

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 以蛋白質體學分析中草藥萃取物處理的人類肝癌細胞(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-048-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：張鴻民

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 26 日

## 摘要

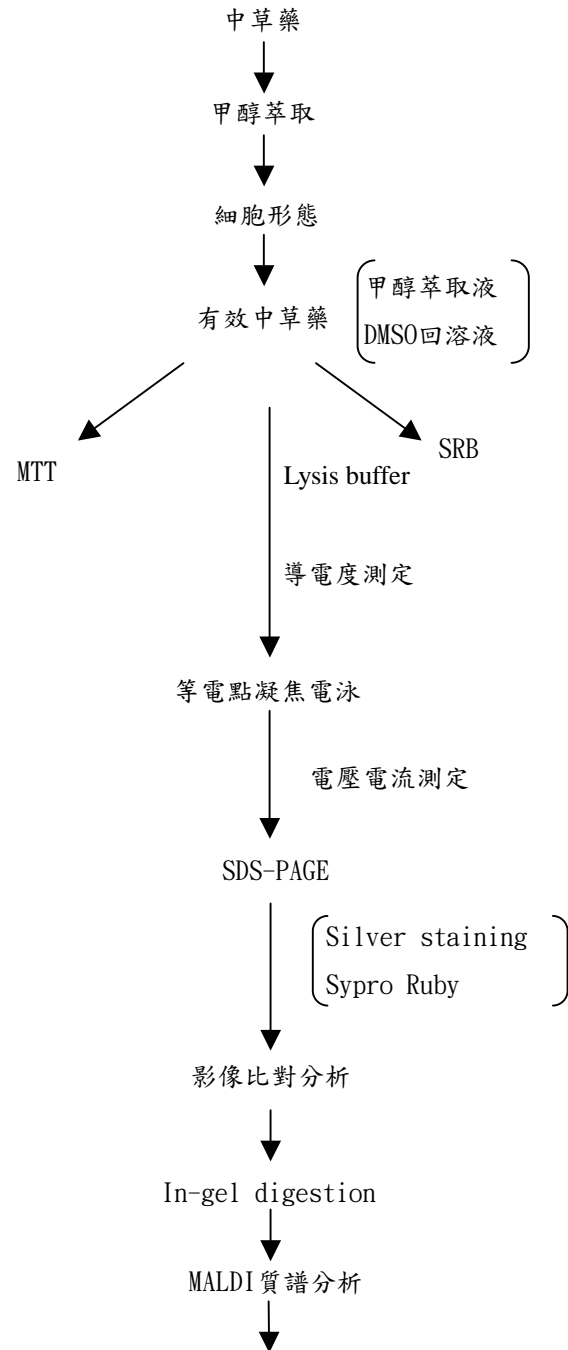
本論文首先以中草藥甲醇萃取物處理人類的肝癌細胞株 HepG2 和 Hep3B，比較萃取物的種類與濃度對人類肝癌細胞株的細胞形態與細胞毒性的影響。結果發現以大腹皮、厚朴、檳榔及大黃之甲醇萃取物對 HepG2 和 Hep3B 的細胞形態的變化最嚴重，在 MTT 試驗結果可知細胞存活率低於 50 % (IC<sub>50</sub> 值) 時，甲醇萃取物對 HepG2 細胞毒性較強，水萃取物對 HepG2 及 Hep3B 細胞毒性非常低。在 SRB 試驗結果可知，AP 甲醇萃取物濃度達 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時對 HepG2 生長有影響，而達 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時對 Hep3B 生長有影響。而再處理其他的人類細胞株 MCF7 與 CCD966SK，發現中藥甲醇萃取物對這些人類肝癌細胞株的毒性與生長抑制具有選擇性。進而探討中藥甲醇萃取物對人類肝癌細胞株及其它細胞生長影響的差異，結果顯示中藥甲醇萃取物對於肝癌細胞有較強的毒殺效果。

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a predominant malignancy in Taiwan. The diagnosis of HCC is still poor despite of improving diagnostic techniques. It is imperative to develop new drugs for efficient therapy. Cancer is a serious health problem in human. Development of anticancer drugs from natural products is one of the important therapies. Herbs have a long history in Chinese. It is hard to know that theirs treat methods for diseases because of various kinds of them and compound medicine in general.

This study has demonstrated that methanol extracts of herbs exhibited anti-cancer effectiveness against human hepatoma cells. The dose-response of methanol extracts ( AP 、 MC 、 AS 、 RR ) in HepG2 and Hep3B cells indicate that methanol extracts changed theirs morphology. In MTT assay result showed, we can find that when the cell viability lower than fifty percent, methanol extracts had great cytotoxicity to HepG2, but water extracts had minimal effect to them. In SRB assay result showed that it had effect on cell viability of HepG2 when concatenation of AP treatment reached to 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and reached to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , it had effect on Hep3B. In comparison, methanol extracts had only minimal effects on the viability and morphology of other cells. These results indicate that methanol extracts are an effective anti-hepatoma medicine which has minimal influence on noncancer cells. In vitro the methanol extracts of herbs were studied and aimed at the differential growth effects on nonhepatoma cells 、 hepatoma cells and human normal cells. Results indicated that the methanol extracts has much more inhibition on hepatoma cells than on other cells.

# 實驗流程



## 實驗方法

### 一、 樣品製備

將中藥材以中藥磨粉機研磨，放入低溫冷藏櫃（4 °C）中保存。將樣品以甲醇(1/10, w/v) 於室溫下萃取 24 小時，過濾除去殘渣得甲醇萃取液，並以減壓濃縮機濃縮抽乾，備用的甲醇萃取物保存於乾燥箱。實驗時再加入 DMSO 使凍乾物溶解得 DMSO 回溶液；將甲醇萃取後之殘渣以水(1/10, w/v) 比例於室溫下萃取 24 小時，過濾後行冷凍乾燥得乾燥水萃取物，保存於乾燥箱備用。

### 二、 細胞株之繼代培養及保存

#### (1) 繼代培養 (subculture)

人類肝癌細胞株 HepG2 細胞及 Hep3B 細胞分別以 10 % FBS MEM 及 10 % 3B-DMEM 培養液，而 MCF7 及 CCD966SK 以 10 % FBS DMEM 培養液，均在 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 條件下培養。細胞以倒立式顯微鏡觀察，待細胞長滿為單層 (monolayer) 時，進行繼代培養 (subculture)。除去舊培養液，以磷酸緩衝溶液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, PBS) 清洗兩次，再加入 PBS 及 trypsin-EDTA 液輕微搖晃 (使 trypsin-EDTA 最終濃度為 0.1 %)，以倒立式顯微鏡觀察，當細胞要分離而呈現圓粒狀時，吸掉 trypsin-EDTA 溶液，加入上述培養液將細胞打散並收集，再以  $2 \times 10^6$  cells / mL 的細胞濃度進行繼代培養 (洪，2000)。

#### (2) 保存

將收集細胞液之密度調至  $5 \times 10^6$  cells / mL，加入 1 %

(v/v)DMSO，混合均勻後取 1.0 mL 細胞液置於細胞冷凍管中，將冷凍管裝入於有異丙醇之冷凍盒，放入-80 °C 冰箱經 12 小時後再將冷凍管移入液態氮中保存（洪，2000）。

### 三、細胞生長形態

將不同藥物之不同甲醇萃取液直接加入培養癌細胞之培養液中使其濃度分別為 0、0.1、0.3、0.5 % (v/v)，在 24 小時作用時間處理下，分別以 200 倍倒立式光學顯微鏡觀察細胞數目變化並記錄細胞形態的變化，如細胞形態和控制組相比有不同（形態萎縮、細胞不再相連結、細胞呈圓形甚至浮起等）及細胞數目和控制組相比有明顯不同（Huang et al., 2001）者。

### 四、細胞生長及毒性評估

#### MTT 法

調整細胞至合適的濃度，再各取 50  $\mu$ L 的細胞懸浮液加入於 96 well 的組織培養盤中，使 HepG2 和 Hep3B 之細胞數分別為  $5 \times 10^4$  和  $10^5$  cells/mL。置於培養箱（37 °C，5 % CO<sub>2</sub>）中 24 小時後換 50  $\mu$ L 新鮮培養液及加入 50  $\mu$ L 不同濃度的樣品液，使最終藥物濃度分別為甲醇萃取液（0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 % (v/v)）或 DMSO 回溶液（0、10、30、50、70、100  $\mu$ g/mL），培養 24、48 及 72 小時。其後，除去培養液並以 PBS 清洗，加入 100  $\mu$ L MTT 液（1 mg/mL）。在培養箱中反應 4 小時之後將液體除去，再加入 100  $\mu$ L DMSO 使藍色結晶溶解，以 ELISA reader 測定波長 570 nm 和輔助波長如 630 nm 作為參考波長之吸光值（Wang, 2000）。

## 五、蛋白質測定試驗

### SRB 法

調整細胞至合適的濃度，再各取 50  $\mu\text{L}$  的細胞懸浮液加入於 96 well 的組織培養盤中，使 HepG2 和 Hep3B 之細胞數分別為  $5 \times 10^4$  和  $1 \times 10^5$  cells/mL。置於培養箱（37  $^{\circ}\text{C}$ ，5 %  $\text{CO}_2$ ）中 24 小時後換 50  $\mu\text{L}$  新鮮培養液及加入 50  $\mu\text{L}$  不同藥物濃度之 DMSO 回溶樣品液，使最終藥物濃度為 0、10、30 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，培養 24、48 及 72 小時。其後，除去培養液並以 PBS 清洗，再加入 50  $\mu\text{L}$  50 % TCA 於 4 $^{\circ}\text{C}$  下靜置 30 分鐘，除去 TCA 並以 PBS 清洗，置室溫下風乾後加入 40  $\mu\text{L}$  0.4 % SRB（溶於 0.1 % acetic acid）作用 20 分鐘，再以 0.1 % acetic acid 清洗 3 次並置室溫下風乾。乾燥後觀察型態並加入 100  $\mu\text{L}$  10 mM Tris base（pH 10.5），使紅色結晶溶解，以 ELISA reader 測定波長 490 nm 和輔助波長如 630 nm 作為參考波長之吸光值（Wang, 2000）。

## 結果與討論

### 一、 中草藥的選擇

中草藥的使用在中國已有數千年之久，各種醫學古籍及民間偏方種類繁多，若要詳閱全部而從其中找出治療肝癌有用的中藥以治療肝癌，實在是一件浩瀚的工程。而中醫絕多數以複方藥物治病，因中醫認為病症的起因不是單一因素所引起的，以肝病為例，就可能因腎或脾的功能失調而造成，所以一帖複方中的藥物，並不一定全對病症主因有效用，可能只是輔助藥物，也就是中醫所說的「君臣」藥物的概念。故在複方的研究方面，由於歷代流傳的複方非常多且複方中的藥物種類多，故研究起來十分艱辛（郭和楊，2000；李和呂，2000。）。因此在選擇抗癌中草藥時，除查閱期刊文獻及古籍外，另使用兩種工具以便利資訊的收集。

#### (1) 典籍檢索系統

中醫藥委員會開發的「中醫藥典籍檢索系統」，由其建立各種古籍資料庫，可以快速搜尋出所輸入字串的相關資料。

#### (2) GOOGLE 搜尋器

號稱最強的搜尋器，可搜尋目前 WWW sides 上出現所輸入字串的相關資訊。

#### (3) 醫學古籍及民間偏方

藉由以上各種資訊，最後選擇 14 種中草藥作為初步篩選的試驗中草藥（圖一、表一）。

### 二、 初步篩選有效中草藥

將所挑選的 14 種中草藥萃取後，由於種類繁多，若逐一進



行藥物毒性試驗，則必相當費時，故以甲醇萃取液直接進行有效  
中草藥試驗篩選 (Tsai et al., 1997)，再將初步篩選出最有效  
用的中草藥進行更進一步的細胞毒性試驗。而為了能快速且簡便  
的進行初步篩選有效中草藥，就以細胞形態變化進行初步篩選有  
效中草藥，而且細胞形態變化差異愈大，在以後的蛋白質膠體分  
析上也較容易進行操作。

在製備和保存甲醇萃取液及甲醇萃取物之 DMSO 回溶液時，  
樣品瓶底部常有附著物產生，且甲醇萃取物之 DMSO 回溶液甚至  
在側面瓶壁也有附著物產生，此可能因溫度變化或保存時間太久  
所造成。而由預實驗結果得知，發生附著物的樣品液在加溫回溶  
後，發現對癌細胞的毒性均十分小（結果未示），故無法大量製  
備中草藥萃取物以保存備用，均必需於實驗前三天進行萃取及製  
備。

又甲醇萃取物之 DMSO 回溶液在加入於相對多量體積的細胞  
培養液時，會瞬間產生沈澱物，此可能是溶液極性不同所致。預  
實驗中發現，振盪後可將沈澱物回溶，但是否在實驗過程中會再  
次沈澱於培養盤內則不易判斷（因培養液成分複雜及細胞亦可能  
因破碎或死亡而沈澱於培養盤內）。

## 2.1 0.3 % 甲醇萃取液篩選比較

由於以有機溶劑進行萃取中草藥，一般在毒性試驗時有機溶  
劑含量不超過 0.5 % (洪, 2000)，故本實驗以含 0.3 % 萃取  
液濃度的細胞培養液來直接進行有效中草藥之初步篩選。分別以  
肝癌細胞(HepG2) (圖二) 及(Hep3B) (圖三)、乳癌細胞 (MCF7)  
(圖四) 及人類皮膚纖維細胞 (CCD966SK) (圖五) 進行試驗。

由實驗結果可知（表二），MC、AS 及 RR 三種中草藥皆會使此 4 種測試細胞的細胞形態產生改變，甚至細胞數目減少或細胞死亡的情形產生。AP 及 TH 在 24 小時觀察時分別對 HepG2 及 CCD966SK 的細胞形態產生改變；ARA、PAR、CR 及 HDW 在 48 小時觀察時對 HepG2 的細胞形態產生改變；而 ZSS、AR、ACH、SBD、AFH 及 CM 在此試驗條件下對 4 種測試細胞的細胞形態均不會產生改變。

依上述結果挑選出對 4 種細胞影響較顯著的 MC、AS 及 RR，僅對 HepG2 有影響者的 AP 及對任一細胞均不影響者的 AR，進行更進一步的分析。

## 2.2 不同濃度（0.1 %、0.3 %及 0.5 %）甲醇萃取液篩選比較

分別以肝癌細胞(Hep3B)(圖六)及乳癌細胞(MCF7)(圖七)進行不同濃度（0.1 %、0.3 %及 0.5 %）萃取液快速篩選試驗。由實驗結果可知，0.1 %的藥物濃度對 Hep3B 及 MCF7 的細胞形態沒有影響。0.3 %濃度的 MC、AS 及 RR 對 Hep3B 有影響，萃取液濃度上昇到 0.5 %時僅 AP 還保留大致細胞形態，另四種藥物對細胞形態影響嚴重；而 AP 及 AR 在 0.5 %濃度時 MCF7 細胞形態受影響，其餘結果同 Hep3B。

在初步篩選模式下篩選出五種中草藥，即厚朴（常，2000；何，2000）、白朮（李，2000；張，1998）及大黃（張，1998；沈，1985）有文獻或古籍指出對癌症具有效用，而大腹皮及檳榔僅有偏方有記載，其甲醇萃取物含量如表三所示，五種有效中草藥甲醇萃取液的作用濃度如表四所示。

### 三、有效中草藥的細胞毒性分析

經初步篩選後選出 AP、MC、AS、RR 及 AR 等中草藥作為細

胞毒性分析的樣品，由於 AP 對癌細胞作用具有選擇性，故以 AP 作為後實驗的研究重點，而以 MC、AS 和 RR 及對肝癌細胞作用小的 AR 作為實驗的參考對照組；由預備實驗得知 MTT 試驗最佳測試細胞數 HepG2 為  $5 \times 10^4$  cells/mL，Hep3B 為  $10^5$  cells/mL。

先以初步篩選為有效中草藥的甲醇萃取液（0.1 %、0.2 %、0.3 %、0.4 %及 0.5 %）以直接作用方式對 Hep3B（圖八）及 HepG2（圖九）進行細胞毒性分析，用以探討藥物種類、藥物濃度及作用時間的相關性。以細胞存活率 50 %（ $IC_{50}$  值）為條件所需中草藥甲醇萃取物濃度之結果整理如附錄四所示。

在參照各種甲醇草藥萃取液含量對照表（表四），再將附錄四換算成中草藥甲醇萃取物的實際含量（如表五所示）。而由表五可知，Hep3B 細胞之  $IC_{50}$  值較 HepG2 者高，故可知藥物對 HepG2 作用較敏感。

另以初步篩選有效中草藥的水萃取液（0.1 %、0.2 %及 0.3 %、0.4 %及 0.5 %）以直接作用方式對 HepG2 及 Hep3B（圖十）進行細胞毒性分析。由結果可知僅 0.3 % RR 作用 48 小時以上時對 HepG2 有毒性，0.4 % AP 作用 72 小時、0.5 % RR 作用 48 小時及 0.3 % RR 作用 72 小時以上時對 Hep3B 有毒性。由此可知水萃物較甲醇萃取物對 HepG2 及 Hep3B 的細胞毒性低。

其次以中草藥甲醇萃取物之 DMSO 回溶液（0、10、30、50、70、100  $\mu$ g/mL（DMSO < 0.3 %）），做不同濃度作用下的 Hep3B（表六）及 HepG2（表七）細胞毒性分析，探討藥物種類、作用時間及藥物濃度的相關性，整理  $IC_{50}$  值如表八所示。由表八可知，HepG2 細胞之中草藥  $IC_{50}$  值低於 Hep3B 者，此趨勢和表五同。Hep3B 之各種中草藥  $IC_{50}$  值則較表五中者少。

在參考上述兩種的試驗結果（表五、八）後，以 10、30 及 50  $\mu\text{g}$  AP 萃取物/ mL 等三種藥物濃度處理所得的細胞蛋白質萃取物來進行電泳分析。



圖1、對各種癌細胞反應之中草藥。

Figure 1、Chinese herbs used to treated with cell lines.

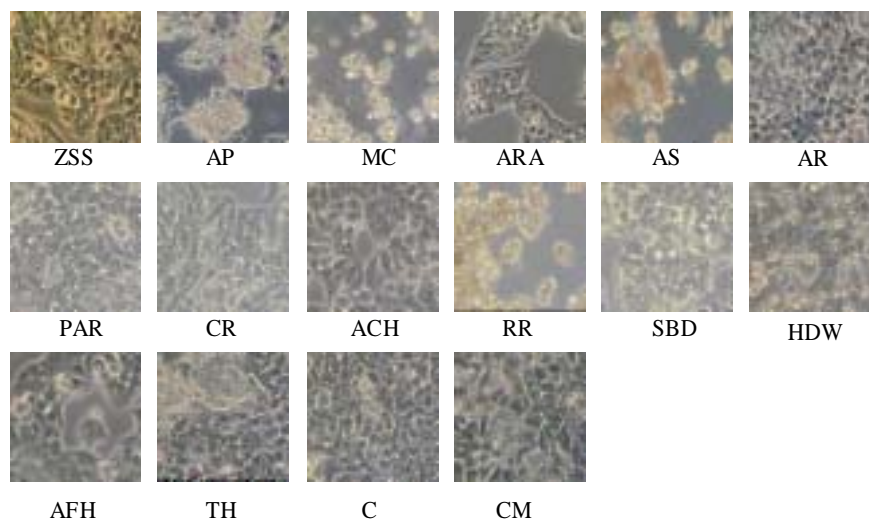


圖2、不同中藥 0.3 % 甲醇萃取液對HepG2細胞形態之觀察。

Figure 2、Morphological observation of HepG2 cells treated with various 0.3 % methanol extracts of herbs.

75

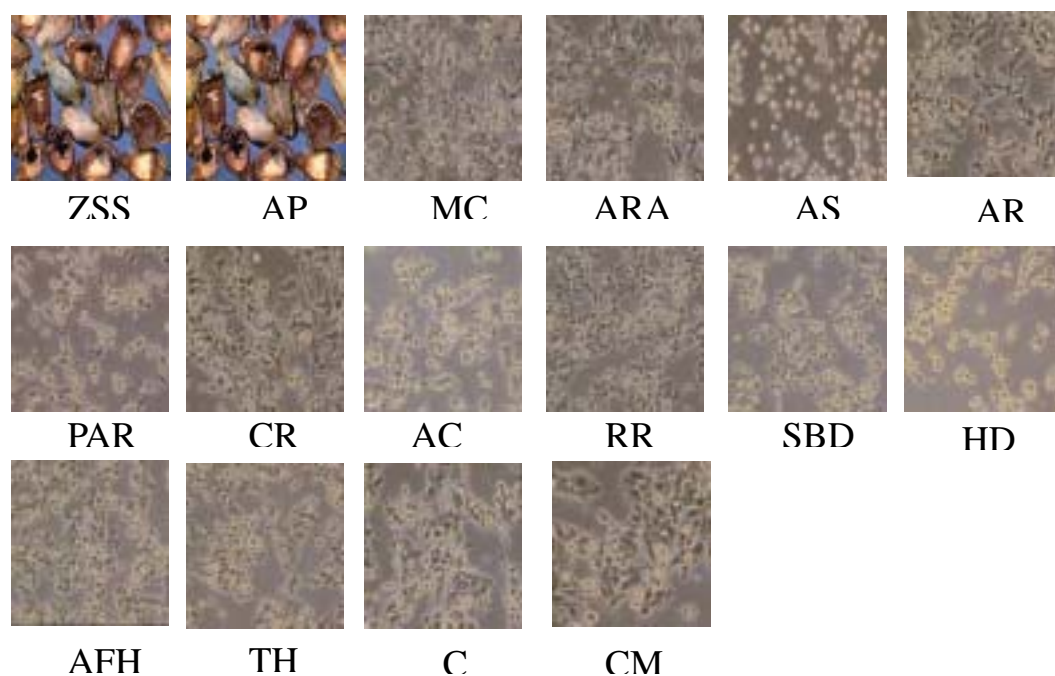


圖3、不同中藥 0.3 % 甲醇萃取液對Hep3B細胞形態之觀察。

Figure 3、Morphological observation of Hep3B cells treated with various 0.3 % methanol extracts of herbs.

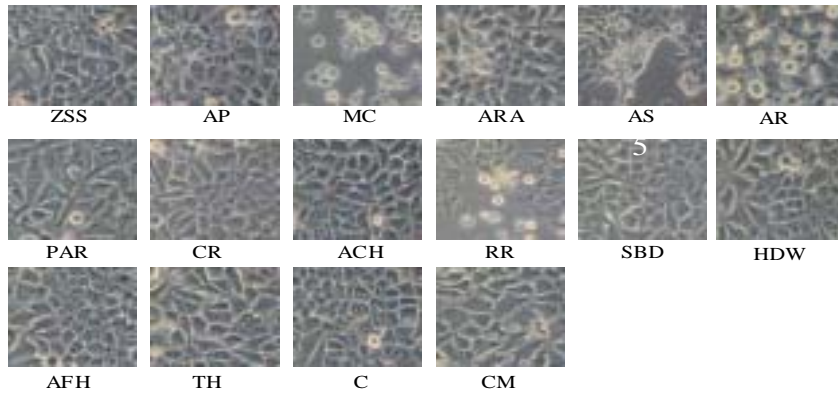


圖4、不同中藥 0.3 % 甲醇萃取液對MCF7細胞形態之觀察。

Figure 4、Morphological observation of MCF7 cells treated with various 0.3 % methanol extracts of herbs.

77

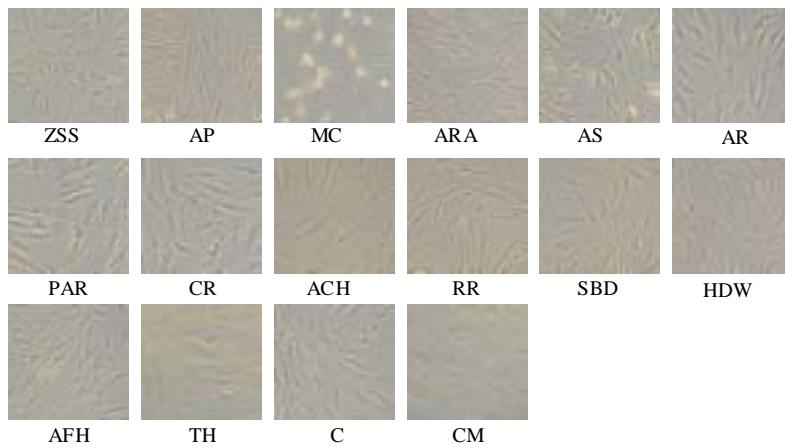


圖5、不同中藥 0.3 % 甲醇萃取液對CCD966SK細胞形態之觀察。

Figure 5、Morphological observation of CCD966SK cells treated with various 0.3 % methanol extracts of herbs.

78

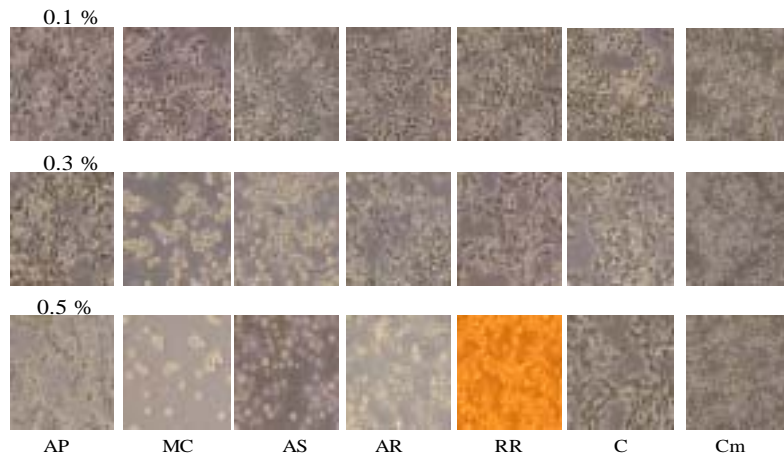


圖6、不同濃度甲醇萃取液對Hep3B細胞形態之影響。  
Figure 6、Morphological observation of Hep3B cells treated with various levels of methanol extracts of herbs.

80

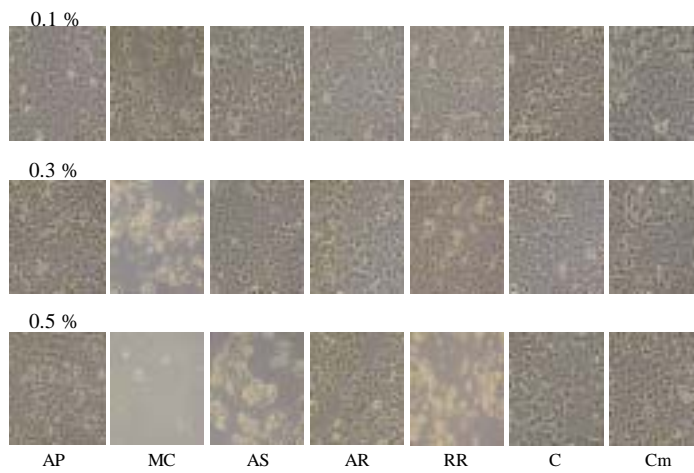


圖7、不同濃度甲醇萃取液對MCF7細胞形態之影響。  
Figure 7、Morphological observation of MCF7 cells treated with various levels of methanol extracts of herbs.

81



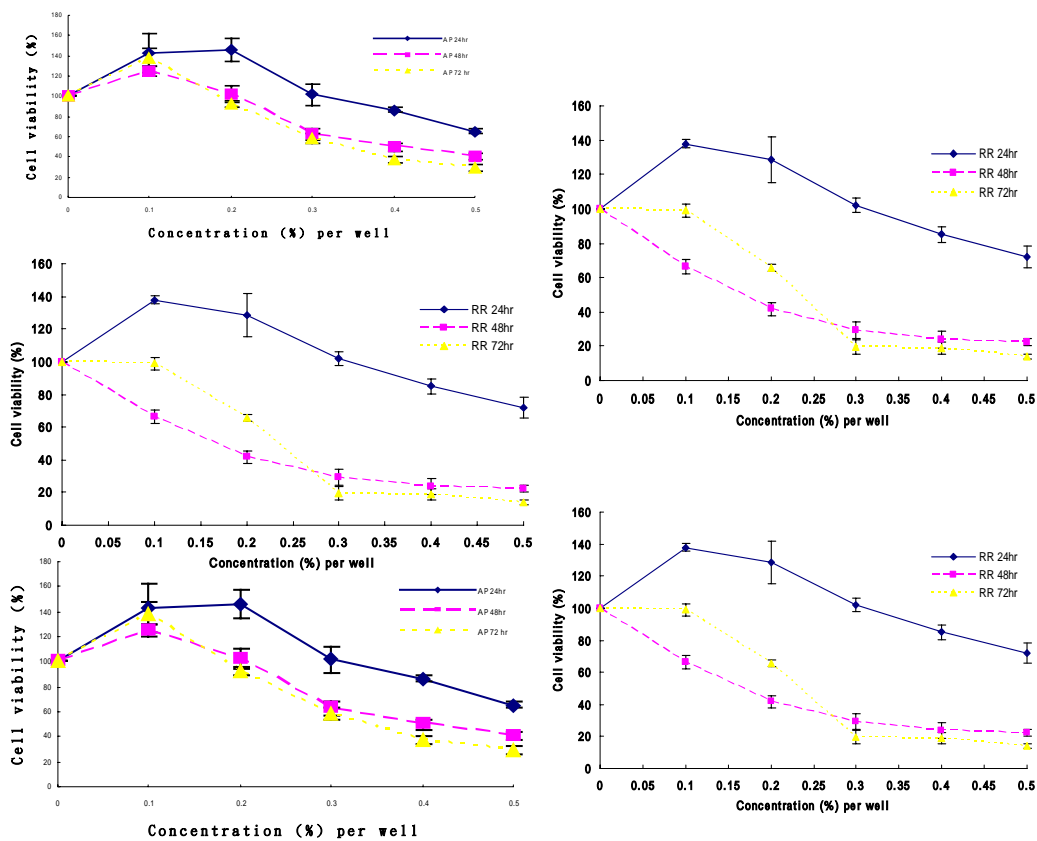


圖8、不同中藥甲醇萃取物對Hep3B細胞生長之影響。

Figure 8、Effect of various methanol herb extracts of AP、MC、AS、AR and RR on the growth of Hep3B cells.

Hep3B cells ( $5 \times 10^3$  cell/well) were seeded in 96 well culture plates for 24 hr, and were subsequently incubated in fresh media and treated with various concentrations of methanol extracts of herbs (AP、MC、AR、AS and RR) for 24hr、48hr and 72 hr. Number of cells cultured in media without the addition of herb extract was used as control. Cell viability was determined by the MTT assay.

Each data represents mean $\pm$ SD (n=5) from the same experiment.

Cell viability (%)= cell number in sample (cell/mL) /cell number in the respective control(cell/mL)

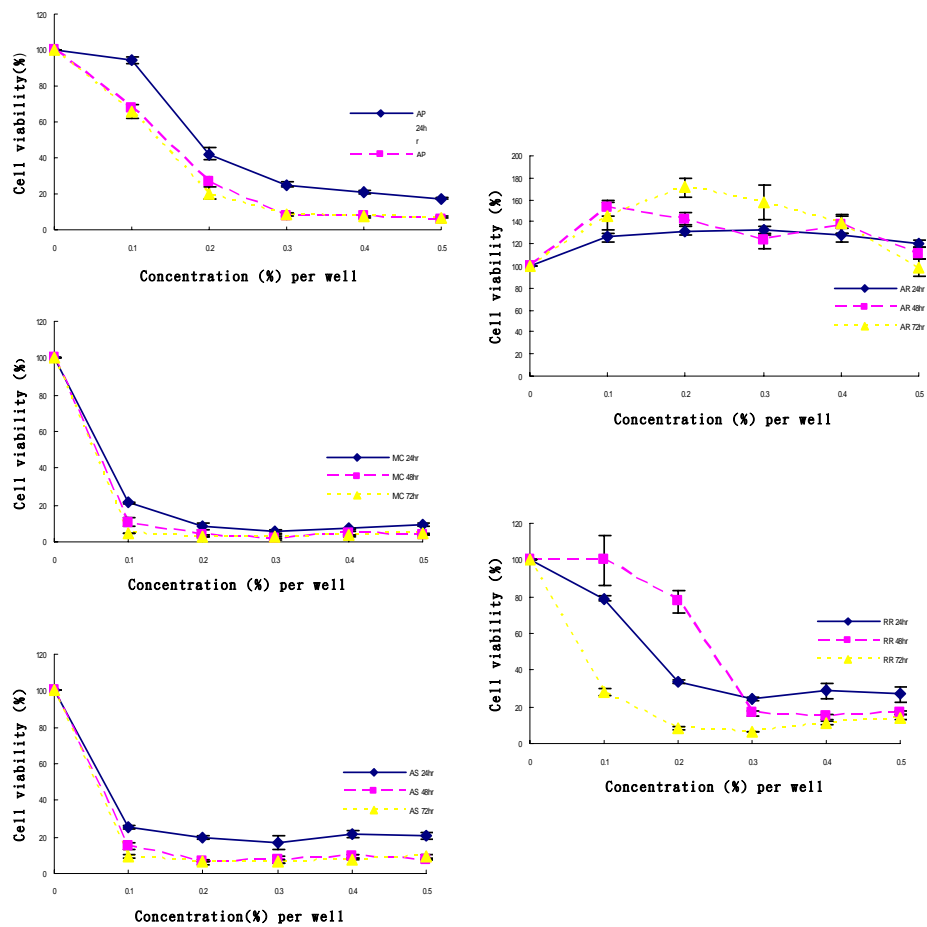


圖9、不同中藥甲醇萃取物對HepG2細胞生長之影響。

Figure 9、Effect of various methanol herb extracts of AP、

MC、AS、AR and RR on the growth of HepG2 cells.

Hep3B cells ( $2.5 \times 10^3$  cell/well) were seeded in 96 well culture plates for 24 hr, and were subsequently incubated in fresh media and treated with various concentrations of methanol extracts of herbs (AP、MC、AR、AS and RR) for 24hr、48hr and 72 hr. Number of cells cultured in media without the addition of herb extract was used as control. Cell viability was determined by the MTT assay.

Each data represents mean $\pm$ SD (n=5) from the same experiment.

Cell viability(%)=cell number in sample (cell/mL)

/cell number in the respective control (cell/mL)

表一、中草藥名稱及代稱

Table 1、Scientific names and their abbreviations of the Chinese herbs primitively selected in the present study

編號	中文	別稱	學名	代稱
1	酸棗仁	棗實,山棗仁,羊棗仁	<i>Zizyphi spinosi semen</i>	ZSS
2	大腹皮	大腹檳榔、檳榔衣、 大腹絨	<i>Arecae pericarpium</i>	AP
3	厚朴	川樸,赤樸,烈樸,重樸, 厚皮,淡白	<i>Magnoliae cortex</i>	MC
4	淮七	淮牛膝、懷牛膝	<i>Achyranthis radix</i>	ARA
5	檳榔	大腹子、海南子、榔玉	<i>Arecae semen</i>	AS
6	白朮	於朮、山薑	<i>Atractylodis rhizoma</i>	AR
7	黃柏	黃蘗、柏皮	<i>Phellodendron amurense rupr</i>	PAR
8	防己	漢防己、木防己	<i>Cocculis rhizoma</i>	CR
9	茵陳	綿茵陳,茵陳草,茵塵, 白蒿,耆蒿	<i>Artemisiae capillaris Herba</i>	ACH
10	大黃	錦紋,生軍,治軍,黃良, 將軍,火參,膚如	<i>Rhei rhizoma</i>	RR
11	半支蓮	並頭草、向天盞	<i>Scutellaria barbata Don</i>	SBD
12	白花蛇舌草	白花十字草、龍舌草、 蛇舌草、蛇舌癩、 龍吐珠	<i>Hedyatio diffusa willd</i>	HDW
13	金線蓮		<i>Anoectochilus formosanus Hayata</i>	AFH
14	蒲公英	黃花地丁、鳧公英、 僕公嬰、黃花草	<i>Taraxace Herba</i>	TH

表 2、不同中藥 0.3 % 甲醇萃取液對各種細胞株細胞形態之觀察

Table 2、Morphological observation of various cell lines treated with various 0.3 % methanol extracts of herbs

	ZSS	AP	MC	ARA	AS	AR	PAR	CR	ACH	RR
HepG2	—	*	*	◎	*	—	◎	◎	—	*
		細胞數目減少、型態改變	細胞數目減少、型態改變	型態改變	細胞數目減少 型態改變		型態改變	型態改變		細胞數目減少、 型態改變
Hep3B	—	—	*	—	*	—	—	—	—	*
			細胞浮起 呈圓形		細胞數目減少 型態改變					同 AS 但有 細胞浮起
MCF7	—	—	*	—	*	—	—	—	—	*
			細胞數目減少、型態改變		型態改變					型態改變
CCD 966SK	—	—	*	—	*	—	—	—	—	◎
			細胞浮起 呈圓形		細胞萎縮破 碎					有細胞浮起

— 24 小時觀察細胞型態無變化

\* 24 小時觀察細胞型態有變化

◎ 48 小時觀察細胞型態有變化 (資料未列出)

CM 0.3 % MeOH

表 6、溶於 0.3 %DMSO 之各種中草藥萃取物對於 Hep3B 細胞生長之影響

Table 6、 Effect of herb extracts in 0.3% DMSO on the cell viability of Hep3B

Herb extract	Concentration (μg/mL)	Cell viability(%)		
		After 24 hr	After 48 hr	After 72 hr
AP	0	100	100	100
	CM*	98.6±7.0	129.4±3.1	102.5±4.9
	1	119.9±8.0	124.3±9.8	118.9±8.2
	10	146.9±11.7	108.2±4.4	100.4±5.2
	30	65.8±3.0	29.8±1.5	26.8±2.2
	50	39.6±4.5	18.2±3.4	13.8±0.7
	70	31.8±1.3	12.1±0.8	10.4±0.4
	100	16.1±2.5	7.5±0.6	6.2±0.7
MC	0	100	100	100
	CM*	145.0±9.7	85.8±3.6	101.3±4.4
	1	163.1±13.0	142.0±4.2	119.3±7.6
	10	45.1±4.5	24.8±0.8	20.8±1.8
	30	5.6±0.7	4.1±0.3	3.5±0.3
	50	13.7±2.1	6.4±0.2	7.7±1.4
	70	16.9±2.3	10.4±1.7	9.3±0.8
	100	15.6±1.7	11.1±0.7	11.7±0.4
AS	0	100	100	100
	CM*	127.3±4.7	113.4±3.1	106.1±2.1
	1	107.4±6.4	111.6±5.9	122.7±1.8
	10	54.3±2.2	24.8±1.6	21.3±1.2
	30	24.4±1.4	14.3±1.6	7.9±0.8
	50	20.4±1.6	11.4±0.6	7.5±1.1
	70	14.5±2.5	8.6±0.7	7.0±0.6
	100	9.4±1.3	10.7±0.8	6.4±1.0

AR	0	100	100	100
	CM*	91.9±7.8	89.8±5.7	119.4±3.4
	1	89.2±3.2	109.6±9.2	152.9±7.6
	10	89.4±4.0	109.4±6.2	164.2±10.4
	30	88.6±2.8	126.3±4.9	116.0±4.2
	50	87.6±7.5	102.5±4.9	93.1±3.2
	70	95.5±10.0	58.9±5.9	69.8±1.0
	100	69.7±8.5	43.0±2.1	48.1±3.3
RR	0	100	100	100
	CM*	106.0±5.0	99.8±7.3	97.3±8.0
	1	122.7±8.2	94.1±5.8	99.8±11.7
	10	120.2±4.1	74.8±7.6	76.7±4.7
	30	77.4±3.7	18.7±1.6	33.1±0.3
	50	47.6±1.7	10.6±1.5	22.5±1.0
	70	35.3±3.1	10.1±0.6	20.5±2.0
	100	24.2±1.3	12.9±0.7	19.6±1.8

Hep3B cells (  $5 \times 10^3$  /well ) were seeded in 96 well culture plates for 24 hr, and were subsequently incubated in fresh media and treated with various concentrations of herbs ( AP, MC, AR, AS and RR ) extracts in 0.3 % DMSO for 24hr, 48hr and 72 hr. Cell viability was determined by the MTT assay. Each data represents mean± SD ( n=5 ) from the same experiment.

\* Control

表 7、溶於 0.3 %DMSO 之各種中草藥萃取物對於 HepG2 細胞生長之影響

Table 7、Effect of herb extracts in 0.3 % DMSO on the cell viability of HepG2 cells

Herb extract	Concentration (μg/mL)	Cell viability(%)		
		After 24 hr	After 48 hr	After 72 hr
AP	0	100	100	100
	CM*	102.1±2.4	101.0±7.4	104.5±4.7
	1	119.9±1.2	119.2±8.9	149.5±17.4
	10	89.4±15.9	60.7±6.3	68.4±5.0
	30	25.5±2.3	5.9±0.5	5.9±0.9
	50	30.5±1.4	6.1±0.4	7.3±0.4
	70	23.5±0.9	6.9±0.2	7.4±0.7
	100	26.3±2.8	3.7±0.4	4.6±0.8
MC	0	100	100	100
	CM*	125.4±5.5	77.7±4.0	134.5±8.5
	1	116.7±7.3	118.2±10.7	182.1±14.3
	10	27.3±6.4	8.3±1.1	5.3±0.4
	30	10.1±1.3	5.8±0.6	7.7±0.6
	50	22.4±3.5	9.1±0.2	7.7±0.6
	70	22.8±2.9	13.0±0.9	15.4±0.8
	100	26.3±1.6	12.7±1.5	18.8±1.1
AS	0	100	100	100
	CM	114.9±6.7	96.9±3.8	98.5±6.7
	1	107.4±6.4	115.6±9.7	161.7±11.8
	10	34.1±7.5	19.3±3.7	11.4±0.4
	30	27.2±2.6	13.0±1.3	9.5±0.5
	50	21.4±2.4	11.4±0.6	7.4±0.5
	70	13.8±3.6	7.4±0.4	10.0±1.1
	100	9.4±1.3	8.2±0.5	5.9±0.3

AR		0	100	100	100
		CM*	105.8±11.8	86.9±5.1	139.9±6.1
		1	110.8±2.4	105.1±12.8	149.9±3.4
		10	123.6±4.2	129.5±7.3	164.9±12.8
		30	124.4±5.0	80.9±4.9	118.1±13.2
		50	40.5±6.8	5.1±0.7	4.4±0.4
		70	12.7±2.3	2.6±0.4	4.2±1.2
		100	3.0±1.8	0	0
RR		0	100	100	100
		CM*	97.7±3.5	82.7±8.9	131.8±3.1
		1	123.7±6.4	126.7±1.7	142.8±6.7
		10	99.9±7.1	30.9±2.2	20.9±1.8
		30	44.5±4.2	12.5±0.3	14.4±0.8
		50	39.5±0.8	16.3±0.9	17.5±1.0
		70	46.3±5.2	19.1±1.3	25.8±1.3
		100	30.5±2.7	19.8±1.0	19.3±2.0

HepG2 cells ( $2.5 \times 10^3$ /well) were seeded in 96 well culture plates for 24 hr, and were subsequently incubated in fresh media and treated with various concentrations of herbs (AP, MC, AR, AS and RR) extracts in 0.3 % DMSO for 24hr, 48hr and 72 hr. Cell viability was determined by the MTT assay. Each data represents mean±SD (n=5) from the same experiment.

\* Control

表 8、不同中草藥萃取物對 HepG2 及 Hep3B 之 IC<sub>50</sub> 值 (μg/mL) \*

Table 8、IC<sub>50</sub> values (μg/mL) of various herb extracts in DMSO solution on HepG2 and Hep3B

	IC <sub>50</sub> values (μg/mL)					
	HepG2			Hep3B		
	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
AP	10–30	10–30	10–30	30–50	10–30	10–30
MC	1–10	1–10	1–10	10	1–10	1–10
AS	1–10	1–10	1–10	30	1–10	1–10
AR	50	30–50	30–50	>100	70–100	100



RR	30	1-10	1-10	50	10-30	10-30
----	----	------	------	----	-------	-------

\* Concentration of herb extract required to inhibit 50 % cell viability.

## 結論

本研究以細胞形態實驗所篩選出的中草藥(大腹皮、厚朴、檳榔、白朮及大黃)，藉由細胞形態變化可和後續蛋白質體的分析相結合(Harris et al., 2002)。經由 MTT 細胞毒性試驗得知，中藥甲醇萃取物對 HepG2 作用較 Hep3B 敏感，以 24 小時處理對 HepG2 達 50% 抑制率所需的濃度 (IC<sub>50</sub> 值) 分為大腹皮 (10-30 µg / mL)、厚朴 (< 10 µg / mL)、檳榔 (< 10 µg / mL)、白朮 (50 µg / mL) 及大黃 (30 µg / mL)，均較 Hep3B 所需低，而水萃取物所造成的影響十分低微。在 SRB 的分析方面，大腹皮濃度達 30 µg / mL 始對 HepG2 的蛋白質有影響，濃度至 50 µg / mL 時，對 Hep3B 的蛋白質才有些微影響，若將 SRB 分析結果以細胞毒性表示，則和 MTT 細胞毒性試驗有相似的結果。

## 參考文獻

- 上野洋一郎。組織培養技術。1999。藝軒圖書出版社。
- 中醫藥資訊網。中藥行政一常用中藥。行政院衛生署中醫藥委員會。
- 王聲遠、許梅玲、李旭生和蕭明熙。1993。靈芝與雲芝免疫增強作用之研究。中醫藥年報 11：257-276。
- 李一宏和呂文智。2000。刪補名醫方論。志遠書局。
- 何彥毅。2000。中藥厚朴抽取物厚朴酚對於乙醯氨酚引起急性肝損傷之動物模式之研究。國立陽明大學傳統醫藥學研究所碩士論文。
- 行政院「第二次生物技術策略(SRB)會議」。1998 6 8-12。「議題結論報告」。主題一、中藥發展策略。台灣。
- 行政院衛生署衛生統計一八十九年死因統計，2001。行政院衛生署。

行政院衛生署健康食品管理法及相關法規－健康食品之免疫調節功能評估方法。1999。

沈成基。1985。中藥大黃對實驗性肝炎之療效。中國醫藥學院中國醫藥研究所碩士論文。

周佳珍。2000。龍膽瀉肝湯及其主成分 baicalein 等對 Hep3B 細胞凋亡之影響。國立臺灣大學藥理學研究所碩士論文。

洪淑敏。2000。靈芝促進人類肝癌細胞凋亡之研究。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。

洪業晃。1998。茵陳蒿湯之抗氧化的作用。中國醫藥學院中國醫藥研究所碩士論文。

郭慧固和楊維傑。2000。內經知要譯解。志遠書局。

陳定信、賴明陽和陳建弘。本土醫學資料庫之建立及衛生政策上之應用。1991。行政院衛生署八十年度委託研究計畫研究報告。

陳定信。慢性 B，C 及 G 型病毒性肝炎之研究：分子流行病學、致病機轉、自然病史與治療。1999。行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫研究報告。

常玉澤。2000。Magnolol 對人類肝癌細胞之抗肝癌活性的機制研究。台北醫學院細胞及分子生物研究所碩士論文。

張立青。1998。大黃素調節人類細胞中核甘酸切除修補之分子機轉研究。高雄醫學院生物化學研究所碩士論文。

張思平。1998。肝脂質過氧化之研究。台北醫學院生藥學研究所碩士論文。

張永勳。1997。台灣市售易混用、誤用中藥品種之探討。中醫藥年報 15:476-624。

歐馨婷。2001。多種蔬菜抑制人類白血病細胞 (U937) 增殖與誘導其分化之探討。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。

賴龍。1980。臺灣治療肝炎草藥之調查研究。文化大學實業計劃(農學組)研究所碩士論文。

蔡穎銘。1983。黃芩對四氯化碳誘發肝炎之療效及其有效成份之探

- 討。中國醫藥學院中國醫藥研究所碩士論文。
- 魏育慧。2000。利用動物細胞進行抗癌藥物篩選。食品工業。32:27-35。
- Charlwood, J., Skehel, J. M., King, N., Camilleri, P., Lord, P., Bugelski, P. and Atif, U. 2002. Proteomics analysis of rat kidney cortex following treatment with gentamicin. *Journal of Proteome Research* 1:73-82.
- Chen, D. S. and Sung, J. L. 1978. Hepatitis B virus infection and chronic liver disease in Taiwan. *Acta Hepato-Gastroenterol.* 25: 423-430.
- Chen, D. S., Kuo, G. and Sung, J. L. 1990. Hepatitis C virus infection in an area hyperendemic for hepatitis B and chronic liver disease : The Taiwan Experience. *J. Infect. Dis.* 162: 817-822.
- Chen, Y. J., Shiao, M., Lee, S. S. and Wang, S. Y. 1997. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sciences* 60: 2349-2359.
- Denizot, F. and Lang, R. J. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89:271.
- Dong, Y., Yang, M. P. and Kwan, C. Y. 1997. *In vitro* inhibition of proliferation of HL-60 cells by tetrandrine and coriolus versicolor peptide derived from Chinese medicinal herbs. *Life Sciences* 60: 135-140.
- Ebina, T. and Murata, K. 1992. Antitumor effect of PSK at a distant site: Tumor-specific immunity and combination with other chemotherapeutic agents. *Jpn. J. Res.* 83: 775-782.
- Fey, S. J. and Larsen, P. M. 2001. 2D or not 2D. *Current Opinion in Chemical Biology.* 5:26-33.
- Fong, Y. and Blumgart, L. H. 1996. Surgical therapy of liver cancer. In:

- Zakim, D., T. D. Boyer, eds. Hepatology: a textbook of liver disease. 3<sup>rd</sup> ed. pp.1548-1564. Saunders, Philadelphia.
- Freshney, R. I. and Freshney, M. G. 1996. Culture of immortalized Cells, pp.1-366, Wiley-Liss, New York, USA.
- Herbert, B. 1999. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20:660-663.
- Hwang, K. P., Yang, J. M., Wu, B. N., Yeh, J. L., Yang, Y. D., Sou, S. F. and Chen, I. J. 1997. Comparative study on the pharmacokinetic bioequivalence of two intravascular ceftriaxone preparations. *J. Food Drug Anal.* 5:67-76.
- Jenkins, R. E. and Pennington, S. R. 2001. Arrays for protein expression profiling: Towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? *Proteomics* 1: 13-29.
- Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364.
- Lee, S. D., Chan, C. Y., and Wang, Y. C. 1991. Seroepidemiology of hepatitis C virus infection in Taiwan. *Hepatology* 13: 830-833.
- Lin, Yuan. 1997. Modernization of Chinese herbal medicine through scientific and clinical validations. *J. Food Drug Anal.* 5:235-240.
- Lo, K. J., Tong, M. J., Chin, M. C. 1982. The natural course of HbsAg-positive chronic active hepatitis in Taiwan. *J. Infect. Dis.* 146: 205-210.
- Matsudaira, P. 1987. Sequence from picmole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol.*

Chem. 262: 10035-10038.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83:757-766.

Mosamann, T. J. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55.

Page, M. J., Amess, B., Rohlf, C., Stubberfield, C. and Parekh, R. 1999. Proteomics: a major new technology for the drug discovery process. *Drug Discov. Today* 4: 55-62.

Pannington, S. R. and Dunn, M. J. 2001. Proteomics: from protein sequence to function. *BIOS.* Chp. 6.

Poppel, V. and Berg, V. D. 1997. Vitamins and Cancer. *Cancer Letters.* 114(1-2): 195-202.

Searls, D. B. 2000. Using bioinformatics in gene and drug discovery. *Drug Discov. Today* 5: 135-143.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, S., Vistica, D., Warren, J. H., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112.

Sung, J. L. and Chen, D. S. 1976. Hepatitis B surface antigen and antibody in liver disease in Taiwan. *Proc. 5<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress of Gastroenterology.* Singapore 99: 265-269.

- Sung, J. L. 1981. Hepatitis B virus infection and its sequence in Taiwan. Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC 5: 385-389.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:4350-4354.
- Tsai, T. H., Hong, C. Y. and Chen, C. F. 1997. Analysis of active ingredients in medicinal herbs with high-performance liquid chromatography and related technologies: A review. J. Food Drug Anal. 5:303-318.
- Vercoutter-Edouart, A. S., Czeszak, X., Crepin, M., Lemoine, J., Boilly, B., Bourhis, X. L., Peyrat, J. P. And Hondermarck, H. 2001. Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. Exp. cell res. 262:59-68.
- Wang, J. H. and Hewick, R. M. 1999. Proteomics in drug discovery. Drug Discov. Today 4: 129-133.
- Wang, C. C., Wu, C. H., Hesih, K. j., Yen, K. Y. and Yang, L. L. 2000. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cell. Toxicology 147:77-87.
- Weisburger, J. H. 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. Food Chem. Toxicol. 37: 943-948.
- Wilkinson, G. R. 1997. The effects of diet, aging and disease-states on presystemic elimination and oral drug bioavailability in humans. Advanced Drug Delivery Reviews. 27: 129-159.
- Williamson, G., DuPont, M. S., Wanigatunga, S., Heaney, R. K., Musk, S. R. 1997. Induction of glutathione S-transferase activity in hepG2 cells

by extracts from fruits and vegetables. *Food Chem.* 60:157-160.

Wittmann, H. G. and Wittmann-Liebold, B. 1974. Chemical structure of bacterial ribosomal proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, p115-140.

Wu, J. S., Chen, C. H. and Chiang, Y. H. 1980. Hepatitis B virus infection in Taiwan. *J. Formosan Med. Assoc.* 79: 760-767.