

## 參、結果

### 一、中草藥複方對肝癌細胞增生的影響

#### 小柴胡湯

以MTT assay測試細胞相對存活率的結果顯示，小柴胡湯水萃取(圖一(A))在1、2和10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48小時後HepG2細胞增加約20%的生長 ( $p>0.5$ )，但濃度增至20及50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 後細胞漸受到生長抑制，尤以50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48、72小時僅有38%、20%及15% ( $p<0.001$ )的細胞可以存活。IC<sub>50</sub>亦隨時間增加由36.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至25.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (表一)。

以1和2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 小柴胡湯酒精萃取(圖一(B))處理24、48及72小時也會讓HepG2細胞增生30% ( $p>0.5$ )，但分別以10、20及50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理48小時後細胞存活率均降至50%以下 ( $p<0.01$ )。IC<sub>50</sub>隨時間增加由49.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至36.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 柴胡加龍骨牡蠣湯

柴胡加龍骨牡蠣湯(圖一(C))1和2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24小時後也會讓HepG2細胞生長增加約32%的生長 ( $p<0.05$ )，但分別以10、20及50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理72小時，其存活率會逐漸遞減至60%以下 ( $p<0.01$ )。IC<sub>50</sub>從24小時的61.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 略增至63.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 核桃承氣湯

核桃承氣湯(圖一(D)) 2和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24小時後，HepG2生長增加40% ( $p<0.05$ ) 及22% ( $p<0.001$ )，1、2、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48及72小時後，平均仍有80%的細胞存活。但以10和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理72小時後存活率逐漸遞減50%以下 ( $p<0.05$ )。IC<sub>50</sub>隨時間增加由156.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至51.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 半夏厚朴湯

半夏厚朴湯(圖一(E)) 1、2、10和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48及72小時後HepG2仍有約70%的細胞存活率，至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理48小時後，存活率逐漸遞減至50%以下 ( $p<0.01$ )。IC<sub>50</sub>亦隨時間增加由47.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至27.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

由複方實驗結果顯示，使用小柴胡湯、柴胡加龍骨牡蠣湯、核桃承氣湯及半夏厚朴湯可以抑制細胞生長，但在低劑量時仍會增加細胞生長。

## 二、中草藥複方及其有效單方對肝癌細胞增生與血管新生的影響

### 香蘇散

複方香蘇散(圖一(F)) 1、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時處理24、48小時，使HepG2細胞生長增加20% ( $p>0.5$ )，但10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48或72小時後細胞

存活率降為50%以下且生長抑制效應隨時間與濃度的增加而顯著下降 ( $p<0.01$ )，以 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理72小時存活細胞僅剩餘10% ( $p<0.05$ )。其24、48及72小時之 $\text{IC}_{50}$ 皆小於 $35\mu\text{g}/\text{mL}$ 。至於，Huh 7細胞株給予香蘇散(圖二(A))  $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48及72小時後細胞生長抑制情形不明顯 ( $p>0.5$ )，以 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理48小時後細胞存活率為82% ( $p<0.01$ )，但濃度增至 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24小時後，細胞存活率僅剩32%以下，其效應隨濃度與時間的增加呈顯著的變化 ( $p<0.001$ )。至 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 時細胞存活率於不同施藥時間均停滯在8-15%之間 ( $p<0.001$ )。 $\text{IC}_{50}$ 隨時間增加由 $26.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至 $21.3\mu\text{g}/\text{mL}$  (表三)。

HepG2 (圖三) 與 Huh 7 細胞 (圖五) 的細胞侵犯能力由控制組分別有  $8.5\times 10^4$  及  $9.3\times 10^4$  (視為 100%) 細胞通過 MatriGel 與  $8\mu\text{m}$  的孔隙穿透至孔盤下層貼附，加入香蘇散 ( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 小時後，細胞穿透率降至 45% ( $p<0.01$ ) 和 48% ( $p<0.01$ )。

利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶 (MMP-9 和 MMP-2) 活性 (圖十一)，發現香蘇散能抑制此兩種明膠酶之前驅物相對活性表現量，分別降至 30% 及 20%，其調控的層級為 RNA (圖十) 以及蛋白質。西方轉漬法顯示 HepG2 細胞 (圖六) 以香蘇散 ( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 及 48 小時後，VEGF 與 MMP-9 表現有隨時間依賴的關係而遞減的趨勢。對於 Huh 7 細胞則是抑制  $\beta$ -catenin 的表現。

## 紫蘇葉

香蘇散之單方物質紫蘇葉在低濃度(2.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的紫蘇葉相當於10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香蘇散中的含量)處理後，HepG2細胞存活率隨時間增加而遞減，以5.7、14.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理48小時後，細胞存活率降至 50%以下 ( $p<0.05$ )，14.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48、72小時，細胞存活率分別降至45% ( $p<0.001$ ) 38% ( $p<0.001$ ) 及18% ( $p<0.01$ )。而香蘇散的其餘單方物質香附、炙甘草和陳皮則不具生長抑制的能力(結果未呈現)。紫蘇葉無論24、48及72小時 $\text{IC}_{50}$ 小於12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，降幅差異約至60% (表二)。

Huh 7細胞株(圖二(C))於低濃度(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下)處理48小時後，細胞生長約增加10% ( $p<0.05$ )，2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理後隨濃度增加有顯著生長抑制的情形 ( $p<0.01$ ) 5.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24小時細胞存活率降至85% ( $p<0.01$ ) 以14.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24、48和72小時細胞存活率分別為39% ( $p<0.001$ )、21% ( $p<0.01$ ) 及17% ( $p<0.01$ )。  $\text{IC}_{50}$ 變化與HepG2細胞相似。

HepG2 (圖三) 與 Huh 7 細胞 (圖五)，加入紫蘇葉 (5.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 小時後，細胞侵犯能力分別為控制組 (未加藥) 的 25% ( $p<0.01$ ) 和 51% ( $p<0.01$ )，香蘇散其餘單方物質：炙甘草 (2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及陳皮 (1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (圖三(B)) 則使略能細胞穿透率降至 59% 和 64% ( $p<0.01$ )。但香蘇散和紫蘇葉與陳皮相較，仍有顯著差異。

利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶 (MMP-9 和 MMP-2) 活性 (圖十一), 發現紫蘇葉也能抑制此兩種明膠酶之前驅物相對活性表現量, 分別降至 45% 及 20%。而西方轉漬法結果顯示 HepG2 細胞 (圖六) 以紫蘇葉 (2.9 $\mu$ g/mL) 處理 24 及 48 小時後, VEGF 的表現有隨時間依賴的關係而遞減的趨勢。對於 Huh 7 細胞同樣能抑制  $\beta$ -catenin 的表現。

#### 黃連解毒湯

黃連解毒湯(圖一(G)) 以 5.4 及 25.2 $\mu$ g/mL 處理 24 小時, 細胞存活率分別降為 83% ( $p < 0.01$ ) 和 15% ( $p < 0.001$ ), 處理 48 小時以後細胞存活率降至 75% 以下, 而且隨著濃度的增加而遞減 ( $p < 0.05$ ), 1.1 和 10.1  $\mu$ g/mL 處理 72 小時後存活率均降至 55% 以下 ( $p < 0.01$ )。25.2 $\mu$ g/mL 處理 24、48 和 72 小時細胞存活率分別為 15%、10% 和 5% ( $p < 0.001$ )。無論 24、48 及 72 小時其  $IC_{50}$  小於 14 $\mu$ g/mL。

Huh 7 細胞株以黃連解毒湯(圖二(B)) 0.5 $\mu$ g/mL 處理 24 小時後細胞存活率降至 80% 以下, 其效應隨濃度與時間的增加具顯著的變化 ( $p < 0.05$ ), 5.4 $\mu$ g/mL 處理 24 小時後細胞存活率降至 60% 以下 ( $p < 0.05$ ), 72 小時之細胞存活率降至 40% 以下 ( $p < 0.05$ )。  $IC_{50}$  變化與 HepG2 細胞相似。

HepG2 (圖三) 與 Huh 7 細胞 (圖五), 加入黃連解毒湯 (10.1 $\mu$ g/mL) 處理 24 小時後, 細胞侵犯能力 (細胞穿透率) 分別為控制組 (未加藥) 的 50% ( $p<0.01$ ) 和 59% ( $p<0.01$ )。

利用明膠酶譜法偵測HepG2之明膠酶 (MMP-9和MMP-2) 活性 (圖十一), 發現以黃連解毒湯 (5.4 $\mu$ g/mL) 處理48小時後, 使此兩種明膠酶的前驅物相對活性表現量降至約60%。而西方轉漬法結果顯示Huh 7細胞 (圖八) 以黃連解毒湯 (5.4 $\mu$ g/mL) 處理24及48小時後,  $\beta$ -catenin的表現有隨時間依賴的關係而遞減的趨勢。

## 黃連

黃連能顯著地抑制HepG2細胞生長, 以0.1 $\mu$ g/mL處理24小時細胞存活率僅剩60%, 濃度增至1.4、2.7及6.8 $\mu$ g/mL後, 其存活率分別下降至31% ( $p<0.05$ )、21% ( $p<0.001$ ) 及8% ( $p<0.001$ )。其效應隨時間與濃度增加有顯著的變化。另一單方物質山梔子則不具生長抑制效力(結果未呈現)。以黃連處理24、48及72小時, 各時間之 $IC_{50}$ 皆低於3 $\mu$ g/mL, 降幅差異甚大。

Huh 7細胞株(圖二(D))以不同濃度處理24小時後, 細胞存活率降至80%以下, 48小時處理後細胞存活率降至40%以下 ( $p<0.01$ ), 72小時處理後細胞存活率降至25%以下 ( $p<0.01$ )。以1.4 $\mu$ g/mL處理24

小、48及72時後，細胞存活率分別降至68% ( $p<0.01$ )、38% ( $p<0.01$ )及19% ( $p<0.001$ ) 其效應隨濃度與時間的增加具顯著的變化。IC<sub>50</sub>變化與HepG2細胞相近。

黃連 (2.7 $\mu\text{g/mL}$ ) 處理 24 小時後，HepG2 (圖三) 與 Huh 7 細胞 (圖五) 的細胞侵犯能力 (細胞穿透率) 分別是控制組的 55% ( $p<0.01$ ) 和 47% ( $p<0.01$ )。

利用明膠酶譜法偵測HepG2之明膠酶 (MMP-9和MMP-2) 活性 (圖十一)，發現以黃連處理48小時後，使此兩種明膠酶的前驅物相對活性表現量降至約60%。西方轉漬法結果顯示HepG2細胞 (圖六) 與Huh 7細胞 (圖八) 以黃連 (1.4 $\mu\text{g/mL}$ ) 處理24及48小時後，能降低 $\beta$ -catenin與MMP-9在蛋白質層級的表現，且具時間依賴關係而遞減的趨勢。

### 三、中草藥單方對肝癌細胞增生與血管新生的影響

#### 石上柏

HepG2細胞以石上柏(圖一(J)) 2 $\mu\text{g/mL}$ 處理48小時後，細胞存活率至60%以下，其效應隨時間與濃度的增加而有顯著的影響 ( $p<0.05$ )。IC<sub>50</sub>亦隨時間增加由47.3 $\mu\text{g/mL}$ 降至7.5 $\mu\text{g/mL}$ 。Huh 7細胞(圖二(E))則是20及50 $\mu\text{g/mL}$ 處理後，細胞存活率降至72%以下，以50 $\mu\text{g/mL}$ 處理

72小時後，存活細胞率降至38% ( $p<0.001$ )，且生長抑制的效應隨時間與濃度的增加而有顯著的變化 ( $p<0.05$ )。IC<sub>50</sub>隨時間增加由71.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至38.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

HepG2 (圖四) 與 Huh 7 細胞 (圖五)，加入石上柏 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 小時後，細胞侵犯能力分別是控制組 (細胞穿透率) 的 56.3% ( $p<0.01$ ) 和 60% ( $p<0.01$ )。

西方轉漬法顯示 HepG2 細胞 (圖七) 與 Huh 7 細胞 (圖九)，以石上柏 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 及 48 小時後，沒有改變 VEGF、MMP-9 與 $\beta$ -catenin 的表現。

### 夏枯草

夏枯草(圖一(K)) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理HepG2細胞48小時後，細胞存活率即可至60%以下，其效應隨時間與濃度的增加而有顯著的變化 ( $p<0.05$ )。且72小時之後，不同濃度均使細胞存活率降至40%以下 ( $p<0.01$ )。IC<sub>50</sub>隨時間增加由33.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至21.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Huh 7細胞 (圖二(F)) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理48和72小時後細胞存活率降至82%和78% ( $p<0.05$ )，不同施藥濃度處理48小時後細胞存活率降至80%以下，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理後細胞存活率降至50%以下，其效應隨時間與濃度的增加有顯著的變化 ( $p<0.01$ )。IC<sub>50</sub>亦隨時間增加由38.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至



25.3 $\mu$ g/mL。

夏枯草 (20 $\mu$ g/mL) 處理 24 小時後，HepG2 (圖四) 與 Huh 7 細胞 (圖五) 的細胞侵犯能力 (細胞穿透率) 分別是控制組的 63.4% ( $p < 0.01$ ) 和 64% ( $p < 0.01$ )。

且西方轉漬法顯示，夏枯草 (10 $\mu$ g/mL) 處理 24 及 48 小時後，HepG2 細胞 (圖七) 與 Huh 7 細胞 (圖九)，VEGF 的表現有隨時間依賴的關係而遞減的趨勢。

#### 鴨膽子

鴨膽子(圖一(L)) 處理HepG2細胞24小時後以不同濃度間細胞存活率至80%以下 ( $p < 0.01$ )，48及72小時後各個濃度間細胞存活率降至40%以下 ( $p < 0.001$ )，但細胞生長抑制之增幅不大，細胞存活率停滯於30-40%。IC<sub>50</sub>隨時間增加由52.8 $\mu$ g/mL降至27.6 $\mu$ g/mL。

鴨膽子(圖二(G))1 $\mu$ g/mL 處理 Huh 7 細胞 24、48 及 72 小時使細胞存活率分別降至 50% ( $p < 0.05$ )、42% ( $p < 0.001$ ) 及 20% ( $p < 0.001$ ) 以下，以不同施藥濃度處理 48 小時後，細胞存活率降至 40% 以下 ( $p < 0.001$ )，並隨時間與濃度的依賴關係遞減。IC<sub>50</sub> 也隨時間增加從 31 $\mu$ g/mL 降至 2.1 $\mu$ g/mL。

鴨膽子 (20 $\mu$ g/mL) 處理 24 小時後，HepG2 細胞 (圖四) 的侵

犯能力（細胞穿透率）是控制組的 48% ( $p < 0.01$ )。

進一步利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶(MMP-9 和 MMP-2) 活性（圖十二），發現以鴨膽子處理 48 小時後，能抑制明膠酶的前驅物相對活性表現量。由西方轉漬法結果顯示，鴨膽子（10 $\mu$ g/mL）處理 24 及 48 小時後，對於 HepG2 細胞（圖七）與 Huh 7 細胞（圖九）MMP-9 及 $\beta$ -catenin 的表現有隨時間依賴的關係而遞減的趨勢。

### 山慈菇

山慈菇(圖一(M)) 處理HepG2細胞24小時後各個濃度均有生長抑制 ( $p < 0.01$ )，以20 $\mu$ g/mL處理48小時後細胞存活率降至55%以下，其效應隨時間與濃度的增加有顯著的改變 ( $p < 0.01$ )。IC<sub>50</sub>隨時間增加由48.2 $\mu$ g/mL降至27.3 $\mu$ g/mL。對於Huh 7細胞(圖二(H))唯50 $\mu$ g/mL處理72小時細胞存活率降為82% ( $p < 0.05$ ) 其餘濃度與時間均無生長抑制的效應。IC<sub>50</sub>隨時間增加由140.9 $\mu$ g/mL降至120 $\mu$ g/mL。

至於 HepG2 細胞（圖四），加入山慈菇（20 $\mu$ g/mL）處理 24 小時後，侵犯能力沒有顯著差異 ( $p > 0.5$ )。

西方轉漬法顯示，山慈菇（10 $\mu$ g/mL）處理 24 及 48 小時後，對於 HepG2 細胞（圖七）與 Huh 7 細胞（圖九）MMP-9 及 $\beta$ -catenin 的表現沒有增減。

## 苦參

苦參(圖一(N)) 處理HepG2細胞24小時後各個濃度均具生長抑制之效 ( $p<0.05$ )，以10、20和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理48小時後細胞存活率至60%以下，其效應隨時間與濃度的增加而有顯著的變化 ( $p<0.05$ )。72小時後細胞存活率為28% ( $p<0.01$ )、26% ( $p<0.01$ ) 及18% ( $p<0.001$ )。IC<sub>50</sub>隨時間增加由32.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至25.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

對於Huh 7細胞(圖二(I)) 處理24小時，細胞無顯著生長抑制之效 ( $p>0.5$ )，以2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理48小時後，細胞存活率降至85%以下，至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時隨時間增加細胞存活率降至45%以下 ( $p<0.05$ )，其效應隨時間與濃度的依賴關係遞減 ( $p<0.05$ )。IC<sub>50</sub>由41.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至26.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

苦參 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 小時後，HepG2 細胞 (圖四) 的侵犯能力 (細胞穿透率) 為控制組 (未加藥) 的 49% ( $p<0.01$ )。

進一步利用明膠酶譜法偵測 HepG2 之明膠酶(MMP-9 和 MMP-2) 活性 (圖十二)，發現苦參處理 48 小時後，能抑制明膠酶的前驅物相對活性表現量。由西方轉漬法結果顯示，苦參 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 及 48 小時後，對於 Huh 7 細胞 (圖九) 的 MMP-9 及 $\beta$ -catenin 表現隨時間依賴的關係而呈遞減的趨勢。

## 黃獨

黃獨(圖一(O))則是在 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理24小時後，HepG2細胞存活率降至60%以下，並隨著濃度與時間的增加呈顯著的生長抑制 ( $p<0.01$ )。72小時後細胞存活率分別為26%、18%及21% ( $p<0.001$ )。IC<sub>50</sub>隨時間增加由 $47.7\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至 $25.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

黃獨(圖二(J))處理 Huh 7 細胞 48 小時後，細胞存活率降至 82% 以下，以  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 72 小時後，細胞存活率降至 30% 以下，其效應隨時間與濃度的依賴關係而有顯著的變化 ( $p<0.01$ )。IC<sub>50</sub> 亦隨時間增加由  $71\mu\text{g}/\text{mL}$  降至  $34.4\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

黃獨 ( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 小時後，HepG2 細胞 (圖四) 的侵犯能力改變，由控制組有  $8.5\times 10^4$  (視為 100%) 細胞通過 MatriGel 與  $8\mu\text{m}$  的孔隙穿透至孔盤下層貼附，細胞穿透率降至 52% ( $p<0.01$ )。

由西方轉漬法結果顯示，黃獨 ( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 24 及 48 小時後，對於 HepG2 細胞 (圖七) 的 VEGF 與  $\beta$ -catenin 表現有隨時間依賴的關係而遞減的趨勢。