

## 壹、緒論

根據世界衛生組織的統計，近二十年來全世界的癌症死亡率正快速上升，而行政院衛生署統計（行政院衛生署，九十六年衛生統計資料），癌症為台灣十大死因之首，肝癌在男性為第一位，在女性則為第二位。肝癌最棘手之處便是病因複雜，肝硬化或是病毒性肝炎可能是肝癌的先兆，也可能是造成肝癌之原因（Gomaa *et al.*, 2008）。且肝癌病程進展快，極具侵襲性，有時肝臟本身無症狀，等到轉移發生在肺、淋巴結、及骨骼，方才被診斷為肝癌（Kim *et al.*, 2008）。

### 一、癌細胞增生、轉移與血管新生的關係

#### 1. 血管新生在癌細胞中扮演的角色

癌症是因細胞調控異於正常細胞，增生繁殖成為癌細胞，癌細胞因增殖快速，需要足夠的營養和氧氣（Wu *et al.*, 2007），因此，必須侵蝕周圍正常細胞並新生血管提供癌細胞增長的良好環境，更可能經由血液和淋巴系統擴散至其他組織器官，即所謂的轉移（Pepper and Skobe *et al.*, 2003），這是造成罹癌患者的主要徵候，也是臨床治療中最難以根治的（Li *et al.*, 2008）。

#### 2. 癌症血管新生的進程

腫瘤內皮細胞（endothelial cells）增生速度一般比正常組織的內皮細胞快 20 倍以上（Denekamp, 1984）。無論是生理或病理狀態下，

血管新生是發生於低氧(hypoxia)或是缺血 (ischemic) 的情況下 (Mirzoeva *et al.*, 2008) 。組織釋放大量的血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 至鄰近的血管中，與血管內皮細胞上之接受體結合 (Byrne *et al.*, 2005) ，進而活化內皮細胞產生一連串的訊息傳遞，引發內皮細胞進行增生 (proliferation) 、移行 (migration) ，所產生初期的管路必須進行細胞外基質再塑造 (extracellular matrix remodeling) ，進而暴露出  $\alpha v\beta 3$  integrin ，最後產生 tube和loop 直至血管穩定化為止，形成一個血管網路之血管新生 (Cristofanilli *et al.*, 2002)

癌症血管新生的機制可分為以下幾種形式：(1)芽生性血管新生 (Sprouting angiogenesis) ，(2)內摺性血管新生 (Intussusceptive angiogenesis) ，(3)吸引內皮前驅細胞 (Endothelial progenitor cells) ，(4)血管共構 (Vessel co-option) ，(5)血管生成擬態 (Vasculogenic mimicry) ，(6)淋巴血管新生 (Lymphangiogenesis) (Hillen *et al.*, 2007)。其中，芽生性血管新生最為普遍研究，經由血管內皮細胞上的促血管新生的生長因子，如：纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, bFGF) 或VEGF被激活，活化的內皮細胞釋放蛋白酶以降解胞外基質和基底膜，內皮細胞得以遷移增殖形成周圍芽狀結構，芽狀構造擴大成環形，最後形成完整的血管腔 (Paku, 1998)。而血管生成

擬態的途徑藉由增加Hypoxia-Induced Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9及VEGF的基因表現為模式 (Sun *et al.*, 2007)。

### 3. 癌症轉移 (metastasis) 的階段

癌細胞的轉移分為幾個階段：第一個階段稱為侵犯 (invasion)，此時上皮細胞 (epithelial cells) 會鬆開與癌細胞之間的連接，讓癌細胞能移動到鄰近組織。第二個階段稱為內滲 (intravasation)，癌細胞穿過血管或淋巴管的內皮進入循環系統。第三個階段稱為外滲 (extravasation)，這個階段的癌細胞由循環系統讓細胞穿越微血管而蔓延到其他的組織。形成具轉移性的惡性腫瘤 (Jing *et al.*, 2004)。

## 二、影響血管新生的相關蛋白質

### 1. VEGF

VEGF是調控血管內皮細胞增生、血管新生、脈管生成和血管通透 (permeability) 最主要的一個調控因子。(Klagsbrun and D'Amore, 1996)。VEGF的成員組成為：VEGF-A, placenta growth factor (PGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D以及VEGF-E。其分子結構是由單一VEGF的基因 (含有八個exon) 所組成，VEGF mRNA會經由選擇性剪裁 (alternative splicing)，剪裁成多個不同長短之mRNA，這些不同長短之mRNA會編碼 (encode) 出不同長度VEGF的胺基酸序列 (Tischer *et*

*al.*, 1991 ; Houck *et al.*, 1991 ; Houck *et al.*, 1992)。VEGF-A 又分為幾種異構：VEGF-A121，VEGF-A145，VEGF-A165，VEGF-A189和VEGF-A206，其中最含量最多研究也最廣泛的是VEGF-A165(Zachary and Gliki, 2001)。VEGF於缺氧的腫瘤細胞、巨噬細胞和免疫有關的細胞被大量製造，為一最具效力促血管新生的mitogen (Brown *et al.*, 1997)，當VEGF-A 表現被抑制時，則會造成血管形成的缺陷與胚胎死亡 (Carmeliet *et al.*, 1996)，VEGF-A，VEGF-B與微小血管生成有關，參與惡性腫瘤的血行轉移，VEGF-C和VEGF-D則為淋巴管生成因子，與腫瘤淋巴腺轉移密切相關並可判斷腫瘤治療的預後情形 (Joukov *et al.*, 1998)。VEGF的增加會使血管內皮細胞活動力突出 (protrusive activity)，VEGF和VEGF receptor的信息傳遞調控血管內皮細胞突出的活動力，是決定血管形態改變的重要關鍵 (Drake *et al.*, 2000)。

## 2. 基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)

癌症的復發或轉移也和MMP的過度表達呈正相關 (McGowan and Duffy, 2008)。MMP是一群帶有二價金屬離子鋅的蛋白酵素 (Amalinei *et al.*, 2007)。其中，MMP-9被歸類為明膠酶 (gelatinase)，主要參與細胞外基質分解的機制，以進行侵襲轉移。提供惡性腫瘤生長的血管增生 (Tu *et al.*, 2008)。

細胞外基質主要由膠原蛋白 (collagen)、彈性蛋白 (elastin)、醣蛋白 (glycoprotein) 和蛋白多醣 (proteoglycan) 四種組成分子組成，不同組織器官，各種組成成分比例不同 (Yurchenco and Schittny, 1990)。當腫瘤細胞從原發腫瘤分離脫落，必須降解細胞外基質，穿透原發腫瘤周邊的宿主結締組織才能進入血管系統 (Fidler *et al.*, 2002)。MMP降解細胞外基質及基底膜，促進了惡性腫瘤的侵襲與轉移。並且使病人預後不良 (Folberg *et al.*, 1993)。

MMP對於原位的增殖性腫瘤到侵襲轉移癌的演進過程，扮演重要的角色，瞭解MMP對腫瘤發生的影響，應可以研究開發出抑制MMP作用的藥物以治療癌症血管新生。而本論文著重在72kDa與92kDa的明膠酶 (gelatinase) 和金屬彈性蛋白酶 (metalloelastase)，分別為MMP-2和MMP-9 (又稱gelatinase B)，此種明膠酶可分解IV、V型基底層 (basal lamina) 非纖維狀膠原質，也可分解VII型的膠原質、纖維結合蛋白 (fibronectin)，X型的短鏈膠原質、彈性蛋白和金屬蛋白酶 (Tapia *et al.*, 2008)。

MMP的分解能力跟酵素分泌時間和其內生性抑制劑有關。而關節炎、硬化症與癌症都與酵素和抑制劑之間的不平衡有關，這些不平衡使得細胞外基質分解 (Tu *et al.*, 2008)。

但是，並非所有種類癌細胞都使用MMP來分解基質，其他的蛋白

水解酵素，如：尿激酶型纖維蛋白溶酶原活化因子（urokinase-type plasminogen activator，uPA）也在惡性腫瘤中發現與病人預後呈負相關（Grondahl *et al.*, 1993）。

### 3. $\beta$ -catenin

芽生型血管新生會促進VEGF與MMP-9/2的表現，又VEGF會使內皮細胞的E-cadherin的酪胺酸高度磷酸化，使E-cadherin與調控細胞生長增殖的蛋白質 $\beta$ -catenin結合力降低（Esser *et al.*, 1998），以利 $\beta$ -catenin進入細胞核內，與轉錄因子Tcf/Lef結合並改變其立體結構使調控細胞週期的因子（如c-myc、cyclin D1）及MMP-7的基因啟動子區域結合，製造蛋白質，增加細胞的增殖與分解細胞外基質的能力。（王，台灣癌症防治網）。

上述三類阻斷血管新生相關蛋白 VEGF、MMP-9 或  $\beta$ -catenin 表現的藥物，為間接滅殺癌細胞的療法，亦能在癌症擴散時作為良好的阻斷劑，以降低肝癌細胞的惡性程度。

## 三、中草藥研究歷史沿革

中藥以四氣五味作為分類，四氣：寒、熱、溫、涼四種藥性，藥性的寒、熱、溫、涼，是藥物作用於人體發生的反應歸納出來的；五味：辛、甘、酸、苦、鹹五種不同的滋味，主要是味覺，或是根據臨

床治療中反映出來的效果而確定的。歸經是藥物對於人體某些臟腑、經絡有著特殊的作用（許，1985）。

肝癌的臨床特徵：多表現為肝脾同病、氣滯血瘀、濕熱毒邪內蘊之徵，晚期多表現為陰液枯竭、瘀毒互結、水濕內停之候，臨床辨治當捉住「肝脾」二臟病生理變化。中醫認為肝癌的發生與感受濕熱邪毒、長期飲食不節、嗜酒過度以及七情內傷等引起機體陰陽失衡有關。感受邪毒、飲食損傷、脾氣虛弱、肝氣抑鬱是肝癌的主要病因，而正氣虧虛、臟腑失調則是發病的內在條件（謝，1996）。

肝癌中醫治則的現代研究主要有以下幾種：1.健脾理氣法 2. 活血化瘀法 3.清熱解毒法 4.疏肝理氣法 5.扶正補虛法（葉，2008）。

中藥治療肝病（歸肝經）主要有解表藥—紫蘇、柴胡；清熱瀉火藥—夏枯草、山梔子，清熱燥濕藥—黃連、黃芩、黃柏、苦參；理氣藥—香附、陳皮、厚朴；補虛藥—甘草，清熱解毒藥—鴨膽子（三七健康網）。

#### 四、研究目的

本論文主要以肝癌細胞為模式，配合細胞分子生物學方法試驗中藥材複方及單方組成物對血管新生及轉移調節因子表現之調控，並釐清各種不同牽涉的機制。期待能夠運用現代化藥物研發技術，達到驗證中草藥功能的目的。