中華民國第 57 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學學科

佳作

052014

癌師膏屠—中藥複方抗癌之分析探討

學校名稱：國立臺南第一高級中學

作者：	指導老師：
高二 林隆軒 高二 陳郁旻	林靜吟

關鍵詞：托裏消毒飲、細胞週期、細胞凋亡

摘要

進步的文明與較長的壽命所衍生出的問題中，癌症可說是難以避免的病症，除了西方醫學的化學療法及放射療法之外，已有數千年歷史的中草藥方也逐漸成為常用的輔助療法，為了探討這些藥方是否能抑制癌細胞生長，我們對於五種中藥複方進行萃取，透過管柱層析及單方的毒性測試，配合高效液相層析儀質譜連用及文獻查詢，一步步分離複方龐大的混和物，並嘗試尋找有效成分。利用 Flow cytometry 分析藥物對細胞週期造成的影響，以及是否造成細胞凋亡，並使用 western blot 觀察 cyclin,CDK2,caspase 等等蛋白質的含量變化，希望能驗證中藥能確實對於癌症的治療方面有所幫助。

壹、研究動機

在衛生署公布的國人十大死因統計中，惡性腫瘤已蟬聯冠軍三十五年！其中乳癌是女性罹患率極高的一種惡性腫瘤，目前的療法卻容易對身體造成強烈傷害，令人聞之膽寒。不過，臨床上常見的中西藥搭配使用據統計能有效降低副作用甚至抑制癌細胞，而中藥複方的使用依循古醫書所述卻鮮少經科學證實，因此我們想探討中藥複方對乳癌細胞的影響，並一步步分離出有效成分。

貳、研究目的

一、研究背景

(一)、中藥與癌症

中醫認為，癌症是一種本虛標實的疾病，初期邪實為主，中晚期正氣虛為主，病理上有虛（氣、血、陰、陽）、濕、痰、瘀、毒互結的特色，治療上整體調理與局部治療相結合，分別採用補益扶正、行氣解鬱、活血化瘀、清熱解毒、化痰散結、利水化濕等藥物，亦有藥物能毒殺或抑制癌細胞生長。(參考：香港李嘉誠醫學院 Health Information 專欄 43) 又許多研究指出，當歸、芍藥、白芷、茯苓、白朮、人參等等單方具毒殺或抑制癌細胞生長的能力(參考資料：五，六)，結合中醫理論與西醫究，進行關鍵字篩選，挑選出以下五個複方。

補益扶正：六味地黃丸；　行氣解鬱：半夏厚朴湯；

活血化瘀：通竅活血湯；　清熱解毒：托裏消毒飲；　利水化濕：真武湯

(二)、癌細胞株介紹

MDA-MB-231 是一株三陰性乳癌細胞，其雌激素受體(Estrogen receptors)黃體素受體(Progesterone receptors)與人類表皮生長因子受體 2(HER-2) 表現皆為陰性，使用賀爾蒙療法或標靶藥物治療接效果不佳，臨床上預後極差，易惡性轉移(Metastasis)。(參考資料：四)

二、研究目的

(一)探討中藥複方對乳癌細胞之毒殺能力。

(二)分離複方得許多片段(Fractions)，測試其對乳癌細胞之毒殺能力。

(三)測試複方中單味藥各自對乳癌細胞之毒殺能力。

(四)探討複方、fraction、單方對 MDAMB231 之細胞週期的影響。
(五)探討 fraction、單方能否造成 MDAMB231 細胞凋亡。
(六)探討 fraction、單方對 MDAMB231 之週期相關蛋白與凋亡相關蛋白之影響。
(七) HPLC MSMS 分析、比對、推測複方萃取物中的主要有效成分。

參、研究設備和器材

一、細胞實驗

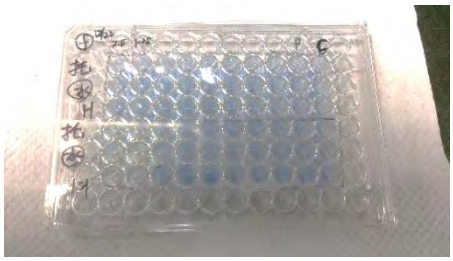
(一)設備

細胞培養箱(Incubator)

無菌操作台(Hood)

培養皿 Dish

分光光度計 SpectraMex5



96 孔盤

(二)藥品

1.培養液(medium):
(1)RPMI+5%PBS+1%PSG
(2)DMEM+20%FBS+1%PSG
2.PBS
3.Trypsin EDTA
4.亞甲藍液
5.Sarcosin:1%N-Lauroylsarcosin in ddH_2O

二、藥物萃取與處理實驗

(一)設備

微量天平電熱板

錐形瓶

冷凝管減壓濃縮機

逆向管住層析

肆、研究過程與方法

一、相關原理與技術探討

(一)逆向液固管柱層析

液相層析利用動相 (mobile phase) 和靜相 (stationary phase) 的交互作用，與分子極性差異分離混合物，分為液固層析法 (LSC) 和液液層析法 (LLC)。

本實驗使用之液固層析法以細粒固體之表面為靜相，沖提劑為動相，使欲分離之混合物與沖提劑競爭靜相固體表面吸附面積，若選擇易吸附極性小甚至是非極性分子之靜相，而使用極性液體為移動相，稱為逆向層析，反之則為正向。

本實驗先吸附混合物，再搭配梯度沖提法依次降低沖提液的極性，便能使極性溶質先行流出，最後沖提出的則會是非極性分子。(參考：高瞻自然科學教育平台)

(二)細胞存活率檢測

亞甲藍(methylene blue)上方的陽離子助色基，會與陰電性的核酸結合，染色於細胞核，又死亡之細胞無法貼附盤底而會漂浮於培養液中，倒去培養液後以亞甲藍染色，洗去多餘染劑後以溶劑溶出亞甲藍，讀出吸光值代表存活之細胞量。

(三)細胞分裂週期檢測

1.細胞週期簡介

細胞週期一般分成四個時期，G_1 期、S 期、G_2 期及M 期(圖一)。M(mitotic) 期，為細胞分裂的時期，S(synthesis) 期為細胞之DNA複製合成時期，在 M 期之後，S 期開始之前稱為G_1 期，在 S 期之後 M 期開始之前的時期稱為G_2 期。最初並不了解介於M 期 與 S 期之間細胞的發生情形，故命名為 gap 期，即空檔時期，而後方知於此二時期細胞仍在生長。

2.染色原理

Propidium iodide (PI) 名為碘化丙啶，能以嵌合的方式（intercalation）與雙股核酸鏈結合，但 PI 其無法穿透活細胞之細胞膜，須以酒精處理(fix)待測細胞之細胞膜再行染色。PI-DNA 複合物的激發和發射波長分別為 535 nm 和 615 nm， 因此流式細胞儀得以偵測其發出之紅色螢光，代表每一顆細胞之細胞核中 DNA 的量，以推測細胞處於週期中的甚麼階段。

3.流式細胞儀原理

當一束單色雷射光打向一到充滿懸浮之微小顆粒的流體，瞄準光束與流體交點的多個偵測器將能記錄下微小顆粒出現的散射，亦可檢測待測物發出之螢光訊號。前者包含了前散射(FSC)與旁散射(SSC)，前散射與細胞體積相關，而旁散射取決於顆粒的內部複雜程度，如核的形狀、胞質內顆粒的種類或者膜的粗糙程度，螢光訊號則主要來自外加的標記，如抗體標記或本實驗使用的 PI 染劑。

4.參數設定與數據分析

(1).建立 FSC/SSC 散點圖，圈定細胞群。

(2).建立 FL2-W/FL2-A 散點圖，去除沾黏之細胞團。

(3).建立 count/FL2-A 之圖，即可得到停留在各時期之細胞數。

(四)細胞凋亡檢測

1.早期凋亡現象簡介

凋亡細胞的早期變化之一，是胞膜上磷脂絲氨酸（Phosphatidyl Serine）的外露。健康的細胞膜有一不對稱性，即磷脂絲氨酸只存在胞膜內層，此不對稱性之維持，需借助一套酶系與能量 ATP；而凋亡細胞的早期變化是停止產能作用，故而無法維持此不對稱性，而使得磷脂絲氨酸外露。

2.染色原理

Annexin V 是一種 Ca+依賴的磷脂結合蛋白，易結合磷脂類如 PS，最初被發現是一種具有很強的抗凝血特性的血管蛋白，現今人們在 Annexin V 上接了螢光物質，便能利用流式細胞儀檢測是否有 Annexin V 的訊號。

二、發展研究架構圖

根據文獻探討，從觀察、連結、發想到一層層實驗，將想法形成研究架構如圖 4-2-1：

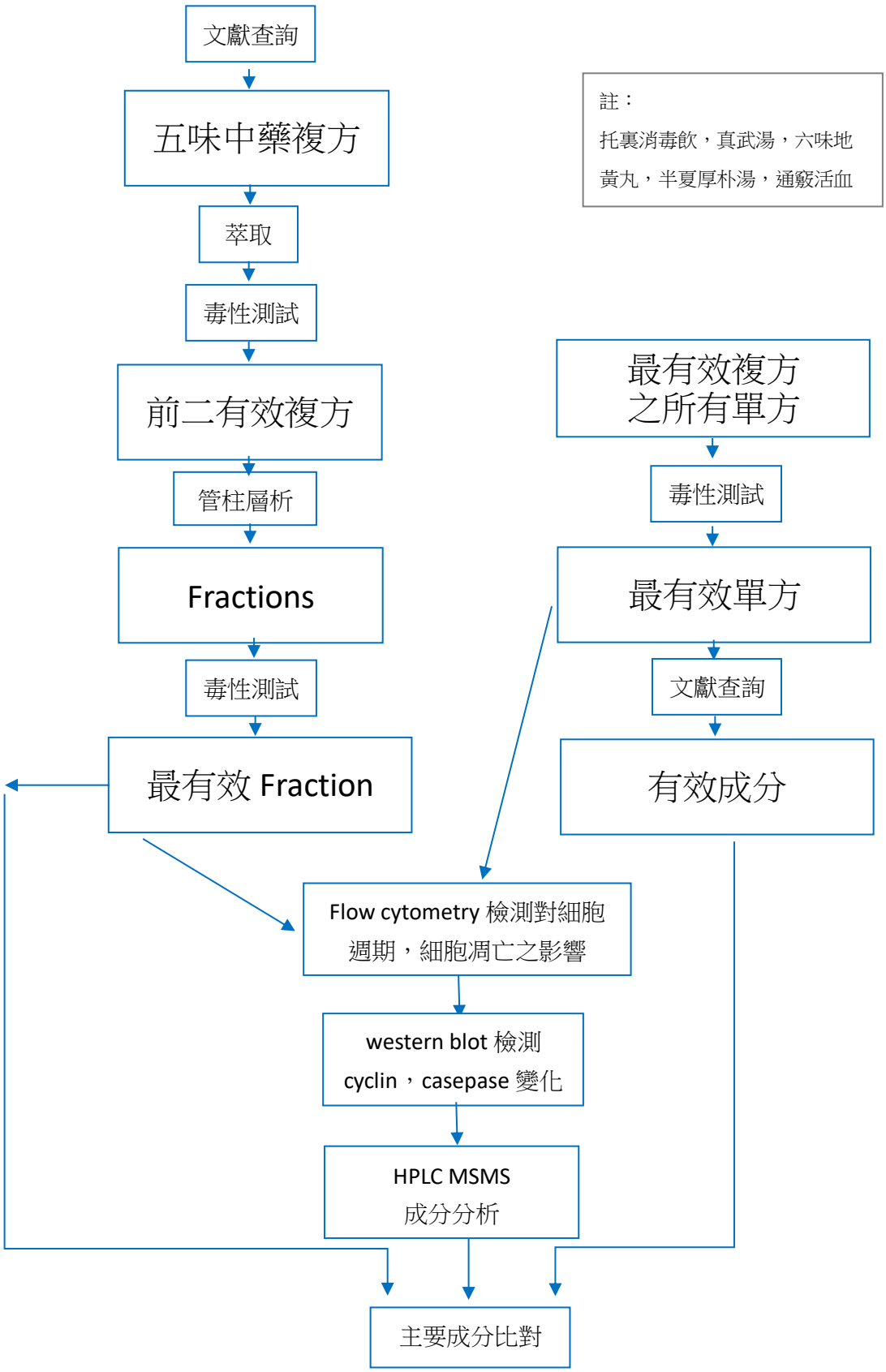


圖 4-2-1 研究架構圖

三、藥品製備

藥物處理 protocols

(一)藥物萃取

1.複方萃取

(1)依照本草拾遺之配方秤取中藥材，剪碎後置入錐形瓶

(2)依 30ml/g 加入溶劑(水萃為 ddH_2O，酒萃為絕對酒精)

(3)隔水加熱(100℃)八小時後，過濾藥渣，取得中藥萃取液

(4)減壓濃縮至藥材原重與萃取物之重量比為 6：1

(5)得浸膏狀複方萃取物 30g，以五公克為單位分裝保存於-20°C 冰箱

2.單方萃取

(1)取中華藥典中確認品種之單味藥材，剪碎後置入錐形瓶

(2)依 30ml/g 加入絕對酒精做為溶劑

(3)隔水加熱(100℃)八小時後，過濾藥渣，取得中藥萃取液

(4)減壓濃縮至藥材原重與萃取物之重量比為 6：1

(5)得浸膏狀單方萃取物 2g，保存於-20°C 冰箱

(二)浸膏溶取、配置

1.以刮杓取少量萃取物於 15ml 離心管中

2.在無菌操作台中加入少量有機溶劑(DMSO 或丙酮)與 PBS 溶解浸膏

3.有標示 F 者，表示有將藥品過 0.22μm 之 filter

(三)逆向管住層析

1.在層析管柱(column)中填入 diaion，以甲醇沖洗三次

2.以 200mL 的 ddH_2O 溶解 1g 的藥品，得藥物溶液

3.置 10g 之 diaion 於上述溶液中，減壓濃縮，使藥物 Coating 於其表面

4.將吸附藥物的 diaion 填入管柱上端，上方再塞入棉花固定

5.配置三種展開液(ddH_2O、50%甲醇水溶液、純甲醇)

6.依序以 ddH_2O、50%甲醇水溶液、純甲醇的次序沖提，展開液加至流動像透明無色為止，則更換下一種溶劑繼續沖提

7.收集三種不同展開液之萃取物，經減壓濃縮即為 fractions

四、人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)細胞培養

細胞培養 protocols

(一)試劑配置:RPMI with 5%FBS,1%PSG

(二)解凍細胞:採取快速解凍手法

1.取全新培養盤加入 10ml 之 medium

2.將冷凍細胞管置於浮床上 37 水浴

(三)培養條件:

乳癌細胞株(MDA-MB-231)貼附於 10 公分培養皿(Dish)上，加入含 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum=FBS)及 1%抗生素(PSG)的 RPMI 培養液(medium)，放置 5%CO_2 培養箱(Incubator)中培養(37°C)

(四)繼代培養:

1.吸去原有的 medium，加入 PBS 潤洗，除去殘餘的 medium

2.加入 trypsin，置於 incubator 三分鐘，使原先貼附於盤底的細胞懸浮

3.加入 4cc 之 medium 終止 trypsin 作用

4.以轉速 1200r.p.m 離心五分鐘，倒去上清液換入新的 medium，避免 trypsin 殘留

5.取 20μl(四)之液體，加上 20 μl 之染劑，進行細胞計數

6.將約 $5*10^4$ 個/mL 的細胞種回 dish

五、乳癌細胞(MDA-MB-231)細胞毒殺實驗

(一)原理:活的乳癌細胞貼附於 96well 的盤底，倒去 medium 加入亞甲藍 (methylene blue)作為染劑，其上方的陽離子助色基，會與陰電性的核酸結合，染色於細胞核，染色後加入 120μl 的 sarcosin 以 shaker 搖一小時，利用 SpectraMex5(分光光度計)讀取吸光值，判定存活度

(二)種細胞(seeding)

1.以 Trypsin 處理細胞後，進行細胞計數

2.在 96 孔盤中種入 100μl/well，2000/well 顆之細胞，周圍一圈不種

3.在周圍填入 100μl 之 PBS(如圖)

(三)加藥

1.seeding 後隔 24 hour 即吸去 medium

2.每格先加入 50 μl 的 medium

3.序列稀釋藥物後加入 well 中(50 μl/well)(如圖 4-5-1)

4.以 50μl/well 的溶劑(PBS+1%DMSO)做正控制組

PBS												
	藥物	處理							溶劑	(50%)	Control-	
											(Medium)	

(四)收取

1.加藥 72 小時後，至水槽倒去 medium

2.每 well 加入 100μl 的染劑

3.靜置一小時等待染色完成

4.小心地在水盆中洗去染劑，水柱不可直接打到盤底

5.將 96 孔盤晾乾，即可長久保存

(五)讀取

1.每個 well 加入 120μl 之 Sarcosin

2.搖晃溶解一小時
3.送入 SpectraMex5(分光光度計)中讀取吸光值
4.分析吸光值並計算藥物毒殺效果

六、流式細胞儀細胞週期測定

(一)原理:

細胞週期中各期的細胞DNA含量不同，故可以細胞內DNA之含量判別細胞週期。Propidium iodine (PI) 是一種螢光劑，可和DNA結合，當以波長488 nm之光激發後會發出波長625 nm之螢光。但PI無法進入細胞膜完整的細胞，故需先以酒精固定細胞，並使細胞膜上產生小洞，PI才得以進入細胞內，故可利用此染劑作為偵測細胞週期之細胞特性之用，測定細胞分裂週期經藥物影響後的變化。

(二)培養細胞樣品:

將 $2*10^5$ 個細胞種於六公分培養皿中，培養 24 小時待細胞貼附後，加入不同濃度藥品再培養 24 小時後收取，即得帶檢測之樣品。

(三)染色:

1.吸掉 medium 並以 PBS 潤洗後，加入 trypsin 切下附著於培養皿底部的細胞
2.利用上步驟吸取的 medium 將懸浮的細胞收取下來
3.以 1000r.p.m 離心五分鐘後倒除上清液
4.加入 0.5ml 的 PBS 使沉澱的細胞懸浮，並震動離心管均勻打散細胞
5.加入 95%酒精 Fix 細胞同時 vortex，並冰入-20℃冰箱中一小時
6.以 800r.p.m 離心五分鐘，倒掉酒精並倒置瀝乾
7.加入染劑 PI，避光染色 15 分鐘
8.樣品放置於冰桶中，以待檢測

(四)檢測及分析:

1.設定儀器參數，並讀取做為對照組的參考值
2.選取染色體套數為一倍及兩倍之間的細胞為檢測目標
3.以軟體分析細胞分裂各時期所佔的比例
4.推測藥物對細胞分裂造成的影響

七、流式細胞儀細胞凋亡測定

(一)原理:

以 Annexin V 染劑檢測細胞凋亡會出現的 PS 外翻現象，以 PI 染劑檢測細胞膜破裂之現象，依據訊號的有無將細胞區分為四類—正常細胞(AnnexinV-,PI-)，Apoptosis 早期(AnnexinV+,PI-)，Apoptosis 晚期(AnnexinV+,PI+) ，Necrosis(AnnexinV-,PI+)

(二)培養細胞樣品:

將 $2*10^5$ 個細胞種於六公分培養皿中，培養 24 小時待細胞貼附後，加入不同濃度藥品再培養 24 小時後收取，即得帶檢測之樣品。

(三)染色:

1 .吸掉 medium 並以冰 PBS 潤洗後，加入 trypsin 切下附著於培養皿底部的細胞
2 .利用上步驟吸取的 medium 將懸浮的細胞收取下來

3 .進行細胞計數，得知離心管內細胞總量
4 .以 1000r.p.m 離心五分鐘後倒除上清液
5 .加入 Annexin-binding buffer 調配成同樣細胞濃度，震動離心管使沉澱的細胞懸浮並均勻打散細胞
6 .各取 100 之待測樣品，加入 5μl之 PI 染劑以及 45μl之 annexin V
7 .避光染色 15 分鐘
8 .立即上機檢測

八、西方點墨法蛋白質分析

(一)原理:

利用十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(簡稱 SDS-PAGE)，透過外加電壓使帶負電之蛋白質因分子量大小不同，呈現在膠片不同位置，接著利用特定抗體能夠專一結合其抗原蛋白質的原理接上第一級抗體，在使用第二級抗體標示第一集抗體位置，由加入呈色劑的第二級抗體所發出的螢光可得知蛋白質分布的含量和位置。

(二)目的:

分離細胞中的蛋白質並比較不同濃度藥品對細胞特定蛋白質表現量的影響，找出可能影像細胞週期表現的蛋白質。

九、高效液相層析儀－質譜連用分析

(一)原理:

高效液相層析儀(HPLC)適用於對熱不安定、非揮發性物質、高極性成分之析，因此適用於中草藥品的分析，以溶液為移動相以膠體為固定相，樣品因與固定相及移動相之作用力不同而將混合物分離之層析法稱 為液相層析，高效液相層析係將固定相之膠體顆粒降低至 5-10μm 以提高分析及分離能力，但因為液體 通過細微膠體時阻力增大，故需藉由高壓幫浦輸送液體以利移動相流動。

(二)目的:

利用高效液相層析將複方 FRACTION 分離，針對含量比率較高者，比較文獻查詢所得知的成份，猜測 FRACTION 之中最為有效的化合物，再將單方細胞毒殺實驗中所得到最有效的單方進行對比進一步得知主要影響細胞週期的主要因素。

十、藥物對馴化細胞株之影響

(一)目的:

為了確定藥物對正常細胞有無影響，選取與 MDA-MB-231 分裂速度相近的細胞 BEAS-2B 進行實驗，因此選取人類支氣管上皮細胞做為對照組，加入最有效之複方進行比較。

(二)方法:

1 .僅轉換目標對象並依照細胞毒殺標準手法進行實驗
2 .收取結果並染色
3 .分析數據並計算 IC50

伍、研究結果與討論

一、中藥複方萃取

實驗一:

(一)選取五種複方分別為托裏消毒飲、真武湯、六味地黃丸、半夏厚朴湯、通竅活血湯

(二)依照複方藥品萃取標準流程製成浸膏，如下圖 5-1-1~5-1-2

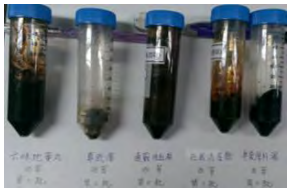


圖 5-1-1

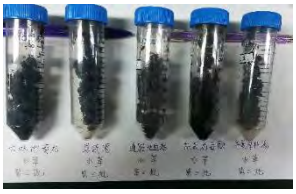


圖 5-1-2

討論:

1.水萃樣品經減壓濃縮後，萃取物近乎為乾燥塊狀，性質極脆

2.酒萃樣品經減壓濃縮後，萃取物呈現膏狀，性質黏稠

二、複方細胞毒殺實驗

實驗二：不同溶劑萃取效果之比較

(一)水萃複方之細胞毒殺能力測試

1.選取托裏消毒飲、真武湯、六味地黃丸、半夏厚朴湯、通竅活血湯，五種複方的二次水(ddH_2O)萃取物

2.利用 PBS 稀釋至不同濃度(2.5mg/ml~0.0195mg/ml)

3.依據標準毒殺流程進行毒性測試

4.分析實驗結果並計算 IC50，如下圖 5-2-1~5-2-2

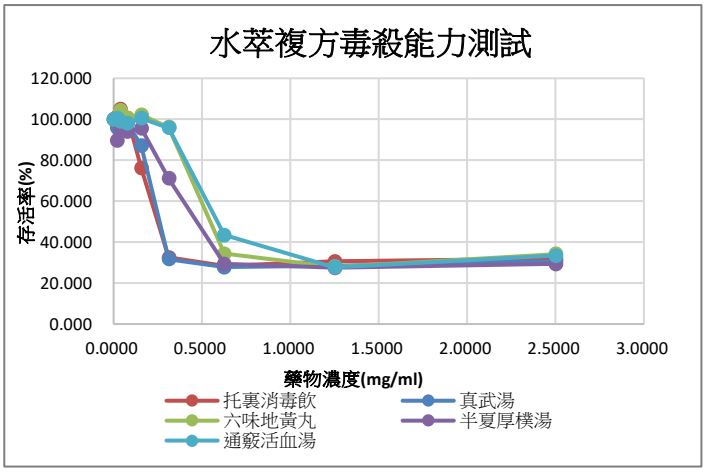


圖 5-2-1

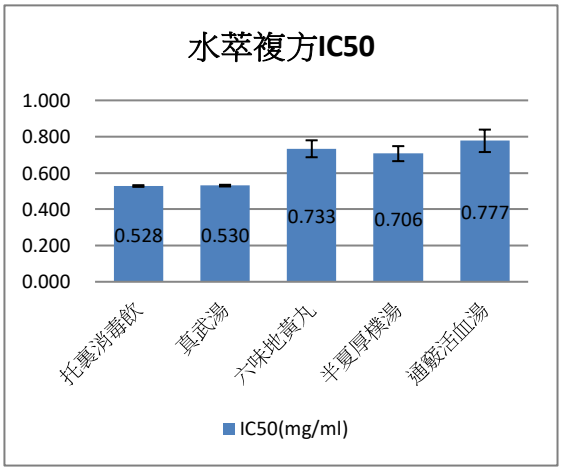


圖 5-2-2

(二)酒萃複方之細胞毒殺能力測試

1.選取托裏消毒飲、真武湯、六味地黃丸、半夏厚朴湯、通竅活血湯，五種複方酒精萃取物

2.利用 PBS 稀釋至不同濃度(2.5mg/ml~0.0195mg/ml)

3.依據標準毒殺流程進行毒性測試

4.分析實驗結果並計算 IC50，如下圖 5-2-3~5-2-4

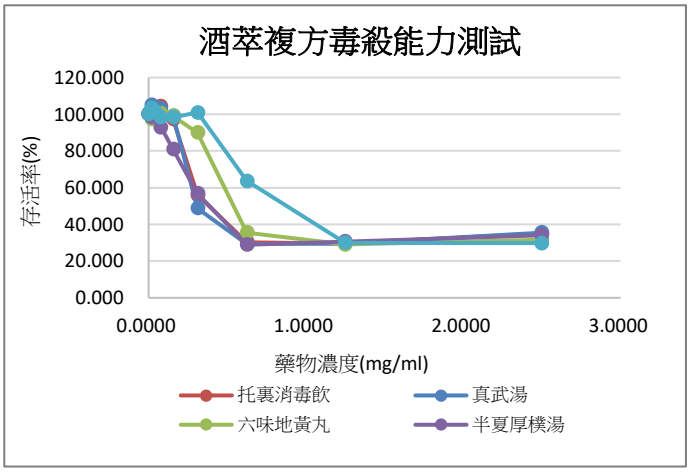


圖 5-2-3

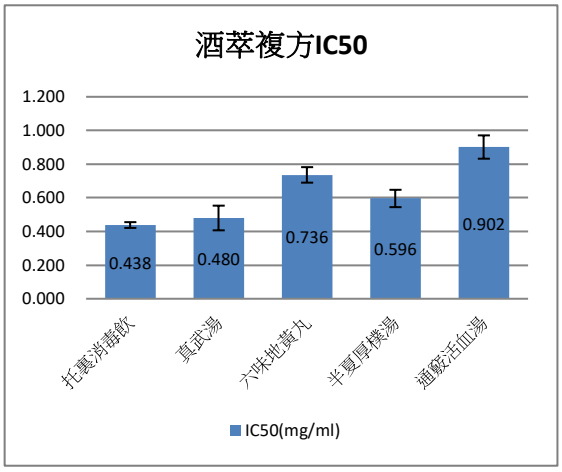


圖 5-2-4

表 5-2-1　IC50 濃度(mg/mL)

萃取方式\藥品	托裏消毒飲	真武湯
水萃	0.528 (mg/mL)	0.530 (mg/mL)
酒萃	0.438 (mg/mL)	0.480(mg/mL)

討論:

1.相同溶劑萃取的藥物中，不論酒萃或水萃，托裏消毒飲及真武湯有較好毒殺效果

2.不同溶劑萃取比較發現，酒萃有較好的毒殺效果

3.將以管住層析的方式分析相同萃取物不同片段的藥性

三、層析片段細胞毒殺實驗

實驗三:不同極性之 fraction 細胞毒殺能力測試

(一)前兩有效的複方，不同極性展開液萃取片段的毒性分析

1.選取托裏消毒飲及真武湯，經逆向管住層析標準程序後獲得 fraction

2.利用 PBS 稀釋至不同濃度(2.5mg/ml~0.0195mg/ml)

3.依據標準毒殺流程進行毒性測試

4.分析實驗結果並計算 IC50，如下圖 5-3-1~5-3-4

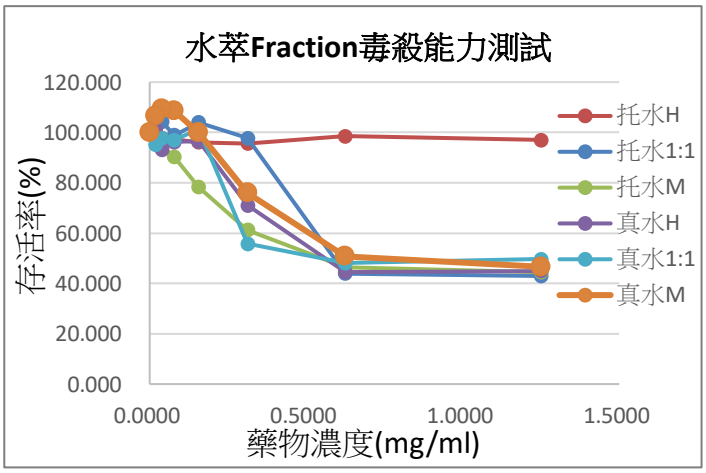


圖 5-3-1

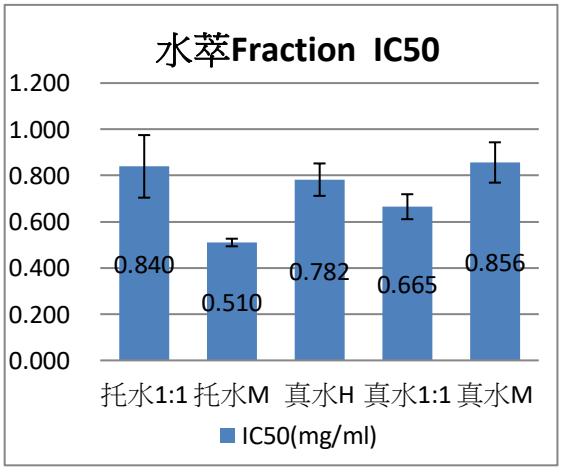


圖 5-3-2

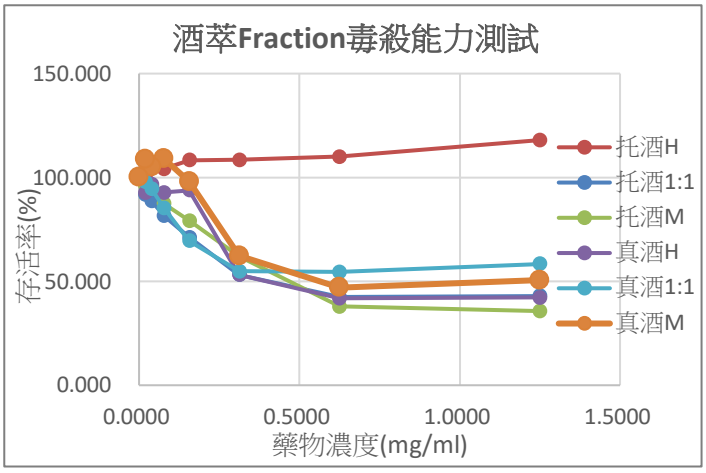


圖 5-3-3

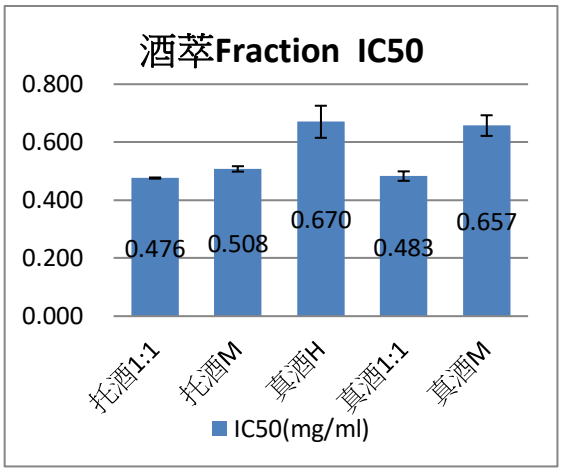


圖 5-3-4

討論:

1 .托裏消毒飲不論酒萃及水萃，用 ddH_2O 做沖提液時，即達在本實驗使用的最高劑量 1.25mg/mL 亦沒有明顯抑制效果

2 .托裏消毒飲酒精萃取物在 50%甲醇沖提下有最佳效果，且 IC50 為 0.476mg/Ml

3 .發現最有效的 fraction 的 IC50 數值和複方差不多，推測此片段為主要抑制生的主要成分

四、中藥單方萃取”單味藥”

實驗四：

(一)分別就托裏消毒飲之單味藥進行萃取

(二)取十二種單味藥-當歸、白芍、桔梗、黃耆、甘草、茯苓、白朮、川芎、銀花、人參、皂角刺

(三)依照單方藥品以乙醇進行標準萃取流程製成浸膏，如圖 5-4-1

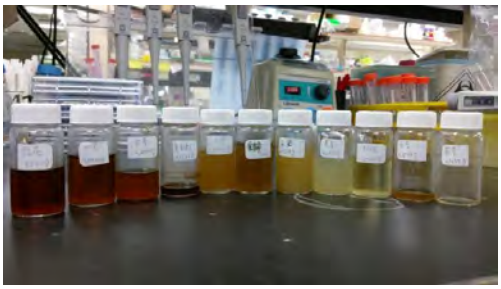


圖 5-4-1

討論:

1 .各單味藥材濃縮後萃取物重量不盡相同，溶解度亦不一

2 .大多成膠體溶液狀，甚至有些不易溶於 PBS，只能繼續稀釋

五、單味藥之細胞毒殺能力測試

實驗五：不同單味藥毒性分析

(一)高濃度初篩酒萃單味藥品之細胞毒性

1.秤取當歸、白芍、桔梗、黃耆、甘草、茯苓、白朮、川芎、銀花、人參、皂角刺之萃取物

2.利用 PBS 稀釋至不同濃度(2.5,2,1.5,1,0.5mg/ml)

3.依照標準毒殺流程進行細胞毒殺測試

4.分析實驗結果並計算 IC50，如下圖 5-5-1~5-5-4

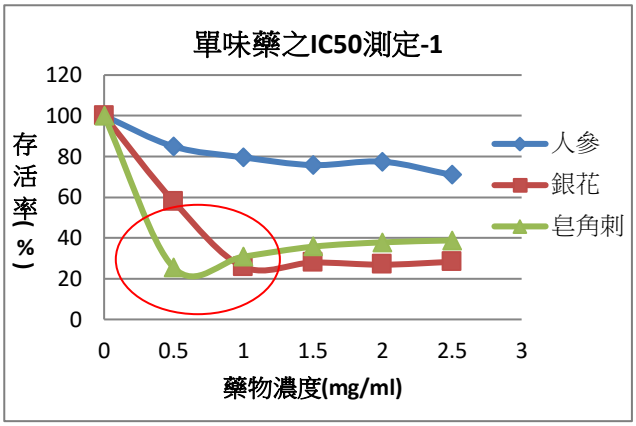


圖 5-5-1

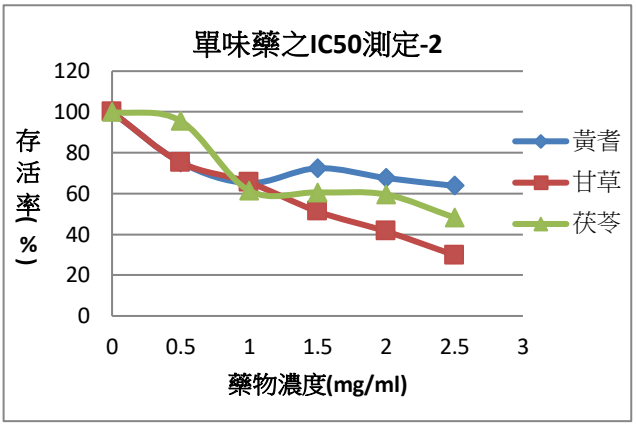


圖 5-5-2

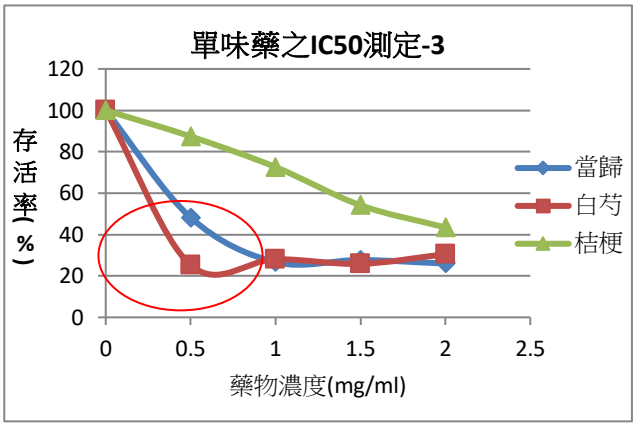


圖 5-5-3

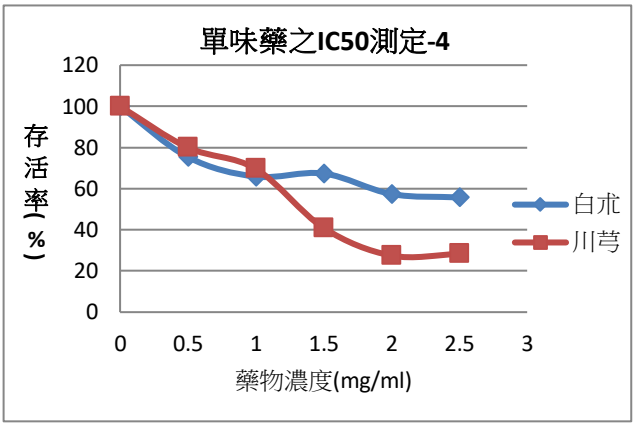


圖 5-5-4

討論

1 .皂角刺、金銀花、當歸、白芍等四種單方有較好的毒殺效果

2 .為了更精確得知單味藥之 IC50 因此進行更低濃度的測試

(二)前四有效單味藥之細胞毒殺能力測試

1.秤取白芍、銀花、皂角刺、當歸之萃取物

2.利用 PBS 稀釋至不同濃度(1,0.8,0.6,0.4,0.2mg/ml)

3.依照標準毒殺流程進行細胞毒殺測試

4.分析實驗結果並計算 IC50，如下圖 5-5-5~5-5-6

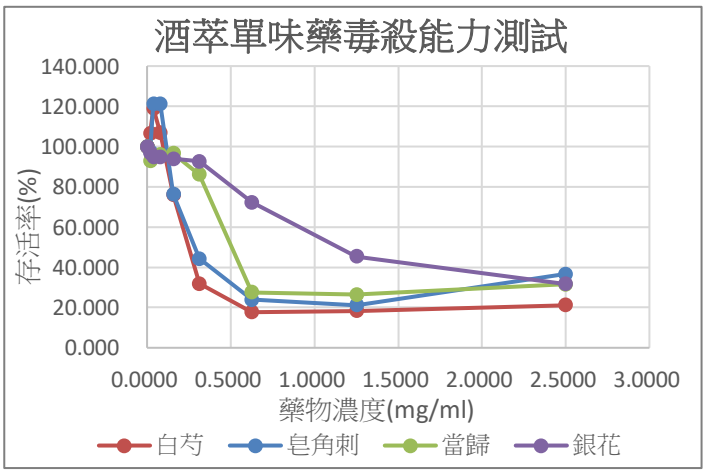


圖 5-5-5

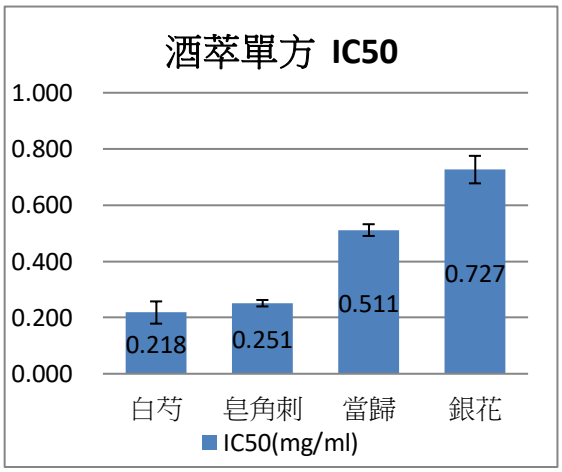


圖 5-5-6

討論:

1 .白芍及皂角刺的毒殺效果為單方中最佳二者，甚至好過複方本身效果

2 .推測白芍為整個複方有毒殺效果的主成分，其本身之 IC50 為 0.218mg/ml

六、細胞週期測定

實驗六：托裏消毒飲之複方酒萃物(Toli A)、最有效 fraction(TA1)、白芍對細胞週期影響

(一) 托裏消毒飲複方酒萃物(Toli A)對細胞週期的影響

1 .秤取複方萃取物

2 .利用 PBS 稀釋至 0.4、0.8、1.6mg/ml

3 .依照細胞週期檢測標準流程處理

4 .分析細胞週期比例變化，如下圖 5-6-1~5-6-6

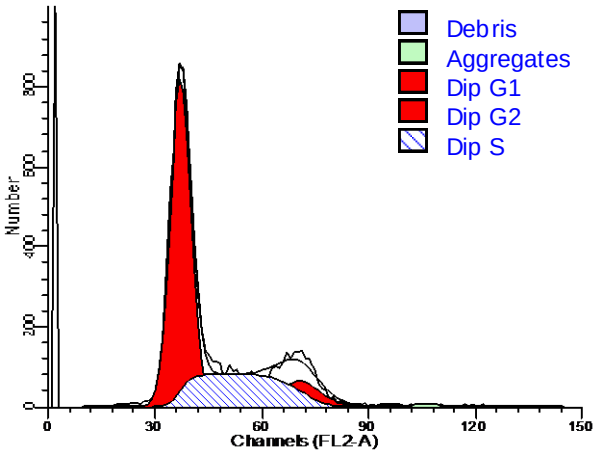


圖 5-6-1

Control

Dip G1: 57.42 %　Dip G2: 12.10 %

Dip S: 30.49 %　G2/G1: 1.96

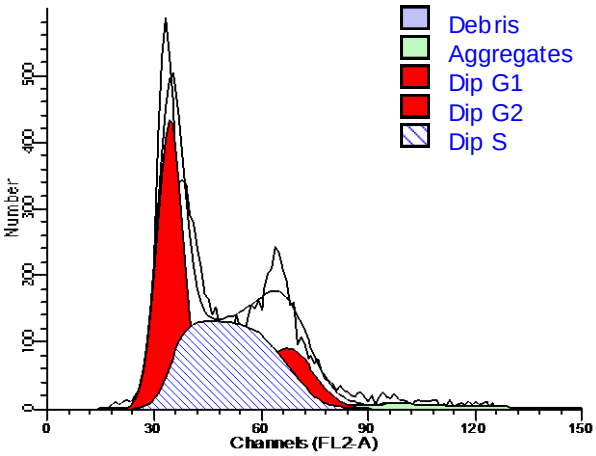


圖 5-6-2

Toli A (0.4mg/mL)

Dip G1: 40.11 %　Dip G2: 16.70 %

Dip S: 43.19 %　G2/G1: 1.96

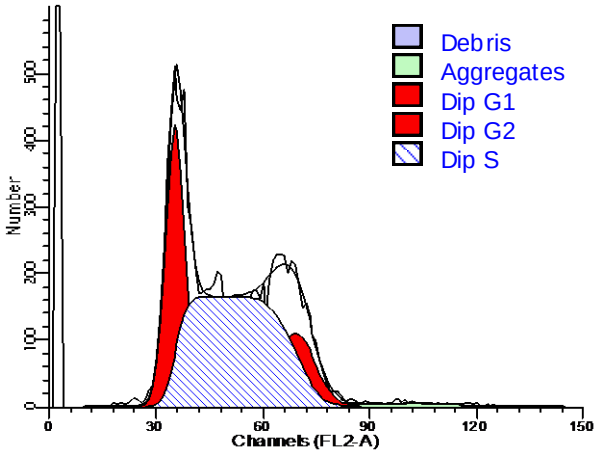


圖 5-6-3

Toli A (0.8mg/mL)

Dip G1: 29.22 %　Dip G2: 15.12 %

Dip S: 55.66 %　G2/G1: 1.96

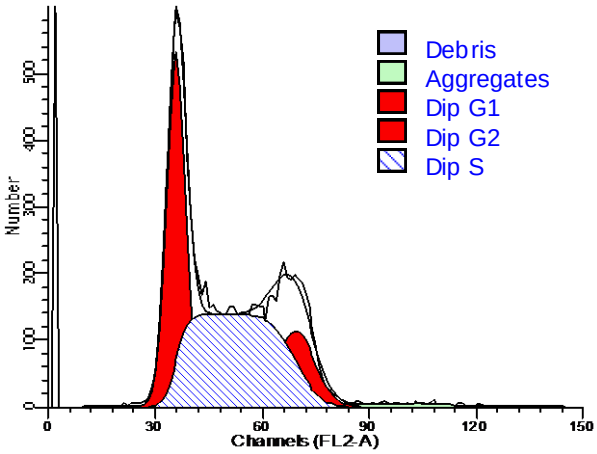


圖 5-6-4

Toli A (1.6mg/mL)

Dip G1: 36.94 %　Dip G2: 15.66 %

Dip S: 47.40 %　G2/G1: 1.94

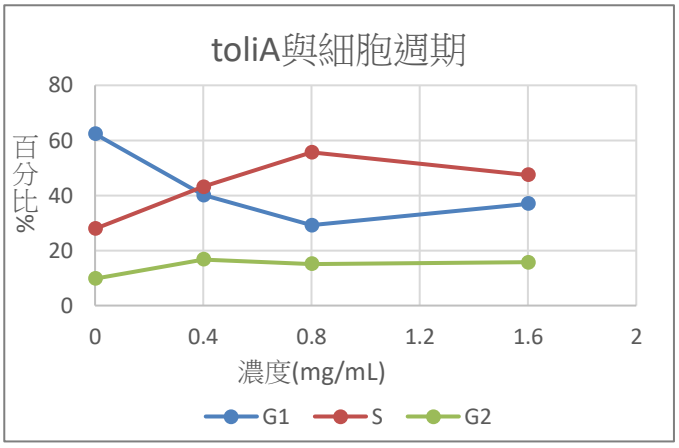


圖 5-6-5

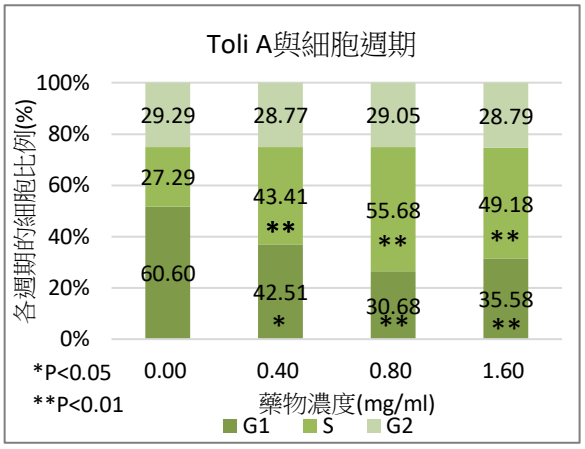


圖 5-6-6

討論:

1 .介於 0.5 ~ 2 倍 IC50 的濃度對細胞具一定影響力，但不至完全毒死細胞是最好的分析區間。

2 . .隨著藥物濃度增加，G1 phase 的比例顯著下降，S phase 的比例顯著增加，G2/M phase 的比例則沒有顯著變化，推測能使細胞週期停滯在 S phase。

(二)TA1 fraction 對細胞週期的影響

1.秤取托裏消毒飲酒精萃取物的 50%甲醇沖提液浸膏(TA1)

2.利用 PBS 稀釋至濃度為 0.175、0.35、0.7mg/ml

3.依照標準流程處理

4.分析細胞分裂周期比例的變化，如下圖 5-6-7~5-6-12

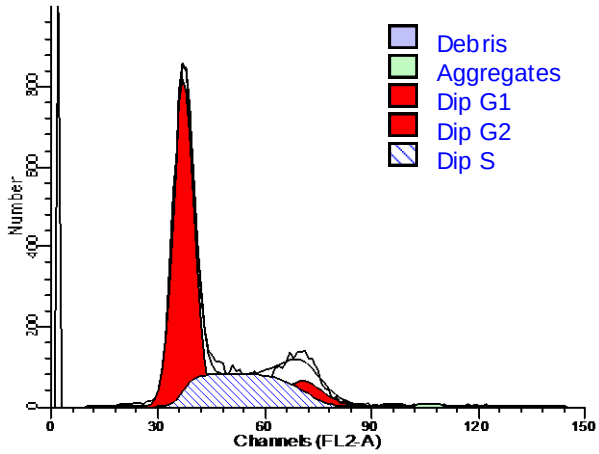


圖 5-6-7

Control 組

Dip G1: 57.42 %　Dip G2: 12.10 %

Dip S: 30.49 %　G2/G1: 1.96

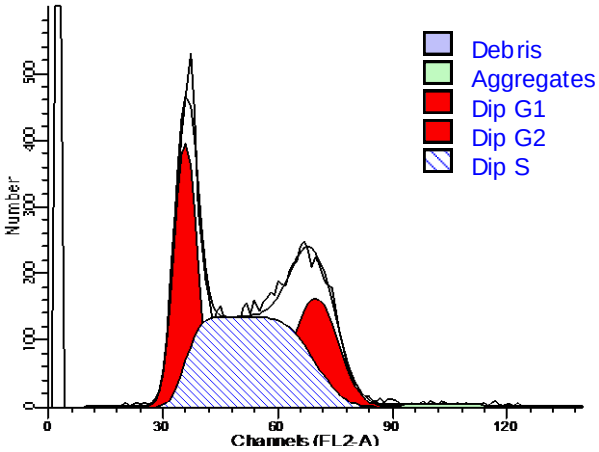


圖 5-6-8

TA1 0.175mg/ml

Dip G1: 29.08 %　Dip G2: 23.94 %

Dip S: 46.98 %　G2/G1: 1.95

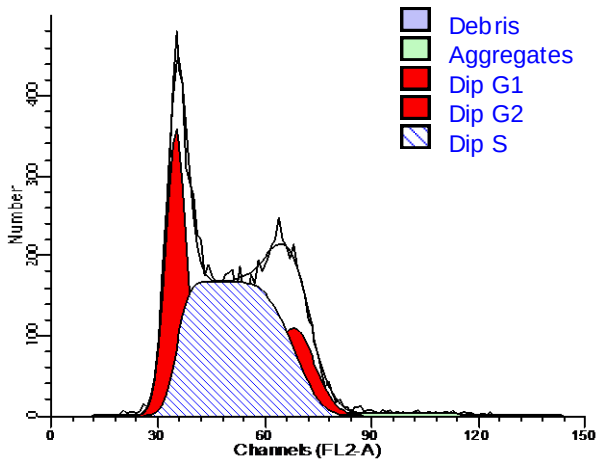


圖 5-6-9

TA1 0.35mg/ml

Dip G1: 27.12 %　Dip G2: 16.52 %

Dip S: 56.35 %　G2/G1: 1.94

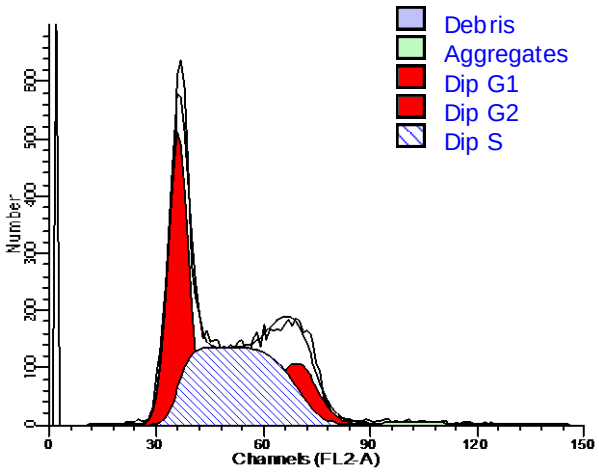


圖 5-6-10

TA1 0.7mg/ml

Dip G1: 38.15 %　Dip G2: 16.04 %

Dip S: 45.80 %　G2/G1: 1.91

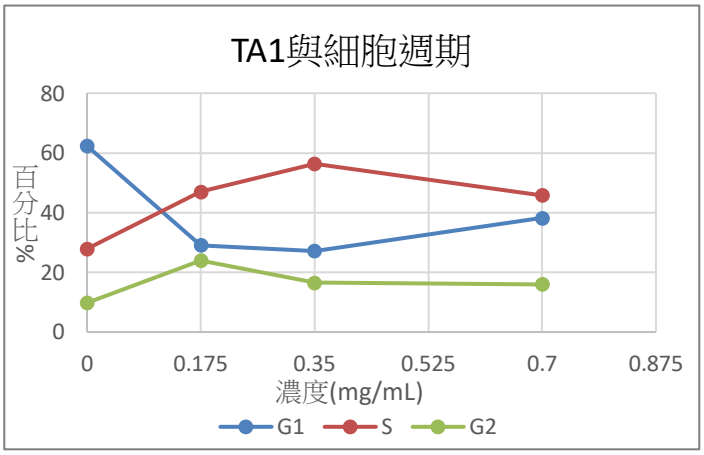


圖 5-6-11

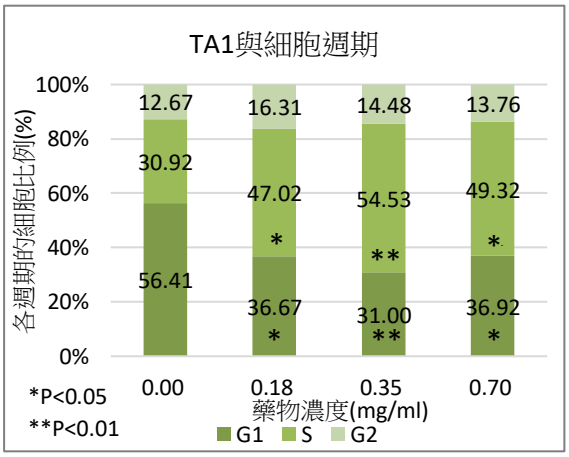


圖 5-6-12

討論:

1 .隨著藥物濃度增加，G1 phase 的比例顯著下降，S phase 的比例顯著增加，G2/M phase 的比例則沒有顯著的變化

2 .複方 Toli A 和 TA1 fraction 對細胞週期的影響相近，皆是使 S phase 的比例顯著增加。

(三)單方白芍對細胞週期的影響

1.秤取白芍酒萃物(白芍 A)浸膏

2.利用 PBS 稀釋至濃度為 0.175、0.35、0.7mg/ml

3.依照標準流程處理成樣本

4.分析細胞分裂周期比例的變化，如下圖 5-6-13~5-6-21

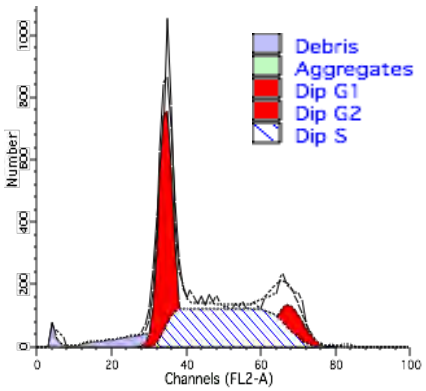


圖 5-6-13

Control

Dip G1:40.94 % Dip G2:14.01 %

Dip S:45.05 %　G2/G1: 1.95

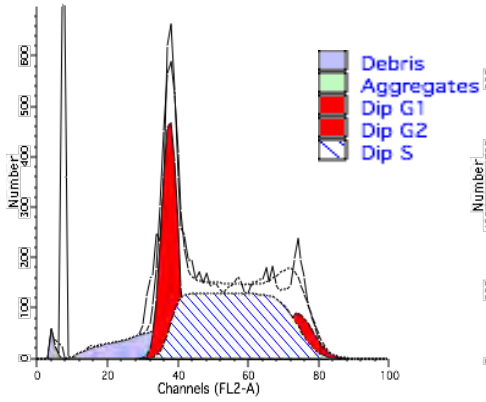


圖 5-6-14

白芍 A　0.1mg/mL

Dip G1:31.48 % Dip G2:11.62 %

Dip S: 56.90 %　G2/G1: 1.97

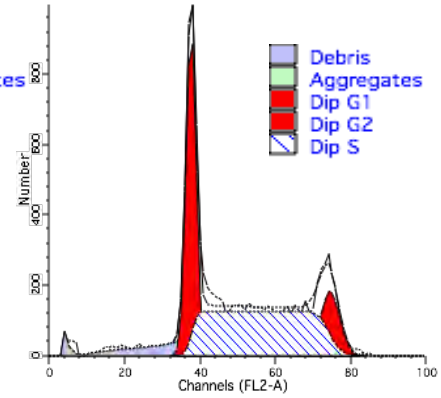


圖 5-6-15

白芍 A 0.2mg/mL

Dip G1: 34.14 % Dip G2:13.40 %

Dip S: 50.66 %　G2/G1: 1.97

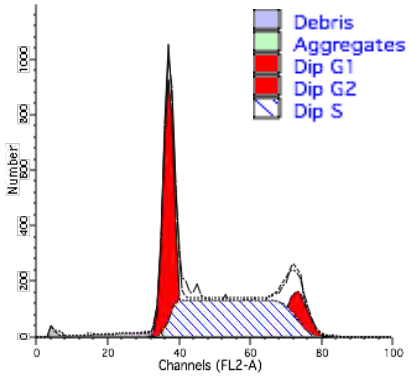
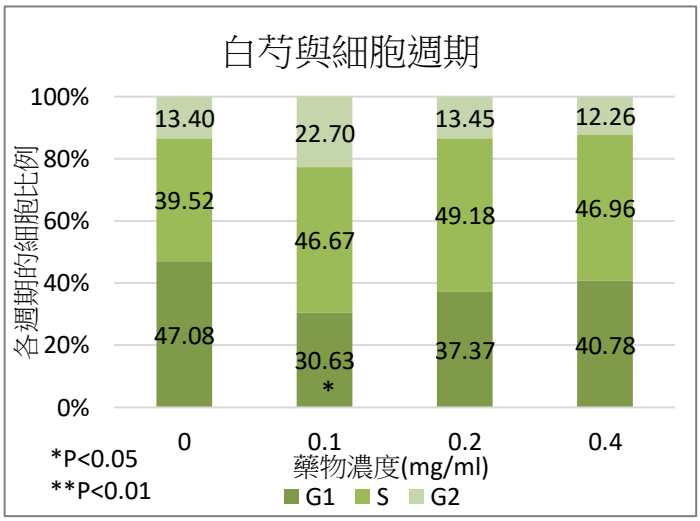


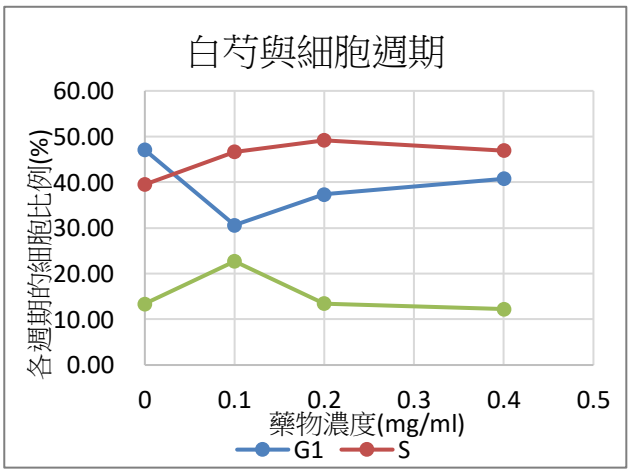
圖 5-6-16

白芍 A 0.4mg/mL

Dip G1: 36.67 % Dip G2:12.67 %

Dip S: 45.05 %　G2/G1: 1.95





討論：

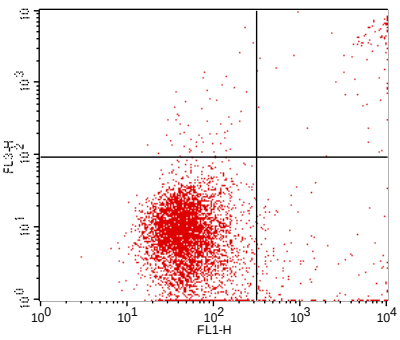
1 .僅藥物濃度為 0.1(mg/ml)時，G1 phase 的比例顯著下降(P<0.05)，

2 .相較複方 Toli A 和 TA1 fraction，白芍對細胞週期的影響較不顯著。

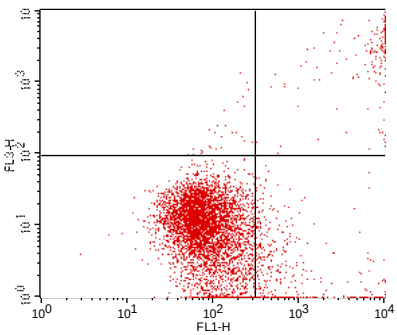
七、流式細胞儀細胞凋亡測定

實驗七:托裏消毒飲及白芍萃取物對細胞凋亡的影響

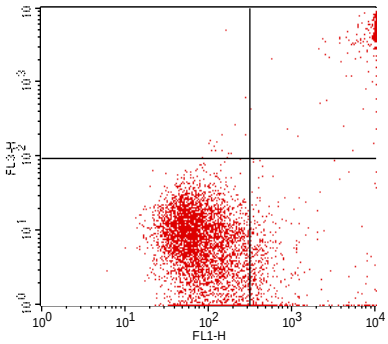
(一)不同濃度的托裏消毒飲複方酒萃 fractoin(TA1)對細胞凋亡的影響(圖 5-7-1~5-7-6)



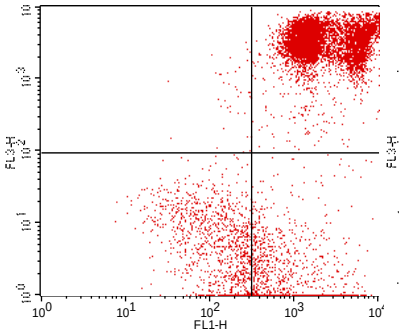
控制組



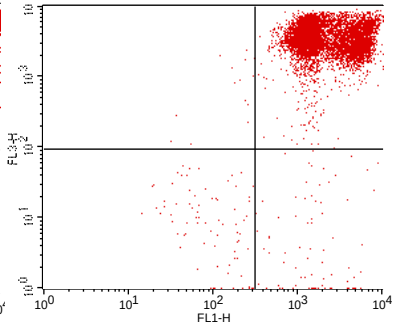
TA1 (0.1mg/ml)



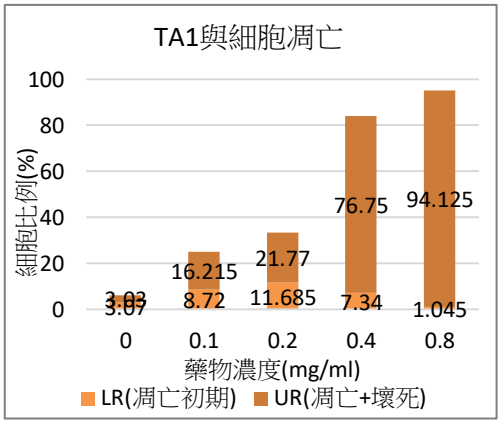
TA1 (0.2mg/ml)



TA1 (0.4mg/ml)



TA1 (0.8mg/ml)



討論 ：

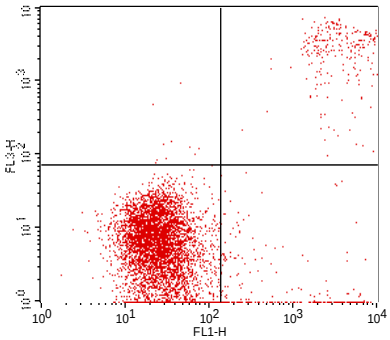
1 .提高托裏消毒飲藥物濃度時，細胞出現 Annexin V 訊號，表示出現細胞膜外翻

2.右下角(LowRight)訊號強度先增後減，表示初期細胞凋亡的細胞比例先增後減

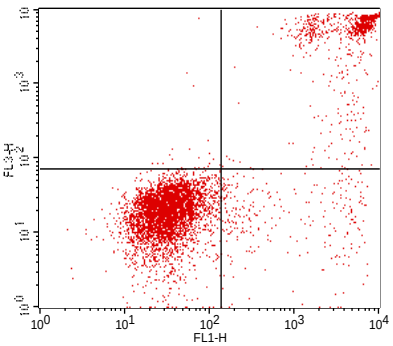
3.當藥物濃度提高至 2X IC50 時，幾乎所有細胞皆可被兩種染劑染色，無法準確分辨細胞屬 Apoptosis 或 Necrosis

4.隨著藥物濃度增加，細胞壞死與凋亡之比例總和(UR+LR)上升，2 倍 IC50 時甚至高達 95%，但初期細胞凋亡的比例並無顯著提升，未見到細胞群向右再向上移動，因此大部分細胞死亡應非凋亡造成。

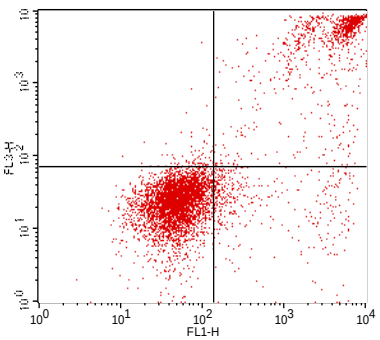
(二)不同濃度的白芍萃取物對細胞週期的影響



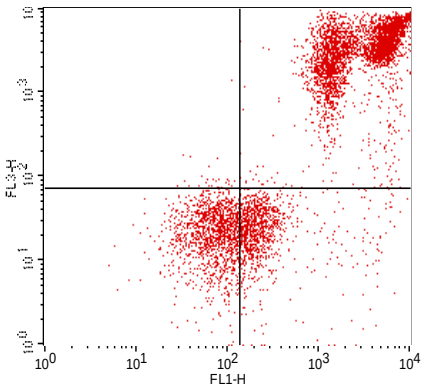
控制組



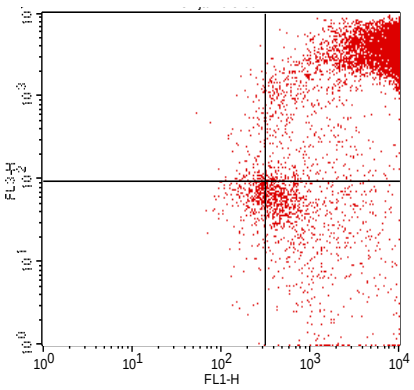
白芍 0.1mg/ml



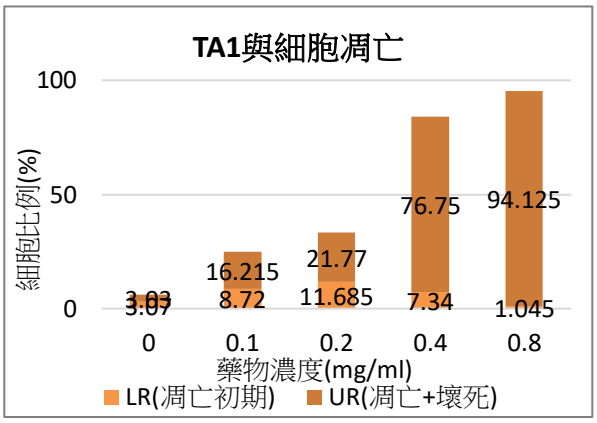
白芍 0.2mg/ml

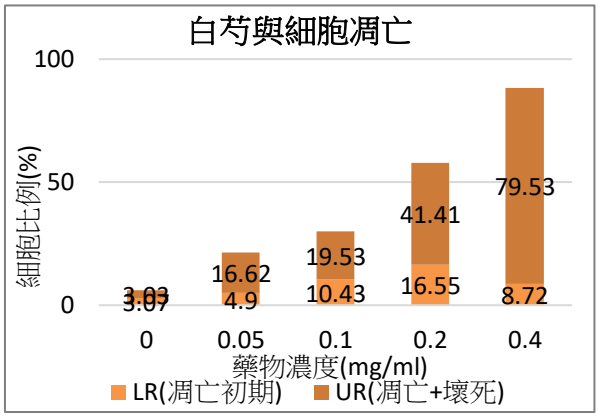


白芍 0.4mg/ml



白芍 0.8mg/ml





討論 ：

1 .隨白芍濃度增加，右下格(LowRight)訊號比例先增加後減少，代表初期細胞凋亡的比率先增後減

2 .在一倍及兩倍 IC50 濃度時，白芍造成的初期細胞凋亡比例(LR)高於 TA1 所造成的，細胞凋亡的特徵較明顯

八、Western blot 檢測蛋白質變化

實驗八:

(一) TA1 與白芍 A 對週期相關蛋白(cyclinA,cyclinE,CDK2)之影響

1 .選取 TA1，白芍 A 萃取物

2.利用 PBS 稀釋至 2 倍，1 倍，0.5 倍 IC50

3.進行標準毒殺流程並收取蛋白質，跑 western blot，壓片後如下(圖 5-8-1~5-8-4)

CDK2(34KDa)

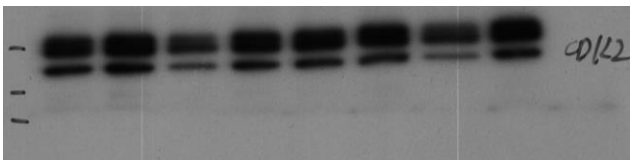


圖 5-8-1

白(0.1) (0.2) (0.4) TA1 (0.1)(0.2)(0.4)(0.8) C

GAPDH(36KDa)

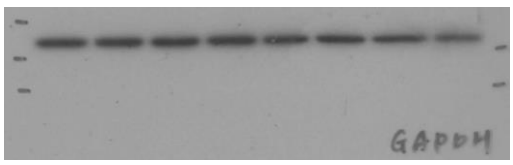


圖 5-8-2

internal control

cyclinA(53kDa)

圖 5-8-3

白(0.1) (0.2) (0.4) TA1 (0.1)(0.2)(0.4)(0.8) C

cyclinE(54kDa)

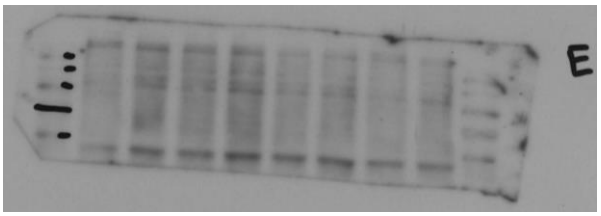


圖 5-8-4

白(0.1) (0.2) (0.4) TA1(0.1)(0.2)(0.4)(0.8) C

討論 ：

1 .隨 TA1 及白芍濃度增加，CDK2 蛋白量減少，在 2 倍 IC50 時最明顯

2 .cyclin A 與 E 未見明顯變化

3.推測托裏消毒飲使細胞週期停滯的路徑與 CDK2 有關

九、HPLC----MS 分析

實驗九：利用層析質譜連用儀器測定分子量，如下圖 5-9-1~5-9-4

(一)標準品層析圖

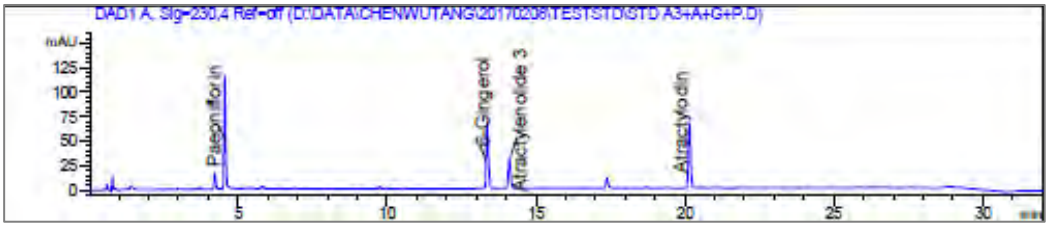


圖 5-9-1

討論:

1.先就文獻探討選取標準物做為對比

(二)托裏消毒飲酒萃 fraction 1:1

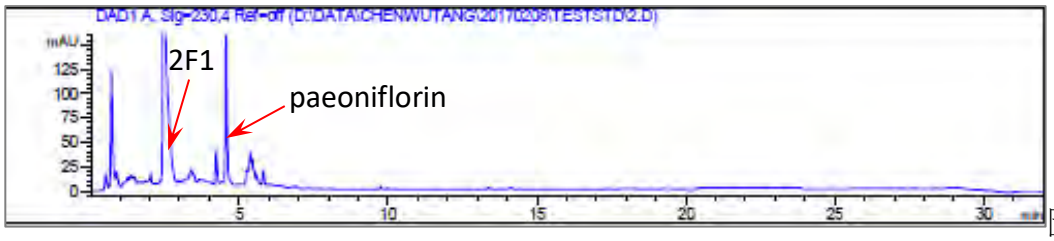


圖 5-9-2

討論:

針對含量最高的兩個峰值討論發現

1 .對照標準品，發現樣品有相呼應的峰值，其成分為 paeoniflorin(白芍皂甘)，大約在層析進行 4~5 分鐘時被感應器偵測得

2 .大約在層析進行 2~3 分鐘時有一極大峰值，但推測其為一混和物，需進一步分析其成分

2F1 MS scan positive

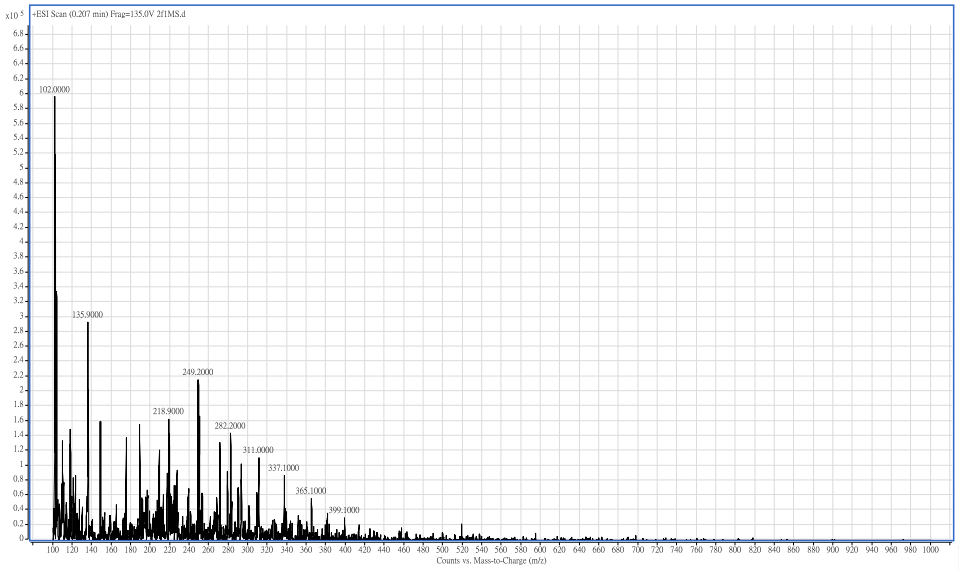


圖 5-9-3

2F1 MS scan negative

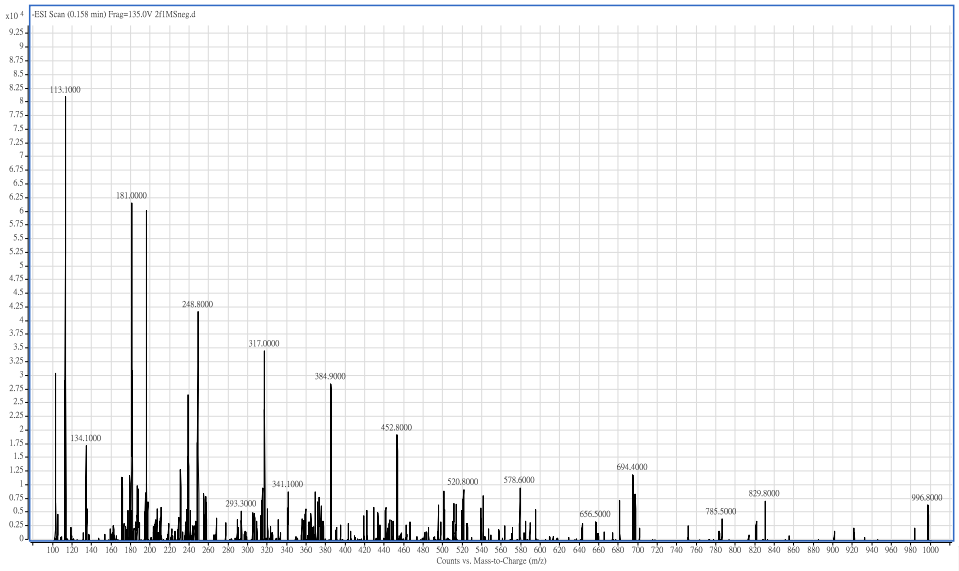


圖 5-9-4

討論:

1 .須利用質譜儀進一步分析 2F1 成份的分子量

2 .positive 所測出的分子量需減去 1 或 23 或 39 才為實際的分子量

3 .negative 所測出的分子量需加上 1 即為實際分子量

4 .綜合 POSITIVE 和 NEGATIVE 在進行推測可能的化合物成份，發現 2F1 是由數十種不同分子量之成分組合而成，若要由碎片一一拼湊還原出原成分有困難。

十、藥品對馴化細胞株的影響

實驗十:

(一)最有效之 fraction(TA1)對正常細胞株的影響

1 .選取 TA1 萃取物

2.利用 PBS 稀釋至不同濃度從 2.5mg/ml 兩倍序列稀釋至 0.015931mg/ml

3.依照標準毒殺流程進行細胞毒殺測試

4.分析實驗結果並計算 IC50，如下圖 5-10-1

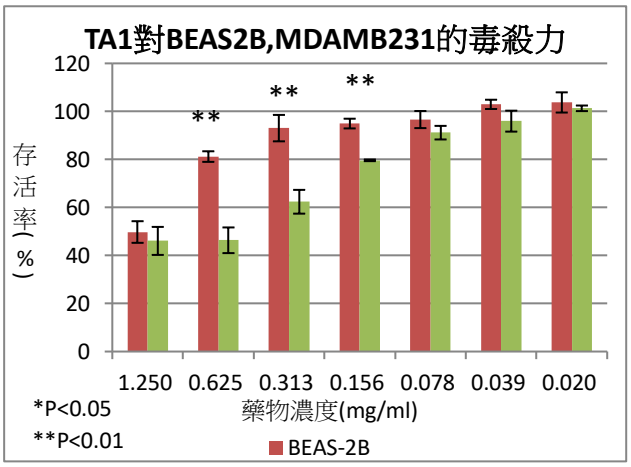


圖 5-10-1

討論:

1 .TA1 對 BEAS-2B 之 IC50 為 1.47(mg/ml 對 MDAMB231 之 IC50 為 0.476(mg/ml)

2. TA1 濃度為 0.625,0.3125,0.156 (mg/ml) 時，BEAS-2B 的存活率顯著高於 MDA-MB-231

3.乳癌細胞對 TA1 較敏感，TA1 對於兩株細胞株具有選擇性

陸、結論

一、發現酒萃物含較多黃酮類化合物，浸膏的狀態較為黏稠，水萃物則較脆。

二、中藥複方能抑制細胞生長，其中又以托裏消毒飲及真武湯的效果最佳，IC50 的濃度在 0.4mg/ml 附近。比較不同溶劑萃取出的藥物，發現酒精萃取者有較好的效果，推測能抑制癌細胞之成份較容易利用非極性溶劑萃取出。

三、經過逆向管柱層析，托裏消毒飲酒萃物以 50%甲醇為沖提液之片段(fraction)(以下簡稱 TA1)有最佳抑癌效果，IC50 約為 0.47mg/ml，並發現其他效果較好之萃取物片段亦偏中上極性，有助於猜測主要作用的成份。

四、分開測試托裏消毒飲 12 種單味藥的毒性，白芍毒殺效果最佳，IC50 約為 0.218mg/ml。

五、利用 flow 檢測細胞週期，發現托裏消毒飲複方及其 fraction(TA1)效果相似，提高藥物濃度皆可使 S Phase 的比例顯著增加，但白芍並沒有明顯抑制細胞週期的效果。

六、利用 flow 檢測細胞凋亡，發現 TA1 與白芍皆能使白芍出現早期凋亡現象，且白芍的造成細胞凋亡的效果更為顯著。

七、利用高效液相層析儀分析發現，paeoniflorin 為托裏消毒飲 fraction(TA1)主要成份之一，但 TA1 中亦有另一含量極高的峰值，經質譜儀打碎後發現為複雜的混合物，成分未知。

八、結合細胞週期實驗與細胞凋亡實驗，發現 TA1 能使細胞週期停滯，同時亦能造成細胞凋亡，但白芍對細胞週期無顯著影響，僅能導致細胞凋亡，推測 TA1 中未知的高含量混合物為使細胞週期停滯之關鍵。

九、利用西方點墨法檢測週期蛋白(cyclinE 與 cyclinA)以及下游蛋白(CDK2)的含量變化，發現 TA1 及白芍能使 CDK2 之表現量降低，cyclin A 與 E 未見明顯變化，推測其影響細胞週期的路徑與 CDK2 有關。

十、利用呼吸道上皮細胞株(BEAS-2B)做為對比，發現托裏消毒飲的抑癌作用具有選擇性。

柒、參考資料

中文部分

一、香港大學中醫藥學院助理教授 馮奕斌博士(2009.4.30)。**癌症的中醫治療**。都市日報，Health Information 43。取自：http://www.med.hku.hk/healthedu/issue266/issue266.pdf。

二、卜聿珊(2014)。**以中藥活血藥方透過 GDNF 媒介路徑作為 抑制乳癌轉移之新穎策略**。2014 年臺灣國際科學展覽會。取自：http://activity.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2014/pdf/090002.pdf

三、許芷瑄(2015)。**"癌"究－小花蔓澤蘭**。2015 臺灣臺灣國際科學展覽會。取自：http://science.ntsec.edu.tw/Science-Content.aspx?cat=90&a=6822&fld=&key=&isd=1&icop=10&p=2&sid=12416

四、科學 online 高瞻自然科學教育平台。**液相層析**。民國 106 年 2 月 18 日取自：http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=63412

五、吳俊輝。**簡介液相層析 質譜／質譜儀 (LC MS/MS)**。金門縣衛生局。取自: http://web.kinmen.gov.tw/Layout/sub_D/ArtHtml_Show.aspx?ID=cc8726fa-1ed0-401f-8c9f-1b47cb89babe&path=13185

六、沈藥子(2008~2017)。**托裏消毒飲**。醫砭。取自：http://yibian.hopto.org/fang/?fno=680

七、沈藥子(2008~2017)。**真武湯**。醫砭。取自：http://yibian.hopto.org/fang/?fno=261

八、沈藥子(2008~2017)。**半夏厚朴湯**。醫砭。取自：http://yibian.hopto.org/fang/?fno=151

九、沈藥子(2008~2017)。**通竅活血湯**。醫砭。取自：http://yibian.hopto.org/fang/?fno=175

十、沈藥子(2008~2017)。**六味地黃丸**。醫砭。取自：http://yibian.hopto.org/fang/?fno=26

英文部分

1.CailleauR, Young R,OlivéM, Reeves WJJr(1974).**Breast tumor cell lines from pleural effusions**.Journal of the National Cancer Institute.53 (3): 661 – 674. PMID 4412247

2. Lih-Chi Chen,Ming-FangLin(2003). **A pilot study comparing the clinical effects ofJia-Wey ShiauYauSan, a traditional Chinese herbal prescription, and a continuous combined hormone replacement therapy in postmenopausal women with climacteric symptoms.**Maturitas44 (2003) 55/62

3. Chun-JuChang,Wing-YiuLui, MD, PhD2(2006).**Si-Wu-Tang-and-its-constituents-promote-mammary-duct-cell.** Menopause: The Journal ofTheNorth American Menopause Society Vol. 13, No. 6, pp. 967<976.

4. OuTT,WangCJ(2011). **PaeonialactifloraPall inhibits bladder cancer growth involving phosphorylation of Chk2 in vitro and in vivo**. JEthnopharmacol.2011 Apr 26;135(1):162-72.doi: 10.1016/j.jep.2011.03.011.Epub2011 Mar 17

5.Yuan-ChiehYeh,Hsing-YuChen,Sien-HungYang(2014). **HedyotisdiffusaCombined withScutellaria barbataAre the Core Treatment of Chinese Herbal Medicine Used for Breast Cancer Patients: A Population-Based Study.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2014, Article ID 202378, 9 pages.http://dx.doi.org/10.1155/2014/202378

【評語】052014

探討五種中藥複方是否能抑制癌細胞生長，對中藥複方進行萃取，透過管柱層析 及單方的毒性測試，並嘗試尋找有效成分。並分析其對細胞凋亡並用西方墨點分析對 Cyclin，CDK2 及 Caspase 之蛋白含量變化以求得中藥能對癌症治療之應用。研究主軸明確，作品層次完整、撰寫清晰。

然而天然物或中藥材之抗癌研究已非常廣泛相關，此篇作品與目前已知的比較，有何突出點應多加著墨。實驗結果尚未有結論，宜針對每一實驗多重復幾次，以得到可信賴之數据。實驗設計多缺乏負控制組；只使用 MDA-MB-231 乳癌細胞做研究，使用單一細胞株難以得到客觀之結果；亦應分析這些萃取物對正常細胞之影響，以釐清是療效還是毒性；藥物的機制研究應有多參考文獻尋求更多背景知識支持與關聯性。

作品海報

摘要

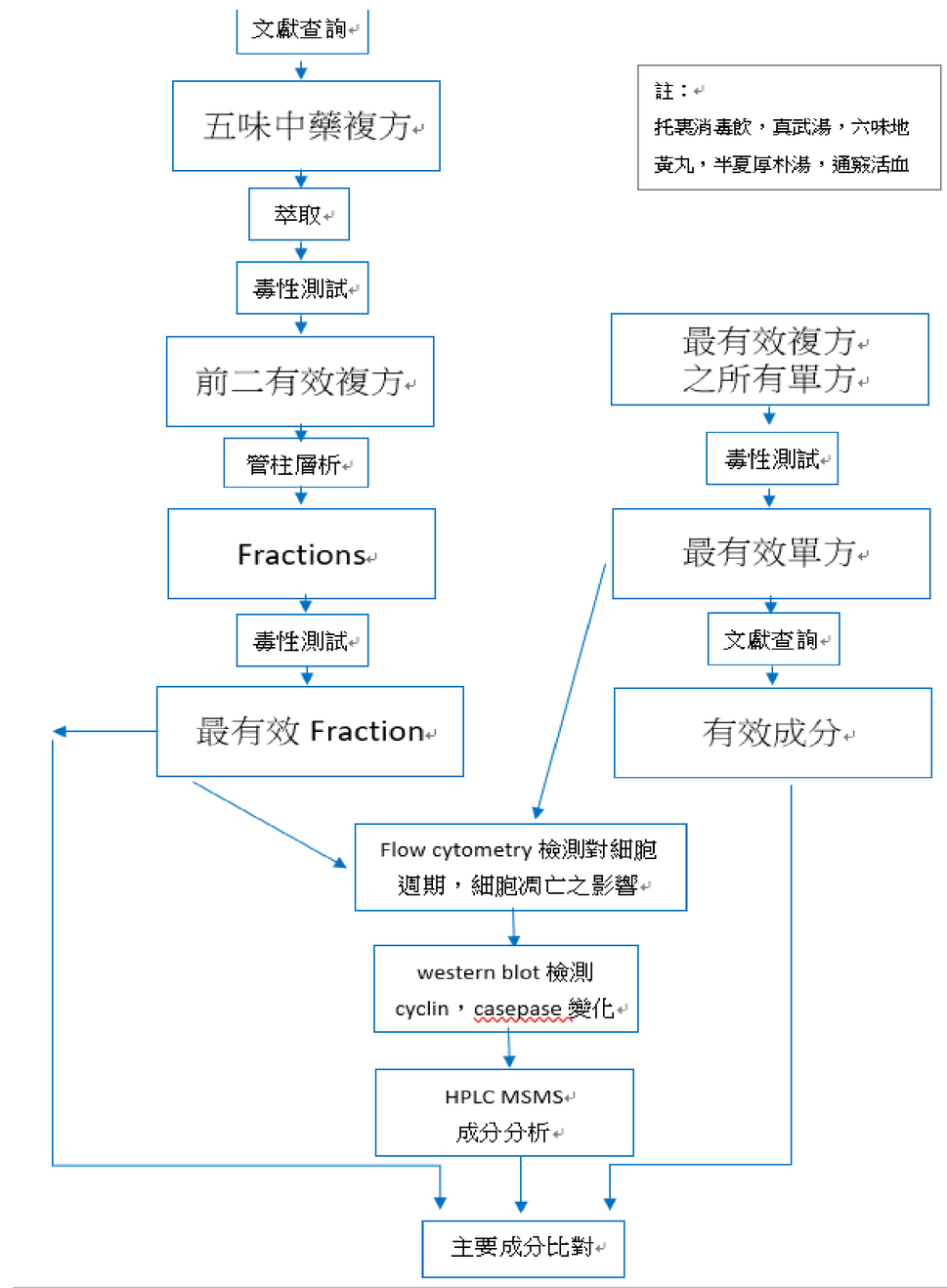
文明的進步，較長的平均壽命衍生出的問題中，癌症可說是難以避免的病症，除了西醫的化學療法及放射療法之外，已有數千年的歷史的中草藥方最近也逐漸成為搭配使用的輔助療法，為了探討這些藥方是否能抑制癌細胞生長，對於五種中藥複方進行萃取，透過管柱層析及單方的毒性測試，配合高效液相層析儀質譜連用，逐一驗證並嘗試分離出有效成分，利用flow分析藥物作用的路徑和對細胞造成的影響，希望能驗證中藥能確實對於癌症的治療方面有所幫助。

壹、實驗動機

在衛生署公布的國人十大死因統計中，惡性腫瘤已蟬聯冠軍三十五年！其中乳癌是女性罹患率極高的一種惡性腫瘤，目前的療法卻容易對身體造成強烈傷害，令人聞之膽寒。不過，臨床上常見的中西藥搭配使用據統計能有效降低副作用甚至抑制癌細胞，而中藥複方的使用依循古醫書所述卻鮮少經科學證實，因此我們想探討中藥複方對乳癌細胞的影響，並一步步分離出有效成分。

貳、研究目的

(一)探討中藥複方對乳癌細胞(MDA-MB-231)之毒殺能力。
(二)分離複方得許多片段(Fractions)，測其對乳癌細胞毒殺能力。
(三)測試複方中單味藥各自對乳癌細胞之毒殺能力。
(四)探討複方、單味藥、fraction對細胞週期的影響。
(五)探討複方、單味藥、fraction對細胞凋亡的影響。
(六) HPLC MSMS分析、比對、推測複方萃取物中的主要有效成分。
(七)探討藥物對馴化之正常細胞株(BEAS-2B)之毒性。



參、研究設備和器材

一、細胞實驗　　二、藥物萃取實驗

無菌操作台(Hood)

藥品萃取之減壓濃縮

逆向液固管住層析

(二)其他藥品：
1.培養液(medium):
(1)RPMI+5%PBS+1%PSG
(2)DMEM+20%FBS+1%PSG
2.Sarcosin:1%N-Lauroylsarcosin in ddH_2O
3.Trypsin EDTA
4.亞甲藍液
5.PBS buffer

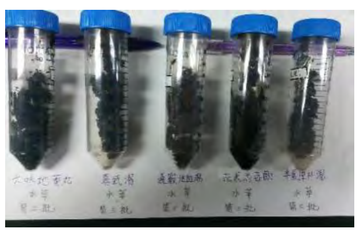
肆、研究過程與方法(各種protocol，詳見報告書)

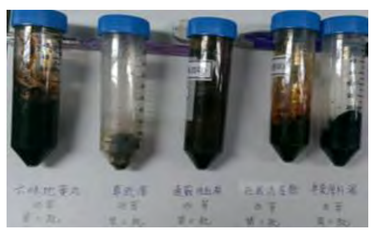
伍、研究結果與討論

一、中藥萃取複方細胞毒殺實驗

實驗一：中藥萃取
步驟：
1.選取五種複方，分別為托裏消毒飲、真武湯、六味地黃丸、半夏厚朴湯、通竅活血湯
2.依照藥品萃取標準流程製成淨膏 (詳見報告書)

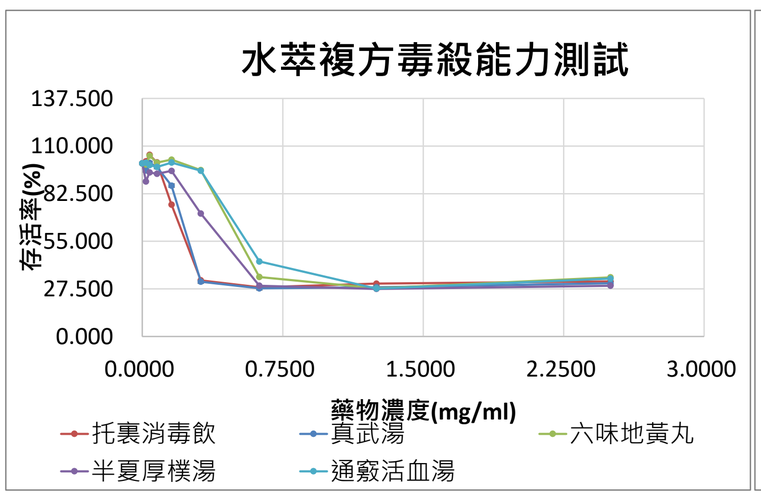
討論:
1.水萃樣品經減壓濃縮後，萃取物近乎為乾燥塊狀，性質極脆
2.酒萃樣品經減壓濃縮後，萃取物呈現膏狀，性質黏稠

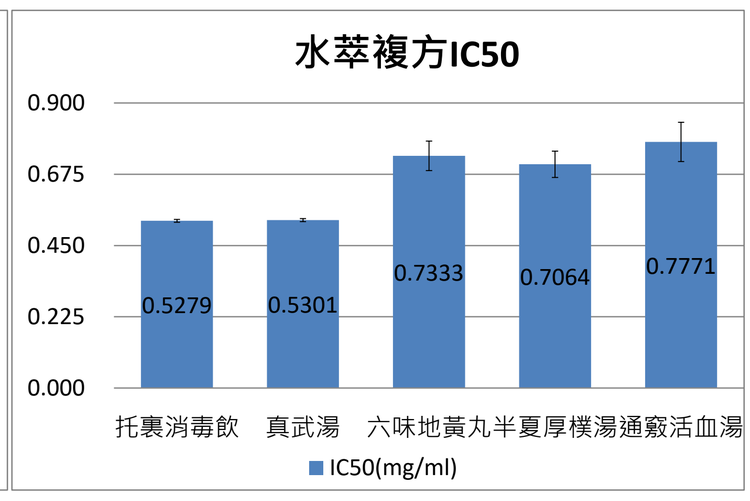




二、細胞毒殺實驗

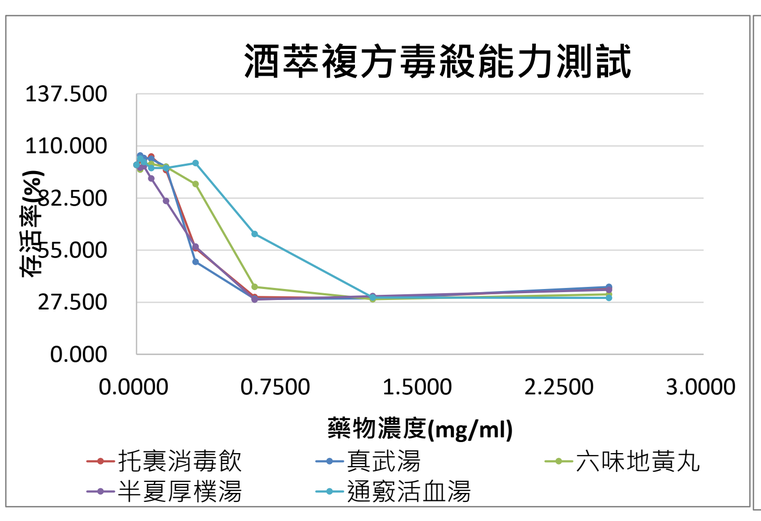
實驗二：不同溶劑萃取效果之比較
(一)水萃複方之細胞毒殺能力測試
步驟：
1.選取托裏消毒飲、真武湯、六味地黃丸、半夏厚朴湯、 通竅活血湯，五種複方的二次水萃取物
2.利用PBS稀釋至不同濃度 (2.5mg/ml~0.0195mg/ml)
3.依據標準毒殺流程進行毒性測試
4.分析實驗結果並計算IC50

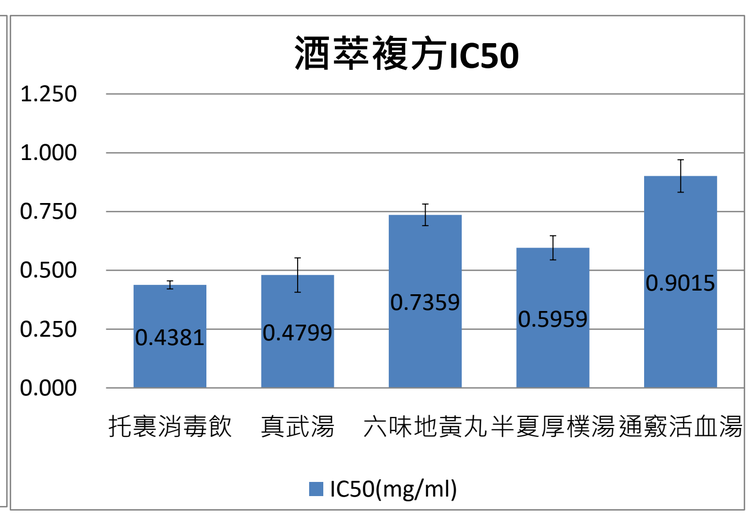




(二)酒萃複方之細胞毒殺能力測試
步驟：
1 .五種複方酒萃物
2 .同水萃實驗之步驟2.~4.

討論:
1 .複方水萃物中，托裏消毒飲及真武湯之IC50較低，毒殺效果較強
2 .複方酒萃物中，托裏消毒飲及真武湯之IC50較低，毒殺效果較強
3.兩者酒萃物毒殺效果均好於水萃物



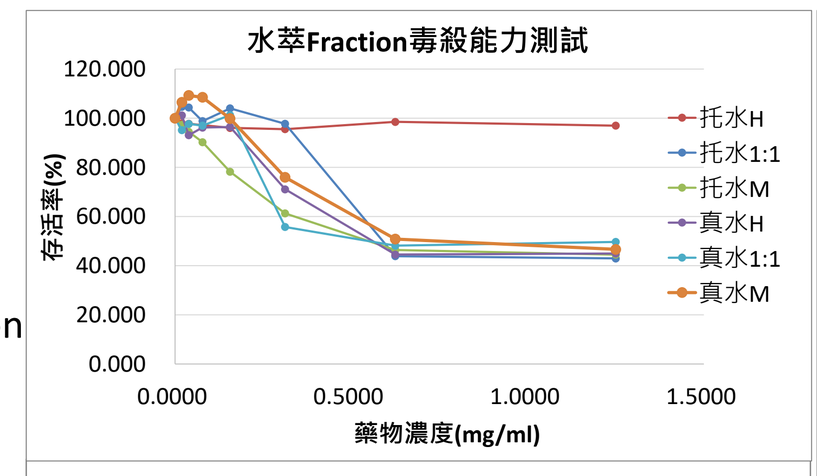


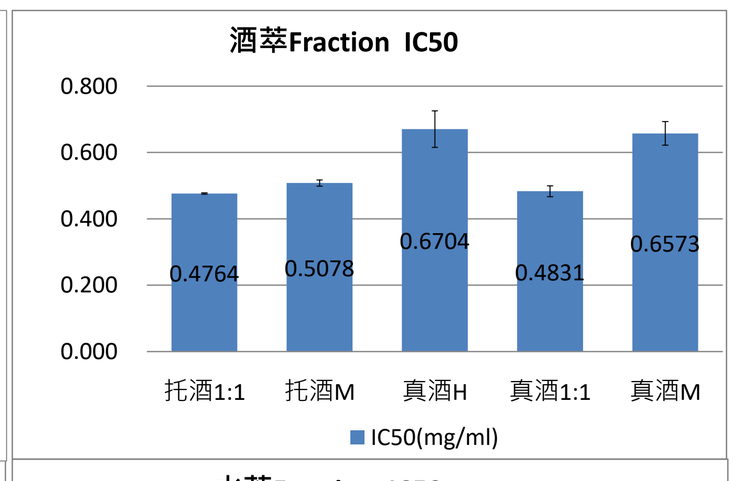
三、層析片段細胞毒殺實驗

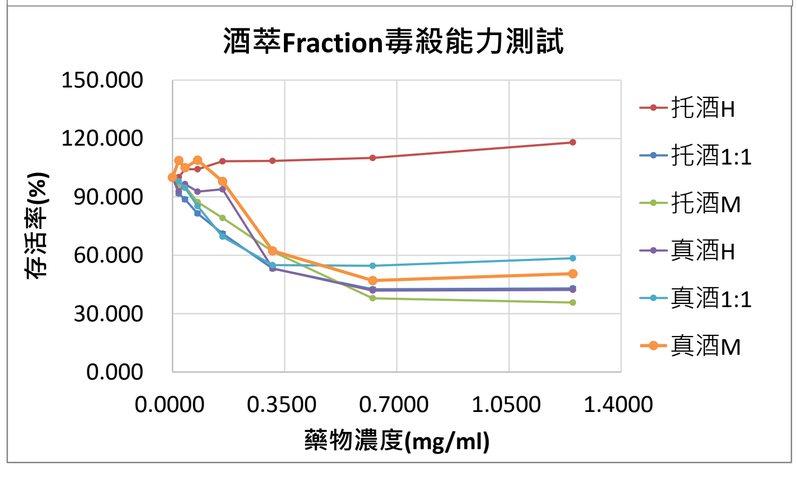
實驗三:不同極性之fraction細胞毒殺能力測試

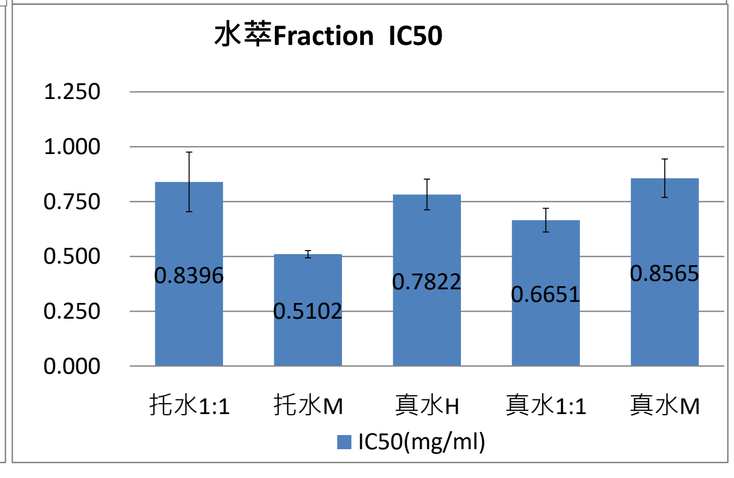
(一)前兩有效複方，不同極性萃取片段毒性分析
步驟：
1.選取托裏消毒飲及真武湯，經逆向管柱層析
2.以不同極性之沖提液分離複方成分，得fraction
2.同水萃實驗之步驟2.~4. ，求得IC50濃度

討論:(就單一複方討論)
1 .托裏消毒飲不論酒萃及水萃，用ddH_2O做沖提液時，即使在最高劑量1.25mg/mL亦沒有明顯抑制效果
2 .托裏消毒飲酒精萃取物，在50%甲醇沖提下有最佳效果，且IC50為0.476mg/ml
3 .發現最有效的fraction的IC50數值和複方差不多，推測此片段為抑制生長的主要成分









四、單味藥之細胞毒殺能力測試

實驗四：不同單位藥毒性分析

(一)高濃度初篩水萃單位藥品之細胞毒性

步驟：

1.秤取當歸、白芍、桔梗、黃耆、甘草、茯苓、白朮、川芎、銀花、人參、皂角刺之酒萃物

2.利用PBS稀釋至不同濃度(2.5,2,1.5,1,0.5mg/ml)

3.依照標準毒殺流程進行細胞毒殺測試

4.分析實驗結果並計算IC50

討論：

1.皂角刺、金銀花、當歸、白芍等四種單方有較好的毒殺效果

2.為了更精確得知單位藥之IC50因此進行更低濃度的測試

(二)前四有效單味藥之細胞毒殺能力

步驟：

1.秤取白芍、銀花、皂角刺、當歸之萃取物

2.用PBS稀釋濃度為(1,0.8,0.6,0.4,0.2mg/ml)

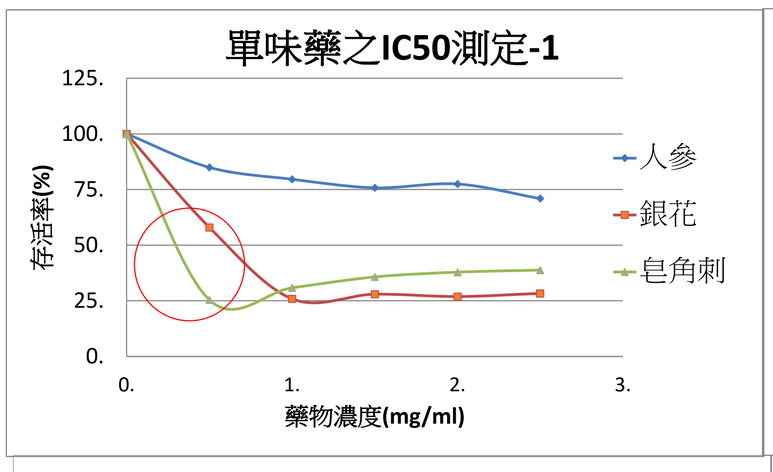
3.依照標準毒殺流程進行細胞毒殺測試

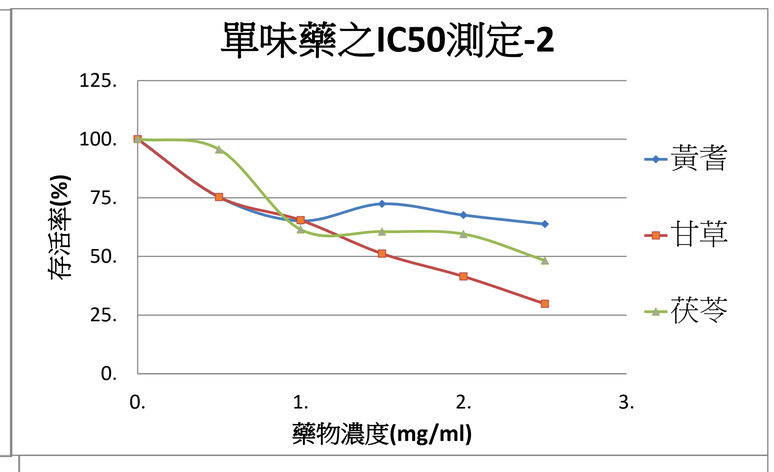
4.分析實驗結果並計算IC50

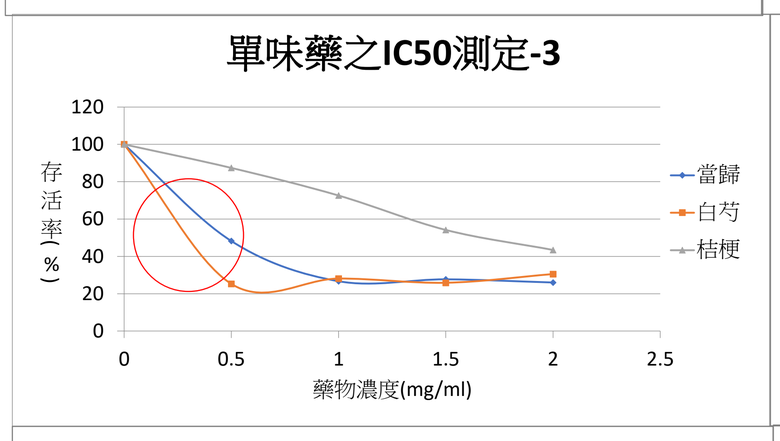
討論：

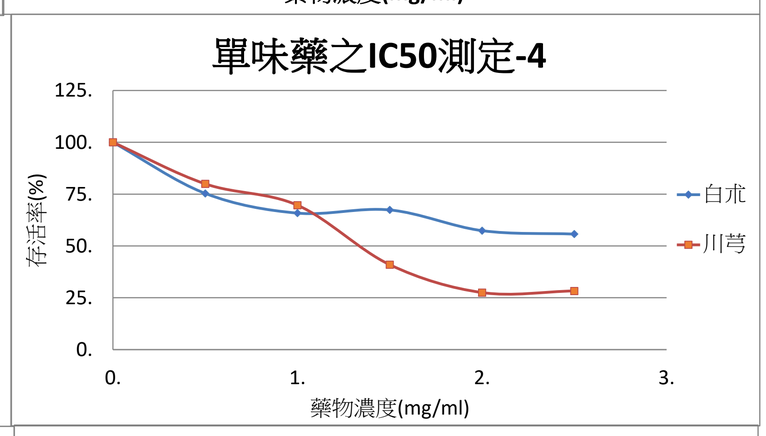
1.白芍及皂角刺的毒殺效果為單方中最佳二者，甚至好過複方本身效果

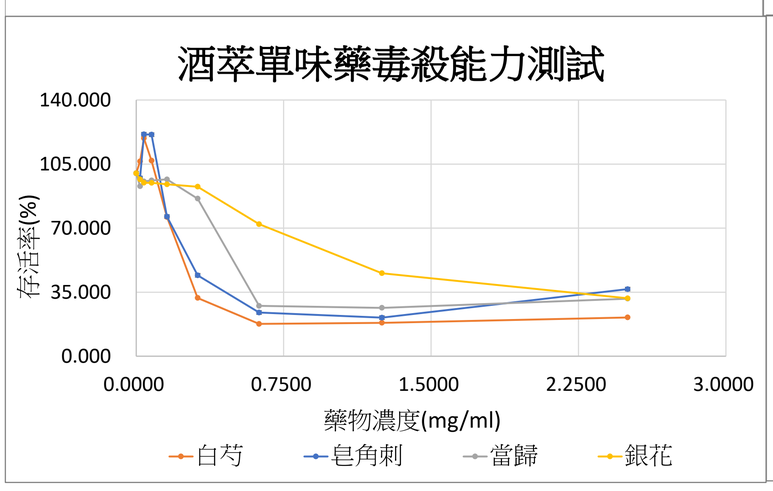
2.推測白芍為整個複方有毒殺效果的主成分，其本身之IC50為0.218mg/ml

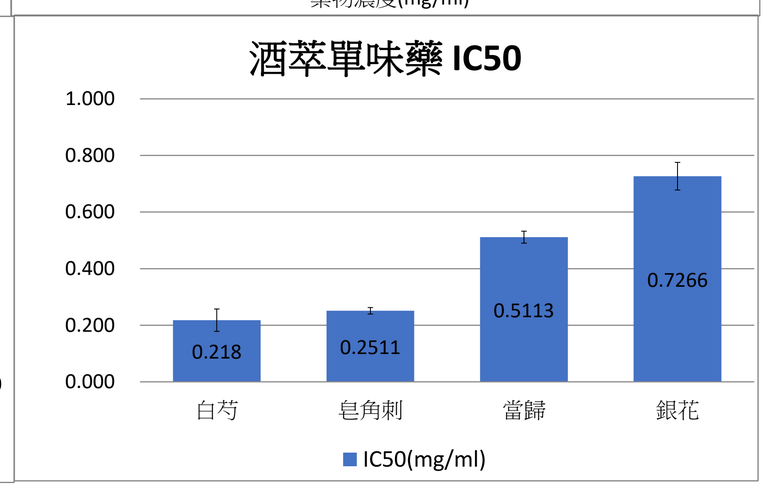












五、細胞週期測定

實驗五：

托裏消毒飲之複方、fraction，與白芍對細胞週期的影響

(一)托裏消毒飲複方對細胞週期的影響

步驟：

1.秤取托裏消毒飲複方酒萃物(以下簡稱Toli A)

2.利用PBS稀釋至0.4、0.8、1.6mg/ml

3.依照細胞檢測標準流程處理成樣品

4.分析細胞週期比例變化

討論:

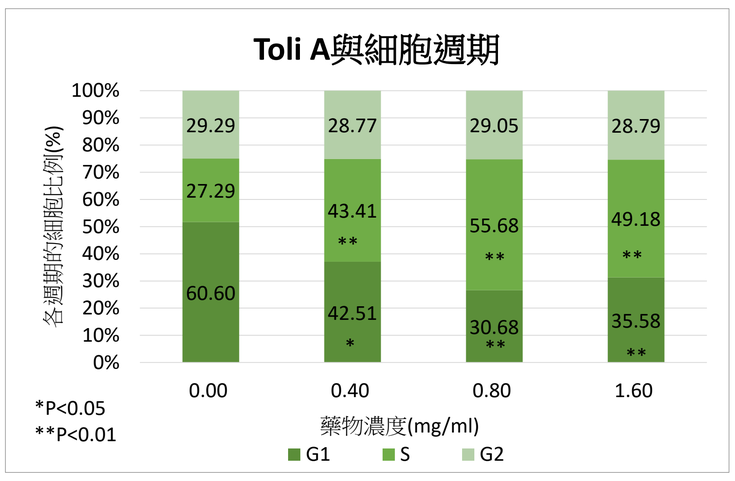
1.介於0.5 ~ 2倍IC50的濃度，對細胞具一定影響力，但不至完全毒死細胞，是最好的分析區間

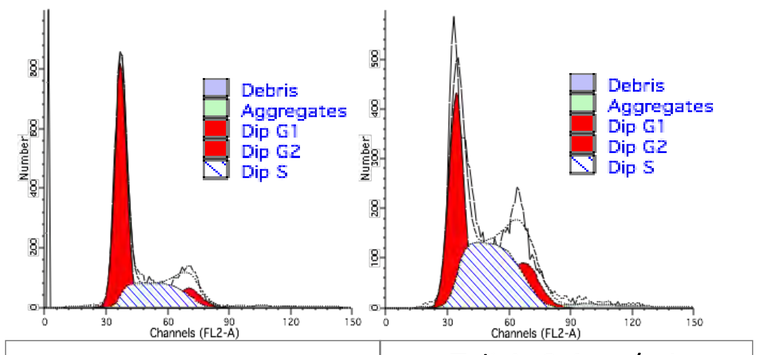
2.隨著藥物濃度增加，G1 phase的比例顯著下降

3.隨著藥物濃度增加，S phase的比例顯著增加

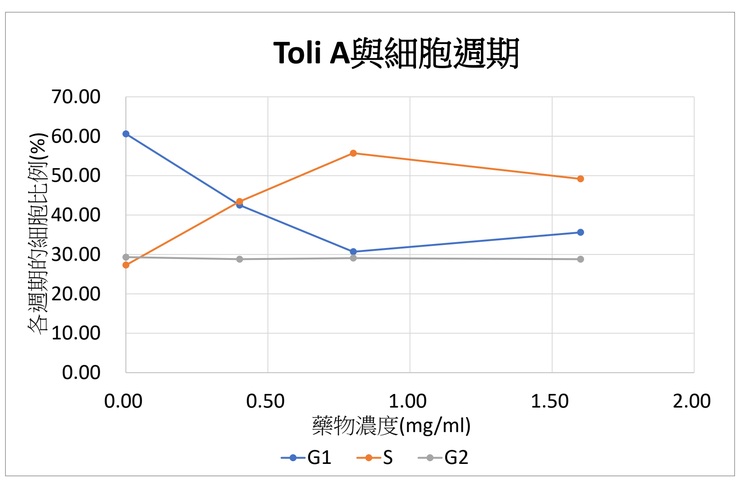
4.隨著藥物濃度增加，G2/M的比例沒有顯著的變化

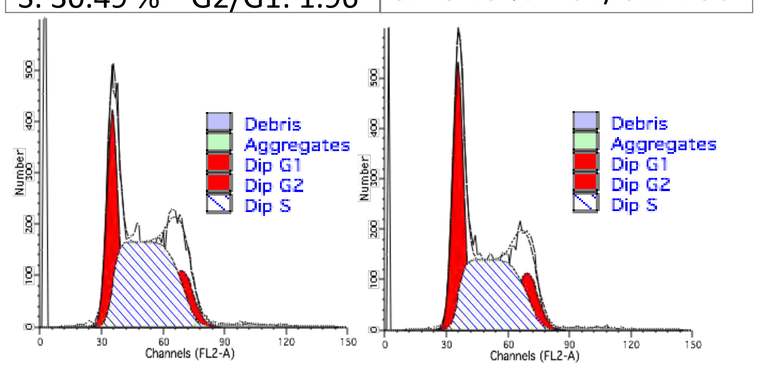
5.Toli A 有使細胞停滯在S phase的效果





Control	Toli A 0.4mg/mL
G1: 57.42 % G2: 12.10 %	G1: 40.11 % G2: 16.70 %
S: 30.49 % G2/G1: 1.96	S: 43.19 % G2/G1: 1.96





Toli A 0.8mg/mL	Toli A 1.6mg/mL
G1: 29.22 % G2: 15.12 %	G1: 36.94 % G2: 15.66 %
S: 55.66 % G2/G1: 1.96	S: 47.40 % G2/G1: 1.94

(二)fraction對細胞週期的影響

步驟：

1.秤取托裏消毒飲酒精萃取物的50%甲醇沖提液浸膏(以下稱之TA1)

2.以PBS稀釋至0.175、0.35、0.7mg/ml

3.依照細胞檢測標準流程處理成樣品

4.分析細胞週期比例變化

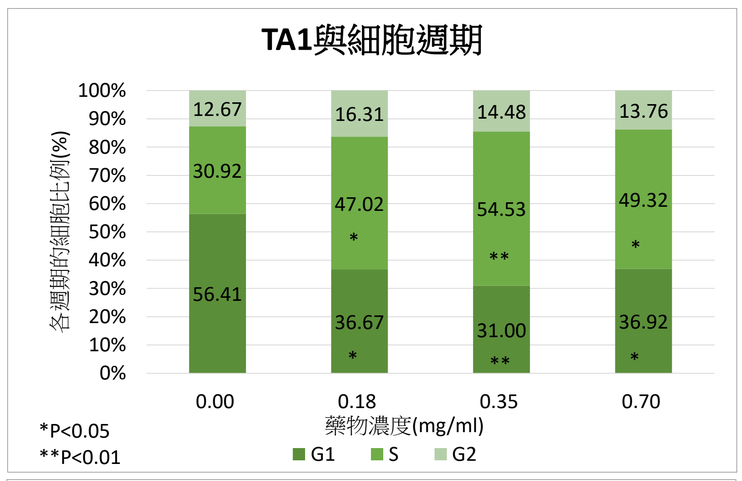
討論：

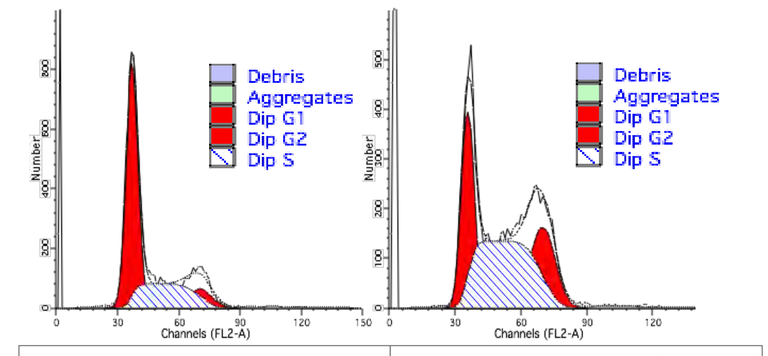
1.隨著藥物濃度增加，G1 phase的比例顯著下降

2.隨著藥物濃度增加，S phase的比例顯著增加

3.隨著藥物濃度增加，G2/M phase的比例則沒有顯著變化

4.fraction和複方對細胞週期的影響相似，皆使S phase的比例增加，有使細胞停留在S phase的效果。





Control	TA1 0.175mg/ml
G1: 57.42 % G2: 12.10 %	G1: 29.08 % G2: 23.94 %
S: 30.49 % G2/G1: 1.96	S: 46.98 % G2/G1: 1.95

(三)單方對細胞週期的影響

步驟：

1.秤取最有效單方—白芍的酒萃浸膏

2.以PBS稀釋至0.1、0.2、0.4mg/ml

3.依照細胞檢測標準流程處理成樣品

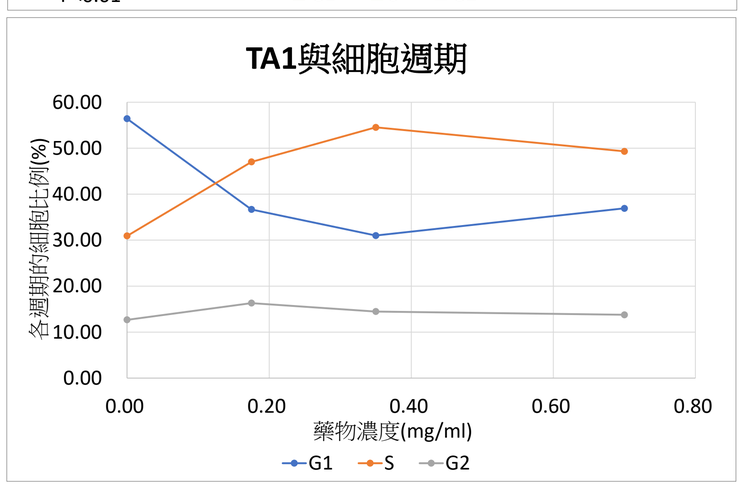
4.分析細胞週期比例變化

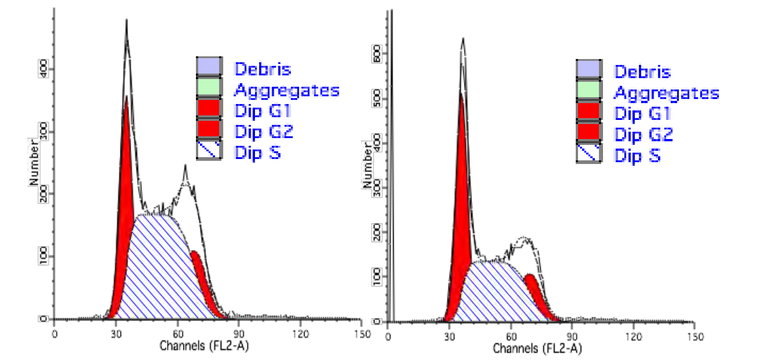
討論：

1.隨著藥物濃度增加，僅0.1mg/ml時，G1 phase的比例顯著下降

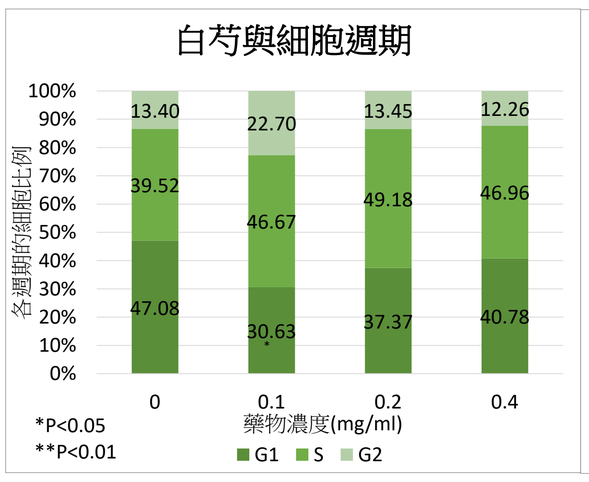
2.其餘統計上沒有顯著差異

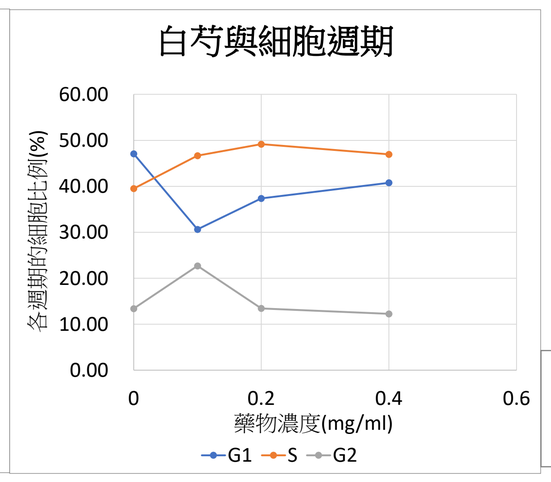
3.但隨濃度提升，細胞死亡率已極高

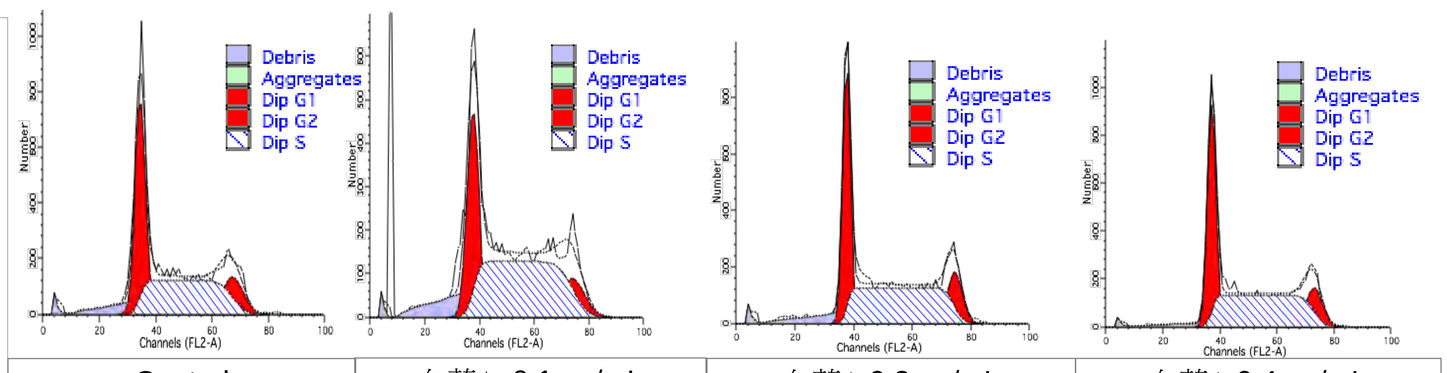




TA1 0.35mg/ml	TA1 0.7mg/ml
G1: 27.12 % G2: 16.52 %	G1: 38.15 % G2: 16.04 %
S: 56.35 % G2/G1: 1.94	S: 45.80 % G2/G1: 1.91







Control	白芍A 0.1mg/mL	白芍A 0.2mg/mL	白芍A 0.4mg/mL
G1:40.94 % G2:14.01 %	G1:31.48 % G2:11.62 %	G1: 34.14 % G2:13.40 %	G1: 36.67 % G2:12.67 %
S:45.05 % G2/G1: 1.95	S: 56.90 % G2/G1: 1.97	S: 50.66 % G2/G1: 1.97	S: 45.05 % G2/G1: 1.95

六、細胞凋亡測定

實驗六：TA1、白芍與細胞凋亡的關係探討

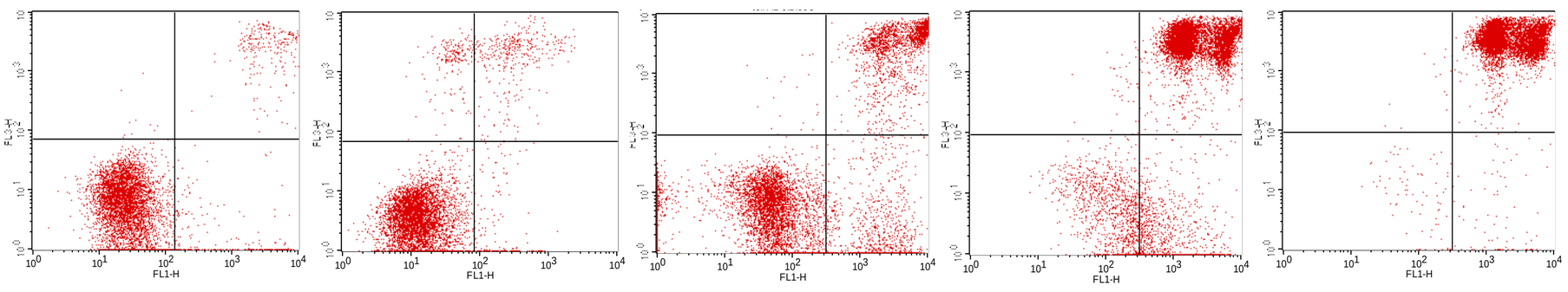
(一)fraction對細胞凋亡的影響

步驟：

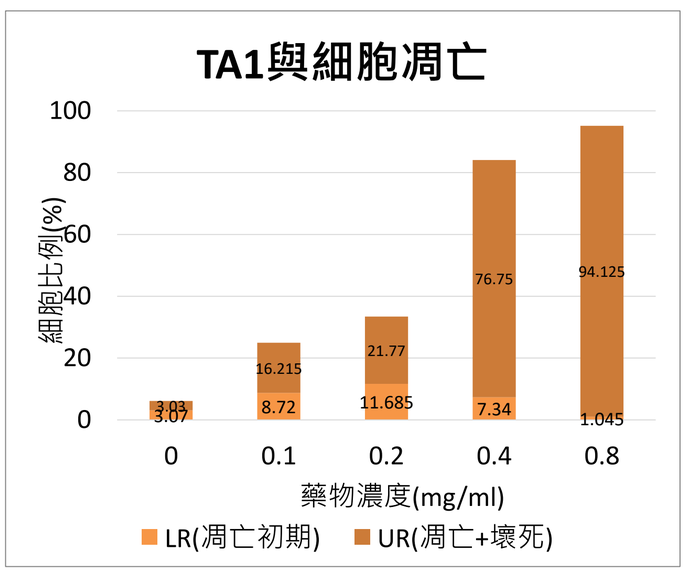
1.秤取TA1浸膏
2.以RPMI稀釋至0.2、0.4、0.8mg/ml
3.treat MDAMB231 for 24 hrs
4.染色並以流式細胞儀讀取訊號

討論：

1 .隨TA1濃度增加，右下格(LowRight)訊號比例先增加後減少，代表初期細胞凋亡的比率先增厚減
2 .隨TA1濃度增加，右上格(UpRight) 訊號比例增加，代表necrosis加上apoptosis的細胞比例增加，但無法分辨兩者各自的比例



控制組　TA1 0.1mg/ml　TA1 0.2mg/ml　TA1 0.4mg/ml　TA1 0.8mg/ml



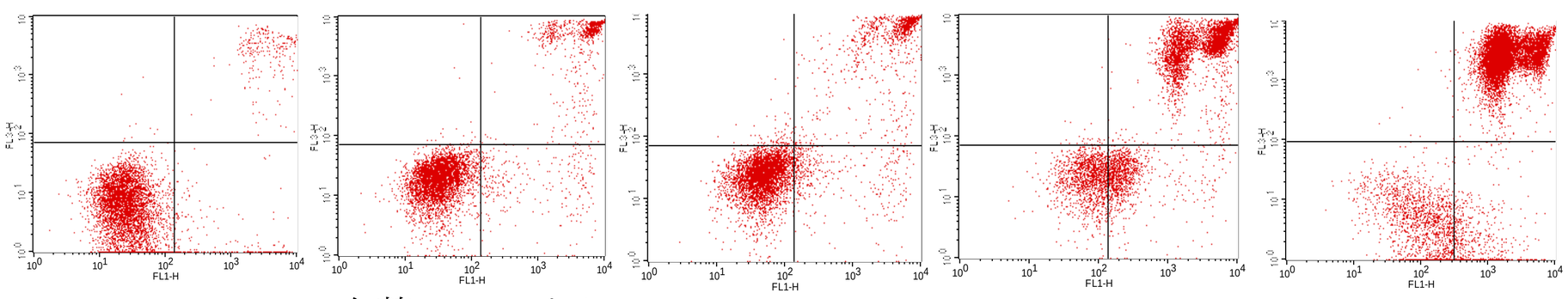
(二)白芍對細胞凋亡的影響

步驟：

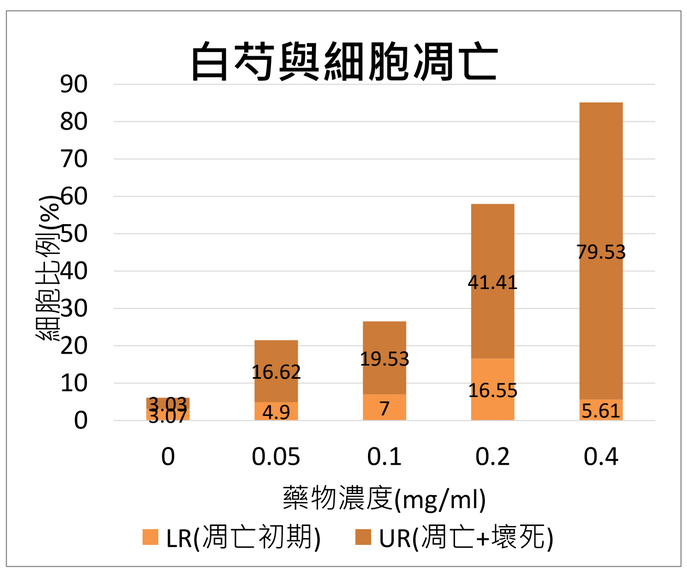
1.秤取白芍浸膏
2.以RPMI稀釋至0.2,0.4,0.8mg/ml
3.同實驗六之一

討論：

1 .隨白芍濃度增加，右下格(LowRight)訊號比例先增加後減少，代表初期細胞凋亡的比率先增厚減
2 .在一倍及兩倍IC50濃度時，白芍造成的細胞凋亡比例(LR)高於TA1



控制組　白芍 0.05mg/ml　白芍 0.1mg/ml　白芍 0.2mg/ml　白芍 0.4mg/ml



七、western blot 分析蛋白質

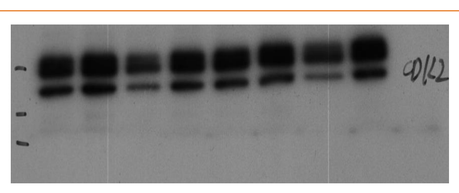
實驗八: TA1 與白芍 A 對週期相關蛋白(cyclinA,cyclinE,CDK2)之影響

步驟：

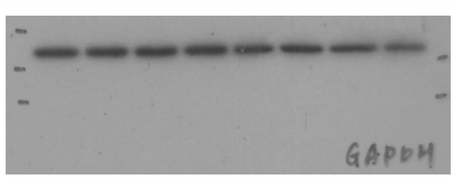
1 .選取 TA1與白芍 A 萃取物，以 PBS 稀釋至 2 倍,1 倍,0.5 倍 IC50
2.進行標準毒殺流程並收取蛋白質，跑 western blot

討論：

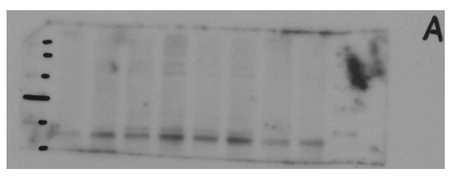
1 .隨TA1及白芍濃度增加，CDK2蛋白量減少，在2倍IC50時最明顯
2 .cyclin A 與E 未見明顯變化
3.推測托裏消毒飲使細胞週期停滯的路徑與CDK2有關



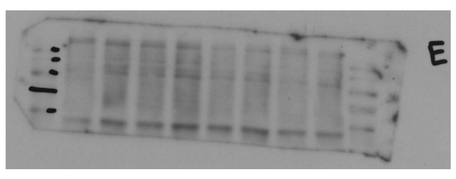
CDK2 (34kDa)
白(0.1) (0.2) (0.4) TA1 (0.1)(0.2)(0.4)(0.8) C



GADPH (36kDa)
internal control



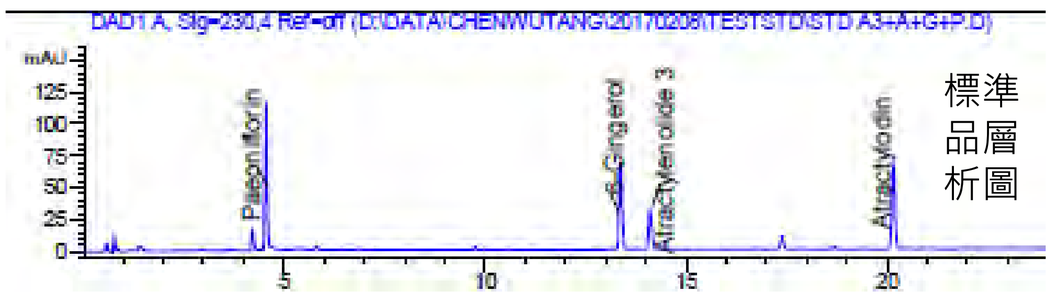
cyclinA (53kDa)
白(0.1) (0.2) (0.4) TA1 (0.1)(0.2)(0.4)(0.8) C

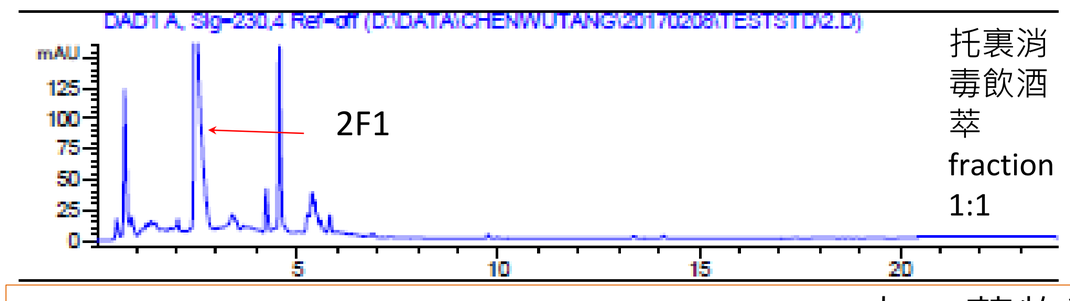


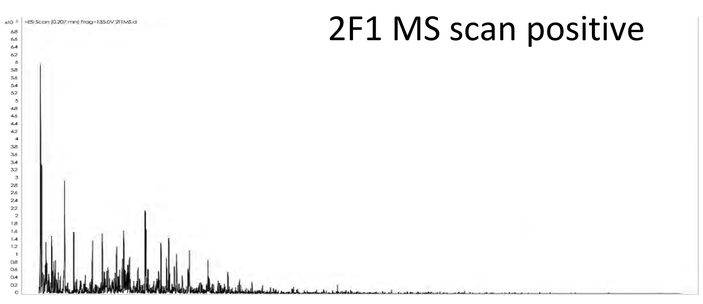
cyclinE (54kDa)
白(0.1) (0.2) (0.4) TA1 (0.1)(0.2)(0.4)(0.8) C

八、HPLC MSMS分析

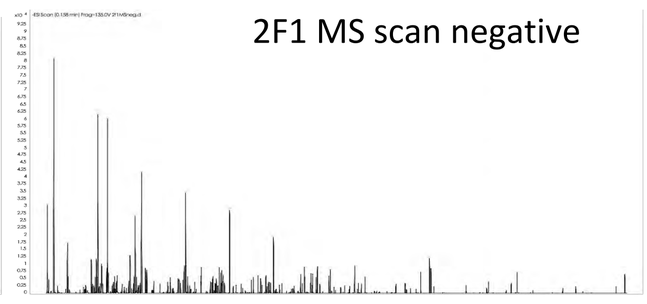
實驗七：利用層析質譜連用儀器測定分子量







2F1 MS scan positive



2F1 MS scan negative

討論：

針對含量最高的兩個峰值討論發現

1 .大約在層析進行4~5分鐘時被感應器偵測得一峰值，對照標準品層析圖，呼應成分paeoniflorin
2 .大約在層析進行2~3分鐘時有一極大峰值，但以質譜儀分析後發現它是一群混合物，需進一步分析其成分

九、藥物對正常細胞株之毒性測試

實驗八：

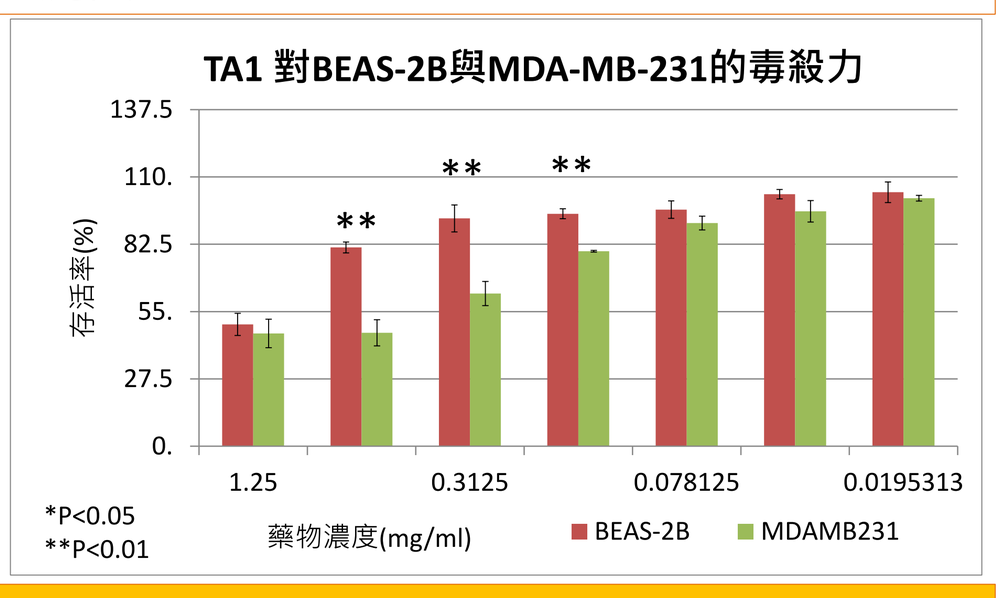
(一)TA1對馴化之正常細胞株的影響

步驟：

1 .選取TA1浸膏，以PBS從2.5mg/ml進行兩倍序列稀釋，得到七個濃度
3.依照標準毒殺流程，處理乳癌細胞MDA-MB-231與呼吸道上皮細胞BEAS-2B
4.分析實驗結果並計算IC50

討論:

1 .TA1為0.625,0.31,0.16(mg/ml)時，BEAS-2B存活率顯著高於MDA-MB-231
2.TA1對BEAS-2B的IC50為1.47mg/ml，對MDA-MB-231的IC50為0.52mg/ml
3 .乳癌細胞對TA1較敏感，TA1對於兩株細胞株具有選擇性



陸、結論

一、發現酒萃物含較多黃酮類化合物，浸膏的狀態較為黏稠，水萃物則較脆。
二、確定中藥複方有抑制細胞生長的傾向，其中又以托裏消毒飲及真武湯的效果較佳，IC50的濃度大約在0.4mg/ml附近。同時比較不同溶劑萃取出的藥物，發現酒精萃取者有較好的效果，推測能抑制之成份較容易利用非極性溶劑萃取出。
三、經過管住層析，托裏消毒飲酒萃物以50%甲醇為沖提液之片段(fraction)(以下簡稱TA1)有最佳抑癌效果，IC50約為 0.47mg/ml，並發現其他效果較好之萃取物亦偏中上極性，有助於猜測主要作用的成份。
四、分開測試托裏消毒飲 12 種單味藥的毒性，發現白芍有最佳的毒殺效果，IC50約為0.218mg/ml。
五、利用flow檢測細胞週期發現複方(Toli A)及fraction(TA 1)有相似的效果，提高藥物濃度皆可使S Phase的比例顯著增加，但白芍並沒有明顯抑制細胞週期的效果。
六、利用 flow 檢測細胞凋亡，發現 TA1 與白芍皆能使白芍出現早期凋亡現象，且白芍的造成細胞凋亡的效果更為顯著。
七、利用高效液相層析儀分析發現，paeoniflorin為托裏消毒飲(TA1)主要成份之一，但TA1中亦有另一含量極高的峰值，經質譜儀打碎後發現為複雜的混合物，成分未知。
八、利用西方點墨法檢測週期蛋白(cyclinE 與 cyclinA)以及下游蛋白(CDK2)的含量變化，發現TA1 及白芍能使 CDK2 之表現量降低，cyclin A 與 E 未見明顯變化，推測其影響細胞週期的路徑與 CDK2 有關
九、結合細胞週期實驗與細胞凋亡實驗，發現 TA1 能使細胞週期停滯，同時亦能造成細胞凋亡，但白芍對細胞週期無顯著影響，僅能導致細胞凋亡，推測 TA1 中未知的高含量混合物為使細胞週期停滯之關鍵。
十、利用正常細胞株(BEAS-2B)做為對比，發現TA1抑制癌效胞生長的效果具有選擇性，而乳癌細胞(MDA-MB-231)對其較敏感。

柒、參考資料

一、香港大學中醫藥學院助理教授 馮奕斌博士(2009.4.30)。**癌症的中醫治療**。都市日報， Health Information 43。
二、卜聿珊(2014)。**以中藥活血藥方透過 GDNF 媒介路徑作為 抑制乳癌轉移之新穎策略**。 2014年臺灣國際科學展覽會。
三、許芷瑄(2015)。**"癌"究 - 小花蔓澤蘭**。2015臺灣臺灣國際科學展覽會
四、Lih-Chi Chen(2003). **A pilot study comparing the clinical effects of Jia-Wey ShiauYau San, a traditional Chinese herbal prescription, and a continuous combined hormone replacement therapy in postmenopausal women with climacteric symptoms.** Maturitas 44 (2003) 55/62