

新鮮大蒜液抑制 Ehrlich腹水癌細胞生長之研究 國中教師組生物科第一名

臺中縣立梧棲國民中學

作者：林淑端

摘 要

患有腹水癌之 ICR 小白鼠以新鮮大蒜液注射於腹腔或皮下，其癌細胞生長受到明顯的抑制。其中腹腔注射效果為皮下注射者之1.68倍。但其細胞密度不受大蒜液的影響。活體外的試驗顯示，大蒜液對腹水癌細胞核酸皮蛋白質的合成亦具有抑制效果。由其經時反應試驗發現，抑制作用為即發性，而不具潛伏相。腹水癌細胞在反應零時加入大蒜液培養15分鐘後，DNA，RNA 及蛋白質的合成立即受到顯著的抑制；待培養60分鐘，其抑制效果已緩減。該現象顯示，受大蒜液損壞的癌細胞可能具有修復的能力。

一、前 言

大蒜 (*Allium sativum*) 是一種日常的食品佐料。傳說生食大蒜可以預防消化管或肝臟腫瘤。其醫用價值的研究報導屢見不鮮。譬如防治高血壓⁽¹⁾、糖尿病^(2,3)、風濕痛⁽⁴⁾、血糖過低⁽⁵⁾、動脈硬化^(6,7)、心臟病⁽⁸⁾、或細菌、真菌引起的疾病等⁽⁹⁾。

大蒜抗癌作用的探討是近幾年來的熱門工作。譬如抑制小白鼠乳腺瘤⁽¹⁰⁾、或 Sarcoma-180 肉瘤的生長⁽¹¹⁾等效果。1975年，日本京都大學衛生研究所報導⁽¹²⁾，大蒜醣質溶液 (garlic sugar solution) 處理過的腹水腫瘤細胞，皮下注射於DDD-小白鼠後，發現具有顯著的抗癌作用。新鮮大蒜萃取液 (fresh garlic extract) [簡稱大蒜液] 的試驗^(13,14,15)亦有類似的免疫效果。

作者較早的觀察⁽¹⁶⁾，發現大蒜醣質溶液對 ICR 雄性小白

鼠腹水癌生長的影響不顯著。這與京都大學的報告⁽¹²⁾有出入。換句話說，大蒜液抑制腹水癌的效果可能與小白鼠的品系 (strain) 有關。爲了證實這一點，遂採用 Fujiwara-Nakata 的試驗方法⁽¹³⁾探測大蒜液的抗癌效果。這是本研究的一部份。當然，瞭解大蒜液抑制腹水癌的機制 (mechanism) 才是主要目的。利用放射性同位素標識法，分析大蒜液對腹水癌細胞核酸與蛋白質合成的抑制作用，亦在本篇一併報導。

二、材料與方法

1. ICR 雄性小白鼠：由南港預防醫學研究所繁殖的 ICR 小白鼠，採用 29 公克左右的雄鼠進行試驗。飼養室空氣調節，室溫維持攝氏 23 度。麩漿混合福壽牌小雞飼料做成乾燥飼料塊餵食，並餵以自來水。
2. 新鮮大蒜液之製備⁽¹³⁾：稱 5 公克之新鮮大蒜末，用 25 毫升蒸餾水萃取。繼以濾紙過濾。濾液即大蒜萃取液，簡稱大蒜液。
3. 腹水癌細胞之接種與抽取：選取接種 Ehrlich 腹水癌細胞後腹部腫脹之小白鼠，以 5 毫升的無菌注射器及 23 號針頭插入腹腔內，抽取腹水。將此腹水液 0.5 毫升腹腔注射於健康小白鼠，約 15 天後鼠腹腫脹，依上法抽取腹水液注入冷凍之離心管中，以 PBS (phosphate saline buffer, pH 7.2) 洗滌離心數次，並將紅血球去除乾淨。最後以冰冷之 PBS 適當稀釋，均勻混合後供試驗之用。
4. 核酸與蛋白質之放射性標識⁽¹⁷⁾：取備好之 Ehrlich 腹水癌細胞懸浮液 0.5 毫升 (約 3×10^6 個細胞) 加於盛有 0.5 毫升冰冷 PBS 或大蒜液之試管內，稍加搖混並移置攝氏 37 度之諧振式恒溫水浴中培養 (振盪頻率約爲每分鐘 100 次)，15 分鐘後再用漢彌頓複式注射器吸取 0.2 毫升 ^3H -胸腺核苷 ($0.1 \mu\text{ci}/\text{ml}$, $2.0 \text{ci}/\text{mmole}$)、 ^3H -尿核苷 ($1 \mu\text{ci}/\text{ml}$, $23 \text{ci}/\text{mmole}$) 或 ^{14}C -白胺酸 ($10 \mu\text{ci}/\text{ml}$,

351ci /mmole) 分別注入合成 DNA , RNA 及蛋白質三組試管中。稍加混合後繼續在諧振式恒溫水浴中培養, 以標識核酸、蛋白質。

5. 核酸與蛋白質之測定⁽¹⁸⁾ : 將細胞懸浮液於培養適當時間後, 置於 2.4 公分之玻璃纖維濾紙 (whatman GF / A), 依 Mans 及 Novelli 方法⁽¹⁸⁾ , 待濾紙乾燥後, 置入含有 10 毫升布雷氏溶液 *⁽¹⁹⁾ 之計數瓶內, 黑暗中冷凍半小時以上, 然後以液態閃光計數儀 (Packard model 2425 Tri-Carb) 測試其放射性強度。

* Dioxane 1000 毫升, Naphthalene 60 公克, PPO 4 公克, POPOP 0.2 公克, Ethylene glycol 20 毫升, Methanol 100 毫升。

三、結 果

1. 活體內 (in vivo) 抑制腹水癌之試驗: 腹水癌細胞的增生是引起小白鼠體重變化的主要原因⁽¹⁶⁾。圖一顯示大蒜液可以抑制小白鼠的體重增加, 換句話說, 癌細胞的增生受到抑制。其中腹腔注射的抑制效果比皮下注射者好 1.68 倍。(插圖之兩直線斜率比值為 1.68)。

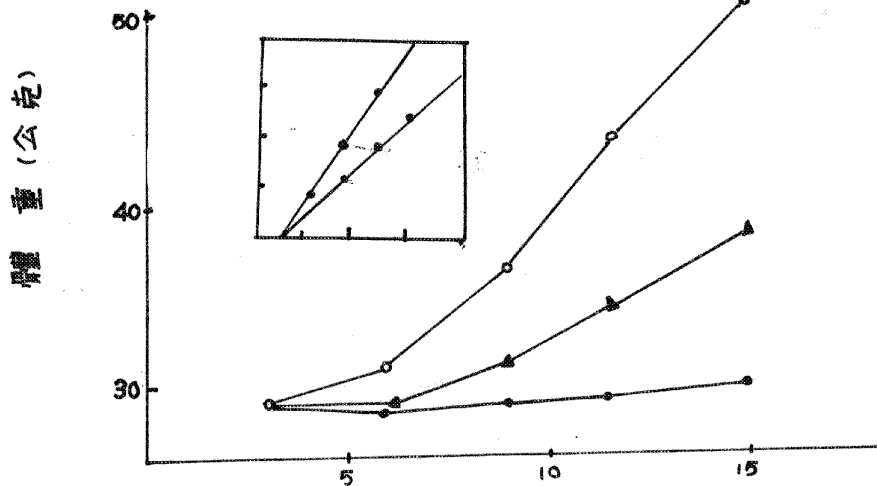
大蒜液也影響小白鼠的外觀形態。圖二 1 之對照組小白鼠腹部腫脹; 而圖二 2, 3 大蒜液處理組, 因為小白鼠癌細胞增長受到抑制, 其腹部較小。

小白鼠腹水癌細胞的密度不受大蒜液的影響。每毫升 $1.37 \times 10^8 \sim 1.41 \times 10^8$ 個細胞。但是大蒜液處理者癌細胞總數則少得多 (表一)。譬如腹腔注射大蒜液之小白鼠, 癌細胞總數還不到對照組之十分之一。進一步證實大蒜液可以抑制活體內腹水癌細胞的增生。

表一 大蒜液對小白鼠腹水癌細胞增生之比較

	對 照 組	皮 下 大 蒜 液 組	腹 腔 大 蒜 液 組
每毫升細胞數	1.37×10^8	1.37×10^8	1.41×10^8
總 細 胞 數	1.73×10^9	7.95×10^8	1.41×10^8

* 腹水癌細胞數目為小白鼠處理大蒜液後15天，抽取腹水統計。



圖一、大蒜液對小白鼠腹水癌細胞生長之影響。對照組 (○—○)；腹腔注射大蒜液 (●—●)；皮下注射大蒜液 (▲—▲)。插圖為大蒜液抑制腹水癌細胞生長之情形。其直線迴歸方程式：腹腔注射大蒜液 $Y_{ip} = -11.15 + 3.32 X$ ($r = 0.978$)；皮下注射大蒜液 $Y_{sc} = -5.83 + 1.98 X$ ($r = 0.985$)。兩者斜率比值 $R = 1.68$ 。

可能是大蒜液引起細胞膜的僵化，影響細胞核複製 (duplication) 的正常功能而致死。換句話說，膜的僵化影響先質的併合，而這種結構上的異常是引起細胞死亡的。

2 活體外 (in vitro) 抑制核酸、蛋白質合成之試驗：

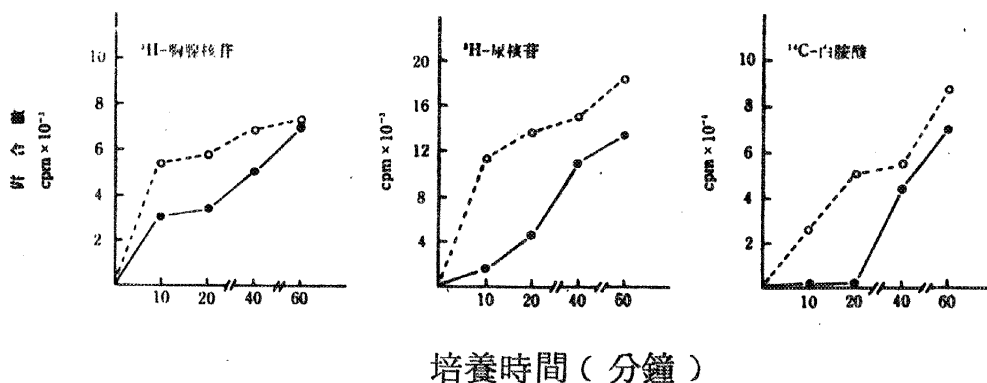
驗之結果如表二。資料顯示大蒜液對 Ehrlich 腹水癌細胞 DNA 的合成抑制程度達 28.8%。對 RNA 與蛋白質的抑制則分別為 28.9% 及 19.8%。換句話說，大蒜液對腹水癌細胞合成核酸、蛋白質具有明顯的抑制作用。

表二 大蒜液對於 Ehrlich 腹水癌細胞合成核酸、蛋白質之影響*

	大蒜液組	對 照 組	抑 制 程 度
DNA	5650	7931	28.8 %
RNA	17073	23997	28.9 %
蛋白質	46440	57880	19.8 %

* 表中每分鐘計數 (cpm) 數據，為三樣品所得之平均值。標識用之同位素放射性強度及標識方法參見材料與方法一節。

3. 經時 (time course) 反應：本試驗結果見圖三。放射性先質在反應零時同時加入備有大蒜液及腹水癌細胞之懸浮液。培養結果顯示反應進行 15 分鐘後，DNA，RNA 及蛋白質的合成立即受到顯著的抑制。待反應 60 分鐘時，三者合成之抑制現象便不如前者明顯。但是仍然顯示大蒜液在活體外對核酸及蛋白質合成的抑制效果。



圖二、經時反應。在反應零時將適當量之放射性先質 (0.22uci³H- 胸腺核者，或 0.2uci³H- 尿核者，或 2 uci¹⁴C- 白胺酸) 加入備有大蒜液 (或 PBS) 及腹水癌細胞之試管中，分別標識腹水癌細胞之 DNA、RNA 及蛋白質合成。○·····○對照組 (PBS)；●—●大蒜液組。

4. 細胞形態之觀察：癌細胞在活體外以大蒜液處理 40 分鐘後，利用位相差光學顯微鏡觀察，其形態上與對照組沒有明顯的差異。

四、討 論

本研究發現大蒜液在小白鼠體內對腹水癌細胞的增生具有明顯的抑制效果。圖一顯示腹腔注射大蒜液的抑制效果為對照組之 3.32 倍（抑制百分率與時間關係之迴歸方程式 $Yip = -11.15 + 3.32x$ ， $r = 0.978$ ）。而且根據細胞數的統計（表一），足可證明小白鼠注射大蒜液後，體重增加受阻乃由於癌細胞增生受到抑制的結果。

作者較早的研究⁽¹⁶⁾，已知小白鼠癌細胞的分裂指數（mitotic index）及多核性（multinucleate）並不受大蒜液的影響。

大蒜液在活體外具有抑制腹水癌細胞 DNA，RNA 及蛋白質合成的現象。其抑制程度約在 20～30% 之間（表二）。最簡單的推測，癌細胞增生受阻可能是核酸或蛋白質併合其先質的能力被大蒜液抑制，而使得原本需要較大量營養物質的癌細胞因此而貧瘠致死。問題是 1/3～1/5 的核酸，蛋白質先質真能影響癌細胞致死嗎？也有原因。利用光學顯微鏡觀察細胞形態，發現大蒜液對細胞外形的影響不顯著。若能藉助電子顯微鏡進一步研究，或許可以證實上述有關細胞物理性質的推測。

前人報告^(20, 21) 已知大蒜辣素（allicin）與大蒜氨酸（alliin）是大蒜的主要成份，且前者可經由蒜酶（allinase）作用而轉變成後者。活體外的試驗^(14, 22) 證明腹水癌細胞受抑制是由於大蒜辣素的作用。另有兩組科學家則進一步闡釋其作用位置是在癌細胞蛋白質的硫氫基（sulphydryl group）^(23, 24)。在細胞生長、分裂過程，還原態硫氫基化合物一旦被氧化，細胞增殖即受到抑制^(25, 26)。而癌細胞比正常細胞的硫氫基濃度偏高很多^(27, 28)。Willis⁽²⁸⁾ 曾證明大蒜液對硫氫基酵素的抑制現象

是由於大蒜辣素的一SO—S—功能基所引起的。

引用上述文獻可以合理地解釋本研究觀察到的各種現象。由於癌細胞蛋白質（尤其是酵素）之硫氫基與大蒜液中的大蒜辣素結合，而抑制細胞的分裂、生長。圖一所示腹腔注射效果較好，可能是大蒜液直接抑制癌細胞的代謝。而皮下注射者由於與癌細胞間接觸，可能先與其它組織的硫氫基作用消耗部份的一SO—S—功能基，所以效果略差。至於在活體外的研究結果（表二），也可以用類似的作用機制來解釋。簡單地說，與併合先質有關的酵素，其硫氫基受大蒜液氧化而失去正常的代謝功能，無法有效地併合DNA，RNA或蛋白質合成所需的先質。

本報告有關經時反應的研究結果，在反應60分鐘後，大蒜液對核酸或蛋白質先質的併合抑制效果漸漸消失，可能是受損的細胞逐漸修復的原故。早先的觀察⁽¹⁶⁾證明腹水癌細胞培養24小時仍有90%以上成活。因此抑制效果的差距減少，死細胞的影響不大。Dextran sulfate能抑制腹水癌細胞蛋白質的合成⁽³⁰⁾及改變細胞滲透性⁽³¹⁾，但受損細胞亦具有修復現象⁽³²⁾。換句話說，大蒜液與dextran sulfate可能有類似的作用機制。其它如藍黴黴毒素（*Penicillium roqueforti* toxin）⁽³³⁾、干擾素（interferon）⁽³⁴⁾抑制腹水癌細胞生長的研究，若能與本研究進一步比較分析，或許大蒜對抗癌機制的探討能早日澄清。

最近美國癌症研究協會（American Association for Cancer Research）年會報告中，Howard大學的研究小組已證明大蒜液能抑制Morris肝腫瘤的生長及其鳥糞苷酸環化酶（guanylate cyclase）活性⁽³⁵⁾。換句話說，可能影響癌細胞cGMP的含量。而cGMP又是細胞葡萄糖代謝的控制因素⁽³⁶⁾。這些有關癌細胞分子生化代謝的研究，乃目前最熱門而且最具突破潛能的研究方向。本研究結果雖然不足提供這方面的建議，却不失為朝這個方向鑽研的一個起步。進一步的工作是去解答更多的疑難。譬如大蒜液的作用機制只與酵素有關嗎？還是作用轉

譯 (translation) 步驟？或轉錄 (transcription) 步驟？細胞物理結構的改變可能比生化機能的改變更重要嗎？腹水液又扮演什麼角色呢？

五、參考文獻

1. Loeper, M. & Debray, M. (1921) Bull. Soc. Med. 37 : 1032
2. Jain, R.C. et al. (1973) Lancet 2 : 1491
3. Brahmachari, H.D. & Augusti, K.T. (1962) J. Pharm. Pharmacol. 14 : 254
4. Prasad, D.N. et al. (1966) Ind. J. Med. Res. 54 : 582
5. Mathew, P.T. & Augusti, K.T. (1973) Ind. J. Exp. Biol. 11 : 573
6. Bordia, A. & Bansal, H.C. (1973) Lancet 2 : 1491
7. Jain, R.C. (1978) Am. J. Clin. Nutr. 31 : 198
8. Buck, C. et al. (1979) Lancet 2 : 104
9. Tansey, M.R. & Appleton, J.A. (1975) Mycologia 67 : 409
10. Kroening, F. (1964) Acta Un. Int. Cancer 20 : 855
11. 鄭惠華、董大成 (1981) 臺灣醫誌 80 : 385
12. Nakata, T. & Fujiwara, M. (1975) Gann 66 : 417
13. Fujiwara, M. & Nakata, T. (1967) Nature 216 : 83
14. 中田利一 (1973) 日衛誌 27 : 538
15. 中田利一 (1973) 日衛誌 28 : 261
16. 林淑端、趙清貴 (1981) 未發表

17. Ueno, Y. & Fukushima, K. (1968) *Experientia*
24 : 1032
18. Mans, R. J. & Novelli, G.D. (1961) *Arch. Biochem
Biophys.* 94 : 48
19. Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* 1 : 279
20. Stoll, A. & Seebeck, E. (1948) *Helv. Chim. Acta*
31 : 189
21. Stoll, A. & Seebeck, E. (1949) *Helv. Chim. Acta*
32 : 197
22. DiPaolo, J.A. & Carruthers, C. (1960) *Cancer Res.*
20 : 431
23. Willis, E.D. (1956) *Biochem. J.* 63 : 514
24. Weisberger, A.S. & Pensky, J. (1958) *Cancer Res.*
18 : 1301
25. Contopolous, A.N. & Anderson, H.H. (1950) *J.
Lab. & Clin. Med.* 36 : 929
26. Barron, E.S.G. (1951) *Adv. Enzymol.* 11 : 201
27. Voegtlin, C. & Thompson, J.W. (1926) *J. Biol.
Chem.* 70 : 801
28. Hammett, F.S. (1929) *Arch. Path.* 8 : 575
29. Siegel, M.R. & Sisler, H.D. (1964) *Biochem.
biophys. Acta* 87 : 70
30. McCoy, G.D. & Racker, E. (1976) *Cancer Res.*
36 : 3346
31. Scholnick, P. et al. (1973) *J. Biol. Chem.* 248:
5175
32. McCoy, G.D. et al. (1976) *Cancer. Res* 36 :
3339
33. 魏如東、張永年 (1976) *科學發展月刊* 4 : 2464

34. Panniers, L.R.V. & Clemens, M. J. (1981) J. Cell Sci. 48 : 259
35. Dhillon, G. et al. (1981) AACR Abst. 69
36. Elbrink, J. & Bihler, I. (1975) Science 188 : 1177

評語：(一)對照宜加以生理食鹽水作皮下注射與腹腔注射。

(二)新鮮大蒜液宜加在生理食鹽水中使用。

(三)實驗宜重複二至三次，以求結果正確。

(四)實驗所用白鼠，每組幾頭應加以說明。