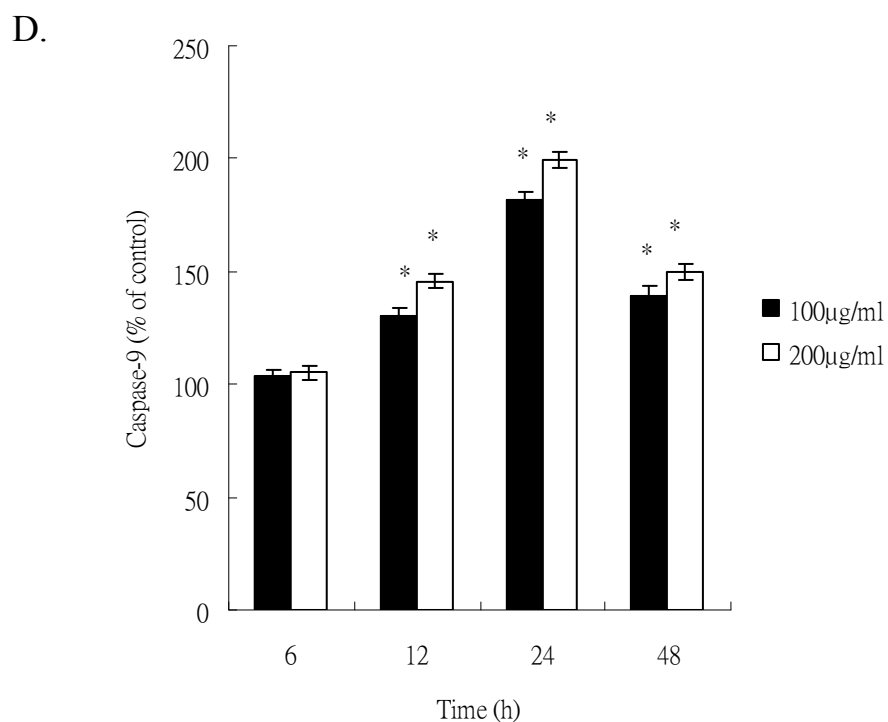


B.



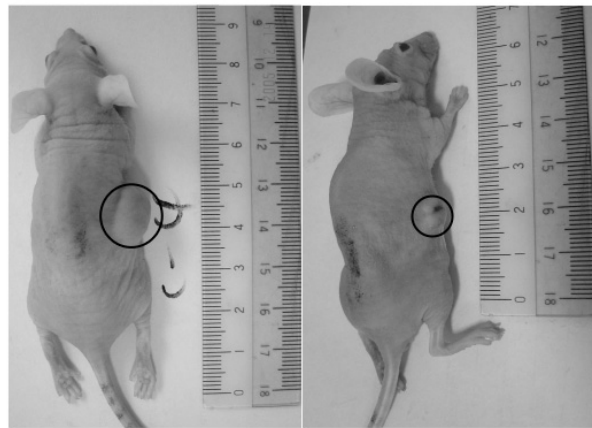
C.





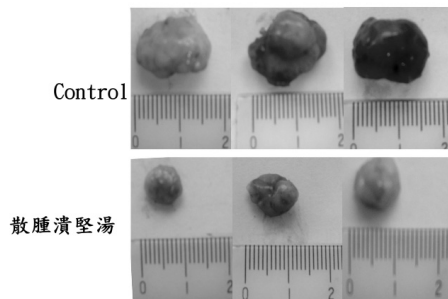
圖六、散腫潰堅湯對粒線體路徑的影響。(A)散腫潰堅湯對 Bcl-2 family proteins 表現的影響；(B)散腫潰堅湯造成粒線體 cytochrome c 的釋放；(C)散腫潰堅湯活化 MCF-7 細胞 caspase-9；(D)散腫潰堅湯活化 MDA-MB-231 細胞 caspase-9。

A.

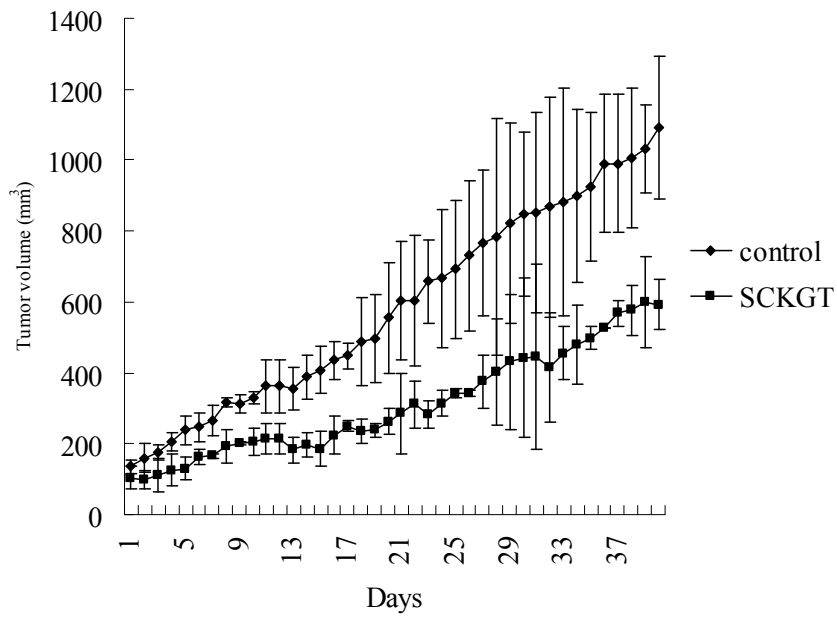


Control

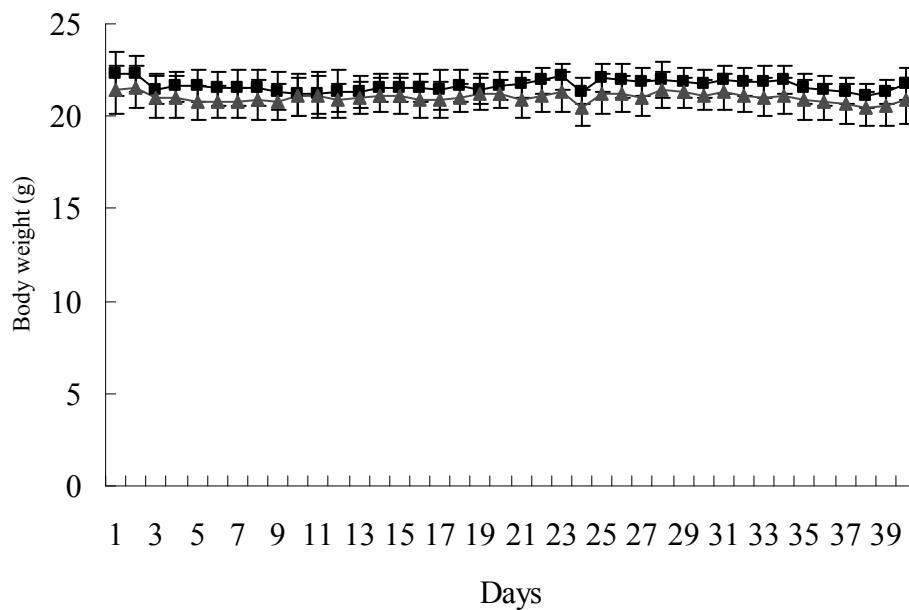
散腫潰堅湯



B.



C.



	肝(g)	心(g)	脾(g)	肺(g)	腎(g)
控制組	1.426 ± 0.136	0.127 ± 0.020	0.192 ± 0.097	0.125 ± 0.053	0.351 ± 0.016
散腫潰堅湯	1.463 ± 0.076	0.126 ± 0.022	0.195 ± 0.110	0.123 ± 0.013	0.366 ± 0.027

圖七、散腫潰堅湯 in vivo 活性評估。(A)散腫潰堅湯抑制 MDA-MB-231 細胞在 nude mice 身上的生長；(B)未給藥及給予散腫潰堅湯的 nude mice 其 MDA-MB-231 腫瘤生長情形；(C)散腫潰堅湯對老鼠體重的影響；(D)散腫潰堅湯對老鼠臟器的影響。