

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

中草藥多醣體對肝癌免疫治療的探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-038-018-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學保健營養學研究所

計畫主持人：趙振瑞

計畫參與人員：江詩雯(研究生研究助理)

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告 期中進度報告

(計畫名稱)

中草藥多醣體對肝癌免疫治療的探討

Effect of Chinese herbal polysaccharides on immunotherapy in hepatocellular carcinoma

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-038-018-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

計畫主持人：趙振瑞

共同主持人：

計畫參與人員：江詩雯(碩士班研究助理)

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：臺北醫學大學保健營養學研究所

中華民國 92 年 10 月 31 日

中文摘要

行政院衛生署統計民國九十一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二十一年榜首，而肝癌更位居所有癌症死亡原因第一位，因此肝癌的治療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，且也有文獻探討這些植物中草藥所含多醣體為其有效成分。以兩種中草藥多醣包括：枸杞多醣(*Lycium barbarum* polysaccharides; LBP)與地黃多醣(*Rehmannia glutinosa* polysaccharide; RPS)，分別以不同劑量添加於老鼠(H-4-II-E)與人類(HA 22T/VGH)肝癌細胞以 MTS 分析試劑組測量細胞數目，以反應肝癌細胞增殖情形。結果顯示在給予 LBP 0.2 mg/mL 共同培養 12 小時後，發現較其他濃度有明顯抑制 H-4-II-E 之細胞增殖率 ($77.68\% \pm 13.99\%$)。在給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 24 及 48 小時後，結果顯示較第 12 小時有降低細胞增殖率 ($86.33\% \pm 21.9\%$ 及 $93.8\% \pm 4.85\%$ vs. $115.79\% \pm 9.68\%$)；另外在給予 RPS 0.05 mg/mL 共同培養 24 及 48 小時後，結果顯示較第 12 小時有降低細胞增殖率 ($91.85\% \pm 7.36\%$ 及 $100.25\% \pm 9.37\%$ vs. $116.46\% \pm 9.97\%$)。在給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 24 小時後，結果發現較其他濃度有明顯抑制 HA 22T/VGH 之細胞增殖率 ($62.69\% \pm 10.13\%$)；給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 48 小時後，結果較其他濃度有明顯抑制細胞增殖率 ($82.45\% \pm 10.59\%$)；對於 RPS 0.5 mg/mL 而言，在共同培養第 24 小時後，結果顯示與控制組降低細胞增殖率 ($70.5\% \pm 7.67\%$)；若培養 48 小時後降低細胞增殖率達 $76.02\% \pm 6.07\%$ 。在給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 24 小時後，抑制細胞增殖情形較培養 48 及 72 小時後效果較好；而 RPS 0.5 mg/mL 也具有相同結果。由本研究發現枸杞多醣與地黃多醣可分別抑制老鼠(H-4-II-E)與人類(HA 22T/VGH)肝癌細胞之增殖。

關鍵字：枸杞多醣、地黃多醣、肝癌、細胞增殖

英文摘要

The Department of Health reported that malignant tumor is the first place of death causes in 2002, and it has been twenty-one years at the first place. Among cancers, hepatocellular carcinoma (HCC) is the first place of death causes. Therefore, the therapy for HCC is one of the most important research focuses. Many of Chinese herbal had been used as Chinese traditional medicine on liver protection, antitumor, and improve immune functions. Also there are lots of researches reported that the main effective functions of Chinese herbal is polysaccharides. An *in vitro* study was conducted to investigate the effects of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) and *Rehmannia glutinosa* polysaccharide (RPS) on cell proliferation of hepatoma cells. After adding different concentrations of these Chinese herbal polysaccharides described above in rat (H-4-II-E) and human (HA 22T/VGH) hepatoma epithelial cells, cell proliferation was measured by using MTS assay kit. The results showed that cell proliferation ($77.68\% \pm 13.99\%$) of H-4-II-E cells was significantly inhibited by incubation with LBP (0.2 mg/mL) for 12 h. LBP (0.5 mg/mL) after 24- and 48-h incubation significantly decreased cell proliferation ($86.33\% \pm 21.9\%$ and $93.8\% \pm 4.85\%$ vs. $115.79\% \pm 9.68\%$) of H-4-II-E cells compared with that after 12-h incubation. Additionally, RPS (0.05 mg/mL) after 24- and 48-h incubation significantly decreased cell proliferation ($91.85\% \pm 7.36\%$ and $100.25\% \pm 9.37\%$ vs. $116.46\% \pm 9.97\%$) of H-4-II-E cells compared with that after 12-h incubation. LBP (0.5 mg/mL) significantly inhibited cell proliferation ($62.69\% \pm 10.13\%$ and $82.45\% \pm 10.59\%$) of HA 22T/VGH cells after 24- and 48-h incubation compared with other concentration of LBP. RPS (0.5 mg/mL) significantly inhibited cell proliferation ($70.5\% \pm 7.67\%$ and $76.02\% \pm 6.07\%$) of HA 22T/VGH cells after 24- and 48-h incubation compared with the control group. Both LBP and RPS (0.5 mg/mL) after 24-h incubation significantly decreased cell proliferation of HA 22T/VGH cells compared with that after 48- and 72-h incubation. In conclusion, *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) and *Rehmannia glutinosa* polysaccharide inhibited cell proliferation in both rat (H-4-II-E) and human (HA 22T/VGH) hepatoma epithelial cells.

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharides, *Rehmannia glutinosa* polysaccharides, hepatocellular carcinoma, proliferation

目錄

	頁數
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	8
六.參考文獻	10
七.計畫成果自評	12
八.附錄	13

前言

根據行政院衛生署最新之統計，民國九十一年十大死因排名第一名為惡性腫瘤，而惡性腫瘤連續蟬連二十一年的榜首，平均一天就有九十四人死於癌症；而在十大癌症總死因當中，肝癌更取代肺癌成為第一名的致死因子，因此在近年來，肝癌的治療以及預防即為國內許多研究的重點。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，同時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。在過去傳統的中醫藥研究中發現，一些常見的中草藥例如枸杞以及地黃等可以提高免疫反應及調節免疫功能異常等情形，甚至具有抑制腫瘤的發生的功效。

而在先前研究中已顯示枸杞及地黃單獨給予，其中的有效成分：多醣體具有抑制癌細胞增殖等效用，另外也有報導對於複方中藥如六味地黃湯(丸)所提取之多醣成分同樣具有上述保護功效，但尚未有研究探討同時給予枸杞及地黃的複方多醣是否具有抑制癌細胞增殖及提高免疫能力之加成效果，甚或決定出達到效果之最佳劑量為何。因此將利用體外實驗探討肝癌及免疫細胞株在給予不同劑量之單方及複方枸杞與地黃多醣後，對於肝癌細胞增殖及免疫功能改變等影響。

研究目的

探討枸杞多醣及地黃多醣的給予，對於肝癌細胞株細胞增殖及程式化凋亡之影響，以及評估免疫細胞株免疫功能與細胞增殖之結果；並由體外實驗決定出中草藥多醣之最佳作用劑量與組合，以做為未來動物實驗與臨床實驗之依據。

文獻探討

枸杞屬於茄科植物之乾燥成熟果實，依品種的不同可分為寧夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)、津枸杞(*Lycium chinese* Mill.)、新疆枸杞(*Lycium dasystemum* Jojank.)及北方枸杞(*Lycium chinense* Mill. Var. *potaninii* (Pojark.))，其中寧夏枸杞屬於常用之藥用枸杞，其富含高量的醣類、胡蘿蔔素及牛磺酸等，具有滋陰強壯、提高免疫機能、抑制腫瘤與明目等功效(東及賴, 1993)，因此在《本草綱目》中記載：『枸杞主五內邪氣，熱中消渴，周痺風濕，久服堅筋骨，輕身不老，耐寒暑，補精氣不足，確保長壽』。地黃為玄參科植物之新鮮或乾燥塊根，其中生地黃性寒味甘，可清熱涼血，具養陰生津的功效；其經過黃酒九蒸九曬後即為熟地黃，藥性為性溫味甘，具益精填髓的功效。

植物多醣體普遍存在生物體中，為多種內源性生物活性成分之重要組成，亦構成組織細胞骨架，與蛋白質、胜肽、脂質等結合以調節生理機能。研究指出，枸杞多醣(*Lycium barbarum* polysaccharides; LBP)是由六種單糖組合而成，分別為葡萄糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、木糖以及阿拉伯糖(何及張, 1995)；而地黃多醣(*Rehmannia glutinosa* polysaccharide; RPS)則是由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖及阿拉伯糖所構成(Chen et al., 1993)。這些中藥多醣已被證實具有免疫調節、抗腫瘤、抗病毒、調節造血功能以及抗氧化與延緩衰老等功能(聶及張, 1999)。

生物體內的免疫細胞主要可分為 T 淋巴球、B 淋巴球及天然殺手細胞(Nature killer cells; NK cells)；其中之 T 淋巴球又主分為兩種亞群，包括助手型 T 淋巴球(Helper T cell; T_H cell)與細胞毒殺型/抑制型 T 淋巴球(Cytotoxic/suppressor T cell; T_{C/S} cell)。T_H cell 之表面標記物為 CD 4，可分泌許多細胞激素，例如白細胞間質-2(Interleukin-2; IL-2)、白細胞間質-12(Interleukin-12; IL-12)等去幫助其他的淋巴球細胞展現功能，像是促進 B 淋巴球產生抗體、調節 T_{C/S} cell 的功能以及活化巨噬細胞等；而 CD 8 主要為 T_{C/S} cell 之表面標記物，其主要之功能為細胞毒殺及抑制 T_H cell 的作用。另外 B 淋巴球在接受抗原刺激或受到 T_H cell 的活化作用時，會移動到組織中形成漿細胞以產生大量抗體像是一些免疫球蛋白。而人體內的非特異性免疫反應由 NK cells 所展現，其主要可以毒殺腫瘤細胞以及吞噬被病毒感染之細胞(陳等, 2000)。

p53 蛋白質為一抑癌蛋白質(tumor suppressor protein)，其分子量為 53 kDa，由 393 個胺基酸所構成的磷酸蛋白，具有三個功能區：包括(1)Transcriptional activation domain、(2)DNA binding domain 以及(3)oligomerization domain (Chilosi et al., 1996)，當 DNA 受到傷害或組織缺氧等因素時，會使得 p53 蛋白質增加，並藉由調節許多基因像是 *bax*、*fas* 等之轉錄作用來抑制細胞增殖與促進細胞程式化凋亡(Kirsch and Kastan, 1998)。在腫瘤細胞中 p53 的 DNA

binding domain 為最常發生突變之位置，會使得其表現或功能受損而導致細胞無限制地生長，因此對於癌症的形成也具有重要的影響。

在枸杞多醣(LBP)的體外實驗中，以 LBP(10, 50, 250, 500 mg / L)添加於含 IL-2 之培養液，伴隨 Con A(concanavalin A)的給予作用在成鼠胸腺細胞，結果發現 LBP 可以促進成鼠胸腺細胞增殖；而作用在老年小鼠脾細胞，結果發現可促進 IL-2 所刺激其脾細胞增殖，其效果與成鼠相近，但研究亦發現，LBP 劑量越高，會使老年小鼠脾細胞增殖有降低趨勢(Geng et al., 1989)。動物實驗中，於正常小鼠給予 i.p. LBP(40 mg/kg/d 共 7 天)，可增加 Con A 誘導巨噬細胞抑制腫瘤細胞增殖活性(Zhang et al., 1989)；i.p. LBP(5 mg/kg/d 共 7 天)，可提高小鼠脾臟 T 細胞增殖，同時增強毒殺型 T 細胞(Tc cell)及天然殺手細胞(NK cell)之殺傷率；對於以環磷醯胺誘導的小鼠，i.p. LBP(5 mg/kg/d 共 7 天)，發現可對抗環磷醯胺所導致的 T、Tc 以及 NK 細胞之免疫抑制作用(Wang et al., 1990)。在臨床試驗中，針對 75 名癌症病患給予 LBP(1.7 mg/kg/d 共 4 週)與 LAK(lymphokine activated killer cell) /IL-2 的結合治療，結果發現 LBP 可促進 LAK/IL-2 對癌症的有效治癒率，同時也可促進 LAK 與 NK 細胞的活性(Cao et al., 1994)。

在地黃多醣(RPS)的體外實驗中，以 RPS-b (50, 100, 200 mg / L)伴隨 Con A 添加於正常小鼠脾淋巴細胞液共 3 天，發現隨著 RPS-b 劑量增加，促進 Con A 誘導之脾細胞增殖反應也會增加(Chen et al., 1994)；RPS-b (0.1~0.5 g/L)可增加 Lewis 肺癌細胞中 p53 基因的表現(魏及茹, 1997)。動物實驗中，於正常小鼠 i.p. RPS-b (10, 20, 40 mg / kg / d 共 8 天)，有促進 T 細胞增殖反應(Chen et al., 1994)；給予 S180 肉瘤小鼠 i.p. RPS-b (10, 20 mg / kg / d 共 8 天)，提昇其 T 細胞分泌 IL-2 量並提高 Tc 細胞活性，同時降低肉瘤細胞重量(Chen et al., 1993；1994)；在劑量 20 mg / kg / d 時，對於 Lewis 肺癌、B16 黑色素瘤及 H22 肝癌小鼠也具有 40 % 之抑瘤率(Chen et al., 1993)。而使用低分子量之地黃多醣(100 mg/kg/d 共 8 天)可明顯增加 Lewis 肺癌小鼠 *c-fos* 的表現，並減少 *c-myc* 的表現(魏等, 1998)。

在複方多醣如六味地黃多醣 CA4-3B (0.09, 0.36, 1.8 mol/L)及 P-3 (0.34, 1.36, 6.8 mol/L)均可促進體外正常及衰老小鼠脾細胞增殖反應，且 CA4-3B (0.09 mol/L)可促進綿羊紅血球所誘導之正常小鼠脾中抗體形成細胞數目(齊等, 1999a)。在 P-3 (2.5, 10, 50 mg/L)與 L1210 腫瘤細胞共同作用 48 小時後發現可抑制其增殖作用，抑制率約 40%；CA4-3B (50 mg/L)與 HL60 共同作用 96 小時後，發現輕微抑制其增殖反應，抑制率約 16.6 % (齊等, 1999b)。

研究方法

4

【實驗流程】

主要分為兩個階段，第一階段以肝癌細胞株進行實驗，評估多醣對於肝癌細胞增殖及程式化凋亡的影響，以決定出單方與複方多醣最有效劑量組合與作用時間。第二階段以上述所得之最有效單方與複方多醣以淋巴癌細胞株進行免疫功能評估、細胞增殖及程式化凋亡的影響。

【植物多醣製備】

選用品質良好之寧夏枸杞及熟地黃各 100 g，分別浸泡在 1 L 之去離子水，溫度維持 100°C 加熱 2 小時，取得中藥汁液後再以 9000 ×g 離心 20 分鐘，將上清液取出以 3 倍體積之酒精沉澱，所得的沉澱物再進行冷凍乾燥後即可得中草藥多醣粗萃取物(梁等, 2000)。

植物多醣萃取物成分分析：將熱鹼萃取之多醣取部分進行水分、總醣含量、還原醣、醣醛酸、蛋白質、脂肪及灰分測定以確定其一般成分。

【實驗設計】

第一階段：

實驗細胞株：自食品工業發展研究所購得人類肝癌細胞株 HA 22T/VGH 及老鼠肝癌細胞株 H-4-II-E，購得後依照其培養條件進行繼代培養：培養基分別為 90% DMEM + 10% FBS + 20 mM L-glutamine + 100 μM non-essential amino acids 及 80% MEM + 10% FBS + 10% CS，並於 37 °C、5% CO₂ 環境下培養，最後選擇型態良好穩定之細胞進行實驗。

單方多醣給予劑量與作用時間：中草藥多醣溶於含血清之細胞培養液中；單方給予劑量為：枸杞多醣與地黃多醣分別各 0.05 或 0.2 或 0.5 mg/mL，控制組則以培養基取代；在給予單方多醣前，肝癌細胞先以無血清培養液培養 24 小時，再添加不同劑量之單方多醣於 37 °C，5% CO₂ 環境下(每種劑量各六重覆)與細胞共同培養 12、24、48 及 72 小時後收集細胞待測。

複方多醣給予劑量與作用時間：中草藥多醣溶於含血清之細胞培養液中；複方給予劑量組合與作用時間以上述所得之最有效結果來決定，主要分為三種劑量組合組包括：組合一：枸杞多醣與地黃多醣等量；組合二：枸杞多醣較地黃多醣高量；組合三：地黃多醣較枸杞多醣高量；控制組則以培養基取代。在給予複方多醣前，肝癌細胞先以無血清培養液培養 24 小時，再添加不同劑量組合之複方多醣於 37°C，5% CO₂ 環境下(每種劑量組合各六重覆)與細胞共同培養 24 小時後收集細胞待測。

測定項目：利用分光光度計以 MTS (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)測定法測定細胞增殖情形；以 LDH (lactate dehydrogenase)漏出率來測定細胞毒性；以流式細胞儀利用螢光標定法(以 annexin-V-fluorescein isothiocyanate 螢光試劑組)來檢測凋亡細胞數目與凋亡發生時期；並以西方墨點法分析 p53 蛋白質含量。

第二階段：

評估多醣對 T 細胞之影響

實驗細胞株：自食品工業發展研究所購得人類免疫細胞株 HH 及小鼠免疫細胞株 EL4.IL-2，購得後依照其培養條件進行繼代培養：培養基分別為 90% RPMI 1640+10% FBS 及 90% DMEM+10% HS，並於 37°C、5% CO₂ 環境下培養，最後選擇型態良好穩定之細胞進行實驗。

單方及複方多醣給予劑量組合與作用時間：中草藥多醣溶於含血清之細胞培養液中；單方與複方給予劑量組合由第一階段所得之最有效結果來決定，主要分為四組：第一組：單方枸杞多醣最適劑量組；第二組：單方地黃多醣最適劑量組；第三組：複方枸杞及地黃多醣最適劑量組；第四組：控制組以培養基取代。另做一批伴隨 20 μg / mL PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)的給予，依照上述四組分別再進行一次重覆實驗。在給予單方及複方多醣前，免疫細胞先以無血清培養液培養 24 小時，再添加不同劑量組合之複方多醣於 37°C，5 % CO₂ 環境下(每種劑量組合各六重覆)與細胞共同培養 24 小時後收集細胞待測。

測定項目：利用分光光度計以 MTS 測定細胞增殖情形；以 LDH leakage 測定細胞毒性；以流式細胞儀測定 CD4⁺(T_H之表面標記)與 CD8⁺(T_C之表面標記)之比值，以檢測 T 淋巴細胞亞群分佈情形；另以酵素免疫分析法測定細胞激素 IL-2 含量。

評估多醣對 B 細胞之影響

實驗細胞株：自食品工業發展研究所購得人類免疫細胞株 MC116 及小鼠免疫細胞株 2PK-3，購得後依照其培養條件進行繼代培養：培養基分別為 80% RPMI 1640+20% FBS 及 90% DMEM+10% FBS，並於 37°C、5% CO₂ 環境下培養，最後選擇型態良好穩定之細胞進行實驗。

單方及複方多醣給予劑量組合與作用時間：中草藥多醣溶於含單方及複方多醣給予劑量組合與作用時間：植物多醣溶於無血清之細胞培養液中；單方與複方給予劑量組合由第一階段所得之最有效結果來決定，主要分為四組：第一組：單方枸杞多醣最適劑量組；第二組：單方地黃多醣最適劑量組；第三組：複方枸杞及地黃多醣最適劑量組；第四組：控制組以培養基取代。在給予單方及複方多醣前，免疫細胞先以無血清培養液培養 24 小時，再添加不同劑量

組合之複方多醣於 37°C，5 % CO₂ 環境下(每種劑量組合各六重覆)與細胞共同培養 24 小時後收集細胞待測。

測定項目：利用分光光度計以 MTS 測定細胞增殖情形；以 LDH leakage 測定細胞毒性；另以酵素免疫分析法測定免疫球蛋白含量。

【統計分析】

數據皆以 mean ± SD 表示；以 SAS(8.0 版)進行統計分析；並以 one-way 及 two-way ANOVA 與 Tukey test 進行相關性與組間差異比較； $P < 0.05$ 時表示具有統計上意義。

結果與討論

LBP 及 RPS 萃取率：

利用前述之萃取流程所得之 LBP 與 RBP 之可獲率分別為 70.4% 以及 72.41%。

不同濃度之 LBP 與 RPB 對於 H-4-II-E 細胞增殖情形：

在給予 LBP 0.2 mg/mL 共同培養 12 小時後，結果發現較其他濃度有明顯抑制 H-4-II-E 之細胞增殖率 ($77.68\% \pm 13.99\%$; fig.1)；對於 RPS 而言，在共同培養第 12 小時後，結果顯示 RPS 0.2 mg/mL 較控制組而言提高細胞增殖率 ($132.58\% \pm 23.73\%$; fig.4)。

不同時間點下 LBP 與 RPB 對於 H-4-II-E 細胞增殖情形：

在給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 24 及 48 小時後，結果顯示較第 12 小時有降低細胞增殖率 ($86.33\% \pm 21.9\%$ 及 $93.8\% \pm 4.85\%$ vs. $115.79\% \pm 9.68\%$; fig.7)；另外在給予 RPS 0.05 mg/mL 共同培養 24 及 48 小時後，結果顯示較第 12 小時有降低細胞增殖率 ($91.85\% \pm 7.36\%$ 及 $100.25\% \pm 9.37\%$ vs. $116.46\% \pm 9.97\%$; fig.8)；RPS 0.2 mg/mL 共同培養 24 及 48 小時後，結果也顯示較第 12 小時降低細胞增殖率 ($96.52\% \pm 11.67\%$ 及 $96.14\% \pm 4.74\%$ vs. $132.58\% \pm 23.73\%$; fig.8)。

不同濃度之 LBP 與 RPB 對於 HA 22T/VGH 細胞增殖情形：

在給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 24 小時後，結果發現較其他濃度有明顯抑制 HA 22T/VGH 之細胞增殖率 ($62.69\% \pm 10.13\%$; fig.9)；給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 48 小時後，結果較其他濃度有明顯抑制細胞增殖率 ($82.45\% \pm 10.59\%$; fig.10)；對於 RPS 0.5 mg/mL 而言，在共同培養第 24 小時後，結果顯示與控制組降低細胞增殖率 ($70.5\% \pm 7.67\%$; fig.12)；若培養 48 小時後降低細胞增殖率達 $76.02\% \pm 6.07\%$ (fig.13)。

不同時間點下 LBP 與 RPB 對於 HA 22T/VGH 細胞增殖情形：

結果顯示在給予 LBP 0.5 mg/mL 共同培養 24 小時後，抑制細胞增殖情形較培養 48 及 72 小時後效果較好(fig.15)；而 RPS 0.5 mg/mL 也具有相同結果(fig.16)。

在現階段之實驗成果中可看到：在人類肝癌細胞株 HA 22T/VGH 中對於枸杞及地黃多醣的給予較老鼠肝癌細胞株 H-4-II-E 具有一致性的結果，無論是給予枸杞多醣或是地黃多醣共同培養 24 或 48 小時之後，隨著多醣劑量的增加，抑制肝癌細胞增殖的情形也較明顯。

而在本體外實驗之預期結果為在給予枸杞多醣以及地黃多醣不論是單方或複方的給予，在共同培養不同時間後，期望看到降低肝癌細胞增殖及存活率；此外也推測是藉由增加 p53 之表現所誘導癌細胞程式化凋亡的結果。另外也假設單方及複方多醣的給予確實明確提高免疫能力，包括提高免疫細胞的存活率以增加 T_H 細胞與 B 細胞之含量，進而增加細胞激素 IL-2 以及免疫球蛋白之分泌量；並期望複方較單方給予所產生的效果較好。

藉由體外實驗初步決定給予枸杞多醣及地黃多醣之最佳劑量組合，進一步作為日後相似動物模式實驗之依據，甚或作為未來應用於臨床試驗輔助肝癌之治療等參考。

參考文獻

1. Cao GW, Yang WG and Du P (1994) Observation of the effect of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) in combination with LAK/IL-2 therapy in the treatment of 75 cancer patients. Chin J Oncol 16: 428-431
2. Chen LZ, Feng XW, and Zhou JH (1994) Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides b on T lymphocyte function in normal and S180 tumor bearing mice. Chin J Pharmacol Toxicol 8: 125-127
3. Chen LZ, Feng XW, Zhou JH and Tang JF (1993) Immunotumoricidal effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides b and its mechanism. Chin J Pharmacol Toxicol 7: 153-156
4. Chilosi M, Doglioni C and Magalini A (1996) p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas : a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. Blood 88: 4012-4020
5. Ghen CS, Xing ST Zhou JH and Chu BM (1989) Enhancing effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the interleukin-2 activity in mice. Chin J Pharmacol Toxicol 3: 175-179
6. Kirsch DG and Kastan MB (1998) Tumor suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. J Clin Oncol 16: 3158-3168
7. Wang BK, Xing ST and Zhou JH (1990) Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on the immune response of T, TL and NK cells in normal and cyclophosphamide-treated mice. Chin J Pharmacol Toxicol 4: 39-43
8. Zhang YX, Xing ST and Zhou JH (1989) Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides and their combination with *Corynebacterium parvum* on the tumoricidal activity of peritoneal macrophages in mice. Clin J Pharmacol Toxicol 3: 169-174
9. 王汀、陳禮明、劉青雲 (2001) 地黃藥理研究進展。基礎中藥雜誌 15: 41-43
10. 何進、張聲華 (1995) 枸杞及枸杞多醣研究(I)。食品科學 16: 14-21
11. 東丈夫、賴榮祥 (1993) 枸杞之知識。生藥資訊 1: 1-7
12. 張永祥、邢善田、周金黃 (1989) 枸杞子多醣及合併應用厭氧短棒桿菌菌苗對小鼠腹腔巨噬細胞抑制腫瘤增殖活性的影響。中國藥理學與毒理學雜誌 3: 174-176
13. 齊春會、張永祥、喬善義、陳保文、姚新生、周金黃 (1999) 六味地黃多醣體外對正常及衰老小鼠脾細胞免疫功能的影響。中國藥理學通報 15: 157-160
14. 齊春會、張永祥、李鳳仙、喬善義、姚新生、山田陽城 (1999) 六味地黃多醣體外抗腫瘤的初步研究。中國藥理學通報 15: 322-325

15. 聶偉、張永祥 (1999) 多糖的免疫調節作用及其作用機制研究進展。中國藥理學通報 15: 484-487
16. 魏小龍、茹祥斌 (1997) 低分子量地黃多醣對 P53 基因表達的影響。中國藥理學通報 18: 471-474
17. 魏小龍、茹祥斌 (1998) 低分子量地黃多醣體外對 Lewis 肺癌細胞 P53 基因表達的影響。中國藥理學通報 14: 245-247
18. 魏小龍、茹祥斌、劉福君 (1998) 低分子量地黃多醣對癌基因表達的影響。中國藥理學與毒理學雜誌 12: 159-163
19. 陳建和、楊沂淵、呂思潔 (2000) 實用免疫學，pp. 180-191，藝軒出版社，台北市。
20. 梁雅婷、毛正倫 (2002) 枸杞之抗氧化與抗致突變性質及其多醣組成分析，pp. 58-61，國立中興大學食品科學系碩士論文，台中市。

計畫成果自評

本實驗所萃取之 LBP 及 RPS 將繼續進一步進行進行中草藥指標成分鑑定與一般成分分析，分析項目包括水分、灰分、脂肪、纖維質、蛋白質、總糖含量、還原糖含量、醣醛酸、中性單醣組成分，同時進行分子量測定以及分析，以確定所投予之中藥多醣組成分。

目前持續進行第一階段後續之實驗；將探討 LBP 與 RPS 對於肝癌細胞株 H-4-II-E 以及 HA 22T/VGH 之細胞毒性；並以流式細胞儀來檢測凋亡細胞數目與凋亡發生時期；且使用西方墨點法分析 p53 蛋白質含量。藉由第一階段所得之最有效單方與複方多醣劑量組合，以進行第二階段實驗：探討單方與複方多醣對於免疫細胞株之細胞增殖、細胞激素分泌量與免疫球蛋白產生量等免疫功能之評估。

附錄

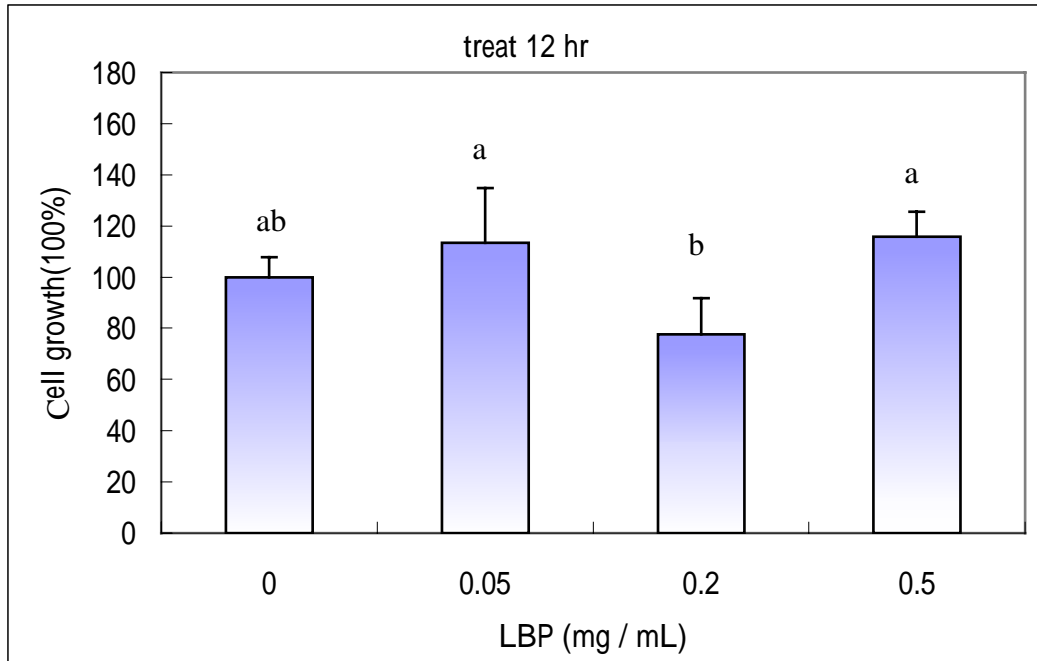


Fig.1 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on H-4-II-E cells after 12 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

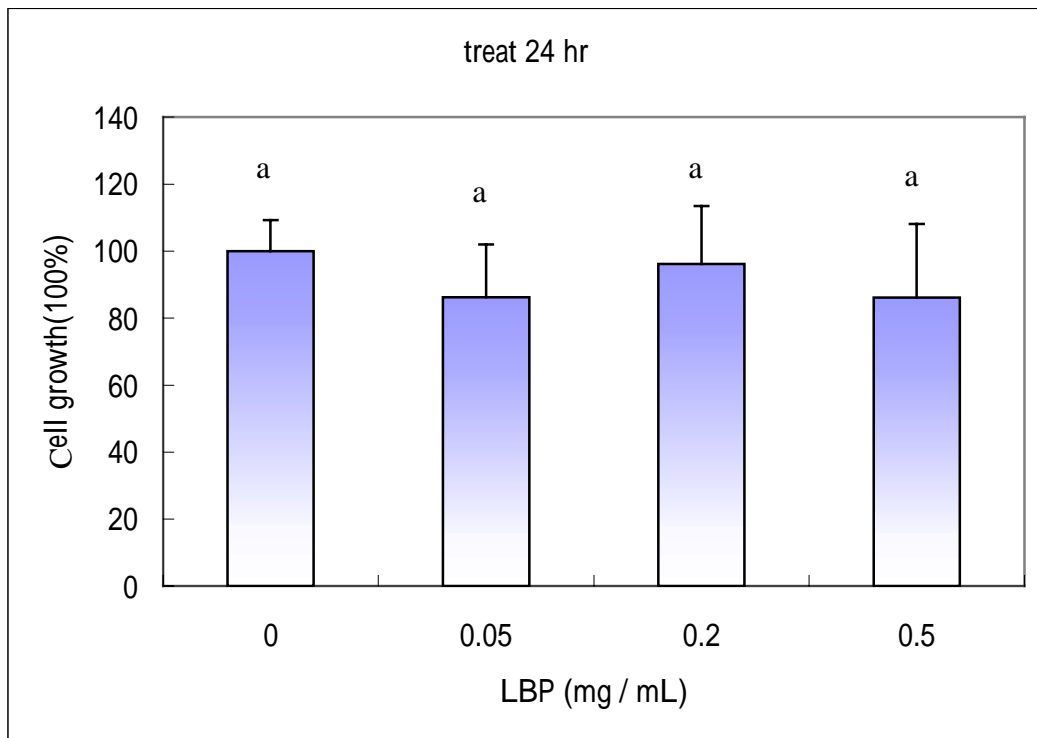


Fig.2 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on H-4-II-E cells after 24 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

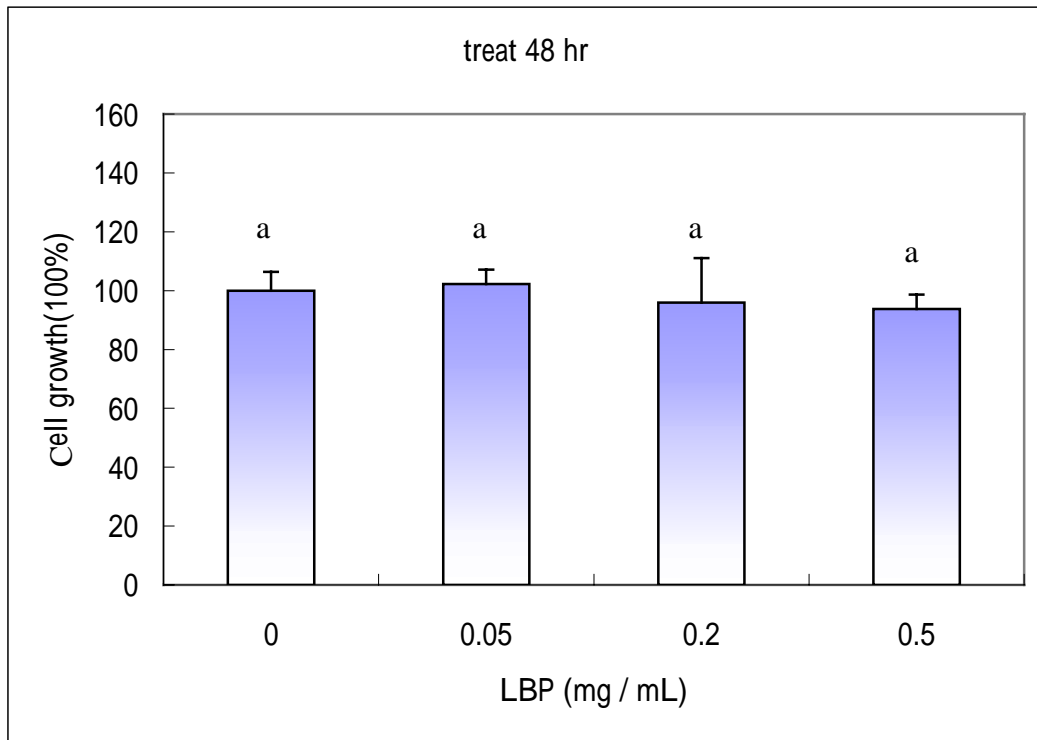


Fig.3 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on H-4-II-E cells after 48 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

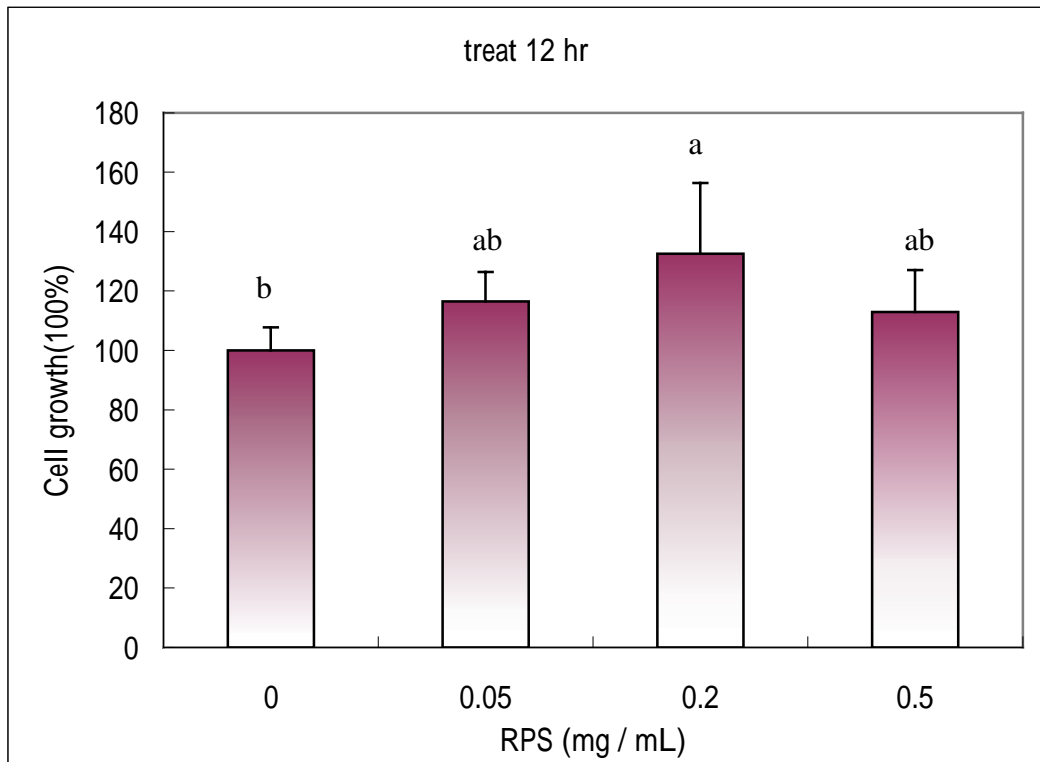


Fig.4 Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on H-4-II-E cells after 12 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

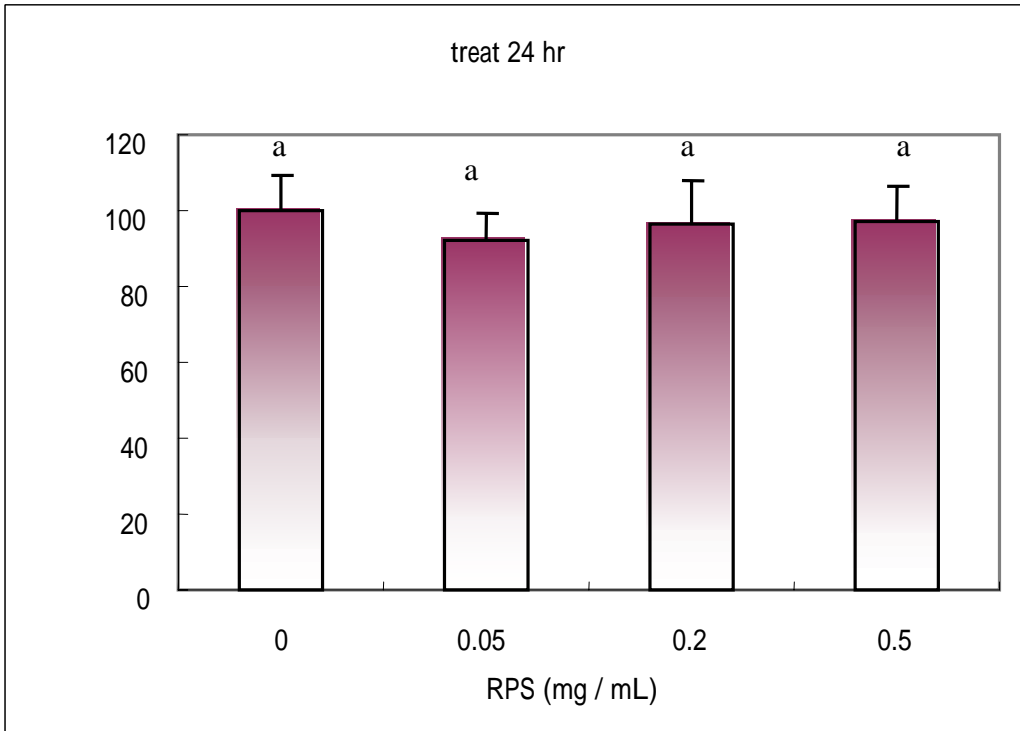


Fig.5 Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on H-4-II-E cells after 12 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

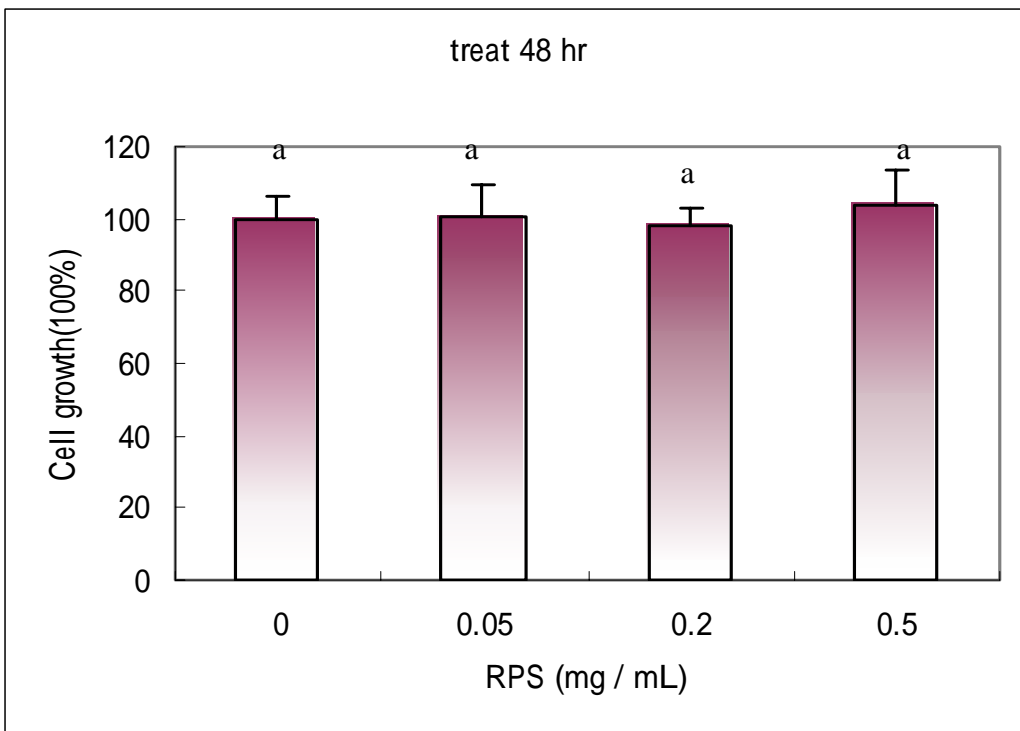


Fig.6 Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on H-4-II-E cells after 48 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

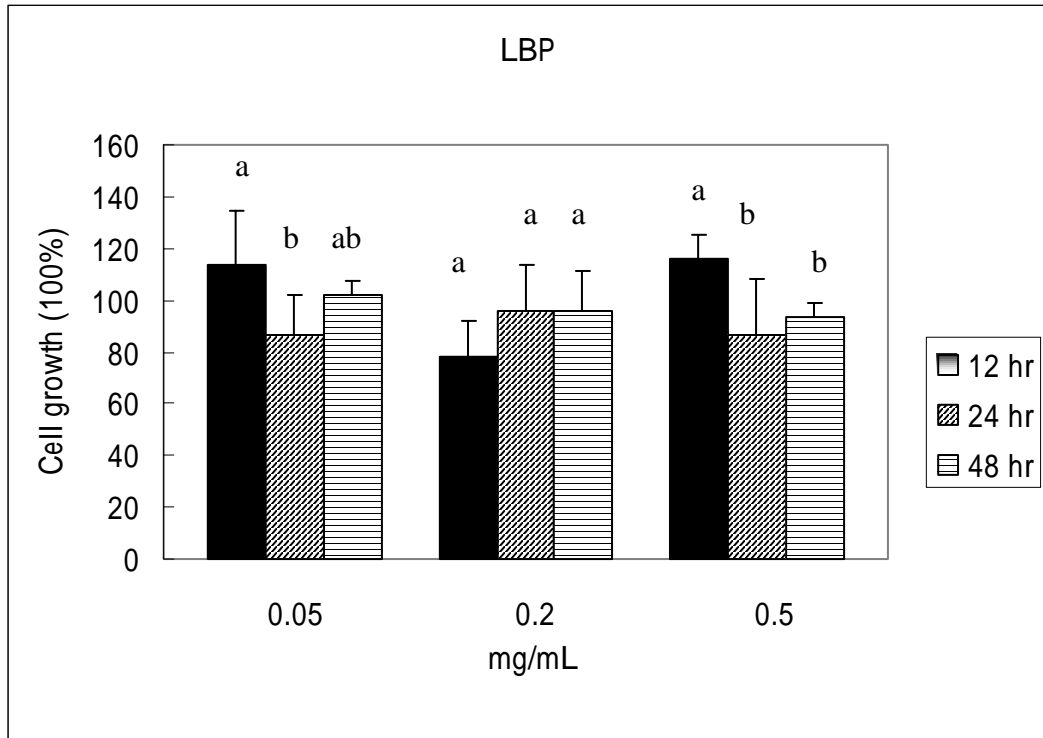


Fig.7 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on H-4-II-E cells after 12, 24 and 48 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

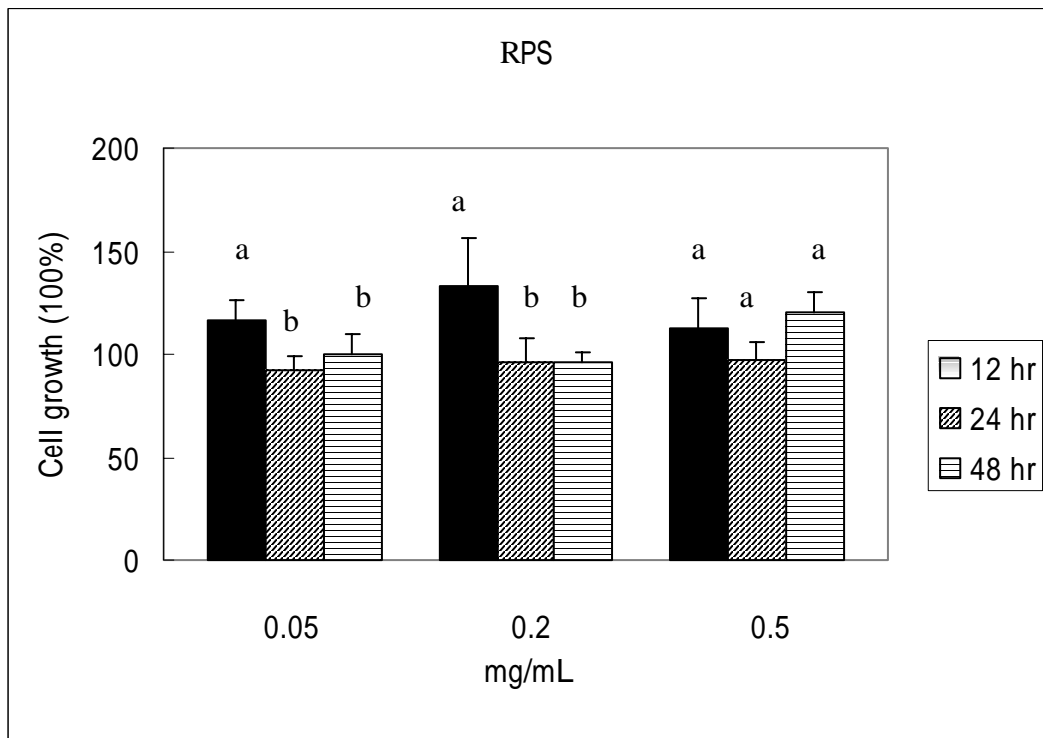


Fig.8 Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on H-4-II-E cells after 12, 24 and 48 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

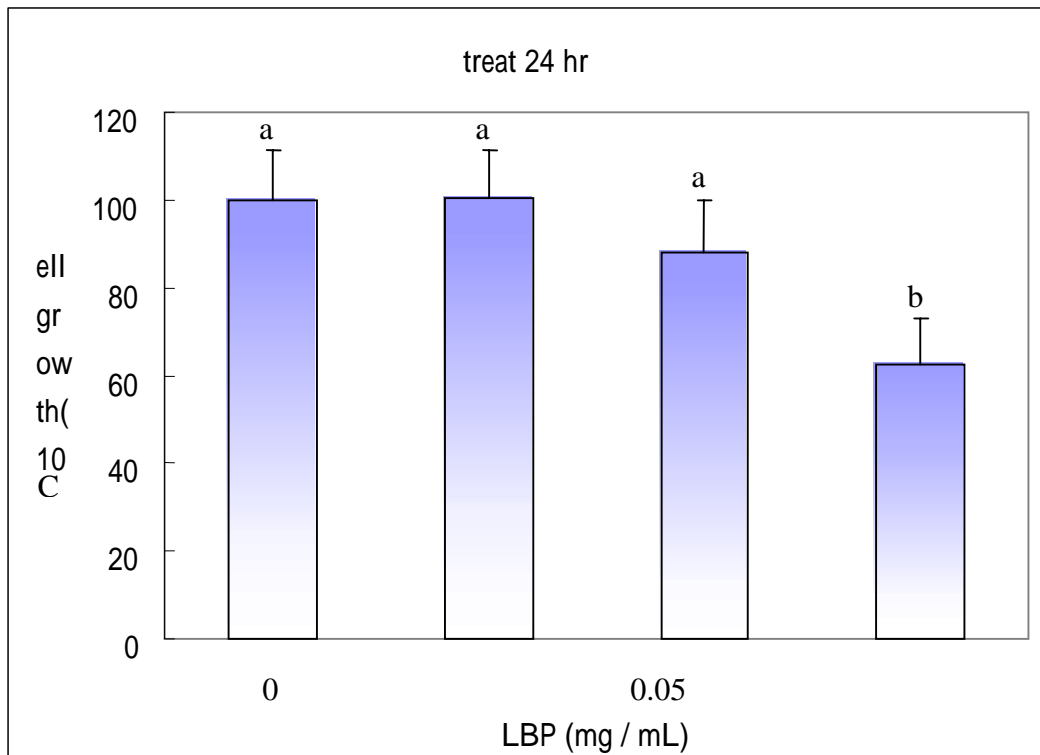


Fig.9 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 24 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p<0.05$.

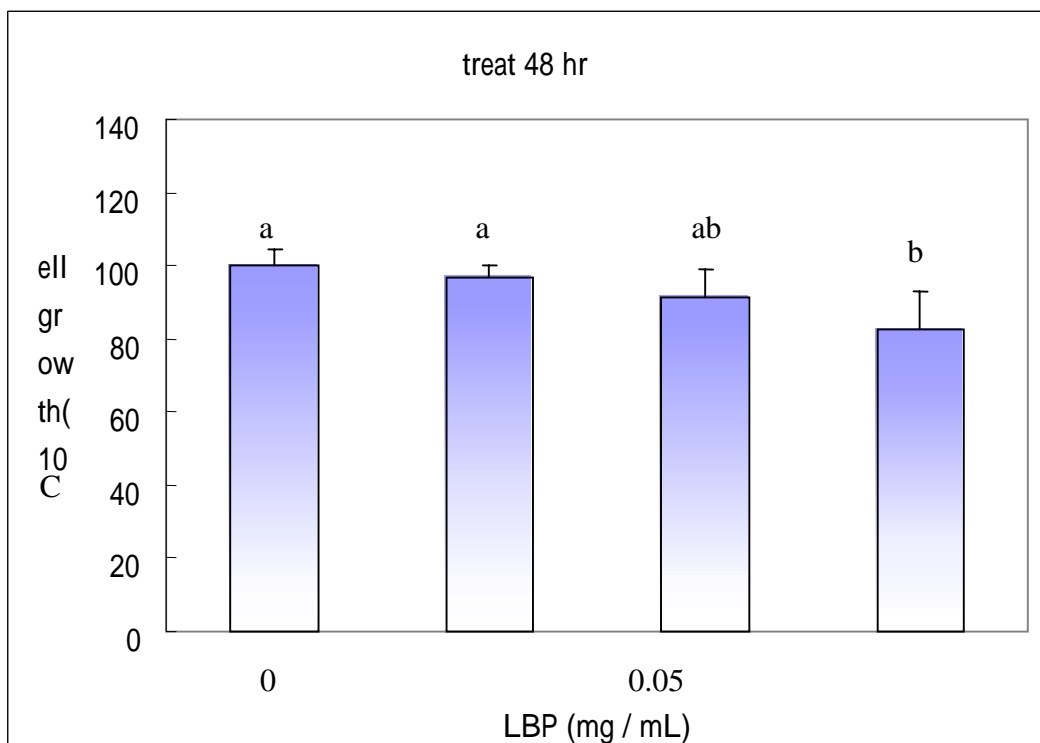


Fig.10 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 48 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p<0.05$.

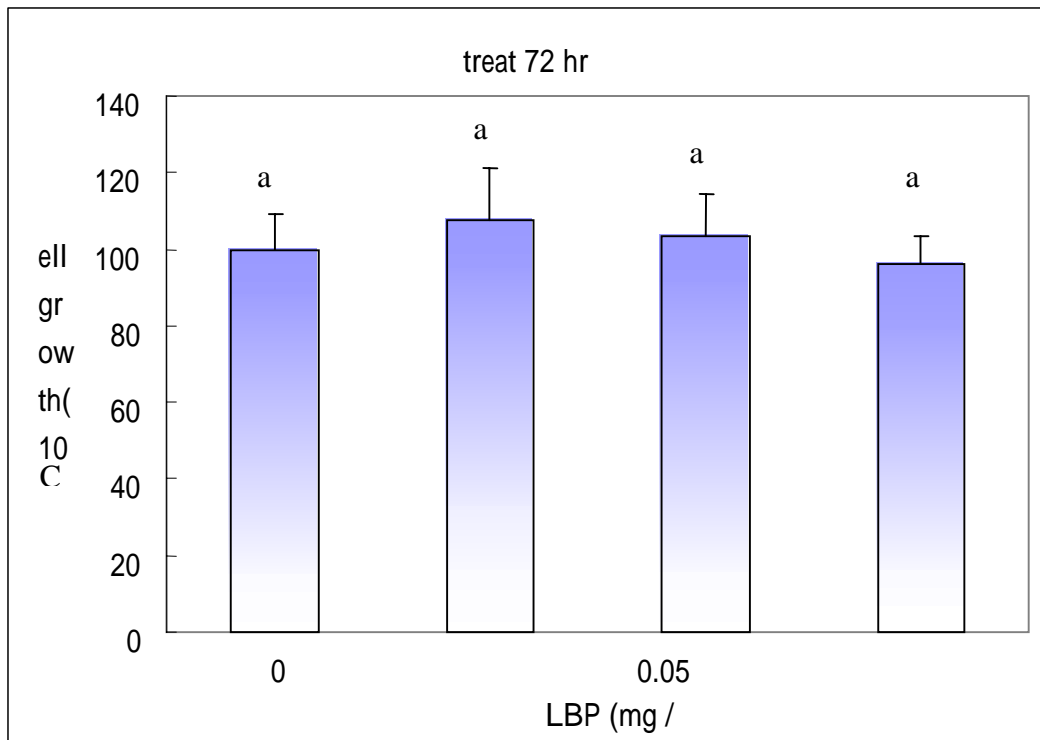


Fig.11 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 72 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p<0.05$.

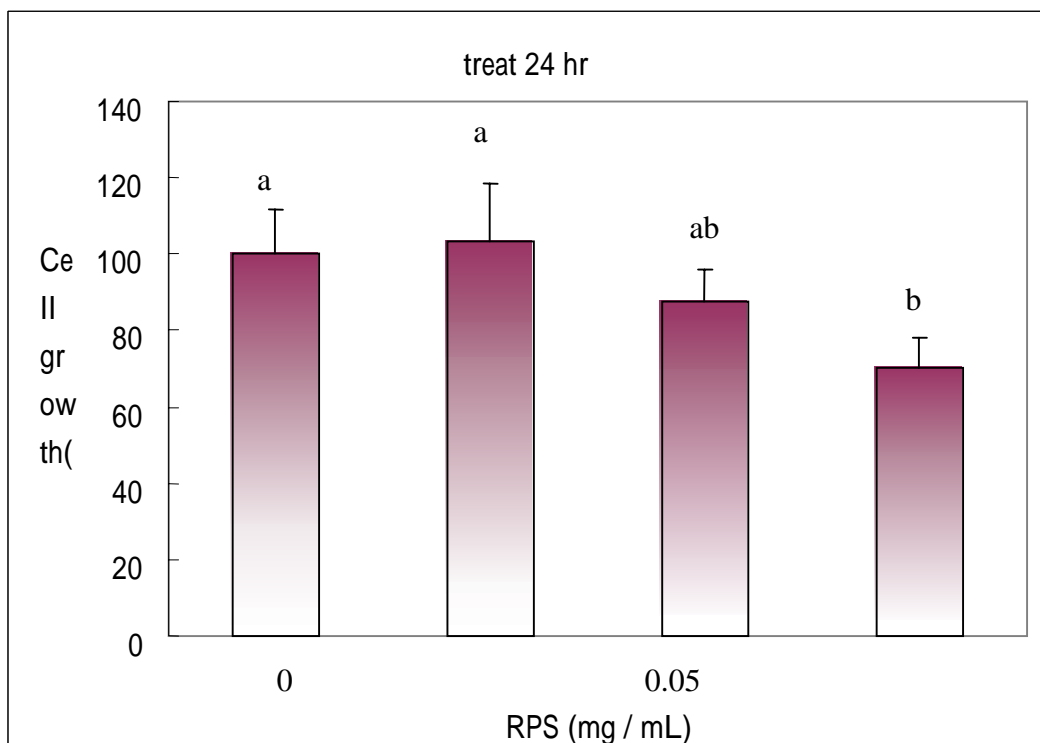


Fig.12 Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 24 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p<0.05$.

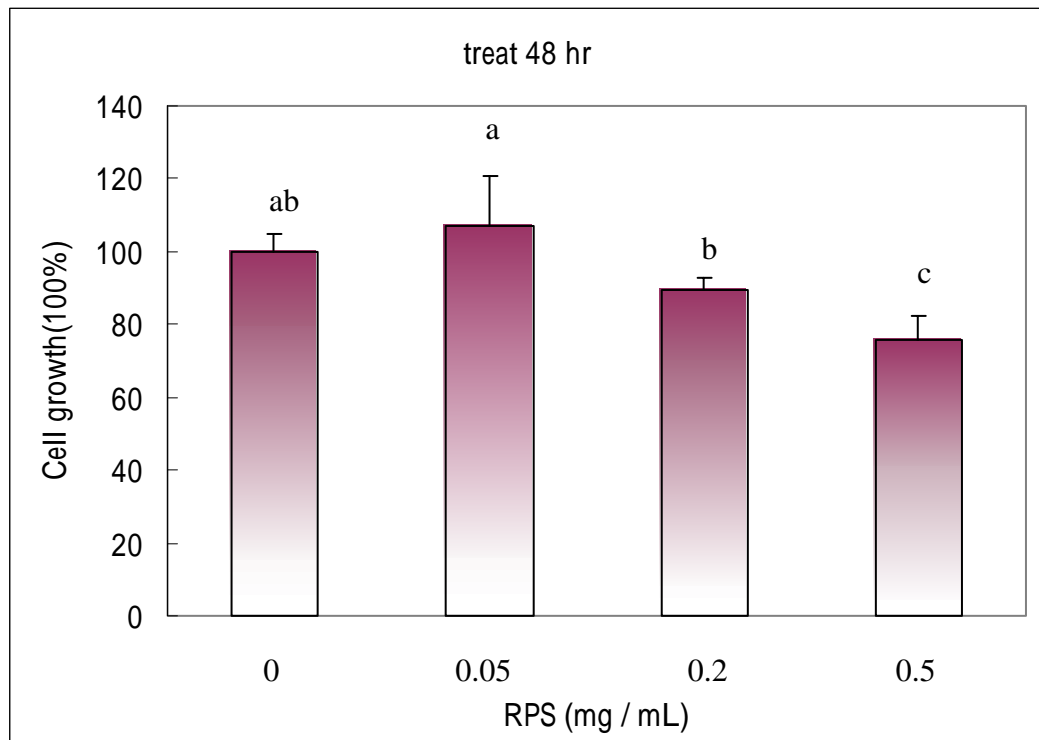


Fig.13 Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 48 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

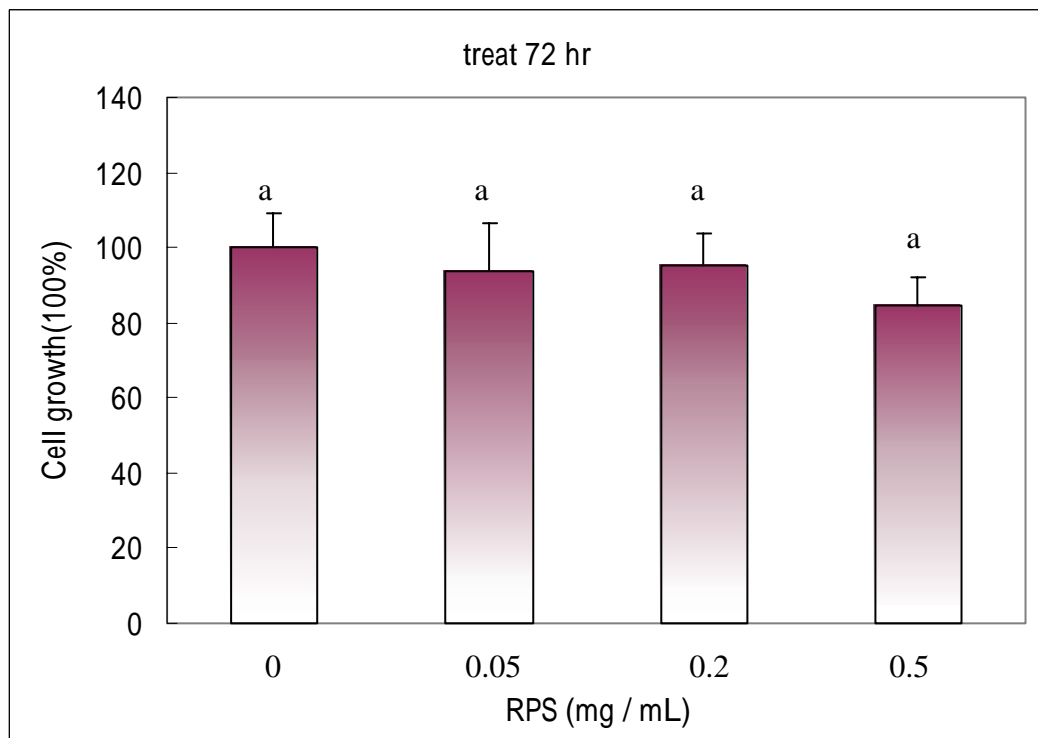


Fig.14 Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 72 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p < 0.05$.

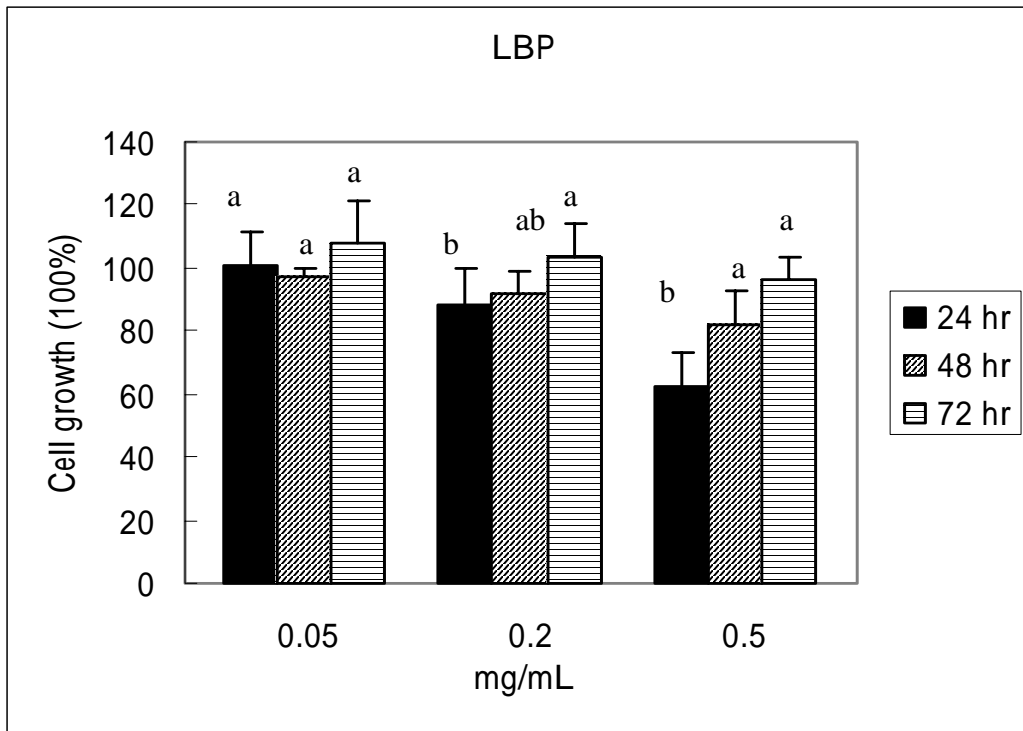


Fig.15 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 24, 48 and 72 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p<0.05$.

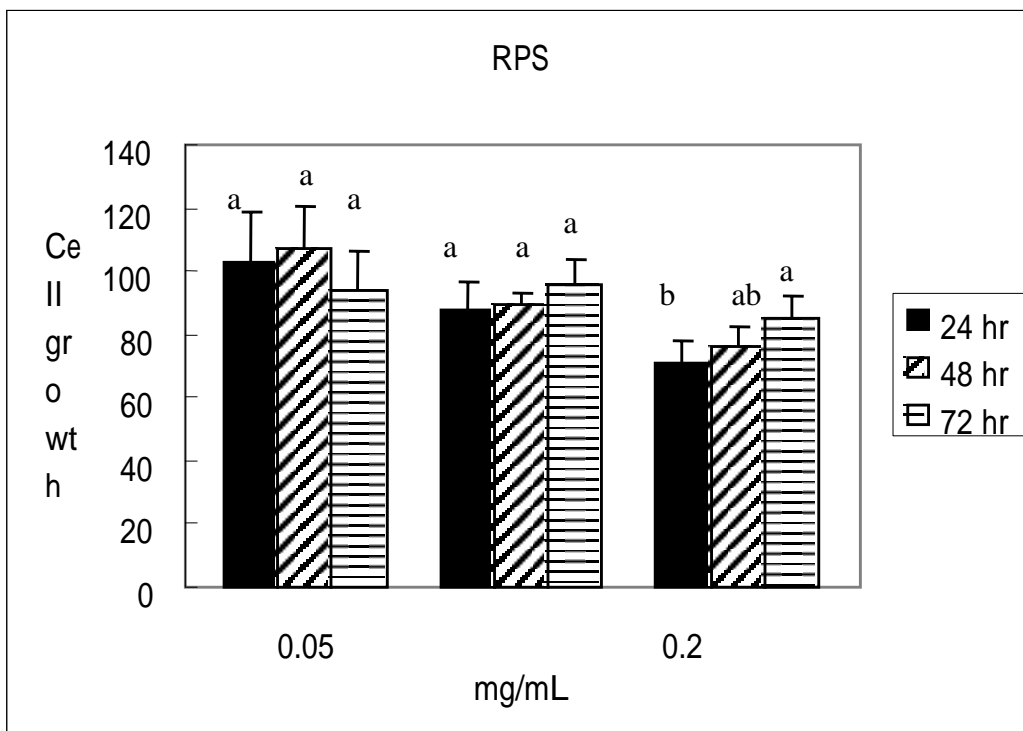


Fig.16 Effects of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on HA 22T/VGH cells after 24, 48 and 72 hr. All values are mean \pm SD (n=6). Values not sharing with the same letter significantly differ at $p<0.05$.