ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ƒ¤"G‡ł§i

⁄⁄fl ^˜ ¤œ"«‰˘⁄Ł„ ¤ ¿m¤x ø¥˝ƒ¤»P»†§U¤x ø"v ł""…v¯T

›p e^ §¡G §O«‹›p e

›p e‰ ¸s„¡GNSC93-2320-B-038-024-

ıƒ · ¶¡¡G93 ƒ~08 ⁄°01 ⁄ ø 94 ƒ~07 ⁄°31 ⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙« O • ïx ª¤s'

›p e¥ D ø⁄¡HG» fl ¶•

ƒ ¶P¥ D ø⁄¡HG§ d œ¶¶

›p e »P⁄H›ß¡Gƒ ¶ ¯„'(x ª¤s¥˝)¡ B " ¥^(fM f † z)"¡RB§d‹ f (‹ ª¤s¥˝)

‡ł§i^ «‹¡G" °†‡ł§i

‡B†z⁄Łƒ¡¡G¥»›p e¥ i ⁄ ‰ ¶‹d,

⁄⁄ ¥` Œ 94 ƒ~10 ⁄°28 ⁄Ø

中文摘要

依據行政院衛生署統計民國九十三年國人十大死因排名第一名為惡性腫瘤，且惡性腫瘤已連續蟬連二十三年榜首。而於民國九十三年國人主要癌症死亡原因中，肝癌更位居所有癌症死亡原因第二位，肝癌的治療衍然成為國內重點研究之一。許多的植物中草藥早已在中國傳統用藥中作為保肝、抗癌及提升免疫能力之用，如：人蔘萃取物(*Ginseng Radix*)與銀杏萃取物(*Ginkgo biloba* extract; EGb761)具有抑制腫瘤之效果。本研究以動物實驗探討給予人蔘萃取物與銀杏萃取物之中草藥複方對於誘導肝癌大鼠之影響。肝癌誘導之動物模式循 2001 年 Emerich 等人之方式，以 MATB-III 之癌細胞直接注射至 Fischer 344 大鼠之左葉肝臟。於實驗起始(第 0 天；D0)將所有大鼠施以肝癌誘發手術，於第 7 天(D7)時隨機選取 10 隻大鼠犧牲，作為病理組，並將其餘之大鼠隨機分為分為 2 組：負控制組(n=9；不給予中草藥複方；誘發肝癌)與實驗組(n=12；給予中草藥複方，人蔘萃取物與銀杏萃取物各 100 mg/kg body weight；誘發肝癌)，於第 9 天(D9)開始給予中草藥複方，實驗期預計 5 週，因於第 10 天(D10)實驗動物發生死亡情形，故於第 12 天(D12)將兩組之大鼠犧牲。結果顯示於 D9、D12 之體重以及犧牲後之肝臟重量於兩組間皆無顯著差異，D9-D12 之食物攝取量於兩組間無顯著差異。於 D7 犧牲之病理組肝臟病理切片結果顯示，肝癌誘發於 D7 時已有腫瘤產生，且腫瘤之範圍中並無任何細胞壞死之情形發生。兩組於 D12 之肝臟外觀可明顯發現肝臟上腫瘤之形成，而不論控制組或實驗組於 D12 之肝臟病理切片結果顯示皆有較病理組(D7)較嚴重之腫瘤形成。於 D12 兩組之病理切片顯示腫瘤形成之範圍中央部位有明顯之細胞壞死情形。本研究結果發現此肝癌誘發模式可成功誘發大鼠肝臟上腫瘤之形成，腫瘤之形成於 D12 發現腫瘤之中央癌細胞發生細胞壞死，而於癌細胞注射後 D10 即有實驗動物死亡之情形。

關鍵字： 人蔘、銀杏、肝癌、細胞壞死

Abstract

The Department of Health reported that malignant tumor is the leading cause of death in 2004, which lasting for twenty-three years. Among cancers, hepatocellular carcinoma (HCC) is the second leading cause of death. Therefore, the therapy for HCC is one of the most important research focuses. Many Chinese herbs had been used as Chinese traditional medicines for hepatoprotection, antitumor, and immune enhancer, such as *Ginseng Radix* and *Ginkgo biloba* extract. An *in vivo* study was conducted to investigate the effects of herbal combination (*Ginseng Radix* and *Ginkgo biloba* extract) in the rats with HCC. The HCC induced model followed the method established by Emercih *et al.* in 2001. Briefly, rat breast cancer cell line (MATB-III) was injected into the left lobe of the liver in Fischer 344 (F344) rats directly. All rats induced HCC by operation initially (D0). On D7, randomly selected ten rats to sacrifice for pathological groups and others were randomly divided into two groups: negative control (HCC without herbal cocktail) and treatment groups (HCC with *Ginseng Radix* and *Ginkgo biloba* extract 100 mg/kg body weight/day each). The rats were given herbal combination on D9. The expected experimental period was five weeks. Because three rats were dead on D10 and others were observed weak to death, two groups were sacrificed on D12. Body weight, liver weight, and feed intake were not different between two groups. The liver histological section showed that liver tumors in the pathological group were successfully induced and no cell necrosis was observed on D7. Both the control and treatment groups (D12) developed tumor necrosis in the center of tumors, and had much more serious tumor formation than the pathological group (D7). In conclusion, the HCC induced model could lead to the formation of liver tumors. After tumor cell injection, rats were start to death on D10 and both groups were found tumor necrosis in the center of tumors on D12.

Key words: *Ginseng Radix, Ginkgo biloba*, hepatocellular carcinoma, tumor necrosis

目錄

	頁數
中文摘要	I
英文摘要	II
目錄	III
一.前言	1
二.研究目的	2
三.文獻探討	3
四.研究方法	5
五.結果與討論	7
六.參考文獻	8
七.計畫成果自評	10
八.附錄	11

前言

依據行政院衛生署民國九十三年之十大死亡原因指出:「惡性腫瘤位居國人主要死亡原因之第一位」。回顧近年來之死亡原因便可發現，惡性腫瘤已從民國七十一年起連續二十三年蟬聯國人十大死亡原因第一位，在我們生活的環境中，無時無刻不存在著許多對人體健康有害之毒性物質，如：致癌物質、細菌毒素、病毒、太陽輻射、紫外線、電磁波等。這些毒性物質在人體內藉由使得體內自由基大量產生、發炎反應過度表現等，細胞傷害不斷地累積，造成細胞 DNA 損傷突變甚或致癌基因與抑癌基因之調控失衡，此為癌症發生主要之進程，對惡性腫瘤之預防與治療皆是研究必需著重的方向之一。而在國人十大癌症死亡原因當中，肝癌更位於居男性及女性之第二位，此因肝癌而死亡之高比率亦少見於其他國家。因此，在國內肝癌的預防與治療更衍然成為重點研究之一。

目前惡性腫瘤之治療方式不外乎放射線療法、化學療法、手術切除等，但多數的治療方式因造成癌症患者其正常細胞壞死過多，病患癒後不佳，使得治療效果有所限制，因此，尋求一具預防或抗腫瘤之有效成分，以主要抑或是輔助的角色，減低惡性腫瘤對國人生命危害之影響，為目前相關研究所需致力的目標之一。癌症的發生多與民眾的不良生活習慣、所接觸的環境因子以及遺傳有關，且當人體的免疫功能低下時，也容易遭受感染及增加癌症的罹患率。在傳統或科學中醫藥研究中發現，人蔘與銀杏萃取物皆具有抑制癌細胞增殖等效用，但尚未有研究探討於動物模式中同時給予人蔘萃取物與銀杏萃取物複方，是否具有抑制癌細胞增殖之加成效果。因此本研究將以體內實驗探討人蔘萃取物與銀杏葉萃取物複方對誘導肝癌大鼠之影響。

研究目的

以 Fischer 344 大鼠為實驗動物，進行體內實驗探討人蔘萃取物與銀杏萃取物複方對誘導肝癌大鼠之影響。未來期能透過本實驗將人蔘與銀杏萃取物之中藥複方應用於臨床試驗。

文獻探討

人蔘，屬五加科植物，於中國文化中已有數千年歷史。本草經集注記載：「主補五臟、安精神、止驚悸、明目、強心、益智、消痰水；治虛勞內傷、發熱自汗、多夢、反胃、虛咳喘促，一切血虛證」。人蔘所含之活性成分以人蔘配醣體(ginsenosides)為主，包括：ginsenoside-Rb1、Rb2、Rb3、Rg1、Rg2..等，於許多研究當中，人蔘配醣體被認為具有保肝抗癌之作用。在 1994 年，Motoo 與 Sawabu 的研究發現人蔘配醣體-Rbl 與 Rg1(>1000μg/ml)可達到 50%抑制人類肝癌細胞株(PLC/PRF/5、Hep-G2)之生長。另一研究中亦顯示人蔘皂苷-Rbl 於抗突變之試驗中可抑制 DNA 之突變 (Ohtsuka et al. 1995)。於 1991 年研究中指出人蔘皂苷-Rb1 可增加肝臟中過氧化氫酶(catalase)與麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase)之活性，進而抑制脂質過氧化作用發生(Deng and Zhang 1991)。在研究中亦指出，中醫之小柴胡湯(sho-saiko-to)與補中益氣湯(Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang)所含之人蔘配醣體具顯著抑制人類肝癌細胞停止於細胞週期 G0/G1 期，且抑制細胞 DNA 合成並伴隨著細胞程式凋亡之發生(Yano *et al.* 1994, Kao *et al.* 2001)。

銀杏，為中國古老的植物之一，源於二億五千萬年前古生代的二疊紀時期，因此具有植物界活化石之稱，而銀杏葉的萃取物也早在中國傳統應用於氣喘與支氣管炎之治療上。而目前市面上常使用之銀杏葉萃取物 EGb761 為德國舒培藥廠(Schwabe Pharm.)所發展之第四代銀杏葉製劑，並經由德國最高衛生主管機關(BGA)訂立其標準公告，如下：

(1) 提取銀杏葉濃縮比例為 50：1。

(2) 含銀杏黃酮配醣體(Ginkgo flavone glycosides)，佔 24%。

(3) 含類苫烯(terpene lactones)，佔 6%；其中包括 2.8%~3.4% 銀杏內脂(Ginkgolides)與 2.6%~3.2% 百果內脂(Bilobalide)。

(4) 銀杏葉酸(Ginkgolic acid)含量少於 5ppm。

EGb761 之組成分約有 87%已被確認，其組成分可分為(1)銀杏黃酮配醣體：所含之類黃酮如槲皮素(quercetin)、山奈酚(kaempferol)等，與葡萄醣(glucose)、鼠李醣(rhamnose)或二者之醣基組成黃酮配糖體、(2)雙類黃酮(biflavonoids)、(3)類苫烯，即銀杏內酯 A、B、C、J、M 與百果內酯、(4)前花青素(proanthocyanidins)及(5)有機酸(organic acids)。於 2000 年 Papadopoulos

等人的研究中發現，銀杏葉萃取物(EGb761)可隨時間與劑量的增加而抑制人類乳癌細胞(MDA-231)的增殖。而於另一研究中指出，銀杏葉萃取物(EGb761)可在不降低 Cisplatin(CDDP)抗癌活性的前提下，減緩其所產生的毒性(Fukaya and Kanno, 1999)。1995 年 Dumont 等人發現，銀杏葉萃取物(EGb761)可防止細胞膜上之不飽和脂肪酸因鐵所誘導脂質過氧化(iron-dependent lipid peroxidation)的情形發生。而 Scholtyssek 等人於 1997 年的研究中指出銀杏葉萃取物(EGb761)中之銀杏內脂 B、C、J、M 以及百果內脂(Bilobalide)皆具有清除超氧化物(superoxide)之抗氧化能力。2002 年 Ozkur 等人研究中發現，銀杏葉萃取物(EGb761)可提高以 UVB 照射之老鼠其超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase；SOD)之活性。於另一研究中指出，銀杏葉萃取物(EGb761)可抑制由脂多醣(Lipopolysaccharide；LPS)所誘導之 inducible nitric oxide synthase(iNOS)活性(Wadsworth and Koop, 2001)。

研究方法

【人蔘萃取物】

人蔘萃取物購自 Ashland 公司(Covington, KY)，含 80%之 ginsenosides (包括: ginsenoside-Rh1, Rh2, Rg1, Rg2, Rg3, Rb1 等)。

【銀杏葉萃取物 EGb761】

銀杏萃取物 EGb761 購自 Ashland 公司(Covington, KY)。

【肝癌誘導模式】

誘導實驗動物肝癌之模式，依據 Emerich 等人(2001)之方式。以 Fischer 344 (F344)大鼠為實驗動物，將 F344 麻醉後於腹腔施以手術切開皮層與肌肉層，以 25 號針頭將癌細胞株 MATB-III (2×10^6/ 200 μL PBS)直接注射於大鼠之左葉肝臟。縫合切開之肌肉層與皮層，以碘酒擦拭縫合處，持續觀察實驗動物，當生命狀況穩定即可置於原飼養之吊籠。

【中藥萃取物複方】

中藥萃取物複方於飲食中添加各 100 mg/kg body weight 之人蔘萃取物與銀杏葉萃取物。中草藥複方之添加於實驗期(D9)給予直至實驗動物犧牲。

【實驗流程】

雄性 F344 大鼠，購於財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心(National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan, R.O.C.)，購入 3-5 週重約 150 公克之大鼠。個別飼養於獨立吊籠中，個別給予充足之飲水與飼料，以 laboratory rodent diet 5001 為其基本飲食。飼養環境採日光/黑暗 12 小時循環、溫度控制於 22-24°C、溼度 40-60%，預養期大約兩週，當老鼠體重約 200 公克重即可進入實驗期。實驗期預期為 6 週，於實驗起始(D0)時將所有老鼠施以肝癌誘發之手術，於 D7 隨機選取 10 隻大鼠犧牲，為病理組，進行肝臟之病理切片分析。並將其餘之 F344 隨機分為 2 組：(1)負控制組(n=9；不給予複方；誘發肝癌)、(2)實驗組(n=12；飲食中添加人蔘萃取物與銀杏葉萃取物之複方；誘發肝癌)，給予實驗期飲食。

【樣本收取】

於 D0 進行尾靜脈採血，將血液置於含有 heparin 之採血管，離心後收集血漿儲存於-80˚C 以待分析。於 D12 將大鼠麻醉後抽取腹腔靜脈之血液(如上述)，收集血漿儲存於-80˚C 以待分析，並於犧牲後取大鼠之肝臟進行肝臟病理切片之分析。

【分析項目】

(1) 肝臟病理切片：將肝臟摘除稱重後切下肝臟之左葉約 1 公分立方。置於 10%之福馬林中固定，並於修片後以酒精令其脫水，以二甲苯(xylene)清洗肝臟組織後以石蠟進行浸潤與包埋，製成蠟塊後以切片機切片，以蘇木紫-伊紅染色(haematoxylin-eosin stain; H &

E stain)。病理切片交由病理科醫師於單盲情況下判讀，確定肝癌細胞之增殖情形。

【統計分析】

所有數據以平均值(mean)±標準偏差(standard deviation; SD)表示之。以 SAS 軟體(8.1 版)進行 Student's *t* 檢定，比較兩組體重、肝重及飼料攝取量之差異。

結果與討論

各組飼料攝取量與體重：

實驗期間(D9-D12)，兩組之飼料攝取量皆無顯著差異(Fig 1)。兩組體重於 D9、D12 皆無顯著差異(Fig 2、Fig 3)。

各組肝臟之重量：

兩組之肝臟重量並無顯著差異(Fig 4)。

各組肝臟病理組織切片：

(1) 病理組：病理組之肝臟病理切片可明顯觀察到癌細胞之形成，且腫瘤發生之範圍中並無任何癌細胞壞死之情形發生，以此模式誘發肝臟之腫瘤生成，於注射癌細胞後第七天即有明顯之癌細胞產生(Fig 5)。且明顯觀察到癌細胞向正常肝細胞侵襲(Fig 6)。

(2) 控制組與實驗組之犧牲外觀圖皆可明顯觀察到肝臟腫瘤之生成(Fig 7, Fig 8)，於兩組之肝臟病理切片皆可明顯觀察到較病理組嚴重之腫瘤細胞形成(Fig 9-12)，且可發現腫瘤生成之範圍中央部分之癌細胞皆有嚴重之細胞壞死情形發生，推測因腫瘤形成後，腫瘤中心部分之癌細胞因養份與氧氣之供應不足所致。而癌細胞之壞死應造成癌症病變好轉，但因於 D10 起，老鼠已陸續有死亡之情形發生，故於 D12 時便犧牲，於此結果顯示實驗動物並非因癌細胞之死亡而使得癌症病變好轉。推測因癌細胞之死亡方式為細胞壞死而非以細胞程式凋亡之方式死亡所致。若細胞以細胞壞死之方式死亡，常因細胞壞死之過程中會因細胞膜之滲透壓無法維持而造成壞死細胞之細胞膜破裂，細胞內之發炎反應物質釋出波及鄰近之細胞，導致大範圍之發炎反應及細胞壞死。推測，癌細胞之壞死造成一快速且劇烈之細胞大範圍死亡，為致實驗動物於 D10 起便發生死亡之原因。

參考文獻

1. Dumont E, D'Arbigny P and Nouvelot A (1995) Protection of polyunsaturated fatty acids against iron-dependent lipid peroxidation by a *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). Methods Find Exp Clin Pharmacol 17: 83-88.
2. Fukaya H and Kanno H (1999) Experimental studies of the protective effect of ginkgobiloba extract (GBE) on cisplatin-induced toxicity in rats. J Oto-Rhino-Laryngol Soc Jpn 102: 907-917.
3. Ozkur MK, Bozkurt MS, Balabanli B, Aricioglu A, Ilter N, Gurer MA and Inaloz HS (2002) The effects of EGb 761 on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in sunburn. Photodermatol Photoimmunol Photomed 18: 117-120.
4. Scholtyssek H, Damerau W, Wessel R and Schimke I (1997) Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. Chem Biol Interact 106: 183-190.
5. Wadsworth TL and Koop DR (2001) Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. Chem Biol Interact 137: 43-58.
6. Yasukawa K, Ikeya Y, Mitsuhashi H, Iwasaki M, Aburada M, Nakagawa S, Takeuchi M and Takido M (1992) Gomisin A inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Oncology 49: 68-71.
7. Zhu M, Yeung RY, Lin KF and Li RC (2000) Improvement of phase I drug metabolism with *Schisandra chinensis* against CCl4 hepatotoxicity in a rat model. Planta Med 66: 521-525.
8. Papadopoulos V,Kapsis A,Li H,Amri H,Hardwick M,Culty M,Kasprzyk PG,Carlson M, Moreau JP and Drieu K(2000)Drug-induced inhibition of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. Anticancer Research. 20:2835-2848.
9. Motoo,Y and Sawabu N(1994)Antitumor effects of saidosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. Cancer letter. 86:91-95.
10. Ohtsuka M, Fukuda K, Yano H and Kojiro M(1995)Effects of nine active ingredients in Chinese herbal medicine sho-saiko-to on 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide mutagenicity. Jpn J cancer res (Gann). 86(12):1131-1135.
11. Deng HL and Zhang JT(1991)Anti-lipid peroxidative effect of ginsenoside Rb1 and Rg1. Chin Med J. 104(5):395-398
12. Yao, X, Hu, JF, Daniels, M, Yien, H, Lu, H, Sharan, H, Zhou, X, Zeng, Z, Li, T, Yang, Y, and Hoffman, AR (2003) A novel orthotopic tumor model to study growth factors and oncogenes in hepatocarcinogenesis. Clin Cancer Res 9: 2719-2726.

13. Kao, ST, Yeh, CC, Hsieh, CC, Yang, MD, Lee, MR, Liu, HS, and Lin, JG (2001) The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. Life Sci. 69: 1485-1496.

計畫成果自評

本研究之肝癌誘導模式，循 2001 年研究之肝癌誘發模式，自 ATCC 購入 MATB-III 之 F344 大鼠乳癌細胞株，成功建立肝癌誘發之動物模式，可應用於未來相關研究之進行。因肝癌誘發之情況嚴重，使得藥物投予之時機應用，應以防禦肝癌細胞之形成較為合適。

附錄

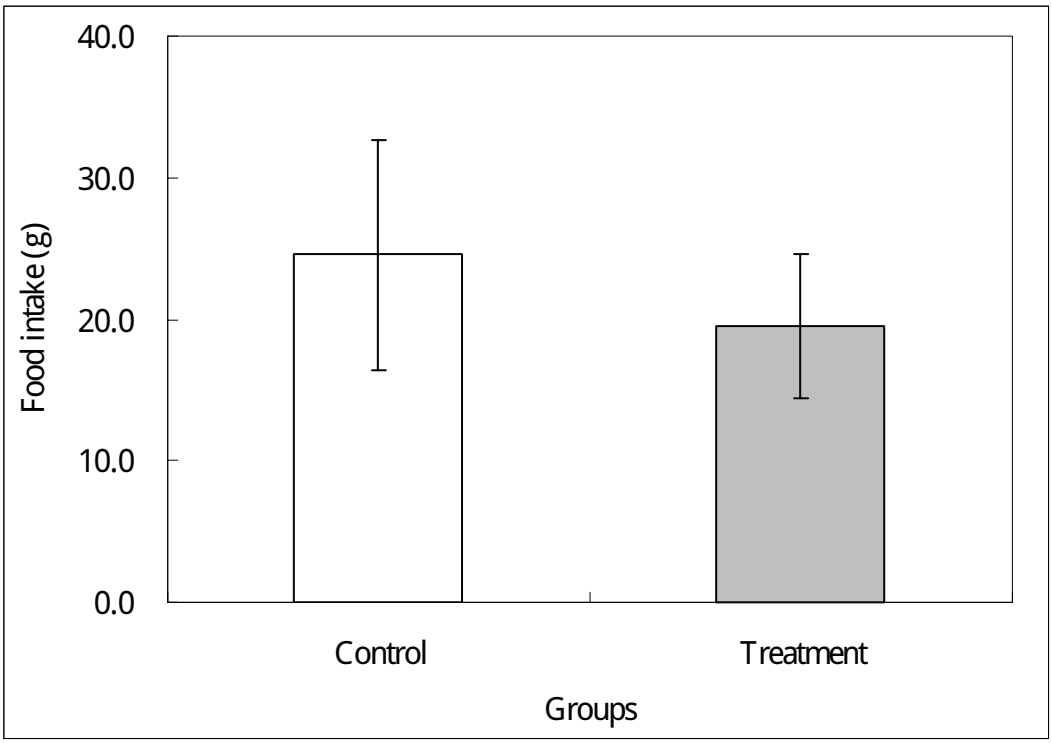

Figure 1 Food intake of each group (D9-D12). Data are presented as mean ± SD.

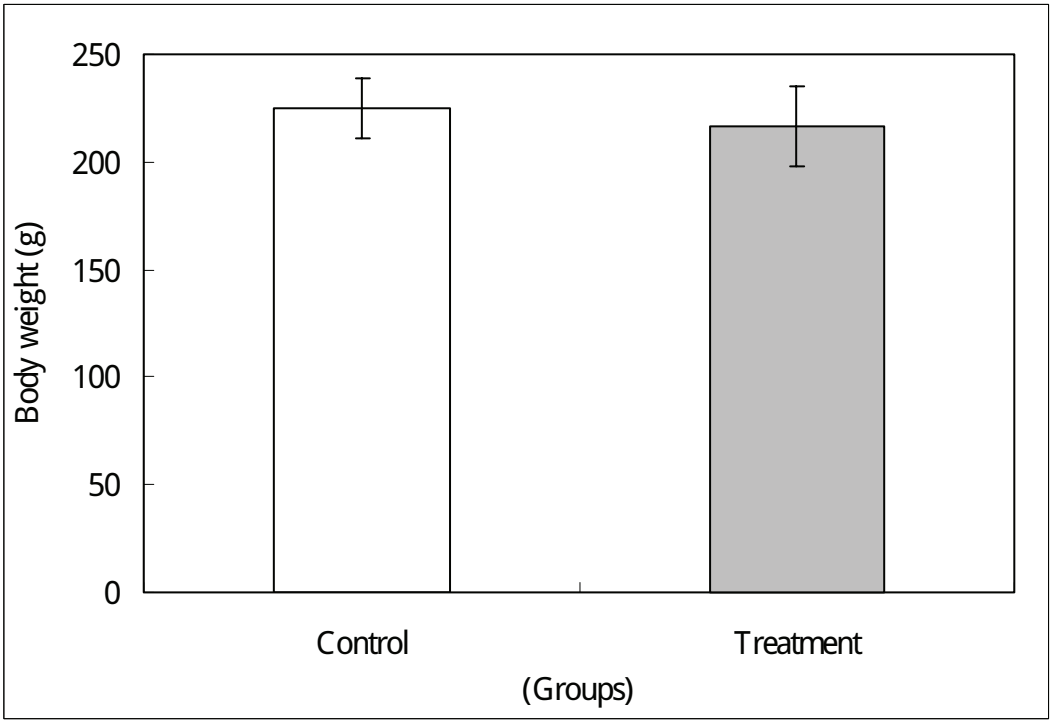

Figure 2 Body weight of each group (D9). Data are presented as mean ± SD.

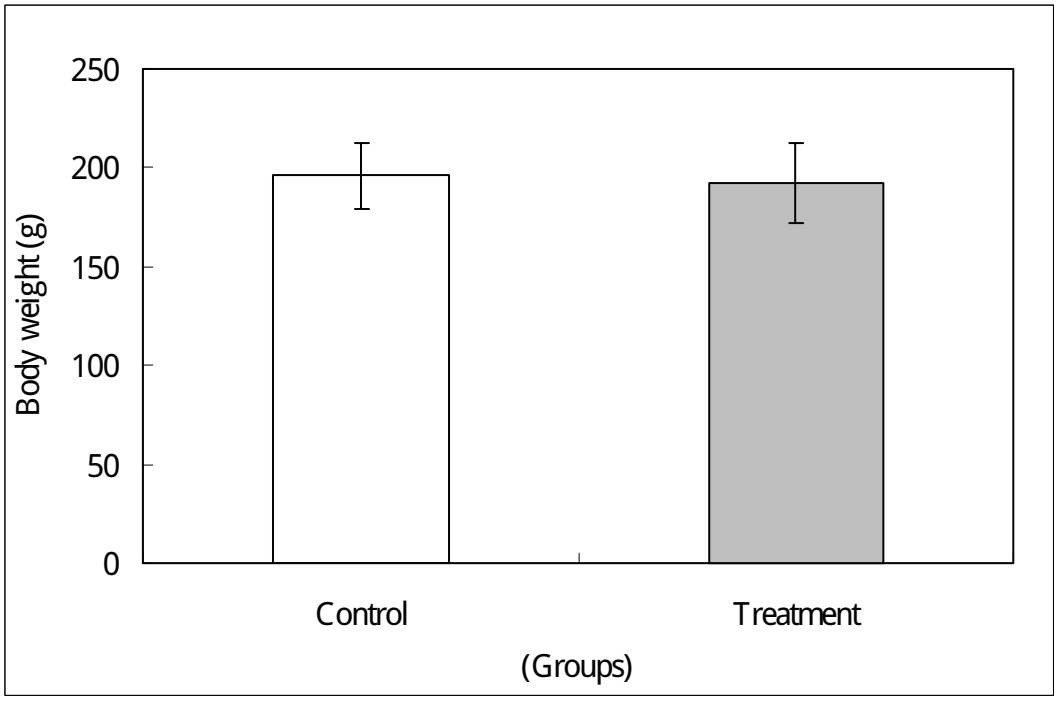

Figure 3 Body weight of each group (D12). Data are presented as mean ± SD.

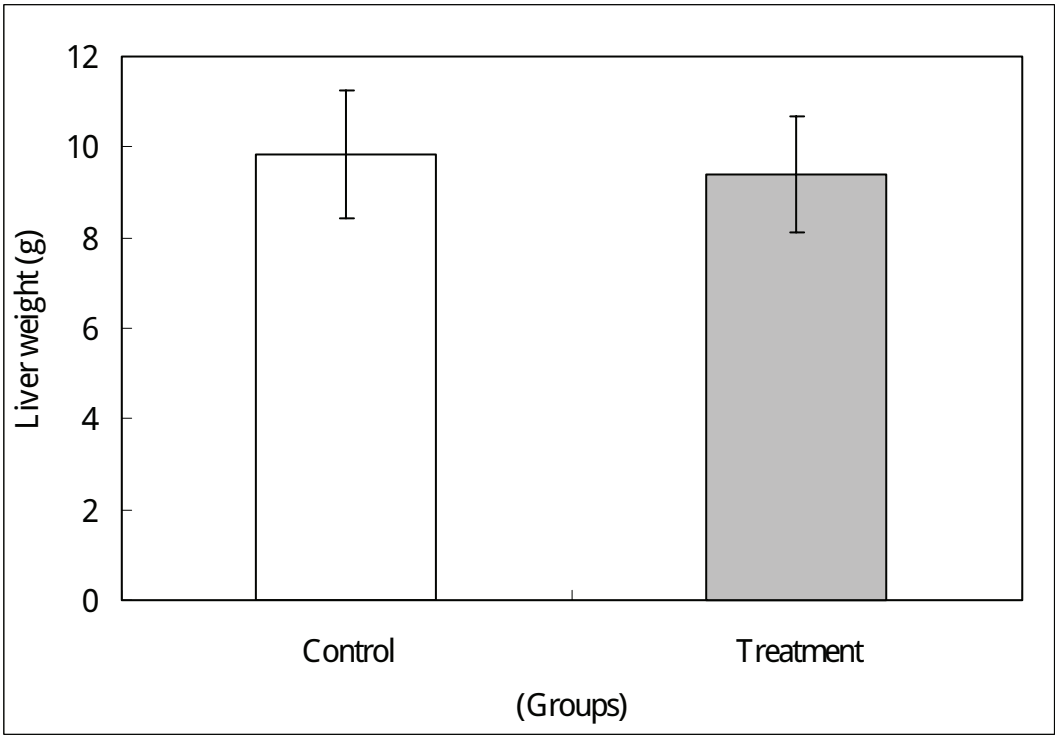

Figure 4 Liver weight of each group. Data are presented as mean ± SD.

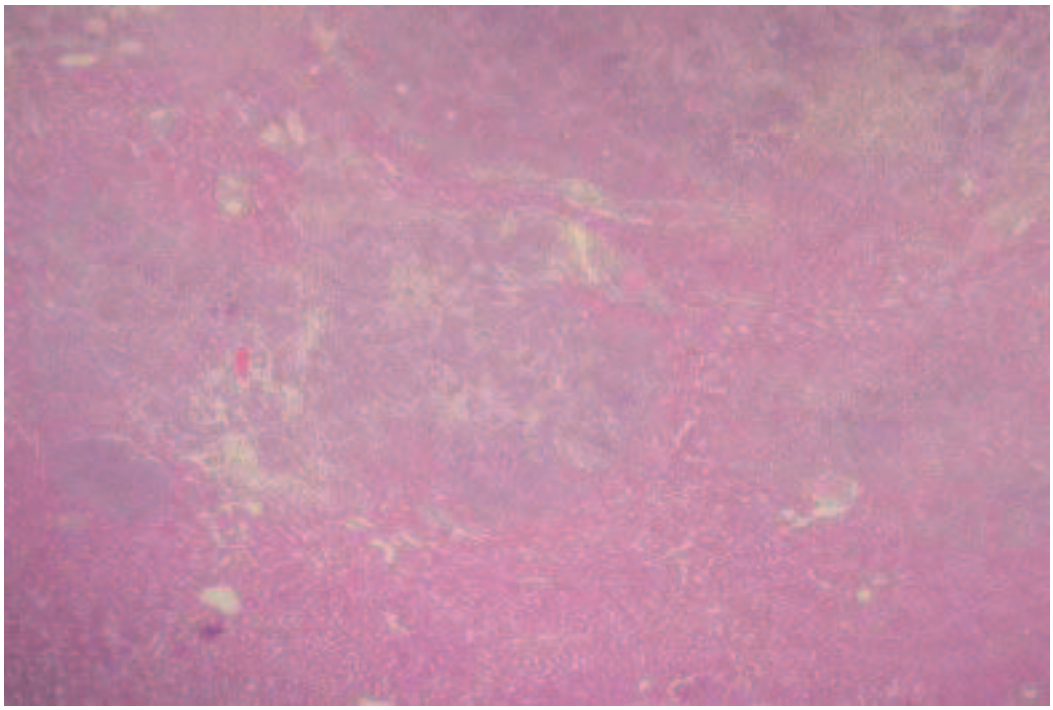

Figure 5 The pathological assessment (10×) of pathological group by H & E stain

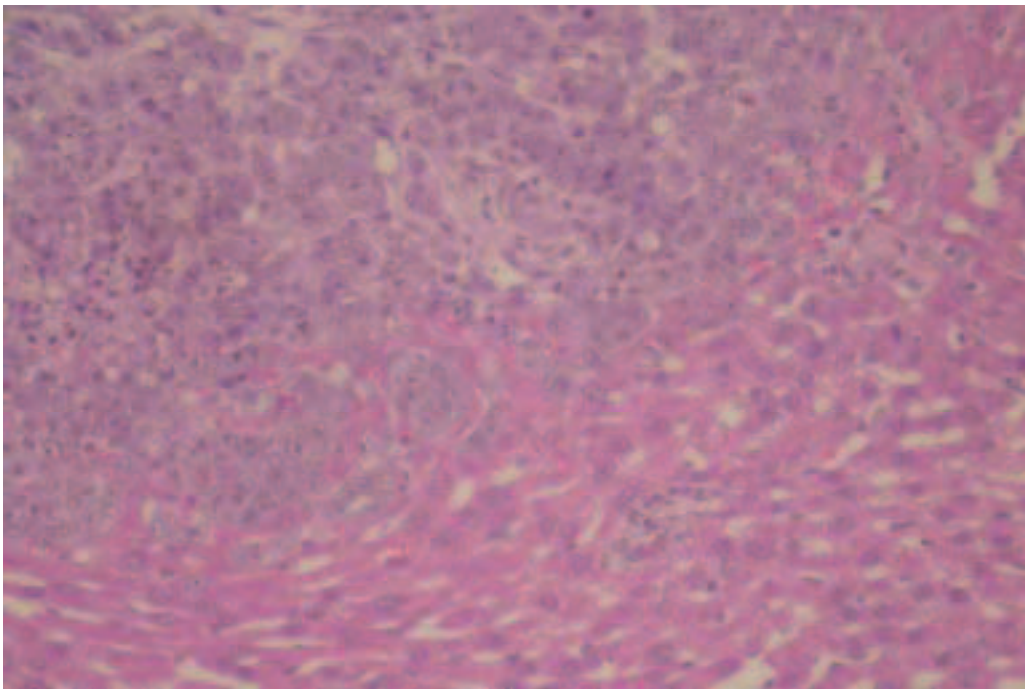

Figure 6 The pathological assessment (40×) of pathological group by H & E stain

Figure 7 Liver appearance of control group

Figure 8 Liver appearance of treatment group

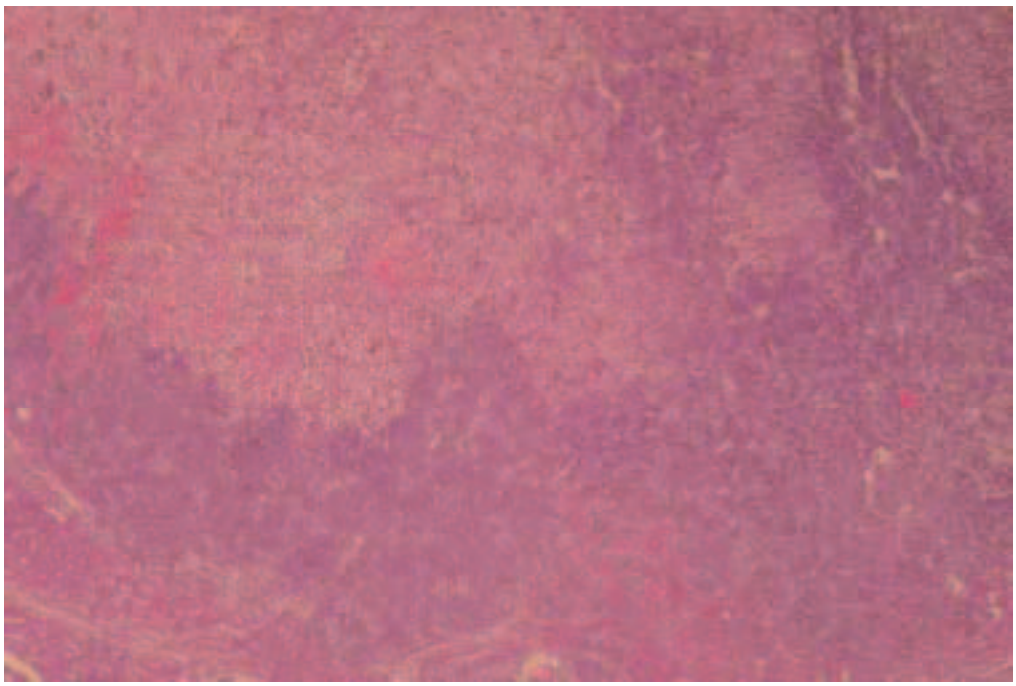

Figure 9 The pathological assessment (10×) of control group by H & E stain

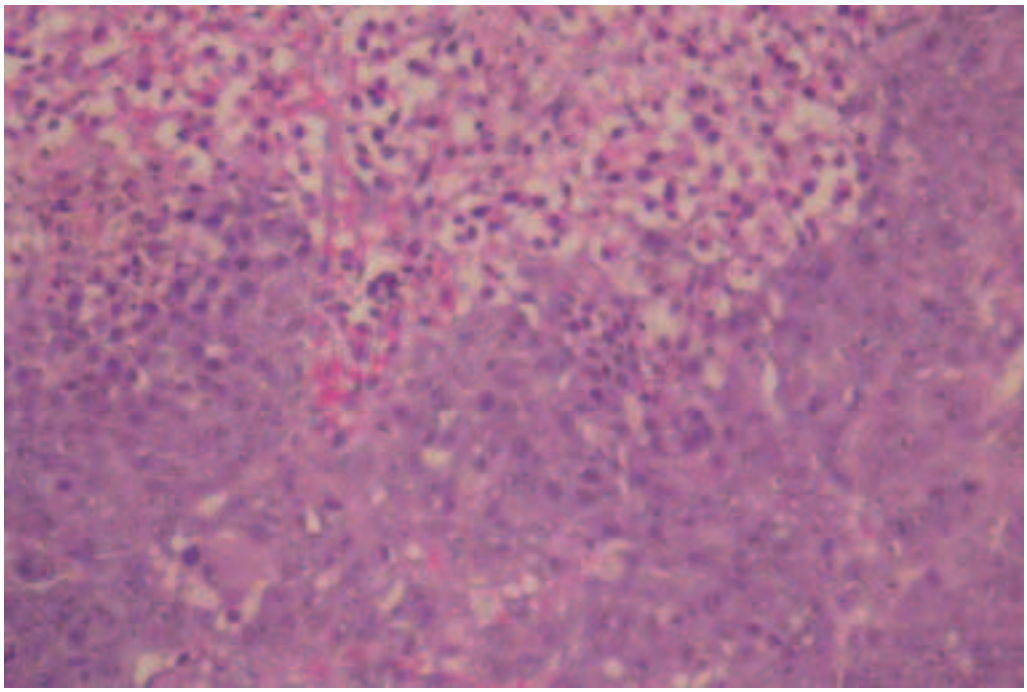

Figure 10 The pathological assessment (40×) of control group by H & E stain

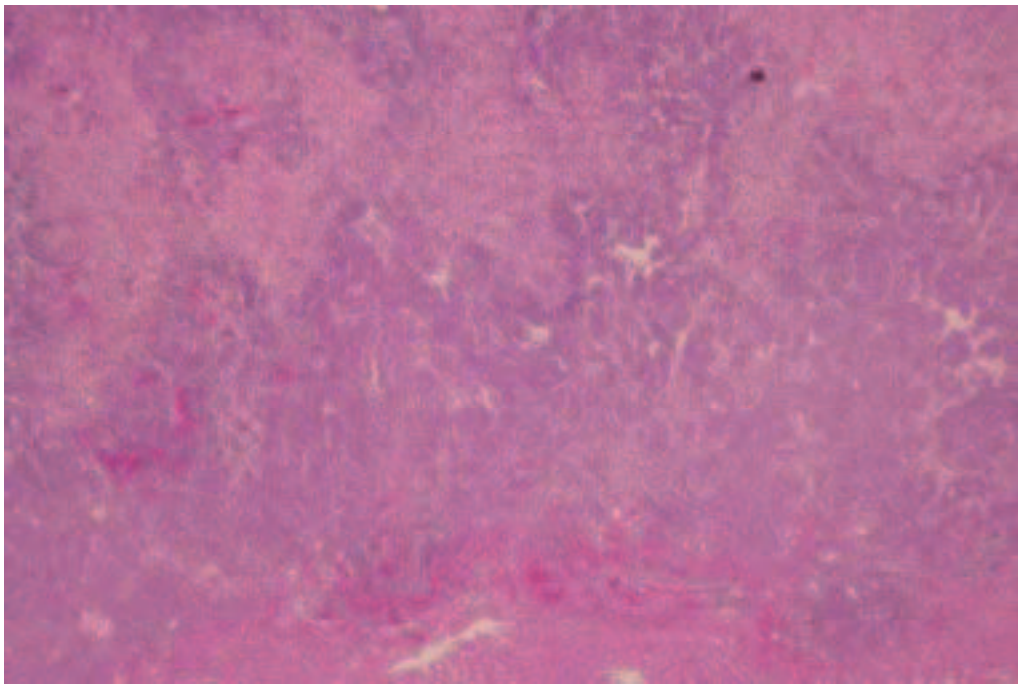

Figure 11 The pathological assessment (10×) of treatment group by H & E stain

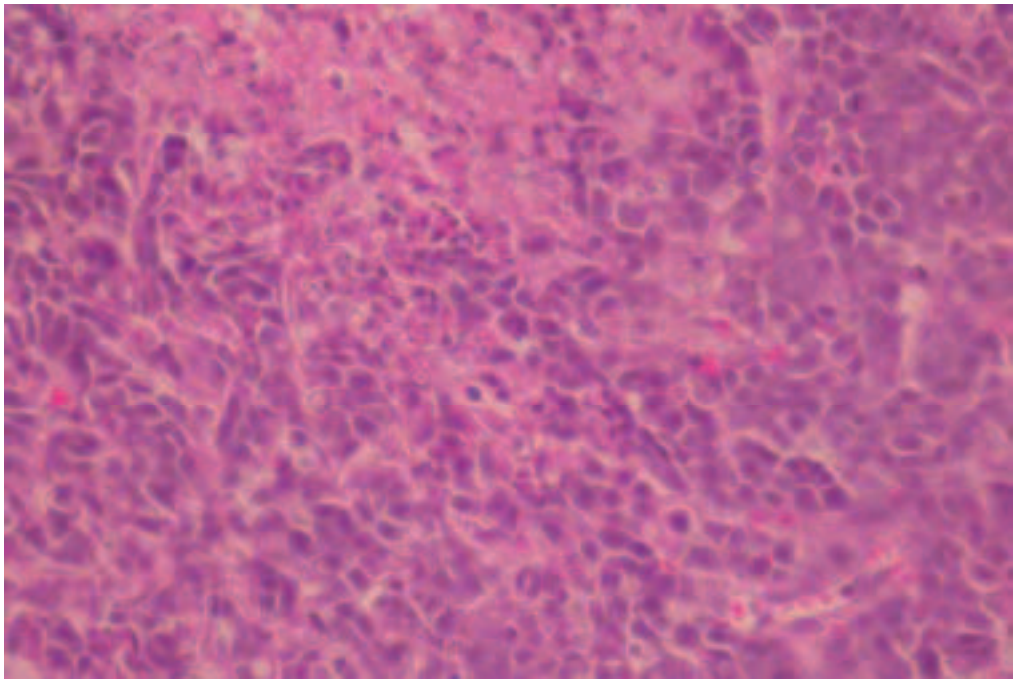

Figure 12 The pathological assessment (40×) of treatment group by H & E stain