

穿心蓮抗腫瘤作用之探討

黃瑞齡^{1*}·謝桂鈺²·沈賈堯²·施慧娟²·鄭德志²

摘要

自 1982 年起，癌症在台灣已連續 28 年蟬連 10 大死因之首，如何提供有效的防制及治療方法，已成為當今維護國民健康的首要課題。為了開發具抗腫瘤活性且對正常宿主組織無毒性之有效中草藥，穿心蓮 *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees 為首選藥材。穿心蓮屬於爵床科植物穿心蓮的全植物，傳統中醫作為抗數種癌症之用，穿心蓮因具有抗菌作用，而成為極具經濟價值之藥用植物。

為了研究穿心蓮是否具抗腫瘤活性，本報告使用 MTT 測試及流式細胞儀檢測，進行穿心蓮粗抽物(crude extracts)對肝癌細胞株 (HepG2) 及白血病細胞株 (HL-60) 的檢測，初步測試結果顯示穿心蓮粗抽物(crude extracts)對肝癌細胞株 (HepG2) 及白血病細胞株 (HL-60) 具抗腫瘤活性。

關鍵詞：抗腫瘤、穿心蓮、MTT 測試、流式細胞儀檢測

¹ 美和科技大學 生物科技系 *責任作者

² 美和科技大學 護理學系

前言

社會經濟的起飛和醫藥科技的發達，使台灣地區的死因型態，不再是以急性傳染病為主，取而代之的是生態環境污染、職業為害等所引起的慢性病。自 1982 年起，癌症在台灣已連續 27 年蟬連 10 大死因之首，最令人擔憂的是癌症罹患率已由 1982 年時的 15479 人，至 2000 年的 56323 人，呈現幾乎四倍的成長率。而根據 2002 年衛生署的癌症登記報告顯示，平均每 15 分 18 秒，癌症就奪走一條寶貴的生命。所以，不論是癌症的發生率或死亡率，都呈逐年上升的趨勢。如何提供有效的防制及治療方法，已成為當今維護國民健康的首要課題。就年齡別主要死因來看，癌症是 30 至 40 歲年齡層的第二大死因，僅次於意外傷害，但是在 45 至 64 歲年齡層，則癌症居死因之首位。這兩個年齡層均是人生的黃金時期。故癌症已對國人之經濟、社會造成莫大之損失，是當今醫療上的重要問題之。

癌症的治療，除了早期診斷，早期手術切除外，一旦蔓延，即需依靠其他療法的協助，如放射治療、化學治療及免疫治療

等。半世紀以來，癌症化學治療絕大部份是針對細胞毒性 (cytotoxic) 的治療，專門對付分裂週期內的細胞。在人體內，分裂週期內的細胞有許多種，如骨髓細胞、消化道黏膜細胞、皮膚細胞及毛髮細胞等等，都會因接受化學治療而損傷。癌症化學藥物副作用嚴重，加上療效有限，常令病人痛苦不堪，聞癌色變。這也是許多病人因而放棄接受正規治療，尋求偏方或另類療法的主因[6]。

近 10 年來，有數種癌症新藥問世，新的癌症合併治療方法也有些突破。如最近治療胃腸癌及肺癌的化學藥品：

1. Camptosar (Irinotecan, CPT-11)

這是一種抑制細胞核酸轉位酵素 Topoisomerase I 的藥物，最常見的副作用為腹瀉，在臨床上，這個副作用已被有效克服。

2. Oxaliplatin (L-OHP)

這是 Platinum 的第三代新藥物，副作用比習慣常用的 Cisplatin 來得少。最近國家衛生研究院癌症研究組台北榮總合作病房正進行以 Oxaliplatin、Gemcitabine、5-FU、及 LV (GOLF) 合併治療胰臟癌的臨床試驗。這個才進行不久的臨床試驗，已帶給

我們一些好消息及無窮的希望。

3.UFUR、UFT、S1 等等

口服是一般最受病患接受的服藥方式，最近這些加強 5-FU 的口服藥物終於上市，其療效不比靜脈注射來得差。

4.Gemcitabine (Gemzar)

非小細胞肺癌在化療上，一直是棘手的難題。台北榮總以 Gemcitabine(Gemzar)+ Vinorelbine 合併治療第三期以上的肺癌病人，療效可達 70%，且副作用少，適合治療較年長的患者。其他如 Gemcitabine+Cisplatin、Taxotere+Carboplatin、Taxotere+Cisplatin 等合併治療肺癌，其療效似乎都有進展。

5.Capecitabine (Xeloda)

是個治療乳癌的新口服藥物。口服後經三個酵素步驟成為 5-FU，在臨床試驗上使用於第二線時，還有 25%的緩解率。其副作用為腹瀉，手足症 (hand-foot syndrome) 及口腔發炎等[6]。

食物和營養是維持健康的兩大要素。身體的營養主要來自一般飲食中的大分子營養物，如維生素、葉酸、各類胡蘿蔔素、稀有礦物質如鋅、鎂、硒及鈣等的攝取。在飲食中以脂肪的熱量最高，最容易造成肥胖，過多的脂肪易增加罹患癌症的機

率，特別是像肺癌、大腸直腸癌、胰臟癌、膽囊癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌及攝護腺癌等。所以，減少脂肪的攝取、維持適當體重，是保持健康的不二法則，也是預防癌症的第一步。1997 年世界衛生組織 (WHO) 的全球統計報告指出，如能早期控制飲食，全世界因癌症而死亡的病例，則可減少三到四成，因此抗腫瘤中草藥之開發，為本實驗室重要任務之一。

穿心蓮 *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees 為首選藥材。穿心蓮屬於爵床科植物穿心蓮的全植物，具有清熱解毒，消腫止痛作用。治扁桃腺炎，咽喉炎，流行性腮腺炎，肺炎，細菌性痢疾，急性腸胃炎，鉤端螺旋體病。外用治蛇毒咬傷，傷口感染。全草有抗菌，抗病毒，解熱，驅蟲等作用。可用於急性菌痢，胃腸炎，中毒性消化不良，腸傷寒，眼結膜炎，鼻衄，鼻竇炎，中耳炎，口腔炎，牙痛，腮腺炎，流行性腮腺炎，扁桃腺炎，咽喉炎，氣管炎，支氣管炎，上呼吸道感染，感冒，流腦，氣管炎，肺炎，百日咳，肺結核，肺膿瘍，膽囊炎，泌尿系統感染，感冒發熱，流行性腦炎，高血壓，急性盆腔炎，鉤端螺旋體病，口咽腫痛，瘡癤癰腫、水火燙傷，膿疱瘡，傷口感染，燙火傷，毒蛇

咬傷。而成為極具經濟價值之藥用植物 [7]。

研究方法、步驟

1. 供測試藥物

穿心蓮之粗抽物(crude extracts)由國立中國醫藥研究所陳建志研究員提供。

2. 細胞株及細胞培養

本報告共使用 2 種人類癌細胞株為研究材料，分別為：肝癌細胞株(HepG2)，白血病細胞株(HL-60)。HepG2 細胞培養於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中，每毫升的培養基內添加 100 I.U.青黴素 (penicillin)、100 頁 μg 鏈黴素(streptomycin)、2.5 μg 防治黴(fungizone)、2 mM 麩氨酸(L-glutamine)及 100 μM 之非必需性氨基酸(non-essential amino acid，包括 14.7 μg glutamic acid, 7.5 μg glycine, 8.9 μg alanine, 13.3 μg aspartic acid, 11.5 μg proline, 15 μg asparagine 及 10.5 μg serine)，以上稱完全培養基，置於含 5%二氧化碳的 37°C 培養箱中。(Huang et al., 1998)；HL-60 細胞培養於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI-1640 完全培養基。每毫升的培養基內添加 100 I.U.青黴素 (penicillin)、100 頁 μg 鏈黴素(streptomycin)、2 mM 麩氨酸(L-glutamine)及 100 μM 之非必需性氨基酸

(non-essential amino acid，包括 14.7 μg glutamic acid, 7.5 μg glycine, 8.9 μg alanine, 13.3 μg aspartic acid, 11.5 μg proline, 15 μg asparagine 及 10.5 μg serine)，以上稱完全培養基，置於含 5%二氧化碳的 37°C 培養箱中[1]。

2. 細胞毒測定(Cytotoxicity assay)[2-4]

在 96 well 的細胞培養皿，每 well 種入 2.0×10^4 細胞，若為需附著之細胞，則待 24 小時細胞充分附著，更新培養基，同時給予五種不同濃度之供試藥物，每個劑量三重覆。若為懸浮培養之細胞，則種入細胞同時給藥處理。給藥處理 48 小時，加入 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)，作用 4 小時，吸掉培養液，加入 dimethylsulfoxide (DMSO)，再以分光比色計 DYNATECH MR5000 型 ELISA reader 在 540 nm 測定之，所得的吸光值反應出存活細胞的多寡。所得檢驗值均以 % T/C (percentage of treated per control)表示，並計算其細胞抑制百分之五十的作用濃度(IC₅₀; Inhibition Concentration Fifty)。

3. 流式細胞儀分析 (Flowcytometric

analysis) [5]

細胞培養於培養盤，處理所要測試藥物各種不同的時間。然後將細胞收取後，離心，並溶入 200 μ l 的 citrate 緩衝溶液 (citrate buffer: 250 mM sucrose, 20 mM trisodium citrate, 5% DMSO, pH 7.6) 中。測定細胞內 DNA 含量時，取 100 μ l 的細胞溶液，加入 0.9 ml 的溶液 A (solution A: 0.5 mM Tris, 10 mM spermine tetrahydrochloride, 0.1% NP40, 0.03 mg/ml Trypsin, pH 7.6)，均勻混合後置於室溫下 10 分鐘。加入 0.75 ml 的溶液 B (solution B: 0.5 mM Tris, 10 mM spermine tetrahydrochloride, 0.1% NP40, 0.05 mg/ml Trypsin inhibitor, 0.001 mg/ml Ribonuclease A, pH 7.6)，均勻混合後置於

室溫下 10 分鐘。最後再加入 0.75 ml 的溶液 C (solution C: 0.5 mM Tris, 50 mM spermine tetrahydrochloride, 0.1% Nonidet P-40, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, Propidium iodide, pH 7.6)，室溫下避光靜置 10 分鐘。細胞內的 DNA 含量則以流式細胞儀 (Flowcytometer) 測定之。[使用國立中國醫藥研究所 FACS CALIBUR 流式細胞儀 (BD Biosciences, USA)]

4. 統計方法

實驗所得之數據以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error of mean) 來表示。實驗組與對照組之間是否有差異以 Student's t-test 或單次變方分析 (one way ANOVA) 測定，當 $p < 0.05$ 時視為有統計意義。

研究結果與討論

1. 穿心蓮全草



2. 穿心蓮粗抽物對人類肝癌細胞株 HepG2 細胞生長抑制作用

以 MTT 測試穿心蓮粗抽物對 HepG2 細胞增生與抑制的活性分析，在 96 well 的細胞培養皿，每 well 種入 2.0×10^4 細胞，待 24 小時細胞充分附著，更新培養基，同時給予 200.0、100.0、50.0、25.0 及 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 五種不同濃度之供試藥物，每個劑量三重覆。給藥處理 48 小時，加入 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)，作用 4 小時，吸掉培養液，加入 dimethylsulfoxide

(DMSO)，再以分光比色計 DYNATECH MR5000 型 ELISA reader 在 540 nm 測定之，所得的吸光值反應出存活細胞的寡。所得檢驗值均以 % T/C (percentage of treated per control) 表示，並計算其細胞抑制百分之五十的作用濃度 (IC_{50} ; Inhibition Concentration Fifty)。結果如表 1 及圖 1 顯示：穿心蓮粗抽物 200.0 及 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 具顯著細胞抑制作用，其細胞抑制百分之五十的作用濃度 (IC_{50} ; Inhibition Concentration Fifty) 為 182.9 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 1. 穿心蓮粗抽物對人類肝癌細胞株 HepG2 細胞生長抑制作用

| 濃度(μg/ml) | % of Treated per Control | Inhibition (%) |
|-----------|--------------------------|----------------|
| Control | 0.0 ± 0.0 | 0 |
| DMSO | 97.5 ± 1.7 | 2.5 |
| 200.0 | 45.3 ± 0.8 | 54.7 |
| 100.0 | 77.1 ± 0.4 | 22.9 |
| 50.0 | 92.7 ± 3.4 | 7.3 |
| 25.0 | 99.7 ± 6.2 | 0.3 |
| 12.5 | 104.1 ± 6.5 | -4.1 |

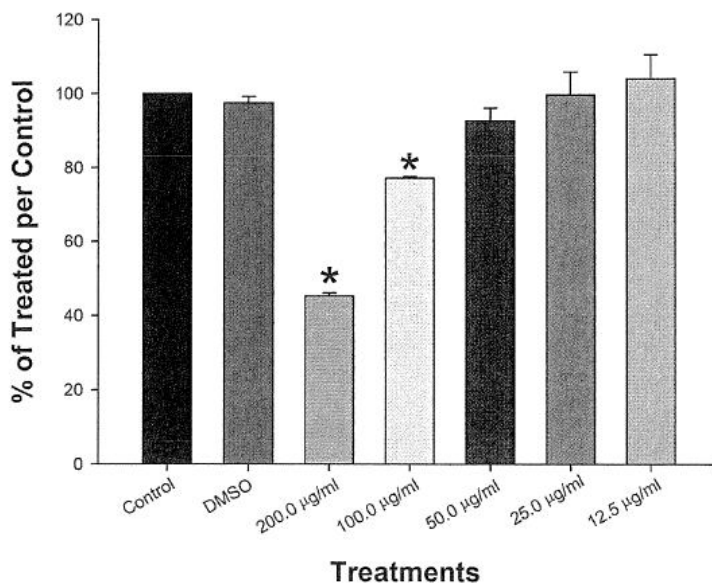


圖 1. 穿心蓮粗抽物對人類肝癌細胞株 HepG2 細胞生長抑制作用

2. 穿心蓮粗抽物對人類血癌細胞株 HL60 細胞生長抑制作用

以 MTT 測試穿心蓮之粗抽物對 HL60 細胞增生與抑制的活性分析，在 96 well 的細胞培養皿，每 well 種入 2.0×10^4 細胞，同時給予 200.0、100.0、50.0、25.0 及 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 五種不同濃度之供試藥物，每個劑量三重覆。給藥處理 48 小時，加入 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)，作用 4 小時，吸掉培養液，加入 dimethylsulfoxide

(DMSO)，再以分光比色計 DYNATECH MR5000 型 ELISA reader 在 540 nm 測定之，所得的吸光值反應出存活細胞的寡。所得檢驗值均以 % T/C (percentage of treated per control) 表示，並計算其細胞抑制百分之五十的作用濃度 (IC₅₀; Inhibition Concentration Fifty)。結果如表 2 及圖 2 顯示：穿心蓮粗抽物 200.0、100.0 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 均具顯著細胞抑制作用，其細胞抑制百分之五十的作用濃度 (IC₅₀; Inhibition Concentration Fifty) 為 163.2 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 2. 穿心蓮粗抽物對人類血癌細胞株 HL60 細胞生長抑制作用

| 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) | % of Treated per Control | Inhibition (%) |
|-------------------------|--------------------------|----------------|
| Control | 0.0 ± 0.0 | 0 |
| DMSO | 102.9 ± 2.3 | -2.9 |
| 200.0 | 43.2 ± 1.1 | 56.8 |
| 100.0 | 65.6 ± 3.2 | 34.4 |
| 50.0 | 79.6 ± 1.9 | 20.4 |
| 25.0 | 103.5 ± 5.7 | -3.5 |
| 12.5 | 107.2 ± 6.8 | -7.2 |

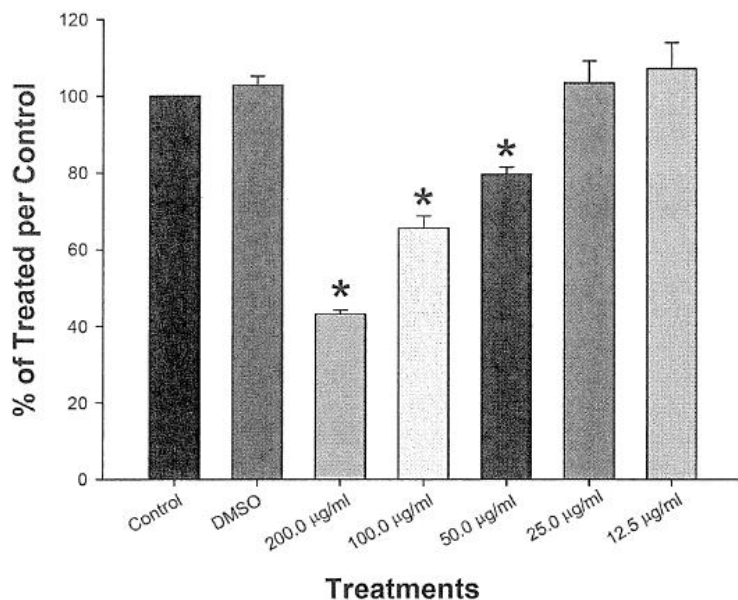


圖 2. 穿心蓮粗抽物對人類血癌細胞株 HL60 細胞生長抑制作用

4. 穿心蓮粗抽物對人類血癌細胞株 HL60 細胞週期作用

穿心蓮粗抽物對 HL60 細胞週期的作用分析，在 96 well 的細胞培養皿，每 well 種入 2.0×10^4 細胞，同時給予 200.0、100.0、50.0、25.0 及 12.5 µg/ml 五種不同濃度之供試藥物，每個劑量三重覆。給藥處理 48 小時，將細胞收取後，進行 Propidium iodide (PI) 染色法，細胞內的

DNA 含量則以流式細胞儀測定之。所得檢驗值均以 ModFIT 程式分析細胞週期，並計算其使 HL60 細胞產生代表誘導細胞程式凋亡的亞二倍體(% of sub G1)。如表 3 及圖 3：穿心蓮粗抽物給藥濃度 200.0 及 100 µg/ml 對人類白血病細胞株 HL60 有極顯著誘導細胞程式凋亡的亞二倍體(% of sub G1)，分別為 29.9 ± 1.3 及 14.7 ± 2.0 ，顯示穿心蓮粗抽物具細胞凋亡作用。

表 3. 穿心蓮粗抽物對人類血癌細胞株 HL60 細胞週期亞二倍體之作用

| Treatments | | Apoptosis (%) (Mean ± SEM) |
|------------|-------------|----------------------------|
| Control | | 3.2 ± 1.6 |
| DMSO | | 2.8 ± 1.1 |
| 穿心蓮粗抽物 | 200.0 µg/ml | 29.9 ± 1.3 |
| | 100.0 µg/ml | 14.7 ± 2.0 |
| | 50.0 µg/ml | 8.5 ± 2.4 |
| | 25.0 µg/ml | 4.1 ± 1.3 |
| | 12.5 µg/ml | 3.6 ± 2.9 |

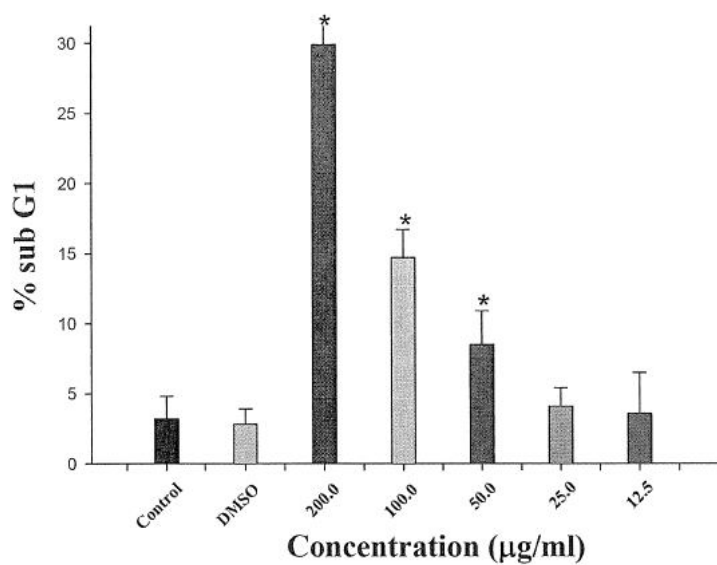


圖 3. 穿心蓮粗抽物對人類血癌細胞株 HL60 細胞週期亞二倍體之作用

結論

穿心蓮以消炎功效稱著，老一輩人更以「能去五臟六腑之火」來形容，可見民間對其療效的肯定。近代藥理學研究，穿心蓮萃取物具有抗瘧疾及許多種類的細菌，穿心蓮粗抽物對 2 種人類癌細胞株，分別為：肝癌細胞株 (HepG2)，白血病細胞株 (HL-60) 均具顯著細胞抑制作用且對白血病細胞株 (HL-60) 之毒殺作用比對肝癌細胞株 (HepG2) 作用強。以流式細胞儀 (Flowcytometer) 測定細胞內的 DNA 含量，結果顯示：穿心蓮粗抽物給藥濃度 200.0 及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 對人類白血病細胞株 HL60 有極顯著細胞凋亡作用，藥用植物穿心蓮具抗腫瘤活性。

參考文獻

1. Huang, R. L., Chen, C. C., Ou, J. C., Hu, C. P., Chen C. F., and Chang, C. M. (1998). Anti-tumor effects of *d*-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Medica* 64: 212-215.
2. Denizot F. and Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89, 271-277
3. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63
4. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47: 936-942.
5. Nicoletti I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 139, 271-279
6. 癌症治療的新思維: 更多的選擇及希望.

彭汪嘉康.科學人雜誌 2003 年 11 月號

7.臺灣藥用植物資源名錄行政院衛生署中

醫藥委員會編穿心蓮 92 年 10 月 418

頁

Studies on Anti-Tumor Effect of *Andrographis panicusata* (Bum.f)

Nees

Abstract:

Since 1982, cancers have been the number one death cause in Taiwan for twenty eight years consecutively. How to provide effective preventive measure and cure has become the foremost issue for national health concern. With the aim of developing novel anticancer drugs characterized by selective targeting and low toxicity for dividing normal host tissues, we devoted our attention to *Andrographis panicusata* (Bum.f) Nees that have traditionally been used to treat a variety of tumor for hundreds of years. *Andrographis panicusata* (Bum.f) Nees belong to Euphorbiaceae family, is a great economic importance due to its anti-bacterial potential.

To investigate the anti-tumor property and possible mechanism of action of *Andrographis panicusata* (Bum.f) Nees on hepatoma cell line HepG2 and leukemia cell line HL-60 *in vitro*. The MTT assay was used to measure cytotoxicity of the crude extracts. The appearance of apoptotic Sub-G1 cells was detected by flow cytometry analysis.

Keywords: anti-tumor , *Andrographis panicusata* (Bum.f) Nees, MTT, flow cytometry